

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7684788号
(P7684788)

(45)発行日 令和7年5月28日(2025.5.28)

(24)登録日 令和7年5月20日(2025.5.20)

(51)国際特許分類

A 6 1 K	38/16 (2006.01)	F I	A 6 1 K	38/16	Z N A
A 6 1 K	31/155 (2006.01)		A 6 1 K	31/155	
A 6 1 K	31/4965 (2006.01)		A 6 1 K	31/4965	
A 6 1 K	38/28 (2006.01)		A 6 1 K	38/28	
A 6 1 P	3/10 (2006.01)		A 6 1 P	3/10	

請求項の数 10 (全70頁)

(21)出願番号	特願2018-562995(P2018-562995)
(86)(22)出願日	平成29年5月31日(2017.5.31)
(65)公表番号	特表2019-520341(P2019-520341)
	A)
(43)公表日	令和1年7月18日(2019.7.18)
(86)国際出願番号	PCT/CN2017/086558
(87)国際公開番号	WO2017/206898
(87)国際公開日	平成29年12月7日(2017.12.7)
審査請求日	令和2年5月19日(2020.5.19)
審判番号	不服2022-16385(P2022-16385/J 1)
審判請求日	令和4年10月13日(2022.10.13)
(31)優先権主張番号	201610370442.4
(32)優先日	平成28年5月30日(2016.5.30)
(33)優先権主張国・地域又は機関	最終頁に続く

(73)特許権者	516004798 上海賀普薬業股 分有限公司 S H A N G H A I H E P P H A R M A C E U T I C A L C O . , L T D . 中華人民共和国 2 0 1 2 0 3 上海市浦東 新区蔡倫路 7 2 0 号 1 号樓 6 0 1 室 R O O M 6 0 1 , B U I L D I N G 1 , N O . 7 2 0 , C A I L U N R D , P U D O N G N E W A R E A , S H A N G H A I 2 0 1 2 0 3 , P . R . C H I N A
(74)代理人	110001195 弁理士法人深見特許事務所
(72)発明者	リウ, ホンリー 中華人民共和国 2 0 1 2 0 3 上海市浦東 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 代謝疾患を治療する組成物と方法

(57)【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

それを必要とする対象における高血糖または2型糖尿病の治療または予防方法に使用するための、ポリペプチドを含む薬学組成物であって、

ここにおいて、上記ポリペプチドはSEQ ID NO: 21 - 40から選ばれたアミノ酸配列、または、SEQ ID NO: 21 - 40から選ばれたアミノ酸配列と少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有する、薬学組成物。

【請求項 2】

上記ポリペプチドはSEQ ID NO: 1 - 20から選ばれたアミノ酸配列、または、SEQ ID NO: 1 - 20から選ばれたアミノ酸配列と少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有する、請求項1に記載の薬学組成物。

【請求項 3】

上記ポリペプチドは、N-末端および/またはC-末端に、HBVのpre-S1領域からの天然フランキングアミノ酸配列を含む、請求項1に記載の薬学組成物。

【請求項 4】

HBVのpre-S1領域からの天然フランキングアミノ酸配列は1-10、1-8、1-5、または1-3個アミノ酸の長さを有する、請求項3に記載の薬学組成物。

【請求項 5】

上記ポリペプチドは、N-末端修飾に疎水基を有する、および/または、上記ポリペプチドを安定化できるC-末端修飾を含む、請求項1～4のいずれか1項に記載の薬学組成

物。

【請求項 6】

上記疎水基は、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、コレステロールおよびアラキドン酸から選ばれ、上記C - 末端修飾は、アミド化（アミノ化）またはイソペンタンジオール化である、請求項5に記載の薬学組成物。

【請求項 7】

上記ポリペプチドはSEQ ID NO: 23を含み、ここにおいて上記ポリペプチドはさらにN - 末端修飾にミリスチン酸およびC - 末端修飾にアミノ化を有する；または、ここにおいて上記ポリペプチドはSEQ ID NO: 3を含む、請求項1に記載の薬学組成物。

10

【請求項 8】

上記ポリペプチドを含む薬学組成物は、治療的有効量の抗高血糖剤の投与の前、同時、後に、対象に投与される、請求項1に記載の薬学組成物。

【請求項 9】

上記抗高血糖剤は、インスリン、メトホルミンおよびグリビジドから選ばれる、請求項8に記載の薬学組成物。

【請求項 10】

上記ポリペプチドを含む薬学組成物は、腸管外、肺内、鼻腔内、病巣内、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内および皮下投与から選ばれる少なくとも一つのモードで、対象に投与される、請求項1に記載の薬学組成物。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、ASCII形式で電子的に提出された配列表を含み、その全体は、本明細書に組み込まれる。上記ASCIIファイルは、2016年4月14日に作成され、13230.0001_SL.txtと名づけられ、56,034 bytesのサイズを有する。

【0002】

本開示は、糖尿病と高脂血症のような代謝疾患を治療する組成物と方法に関する。特定の実施形態において、本願は、B型肝炎ウイルスから由来するポリペプチドによる代謝疾患の治療に関する。

30

【背景技術】

【0003】

代謝疾患は、炭水化物、脂肪、脂質およびミネラルを含む、生体の健康に不可欠な代謝産物の不均衡によるものである。例えば、2型糖尿病と高脂血症は、最もよく見られる二つの代謝疾患である。代謝産物の不均衡が、老化、行動、遺伝および環境の影響を含む複数の因子に引き起こされ、かつ通常に、複数の因子が、一緒に疾患の兆候を助長する。代謝疾患に罹患する患者が、例えば、高血糖、高インスリン血症、高脂血症、インスリン抵抗性、及びアミノ酸とミネラルのような他の代謝産物の異常調節を含む広い範囲の症状を表す。代謝疾患は通常、その根本的な原因を確定しにくいから、それを効果的に治療することは困難です。また、代謝疾患に罹患する患者が、高血圧、心血管疾患、腎臓損傷と神経損傷のような疾患に関連する重篤な合併症が発展するリスクを有する。

40

【0004】

それらの疾患の異質性のため、代謝疾患に罹患する患者が、数多くの異なる医薬品を需要し、複数の代謝経路を標的し、複数の症状を同時に対処する。例えば、ある研究が、調査された2型糖尿病の患者は、毎日平均8.4つの異なる薬物化合物を服用することを示した（例えば、Bauerら、Diabetic Medicine、31:1078-85(2014)（非特許文献1）を参照する）。代謝疾患に罹患する患者が、異なる薬品を服用しなければならない理由の一つとしては、それらの薬品は、一般的に、代謝疾患の一つの特定の症状又は経路を標的し、そして他の関連する症状を標的できないためであ

50

る。残念ながら、複数の薬品の服用が、患者の生活の質に影響し、かつ最終に疾患進行の経過を悪化させる。実際に、統計が示されたように、2型糖尿病の患者が、それらの投薬計画を続けづらい、その理由の一部は、それらの投薬計画の複雑性である（例えば、Garcia-Perezら、Diabetes Therapy, 4 : 175 - 94 (2013)（非特許文献2）を参照する）。

【0005】

また、通常に、代謝疾患が、シグナル経路の複雑なネットワークに関係するので、一つの薬剤で一つの特定の経路を標的することは、必ず患者に治療的に関連する効果を達成することではない。例えば、拒絶反応を防ぐために臓器移植に広く使用されている免疫抑制薬物とするシクロスボリンA（CsA）が、ナトリウム・タウロコール酸共輸送ポリペプチド（NTCP）（血流から肝細胞へ胆汁酸を輸送するNa⁺-依存性胆汁酸輸送体）に仲介された、培養肝細胞への胆汁酸の摂取とHBVの進入を阻害することを示す（Watashehら、Hepatology, 59 : 1726 - 37 (2014)（非特許文献3））。しかしながら、CsAによる治療は、グルコース代謝に有害な影響をもたらし、インスリン応答を損なう可能性がある（Dresnerら、Surgery, 106 (2) : 163 - 69 (1989)（非特許文献4））。なお、CsAが、総コレステロールレベルを増加させることにより（主に、低密度リボタンパク質（LDL）コレステロールレベルの増加により）、患者において高脂血症を誘発することができる（Ballantyneら、JAMA, 262 (1) : 53 - 56 (1989)（非特許文献5））。様々な他の化合物がNTCPに結合することを示されたが、それらの一部の化合物が、阻害剤として機能し、他の一部が、増強剤として機能するので、NTCPに対して同様な効果を生じない（Kimら、J. Pharmacol. Exp. Ther., 291 (3) : 1204 - 09 (1999)（非特許文献6））。それらの薬物の大部分は、これまで代謝疾患の治療における治療成績が実証されていないが、NTCPの一部の増強剤は、グルコースまたは脂質代謝に反対の効果をもたらす（例えば、Beaudoinら、Apppl. Physiol. Nutr. Metab., 38 (2) : 140 - 47 (2013)（非特許文献7）；Theilleら、N. Engl. J. Med., 308 (24) : 1454 - 57 (1983)（非特許文献8）；Philipsら、Br. Med. J., 292 : 1319 - 21 (1986)（非特許文献9）；Bodenら、Circulation, 85 (6) : 2039 - 44 (1992)（非特許文献10）を参照する）。NTCP欠損の対象は、明確な臨床的表現型を示さなかったから、生体内のNTCPの調節が治療的に関連する効果を有するかどうかは不明である（Vazら、Hepatology, 61 (1) : 260 - 267 (2015)（非特許文献11）を参照する）。したがって、複数の症状を同時に対処できるとともに強力な治療効果を有する代謝疾患の新しい医薬品の開発が、切望されている。

【0006】

HBVウイルスエンベロープが、三つの表面抗原タンパク質を含む：大（L）、中（M）および小（S）。これらのタンパク質は、三つの異なる翻訳開始点、すなわち、L（Pre-S1+Pre-S2+S）、M（Pre-S2+S）およびS（S）から、S遺伝子における単一のオープンリーディングフレームにコードされる。HBVは、そのエンベロープタンパク質に存在する抗原エピトープによって、四つの主な血清型（adr、adw、ayr、ayw）に分けられ、かつゲノムの全体ヌクレオチド配列の変異によって、八つの遺伝子型（A-H）に分けられる。ウイルス感染期間において、HBVのLタンパク質のPre-S1領域が、NTCPに結合することが示された（Yanら、eLife, 1 : e00049 (2012)（非特許文献12））。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【文献】Bauerら、Diabetic Medicine, 31 : 1078 - 85 (2014)

10

20

30

40

50

【文献】Garcia - Perezら、Diabetes Therapy、4 : 175 - 94 (2013)

【文献】Watashiら、Hepatology、59 : 1726 - 37 (2014)

【文献】Dresnerら、Surgery、106 (2) : 163 - 69 (1989)

【文献】Ballantyneら、JAMA、262 (1) : 53 - 56 (1989)

【文献】Kimら、J. Pharmacol. Exp. Ther., 291 (3) : 1204 - 09 (1999)

【文献】Beaudoinら、Appl. Physiol. Nutr. Metab. 38 (2) : 140 - 47 (2013)

【文献】Theilleら、N. Engl. J. Med. 308 (24) : 1454 - 57 (1983)

【文献】Phillipsら、Br. Med. J. 292 : 1319 - 21 (1986)

【文献】Bodenら、Circulation、85 (6) : 2039 - 44 (1992)

【文献】Vazら、Hepatology、61 (1) : 260 - 267 (2015)

【文献】Yanら、eLife、1 : e00049 (2012)

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0008】

本願が、HBV由来のポリペプチドで代謝疾患を治療する組成物と方法を提供する。一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドが、HBV遺伝子型A、B、C、D、E、F、GおよびHのいずれか一つのpre-S1領域から由来するポリペプチドを含む。本願が、さらに、対象（ヒトおよび薬学的に関連する動物モデルを含む）におけるグルコースと脂質代謝のような代謝を変わる、HBV由来のポリペプチドを提供する。

【0009】

一部の態様において、本願が、ここに記載されたポリペプチドを含む薬学組成物を提供し、ただし、それを必要とする対象に投与される場合に、薬学組成物が、対象におけるNTCP仲介の胆汁酸摂取の両方向制御を可能にするポリペプチドの血清濃度を提供する。

【0010】

一部の態様において、本願が、それを必要とする対象における代謝疾患を治療する方法を提供し、対象に治療的有効量のここに記載されたポリペプチド或いは上記ポリペプチドを含む薬学組成物を投与することを含み、投与されたポリペプチドの血清濃度が、対象におけるNTCP仲介の胆汁酸摂取の両方向制御を可能にして、ただし、上記ポリペプチドが、B型肝炎ウイルス（HBV）から由来するアミノ酸配列を含む。

【0011】

一部の態様において、本願が、対象に治療的有効量のここに記載されたポリペプチド或いは上記ポリペプチドを含む薬学組成物を投与することで、それを必要とする対象における血清脂質レベルを低下させ、そして投与されたポリペプチドの血清濃度が、対象におけるNTCP仲介の胆汁酸摂取の両方向制御を可能にする方法に関わる。一部の実施形態において、血清脂質が、例えば、総コレステロール（「TC」）、トリグリセリド（「TG」）およびLDL-Cを含んでも良い。

【0012】

特定の態様において、本願が、対象に治療的有効量のここに記載されたポリペプチド或いはこのようなポリペプチドを含む薬学組成物を投与することを含む、それを必要とする対象における血糖レベルを低下させる方法にも関わる。

【0013】

一部の実施形態において、対象に投与されたポリペプチドの血清濃度は、93nmol/Lまたはそれ以下である場合に、上記ポリペプチドが、対象におけるNTCP仲介の胆汁酸摂取を増強する。一部の実施形態において、対象に投与されたポリペプチドの血清濃度

10

20

30

40

50

度は、93 nmol/Lより高い場合に、上記ポリペプチドが、対象におけるN T C P仲介の胆汁酸摂取を阻害する。一部の実施形態において、対象におけるポリペプチドの血清濃度が、投与から約20分間の時点に、ピーク濃度（すなわち、C_{max}）に至る。したがって、一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドのT_{max}は、約20分間である。一部の実施形態において、上記ピーク濃度は、93 nmol/Lより高い。

【0014】

一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドを投与された対象が、代謝疾患を罹患する、或いは代謝疾患が進展するリスクを有する。一部の実施形態において、上記代謝疾患が脂質代謝の異常調節に関係する。一部の実施形態において、上記代謝疾患は、コレステロール関連病気である。一部の実施形態において、上記代謝疾患は、高脂血症（例えば、高トリグリセリド血症、高コレステロール血症、またはそれらの組み合わせ）である。一部の実施形態において、上記代謝疾患がグルコース代謝の異常調節に関係する。一部の実施形態において、上記代謝疾患は、高血糖である。一部の実施形態において、上記代謝疾患は、糖尿病或いは肥満である。一部の実施形態において、対象が、心血管疾患（例えば、アテローム性動脈硬化疾患）、心臓疾患、または腎障害を罹患する、或いはそれらが進展するリスクを有する。

10

【0015】

一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドが、対象における代謝に関連する一つ以上の化学的または生物学的分子のレベルまたは活性を低下または安定化できる。代謝に関連する化学的または生物学的分子は、グルコース、コレステロール、トリグリセリド、遊離脂肪酸、アミノ酸、ホルモン、LDL-C、HDL-C、HbA1c、血液尿素窒素、ミネラルから選ばれるものである。一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドが、代謝変化を測定する一つ以上の生理学的パラメータのレベルまたは値を低下または安定化もできる。生理学的パラメータは、血糖、血圧、体重、脂肪量、ボディマス指数（BMI）、炎症、アテローム性動脈硬化指数、心臓指数、腎指数、総脂肪指数および恒常性モデル評価（HOMA）指数から選ばれるものである。

20

【0016】

一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドが、HBV遺伝子型A、B、C、D、E、F、G、またはHのpre-S1領域から由来するアミノ酸配列を含む。特定の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドが、HBV遺伝子型Cのpre-S1領域のアミノ酸13-59配列を含む。他の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドが、HBV遺伝子型Cのpre-S1領域のアミノ酸13-59と対応する、任意の他のHBV遺伝子型のpre-S1領域から由来するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、上記ポリペプチドが、SEQ ID NO: 21-40から選ばれるアミノ酸配列を含む。

30

【0017】

一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドの一つ以上のアミノ酸残基は、削除、置換、または挿入されるが、N T C Pに結合する能力と、N T C P仲介の肝細胞への胆汁酸の輸送を両方向制御する能力を持ちつづける。特定の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドが、HBV遺伝子型A、B、C、D、E、F、G、またはHのpre-S1領域からの天然フランкиングアミノ酸配列を含む。他の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドが、SEQ ID NO: 21-40から選ばれるいずれか一つのアミノ酸配列に対して、少なくとも約30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有する。一部の実施形態において、ポリペプチドが、HBV遺伝子型Cのpre-S1領域のアミノ酸13に対応するグリシンおよび/またはHBV遺伝子型Cのpre-S1領域のアミノ酸20に対応するアスパラギンを含む。

40

【0018】

一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドが、ポリペプチドを安定化できる、N-末端の疎水基修飾および/またはC-末端修飾を含む。上記疎水基が、例え

50

、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、コレステロールおよびアラキドン酸から選ばれても良い。上記C - 末端修飾は、例えば、アミド化(アミノ化)、イソペントンジオール化(isopentanediolization)と、ポリペプチドを安定化できる任意のC - 末端修飾から選ばれても良い。特定の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドが、ミリスチン酸によるN - 末端修飾および/またはアミノ化によるC - 末端修飾を含む。一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドが、SEQ ID NO: 21 - 40から選ばれるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドが、SEQ ID NO: 23のアミノ酸配列を含む。

【0019】

一つの態様において、ここに記載されたポリペプチドが、代謝疾患に関連する一つ以上の症状を軽減できる。一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチド或いはこのようなポリペプチドを含む薬学組成物は、治療的有効量の少なくとも一つの第2の薬剤の投与の前、同時、またはその後に、対象に投与される。上記第2の薬剤は、例えば、抗高脂血症剤、抗高血糖剤、抗糖尿病剤、抗肥満剤および胆汁酸類似物から選ばれても良い。例えば、上記第2の薬剤は、例えば、インスリン、メトホルミン(metformin)、シタグリプチン(sitagliptin)、コレセベラム(coleselvam)、グリピジド(glipizide)、シンバスタチン(simvastatin)、アトルバスタチン(atorvastatin)、エゼチミブ(ezetimibe)、フェノフィブラート(fenofibrate)、ニコチン酸(nicotinic acid)、オルリストット(orlistat)、ロルカセリン(lorcaserin)、フェンテルミン(phentermine)、トピラマート(topiramate)、オベチコール酸(obeticholic acid)およびウルソデオキシコール酸(ursodeoxycholic acid)から選ばれても良い。

【0020】

一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチド或いはこのようなポリペプチドを含む薬学組成物は、例えば、腸管外、肺内、鼻腔内、病巣内、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内および皮下投与を含む少なくとも一つの方式で、対象に投与する。一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチド或いはこのようなポリペプチドを含む薬学組成物は、皮下投与で対象に投与する。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】図1Aは、高压液体クロマトグラフィー(HPLC)で測定されたCmyr-47の純度を示す例示的なグラフを示す。図1Bは、質量分析法で確定されたCmyr-47の分子量を示す例示的なグラフを示す。

【図2】図2Aは、FIFCで標識されたCmyr-47が、ツパイ初代肝細胞と結合することを示す。図2Bは、FIFCで標識されたCmyr-47が、ヒト肝細胞から由来する細胞系とするHepG2細胞と結合することを示す。

【図3】図3は、FIFCで標識されたCmyr-47が、NTCPを発現するL02細胞(「NTCP-L02」として示す)と結合するが、対照とするL02細胞(「BLANK-L02」として示す)と結合しないことを説明する。

【図4】図4は、FIFCで標識されたCmyr-47が、NTCPを発現するHEK293細胞(「NTCP-293」として示す)と結合するが、対照とするHEK293細胞(「BLANK-293」として示す)と結合しないことを示す。サギHBVから由来する、FIFCで標識されたポリペプチドは、対照ポリペプチドとして用いられる。

【図5A】図5Aは、インビトロで胆汁酸の摂取におけるCmyr-47の作用を示す。シクロスボリンA(「CsA」として示す)は、陽性対照として用いられる。

【図5B】図5Bは、胆汁酸の摂取におけるCmyr-47の両方向の効果を説明する。

【図5C】図5Cと図5Dは、インビトロで胆汁酸の摂取におけるCsAの効果を示し、かつCsAの阻害効果を確認した。

10

20

30

40

50

【図5D】図5Cと図5Dは、インビトロで胆汁酸の摂取におけるCsAの効果を示し、かつCsAの阻害効果を確認した。

【図5E】図5Eと図5Fは、それぞれに、インビトロで、62.5ng/ml(11.58nmol/L)Cmyr-47に相当する低いモル濃度と1μg/ml(185.23nmol/L)Cmyr-47に相当する高いモル濃度で胆汁酸の摂取におけるHBV由来のポリペプチドの効果を示す。

【図5F】図5Eと図5Fは、それぞれに、インビトロで、62.5ng/ml(11.58nmol/L)Cmyr-47に相当する低いモル濃度と1μg/ml(185.23nmol/L)Cmyr-47に相当する高いモル濃度で胆汁酸の摂取におけるHBV由来のポリペプチドの効果を示す。

【図6】図6は、Cmyr-47またはCsAで4週間処理された高脂血症のゴールデンハムスターにおける血清総コレステロール(「TC」)の変化を示す。通常食で給餌されたゴールデンハムスターは、PBSで処理され、かつ「正常対照」として用いられるとともに、PBSで処理された高脂血症ゴールデンハムスターは「モデル対照」として用いられる。フェノフィブラーート(「陽性処理」)で処理された高脂血症ゴールデンハムスターは、陽性対照として用いられる。

【図7】図7Aは、HBVから由来するポリペプチドで処理する前の血清TCのレベルを示す。図7Bは、4週間処理後の血清TCのレベルを示す。

【図8】図8は、4週間のCmyr-47処理にわたって、高脂血症ゴールデンハムスターの血清トリグリセリド(「TG」)の変化を描く。

【図9】図9Aは、HBVから由来するポリペプチドで処理する前の血清TGのレベルを示す。図9Bは、4週間処理後の血清TGのレベルを示す。

【図10】図10は、4週間のCmyr-47処理後、高脂血症ゴールデンハムスターの血清LDL-Cのレベルを描く。

【図11】図11Aは、HBVから由来するポリペプチドで処理する前の血清LDL-Cのレベルを示す。図11Bは、4週間処理後の血清LDL-Cのレベルを示す。

【図12】図12は、4週間のCmyr-47処理後、高脂血症ゴールデンハムスターの血清HDL-Cのレベルを示す。

【図13】図13は、4週間のCmyr-47処理後、高脂血症ゴールデンハムスターのアテローム性動脈硬化指数(「AI」)を描く。

【図14】図14は、4週間のCmyr-47処理後、高脂血症ゴールデンハムスターの血清総胆汁酸(TBA)の変化を示す。比較として、フェノフィブラーートとCsAもテストされた。

【図15】図15は、三つの異なる用量(1mg/kg、3mg/kgおよび10mg/kg)のCmyr-47で4週間処理された高脂血症ゴールデンハムスターの血清TCの変化を示す。通常食で給餌されたゴールデンハムスターは、PBSで処理され、かつ「正常対照」として用いられるとともに、PBSで処理された高脂血症ゴールデンハムスターは「モデル対照」として用いられる。

【図16】図16は、1mg/kg、3mg/kg、または10mg/kgのCmyr-47で4週間処理された高脂血症ゴールデンハムスターの血清TGの変化を示す。

【図17】図17は、4週間のCmyr-47またはCsA処理にわたって、Zucker糖尿病性fat-tt ラットにおける血清グルコース(「GLU」)の変化を示す。PBSで処理されたZucker leanラットは、「正常対照」として用いられるとともに、PBSで処理されたZucker糖尿病性fat-tt ラットは、「モデル対照」として用いられる。メトホルミン(「陽性処理」)で処理されたZucker糖尿病性fat-tt ラットは、陽性対照として用いられる。

【図18】図18Aは、HBVから由来するポリペプチドで処理する前の血清GLUのレベルを示す。図18Bは、4週間処理後の血清GLUのレベルを示す。

【図19】図19は、4週間のCmyr-47処理にわたって、Zucker糖尿病性fat-tt ラットにおけるHbA1cの変化を示す。

10

20

30

40

50

【図20】図20Aは、HBVから由来するポリペプチドで処理する前のHbA1cのレベルを示す。図20Bは、4週間処理後のHbA1cのレベルを示す。

【図21】図21は、4週間のCmyr-47処理にわたって、Zucker糖尿病性fatatyラットにおけるインスリンの変化を示す。

【図22】図22は、4週間のCmyr-47処理にわたって、Zucker糖尿病性fatatyラットにおける血清TCの変化を示す。

【図23】図23Aは、HBVから由来するポリペプチドで処理する前の血清TCのレベルを示す。図23Bは、4週間処理後の血清TCのレベルを示す。

【図24】図24は、4週間のCmyr-47処理にわたって、Zucker糖尿病性fatatyラットにおける血清TGの変化を示す。

【図25】図25Aは、HBVから由来するポリペプチドで処理する前の血清TGのレベルを示す。図25Bは、4週間処理後の血清TGのレベルを示す。

【図26】図26は、4週間のCmyr-47処理後のZucker糖尿病性fatatyラットにおける血液尿素窒素（「BUN」）のレベルを示す。

【図27】図27A-Cは、4週間のCmyr-47処理後のZucker糖尿病性fatatyラットにおける心臓指数、腎指数および総脂肪指数を描く。「Cmyr-47(L)」は、10mg/kg/dのCmyr-47の用量を指し、「Cmyr-47(Hi)」は、30mg/kg/dのCmyr-47の用量を指す。

【図28】図28は、4週間のCmyr-47処理後のZucker糖尿病性fatatyラットにおける血清TBAのレベルを示す。

【発明を実施するための形態】

【0022】

具体的な実施形態

特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および科学用語は、本開示が属する技術分野の当業者が一般に理解するものと同じ意味を有する。本開示の目的によって、以下の用語を以下に定義する。

【0023】

冠詞「1」と「一つ」は、1つまたは複数（すなわち、少なくとも1つ）の上記冠詞の文法的な目的語を指す。例えば、「一つの要素」は、一つの要素または複数の要素を意味する。

【0024】

コンテキストに明確に説明されない限り、用語「または」は、用語「および／または」を意味し、それと互換的に用いられる。

【0025】

本開示または請求項のいずれにおいても使用される限り、用語「備える」、「含有する」、「有する」またはそれらの用語の文法的な変形に対して、このような用語は、用語「含む」と同様の態様に含まれ、「含む」が、請求項における移行語として用いられる際と類似する方式で解釈される。用語「含む」またはその文法的な変形は、表現「含むが、それらに限定されない」を意味し、それと互換的に用いられる。

【0026】

用語「約」は、数、レベル、値、回数、頻度、百分率、寸法、サイズ、量、重量、または長さに対して、30、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2または1%で変化する数、レベル、値、回数、頻度、百分率、寸法、サイズ、量、重量、または長さを意味する。用語「約」は、数値範囲と一緒に用いられる場合に、それが、境界を上記数値の上下に拡張することによって、該範囲を変更する。一般に、用語「約」は、記載された値より10%で高い若しくは低い数値を変更することを指す。

【0027】

I. ポリペプチド

本開示のある態様が、例えば、糖尿病と高脂血症を含む代謝疾患を治療する、HBVから由来するポリペプチドを提供する。上記ポリペプチドは、HBVのpre-S1領域か

10

20

30

40

50

ら由来しても良く、インビトロ（例えば、溶液または無細胞系（例えば、細胞溶解物または再構成系）、或いは例えば培養されたエクスピボの細胞（例えば、N T C Pを発現する細胞、または肝細胞））でまたはインビボ（対象における細胞）でN T C Pと結合しても良い。上記対象は、哺乳類であっても良い。一部の実施形態において、上記対象は、ヒトであっても良い。

【0028】

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」、「タンパク質」は互換的に用いられ、全長タンパク質および断片、ならびに全長タンパク質および断片のバリアントを含む。ここに記載されたポリペプチドのこのような断片とバリアントが、少なくともポリペプチドのN T C Pと結合する生物学的活性と、N T C P仲介の肝細胞への胆汁酸の輸送を両方向制御する生物学的活性を持ちつづける。「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」が、天然および／または非天然のアミノ酸残基を含んでも良い。それらの用語は、さらに例えば、グリコシル化、シアル酸化、アセチル化、および／またはリン酸化されたタンパク質を含む翻訳後修飾タンパク質を含む。上記用語は、さらに、一つ以上のアミノ酸残基に（例えば、N-末端および／またはC-末端に）化学修飾されたタンパク質を含む。例えば、ここに開示されたポリペプチドのN-末端は、例えば、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、コレステロールとアラキドン酸を含む疎水基に修飾されても良い。一部の実施形態において、ここに開示されたポリペプチドのC-末端は、ポリペプチドの安定化のため、修飾されても良い。上記C-末端修飾は、アミド化（アミノ化）、イソペンタンジオール化と、ポリペプチドを安定化できる任意の他のC-末端修飾から選ばれても良い。10

【0029】

ここに使用されたように、用語「H B Vから由来するポリペプチド」または「H B V由来のポリペプチド」は、ポリペプチドの起源または由来はH B Vであることを指し、かつ天然、組み換え、合成、或いは精製のポリペプチドを含む。用語「H B Vから由来するポリペプチド」または「H B V由来のポリペプチド」は、全長天然H B Vポリペプチドまたはその断片、ならびに全長天然ポリペプチドまたはその断片のバリアントを指す。一部の実施形態において、上記断片は、少なくとも3-5個のアミノ酸、少なくとも5-10個のアミノ酸、少なくとも10-20個のアミノ酸、少なくとも20-30個のアミノ酸、少なくとも30-50個のアミノ酸、または天然配列の全部のアミノ酸からなっても良く、或いは当業者に、天然配列から由来することを同定されても良い。一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドは、任意のH B VサブタイプのLタンパク質のpre-S1領域から由来しても良い。一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドは、任意のH B VサブタイプのLタンパク質のpre-S1領域全体を含んでも良い。特定の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドは、H B V遺伝子型A、B、C、D、E、F、GおよびHのいずれか一つのLタンパク質のpre-S1領域から由来しても良い。それらのH B V遺伝子型のゲノム配列は、それぞれに、GenBankアクセッション番号KC875260 (SEQ ID NO: 41)、AY220704 (SEQ ID NO: 42)、AF461363 (SEQ ID NO: 43)、AY796030 (SEQ ID NO: 44)、AB205129 (SEQ ID NO: 45)、DQ823095 (SEQ ID NO: 46)、HE981176 (SEQ ID NO: 47)およびAB179747 (SEQ ID NO: 48)に見つけられる。特定の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドは、H B V遺伝子型CのLタンパク質のpre-S1領域から由来しても良い。ここに記載されたH B Vから由来するポリペプチドが、天然H B Vポリペプチドに対応する、ここに記載された一つ以上の生物学的活性（少なくともポリペプチドのN T C Pと結合する生物学的活性と、N T C P仲介の肝細胞への胆汁酸の輸送を両方向制御する生物学的活性を含む）を持ちつづける。30

【0030】

ここに使用された、ここに記載されたポリペプチド、H B Vから由来するポリペプチド、またはH B V由来のポリペプチドに関連する「バリアント」は、アミノ酸配列の点で、40

所与のポリペプチド（すなわち、ここに記載されたポリペプチド、HBVから由来するポリペプチド、またはHBV由来のポリペプチド）と区別するが、所与のポリペプチドのここに記載された一つ以上の生物学的活性を持ちつづけるポリペプチドを指す。ここに記載されたバリアントポリペプチドが、少なくともポリペプチドのNTCPと結合する生物学的活性と、NTCP仲介の肝細胞への胆汁酸の輸送を両方向制御する生物学的活性を持ちつづける。ここに記載されたバリアントポリペプチドは、所与のポリペプチドに対して、一つ以上のアミノ酸の添加（例えば、挿入）、削除、または置換を有しても良い。一部の実施形態において、ここに記載されたバリアントポリペプチドは、所与のポリペプチドに対して、1-30、1-20、1-10、1-8、1-5、または1-3個（これらの範囲の間のすべての整数を含む）のアミノ酸の添加（例えば、挿入）、削除、または置換を有しても良い。例えば、ポリペプチド配列は、アミノ酸の保存的置換を含んでも良い。アミノ酸の保存的置換、すなわち、アミノ酸が、類似する特性（例えば、親水性と、帯電領域の程度と分布）を有する異なるアミノ酸に置換されることは、典型的にはわずかな変化しか伴わず、したがってポリペプチドの生物学的活性を有意に変化させない。これらのわずかな変化は、部分的に、アミノ酸の疎水性および電荷を斟酌することに基づき、アミノ酸の疎水性指数を考慮することによって、同定できる。類似の疎水性指数および親水性値のアミノ酸は、置換されるとともに、タンパク質機能を保持できる。アミノ酸の疎水性指数と親水性値は、アミノ酸の特定の側鎖に影響される。その観察と一致し、生物学的機能が一致するアミノ酸の置換は、アミノ酸（特にそれらのアミノ酸の側鎖）の相対的類似性に依存し、疎水性、親水性、電荷、サイズと他の特性から明らかになる。

10

20

30

【0031】

用語「バリアント」は、さらに、所与のポリペプチドと特定の同一性、例えば、少なくとも約30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有するポリペプチドを含む。ここに使用された「バリアント」は、さらに、HBVタンパク質の天然配列に対応する、所与のポリペプチドの部分を含有するポリペプチドを含む。「バリアント」は、さらに、一つ以上の異なるソースから由来するポリペプチドを含む融合タンパク質またはキメラタンパク質を指す。ここに記載された融合タンパク質の非限定的な例、例えば、HBVから由来する一つのポリペプチドと非HBVタンパク質から由来するもう一つのポリペプチドとの融合タンパク質、異なるHBVサブタイプから由来する二つのポリペプチドの融合タンパク質、いずれか一つのHBVサブタイプのLタンパク質の異なる領域から由来する、或いはいずれか一つのHBVサブタイプのLタンパク質のpre-S1領域における異なる配列から由来する二つのポリペプチドの融合タンパク質を含む。

【0032】

用語「バリアント」は、さらに、所与のポリペプチドと同じアミノ酸配列（すなわち、ここに記載されたポリペプチド、HBVから由来するポリペプチド、またはHBV由来のポリペプチド）を含み、かつ所与のポリペプチドの一つ以上の生物学的活性を持ちつづけるが、所与のポリペプチドと異なる方式で化学的および/または翻訳後修飾されたポリペプチドを含む。「バリアント」は、さらに、タンパク質分解、リン酸化、またはその他の翻訳後修飾のような差別化処理されたが、NTCPと結合する生物学的活性とNTCP仲介の肝細胞への胆汁酸の輸送を両方向制御する生物学的活性を持ちつづけるポリペプチドまたはその断片を記述するために使用されても良い。この「バリアント」の使用は、特に説明しない限り、バリアントの断片を含むことを意図する。用語「バリアント」は、さらに、ヘパドナウイルス属の異なるウイルス種、株、またはサブタイプに発見された相同性ポリペプチド配列を含む。HBVは、そのエンベロープタンパク質に存在する抗原エピトープによって、四つの主な血清型（adr、adw、ayr、ayw）に分けられ、かつゲノムの全体ヌクレオチド配列の変異によって、八つの遺伝子型（A-H）に分けられる。したがって、用語「バリアント」は、それらのHBVサブタイプのいずれか一つに発見された相同性ポリペプチドを含む。「バリアント」は、さらに、Nおよび/またはC末端に添加されたそれらのHBVサブタイプのいずれか一つの天然フランкиングアミノ酸

40

50

配列を有するポリペプチドを含む。

【0033】

用語「保存的アミノ酸置換」と「保存的置換」は、ここに互換的に用いられ、アミノ酸組における意図されたアミノ酸交換を指し、ただし、アミノ酸は、サイズ、構造、電荷、および／または極性が似ている別のアミノ酸に交換された。類似する側鎖を有するアミノ酸残基ファミリーは、当分野に公知されたものであり、塩基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、無極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、分岐側鎖（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）と芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を含む。そして、一部の実施形態において、ポリペプチドにおけるアミノ酸残基は、同じ側鎖ファミリーの別のアミノ酸残基に置換されても良い。他の実施形態において、アミノ酸のストリング（string）は、構造的に類似するが、側鎖ファミリーメンバーの順番および／または組成が異なるストリングに置換されても良い。その他の実施形態において、変異は、ポリペプチドの全部または一部にランダムに導入されても良い。保存的アミノ酸置換の例は、例えば、脂肪族または疎水性アミノ酸 A l a、V a l、L e u および I l e の一つと、その四つの組における他のアミノ酸の一つとの交換；ヒドロキシルを含有する残基 S e r と T h r の間の交換；酸性残基 A s p と G l u の間の交換；アミド残基 A s n と G l n の間の交換；塩基性残基 L y s、A r g および H i s の間の交換；芳香族残基 P h e、T y r および T r p の間の交換；小サイズアミノ酸 A l a、S e r、T h r、M e t および G l y の間の交換を含む。保存的アミノ酸を類似の構造的に関連するアミノ酸で置換することのような保存的置換は、ポリペプチドの生物学的活性に実質的な影響を与えないと合理的に予想される。10

【0034】

用語「配列同一性」（例えば、「配列は、50%同一する」）は、比較ウィンドウにおいて、アミノ酸ごとに配列が同一する程度を指す。一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドは、所与のポリペプチドの配列に対して、少なくとも約30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むが、所与のポリペプチドの一つまたは以上の生物学的活性を持ちつづける。「百分比同一性」（または「%同一性」）は、比較ウィンドウで2つの最適に整列された配列を比較し、一致した位置の数を得るために、両方の配列において同一のアミノ酸が存在する位置の数を決定し、一致した位置の数を比較ウィンドウ内の位置の総数で割り、そして結果に100を掛けて配列同一性のパーセンテージを得ることで、計算できる。比較ウィンドウを整列する配列の最適アライメントは、当分野で利用可能なアルゴリズム（例えば、B L A S T（登録商標）ファミリーのプログラム）のコンピューター化実行、または目視検査によって実施されてもよい、選択したさまざまな方法のいずれかによって最適なアライメント（すなわち、比較ウィンドウで最も高い割合の相同性が得られるもの）が生成される。配列比較において、一つの配列は、参照配列として作用し、テスト配列はそれと比較される。配列比較アルゴリズムを使用する場合に、テスト配列と参照配列をコンピューターに入力し、必要に応じて、サブ配列の座標を設定し、そして配列アルゴリズムプログラムのパラメータを設定する。次いで、配列比較アルゴリズムは、指定されたプログラムパラメーターに基づいて、テスト配列の、参照配列に対する現在の配列同一性を計算する。配列アルゴリズムプログラムのパラメータの設定は、本分野に公知されたものである。例えば、比較ウィンドウは、一方または両方の比較配列の全長にわたって指定することができ、例えば、参照配列の全長にわたって、参照配列中のアミノ酸の総数の5%までのギャップが許容されてもよい。20

【0035】

ここに使用されたように、ここに記載されたポリペプチドの「生物学的活性」は、ポリペプチドのN T C Pと結合する能力と、N T C P仲介の肝細胞への胆汁酸の摂取を両方向

10

20

30

40

50

制御する能力を含む。ここに使用されたように、分子または経路の「両方向制御」は、ここに記載されたH B V由来のポリペプチドが、ある濃度以下で、分子または経路の活性を増強する（すなわち、増強剤として機能する）が、その濃度を超えると、分子または経路の活性を阻害する（すなわち、阻害剤として機能する）ことを指す。例えば、ここに記載されたポリペプチドが、N T C Pと結合し、ある濃度以下で肝細胞におけるN T C P仲介の胆汁酸摂取を促進できる（すなわち、N T C Pの「増強剤」として機能する）。同じポリペプチドは、N T C Pと結合するが、ある濃度を超える場合にN T C P仲介の胆汁酸摂取を阻害する（すなわち、N T C Pの「inhibitor」として機能する）こともできる。一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドは、93 nmol/L以下でN T C P増強剤として、93 nmol/Lを超える場合にN T C P阻害剤として機能する。例えば、ここに記載されたC my r - 47ポリペプチドは、500 ng/ml以下でN T C P増強剤として、500 ng/mlを超える場合にN T C P阻害剤として機能する。

【0036】

一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドは、インビトロでN T C P仲介の肝細胞への胆汁酸の摂取を両方向制御する。ここに記載されたポリペプチドは、ある濃度以下で、インビトロでN T C P仲介の胆汁酸摂取を促進するが、上記ポリペプチドは、その濃度を超える場合に、インビトロでN T C P仲介の胆汁酸摂取を阻害する。一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドは、93 nmol/L以下で、インビトロでN T C P仲介の胆汁酸摂取を促進するが、上記ポリペプチドは、93 nmol/Lを超える場合に、インビトロでN T C P仲介の胆汁酸摂取を阻害する。例えば、ここに記載されたC my r - 47ポリペプチドは、500 ng/ml以下で、インビトロでN T C P仲介の胆汁酸摂取を促進するが、500 ng/mlを超える場合に、インビトロでN T C P仲介の胆汁酸摂取を阻害する。

【0037】

一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドは、投与されたポリペプチドの特定の血清濃度の以下で、ポリペプチドで処理された対象におけるN T C P仲介の胆汁酸摂取を促進する。上記ポリペプチドは、投与されたポリペプチドの血清濃度を超える場合に、ポリペプチドで処理された対象におけるN T C P仲介の胆汁酸摂取を阻害する。一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドで処理された対象におけるポリペプチドの血清濃度は、93 nmol/L以下である場合に、ポリペプチド、対象におけるN T C P仲介の胆汁酸摂取を増強できる。一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドの血清濃度は、93 nmol/Lを超える場合に、ポリペプチド、対象におけるN T C P仲介の胆汁酸摂取を阻害できる。例えば、ここに記載されたC my r - 47ポリペプチドが、500 ng/mlの血清濃度以下である場合に、対象におけるN T C P仲介の胆汁酸摂取を増強できるが、500 ng/mlの血清濃度を超える場合に、対象におけるN T C P仲介の胆汁酸摂取を阻害できる。

【0038】

ここに記載されたポリペプチドの生物学的活性は、代謝疾患を治療する能力、または代謝疾患に関連する一つ以上の症状を改善する能力を含む。上記生物学的活性は、さらにここに記載されたポリペプチドが代謝性疾患の発展を予防する能力を含む。一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドの生物学的活性は、代謝に関連する一つ以上の化学的または生物学的分子のレベルまたは活性を調整する、および/または代謝変化を測定する一つ以上の生理学的パラメータのレベルまたは値を調整するポリペプチドの能力を含む。一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドの「生物学的活性」は、ポリペプチドが、一つ以上のこのようないかれた分子のレベルまたは活性、または生理学的パラメータを低下または安定化する能力を含む。一部の実施形態において、上記代謝は、胆汁酸代謝、グルコース代謝、脂質代謝、および/またはアミノ酸代謝を指す。代謝に関連する化学的または生物学的分子は、例えば、グルコース、トリグリセリド、コレステロール、遊離脂肪酸、胆汁酸、アミノ酸、ホルモン（例えば、インスリン）

10

20

30

40

50

、LDL-C、HDL-C、HbA1c、血液尿素窒素およびミネラルを含む。代謝変化を測定する生理学的パラメータは、例えば、血糖、血圧、体重、脂肪量、ボディマス指数(BMI)、炎症、アテローム性動脈硬化指数(AI)、心臓指数、腎指数、総脂肪指数および恒常性モデル評価(HOMA)指数を含む。

【0039】

特定の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドの「生物学的活性」は、対象における血清胆汁酸のレベルを増加するポリペプチドの能力を含む。特定の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドの「生物学的活性」は、肝細胞における胆汁酸合成によって、コレステロール除去を増強するポリペプチドの能力を含む。

【0040】

一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドの生物学的活性は、ポリペプチドを投与された対象における脂質代謝に関連する一つ以上の化学的または生物学的分子の血清レベルを低下する能力を含む。一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドの生物学的活性は、ポリペプチドを投与された対象における血清脂質(例えば、トリグリセリド、総コレステロール、またはLDL-C)の血清レベルを低下する能力を含む。

10

【0041】

一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドの生物学的活性は、ポリペプチドを投与された対象におけるグルコース代謝に関連する一つ以上の化学的または生物学的分子の血清レベルを低下する能力を含む。一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドの生物学的活性は、ポリペプチドを投与された対象におけるグルコースまたはHbA1cの血清レベルを低下する能力を含む。一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドが、対象におけるインスリンの血清レベルを安定化できる。

20

【0042】

特定の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドの「生物学的活性」は、対象における代謝病気を治療するポリペプチドの能力を含む。一部の実施形態において、上記代謝病気が脂質代謝の異常調節に関係する。上記代謝疾患は、例えば、高脂血症(高トリグリセリド血症、高コレステロール血症、または両者を含む)のようなコレステロール関連病気を含む。一部の実施形態において、上記代謝病気がグルコース代謝の異常調節に関係する。上記代謝疾患は、例えば、糖尿病と肥満を含む。

30

【0043】

特定の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドの「生物学的活性」は、このような病気の一つ以上の症状または合併症を改善または予防するポリペプチドの能力を含む。特定の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドの「生物学的活性」は、このような病気が患者の健康に及ぼす悪影響を緩和する、またはこのような病気を発展するリスクを低下するポリペプチドの能力を含む。特定の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドの「生物学的活性」は、例えば、アテローム性動脈硬化および/または心血管疾患、心臓疾患、腎障害、または肥満のような他の関連する疾患を発展する重症度またはリスクを低下するポリペプチドの能力を含む。

【0044】

理論にとらわれず、ここに記載されたポリペプチドのそれらの生物学的活性は、対象にポリペプチドを投与する後に血清濃度でのポリペプチドによる、対象におけるNTCP仲介の胆汁酸摂取の両方向制御に起因する可能性があると信じられる。一部の実施形態において、このようなポリペプチドを投与された対象の血流におけるここに記載されたポリペプチドの濃度は、特定の濃度以下である場合に、対象における胆汁酸摂取は、増加される。一部の実施形態において、対象の血流におけるここに記載されたポリペプチドの濃度は、特定の濃度を超える場合に、対象における胆汁酸摂取は、阻害される。一部の実施形態において、このようなポリペプチドを投与された対象の血流におけるここに記載されたポリペプチドの濃度は、93 nmol/L以下である場合に、対象における胆汁酸摂取は、増加される。一部の実施形態において、対象の血流におけるここに記載されたポリペプチ

40

50

ドの濃度は、93 nmol/Lを超える場合に、対象における胆汁酸摂取は、阻害される。例えば、このようなポリペプチドを投与された対象の血流におけるここに記載されたCmyr-47ポリペプチドの濃度は、500 ng/ml以下である場合に、対象における胆汁酸摂取は、増加される。対象の血流におけるここに記載されたCmyr-47ポリペプチドの濃度は、500 ng/mlを超える場合に、対象における胆汁酸摂取は、阻害される。

【0045】

ここに記載されたポリペプチドの生物学的活性を確定するための様々なインビトロ、インビトロおよびエクスビトロ試験は、考えられる。ここに記載されたポリペプチドの生物学的活性は、ここに記載されたポリペプチドで処理された対象からサンプルを採取することでインビトロで確定する。サンプルは、例えば肝臓、筋肉、脂肪、および臍臓などの特定の組織から採取された生検サンプル、または死後の動物から採取された急速冷凍組織であってもよい。一部の実施形態において、サンプルは、対象からの血液から採取された血清サンプルであってもよい。対象から血清サンプルを採取するための様々な方法が当分野において公知されたものであり、例えば、尾部出血、眼窩後穿刺、および心臓穿刺を含む。一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドの生物学的活性は、ここに記載されたポリペプチドを、形質転換細胞系または動物から単離された細胞のいずれか一つとする細胞と接触させることにより、インビトロで確定する。一部の実施形態において、上記細胞は動物から単離された初代肝細胞である。

10

【0046】

様々な方法は、定量的な手段でNTCPを両方向制御することに記載されたポリペプチドの能力を確定するために使用できる。例えば、NTCPを発現する細胞（例えば、NTCPを過剰発現する哺乳動物細胞または肝細胞）は、胆汁酸および増加する量のここに記載されたポリペプチドでインビトロで処理されてもよい。検出のために、細胞に添加された胆汁酸は、放射能標識または化学的標識されても良い。次いで、細胞を採取し、細胞に採取された胆汁酸の量を測定できる。ポリペプチドが特定の濃度以下の場合に胆汁酸摂取を増強しつつ、上記濃度を超える場合に胆汁酸摂取を阻害する場合に、ここに記載されたポリペプチドのNTCPを両方向制御する能力を確定される。

20

【0047】

ポリペプチドの生物学的活性の確定に有用な例示的な試験は、ここに記載されたポリペプチドで処理された対象から採取されたサンプルでの機能的分析を含み、例えば、グルコース産生試験、グルコース摂取試験、脂肪酸酸化試験、コレステロール試験、胆汁酸試験、尿素試験およびトリグリセリド試験を含む。一部の実施形態において、上記試験は、さらに例えば、ポリペプチドとNTCPの間の結合分析、胆汁酸を輸送するためのNTCP活性試験、および、例えば、胆汁酸代謝、グルコース代謝、脂質代謝およびアミノ酸代謝のような代謝に関わる分子的要因の発現、局在化、または活性分析を含む。ここに記載されたポリペプチドの生物学的活性を確定するための前記の技術と手順は、当分野において公知された方法および本明細書に提供される手順に従って行うことができる。

30

【0048】

一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドは、任意のHBVサブタイプのpre-S1領域のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドが、HBV遺伝子型Cのpre-S1領域のアミノ酸13-59配列：G TNLSVPNPLGFDPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWPLEANQVG（SEQ ID NO：23）を含む。他の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドは、例えば、遺伝子型A、B、D、E、F、GおよびHのような別のHBV遺伝子型からの対応するpre-S1配列を含む。例えば、一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドが：

40

HBV遺伝子型Aのpre-S1 アミノ酸 13-59 : G T N L S V P N P L G F F P D H Q L D P A F G A N S N N P D W D F N P V K D D W P A A N Q V G (SEQ ID NO：34)、

50

H B V 遺伝子型 B の p r e - S 1 アミノ酸 1 3 - 5 9 : G T N L S V P N P L G F
F P D H Q L D P A F K A N S E N P D W D L N P N K D N W P D A N K V G (S E Q
I D N O : 3 5) ,

H B V 遺伝子型 D の p r e - S 1 アミノ酸 2 - 4 8 : G Q N L S T S N P L G F F
P D H Q L D P A F R A N T A N P D W D F N P N K D T W P D A N K V G (S E Q I D
N O : 3 6) ,

H B V 遺伝子型 E の p r e - S 1 アミノ酸 1 2 - 5 8 : G K N I S T T N P L G F
F P D H Q L D P A F R A N T R N P D W D H N P N K D H W T E A N K V G (S E Q
I D N O : 3 7) ,

H B V 遺伝子型 F の p r e - S 1 アミノ酸 1 3 - 5 9 : G Q N L S V P N P L G F
F P D H Q L D P L F R A N S S S P D W D F N T N K D S W P M A N K V G (S E Q
I D N O : 3 8) ,

H B V 遺伝子型 G の p r e - S 1 アミノ酸 1 2 - 5 8 : G K N L S A S N P L G F
L P D H Q L D P A F R A N T N N P D W D F N P K K D P W P E A N K V G (S E Q
I D N O : 3 9) , または

H B V 遺伝子型 H の p r e - S 1 アミノ酸 1 3 - 5 9 : G Q N L S V P N P L G F
F P D H Q L D P L F R A N S S S P D W D F N T N K D N W P M A N K V G (S E Q
I D N O : 4 0)

を含んでも良い。

【 0 0 4 9 】

一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドは、H B V の p r e - S 1 領域の部分を含み、上記部分は、少なくとも S E Q I D N O : 2 3 と 3 4 - 4 0 から選ばれるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドは、H B V の p r e - S 1 領域全体を含む。

【 0 0 5 0 】

一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドは、1 0 - 1 0 0 個のアミノ酸の長さを有する。例えば、上記ポリペプチドは、1 5 - 1 0 0 、 1 5 - 8 0 、 2 0 - 1 0 0 、 2 0 - 8 0 、 2 0 - 6 0 、 2 5 - 6 0 、 3 0 - 6 0 、 3 5 - 6 0 、または 4 0 - 6 0 個のアミノ酸の長さ有する（これらの範囲内のすべての整数を含む）。一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドの長さは、少なくとも 2 0 、例えば、少なくとも 2 5 、 3 0 、 3 5 、 4 0 個のアミノ酸である。一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドは、2 0 、 2 5 、 3 0 、 3 5 、 4 0 、 4 7 、 5 5 、 6 0 個のアミノ酸の長さを有する。一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドは、4 7 個のアミノ酸の長さを有する。ここに記載されたポリペプチドの異なる長さを有するバリアントは、対応するポリペプチドに関連する一つ以上の、少なくとも N T C P と結合する生物学活性と、N T C P 仲介の肝細胞への胆汁酸輸送を両方向制御する生物学的活性を含む生物学的活性を持ちつづける。

【 0 0 5 1 】

一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドは、疎水基による N - 末端修飾を含む。例えば、上記疎水基が、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、コレステロールおよびアラキドン酸から選ばれても良い。一部の実施形態において、上記疎水基は、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸およびコレステロールから選ばれても良い。一部の実施形態において、上記疎水基は、ミリスチン酸であっても良い。特定の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドは、S E Q I D N O : 2 3 と 3 4 - 4 0 から選ばれるアミノ酸配列を含み、ただし、上記 N 末端は、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸およびコレステロールから選ばれる疎水基で修飾される。特定の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドは、S E Q I D N O : 2 3 と 3 4 - 4 0 から選ばれるアミノ酸配列を含み、ただし、上記 N 末端は、ミリストイル化された。一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドが、S E Q I D N O : 2 3 のアミノ酸配列を含み、ただし、上記 N 末端は、ミリストイル化された。一部

10

20

30

40

50

の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドは、ポリペプチドの安定化のための C - 末端修飾を含む。例えば、上記 C - 末端修飾は、アミド化（アミノ化）、イソペンタジオール化と、ここに記載されたポリペプチドを安定化できる任意の C - 末端修飾から選ばれても良い。一部の実施形態において、上記 C - 末端修飾は、アミド化（アミノ化）であっても良い。例えば、ここに記載されたポリペプチドは、N O : 2 3 のアミノ酸配列を含み、ただし上記 N 末端はミリストイル化され、および / または上記 C 末端は、アミド化（アミノ化）される。一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドが、N O : 3 のアミノ酸配列（C m y r - 4 7 ）を含む。一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドは、S E Q I D N O : 3 4 - 4 0 から選ばれるアミノ酸配列を含み、ただし、上記 N 末端はミリストイル化され、および / または上記 C 末端は、アミド化（アミノ化）で修飾される。一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドが、S E Q I D N O : 1 4 - 2 0 から選ばれるアミノ酸配列を含む。N 末端および / または C 末端に修飾されるここに記載されたポリペプチドのバリエントは、同じ方式で修飾されていない対応するポリペプチドの一つ以上の、少なくとも N T C P と結合する生物学活性と、N T C P 仲介の肝細胞への胆汁酸輸送を両方向制御する生物学的活性を含む生物学的活性を持ちつづける。
10

【 0 0 5 2 】

ここに記載されたポリペプチドのバリエントは、本開示に考えられ、一つ以上のアミノ酸の削除、置換、または挿入を有する、ポリペプチドの一つ以上の、少なくとも N T C P と結合する生物学活性と、N T C P 仲介の肝細胞への胆汁酸輸送を両方向制御する生物学的活性を含む生物学的活性を持ちつづけるバリエントを含む。好ましくは、ここに記載されたポリペプチドは、H B V 遺伝子型 C の p r e - S 1 領域のアミノ酸 1 3 に対応するグリシン（すなわち、S E Q I D N O : 2 3 の N - 末端グリシン）を持ちつづける。一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドは、H B V 遺伝子型 C の p r e - S 1 領域のアミノ酸 2 0 に対応するアスパラギンを持ちつづける。一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドは、H B V の p r e - S 1 領域に一つ以上の天然に発生する変異を有しても良い。一部の実施形態において、H B V の p r e - S 1 領域から由来する配列に対して、ここに記載されたポリペプチドは、1 - 3 0 、例えば、1 - 2 0 、1 - 1 0 、1 - 8 、1 - 5 、または 1 - 3 個のアミノ酸の削除、置換、または挿入を有しても良い（これらの範囲内のすべての整数を含む）。一部の実施形態において、S E Q I D N O : 2 3 と 3 4 - 4 0 から選ばれるアミノ酸配列に対して、ここに記載されたポリペプチドは、1 - 3 0 、例えば、1 - 2 0 、1 - 1 0 、1 - 8 、1 - 5 、または 1 - 3 個のアミノ酸の削除、置換、または挿入を有しても良い（これらの範囲内のすべての整数を含む）。一部の実施形態において、S E Q I D N O : 2 3 のアミノ酸配列に対して、ここに記載されたポリペプチドは、1 - 3 0 、例えば、1 - 2 0 、1 - 1 0 、1 - 8 、1 - 5 、または 1 - 3 個のアミノ酸の削除、置換、または挿入を有しても良い（これらの範囲内のすべての整数を含む）。一部の実施形態において、S E Q I D N O : 2 3 のアミノ酸配列に対して、ここに記載されたポリペプチドは、1 - 3 個のアミノ酸の削除、置換、または挿入を有しても良い。特定の実施形態において、S E Q I D N O : 2 3 と 3 4 - 4 0 から選ばれるアミノ酸配列に対して、ここに記載されたポリペプチドは、C 末端に 1 - 3 0 、例えば、1 - 2 0 、1 - 1 0 、1 - 8 、1 - 5 、または 1 - 3 個のアミノ酸の削除または挿入を有しても良い（これらの範囲内のすべての整数を含む）。例えば、ここに記載されたポリペプチドが、S E Q I D N O : 2 1 、2 2 および 2 4 - 2 8 から選ばれるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドは、表 1 に記載されたポリペプチドのいずれか一つのアミノ酸配列を含んでも良い。一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドは、表 1 に記載された翻訳後修飾ポリペプチドのいずれか一つから選ばれてもよい。
20

【 0 0 5 3 】

【表 1】

表 1. 例示的なポリペプチドのリスト

SEQ ID No.	SEQ名 称	N-末端修 飾	アミノ酸列 123456789012345678901234567890	C-末 端修飾	SEQ由来
1	Cmyr - 60	Myr	GTNLSPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPD WDFNPNKDHWPEANQVGAGAFGPGFTPPHG	NH2	遺伝子型 C Pre-S1 (13-72)
2	Cmyr - 55	Myr	GTNLSPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPD WDFNPNKDHWPEANQVGAGAFGPGF	NH2	遺伝子型 C Pre-S1 (13-67)
3	Cmyr - 47	Myr	GTNLSPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPD WDFNPNKDHWPEANQVG	NH2	遺伝子型 C Pre-S1 (13-59)
4	Cmyr - 40	Myr	GTNLSPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPD WDFNPNKDHW	NH2	遺伝子型 C Pre-S1 (13-52)
5	Cmyr - 35	Myr	GTNLSPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPD WDFNP	NH2	遺伝子型 C Pre-S1 (13-47)
6	Cmyr - 30	Myr	GTNLSPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPD	NH2	遺伝子型 C Pre-S1 (13-42)
7	Cmyr - 25	Myr	GTNLSPNPLGFFPDHQLDPAFGAN	NH2	遺伝子型 C Pre-S1 (13-37)
8	Cmyr - 20	Myr	GTNLSPNPLGFFPDHQLDP	NH2	遺伝子型 C Pre-S1 (13-32)

10

20

30

40

50

9	C my r - 4 7 + (- 1 0)	My r	GGWSSKPRQGMGTNLSVPNPLGFFPDHQLD PAFGANSNNPDWDFNPNKDHWPEANQVG	NH 2	遺伝子型 C P r e - S 1 (2 - 5 9)
10	C my r - 4 7 + (- 9)	My r	GLSWTVPLEWGTNLSVPNPLGFFPDHQLD PAFGANSNNPDWDFNPNKDHWPEANQVG	NH 2	遺伝子型 E ま たは G P r e - S 1 (2 - 1 1) + 遺伝子型 C P r e - S 1 (1 3 - 5 9)
11	C p l a m - 4 7	P l a m	GTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPD WDFNPNKDHWPEANQVG	NH 2	遺伝子型 C P r e - S 1 (1 3 - 5 9)
12	C s t e a - 4 7	S t e a r o y 1	GTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPD WDFNPNKDHWPEANQVG	NH 2	遺伝子型 C P r e - S 1 (1 3 - 5 9)
13	C c h o l - 4 7	C h o l	GTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPD WDFNPNKDHWPEANQVG	NH 2	遺伝子型 C P r e - S 1 (1 3 - 5 9)
14	A m y r - 4 7	My r	GTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPD WDFNPVKDDWPAANQVG	NH 2	遺伝子型 A P r e - S 1 (1 3 - 5 9)
15	B m y r - 4 7	My r	GTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFKANSENPD WDLNPNKDNWPDANKVG	NH 2	遺伝子型 B P r e - S 1 (1 3 - 5 9)
16	D m y r - 4 7	My r	GQNLSTSPLGFFPDHQLDPAFRANTANPD WDFNPNKDTWPDANKVG	NH 2	遺伝子型 D P r e - S 1 (2 - 4 8)

10

20

30

40

50

17	E my r - 4 7	My r	GKNI STTNPLGFFPDHQLDPAFRANTRNPD WDHNPNKDHTEANKVG	NH 2	遺伝子型 E P r e - S 1 (12-58)
18	F my r - 4 7	My r	GQNL SVPNPLGFFPDHQLDPLFRANSSPD WDFNTNKDSWPMANKVG	NH 2	遺伝子型 F P r e - S 1 (13-59)
19	G my r - 4 7	My r	GKNL SASNPLGFLPDHQLDPAFRANTNNPD WDFNPKKDPWPEANKVG	NH 2	遺伝子型 G P r e - S 1 (12-58)
20	H my r - 4 7	My r	GQNL SVPNPLGFFPDHQLDPLFRANSSPD WDFNTNKDNWPMANKVG	NH 2	遺伝子型 H P r e - S 1 (13-59)

【0054】

各種な実施形態において、ここに記載されたポリペプチドが、任意のここに記載されたポリペプチドに対して、少なくとも約30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有しても良い。例えば、上記ポリペプチドが、SEQ ID NO: 21-40から選ばれるいずれか一つに対して、少なくとも約30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、上記ポリペプチドが、SEQ ID NO: 23と34-40から選ばれるいずれか一つに対して、少なくとも約30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、上記ポリペプチドが、SEQ ID NO: 23に対して、少なくとも約30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。ここに記載されたポリペプチドと特定の配列同一性を有するバリアントは、対応するポリペプチドの一つ以上の、少なくともNTCPと結合する生物学活性と、NTCP仲介の肝細胞への胆汁酸輸送を両方向制御する生物学的活性を含む生物学的活性を持ちつづける。

【0055】

本開示の態様は、さらに、Nおよび/またはC末端に添加された、HBVのLタンパク質から（例えば、Lタンパク質のpre-S1領域から）由来する天然フランкиングアミノ酸配列を有するここに記載されたポリペプチドのバリアントを含む。天然フランкиングアミノ酸配列は、対応するHBV遺伝子型または任意の他のHBV遺伝子型のpre-S1領域において、ここに記載されたポリペプチドのNまたはC末端にフランкиングする天然配列を指す。一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドは、SEQ ID NO: 23と34-40から選ばれるアミノ酸配列を含み、かつそのNおよび/またはC末端に、HBV遺伝子型A-Hのいずれか一つのpre-S1領域から由来する天然フランкиングアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、天然フランкиングアミノ酸配列は、GenBank アクセション番号KC875260（遺伝子型A；SEQ ID NO: 41）、AY220704（遺伝子型B；SEQ ID NO: 42）、AF461363（遺伝子型C；SEQ ID NO: 43）、AY796030（遺伝子型D；SEQ ID NO: 44）、AB205129（遺伝子型E；SEQ ID NO: 45）、

D Q 8 2 3 0 9 5 (遺伝子型 F ; S E Q I D N O : 4 6)、H E 9 8 1 1 7 6 (遺伝子型 G ; S E Q I D N O : 4 7)、または A B 1 7 9 7 4 7 (遺伝子型 H ; S E Q I D N O : 4 8)の H B V 株のコンセンサス配列から由来してもよい。例えば、ここに記載されたポリペプチドは、S E Q I D N O : 2 3 のアミノ酸配列を含み、かつその N および / または C 末端に、H B V 遺伝子型 C の p r e - S 1 領域から由来する天然フランкиングアミノ酸配列を含む。或いは、ここに記載されたポリペプチドは、S E Q I D N O : 2 3 のアミノ酸配列を含み、かつその N および / または C 末端に、H B V 遺伝子型 A、B、D、E、F、G および H のいずれか一つの p r e - S 1 領域から由来する天然フランкиングアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドは、その N および / または C 末端に、独立に、1 - 1 0 、例えば、1 - 8 、1 - 5 、または、1 - 3 個のアミノ酸の長さを有する天然フランкиングアミノ酸配列を含む（これらの範囲内のすべての整数を含む）。例えば、ここに記載されたポリペプチドは、S E Q I D N O : 2 3 のアミノ酸配列を含み、かつその N 末端に、H B V 遺伝子型 C の p r e - S 1 領域から由来する 1 0 個のアミノ酸の天然フランкиングアミノ酸配列を含む。言い換えると、上記ポリペプチドは、H B V 遺伝子型 C の p r e - S 1 領域のアミノ酸 2 - 5 9 (S E Q I D N O : 2 9) を含んでも良い。別の例として、ここに記載されたポリペプチドは、S E Q I D N O : 2 3 のアミノ酸配列を含み、かつその N 末端に、H B V 遺伝子型 E または G の p r e - S 1 領域から由来する 9 個のアミノ酸の天然フランкиングアミノ酸配列を含む。言い換えると、上記ポリペプチドは、H B V 遺伝子型 C の p r e - S 1 領域のアミノ酸 1 3 - 5 9 と H B V 遺伝子型 E または G の p r e - S 1 領域のアミノ酸 2 - 1 1 (S E Q I D N O : 3 0) を含んでも良い。理解すべきのは、ここに記載された任意のポリペプチドは、N および / または C 末端から延長する任意の長さの天然フランкиングアミノ酸配列を有しても良く、得られたポリペプチドは、元のポリペプチドの一つ以上の、少なくとも N T C P と結合する生物学活性と、N T C P 仲介の肝細胞への胆汁酸輸送を両方向制御する生物学的活性を含む生物学的活性を持ちつづける。
10

【 0 0 5 6 】

一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドは、N T C P 仲介の肝細胞への胆汁酸の輸送を両方向制御できる。肝細胞が、特定の濃度以下のここに記載されたポリペプチドと接触する場合に、このようなポリペプチドと接触していない肝細胞と比較して、N T C P 仲介の肝細胞への胆汁酸の輸送は、増強される。肝細胞が、特定の濃度を超えるここに記載されたポリペプチドと接触する場合に、このようなポリペプチドと接触していない肝細胞と比較して、N T C P 仲介の肝細胞への胆汁酸の輸送は、阻害される。一部の実施形態において、肝細胞が、9 3 n m o l / L 以下のここに記載されたポリペプチドと接触する場合に、このようなポリペプチドと接触していない肝細胞と比較して、N T C P 仲介の肝細胞への胆汁酸の輸送は、増強される。一部の実施形態において、肝細胞が、9 3 n m o l / L を超えるここに記載されたポリペプチドと接触する場合に、このようなポリペプチドと接触していない肝細胞と比較して、N T C P 仲介の肝細胞への胆汁酸の輸送は、阻害される。例えば、肝細胞が、5 0 0 n g / m l 以下のここに記載された C m y r - 4 7 ポリペプチドと接触する場合に、このようなポリペプチドと接触していない肝細胞と比較して、N T C P 仲介の肝細胞への胆汁酸の輸送は、増強される。一部の実施形態において、肝細胞が、5 0 0 n g / m l を超えるここに記載された C m y r - 4 7 ポリペプチドと接触する場合に、このようなポリペプチドと接触していない肝細胞と比較して、N T C P 仲介の肝細胞への胆汁酸の輸送は、阻害される。
20

【 0 0 5 7 】

一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドが、対象における代謝に関連する一つ以上の化学的または生物学的分子のレベルまたは活性を調整（例えば、低下または安定化）できる。一部の実施形態において、上記代謝は、例えば、胆汁酸代謝、グルコース代謝、脂質代謝、またはアミノ酸代謝を含む。一部の実施形態において、化学的または生物学的分子は、グルコース、トリグリセリド、コレステロール、遊離脂肪酸、胆汁酸、アミノ酸、ホルモン、L D L - C 、H D L - C 、H b A 1 c 、血液尿素窒素およびミネ
40

10

20

30

40

50

ラルから選ばれるものである。一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドは、代謝変化を測定する一つ以上の生理学的パラメータ（例えば、血糖、血圧、体重、脂肪量、ボディマス指数（B M I）、炎症、アテローム性動脈硬化指数（A I）、心臓指數、腎指數、総脂肪指數および恒常性モデル評価（H O M A）指數）のレベルまたは値を調整（例えば、低下または安定化）できる。一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドが、対象における胆汁酸の血清レベルを増加できる。一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドが、対象における血清脂質のレベルを低下できる。一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドが、対象における総コレステロールの血清レベルを低下できる。さらなる実施形態において、ここに記載されたポリペプチドが、対象におけるL D L - コレステロールの血清レベルを低下できる。一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドが、対象におけるトリグリセリドの血清レベルを低下できる。一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドが、対象におけるグルコースの血清レベルを低下できる。一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドが、対象におけるH b A 1 c の血清レベルを低下できる。一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドが、対象におけるインスリンの血清レベルを安定化できる。一部の実施形態において、上記対象は、哺乳類であっても良い。一部の実施形態において、上記対象は、ヒトであっても良い。一部の実施形態において、上記対象は、代謝疾患を罹患し、またはこのような疾患を発展するリスクを有しても良い。

【 0 0 5 8 】

ここに使用されたように、「調整」または「変化」はすべて互換的に用いられ、一つ以上の定量化可能なパラメータを任意に、定義されたおよび／または統計的に有意な量で「減少」、「低下」、「低減」、「下方に制御」または「阻害」することを含む。用語「調整」は、さらに一つ以上の定量化可能なパラメータを任意に、定義されたおよび／または統計的に有意な量で、「増強」、「増加」、「向上」、「上方に制御」または「促進」することを含む。

【 0 0 5 9 】

用語「減少」、「低下」、「低減」、「下方に制御」または「阻害」は、すべてここに互換的に用いられ、代謝に関連する一つ以上の、例えば、グルコース、トリグリセリド、コレステロール、遊離脂肪酸、胆汁酸、アミノ酸、またはホルモン（例えば、インスリンを含む）、L D L - C、H D L - C、H b A 1 c 、血液尿素窒素およびミネラルのような化学的または生物学的分子のレベルまたは活性は、ここに記載のポリペプチドが存在しない場合に観察されるレベルまたは活性を下回るか、または対照ポリペプチドより低いことを指す。一部の実施形態において、「低下」は、代謝変化を測定する一つ以上の生理学的パラメータ（例えば、血糖、血圧、体重、脂肪量、ボディマス指数（B M I）、炎症、アテローム性動脈硬化指数（A I）、心臓指數、腎指數、総脂肪指數および恒常性モデル評価（H O M A）指數）のレベルまたは値は、ここに記載のポリペプチドが存在しない場合に観察されるレベルまたは活性を下回るか、または対照ポリペプチドより低いことを指す。特定の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドによる低下は、不活性分子または弱毒化分子の存在下で観察されるレベルまたは活性を下回ることである。一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドは、血清および／または他の組織または器官（例えば、肝臓、心臓、筋肉、内臓脂肪、皮下脂肪、腸および脳）におけるグルコース、インスリン、コレステロール、またはトリグリセリドのレベルを低下できる。

【 0 0 6 0 】

ここに使用されたように、対象のボディマス指數（B M I）の値は、以下の式で計算できる： $B M I = (k g \text{ で表した対象の体重}) / [(m \text{ で表した対象の身長})^2]$ 。炎症のレベルは、本分野の以下の様々な臨床テストで測定できる。例えば、血におけるC - 反応性タンパク質（C R P）レベルを測定することで、対象の炎症のレベルを定量的に測定できる。赤血球沈降速度（E S R）テストは、対象の炎症のレベルを測定するテストのもう一つの例である。E S R テストは、設定期間中の赤血球沈降物の割合を測定する。対象における総コレステロール（T C）とH D L - Cのレベル（例えば、mmol/Lで）を得る

10

20

30

40

50

後に、アテローム性動脈硬化指数（A I）の値は、以下の式で計算できる： $A I = (T C - H D L - C) / H D L - C$ 。ここに使用されたように、恒常性モデル評価（H O M A）指数は、H O M A - I R（インスリン抵抗性のレベルを定量化する）指数および／またはH O M A - 指数（細胞機能のレベルを定量化する）を指す。H O M A - I Rの値は、以下の式で計算できる： $H O M A - I R = [(m m o l / L \text{ で表した血グルコース}) \times (m U / L \text{ で表した血清インスリン})] / 22.5$ 。H O M A - の値は、以下の式で計算できる： $H O M A - = [(20 \times m U / L \text{ で表した血清インスリン}) / (m m o l / L \text{ で表した血グルコース} - 3.5)]\%$ 。心臓指数の値は、心臓の重量と総体重との比を意味し、以下の式で計算できる：心臓指数（g / kg）= 心臓の重量（g）/ 体重（kg）。腎指数の値は、腎の重量と総体重との比を意味し、以下の式で計算できる：腎指数（g / kg）= 腎の重量（g）/ 体重（kg）。総脂肪指数の値は、脂肪の重量（例えば、腹部脂肪および／または肩甲骨脂肪）と総体重との間の比を指す。ここに使用されたように、脂肪指数は、以下の式で計算できる：総脂肪指数（g / kg）= 腹部脂肪と肩甲骨脂肪の合計重量（g）/ 体重（kg）。

【0061】

同様に、用語「増強」、「増加」、「向上」、「上方に制御」または「促進」は、すべて互換的に用いられ、代謝に関連する一つ以上の、例えば、グルコース、トリグリセリド、コレステロール、遊離脂肪酸、胆汁酸、アミノ酸、またはホルモン（例えば、インスリンを含む）、L D L - C、H D L - C、H b A 1 c、血液尿素窒素およびミネラルのような化学的または生物学的分子のレベルまたは活性は、ここに記載のポリペプチドが存在しない場合に観察されるレベルまたは活性を上回るか、または対照ポリペプチドより高いことを指す。一部の実施形態において、「増強」は、代謝変化を測定する一つ以上の生理学的パラメータ（例えば、血糖、血圧、体重、脂肪量、ボディマス指数（B M I）、炎症、アテローム性動脈硬化指数（A I）、心臓指数、腎指数、総脂肪指数および恒常性モデル評価（H O M A）指数）のレベルまたは値は、ここに記載のポリペプチドが存在しない場合に観察されるレベルまたは活性を上回るか、または対照ポリペプチドより高いことを指す。特定の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドによる増加は、不活性分子または弱毒化分子の存在下で観察されるレベルまたは活性を上回ることである。一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドは、血清および／または他の組織または器官（例えば、肝臓、心臓、筋肉、内臓脂肪、皮下脂肪、腸および脳）における胆汁酸のレベルを増強できる。

【0062】

用語「安定化」、「維持」、「保持」と「保つ」は、代謝に関連する一つ以上の化学的または生物学的分子に関連して、互換的に用いられ、代謝に関連する一つ以上の化学的または生物学的分子（例えば、グルコース、トリグリセリド、コレステロール、遊離脂肪酸、胆汁酸、アミノ酸、ホルモン（例えば、インスリンを含む）、L D L - C、H D L - C、H b A 1 c、血液尿素窒素およびミネラル）のレベルまたは活性が、健康な対象もしくは代謝性疾患に罹患していない対象において観察されるレベルまたは活性、または陽性対照ポリペプチドの存在下で観察されるレベルまたは活性からの最小の差を示すことを指す。一部の実施形態において、「安定化」は、代謝変化を測定する一つ以上の生理学的パラメータ（例えば、血糖、血圧、体重、脂肪量、ボディマス指数（B M I）、炎症、アテローム性動脈硬化指数（A I）、心臓指数、腎指数、総脂肪指数および恒常性モデル評価（H O M A）指数）のレベルまたは値が、健康な対象もしくは代謝性疾患に罹患していない対象において観察されるレベルまたは値、または陽性対照ポリペプチドの存在下で観察されるレベルまたは値からの最小の差を示すことを指す。一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドは、血清におけるインスリンレベルおよび／または膵臓からのインスリンの産生を安定させることができる。

【0063】

ここに記載されたポリペプチドは、化学合成または組換え技術を用いて製造することができる。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 4 】

組換え手法が選択される場合、合成遺伝子は初めから構築されてもよいか、または天然遺伝子を、例えばカセット突然変異誘発によって突然変異してもよい。ここに記載されたポリペプチドは、組換えDNA技術を用いて製造できる。簡単な形で、これらの技術は、ペプチドをコードする天然または合成の遺伝子を取得する；それを適切なベクターに挿入する；ベクターを適切な宿主細胞に挿入する；宿主細胞を培養して遺伝子を発現させる；それによって産生されたペプチドを回収または単離することを含む。一部の実施形態において、回収されたペプチドは、その後、適切な程度に精製される。

【 0 0 6 5 】

例えば、ここに記載されたポリペプチドをコードするDNA配列は、適当な宿主において発現できるように、クローンされ、かつ操作される。親ポリペプチドをコードするDNAは、HBVゲノムライブラリーから、ポリペプチドを発現する細胞由来のmRNAに由来するcDNAから得られ、或いはDNA配列を合成的に構築することによって得られる。次いで、親DNAを宿主細胞を形質転換するために使用される適当なプラスミドまたはベクターに挿入する。通常に、宿主細胞と適合する種から由来する複製および制御配列を含むプラスミドベクターは、それらの宿主に関連して使用される。ベクターは、通常に、複製サイトと、形質転換細胞において表現型選択を提供することができるタンパク質またはペプチドをコードする配列を有する。ベクターは、当技術分野で一般的に使用されているものであってもよく、または当技術分野で一般的に使用されているベクターの機能的断片を組み合わせることによって標準的な技術を使用して構築してもよい。

10

【 0 0 6 6 】

宿主細胞は原核なまたは真核なものであっても良い。例えば、原核な宿主細胞は、大腸菌(*E. coli*)、枯草菌(*Bacillus subtilis*)および例えば、ネズミチフス菌(*Salmonella typhimurium*)またはセラチア・マルセッセンス(*Serratia marcesans*)および様々なシードモナス種(*Pseudomonas species*)のような他の腸内細菌科を含む。原核生物以外に、酵母培養物などの真核生物、または昆虫もしくは哺乳動物細胞培養物などの多細胞生物から由来する細胞を使用することができる。このような真核な宿主細胞系の例は、VEROとHeLa細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHOC)細胞系、W138、293、BHK、COS-7およびMDCK細胞系を含む。

20

【 0 0 6 7 】

一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドは、固相合成、または当分野において公知された他の同等の化学合成を用いて調製できる。一部の実施形態において、固相合成は、保護された α -アミノ酸を適切な樹脂にカップリングすることによってペプチドのC末端から開始される。このような出発物質は、 α -アミノ保護アミノ酸を、エステル結合によってクロロメチル化樹脂またはヒドロキシメチル樹脂へ、或いはアミド結合によってBHA樹脂またはMBHA樹脂へ結合することにより調製できる。アミノ酸は、ペプチド結合の形成のための本分野の公知された技術を用いてペプチド鎖に結合される。一つの方法はアミノ酸を誘導体に変換することに関わり、上記誘導体は、カルボキシル基をペプチドフラグメントの遊離N末端アミノ基と容易に反応させる。例えば、アミノ酸は、保護されたアミノ酸とクロロギ酸エチル、クロロギ酸フェニル、クロロギ酸sec-ブチル、クロロギ酸イソブチル、塩化ピバロイルなどの酸塩化物との反応によって、混合無水物に変換できる。或いは、アミノ酸は、2,4,5-トリクロロフェニルエステル、ペンタクロロフェニルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、p-ニトロフェニルエステル、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、または1-ヒドロキシベンゾトリアゾールから形成されるエステルのような活性エステルに変換できる。他のカップリング方法はN、N'-ジシクロヘキシリカルボジイミドまたはN、N'-ジイソプロピルカルボジイミドなどの適切なカップリング剤の使用を含む。

30

【 0 0 6 8 】

一部の実施形態において、ペプチド合成に使用される各アミノ酸の α -アミノ基は、そ

40

50

れらの活性な - アミノ機能を含む副反応を防ぐために、カップリング反応期間にわたって保護されてもよい。例えば、反応性側鎖官能基（例えば、スルフヒドリル、アミノ、カルボキシル、ヒドロキシル）を含む特定のアミノ酸は、初期および後続のカップリングステップにわたって化学反応がその部位で起こるのを防ぐために適切な保護基で保護されてもよい。適切な側鎖保護基の選択は当分野の技術に含まれる。保護基は、ペプチド鎖の構造を変えない反応条件下において、所望のアミノ酸ペプチドを完成する際に容易に除去される。

【 0 0 6 9 】

- アミノ保護基の除去後、残りの - アミノおよび側鎖保護アミノ酸は、所望の順序で段階的に結合する。合成において各アミノ酸を別々に添加する代わりに、固相合成機に添加する前にいくつかを互いにカップリングさせてもよい。適切なカップリング剤の選択は当業者の技術に含まれる。

10

【 0 0 7 0 】

各保護されたアミノ酸またはアミノ酸配列は、固相反応器に過剰に導入され、カップリングは、ジメチルホルムアミド (D M F) または C H₂ C l₂ またはそれらの混合物の媒体中で適切に行われる。不完全なカップリングが生じた場合、次のアミノ酸とカップリングする前に、N - アミノ保護基を除去する前にカップリング手順を繰り返す。合成の各段階に、カップリング反応の成功をモニターしても良い。カップリング反応は、公知の方法、例えば B I O S E A R C H 9 5 0 0 (商標) ペプチド合成機を使用して自動的に実施できる。

【 0 0 7 1 】

所望のペプチド配列を完成すると、保護されたペプチドは、樹脂支持体から切断しなければならず、かつ全ての保護基を除去しなければならない。切断反応および保護基の除去は、同時にまたは順番に適切に行う。樹脂支持体がクロロメチル化ポリスチレン樹脂である場合、ペプチドを樹脂に錨着する結合は、C 末端残基の遊離カルボキシル基と樹脂マトリックス上に存在する多くのクロロメチル基のうちの 1 つとの間に形成されるエステル結合である。理解すべきのは、錨着する結合は、エステル結合を破壊し、樹脂マトリックスを貫通することができる試薬によって切断することができる。認識すべきのは、ポリペプチドは、ポリペプチドが支持体から切断される前または後に、修飾（例えば、例えば、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、コレステロール、アラキドン酸のような疎水基で N - 末端に修飾すること；アミド化（アミノ化）、イソペンタジオール化、または他の安定化 C - 末端修飾で C - 末端に修飾すること）されても良い。

20

【 0 0 7 2 】

本発明のポリペプチドの精製は、分取 H P L C (逆相 H P L C を含む) または他の公知のクロマトグラフィー技術（ゲル浸透、イオン交換、分配クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィー（モノクローナル抗体カラムを含む）または向流分布）などの従来の手順を用いて行われても良い。

30

【 0 0 7 3 】

I I . 薬学組成物

本開示は、さらに、ここに記載されたポリペプチドを含む組成物（薬学組成物を含む）を提供する。特定の実施形態において、組成物は、一つまたは以上のここに記載されたポリペプチドを含んでも良い。一部の実施形態において、上記組成物は、さらに適当な薬学的に許容される担体を含んでも良い。一部の実施形態において、それを必要とする対象に投与する際に、薬学組成物が、対象における N T C P 仲介の胆汁酸摂取を両方向制御させる、ここに記載されたポリペプチドの血清濃度を提供する。

40

【 0 0 7 4 】

「薬学的に許容される担体」は、例えば、固体、半固体、または液体充填剤、希釈剤、カプセル化材料、製剤補助剤、賦形剤、または担体のような不活性成分を指し、対象に投与する「薬学組成物」を含む治療薬と一緒に使用される。薬学的に許容される担体は、受領者に対して、用いられる投与量と濃度では無毒であり、かつ製剤の他の成分と適合性が

50

ある。薬学的に許容される担体は、使用される製剤に適している。例えば、治療薬を経口投与する場合、担体はゲルカプセルであっても良い。治療薬を皮下投与する場合、理想的に、担体は皮膚に対して刺激性がなく、注射部位反応を引き起こさない。

【0075】

ここに記載されたポリペプチドの薬学組成物は、所望の純度を有するこのようなポリペプチドを、一つ以上の任意の薬学的に許容される担体と混合することによって調製されても良い。薬学的に許容される担体は、例えば：緩衝剤（例えば、リン酸塩、クエン酸塩、および他の有機酸）；酸化防止剤（例えば、アスコルビン酸とメチオニン）；防腐剤（例えば、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド、塩化ヘキサメトニウム、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、フェノール、ブチルもしくはベンジルアルコール、メチルパラベンもしくはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン、カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；およびm-クレゾール）；低分子量（例えば約10残基未満）のポリペプチド；タンパク質（例えば、血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリン）；親水性ポリマー（例えば、ポリビニルピロリドン）；アミノ酸（例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、またはリジン）；グルコース、マンノース、またはデキストリンを含む单糖、二糖、および他の炭水化物；キレート化剤（例えば、EDTA）；糖（例えば、スクロース、マンニトール、トレハロースまたはソルビトール）；塩形成性対イオン（例えば、ナトリウム）；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質複合体）；および／または非イオン性界面活性剤（例えば、ポリエチレングリコール（PEG））を含む。

10

【0076】

例示的な薬学的担体は、結合剤（例えば、アルファー化トウモロコシデンプン、ポリビニルピロリドンまたはヒドロキシプロピルメチルセルロースなど）；フィラー（例えば、ラクトースおよび他の糖、微結晶セルロース、ペクチン、ゼラチン、硫酸カルシウム、エチルセルロース、ポリアクリレートまたはリン酸水素カルシウムなど）；潤滑剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルク、シリカ、コロイド状二酸化ケイ素、ステアリン酸、金属ステアリン酸塩、硬化植物油、コーンスター、ポリエチレングリコール、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウムなど）；崩壊剤（例えば、デンプン、デンブングリコール酸ナトリウムなど）；と湿潤剤（例えば、ラウリル硫酸ナトリウムなど）を含んでいても良い。

20

【0077】

例示的な薬学的に許容される担体は、さらに、間質性薬物分散剤を含み、可溶性の中性活性ヒアルロニダーゼ糖タンパク質（sHASEGP）、例えば、ヒト可溶性PH-20ヒアルロニダーゼ糖タンパク質（例えば、rHuPH20（HYLINE X（登録商標）、Baxter International, Inc.））をあげられる。一部の実施形態において、sHASEGPは、薬学組成物に、一つ以上の追加のグリコサミノグリカナーゼ（glycosammoglycanases）（例えば、コンドロイチナーゼ）と混ぜても良い。

30

【0078】

上記薬学組成物は、更に治療される特定の症状に適した、例えば互いに悪影響を及ぼさない相補的な活性を有する複数の活性成分を含んでも良い。そのような活性成分は、意図する目的に有効な量で組み合わせて適切に存在してもよい。

40

【0079】

一部の実施形態において、上記活性成分は、コロイド状薬物送達システム（例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセルなど）中、またはマクロエマルジョン中において、例えばコアセルベーション技術または界面重合で製造されたマイクロカプセル（例えば、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチンマイクロカプセルとポリ（メチルメタクリレート）マイクロカプセル）にそれぞれ封入されてもよい。

【0080】

50

一部の実施形態において、上記薬学組成物は、徐放性製剤を含んでも良い。徐放性製剤の適切な例としては、例えば、ここに記載のポリペプチドを含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスが挙げられ、このマトリックスは、例えばフィルムまたはマイクロカプセルなどの成形品の形態であっても良い。

【0081】

一部の実施形態において、上記薬学組成物は、インビボ投与に使用でき、かつ無菌性である。無菌性は、例えば無菌濾過膜を通して濾過することによって容易に達成できる。

【0082】

上記薬学組成物は、例えば錠剤、カプセル剤、ゲルカプセル剤、散剤または顆粒剤などの多くの可能な投与形態のいずれか一つに製剤されても良い。上記薬学組成物は、液剤、懸濁剤、乳剤、または混合媒体として製剤されても良い。一部の実施形態において、上記薬学組成物は、凍結乾燥製剤または水溶液として製剤されても良い。

10

【0083】

一部の実施形態において、上記薬学組成物は、溶液として製剤されても良い。例えば、ここに記載されたポリペプチドは、緩衝化されていない溶液中（例えば、食塩水中または水中）で投与することができる。一部の実施形態において、上記ポリペプチドは、適当な緩衝剤溶液中で投与することもできる。例えば、上記緩衝剤溶液は、酢酸塩、クエン酸塩、プロラミン、炭酸塩、またはリン酸塩、あるいはそれらの任意の組み合わせを含んでも良い。一部の実施形態において、上記緩衝剤溶液は、リン酸緩衝食塩水（PBS）であっても良い。ポリペプチドを含有する緩衝液のpHおよび浸透圧は、対象への投与に適するように調整できる。

20

【0084】

一部の実施形態において、上記薬学組成物は、水性、非水性、または混合媒体中の懸濁液として製剤されても良い。上記水性懸濁液は、さらに例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトールおよび／またはデキストランを含む懸濁液の粘度を増加させる物質を含んでも良い。上記懸濁液は、さらに安定剤を含んでも良い。

【0085】

一部の実施形態において、上記薬学組成物は、エマルジョンとして製剤されても良い。例示的なエマルジョンは、通常直径0.1 μmを超える小滴の形態の液体が、他の液体に分散された不均一系を含む。エマルジョンは、分散相と、水相中、油相中、またはそれ自身が分離相として溶液中に存在できる活性薬物以外に、追加の成分を含んでも良い。マイクロエマルジョンも本開示の実施形態として含まれる。一部の実施形態において、上記薬学組成物は、さらにリポソーム製剤として製剤されても良い。

30

【0086】

I I I . 使用の方法

本開示の実施形態は、ここに記載されたポリペプチドの治療的用途を含む。一つの態様において、医薬品としてのここに記載されたポリペプチドの使用を提供する。もう一つの態様において、代謝疾患の治療におけるここに記載されたポリペプチドの使用を提供する。一部の実施形態において、上記代謝疾患が脂質代謝の異常調節に関係する。特定の実施形態において、上記代謝疾患は、コレステロール関連病気であっても良い。一部の実施形態において、上記コレステロール関連病気は、高脂血症であっても良い。一部の実施形態において、上記高脂血症は、高トリグリセリド血症、高コレステロール血症、またはそれらの組み合わせであっても良い。一部の実施形態において、総トリグリセリド、総コレステロールおよびLDL-Cのいずれか一つの血清レベルの上昇に関連した症状の治療におけるここに記載のポリペプチドの使用を提供する。

40

【0087】

一部の実施形態において、上記代謝疾患がグルコース代謝の異常調節に関係する。一部の実施形態において、上記代謝疾患は、糖尿病である。一部の実施形態において、上記代謝疾患は、2型糖尿病である。一部の実施形態において、上記代謝疾患は、肥満である。一部の実施形態において、グルコースまたはHbA1cの血清レベルの上昇に関連した症

50

状の治療におけるここに記載のポリペプチドの使用も提供する。

【 0 0 8 8 】

もう一つの態様において、対象に治療的有効量のここに記載されたポリペプチドまたはこのようなポリペプチドの薬学組成物を投与することを含む、対象における代謝疾患を治療する方法を提供する。特定の実施形態において、上記対象は、代謝疾患を罹患する、或いはこのような疾患が進展するリスクを有する。一部の実施形態において、上記対象は、哺乳類であっても良い。一部の実施形態において、上記対象は、ヒトであっても良い。特定の実施形態において、ここに記載された方法と用途は、さらに対象に治療的有効量の少なくとも一つの他の治療薬を投与することを含む。

【 0 0 8 9 】

一部の実施形態において、上記代謝疾患が脂質代謝の異常調節に関係する。一部の実施形態において、上記代謝疾患は、コレステロール関連病気であっても良い。一部の実施形態において、上記コレステロール関連病気は、高脂血症であっても良い。一部の実施形態において、上記高脂血症は、高トリグリセリド血症、高コレステロール血症、またはそれらの組み合わせであっても良い。

10

【 0 0 9 0 】

他の態様において、対象に治療的有効量のここに記載されたポリペプチド或いは上記ポリペプチドを含む薬学組成物を投与することを含む、それを必要とする対象における血清脂質のレベル（例えば、総コレステロール、総トリグリセリド、またはLDLコレステロールのレベル）を低下させる方法を提供する。一部の実施形態において、以上の対象は、脂質代謝の異常調節に関する代謝疾患に罹患するまたは発展するリスクがある。一部の実施形態において、上記対象は、コレステロール関連病気に罹患するまたは発展するリスクがある。一部の実施形態において、上記対象は、高脂血症に罹患するまたは発展するリスクがある。一部の実施形態において、上記対象は、高トリグリセリド血症、高コレステロール血症、またはそれらの組み合わせに罹患するまたは発展するリスクがある。

20

【 0 0 9 1 】

一部の実施形態において、上記代謝疾患がグルコース代謝の異常調節に関係する。一部の実施形態において、上記代謝疾患は、糖尿病である。一部の実施形態において、上記代謝疾患は、2型糖尿病である。一部の実施形態において、上記代謝疾患は、肥満である。

【 0 0 9 2 】

30

一部の態様において、対象に治療的有効量のここに記載されたポリペプチド或いは上記ポリペプチドを含む薬学組成物を投与することを含む、それを必要とする対象における血グルコースまたはHbA1cレベルを低下させる方法を提供する。一部の態様において、対象に治療的有効量のここに記載されたポリペプチド或いは上記ポリペプチドを含む薬学組成物を投与することを含むそれを必要とする対象におけるインスリンの血清レベルを安定化させる方法を提供する。一部の実施形態において、以上の対象は、グルコース代謝の異常調節に関する代謝疾患に罹患するまたは発展するリスクがある。一部の実施形態において、上記対象は、糖尿病に罹患するまたは発展するリスクがある。一部の実施形態において、上記対象は、2型糖尿病に罹患するまたは発展するリスクがある。一部の実施形態において、上記対象は、肥満に罹患するまたは発展するリスクがある。

40

【 0 0 9 3 】

理論にとらわれずに、ポリペプチドの投与後の対象におけるNTCP仲介の胆汁酸摂取を両方向制御することで、ここに記載されたポリペプチドは、代謝疾患を治療、または対象における代謝関連分子の血清レベルを調整できると考えられる。一部の実施形態において、このようなポリペプチドを投与された対象の血流におけるここに記載されたポリペプチドの濃度は、特定の濃度以下である場合に、対象における胆汁酸摂取は、増強される。一部の実施形態において、このようなポリペプチドを投与された対象の血流におけるここに記載されたポリペプチドの濃度は、特定の濃度を超える場合に、対象における胆汁酸摂取は、阻害される。一部の実施形態において、このようなポリペプチドを投与された対象の血流におけるここに記載されたポリペプチドの濃度は、93nmol/L以下である場

50

合に、対象における胆汁酸摂取は、増強される。一部の実施形態において、このようなポリペプチドを投与された対象の血流におけるここに記載されたポリペプチドの濃度は、93 nmol / Lを超える場合に、対象における胆汁酸摂取は、阻害される。例えば、このようなポリペプチドを投与された対象の血流におけるここに記載されたCmyr-47ポリペプチドの濃度は、500 ng / ml以下である場合に、対象における胆汁酸摂取は、増強される。上記対象の血流におけるここに記載されたCmyr-47ポリペプチドの濃度は、500 ng / mlを超える場合に、対象における胆汁酸摂取は、阻害される。一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドの血清濃度は、投与後少なくとも約10、20、40、60、90、120、180、240、または360分間に測定される。一部の実施形態において、投与後の特定の時点に、ここに記載されたポリペプチドの血清濃度は、93 nmol / Lを超える。一部の実施形態において、投与後の特定の時点に、ここに記載されたポリペプチドの血清濃度は、93 nmol / Lを下回る。例えば、投与後の特定の時点に、ここに記載されたCmyr-47ポリペプチドの血清濃度は、500 ng / mlを超える。一部の実施形態において、投与後の特定の時点に、ここに記載されたCmyr-47ポリペプチドの血清濃度は、500 ng / mlを下回る。一部の実施形態において、ポリペプチドのこのような閾値血清濃度は、投与後の約20分間に発生する。

【0094】

ここに使用されたように、「代謝疾患」または「代謝病気」は、例えば、胆汁酸代謝、グルコース代謝、脂質代謝およびアミノ酸代謝に関する経路のような代謝経路の異常調節に起因する任意の疾患を含む。一部の実施形態において、上記代謝疾患は、脂質代謝の異常調節に関する疾患を指す。特定の実施形態において、上記代謝疾患は、脂質代謝産物（例えば、胆汁酸、コレステロール、トリグリセリドおよび脂肪酸を含む）の生産、除去、および／または利用における異常調節を含む疾患を指す。そして、ここに記載された代謝疾患は、コレステロール関連病気を指しても良い。そして、ここに記載された代謝疾患は、例えば、高トリグリセリド血症、高コレステロール血症、またはそれらの組み合わせを含む高脂血症を指しても良い。一部の実施形態において、上記代謝疾患は、グルコース代謝の異常調節に関する疾患を指す。特定の実施形態において、上記代謝疾患は、グルコース代謝産物（例えば、グルコース、ビルビン酸およびグルコース-6-リン酸）の生産、除去、および／または利用における異常調節を含む疾患を指す。そして、ここに記載された代謝疾患は、糖尿病と肥満を指しても良い。

【0095】

ここに記載された代謝疾患は、高血糖；低血糖；高インスリン血症；肥満；高脂血症；高トリグリセリド血症；高コレステロール血症；心臓病；メタボリック・シンドローム；アテローム性動脈硬化症；冠状動脈性心臓病；冠動脈疾患；末梢動脈疾患；狭心症；脳血管疾患；急性冠症候群；心筋梗塞；卒中；循環器疾患；アルツハイマー病；脂質異常症；家族性複合型高脂血症；家族性高トリグリセリド血症；家族性高コレステロール血症；ヘテロ接合型高コレステロール血症；ホモ接合性高コレステロール血症；家族性欠陥アポリポタンパク質B-100；多遺伝子性高コレステロール血症；レムナント除去病；肝性リバーゼ欠損症；食傷と、甲状腺機能低下症と、エストロゲンおよびプロゲスチン療法、遮断薬、チアジド系利尿薬などの薬による脂質異常症；ネフローゼ症候群；慢性腎不全；クッシング症候群；原発性胆汁性肝硬変；グリコーゲン蓄積症；肝細胞癌；胆汁うっ滞；先端巨大症；インスリノーマ；成長ホルモン単独欠損症；腎臓障害；肥満；およびアルコール誘発性高トリグリセリド血症から選ばれても良い。

【0096】

用語「代謝疾患」は、例えば、I型糖尿病、II型糖尿病、高血糖、低血糖、高インスリン血症、肥満、高脂血症、高トリグリセリド血症、高コレステロール血症、心臓病、メタボリック・シンドローム、冠状動脈性心臓病、脳卒中、心血管疾患、アルツハイマー病、ならびに一般的に、例えば、総血清コレステロール、LDL、トリグリセリド、VLDL、および／またはHDLの上昇によって現れる異常脂質血症を含む。ここに記載のポリ

ペプチドを単独で、または1つ以上の他の薬剤と組み合わせて使用して治療できる原発性および続発性脂質異常症のいくつかの非限定的な例は、メタボリック・シンドローム、糖尿病、高脂血症、家族性高脂血症、家族性高トリグリセリド血症、ヘテロ型高コレステロール血症を含む家族型高コレステロール血症、ホモ型高コレステロール血症、家族性不完全アボリポタンパク質B-100、多遺伝子性高コレステロール血症、ムナント除去病；肝性リバーゼ欠損症；食傷と、甲状腺機能低下症と、エストロゲンおよびプロゲスチン療法、遮断薬、チアジド系利尿薬などの薬に続発する脂質異常症；ネフローゼ症候群、慢性腎不全、クッシング症候群、原発性胆汁性肝硬変、グリコーゲン蓄積症、肝細胞癌、胆汁うっ滞、先端巨大症、インスリノーマ、成長ホルモン単独欠損症、腎臓障害、肥満、およびアルコール誘発性高トリグリセリド血症を含む。

【0097】

一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドは、一つ以上の代謝疾患を予防または治療することに有用する。特定の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドは、代謝疾患に関連する一つ以上の症状または合併症を予防または治療することにも有用できる。例えば、上記ポリペプチドは、心血管疾患を予防または治療することに有用でき、例えば冠状動脈性心臓病、冠状動脈疾患、末梢動脈疾患、脳卒中（虚血性および出血性）、狭心症、または脳血管疾患および急性冠症候群、心筋梗塞などのアテローム性動脈硬化症を含む。特定の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドは、心臓疾患、腎障害、または代謝病気に関連する肥満を予防または治療することにも有用できる。

【0098】

用語「糖尿病」は、一般的に体内で適切な血糖レベルを維持できず、グルコースの産生および/または利用における代謝欠陥を特徴とする疾患または病状を指す。血糖値の上昇を含むこれらの欠陥の結果は、「高血糖」と呼ばれる。糖尿病の二つの主要な形態は、1型糖尿病および2型糖尿病である。1型糖尿病は、一般にインスリンの絶対的欠乏（例えば、膵臓細胞からの産生が極めて低いかまたは完全に除去されている）に起因し、したがってグルコース利用を調節することができない。2型糖尿病は、インスリンの正常レベルまたはさらに高いレベルに表し、組織がインスリンに適切に応答できないことで生じるものである。ほとんどの2型糖尿病患者はインスリン抵抗性を有し、インスリン分泌がインスリンに応答するための末梢組織の抵抗性を補うことができないから、インスリンの相対的欠乏症を有する。

【0099】

「高脂血症」という用語は、血清脂質の異常な増加を特徴とする病状を指す。循環血中の脂質画分は、例えば、総コレステロール、特定のリポタンパク質、およびトリグリセリドを含む。血清リポタンパク質は、循環中の脂質の担体として働き、それらの密度によって、キロミクロン、超低密度リポタンパク質（「LDL」）、中密度リポタンパク質（「IDL」）、低密度リポタンパク質（「LDL」）、および高密度リポタンパク質（「HDL」）に分類される。用語「高脂血症」は、原発性および続発性高脂血症を含む。原発性高脂血症は、一般に遺伝的欠陥によって引き起こされるが、続発性高脂血症は、一般に様々な病状、薬物、および食事要因などの他の要因によって引き起こされる。例えば、続発性高脂血症は、糖尿病に引き起こされても良い。或いは、高脂血症は、原発性および続発性の要因の組み合わせに引き起こされても良い。高脂血症は、高トリグリセリド血症、高コレステロール血症、またはそれらの組み合わせを含む。用語「高トリグリセリド血症」は、ここに使用されたように、血清総トリグリセリドレベルが所望のレベルを超えて上昇する病状を指す。用語「高コレステロール血症」は、ここに使用されたように、血清コレステロールレベルが所望のレベルを超えて上昇する病状を指す。特定の実施形態において、血清総コレステロール、HDLコレステロール（「HDL-C」）、またはLDLコレステロール（「LDL-C」）レベルは、高コレステロール血症における所望のレベルを超えて上昇する。高脂血症は、心血管とアテローム性動脈硬化疾患の発展を含むリスクを増加する。用語「心血管疾患」は、血管内の異常に高濃度の脂質によって引き起こされる循環系の血管の疾患を含む。用語「アテローム性動脈硬化」は、脂肪プラークが内壁で

10

20

30

40

50

発生し、最終的に血流が閉塞する動脈疾患を指す。

【0100】

「患者」と「対象」は互換的に用いられ、疾患、障害、または病状について治療または評価されている、疾患、障害、または病状を発症する危険性のある、あるいは疾患、障害、または病状に罹患する哺乳類またはヒトなどの動物を指す。一部の実施形態において、このような疾患、病気、または病状は、代謝疾患を含んでも良い。一部の実施形態において、上記代謝疾患が脂質代謝の異常調節に関係しても良い。一部の実施形態において、上記代謝疾患は、高脂血症（例えば、高コレステロール血症、高トリグリセリド血症、またはそれらの組み合わせ）のようなコレステロール関連病気であっても良い。一部の実施形態において、上記代謝疾患がグルコース代謝の異常調節に関係しても良い。一部の実施形態において、上記代謝疾患は、1型と2型糖尿病を含む糖尿病であっても良い。

10

【0101】

ここに記載されたポリペプチドまたはこのようなポリペプチドを含む組成物の用語「治療的有効量」または「有効量」は、治療のためのポリペプチドまたは組成物が有効である障害の予防または治療に有効な量を指す。上記用語は、代謝疾患に罹患するまたは発展するリスクがある対象における胆汁酸の血清レベルの向上に対して、有効することに記載されたポリペプチドの量を含む。上記用語は、代謝疾患（例えば、糖尿病と肥満）に罹患するまたは発展するリスクがある対象における血糖またはHbA1cレベルの低下や、インスリンの血清レベルの安定化に対して、有効することに記載されたポリペプチドの量を含む。上記用語は、代謝疾患（例えば、高脂血症（高コレステロール血症、高トリグリセリド血症、または两者を含む））に罹患するまたは発展するリスクがある対象における血清脂質のレベル（例えば、総コレステロール、総トリグリセリド、LDLコレステロールレベル）の低下に対して、有効することに記載されたポリペプチドの量を含む。上記用語は、さらに、代謝疾患（例えば、糖尿病と高脂血症（例えば、高コレステロール血症、高トリグリセリド血症、または两者））を治療するために対象に投与した場合に、既存の疾患またはその疾患の1つもしくは複数の症状を軽減、改善、または維持すること、あるいは疾患の進行を抑制することによって、疾患の治療に十分であるここに記載されたポリペプチドの量を含む。「治療的有効量」または「有効量」は、ポリペプチド、投与経路、疾患およびその重症度、ならびに健康状態、年齢、体重、家族歴、遺伝子構成、病理学的過程の段階、先行または同時の治療の種類（あれば）、および治療されるべき対象の他の個々の特徴に応じて変われる。

20

【0102】

ここに記載されたポリペプチドの「治療的有効量」は、投与されたポリペプチドを、該ポリペプチドが対象におけるNTCP仲介の胆汁酸摂取を阻害できるほどの対象の血流における濃度に達成させる。一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドの治療的有効量は、その量を投与された対象の血流に、投与されたポリペプチドが、少なくとも約93nmol/Lに達成させる。例えば、ここに記載されたCmyr-47ポリペプチドの治療的有効量は、その量を投与された対象の血流に、投与されたポリペプチドが、少なくとも約500ng/mlに達成させる。

30

【0103】

特定の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドの治療的有効量は、投与されたポリペプチドの血清濃度が、対象におけるNTCP仲介の胆汁酸摂取を両方向制御することを可能にする量を指す。例えば、対象が、ここに記載されたポリペプチドの治療的有効量で投与される場合に、対象におけるポリペプチドの初期血清濃度は、ポリペプチドが、NTCP仲介の胆汁酸摂取を阻害する特定の濃度を超えてよい。対象におけるポリペプチドの血清濃度は、徐々に減少し、ポリペプチドがNTCP仲介の胆汁酸摂取を増強し始める値まで或いは以下になってしまよい。投与されたポリペプチドの血清濃度は、投与後少なくとも約10、20、40、60、90、120、180、240、または360分後に評価できる。一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドの治療的有効量は、ポリペプチドが、投与後の特定の時点に、93nmol/Lを超える血清濃度に達

40

50

成させる。一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドの治療的有効量は、ポリペプチドが、投与後の特定の時点に、 93 nmol/L 以下の血清濃度に達成させる。例えば、ここに記載されたCmyr-47ポリペプチドの治療的有効量は、ポリペプチドが、投与後の特定の時点に、 500 ng/mL を超える血清濃度に達成させる。一部の実施形態において、ここに記載されたCmyr-47ポリペプチドの治療的有効量は、ポリペプチドが、投与後の特定の時点に、 500 ng/mL 以下の血清濃度に達成させる。一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドの治療有効量は、投与後約20分でポリペプチドのそのような閾値血清濃度を生じる。

【0104】

様々な実施形態において、用語「治療」は、対象（例えば、ヒトなどの哺乳類）または細胞の現在の経過を変えるための対象または細胞の治療を含む。治療は、例えば、ここに記載されたポリペプチド或いは上記ポリペプチドを含む薬学組成物の投与を含み、かつ予防的にまたは病理学的事象の開始または病因との接触の後に行うことができる。「予防的」治療も含まれ、これは治療される疾患または病状の進行速度を低下させること、その疾患または病状の発症を遅らせること、またはその発症の重症度を低下させることを目的とする。「治療」または「予防」は、必ずしも疾患もしくは病状または関連症状の完全な根絶、治癒、または予防を示すわけではない。様々な実施形態において、用語「治療」は、例えば糖尿病および高脂血症（例えば、高コレステロール血症、高トリグリセリド血症、または両者）のような代謝性疾患に罹患する対象における病理学的過程または症状の軽減、遅延または回復を含む。一部の実施形態において、用語「治療」は、代謝疾患の少なくとも1つの症状または測定可能なパラメータを改善することを含む。当業者にとって、代謝疾患の病理学的過程を評価するために、どの生物学的および/または生理学的パラメータを使用できることは、明らかなことである。このような病理学的過程または症状は、代謝に関連する一つ以上の化学的または生物学的分子（例えば、グルコース、トリグリセリド、コレステロール、遊離脂肪酸、胆汁酸、アミノ酸、ホルモン（例えば、インスリン）、LDL-C、HDL-C、HbA1c、血液尿素窒素およびミネラル）の健康対象と比較して過剰または増加したレベル、または代謝変化を測定する一つ以上の生理学的パラメータ（例えば、血糖、血圧、体重、脂肪量、ボディマス指数（BMI）、炎症、アテローム性動脈硬化指数（AI）、心臓指数、腎指数、総脂肪指数および恒常性モデル評価（HOMA）指数）の健康対象と比較して過剰または増加したレベルを含む。

【0105】

用語「投与」または「給与」は、ここに記載のポリペプチドの局所または全身投与による対象への送達を含む。投与は、局所的（点眼用、および腔と直腸送達を含む粘膜への投与を含む）、経肺（例えばネブライザー、気管内、鼻腔内を含む粉末またはエアロゾルの吸入または送気）、表皮、経皮、経口、または非経口であっても良い。非経口投与は、静脈内、皮下、腹腔内、または筋肉内注射または注入；または頭蓋内投与、例えば髄腔内投与または脳室内投与を含む。

【0106】

特定の実施形態において、本開示は、対象における代謝に関連する一つ以上の化学的または生物学的分子（例えば、グルコース、トリグリセリド、コレステロール、遊離脂肪酸、胆汁酸、アミノ酸、ホルモン、LDL-C、HDL-C、HbA1c、血液尿素窒素およびミネラル）のレベルまたは活性の調整（低下または安定化）におけるここに記載されたポリペプチドの用途を提供する。一部の実施形態において、本開示は、代謝変化を測定する一つ以上の生理学的パラメータ（例えば、血糖、血圧、体重、脂肪量、ボディマス指数（BMI）、炎症、アテローム性動脈硬化指数（AI）、心臓指数、腎指数、総脂肪指数および恒常性モデル評価（HOMA）指数）のレベルまたは値の調整（低下または安定化）におけるここに記載されたポリペプチドの使用を提供する。

【0107】

一部の実施形態において、本開示は、対象における血清脂質のレベルの低下におけるここに記載されたポリペプチドの用途を提供する。一部の実施形態において、本開示は、対

10

20

30

40

50

象における総コレステロールの血清レベルの低下におけるここに記載されたポリペプチドの使用を提供する。一部の実施形態において、本開示は、対象におけるLDL-コレステロールの血清レベルの低下におけるここに記載されたポリペプチドの使用を提供する。一部の実施形態において、本開示は、対象におけるトリグリセリドの血清レベルの低下におけるここに記載されたポリペプチドの使用を提供する。一部の実施形態において、本開示は、対象におけるグルコースの血清レベルの低下におけるここに記載されたポリペプチドの使用を提供する。一部の実施形態において、本開示は、対象におけるインスリンの血清レベルの安定化におけるここに記載されたポリペプチドの使用を提供する。一部の実施形態において、上記対象は、哺乳類であっても良い。一部の実施形態において、上記対象は、ヒトであっても良い。

10

【0108】

一部の実施形態において、本開示は、代謝疾患を発展するリスクの低下におけるここに記載されたポリペプチドの用途を提供する。特定の実施形態において、本開示は、さらに代謝疾患に関連する一つ以上の症状または合併症を発展するリスクの低下におけるここに記載されたポリペプチドの使用を提供する。一部の実施形態において、上記代謝疾患が脂質代謝の異常調節に関係する。一部の実施形態において、上記代謝疾患は、コレステロール関連病気である。一部の実施形態において、上記代謝疾患は、高脂血症である。上記高脂血症は、高トリグリセリド血症、高コレステロール血症、または両者を含む。一部の実施形態において、上記代謝疾患がグルコース代謝の異常調節に関係する。一部の実施形態において、上記代謝疾患は、糖尿病である。上記糖尿病は、1型と2型糖尿病を含む。一部の実施形態において、上記代謝疾患は、肥満である。代謝疾患に関連する症状または合併症は、このような代謝疾患（例えば、糖尿病、高脂血症（高トリグリセリド血症、高コレステロール血症、または両者を含む））を有する対象における、例えば、アテローム性動脈硬化疾患のような心血管疾患、心臓疾患、腎障害、または肥満を含む。

20

【0109】

本開示は、さらに対象において、ここに記載されたポリペプチドの上記使用を実行する方法を提供する。このような方法は、対象に、治療的有効量のここに記載されたポリペプチド或いは上記ポリペプチドを含む薬学組成物を投与することを含む。一部の実施形態において、上記対象は、哺乳類であっても良い。一部の実施形態において、上記対象は、ヒトであっても良い。一部の実施形態において、上記対象は、代謝疾患を罹患する、或いはこのような疾患が進展するリスクを有する。

30

【0110】

さらなる態様において、本開示は、医薬品の製造または調製におけるここに記載されたポリペプチドの用途を提供する。一部の実施形態において、上記医薬品は、代謝疾患の治療に用いられても良い。上記代謝疾患は、脂質代謝の異常調節に関係する。一部の実施形態において、上記医薬品は、コレステロール関連病気の治療に用いられても良い。一部の実施形態において、上記コレステロール関連病気は、高脂血症であっても良い。上記高脂血症は、高トリグリセリド血症、高コレステロール血症、またはそれらの組み合わせであっても良い。もう一つの実施形態、上記医薬品は、対象における血清脂質のレベル（例えば、総コレステロール、総トリグリセリド、またはLDLコレステロールレベル）を低下する方法に用いられ、対象に治療的有効量の医薬品を投与することを含む。

40

【0111】

一部の実施形態において、上記代謝疾患がグルコース代謝の異常調節に関係しても良い。一部の実施形態において、上記医薬品は、糖尿病（例えば、1型または2型糖尿病）の治療に用いられる。一部の実施形態において、上記医薬品は、肥満の治療に用いられても良い。もう一つの実施形態において、上記医薬品は、対象における血糖またはHbA1cレベルを低下する方法に用いられ、対象に治療的有効量の医薬品を投与することを含む。

【0112】

特定の実施形態において、治療される病気は、NTCP活性を両方向制御することで改善、改良、抑制、または予防される任意な疾患または病状であっても良い。特定の実施形

50

態において、肝細胞による胆汁酸摂取の調節から利益を得る病気または疾患も、ここに記載されたポリペプチドで治療できる。特定の実施形態において、ここに記載のポリペプチドと方法と用途で治療可能な対象は、LDLアフェレーシスを示す対象、糖尿病を有する対象、原発性高脂血症（高コレステロール血症、高トリグリセリド血症、またはそれらの組み合わせを含む）を有するが他の治療薬を受けつけない対象或いは他の治療薬で制御されない対象、高脂血症を発展するリスクがあるが予防的に治療され得る対象を含む。他の適応症は、2型真性糖尿病、胆汁うつ滞性肝疾患（原発性胆汁性肝硬変）、ネフローゼ症候群、甲状腺機能低下症、肥満などの続発性原因、ならびに心血管疾患（例えばアテローム性動脈硬化症）、心臓疾患、腎臓障害の予防および治療に関連する脂質異常症を含む。

【0113】

10

特定の実施形態において、ここに記載された方法と用途は、さらに対象に有効量の少なくとも一つの他の治療薬を投与することを含む。特定の実施形態において、他の治療薬は、ここに記載された代謝疾患に関連する一つ以上の疾患（例えば、糖尿病または高脂血症に関連する一つ以上の疾患）を予防および／または治療することに用いられても良い。特定の実施形態において、他の治療薬は、心血管疾患（例えばアテローム性動脈硬化症）を予防および／または治療することに用いられても良い。特定の実施形態において、他の治療薬は、再発性心血管イベントのリスクを低下することに用いられても良い。特定の実施形態において、他の治療薬は、心臓疾患、腎障害、または肥満を予防および／または治療することに用いられても良い。ここに記載されたポリペプチドは、治療において、単独でまたは他の薬剤と組み合わせて使用できる。例えば、任意のここに記載されたポリペプチドは、少なくとも一つの他の治療薬の投与の前に、同時に、または後に、投与されても良い。特定の実施形態において、他の治療薬は、例えば、抗高脂血症剤、抗高血糖剤、抗糖尿病剤、抗肥満剤および胆汁酸類似物から選ばれても良い。

【0114】

20

一部の実施形態において、上記抗高血糖剤は、例えば、ビドアニド（例えば、メトホルミン、フェンホルミン、およびブホルミン）、インスリン（例えば、通常のヒトインスリン、NPHインスリン、インスリニアスパルト、インスリンリスプロ、インスリングラルギン、インスリンデテミル、およびインスリンレベミル）、グルカゴン様ペプチド1受容体作動薬（GLP-1RA；例えばアルビグルチド（albiglutide）、デュラグルチド（dulaglutide）、エキセナチド（Exenatide）、リラグルチド（liraglutide）、リキシセナチド（lixisenatide）、および持続放出グルカゴン）、ナトリウム・グルコース共輸送体2阻害剤（SGLT2I；例えば、カナグリフロジン（Canagliflozin）、エンパグリフロジン（Empagliflozin）、ダパグリフロジン（Dapagliflozin）、エンパグリフロジン（Empagliflozin）、およびイプラグリフロジン（Ipragliflozin））、ジペプチジルペプチダーゼ4阻害剤（DPP4I；例えばプロモクリプチン（bromocriptine）、シタグリプチン（sitagliptin）、ビルダグリプチン（vildagliptin）、サクサグリプチン（saxagliptin）、リナグリプチン（linagliptin）、アナグリプチン（Anagliptin）、テネリグリプチン（Teneligliptin）、アログリプチン（alogliptin）、トレラグリプチン（trelogliptin）、ゲミグリプチン（gemigliptin）、デュトグリプチン（dutogliptin）、オマリグリプチン（omarigliptin）、ベルベリン（berberine）、およびルペオール（lupeol））、-グルコシダーゼ阻害剤（AGI；例えば、ミグリトール（Miglitol）、アカルボース（Acarbose）、およびボグリボース（Voglibose））、チアゾリジンジオン（Thiazolidinedione）（TZD；例えば、ピオグリタゾン（Pioglitazone）、ロシグリタゾン（Rosiglitazone）、ロベグリタゾン（Lobeglitazone）、トログリタゾン（Troglitazone）、シグリタゾン（Ciglitazone）、ダルグリタゾン（darglitazone）、エングリタゾン（englitazon

30

40

50

e)、ネットグリタゾン (netoglitazone)、リボグリタゾン (Rivoglitazone)、およびミフェプリストン (mifepristone))、メグリチニド (meglitinide) (例えば、レパグリニド (repaglinide)、ナテグリニド (nateglinide)、およびミチグリニド (mitiglinide))、スルホニルウレア (sulfonylurea) (SU; 例えば、カルブタミド (carbutamide)、アセトヘキサミド (Acetohexamide)、クロルプロパミド (chlorpropamide)、トルブタミド (tolbutamide)、トラザミド (tolazamide)、グリビジド (glipizide) (グルコトロール (Glucotrol))、グリクラジド (gliclazide)、グリベンクラミド (glibenclamide)、グリブリド (glyburide) (例えば、ミクロナーゼ (Micronase))、グリボルヌリド (glibornuride)、グリキドン (gliquidone)、グリソキセピド (glisoxepide)、グリクロピラミド (Glyclopipamide)、グリメピリド (glimepiride)、アマリール (Amaryl)、グリムプライム (glimiprime))、アミリン類似体 (例えば、プラムリンチド (Pramlinotide))、プロタンパク質転換酵素サブチリシン / ケキシン 9 型阻害剤 (PCSK9I; 例えば、エボロクマブ (evolocumab)、ボコシズマブ (bococizumab)、アリロクマブ (alirocumab)、1D05 - IgG2、RG - 7652、LY3015014、RNAi 治療剤 ALN-PCSO2、AMG - 145、および REGN727 / SAR236553)、グルコキナーゼ活性化剤 (GKA; 例えば、MK - 0941、RO - 28 - 1675、および AZD1656)、PPAR アゴニスト / モジュレーター、グルカゴン受容体拮抗剤、C - C ケモカイン (Chemokine) 受容体 2 型 (CCR2) 拮抗剤、インターロイキン - 1 モジュレーター (Interleukin - 1 modulator)、G タンパク質共役受容体作動薬、GLP - 1 以外の胃腸ペプチド作動薬、SGLT1 および二重 SGLT1 / SGLT2 阻害剤 (SGLT2 のみに対する阻害剤を除く)、11 - HSD1 阻害剤、ジアシルグリセリンアシルトランスフェラーゼ (DGAT) - 1 阻害剤、カンナビノイド (cannabinoid)、肝カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ 1 (CPT1) 阻害剤、線維芽細胞増殖因子 (FGF) - 21 作動薬、グルココルチコイド受容体拮抗薬、熱ショックタンパク質 (HSP) 誘導剤、4 型メラノコルチン受容体 (MC4R) 作動薬、経口糖尿病治療薬グリミンを含むテトラヒドロトリアジン、テトラヒドロトリアジン (tetrahydrotriazine) を含む経口糖尿病治療薬、グリミン (glimimin)、タンパク質チロシンホスファターゼ 1B (PTP1B) 阻害剤、サーチュイン 1 (SIRT1) 活性化剤およびミクロバイオームモジュレーター (microbiome modulator) から選ばれても良い。
【0115】

一部の実施形態において、他の治療薬は、抗高脂血症剤であって、スタチン (例えば、HMG - CoA レダクターゼ阻害剤; 例えば、シンバスタチン (simvastatin)、アトルバスタチン (atorvastatin)、ロスバスタチン (Rosuvastatin)、プラバスタチン (pravastatin)、ピタバスタチン (Pitavastatin)、ロバスタチン (lovastatin)、アトルバスタチン (atorvastatin)、フルバスタチン (fluvastatin)、セリバスタチン (cerivastatin)、メバスタチン (mevastatin)、パンテチニ (panethine)、エラスター (elastase)、およびプロブコール (probucol))、フィブリリン酸 (例えば、ベザフィブラー (bezafibrate) (例えば、ベザリップ (Bezalip)))、シプロフィブラー (ciprofibrate) (例えば、モダリム (Modalim)))、クロフィブラー (clofibrate)、ゲムフィブロジル (gemfibrozil) (例えば、ロビッド (Lopid))、フェノフィブラー (fenofibrate) (例えば、トライコア (TriCor))、クリノフィブラー (clinofibrate) (例えば、リポクリン (Lipoctin)))、リフィブレー (lifibrate)、アルフィブレー (alifibrate) から選ばれても良い。

10

20

30

40

50

(*alufibrate*)、シンフィブラーート(*simfibrate*)、エトフィリンクロフィブラーート(*etofylline clofibrate*)およびゲムフィブロジル(*gemfibrozil*)、ニコチン酸(*nicotinic acid*)（例えば、ナイアシン(*niacin*)、イノシトールヘキサニコチネート(*inositol hexanicotinate*)、ニコチンアミド(*nicotinamide*)およびアシピモックス(*acipimox*)）、胆汁酸吸着剤（例えば、コレステラミン(*cholestyramine*)（例えば、クエストラン（登録商標）（*Questран*（登録商標）））、コレセベラム(*colesevelam*)（例えば、ウェルコール（登録商標）（*Welchol*（登録商標）））、コレステチポール(*colestipol*)（例えば、コレステド（登録商標）（*Colestid*（登録商標）））、ポリデキシド(*polidexide*)、コレステラミン(*cholestyramine*)および

10
divistyramine)、エゼチミブ(*Ezetimibe*)（例えば、ゼチア(*Zetia*)）、プロタンパク質転換酵素サブチリシン/ケキシン9型阻害剤(*PC SK9I*；例えば、エボロクマブ(*evolocumab*)、ボコシズマブ(*bococizumab*)、アリロクマブ(*alirocumab*)、1D05-IgG2、RG-7652、LY3015014、RNAi治療剤ALN-PCSO2、AMG-145、およびREGN727/SAR236553）、ミクロソームトリグリセリド輸送タンパク質阻害剤(*MTTP*；例えば、ロミタビド(*lomitapide*)とJTT-130）、アポリポタンパク質B阻害剤(*apoB1*；例えば、ミポメルセン(*mipomer sen*)（例えば、*Kynamro*））、ジアシルグリセリンアシルトランスフェラーゼ1(*DGAT1*)阻害剤（例えば、プラジガstatt(*pradigastat*)）、アンジオポエチン様タンパク質3阻害剤（例えば、*REGN1500*）、コレステロールエステル転移タンパク質(*CETP*)阻害剤（例えば、アナセトラビブ(*Anacetrapib*)とエバセトラビブ(*evacetrapib*)）、ペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体(*PPAR*) / 作動薬、アシルCoA阻害剤、インクレチンミメティックス阻害剤、アンジオポエチン様タンパク質3(*ANGPTL3*)阻害剤、アンジオポエチン様タンパク質4(*ANGPTL4*)阻害剤、apoC-IIIを阻害する阻害剤および選択的ペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体モジュレーター(*SPPARM*)から選ばれても良い。

【0116】

一部の実施形態において、他の治療薬は、抗肥満剤であって、例えば、オルリストット（例えば、ゼニカル(*Xenical*)）、ロルカセリン（例えば、*Belviq*）、フェンテルミン、トピラマート、ジエチルプロピオン(*dietfylpropion*)、フェンジメトラジン(*phendimetrazine*)、ベンズフェタミン(*benzphetamine*)およびフェンジメトラジンとベンズフェタミンの組み合わせから選べられても良い。

【0117】

一部の実施形態において、他の治療薬は、胆汁酸類似物であって、例えば、オベチコール酸、ウルソデオキシコール酸およびコリルサルコシン(*cholyl sarcosine*)から選ばれても良い。

【0118】

一部の実施形態において、他の治療薬例えば、ファルネソイドX受容体(*FXR*)作動薬、*FXR*阻害剤、膜貫通Gタンパク質共役受容体5(*TGR5*)作動薬および*TGR5*阻害剤から選ばれても良い。

【0119】

一部の実施形態において、他の治療薬は、例えば、インスリン、メトホルミン、シタグリップチン、コレセベラム、グリピジド、シンバスタチン、アトルバスタチン、エゼチミブ、フェノフィブラーート、ニコチン酸、オルリストット、ロルカセリン、フェンテルミン、トピラマート、オベチコール酸およびウルソデオキシコール酸から選ばれても良い。

【0120】

10

20

20

30

40

50

ここに記載されたこのような併用療法は、併用投与（ただし、二つ以上の治療薬は、同じまたは別々の製剤に含まれる）と個別投与を含み、個別投与の場合に、ここに記載されたポリペプチドの投与は、他の治療薬の投与の前に、同時に、および／または後に行われても良い。

【0121】

ここに記載されたポリペプチド（と任意の他の治療薬）は、任意の適当な手段で投与されても良く、非経口投与、肺内投与、鼻腔内投与、および必要に応じて局所治療または病巣内投与を含む。一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドは、腸管外に投与されても良い。腸管外投与は、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内、または皮下投与を含む。一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドは、皮下に投与されても良い。一部の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドは、静脈内に投与されても良い。給薬は、任意の適当な経路（例えば、静脈内または皮下注射または注入のような注射または注入）で行われても良く、投与が短期か長期かによって部分的に決定される。例えば、様々な時点にわたる単回または複数回投与、ボーラス投与、およびパルス注入を含む様々な投与スケジュールも含む。

【0122】

ここに記載されたポリペプチドは、一般的な医療行為と一致する方法で、製剤、給薬および投与される。これに関連して考慮すべき要因は、例えば、治療されている特定の疾患、治療されている特定の哺乳動物、個々の患者の臨床状態、疾患の原因、薬剤の送達部位、投与方法、投与計画および医師に知られている他の要因を含む。ここに記載されたポリペプチドは、必ずしもその必要はないが、解決しようとする病気を予防または治療するために現在使用される一つ以上の薬剤とともに製剤化できる。このような他の薬剤の有効量は、製剤に存在するここに記載されたポリペプチドの量、病気または治療のタイプ、上記他の要因に依存する。

【0123】

疾患の予防または治療のために、ここに記載されたポリペプチドの適当な投与量（単独で、または1つ以上の他の治療薬と組み合わせて使用される場合）は、治療される疾患のタイプ、疾患の重症度と経過、該ポリペプチドが予防または治療目的のために投与されたかどうか、以前の治療、患者の病歴およびポリペプチドに対する反応、および医師の判断に依存しても良い。ここに記載されたポリペプチドは、一回にまたは一連の治療にわたって患者に適切に投与されても良い。疾患の種類と重症度によって、ここに記載されたポリペプチドは、例えば一回以上の個別の投与、または持続注入によって、患者に投与されても良い。数日またはそれ以上にわたる反復投与については、病状に応じて、上記治療は、疾患症状の所望の抑制が生じるまで続けられても良い。ここに記載されたポリペプチドは、断続的に投与されても良く、例えば毎日、2日ごと、3日ごと、毎週、または2～3週間ごと（例えば、患者が二回以上、例えば約2～約20回、または例えば約6回の使用量のポリペプチドを受ける）。投与は、最初のより高負荷使用量、その後の一回以上の低使用量で行っても良い。

【0124】

特定の実施形態において、ここに記載されたポリペプチドを対象に投与するために、固定用量投与計画を用いてもよい。しかしながら、上記要因に応じて、他の投与計画も有用であっても良い。この治療法の進行は、治療される疾患または病状に用いられる従来の技術および試験によって容易にモニターできる。

【0125】

以下の実施例は説明の目的のために使用され、本発明の範囲を縮小することと見なされるべきではない。

【実施例1】

【0126】

実施例1.1. ポリペプチドの合成

表1に示されるポリペプチドは、ポリペプチド合成のための標準的なFmocプロトコ

10

20

30

40

50

ルに従って合成された。一般に、M B H A樹脂から出発して、個々のアミノ酸残基を、カルボキシル末端からアミノ末端まで延びた。その後、N末端は、ミリストイル化によって修飾された。ペプチド合成の完了後、ポリペプチドを切断溶液によって樹脂から切断し、ポリペプチドのC末端をアミノ化によってさらに修飾した。樹脂をG 6 サンドコアロートで濾過することにより除去し、ポリペプチドを含有する濾液を真空乾燥した。ポリペプチド産物を脱イオン水に溶解し、そしてC 18カラムを装着したA K T Aエクスプローラ100型中圧液体クロマトグラフで精製した。主ピークは段階的に回収された。標的ピークから収集したサンプルを、それらの純度についてC 18カラムを装着したAgilent 1100型逆相高压液体クロマトグラフィー(HPLC)によって分析し、それらの分子量を質量分析によって確認した。中圧液体クロマトグラフで精製した回収液を凍結乾燥して保存した。乾燥サンプルをP B Sに溶解し、次いで0.20 μMの膜を通して濾過した。P B Sに溶解したポリペプチドストックを使用前に-80°で保存した。図1Aは、HPLCにより測定された合成ポリペプチドC myr - 47の純度を表す例示的なグラフを示す。図1Bは、質量分析によって測定されたC myr - 47の精確分子量(5398.8 Da)を確認する例示的なグラフを示す。

【0127】

実施例1.2.C myr - 47とNTCPの結合試験

H B Vから由来するポリペプチドがNTCPと結合できることを証明するために、様々なNTCPを発現する細胞系は、C myr - 47で処理された。C myr - 47を視覚化するために、上記ポリペプチドは、F I T Cで標識された。NTCPが、肝臓で高度に発現するから、ツパイから由来する初代肝細胞とヒト肝細胞細胞系H e p G 2細胞は、研究に用意された。図2Aと図2Bに示されたように、F I T Cで標識されたC myr - 47が、二つ異なる種の肝細胞に結合した(図2Aは、C myr - 47とツパイ初代肝細胞の結合を示した;図2Bは、C myr - 47とH e p G 2細胞の結合を示した)。C myr - 47が、NTCPと特異的に結合することを証明するために、NTCPを発現するL 0 2細胞(NTCP - L 0 2)は、NTCPを発現するベクターをトランスフェクトすることで、確立された。NTCPを発現しないベクター(B L A N K - L 0 2)でトランスフェクトされたL 0 2細胞は、陰性対照として使用された。図3に示されたように、F I T Cで標識されたC myr - 47が、NTCP - L 0 2細胞と結合したが、B L A N K - L 0 2細胞と結合しなかった。C myr - 47の特異性を確認するために、肝臓由来ではない細胞系とするH E K 2 9 3細胞は、研究に用意された。NTCPを発現するH E K 2 9 3細胞(NTCP - 2 9 3)は、細胞をNTCPを発現するベクターでトランスフェクトすることで確立された。NTCPを発現しない対照ベクター(B L A N K - 2 9 3)でトランスフェクトされたH E K 2 9 3細胞は、陰性対照として使用された。図4に示されたように、F I T Cで標識されたC myr - 47が、NTCP - 2 9 3細胞と結合したが、B L A N K - 2 9 3細胞を結合しなかった。逆に、鳥のH B Vは哺乳動物に感染しないという以前の発見(G r i p o n l a , J . V i r o l . 7 9 (3) : 1 6 1 3 - 2 2 (2 0 0 5))に基づいて予想されるように、サギH B Vのp r e - S 1領域から由来する47個アミノ酸残基の対照ポリペプチド(ミリストイル化-G L N Q S T F N P L G F F P S H Q L D P L F K A N A G S A D W D K N P N K D P W P Q A H D T A - アミド化、S E Q I D N O : 4 9)が、NTCP - 2 9 3細胞と結合しなかった。これらの結果は、C myr - 47がNTCPと特異的に結合することを証明した。

【0128】

実施例1.3.C myr - 47のインビトロ胆汁酸試験

胆汁酸輸送におけるH B Vから由来するポリペプチドの効果をさらに研究するために、NTCP - 2 9 3細胞は、³H(³H-T A; タウロコール酸)で標識された胆汁酸にインキュベートされた。³H-T Aの使用によって、細胞に吸収された胆汁酸の量は、細胞の放射能レベルを測定することで定量できる。H E K 2 9 3細胞は、NTCPを発現しない場合に、胆汁酸を吸収できないから、NTCP - 2 9 3細胞に摂取された任意の胆汁酸は、NTCPに起因するものだと思われる。1 0 μm o l / LのT A(0.5 μc i / m l

10

20

30

40

50

の 3 H - T A として放射性標識されている)と、増加する量の C my r - 4 7 は、同時に培養細胞に 10 分間添加された。胆汁酸輸送を阻害することが知られているシクロスボリン A (CsA) は、50 μM の濃度で陽性対照として使用された。図 5 A に示されたように、BLANK - 293 細胞と比較し、NTCP - 293 細胞が、多くの量の胆汁酸を吸収できる。NTCP - 293 細胞は、C my r - 4 7 で処理された場合に、胆汁酸摂取は、異なる濃度の C my r - 4 7 に両方向制御された。図 5 B に示されたように、C my r - 4 7 が、500 ng / ml 以下の濃度で、肝細胞への胆汁酸の NTCP 輸送を増強したが、C my r - 4 7 が、500 ng / ml を超える濃度で、TA 吸収を有意に減少させた。特に、62.5 ng / ml の C my r - 4 7 は、TA 吸収を 50 % 以上増加させたが、陽性対照 CsA と比較して、2 μg / ml の C my r - 4 7 は胆汁酸の摂取を効果的に阻害した。図 5 B に示された漸増用量試験に基づき、C my r - 4 7 は、胆汁酸輸送の遮断に、0.15 μM の IC₅₀ 値を有すると解明された。

【0129】

C my r - 4 7 による NTCP 仲介の胆汁酸輸送の双方向制御と逆に、TA 吸収の一方 阻害は、CsA によって誘導された(図 5 C および図 5 D)。CsA は、10 ng / ml の低濃度と 100 μg / ml の高濃度に、NTCP 仲介の TA の輸送を促進しなかった。図 5 D に示された漸増用量試験に基づいて、胆汁酸輸送を阻害するための CsA の計算された IC₅₀ 値は、3.05 μM である。

【0130】

実施例 1.4. 他の HBV 由来のポリペプチドのインビトロ胆汁酸試験

HBV 由来のポリペプチドの、NTCP 仲介の胆汁酸摂取に対する両方向効果をさらに分析するために、二つの異なる濃度(代表的な低濃度として 62.5 ng / ml、代表的な高濃度として 1 μg / ml) の C my r - 4 7 と他の HBV 由来のポリペプチドは、インビトロ胆汁酸試験において、上記プロトコルによってテストされた。二つの対照処理とする CsA とキニジンも、比較のためにテストされた。キニジンはクラス I 抗不整脈薬であり、以前に、NTCP 仲介の TA 摂取を増強することが示されていた(Kimら、J. Pharmacol. Exp. Ther. 291(3): 1204-09(1999) を参照)。CsA およびキニジンは Sigma - Aldrich から購入した(それぞれ Sigma - 30024 および Sigma - Q3625)。

【0131】

図 5 E に示されたように、100 ng / ml の CsA は、TA 吸収に有意な影響を及ぼさなかったが、キニジンは、0.1 μmol / L で、TA 吸収を増強した。表 1 に挙げられた HBV 由来ポリペプチド(C my r - 60, C my r - 55, C my r - 47, C my r - 40, C my r - 35, C my r - 30, C my r - 25, C my r - 20, C my r - 47 + (-10), C my r - 47 + (-9), C plam - 47, C stea - 47, C chol - 47, Amyr - 47, Bmyr - 47, Dmyr - 47, Emvr - 47, Fmyr - 47, Gmyr - 47 または Hmyr - 47) は、62.5 ng / ml (11.58 nmol / L) の C my r - 4 7 に相当する低いモル濃度で TA 吸収を増強し、HBV 由来ポリペプチドは、低濃度で NTCP 仲介の胆汁酸摂取を増強できることを確認した。

【0132】

これに対して、HBV 由来ポリペプチド(C my r - 60, C my r - 55, C my r - 47, C my r - 40, C my r - 35, C my r - 30, C my r - 25, C my r - 20, C my r - 47 + (-10), C my r - 47 + (-9), C plam - 47, C stea - 47, C chol - 47, Amyr - 47, Bmyr - 47, Dmyr - 47, Emvr - 47, Fmyr - 47, Gmyr - 47 または Hmyr - 47) は、1 μg / ml (185.23 nmol / L) の C my r - 4 7 に相当する高いモル濃度でテストされた場合に、全てのポリペプチドが TA 吸収を効果的に阻害し(図 5 F)、HBV 由来ポリペプチドが NTCP 仲介の胆汁酸摂取を特定の高濃度で阻害できることを確認した。比較として、50 μg / ml の CsA は、TA 吸収を阻害したが、20 μM のキ

10

20

30

40

50

ニジンは、T A 吸収を増強した。これらの結果は、H B V 由来ポリペプチドが、用量依存的にN T C P 仲介の胆汁酸摂取を双方向制御できることを証明した。

【実施例 2】

【0133】

実施例 2 . 1 . C m y r - 4 7 で処理されたラットの毒性と胆汁酸、総コレステロール、トリグリセリドおよび血糖分析

C m y r - 4 7 の毒性を確定し、かつC m y r - 4 7 がインビボで胆汁酸の摂取を調節できることを確認するために、同数の雄および雌を有する 190 匹の S p r a g u e D a w l e y ラットは、6 ヶ月間の慢性毒性テストを行った。各ラットに、対照とする P B S 、或いは 1 、 3 または 9 mg / kg の C m y r - 4 7 を 180 日間毎日皮下注射した。実験スキームは、表 2 に示された。

【0134】

【表 2】

表 2. ラットにおける 180 日間の長期慢性毒性テストの実験デザインスキーム

グループ	投与量／注射 (mg · kg ⁻¹)	濃度 (mg · ml ⁻¹)	臨床等価投与量 (X)	ラット数 (n)	
				♀	♂
I.	対照	0	0	0	20 20
II.	低使用量	1	0.4	2.3	20+5 20+5
III.	中使用量	3	1.2	7.0	20+5 20+5
IV.	高使用量	9	3.6	20.9	20+5 20+5

【0135】

実験終了時に、尾部出血によって血液試料を各ラットから採取した。血液サンプルからの血清を、3,000 rpm で 10 分間の遠心分離によってさらに分離した。次いで、血清サンプルを総胆汁酸試験キット（南京建城生物工学研究所）で分析して、総胆汁酸（T B A ）のレベルを確定した。表 3 と表 4 に示されたように、対照グループと比較して、C m y r - 4 7 で処理された雌および雄のラットの両方が、血清中の総胆汁酸レベルの増加を示し、これは、C m y r - 4 7 がインビボで胆汁酸摂取を効果的に阻害できることを示す。総胆汁酸の増加は使用量依存的である。

【0136】

【表 3】

表 3. ラットにおける 180 日の長期慢性毒性テストの血清 T B A 濃度 (雄、μM

/ L)

グループ	N	平均	標準偏差	標準誤差	平均の 95 % 信頼区間			
					下限	上限	最小	最大
対照	10	7.920	3.5401	1.5832	3.524	12.316	5.2	14.0
低使用量	10	15.480	6.5975	2.9505	7.288	23.672	9.5	23.6
中使用量	10	17.240	8.3575	3.7376	6.863	27.617	11.1	30.9
高使用量	10	20.640	11.5881	5.1823	6.252	35.028	13.5	41.2

【0137】

10

20

30

40

50

【表4】

表4. ラットにおける180日の長期慢性毒性テストの血清TBA濃度（雌、 $\mu M/L$ ）

グループ	N	平均	標準偏差	標準誤差	平均の95%信頼区間			
					下限	上限	最小	最大
対照	10	13.180	3.4354	1.5364	8.914	17.446	7.8	16.8
低使用量	10	16.460	5.1189	2.2892	10.104	22.816	11.1	22.5
中使用量	10	21.860	7.5477	3.3754	12.488	31.232	12.9	32.7
高使用量	10	26.800	15.4932	6.9288	7.563	46.037	13.8	51.0

【0138】

実施例2.2.Cmyr-47で処理されたラットの総コレステロール、トリグリセリドおよび血糖

実施例2.1にテストされた各動物の総コレステロール(TC)、トリグリセリド(TG)および血糖(GLU)のレベルは、表5と6にまとめられた。表5と6に示されたように、対照グループと比較して、Cmyr-47の低使用量、中使用量、または高用量は、血清TC、TGまたはGLUに有意な影響を及ぼさなかった(全てのPの値>0.05)。したがって、生理的条件において、Cmyr-47は、正常レベルの血清TC、TGまたはGLUに影響しない。

【0139】

【表5】

表5. ラットにおける180日の長期慢性毒性テストの血清TC、TG、GLU濃度(雄、 $mmol/L$ 、 $\bar{x} \pm SEM$)

グループ	n	TC	TG	GLU
対照	10	1.62±0.37	0.56±0.20	7.15±1.74
低使用量	10	1.58±0.21	0.61±0.26	6.89±1.24
中使用量	10	1.51±0.18	0.49±0.18	6.76±1.05
高使用量	10	1.58±0.33	0.56±0.26	6.69±0.53

注：正常対照グループと比較して、 $^*P<0.05$ 、 $^{**}P<0.01$ ；モデル対照グループと比較して、 $*P<0.05$ 、 $**P<0.01$

【0140】

10

20

30

40

50

【表 6】

表6. ラットにおける180日の長期慢性毒性テストの血清TC、TG、GLU

グループ	n	濃度 (雌、mmol/L、 $\bar{x} \pm SEM$)		
		TC	TG	GLU
対照	10	2.28 ± 0.54	0.78 ± 0.25	6.41 ± 0.38
低使用量	10	1.97 ± 0.36	0.68 ± 0.33	6.34 ± 0.55
中使用量	10	1.98 ± 0.49	0.75 ± 0.29	6.17 ± 0.69
高使用量	10	1.80 ± 0.50	0.56 ± 0.21	6.11 ± 0.42

注：正常対照グループと比較して、 $^{\#}P < 0.05$ 、 $^{##}P < 0.01$ ；モデル対照グループと比較して、 $*P < 0.05$ 、 $**P < 0.01$

【0141】

実施例2.3.Cmyr-47で処理されたイヌの毒性と胆汁酸、総コレステロール、トリグリセリドおよび血糖分析

Cmyr-47の毒性を確定し、かつCmyr-47がインビボで胆汁酸の摂取を調節できるかをさらに確認するために、同数の雄および雌を有する56匹のビーグルイヌは、9ヶ月間の慢性毒性テストを行った。各イヌに、対照とするPBS、或いは毎回の注射に0.25、0.75または2mg/kgのCmyr-47を270日間毎日皮下注射した。実験スキームは、表7に示された。

【0142】

【表7】

表7. イヌにおける270日間の毒性テストの実験デザインスキーム

グループ	投与量/注射 (mg·kg ⁻¹)	臨床等価投与量 (X)	イヌ数 (n)	
			♀	♂
I. 対照	0	0	7	7
II. 低使用量	0.25	2	7	7
III. 中使用量	0.75	6	7	7
IV. 高使用量	2	16	7	7

【0143】

実験終了時に、静脈穿刺によって各イヌから血液サンプルを採取し、そして採取した血液サンプルからの血清を上記のように分離した。次いで血清試料を分析して、上記のように総胆汁酸レベルの濃度を確定した。表8に示されたように、対照グループと比較して、Cmyr-47は、用量依存的にイヌの総胆汁酸の血清レベルを増加させた。各動物の総コレステロール(TC)、トリグリセリド(TG)および血糖(GLU)のレベルは、表9にまとめられた。表9に示されたように、対照グループと比較して、Cmyr-47の低使用量、中使用量、または高用量は、血清TC、TGまたはGLUに有意な影響を及ぼさなかった(全てのPの値 > 0.05)。したがって、生理的条件において、Cmyr-47は、正常レベルの血清TC、TGまたはGLUに影響しない。

【0144】

10

20

30

40

50

【表8】

表8. イヌにおける270日の長期慢性毒性テストの91日目段階的検出の血清T
BA濃度 ($\mu M/L$)

性別	動物番号	グループ			
		対照	低使用量	中使用量	高使用量
雌	1	2. 6	3. 2	2. 4	2. 1
	2	1. 2	3. 7	1. 0	1. 1
	3	1. 0	7. 8	1. 0	20. 4
	4	0. 9	2. 2	1. 8	13. 2
	5	1. 0	2. 3	4. 1	4. 2
	6	2. 1	22. 3	2. 3	1. 4
	7	1. 6	3. 0	2. 9	7. 3
雄	8	1. 4	1. 8	1. 9	1. 2
	9	1. 7	1. 7	2. 1	1. 7
	10	1. 4	3. 2	3. 7	3. 0
	11	0. 8	2. 9	1. 2	1. 3
	12	1. 3	1. 6	2. 4	3. 0
	13	0. 8	1. 1	15. 3	5. 9
	14	1. 9	1. 2	2. 1	2. 4
$\bar{x} \pm s$		1. 41±0. 53	4. 14±5. 48	3. 16±3. 61	4. 87±5. 56
P値		—	0. 086	0. 084	0. 037

10

20

30

【0145】

【表9】

表9. イヌにおける270日の長期慢性毒性テストの91日目段階的検出の血清T
C、TG、GLU 濃度 (mmol/L、 $\bar{x} \pm SEM$)

グループ	n	TC	TG	GLU
対照	14	2. 93±0. 66	0. 39±0. 08	4. 50±0. 68
低使用量	14	3. 07±0. 44	0. 49±0. 13	4. 26±0. 51
中使用量	14	3. 20±0. 61	0. 45±0. 10	4. 52±0. 41
高使用量	14	3. 16±0. 36	0. 46±0. 12	4. 69±0. 41

40

注：正常対照グループと比較して、 $^{\#} P < 0. 05$ 、 $^{##} P < 0. 01$ ；モデル対照グループと比較して、 $* P < 0. 05$ 、 $** P < 0. 01$

【0146】

実施例2.4.Cmyr-47で処理されたイヌの薬物動態分析

雌雄同数の56匹のビーグルイヌは、1ヶ月間の慢性毒性テストを行われた。各イヌに、対照とするPBS、或いは毎回の注射に0.4、1.2または3.6mg/kgのCmyr-47を30日間毎日皮下注射した。実験スキームは、表10に示された。

50

【0147】

【表10】

表 10. イヌにおける薬物動態分析の実験デザインスキーム

グループ	投与量／注射 (mg · kg ⁻¹)	イヌ数 (n)	
		♀	♂
I. 対照	0	3	3
II. 低使用量	0.4	3	3
III. 中使用量	1.2	3	3
IV. 高使用量	3.6	3	3

10

【0148】

実験中、各イヌからの血液サンプルは、最初の投与後および最後の投与後に、0、10、20、40、60、90、120、180、240、360、1440分に静脈穿刺によって採取された。採取した血液サンプルからの血清を上記のように分離した。次いで、血清サンプルを分析して、抗P r e S 1抗体125E11を用いて、放射免疫測定(R I A)によりC my r - 47の濃度を確定した(Weilら, Clinica. Chimica. Acta. 317: 159 - 69 (2002))。表11~13は、それぞれに、0.4、1.2、または3.6mg / kgで投与された各動物の血清濃度を示す。表13に示されたように、3.6mg / kgのC my r - 47を投与されたイヌは、使用量によく耐え、重大な毒性は観察されなかった。血流中のC my r - 47のピーク濃度(すなわちC_{max})は投与後20分(すなわちT_{max})に達した。C_{max}は、投薬後に、薬物が達成するピーク血清濃度を指す。T_{max}は、C_{max}が観察される時間を指す。例えば表13に示されたように、最高用量のC my r - 47は、20分で500ng / mlを超えるC_{max}に達成でき、この試験条件において、C my r - 47のT_{max}が、約20分であることを示した。表11~13に示されたように、最高用量(3.6mg / kg)のみが、500ng / mlを超えるピーク濃度に達成できた。

20

【0149】

30

40

50

【表 1 1】

表 1 1. 0. 4 mg. kg⁻¹皮下注射によるビーグルイスの血清 Cmyr-47

濃度

投与後の時間	Cmyr-47 の血清濃度 (ng. mL ⁻¹)						平均±SD	CV%	
	分間	L7	L8	L9	L10	L11	L12		
最初 投与	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	—	—
	10	86.9	91.3	82.7	103.1	126.5	123.2	102.3±18.8	18.4
	20	165.2	142.7	116.7	162.1	155.8	137.2	146.6±18.3	12.5
	40	108.9	100.0	78.6	112.2	97.4	108.4	100.9±12.3	12.2
	60	50.5	60.2	48.1	62.0	47.5	69.5	56.3±8.9	15.9
	90	34.6	31.1	37.4	32.3	36.4	30.3	33.7±2.9	8.7
	120	23.3	21.6	24.4	21.6	24.2	19.7	22.5±1.8	8.1
	180	11.6	12.9	13.3	11.1	10.9	13.9	12.3±1.2	10.1
	240	2.4	1.5	2.3	2.0	2.6	1.9	2.1±0.4	17.7
最後 投与	360	0.62	0.59	0.33	0.43	0.31	0.72	0.50±0.17	33.7
	1440	ND	ND	ND	ND	ND	ND	—	—
	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	—	—
	10	98.8	76.5	81.0	75.3	124.3	78.9	89.1±19.2	21.6
	20	139.0	127.3	134.0	180.1	146.5	117.7	140.8±21.7	15.4
	40	95.6	112.2	90.4	100.8	137.2	96.3	105.4±17.2	16.3
	60	59.0	47.5	56.9	50.7	56.8	58.9	55.0±4.8	8.6
	90	45.0	24.8	22.7	25.8	38.5	29.9	31.1±8.8	28.4
	120	20.9	21.6	26.0	19.4	25.8	17.4	21.8±3.5	15.8
30	180	14.3	9.9	13.2	8.7	8.2	10.9	10.8±2.5	22.7
	240	2.3	2.0	2.9	2.9	2.7	2.0	2.5±0.4	16.8
	360	0.59	0.53	0.34	0.39	0.35	0.61	0.47±0.12	26.3
	1440	ND	ND	ND	ND	ND	ND	—	—

注 : ND = 検出不能

【0150】

【表12】

表12. 1. 2 mg. kg⁻¹皮下注射によるビーグルイスの血清Cmyr-47

濃度

投与後の時間	Cmyr-47の血清濃度 (ng. mL ⁻¹)							平均±SD	CV%
	分間	M13	M14	M15	M16	M17	M18		
最初投与	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	—	—
	10	289.9	340.3	249.3	374.1	272.9	327.2	308.9±46.4	15.0
	20	433.6	450.2	365.0	540.9	457.4	422.1	444.9±57.3	12.9
	40	333.9	323.0	259.9	314.9	287.1	292.8	302.0±27.2	9.0
	60	140.9	166.6	180.7	127.3	123.3	198.5	156.2±3	19.5
	90	90.6	108.9	113.2	82.4	78.9	122.6	99.4±17.9	18.0
	120	57.2	67.4	54.3	70.9	50.2	61.0	60.2±7.9	13.1
	180	41.8	35.2	31.6	38.6	33.9	49.0	38.3±6.4	16.6
	240	5.6	2.2	7.0	7.9	4.5	6.6	5.6±2.1	36.7
	360	2.0	1.6	1.8	2.2	1.6	1.9	1.8±0.2	13.5
最後投与	1440	ND	ND	ND	ND	ND	ND	—	—
	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	—	—
	10	300.6	301.8	235.7	335.3	305.4	344.9	304.0±38.3	12.6
	20	374.1	418.2	327.2	492.8	407.6	392.8	402.1±54.8	13.6
	40	300.9	279.6	235.7	283.7	266.3	259.9	271.0±22.4	8.3
	60	128.1	149.5	162.1	112.5	109.0	170.9	138.7±26.0	18.8
	90	79.1	90.9	90.5	71.6	68.6	108.3	84.8±14.8	17.4
	120	51.0	59.9	48.3	63.4	45.0	54.3	53.6±7.0	13.1
	180	37.4	30.5	27.2	34.8	29.0	41.8	33.4±5.6	16.7
	240	3.3	4.7	5.7	6.9	5.1	4.5	5.0±1.2	23.7
30	360	1.7	1.4	1.6	2.0	1.4	1.7	1.6±0.2	13.4
	1440	ND	ND	ND	ND	ND	ND	—	—

注: ND = 検出不能

【0151】

【表13】

表13. 3. 6 mg. kg⁻¹皮下注射によるビーグルイスの血清Cmyr-47

濃度

投与後の時間	Cmyr-47の血清濃度 (ng·mL ⁻¹)						平均±SD	CV%	
	分間	H19	H20	H21	H22	H23	H24		
最初投与	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	—	—
	10	617.8	510.6	739.4	542.7	569.9	697.1	612.9±89.8	14.7
	20	958.4	739.4	698.7	1117.3	1206.0	849.6	928.2±204.1	22.0
	40	810.7	620.0	739.4	646.3	840.6	543.6	700.1±116.0	16.6
	60	305.4	344.9	340.4	382.7	425.0	286.4	347.5±50.6	14.6
	90	218.9	237.5	262.8	201.9	190.3	187.4	216.5±29.5	13.6
	120	132.9	109.0	156.0	117.0	148.5	90.7	125.7±24.8	19.7
	180	68.5	44.5	83.2	56.9	75.4	66.0	65.8±13.7	20.8
	240	12.8	16.2	11.2	15.0	10.1	13.2	13.1±2.3	17.4
	360	3.1	3.3	2.6	3.5	3.0	3.1	3.1±0.3	9.6
最後投与	1440	ND	ND	ND	ND	ND	ND	—	—
	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	—	—
	10	543.6	433.2	635.1	490.3	501.2	588.1	531.9±72.6	13.6
	20	874.7	673.9	620.0	921.7	1129.9	746.1	827.7±187.5	22.7
	40	730.7	545.5	674.4	562.1	746.4	493.1	625.4±105.9	16.9
	60	272.3	293.4	272.8	343.2	394.0	252.8	304.7±53.6	17.6
	90	195.9	209.4	236.5	173.7	197.5	166.2	196.5±25.3	12.9
	120	112.5	92.2	132.9	104.5	127.9	97.2	111.2±16.4	14.8
	180	53.6	25.9	72.2	56.0	70.3	53.6	55.3±16.7	30.1
	240	10.9	13.8	10.0	13.2	8.6	11.7	11.4±1.9	17.0
360	360	2.4	3.6	2.4	3.2	3.2	2.8	2.9±0.5	16.3
	1440	ND	ND	ND	ND	ND	ND	—	—

注: ND = 検出不能

【実施例3】

【0152】

実施例3.1. Cmyr-47で高脂質血症ゴールデンハムスター モデルの処理における方法と材料

脂質代謝におけるCmyr-47のインビオ効果を分析するために、2週間高脂肪食で(10日間の順応性飼育後)ハムスターを飼うことで、高脂質血症ゴールデンハムスター モデルを確立した。雄ゴールデンハムスター(N=70、90-110g)は、北京バイタルリバー会社(Beijing Vital River)(SCXK(Jing)2012-0001)から購入され、動物品質証明書番号11400700093338。動物は、浙江漢方医学大学動物実験研究センター(Zhejiang Traditional Chinese Medicine University Animal Experimental Research Center)(SYXK(Zhe)2013-0184)に、騒音が制御された部屋(<50dB)内で、12時間の明暗サイクル

10

20

30

40

50

(150~200L×)で、湿度50~70%、23±1で飼育された。高脂肪食の組成は、1.25%コレステロールと20.06%脂肪(大豆油2.79%、力カオバター17.27%)を含み、食事はResearch Diets Inc. (New Brunswick, NJ)から購入され、4で保存された。正常な非高脂血症対照(「正常対照グループ」として、ゴールデンハムスターのグループに通常の固形飼料を給餌した。 Co^{60} の照射による滅菌された完全栄養ラットペレットは、通常の固形飼料として使用された。動物は、濾過および滅菌した水道水を自由に摂取する。全ての食物は、自由に摂取できて、動物は、ケージ当たり4~5匹を収容した。高脂肪食を給餌した各ハムスターの体重および摂餌量を毎週モニターした。すべての動物は、人道的に処理され、3Rの原則(代替、削減、および最適化)に従って痛みと苦痛を最小限に抑える。

10

【0153】

高脂肪食処理の2週間後、動物が10 mmol/Lより高い血清総コレステロール(TC)レベルを有する場合に、ハムスターの高脂血症表現型が確認された。合計40匹の高脂血症ハムスターは、ランダムに5つのグループに分類された(N=8/グループ)：モデル対照グループ(10 mL/kg PBS、皮下投与(sc))、陽性処理対照グループ(フェノフィブラーート、50 mg/kg/日、経口胃内投与(po))、低使用量処理グループ(Cmyr-47、10 mg/kg/日、sc)、高使用量処理グループ(30 mg/kg/日Cmyr-47、sc)、CsA処理グループ(CsA、5 mg/kg/日、po)。通常の固形飼料を給餌した10匹のハムスターは、正常対照グループとして使用された(10 mL/kg PBS、sc)。

20

【0154】

上記プロトコールに従って、Cmyr-47は、HEP製薬(HEP Pharmaceutical)(中国、上海；ロット番号：14011801)により白色粉末として合成された。各処理について、Cmyr-47をPBS中で新たに調製し、調製直後に使用した。20×PB溶液($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (64.4652 g)と $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (3.1202 g)、水を500 mLまで加えた)を製剤することによって、PBSを調製した。その後、1倍量の20×PB、4倍量の純水、15倍量の0.9%生理食塩水を混合して、テスト薬溶解用PBSを得た。本研究に陽性対照として使用されたフェノフィブラーート(FENO)のFenolip錠は、Laboratoires FOURNIER S.A.から購入された。CsA(Sandimmune(登録商標))はNovartisから購入された。

30

【0155】

PBS、Cmyr-47、FENO、およびCsAは、それぞれに4週間連続して投与された。実験において、モデル対照グループ、低使用量グループおよび高使用量グループ、ならびに陽性対照グループのすべての動物は、高脂肪食を与えられたが、一方、正常対照グループは、通常の固形食を与えられた。Cmyr-47またはPBSをハムスターに1日2回に皮下注射した(午前9:00~10:00、午後16:00~17:00)。陽性処理対照グループには、経口胃内投与により、FENOを投与した。CsA処理グループには、経口胃内投与により、CsAを投与した。毎朝、食料と水の消費量、糞、動物のグルーミングをモニターしました。全ての動物の体重を週ごとに測定した。

40

【0156】

2週間の処理後、全ての動物の血清TCとトリグリセリド(TG)レベルを測定した。4週間の処理後、全ての動物の血清TCとTG、LDL-CおよびHDL-Cレベルを測定した。測定する前に、全ての動物は採血前に12時間絶食させた(水を除外)。各動物からの血液(0.3 mL)サンプルを眼窩後叢から採取し、サンプルからの血清を3,000 rpmで10分間の遠心分離によってさらに単離した。脂質を測定するためのキットはShenneng DESAY診断技術有限公司(Shenneng DESAY Diagnostic Technology Co. Ltd.) (上海、中国)から購入され、すべての測定は製造元のプロトコルに従って行った。測定には7020自動生化学分析装置を使用した。各動物のアテローム性動脈硬化指数(AI)は、AI = (TC - HD

50

L - C) / HDL - C の式に従って計算した。AIは、アテローム性動脈硬化症を発展するリスクが増加することの最も信頼できる指標の一つと考えられる。

【0157】

Sanyo Company (日本) のMLS-3750高圧滅菌チャンバーと、ザルトリウス科学機器株式会社 (Sartorius Scientific Instruments Co., Ltd.) (中国北京) のSQP電子スケールを使用した。Yongjieda精製技術株式会社 (Yongjieda Purification Technology Co., Ltd.) (中国、浙江、杭州) のRO-MB-50超純水システムを使用した。KQ-300DE超音波を、昆山超音波計器有限公司 (Kunshan Ultrasonic Instrument Co., Ltd.) (昆山、江蘇省、中国) から購入し、日立7020自動生化学分析装置を、日立製作所 (日本) から購入した。多機能ELISA装置は、サーモフィッシャーサイエンティフィック社 (Thermo Fisher Scientific Inc.) (米国) から得られた。

10

【0158】

SPSS 19.0 ソフトウェアを用いてデータを分析し、平均±標準偏差または平均±SEMとして表した。テスト結果からのデータを評価するために、ANOVA分散分析を用いられた。 LSD テストは、一対比較に用いられた。統計分析の値は小数点第2位を四捨五入した。

【0159】

実施例 3.2. 血清総コレステロール (TC) に対する Cmyr-47 と HBV から由来する他のポリペプチドの効果

20

表 14 および図 6 に示されたように、実験期間において、正常対照の血清 TC レベルより、モデル対照の血清 TC レベルは有意に高く、高脂肪食を与えた動物が、高脂血症であることを確認した (全ての P < 0.01)。モデル対照グループと比較して、FENO の投与は、血清 TC レベルを有意に低下させた (P 値は全て 0.01 未満)。Cmyr-47 で処理された高脂血症動物も、モデル対照グループより低い血清 TC レベルを示し、Cmyr-47 の効果は、用量依存的であった。これに対して、モデル対照グループと比較して、CsA で処理された高脂血症動物は、有意に高い血清 TC レベルを示した。

【0160】

【表 14】

30

表 14. 血清 TC に対する Cmyr-47 の効果 (mmol/L, $\bar{x} \pm S$)

グループ	投与量/注射	n	投与前	数週間の投与後の TC レベル	
				2 週間	4 週間
正常対照	10mL/kg PBS	10	4.25±0.41	4.09±0.34	4.39±0.43
モデル対照	10mL/kg PBS	8	11.12±0.47 [#]	19.67±4.05 ^{##}	19.58±4.72 ^{##}
陽性対照	50mg/kg FENO	8	11.34±0.50	6.63±4.40 ^{**}	7.42±1.70 ^{**}
低使用量	10mg/kg Cmyr-47	8	11.10±0.44	15.53±4.51*	16.00±5.17*
高使用量	30mg/kg Cmyr-47	8	11.10±0.46	12.67±2.98 ^{**}	11.54±1.67 ^{**}
CsA 处理	5mg/kg CsA	8	11.24±0.40	22.53±2.50	24.46±3.35*

注：正常対照グループと比較して、^{*} P < 0.05、^{**} P < 0.01；モデル対照グループと比較して、* P < 0.05、** P < 0.01

40

50

【0161】

インビボで血清TCに及ぼす効果を確認するために、表1に挙げられたHBVから由来する他のポリペプチドもテストされた。実験は、上記と同じ実験プロトコルに従って実施した。全てのポリペプチドを、30mg/kg/日のCmyr-47に相当するモル使用量で投与した。

【0162】

図7Aおよび図7Bで、(正常対照とモデル対照の血清TCレベルを比較して)高脂肪食を与えた動物が高脂血症を有することを確認した。上記に示されたように、FENOは、動物の血清TCレベルを減少させることができる。4週目に、HBV由来の他のペプチド(Cmyr-60、Cmyr-55、Cmyr-40、Cmyr-35、Cmyr-30、Cmyr-25、Cmyr-20、Cmyr-47+(-10)、Cmyr-47+(-9)、Cplam-47、Cstea-47、Cchol-47、Amyr-47、Bmyr-47、Dmyr-47、Emyr-47、Fmyr-47、Gmyr-47またはHmyr-47)で処理された動物も、モデル対照よりも低い血清TCレベルを示した。

10

【0163】

実施例3.3. 血清トリグリセリド(TG)に対するCmyr-47とHBVから由来する他のポリペプチドの効果

表15および図8に示されたように、実験において、モデル対照における血清TGレベルは正常対照よりも有意に高かった(全てのP<0.01)。2週目および4週目の測定により、FENOが動物の血清TGレベルを有意に減少させることができた(P値はすべて0.01未満)。モデル対照と比較して、高使用量のCmyr-47も、動物における血清TGレベルを有意に低下させた。血清TCに対する効果と同様に、血清TGに対するCmyr-47の効果も、用量依存的であった。注目すべきこととして、モデル対照と比較して、CsA処理は、動物の血清TGレベルを増加させた。

20

【0164】

【表15】

表15. 血清TGに対するCmyr-47の効果 (MMOL/L, $\bar{x} \pm S$)

グループ	投与量/注射	n	投与前	数週間の投与後のTGレベル		30
				2週間	4週間	
正常対照	10 mL/kg PBS	10	2.85±1.24	2.23±0.76	2.29±0.84	
モデル対照	10 mL/kg PBS	8	5.65±1.78##	7.81±3.24##	7.54±3.10##	
陽性対照	50mg/kg FENO	8	6.16±1.30	3.14±0.4**	2.68±0.30**	
低使用量	10mg/kg Cmyr-47	8	6.15±1.14	6.29±2.48	4.39±1.21	
高使用量	30mg/kg Cmyr-47	8	6.35±2.00	5.31±1.76*	3.81±0.95*	
CsA処理	5mg/kg CsA	8	6.23±0.90	8.81±0.50	10.23±0.61**	

40

注: 正常対照と比較して、# P<0.05、## P<0.01; モデル対照と比較して、* P<0.05、** P<0.01

【0165】

HBV由来の他のポリペプチド(Cmyr-60、Cmyr-55、Cmyr-40、Cmyr-35、Cmyr-30、Cmyr-25、Cmyr-20、Cmyr-47+(-10)、Cmyr-47+(-9)、Cplam-47、Cstea-47、Cch

50

o 1 - 4 7、Amyr - 4 7、Bmyr - 4 7、Dmyr - 4 7、Emyr - 4 7、Fmyr - 4 7、Gmyr - 4 7 または Hmyr - 4 7) で処理された動物の血清 TG レベルも、上記プロトコルに従って測定された。図 9 A および図 9 B に示されたように、これらの HBV 由来のポリペプチドで処理された動物の血清 TG レベルは、モデル対照のそれよりも低く、テストされた HBV 由来のポリペプチドは、インビボで、すべて血清 TG を低下させることができることを示す。

【0166】

実施例 3.4. 血清 LDL-C に対する Cmyr - 4 7 と HBV から由来する他のポリペプチドの効果

表 16 および図 10 は、PBS、FENO、または Cmyr - 4 7 で処理された動物からの血清 LDL-C レベルの測定値をまとめたものである。予想通り、正常対照と比較して、モデル対照における血清 LDL-C レベルは有意に増加し、高脂血症表現型を確認した ($P < 0.01$)。FENO で処理された陽性対照は、モデル対照よりも有意に低い血清 LDL-C レベルを示した。血清 TC および TG に対する Cmyr - 4 7 の効果と一致し、モデル対照と比較して、Cmyr - 4 7 (特に高用量 30 mg/kg) で処理された動物は、有意に低い血清 LDL-C レベルを示した。

10

【0167】

【表 16】

表 16. 血清 LDL-C に対する Cmyr - 4 7 の効果
(処理後 4 週間)

グループ	投与量/注射	n	LDL-C (mmol/L)
正常対照	10 mL/kg PBS	10	1. 09 ± 0.11
モデル対照	10 mL/kg PBS	8	9.38 ± 3.75 **
陽性対照	50 mg/kg FENO	8	1.88 ± 0.40 **
低用量	10 mg/kg Cmyr - 4 7	8	7.33 ± 3.40
高用量	30 mg/kg Cmyr - 4 7	8	4.34 ± 1.36 **

20

注：正常対照と比較して、 $^{\#} P < 0.05$ 、 $^{**} P < 0.01$ ；モデル対照と比較して、

$* P < 0.05$ 、 $** P < 0.01$

30

【0168】

HBV 由来の他のポリペプチド (Cmyr - 60、Cmyr - 55、Cmyr - 40、Cmyr - 35、Cmyr - 30、Cmyr - 25、Cmyr - 20、Cmyr - 47+(-10)、Cmyr - 47+(-9)、Cplam - 47、Cstea - 47、Cch - 1 - 47、Amyr - 47、Bmyr - 47、Dmyr - 47、Emyr - 47、Fmyr - 47、Gmyr - 47 または Hmyr - 47) で処理された動物の血清 LDL-C レベルも、上記プロトコルに従って測定された。図 11 A と図 11 B に示されたように、それらの動物の血清 LDL-C レベルはモデル対照より低かった。

40

【0169】

実施例 3.5. 血清 HDL-C と AI に対する Cmyr - 4 7 の効果

表 17 と図 12 は、血清 HDL-C レベルの測定を提供する。この試験で得られた値に基づき、各動物の AI 値を上記式に従って計算した。各グループの平均 AI 値は、表 17 および図 13 に提供された。Cmyr - 4 7 がインビボで血清 HDL-C を低下させなかつたが、Cmyr - 4 7 で処理された動物の平均 AI 値は、モデル対照の平均値より有意に低く、これは Cmyr - 4 7 が、アテローム性動脈硬化症と脂肪の蓄積によって引き起こされる心血管疾患を含む他の血管疾患に対して保護できることを示す。

50

【0170】

【表17】

表 17. 血清HDL-CとA Iに対するCmyr-47の効果
(処理後4週間)

グループ	投与量/注射	n	HDL-C (mmol/L)	A I
正常対照	10mL/kg PBS	10	2.29±0.27	0.92±0.11
モデル対照	10mL/kg PBS	8	3.44±0.19**	4.75±1.59**
陽性対照	50mg/kg FENO	8	3.13±0.30**	1.36±0.38**
低使用量	10mg/kg Cmyr-47	8	3.45±0.22	3.62±1.49*
高使用量	30mg/kg Cmyr-47	8	3.41±0.18	2.39±0.55**

注：正常対照と比較して、 $^{\#}P < 0.05$ 、 $^{**}P < 0.01$ ；モデル対照と比較して、
 $*P < 0.05$ 、 $^{**}P < 0.01$

【0171】

実施例3.6. 血清総胆汁酸(TBA)に対するCmyr-47の効果

表18と図14は、血清TBAレベルの測定を提供する。予想通り、モデル対照における血清TBAレベルは、正常対照より高い。対照グループと比較して、Cmyr-47で処理された動物の血清TBAレベルは、用量依存的な方式でさらに上昇し、Cmyr-47が、インビボで胆汁酸摂取を阻害できることを確認した。4週目の測定で、高使用量のCmyr-47が血清TBAレベルを有意に増加させることができた（P値は0.05未満）。CsAおよび低用量のCmyr-47も4週間の処理後に、血清TBAレベルを中程度に上昇させたが、有意な差に達していなかった。

【0172】

【表18】

表18. 血清TBAに対するCmyr-47の効果 (mmol/L, $\bar{x} \pm S$)

グループ	投与量/注射	n	投与前	数週間の投与後のTGレベル	
				2w	4w
正常対照	10mL/kg PBS	10	24.61±3.69	23.14±2.65	18.13±3.81
モデル対照	10mL/kg PBS	8	36.19±7.00	39.35±12.04**	41.63±18.61**
陽性対照	50mg/kg FENO	8	35.74±4.47	25.74±4.25*	24.45±2.52*
低使用量	10mg/kg Cmyr-47	8	37.28±7.55	39.42±11.18	53.94±32.15
高使用量	30mg/kg Cmyr-47	8	32.15±7.82	40.43±5.96	64.08±5.47*
CsA処理	5mg/kg CSA	8	34.55±6.67	41.38±11.83	52.73±9.83

注：正常対照と比較して、 $^{\#}P < 0.05$ 、 $^{**}P < 0.01$ ；モデル対照と比較して、
 $*P < 0.05$ 、 $^{**}P < 0.01$

【0173】

実施例3.7. 血清グルコース(GLU)に対するCmyr-47の効果

表19に示されたように、正常対照と比較して、高脂血症の動物は、有意な高血糖表現型を示さなかった（全てのPの値 > 0.05 ）。高使用量と低使用量のCmyr-47は、血清GLUレベルを、正常対照およびモデル対照に示される正常血糖より低下させなかつた（すべてのPの値 > 0.05 ）。

【0174】

10

20

30

40

50

【表 19】

表 19. ゴールデンハムスターにおける血清 G L U に対する C my r - 4 7 の効果
(mmol/L, $\bar{x} \pm SEM$)

グループ	投与量/注射	n	投与前	数週間の投与後の G L U レベル	
				2週間	4週間
正常対照	10mL/kg PBS	10	4. 09±0. 3	4. 63±0. 8	4. 99±1. 4
モデル対照	10mL/kg PBS	8	3. 99±0. 4	4. 52±0. 9	4. 34±0. 7
低使用量	10mg/kg Cmyr-47	8	4. 18±0. 3	3. 87±0. 7	4. 55±1. 0
高使用量	30mg/kg Cmyr-47	8	4. 11±0. 5	4. 10±0. 7	4. 38±0. 4

注：正常対照グループと比較して、 $^{\#} P < 0.05$ 、 $^{*\#} P < 0.01$ ；モデル対照グループと比較して、 $* P < 0.05$ 、 $** P < 0.01$

【0175】

上記に記載されたように、C my r - 4 7 が、高脂肪食を与えたゴールデンハムスターの高脂血症表現型を逆転させることができる。特に、高使用量の C my r - 4 7 は、この研究に測定されたすべての生物学的指標を低下させることができる。これに対して、胆汁酸摂取阻害剤である C s A は、同様の効果を有しない。さらに、インビトロで C s A が、効果的に胆汁酸摂取を阻害できるが、インビボで C s A 処理は、血清 T G および T C レベルの増加を引き起こし、C s A の高脂血症効果を確認した。

【0176】

C my r - 4 7 の血清 T C と T G レベルに対する効果と一致し、C my r - 4 7 で処理された動物の A I 値は、処理されない高脂血症の動物より有意に低く、心血管疾患の予防薬とする C my r - 4 7 の有効性をさらに実証した。なお、H B V から由来する他のポリペプチドが、血清 T G 、 T C および L D L - C を低下することに同様の効果を有し、これらのポリペプチドも、インビボで高脂血症表現型を逆転できることを示唆した。

【0177】

実施例 3 . 8 . 血清 T C および T G に対する C my r - 4 7 の各使用量の効果
実施例 3 . 1 と同じように、高脂血症のゴールデンハムスター モデルを、確立した。高脂肪食処理の 2 週間後、動物が 10 mmol/L より高い血清総コレステロール (T C) レベルを有する場合に、ハムスターの高脂血症表現型が確認された。合計 32 匹の高脂血症ハムスターを、ランダムに 4 つのグループに分けられた (N = 8 / グループ) : モデル対照グループ (10 mL / kg PBS 、皮下 (s c)) 、低使用量処理グループ (C my r - 4 7 、 1 mg / kg / 日、 s c) 、中使用量処理グループ (C my r - 4 7 、 3 mg / kg / 日、 s c) 、高使用量処理グループ (10 mg / kg / 日 C my r - 4 7 、 s c) 。通常の固形飼料を給餌した 8 匹のハムスターは、正常対照グループとして使用された (10 mL / kg PBS 、 s c) 。

【0178】

実施例 3 . 1 に記載のプロトコールに従って、C my r - 4 7 を 4 週間連続して投与した。実験において、モデル対照グループ、低使用量グループ、中使用量グループおよび高使用量グループのすべての動物は、高脂肪食を与えられたが、一方、正常対照グループは、通常の固形食を与えられた。C my r - 4 7 または PBS をハムスターに 1 日 2 回に皮下注射した (午前 9:00 ~ 10:00 、午後 16:00 ~ 17:00) 。毎朝、食料と水の消費量、糞、動物のグルーミングをモニターした。全ての動物の血清 T C および T G レベルは、処理の 2 週目および 4 週目に、実施例 3 . 1 に記載されたように測定され、結果は、表 20 および 21 にまとめられた。データは、実施例 3 . 1 に記載のように分析された。

【0179】

10

20

30

40

50

表20および図15に示されたように、実験期間において、モデル対照における血清T Cレベルは正常対照よりも有意に高かった（全てのP < 0.01）。1mg/kgまたは3mg/kgの用量でCmyr-47による処理は、血清T Cに対する効果を有しない。しかしながら、モデル対照グループと比較して、10mg/kgのCmyr-47で4週間処理された高脂血症の動物は、ある程度に減少したレベルの血清T Cを示した（P < 0.05）。

【0180】

【表20】

表20. 血清T Cに対するCmyr-47の効果 (mmol/L, $\bar{x} \pm S$)

グループ	投与量/注射	n	投与前	数週間の投与後のT Cレベル	
				2週間	4週間
正常対照	10mL/kg PBS	8	2.21±0.3	4.31±0.3	4.25±0.3
モデル対照	10mL/kg PBS	8	13.45±1.6 [#] 19.47±4.9 ^{##} 19.88±3.9 ^{##}		
低使用量	1mg/kg Cmyr-47	8	13.42±1.5	19.75±2.5	20.88±4.0
中使用量	3mg/kg Cmyr-47	8	13.33±1.4	18.88±2.1	20.99±6.9
高使用量	10mg/kg Cmyr-47	8	13.34±1.4	16.47±5.1	16.21±4.2*

注：正常対照グループと比較して、[#]P < 0.05、^{##}P < 0.01；モデル対照グループと比較して、*P < 0.05、**P < 0.01

【0181】

表21および図16に示されたように、実験において、モデル対照における血清T Gレベルは正常対照よりも有意に高かった（全てのP < 0.01）。1mg/kgまたは3mg/kgの用量でCmyr-47による処理は、血清T Gに対する効果を有しない。モデル対照グループと比較して、10mg/kgのCmyr-47で4週間処理された高脂血症の動物は、ある程度に減少したレベルの血清T Cを示した（P < 0.05）。それらのデータによって示唆されたように、NTCP仲介の胆汁酸摂取を双方向制御できるCmyr-47の血清濃度に達する治療有効量のCmyr-47を投与することは、高脂血症患者の血清T CとT Gレベルの低減に有益する。

【0182】

【表21】

表21. 血清T Gに対するCmyr-47の効果 (mmol/L, $\bar{x} \pm S$)

グループ	投与量/注射	n	投与前	数週間の投与後のT Gレベル	
				2週間	4週間
正常対照	10mL/kg PBS	8	2.04±0.8	1.46±0.3	1.11±0.2
モデル対照	10mL/kg PBS	8	5.28±1.0 [#]	6.48±1.6 ^{##}	7.92±5.2 ^{##}
低使用量	1mg/kg Cmyr-47	8	4.78±0.8	7.11±2.1	7.41±2.1
中使用量	3mg/kg Cmyr-47	8	5.37±1.3	7.21±2.7	6.91±1.9
高使用量	10mg/kg Cmyr-47	8	5.52±1.3	5.55±2.4	4.44±2.1*

注：正常対照グループと比較して、[#]P < 0.05、^{##}P < 0.01；モデル対照グループと比較して、*P < 0.05、**P < 0.01

【実施例4】

【0183】

実施例4.1. Zucke r糖尿病性fat tyラットのCmyr-47による処理に

10

20

30

40

50

使用された方法と材料

抗糖尿病薬、抗高脂血症薬、および / または抗高コレステロール血症薬とする C my r - 4 7 の有効性を、自発的 I I 型糖尿病動物モデルである Z u c k e r 糖尿病性 f a t t y (Z D F) ラットでテストした。雄の 6 0 日齢 Z D F ラット (n = 4 0) および Z u c k e r l e a n (Z L) ラット (n = 6) をバイタルリバー実験動物技術会社 (V i t a l R i v e r L a b o r a t o r y A n i m a l T e c h n o l o g y C o . 、 L t d .) から購入した (S C X K (B e i j i n g) 2 0 1 2 - 0 0 0 1) 、動物品質認証番号 1 1 4 0 0 7 0 0 1 0 9 9 7 0 および 1 1 4 0 0 7 0 0 1 0 9 9 7 2 である。
全ての動物は、浙江漢方医学大学動物実験研究センター (Z h e j i a n g T r a d i t i o n a l C h i n e s e M e d i c i n e U n i v e r s i t y A n i m a l E x p e r i m e n t a l R e s e a r c h C e n t e r) (S Y X K (Z h e) 2 0 1 3 - 0 1 8 4) に、騒音が制御された部屋 (< 5 0 d B) 内で、特定の病原体のない (S P F) 環境で、1 2 時間の明暗サイクル (1 5 0 ~ 2 0 0 L X) で、湿度 5 0 ~ 7 0 % 、 2 3 ± 1 で飼育された。動物が、オートクレーブ処理の水ボトルにおけるろ過滅菌水を自由に飲める。Z D F ラットに、特殊フィード会社 (S p e c i a l t y F e e d s . I n c .) から購入した Pur i n a # 5 0 0 8 食餌 (テネシー州メンフィス ; Pur i n a 5 0 0 8 ; カタログ番号 S F 0 6 - 0 1 9) を与えた。Z L ラットに、 Co 60 線照射によって滅菌した通常の固形飼料 (基本飼料) を与えた。2 匹の Z D F ラットまたは Z L ラットを各ケージに収容し、ケージベッドを 2 日に 1 回交換した。実験ラットの飼育および他のすべての操作は、人道的に行われ、 3 R の原則に従った。

【 0 1 8 4 】

2 週間の Pur i n a # 5 0 0 8 食餌または通常の食餌を給餌した後に、全ての動物は、水を摂取しながら 1 0 時間絶食させた。次いで、各動物の体重を量り、尾部出血によって 0 . 3 m L の血液を採取した。血液サンプルをさらに糖化ヘモグロビン (H b A 1 c) について分析した。さらに 0 . 5 m L の血液を採取し、血清を分離するために、 3 , 0 0 0 r p m で 1 0 分間遠心分離した。動物における H b A 1 c 、血清グルコース (G L U) およびインスリンレベルは、以下に提供されるキットによって測定された。全ての測定には日立 7 0 2 0 自動生化学分析装置を使用した。

【 0 1 8 5 】

空腹時血清グルコースレベルが平均レベルに近い 3 0 匹の動物を選択し、ランダムに 5 つのグループに分けられ、グループあたり 6 匹の動物 : モデル対照グループ (1 0 m l · k g - 1 P B S) 、低使用量処理グループ (1 0 m g · k g - 1 C my r - 4 7) 、高使用量処理グループ (1 0 m g · k g - 1 C my r - 4 7) 、陽性対照グループ (3 0 0 m g · k g - 1 メトホルミン) 、 C s A 処理グループ (2 0 m g · k g - 1 C s A) 。6 匹の Z L ラットは、正常対照グループとして使用された (1 0 m l · k g - 1 P B S) 。P B S または C my r - 4 7 を動物に 1 日 2 回皮下注射した (0 9 : 0 0 および 1 7 : 0 0) 。メトホルミン (M E T) と C s A 溶液は、1 日 2 回 (午前および午後) に強制経口投与によって与えられた。投与は 4 週間行った。実験期間に、 Z D F ラットには Pur i n a # 5 0 0 8 食餌を与え、 Z L ラットには通常の食事を与えた。

【 0 1 8 6 】

C my r - 4 7 は、上記のように合成され、上海ヘップ製薬株式会社 (S h a n g h a i H E P P h a r m a c e u t i c a l C o . , L t d) (中国、上海 ; ロット番号 1 4 0 1 1 8 0 1) によって白色粉末として精製され、 - 2 0 で保存された。C my r - 4 7 を秤量し、使用直前に P B S に溶解した。M E T はブリストル・マイヤーズ スクイブ株式会社 (B r i s t o l - M y e r s S q u i b b C o . , L t d .) (中国、上海) によって承認番号 H 2 0 0 2 3 3 7 0 およびロット番号 A A D 7 8 7 8 で製造された。C s A (S a n d i m m u n e (登録商標)) は N o v a r t i s から購入された。

【 0 1 8 7 】

投与の 2 週目に、動物を水に自由に摂取させながら 1 0 時間絶食させ、血清 G L U 、総コレステロール (T C) 、トリグリセリド (T G) および血中尿素窒素 (B U N) を測定

10

20

30

40

50

するために、各動物から、0.3 mLの血液を尾静脈出血により採取した。投与の4週目に、動物を10時間絶食させ、次いで血清GLU、TC、TGおよびBUN、HbA1cおよびインスリンの測定のために、血液を採取した。最後の薬物投与後、動物を12時間絶食させ、次いで、3%ペントバルビタールナトリウムの腹腔内注射と、頸椎脱臼を行った。目視観察のために、各動物の心臓、腎臓、肩甲骨脂肪、および腹部脂肪を解剖し、心臓、腎臓、および総脂肪指数を計量した。

【0188】

ペントバルビタールナトリウム（含有量 95.0%；ロット番号 20130112）はメルク（Merck）から購入した。TC、TG、GLUおよびBUNキットはDiaSys診断システム（DiaSys Diagnostic Systems）（中国、上海）から購入した。HbA1c検出試薬は、アイルランドのトリニティバイオテック会社（Trinity Biotech Inc.）から購入した。インスリンELISA検出キット（ロット番号：0469636-1）は、Bertin Pharma（フランス）から購入した。購入したキットを使用した測定は、すべて、キットに記載されている製造元のプロトコルに従って実施した。

【0189】

SQP電子天秤は、ザルトリウス科学機器（北京）会社（Sartorius Scientific Instruments（Beijing）Co., Ltd（Beijing, China））から購入した。MLS-3750オートクレーブは日本のSanyoから購入した。RO-MB-50超純水システムは、杭州Yongjiedaクリーニング科学技術会社（Hangzhou Yongjieda Cleaning Science and Technology, Co., Ltd.）（中国浙江）によって製造された。KQ-300DE超音波は、昆山超音波計器有限公司（Kunshan Ultrasonic Instrument Co., Ltd.）（昆山、江蘇省、中国）から購入した。日立7020自動生化学分析装置を、日立（日本）から購入した。Hb9210糖化ヘモグロビン分析器：トリニティバイオテック会社（Trinity Biotech Inc.）、アイルランド。マルチモードマイクロプレートリーダーは、サーモフィッシュャーサイエンティフィック社（米国マサチューセッツ州）から購入した。

【0190】

SPSS 19.0ソフトウェア（SPSS、Chicago, IL）を統計分析に使用した。全てのデータは、平均±標準誤差の平均

【0191】

【数1】

($\bar{x} \pm SEM$)

【0192】

として表した。テスト結果からのデータを評価するために、ANOVA分散分析を用いられた。LSDテストは、一対比較に用いられた。統計分析の値は小数点第2位を四捨五入した。

【0193】

実施例4.2. 血清グルコース（GLU）に対するCmyr-47とHBVから由来する他のポリペプチドの効果

高血糖（すなわち、血糖値の上昇）は、2型糖尿病の最も顕著な症状の一つである。表22および図17に示されたように、モデル対照と正常対照との血清GLUレベルを比較することによって、ZDFラットの高血糖表現型を確認した（全てのPの値 < 0.01）。METは、糖尿病患者の血糖を効果的に下げる抗糖尿病薬として知られる。予想通り、METで処理されたZDFラットは、モデル対照と比較して、有意に減少した空腹時血清GLUを示した。Cmyr-47も、ZDFラットの血糖を低下できた。特に、4週間の処理で、低使用量および高使用量のCmyr-47は、共に動物の血清GLUレベルを効

10

20

30

40

50

果的に低下させた。血糖に対する Cmyr - 47 の効果は、用量依存的である。これに対して、モデル対照と比較して、CsA 处理は、動物の血清 GLU レベルを有意に上昇させた。

【0194】

【表 22】

表 22. ZDF ラットにおける空腹時血清 GLU に対する Cmyr - 47 の効果

(mmol/L, $\bar{x} \pm SEM$)

グループ	投与量/注射	数週間の投与後の GLU レベル			10
		0	2	4	
正常対照	10mL/kg PBS	6. 91±0. 22	6. 23±0. 27	6. 51±0. 19	
モデル対照	10mL/kg PBS	9. 68±0. 90*	19. 36±3. 35**	27. 03±1. 07**	
陽性対照	300mg/kg Met	9. 71±0. 96	7. 98±1. 02**	8. 35±0. 58**	
Cmyr - 47 低	10mg/kg Cmyr - 47	9. 82±1. 19	14. 74±0. 68	19. 16±1. 23**	
Cmyr - 47 高	30mg/kg Cmyr - 47	9. 73±1. 01	9. 50±1. 72*	10. 50±2. 34**	
CsA 处理	20mg/kg CsA	9. 76±1. 22	22. 38±3. 08	33. 75±6. 68*	

注：正常対照グループと比較して、* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ ；モデル対照グループと比較して、* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$

【0195】

インビボで血糖に対する効果を分析するために、表 1 に挙げられた HBV から由来する他のポリペプチドも、上記と同じプロトコルに従ってテストされた。全てのポリペプチドを、30mg/kg/日の Cmyr - 47 に相当するモル使用量で投与した。

【0196】

図 18 A および図 18 B に示されたように、ZDF ラットの高血糖表現型を確認した。上記研究に観察されたように、MET による処理は、インビボで空腹時血清 GLU を有意に減少させた。HBV 由来ペプチド (Cmyr - 60、Cmyr - 55、Cmyr - 40、Cmyr - 35、Cmyr - 30、Cmyr - 25、Cmyr - 20、Cmyr - 47 + (-10)、Cmyr - 47 + (-9)、Cplam - 47、Cstea - 47、Cchol - 47、Amyr - 47、Bmyr - 47、Dmyr - 47、Emyr - 47、Fmyr - 47、Gmyr - 47 または Hmyr - 47) による 4 週間の処理後、モデル対照と比較して、ZDF ラットの空腹時血清 GLU レベルは減少し、これは抗糖尿病薬としてのポリペプチドの有効性を示している。

【0197】

実施例 4.3. HbA1c に対する Cmyr - 47 と HBV から由来する他のポリペプチドの効果

HbA1c は、糖化ヘモグロビンを指し、対象が慢性高血糖を経るときに、そのレベルが、有意に増加する。表 23 および図 19 に示されたように、ZDF ラットの高血糖表現型と一致し、研究において、モデル対照における HbA1c レベルは正常対照よりも有意に高かった（全ての P の値 < 0.01 ）。また、血糖に対する MET の効果と一致し、MET による処理は ZDF ラットの HbA1c レベルを有意に減少させた（ $P < 0.01$ ）。モデル対照と比較して、Cmyr - 47 で処理された ZDF ラットも、用量依存的に有意に低い HbA1c レベルを示し、インビボで、Cmyr - 47 の血糖を調節する抗糖尿病薬とする有効性を確認した。CsA の血清 GLU レベルに対する効果と一致し、CsA 処理が、4 週間の処理後に血清 HbA1c を有意に増加させた。

【0198】

10

20

30

40

50

【表 2 3】

表 2 3. ZDF ラットにおける HbA1c レベルに対する Cmyr - 47 の効果 (%、 $\bar{x} \pm SEM$)

グループ	投与量/注射	数週間の投与後の HbA1c レベル	
		0	4
正常対照	10 mL/kg PBS	4. 28 ± 0. 02	4. 55 ± 0. 02
モデル対照	10 mL/kg PBS	6. 27 ± 0. 25 **	9. 33 ± 0. 40 **
陽性対照	300 mg/kg Met	6. 25 ± 0. 31	5. 07 ± 0. 23 **
Cmyr - 47 低	10 mg/kg Cmyr - 47	6. 27 ± 0. 24	6. 82 ± 0. 44 **
Cmyr - 47 高	30 mg/kg Cmyr - 47	6. 25 ± 0. 31	5. 73 ± 0. 39 **
CsA 处理	20 mg/kg CsA	6. 23 ± 0. 44	11. 60 ± 1. 03 **

注：正常対照と比較して、 $* P < 0.05$ 、 $** P < 0.01$ ；モデル対照と比較して、
 $* P < 0.05$ 、 $** P < 0.01$

【0199】

上記と同じ動物モデルにおいて試験された場合に、表 1 に挙げられた HBV から由来する他のポリペプチドも、HbA1c に同様の効果を示した。図 20 A および図 20 B に示されたように、モデル対照の HbA1c レベルは、ポリペプチドで処理された ZDF ラットより高かった。これらの結果は、HBV から由来するポリペプチドが、血糖と HbA1c を効果的に低下できることを証明し、CsA の血糖向上効果を確認した。

【0200】

実施例 4.4. 血清インスリンに対する Cmyr - 47 の効果

2 型糖尿病患者は、インスリン抵抗性とインスリンの過剰産生に伴って、最終的に、膵臓の損傷によるインスリンの欠乏になった。Cmyr - 47 が膵臓損傷を予防することによってインスリンを調節することができる事を確認するために、Cmyr - 47 で処理された動物のインスリンレベルは、PBS または MET で処理された動物と比較された。表 24 および図 21 に示されたように、ZDF ラットの初期血清インスリンレベルは、正常対照より有意に高かった。4 週目に、ZDF ラットのインスリンレベルは、正常対照より高かったが、初期レベルと比較して、絶対レベルは有意に低下した。この変化は、研究にわたって、ZDF ラットにおけるインスリン抵抗性も発展し、膵臓機能不全をもたらしたことを見ている。モデル対照と陽性対照との空腹時インスリンレベルの間の差は、統計的に有意ではなかったが ($P > 0.05$)、MET による処理は、血清インスリンの喪失から保護できることを示した。しかしながら、モデル対照と Cmyr - 47 処理動物との間の有意な差が、Cmyr - 47 処理は二つの使用量で（増加しない）と共にインスリン分泌を完全に安定化できることを示した（全ての P の値 < 0.05 ）。これらの結果は、Cmyr - 47 が膵臓の損傷を予防できることを証明し、そして、糖尿病患者における適切なインスリン分泌の維持を助けられることを証明した。

【0201】

10

20

30

40

50

【表 2 4】

表 2 4. ZDF ラットにおける血清インスリンに対する Cmyr - 47 の効果
(ng/mL, $\bar{x} \pm SEM$)

グループ	投与量/注射	数週間の投与後のインスリンレベル	
		0	4
正常対照	10mL/kg PBS	0.46±0.06	0.84±0.06
モデル対照	10mL/kg PBS	7.15±1.38##	3.85±1.25##
陽性対照	300mg/kg Met	6.74±0.62	8.36±3.68
Cmyr - 47 低	10mg/kg Cmyr - 47	7.99±1.17	8.57±2.18*
Cmyr - 47 高	30mg/kg Cmyr - 47	8.55±1.07	9.56±4.26*

注：正常対照グループと比較して、 $*P < 0.05$ 、 $**P < 0.01$ ；モデル対照グループと比較して、 $*P < 0.05$ 、 $**P < 0.01$

【0202】

実施例 4.5. 血清総コレステロール (TC) に対する Cmyr - 47 と HBV から由来する他のポリペプチドの効果

上記に記載されたように、糖尿病表現型は血流中のコレステロールおよびトリグリセリドの上昇を含む脂質調節異常を含む。表 2 5 および図 2 2 に示されたように、正常対照と比較して、モデル対照における血清 TC レベルは、常に上昇した（全ての P の値 < 0.05 ）。しかしながら、血糖に対する MET の効果と逆に、MET は、ZDF ラットの血清 TC レベルの低下に、全く効果がなかった。CsA も、ZDF ラットにおける血清 TC レベルの低下に効果がなく、4 週間の処理後に、モデル対照と比較して、CsA は血清 TC レベルを有意に増加させた。特に、モデル対照と比較して、高使用量の Cmyr - 47 は、ZDF ラットの血清 TC レベルを有意に低下させ、Cmyr - 47 が糖尿病患者に著しく上昇する広範囲のバイオマーカーを調節できることを確認した。

【0203】

【表 2 5】

表 2 5. ZDF ラットにおける血清 TC に対する Cmyr - 47 の効果 (mmol/L, $\bar{x} \pm SEM$)

グループ	投与量/注射	数週間の投与後の TC レベル		
		0	2	4
正常対照	10mL/kg PBS	2.85±0.03	3.18±0.06	3.22±0.04
モデル対照	10mL/kg PBS	3.68±0.46#	4.95±0.15##	6.95±0.21##
陽性対照	300mg/kg Met	3.82±0.11	5.24±0.35	6.95±0.54
Cmyr - 47 低	10mg/kg Cmyr - 47	3.72±0.15	4.97±0.19	6.63±0.18
Cmyr - 47 高	30mg/kg Cmyr - 47	3.60±0.18	4.25±0.27*	5.52±0.41**
CsA 处理	20mg/kg CsA	3.65±0.48	6.54±0.63**	8.33±0.65**

注：正常対照グループと比較して、 $*P < 0.05$ 、 $**P < 0.01$ ；モデル対照グループと比較して、 $*P < 0.05$ 、 $**P < 0.01$

【0204】

HBV から由来する他のポリペプチドで処理された動物も、それらのポリペプチドがイ

10

20

30

40

50

ンビボで血清 T C を低下させることができることを示した。図 23 A と図 23 B に示されたように、H B V 由来の他のペプチド (C my r - 6 0、C my r - 5 5、C my r - 4 0、C my r - 3 5、C my r - 3 0、C my r - 2 5、C my r - 2 0、C my r - 4 7 + (- 1 0)、C my r - 4 7 + (- 9)、C plam - 4 7、C stea - 4 7、C chol - 4 7、Amyr - 4 7、Bmyr - 4 7、Dmyr - 4 7、Emyr - 4 7、Fmyr - 4 7、Gmyr - 4 7 またはHmyr - 4 7) で 4 週間処理された後に、Z D F ラットの血清 T C レベルはモデル対照より低かった。これらの結果は、M E T が、一つの具体的な症状のみを標的できるが、H B V から由来するポリペプチドが、複数の経路を標的でき、したがって、糖尿病関連症状を同時に管理することに有用であることを証明した。

10

【0205】

実施例 4 . 6 . 血清トリグリセリド (T G) に対する C my r - 4 7 と H B V から由来する他のポリペプチドの効果

血清 T C に加えて、血清 T G も、糖尿病によって引き起こされ得る高脂血症のバイオマーカーである。予想通り、表 26 と図 24 に示されたように、研究において、モデル対照における血清 T G レベルは正常対照よりも有意に高かった（全ての P の値 < 0 . 0 1）。注目すべきは、M E T は、2 週目に Z D F ラットの血清 T G レベルを有意に上昇させた（P < 0 . 0 1）。差は有意ではないが、4 週目に、M E T で処理された Z D F ラットの血清 T C レベルは、モデル対照より高かった。血清 T C レベルに対する効果と一致し、C s A は、Z D F ラットにおける血清 T G レベルをさらに増加させた。これに対して、二つの用量の C my r - 4 7 は、共に、Z D F ラットの血清 T G レベルを低下させることができ、C my r - 4 7 の効果は用量依存的である。

20

【0206】

【表 26】

表 26. Z D F ラットにおける血清 T G に対する C my r - 4 7 の効果 (mmol/L、 $\bar{x} \pm SEM$)

グループ	投与量/注射	数週間の投与後の T G レベル		
		0	2	4
正常対照	10mL/kg PBS	0. 58 ± 0. 03	0. 96 ± 0. 08	1. 47 ± 0. 15
モデル対照	10mL/kg PBS	9. 80 ± 2. 95 [#]	12. 23 ± 1. 36 [#]	13. 43 ± 2. 21 [#]
陽性対照	300mg/kg Met	8. 32 ± 0. 65	17. 10 ± 2. 02 ^{**}	14. 74 ± 1. 99
C my r - 4 7 低	10mg/kg C my r - 4 7	9. 78 ± 0. 48	9. 50 ± 0. 58	8. 62 ± 0. 41*
C my r - 4 7 高	30mg/kg C my r - 4 7	8. 11 ± 0. 72	6. 42 ± 0. 92 ^{**}	6. 26 ± 0. 64 ^{**}
C s A 処理	20mg/kg C s A	9. 04 ± 0. 84	14. 34 ± 1. 88 ^{**}	19. 03 ± 2. 65 ^{**}

30

注：正常対照と比較して、[#] P < 0. 05、^{##} P < 0. 01；モデル対照と比較して、

* P < 0. 05、** P < 0. 01

40

【0207】

上記と同じ動物モデルにおいて試験された場合に、H B V から由来する他のポリペプチドも、インビボで血清 T G を減少できた。図 25 A と図 25 B に示されたように、モデル対照の血清 T G レベルは、H B V 由来ペプチド (C my r - 6 0、C my r - 5 5、C my r - 4 0、C my r - 3 5、C my r - 3 0、C my r - 2 5、C my r - 2 0、C my r - 4 7 + (- 1 0)、C my r - 4 7 + (- 9)、C plam - 4 7、C stea - 4 7、C chol - 4 7、Amyr - 4 7、Bmyr - 4 7、Dmyr - 4 7、Emyr - 4 7、Fmyr - 4 7、Gmyr - 4 7 またはHmyr - 4 7) で処理された Z D F ラ

50

ットより高かった、さらに、H B V から由来するポリペプチドが、グルコース代謝および脂質代謝を同時に調節できることを確認した。

【0208】

実施例 4 . 7 . 血清血液尿素窒素 (B U N) に対する C my r - 4 7 の効果

上昇の血清 B U N は、腎機能障害を反映し、しばしばに、ヒト糖尿病患者に発生する。Z D F モデルにおいて、糖尿病表現型は、腎機能障害と血清 B U N との相関的な上昇をもたらす。予想通り、表 2 7 と図 2 6 に示されたように、研究において、モデル対照における血清 B U N レベルは正常対照よりも有意に高かった。モデル対照と陽性対照との間に B U N の差は、有意ではないので、M E T の処理は、腎機能障害を逆転できない。しかしながら、高使用量の C my r - 4 7 は、4 週目に、Z D F ラットの血清 B U N レベルを有意に低下させ ($P < 0 . 0 1$)、C my r - 4 7 が、糖尿病患者を腎臓損傷および腎機能障害から保護できることを示した。

【0209】

【表 2 7】

表 2 7. Z D F ラットにおける血清 B U N に対する C my r - 4 7 の効果 (mm o
1 / L, $\bar{x} \pm S E M$)

グループ	投与量／注射	数週間の投与後の B U N レベル		
		0	2	4
正常対照	10mL/kg PBS	4. 71±0. 22	5. 54±0. 06	4. 48±0. 09
モデル対照	10mL/kg PBS	6. 13±0. 51#	6. 62±0. 35	7. 96±0. 18##
陽性対照	300mg/kg Met	5. 52±0. 21	6. 58±0. 52	7. 09±0. 36
C my r - 4 7 低	10mg/kg C my r - 4 7	5. 26±0. 29	6. 83±0. 48	7. 93±0. 38
C my r - 4 7 高	30mg/kg C my r - 4 7	5. 83±0. 37	6. 44±0. 45	6. 65±0. 20**

注：正常対照グループと比較して、# $P < 0 . 0 5$ 、## $P < 0 . 0 1$ ；モデル対照グループと比較して、* $P < 0 . 0 5$ 、** $P < 0 . 0 1$

【0210】

実施例 4 . 8 . 器官指数に対する C my r - 4 7 の効果

糖尿病患者は、心血管疾患、腎機能障害、および肥満を発展するリスクが高くなる。上述に記載されたように、心臓指数 (H I) 、腎臓指数 (K I) および総脂肪指数 (T F I) のような各種の指標を、リスクの定量的指標として、使用できる。表 2 8 および図 2 7 A に示されたように、モデル対照の H I 値は、正常対照より高かった。M E T による処理は、H I 値に影響を及ぼさなかった。驚くべきことに、二つの使用量の C my r - 4 7 は、共に Z D F ラットの H I 値を有意に減少させ、C my r - 4 7 が有害な心血管イベントを予防することに有用であることを示した。

【0211】

表 2 8 および図 2 7 B に示されたように、モデル対照の K I 値は、正常対照より有意に高く ($P < 0 . 0 1$)、これは、研究期間に、Z D F ラットが腎機能障害を発生したことを表明した。血清 B U N に対する C my r - 4 7 の効果と一致し、C my r - 4 7 処理も、Z D F ラットにおける K I 値を低下させたが、その差は統計的有意性を有しない。

【0212】

表 2 8 および図 2 7 C は、モデル対照の T F I 値が正常対照より有意に高く ($P < 0 . 0 1$)、Z D F ラットが病的肥満に達したことを示した。有意ではないが、C my r - 4 7 で処理された Z D F ラットは、モデル対照より低い T F I 値になる傾向を示した。注目すべきことに、M E T は同様の傾向を示さず、逆に Z D F ラットにおける T F I 値を増加した。

10

20

30

40

50

【0213】

【表28】

表 28. 4週間の処理後のZDFラットの器官指数に対するCmyr-47の効果 (g/kg, $\bar{x} \pm SEM$)

グループ	投与量/注射	心臓指数	腎臓指数	総脂肪指数
正常対照	10mL/kg PBS	3.48±0.09	6.64±0.13	27.47±1.63
モデル対照	10mL/kg PBS	3.63±0.19	8.39±0.41*	93.70±5.01**
陽性対照	300mg/kg Met	3.63±0.24	7.26±0.55	94.64±3.79
Cmyr-47低	10mg/kg Cmyr-47	2.90±0.13*	7.86±0.63	89.18±4.95
Cmyr-47高	30mg/kg Cmyr-47	3.05±0.10*	7.36±0.44	86.61±5.03

注: 正常対照と比較して、*P<0.05、**P<0.01; モデル対照と比較して、*P<0.05、**P<0.01

【0214】

実施例4.9. 血清総胆汁酸(TBA)に対するCmyr-47の効果

Cmyr-47が血清TBAレベルを調節できることを確認するために、各動物の血清TBAレベルを測定した。表29および図28に示されたように、モデル対照における血清TBAレベルは、正常対照より高かった。モデル対照グループと比較して、Cmyr-47で処理されたZDFラットの血清TBAレベルは、用量依存的にさらに上昇した。4週目の測定で、高使用量のCmyr-47が血清TBAレベルを有意に増加させることができ確認した(P値は0.05未満)。また、4週間の治療後に、CsAは、血清TBAレベルを有意に上昇させた(P値0.01未満)。

【0215】

【表29】

表29. ZDFラットにおける血清TBAに対するCmyr-47の効果 (mmol/L, $\bar{x} \pm SEM$)

グループ	投与量/注射	数週間の投与後のTBAレベル		
		0	2	4
正常対照	10 mL/kg PBS	42.61±10.94	44.52±8.62	28.51±8.13
モデル対照	10 mL/kg PBS	55.51±36.96	76.24±31.22	59.15±22.38#
陽性対照	300mg/kg Met	32.83±12.29	82.48±27.02	82.97±15.82*
Cmyr-47低	10mg/kg Cmyr-47	37.51±13.17	74.04±33.35	74.38±28.53
Cmyr-47高	30mg/kg Cmyr-47	44.09±12.20	85.47±24.03	114.58±45.31*
CsA処理	20mg/kg CsA	40.29±6.69	78.53±7.38	117.35±9.33**

注: 正常対照グループと比較して、*P<0.05、**P<0.01; モデル対照グループと比較して、*P<0.05、**P<0.01

【0216】

METは、広く使用されている抗糖尿病薬であり、インビオで血糖を効果的に調節できる。上記のように、血糖調節におけるMETの有効性も、この研究に確認された。しかしながら、METは、ZDFラットの血清TC、TG、およびBUNレベル、ならびにHb値を低下できないことが証明したように、METは、脂質調節異常および関連疾患に利益をもたらすことができない。高脂血症動物モデルに示されたように、CsA処理は、血清

10

20

30

40

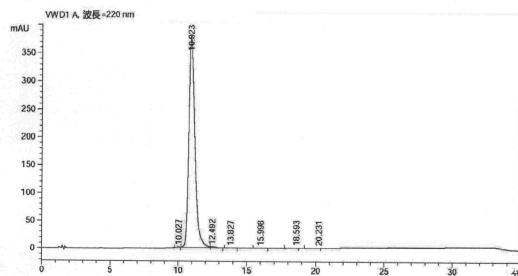
50

T G および T C レベルを増加させるだけでなく、血清 G L U レベルもさらに増加させ、インビトロで胆汁酸取摂取を有効に阻害できるものは、必ずしもインビボで脂質およびグルコース代謝に対する治療効果を有するわけではないことを表明する。これに対して、C my r - 4 7 は、すべてのテストに、うまく機能した。上記に証明されたように、C my r - 4 7 は、膵臓損傷、腎機能障害、および心血管疾患に対する保護を提供しながら、血糖および脂質代謝を調節できる。したがって、抗高血糖剤、抗高コレステロール血症剤、抗高脂血症剤、および抗脂肪症剤として、C my r - 4 7 は、M E T より優れ、同時に複数の糖尿病表現型に対する全面的な効果を示した。

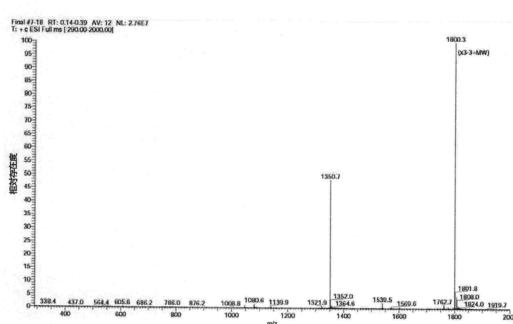
【図面】

【図 1】

A.

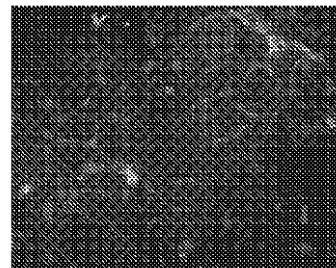


B.



【図 2 A】

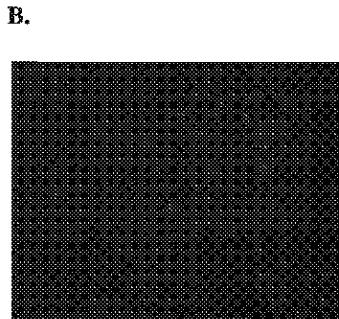
A.



10

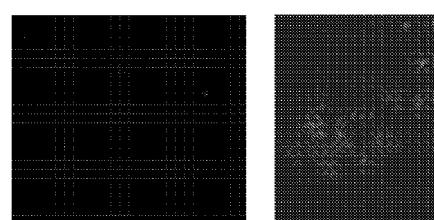
20

【図 2 B】



【図 3】

FIG. 3

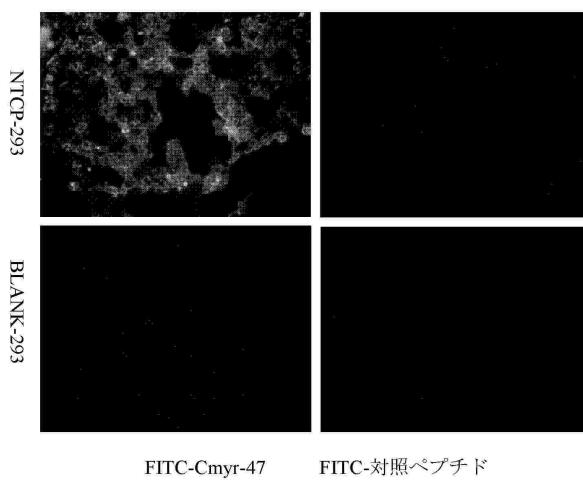


30

40

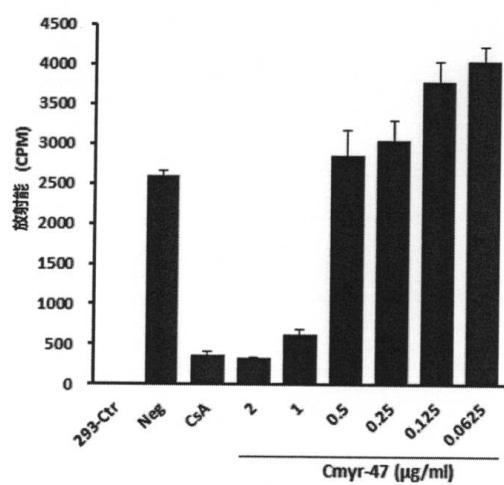
50

【図4】



【図5 A】

A.

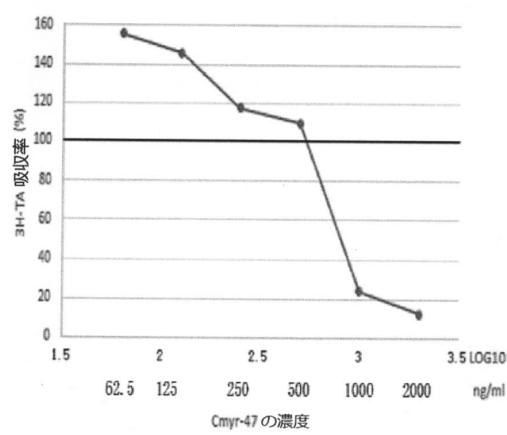


10

20

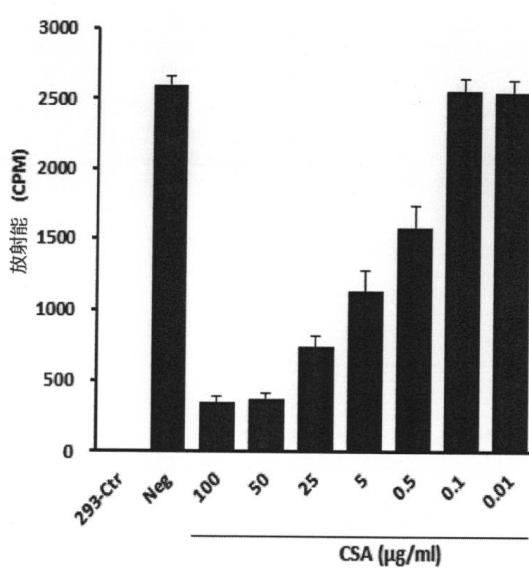
【図5 B】

B.



【図5 C】

C.



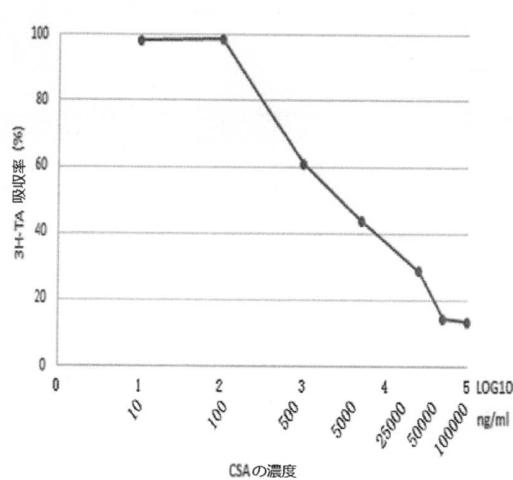
30

40

50

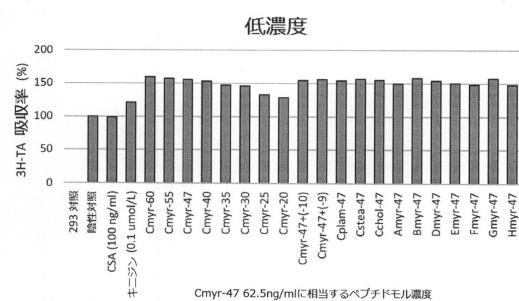
【図 5 D】

D.



【図 5 E】

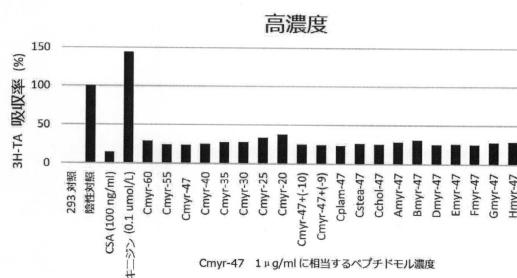
E.



10

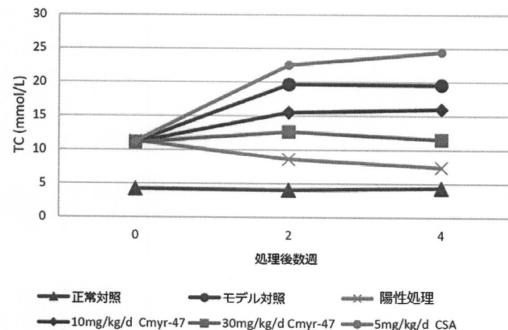
【図 5 F】

F.



【図 6】

TC



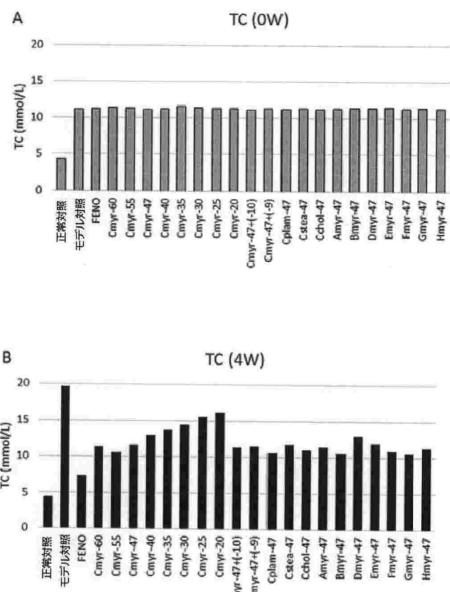
20

30

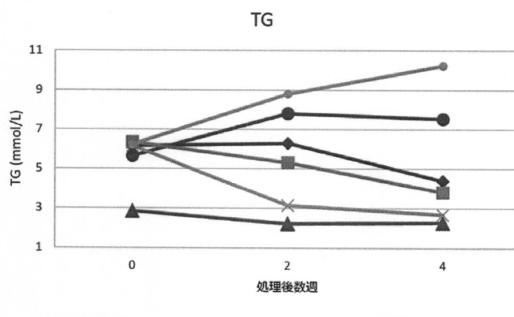
40

50

【図7】

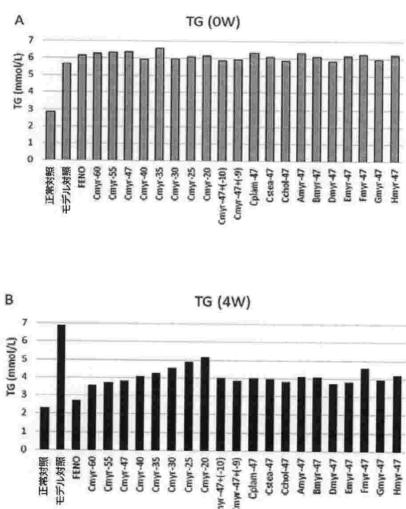


【図8】

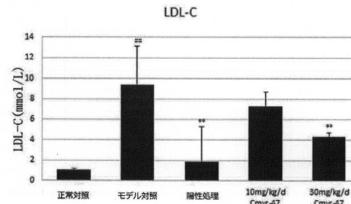


10

【図9】



【図10】



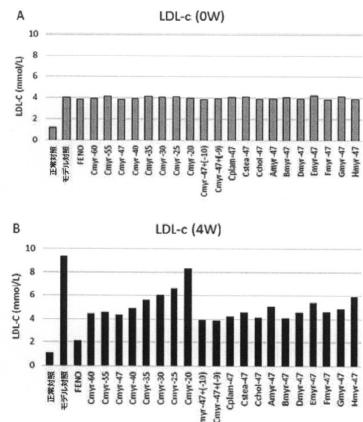
20

30

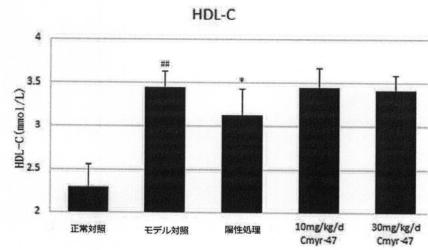
40

50

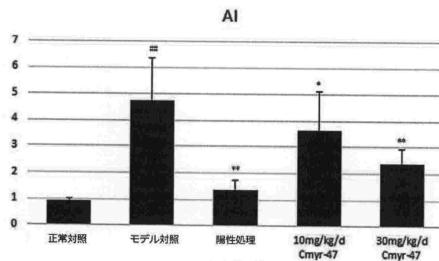
【図 1 1】



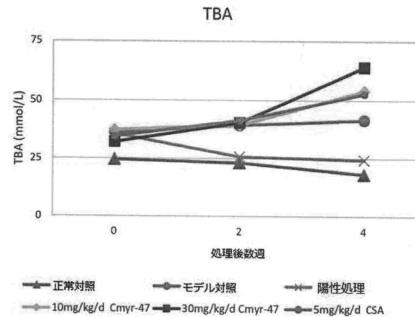
【図12】



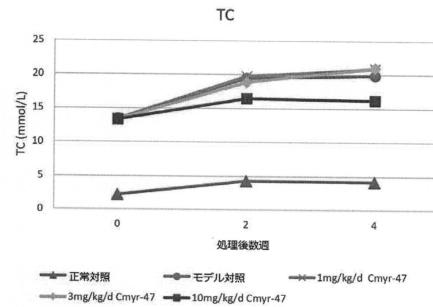
【図13】



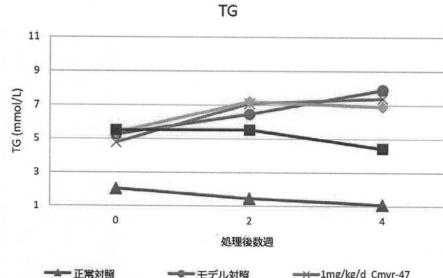
【図 1-4】



【図15】



【図16】



10

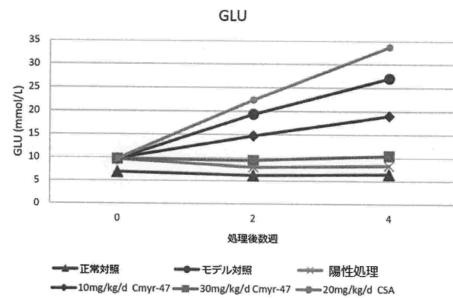
20

30

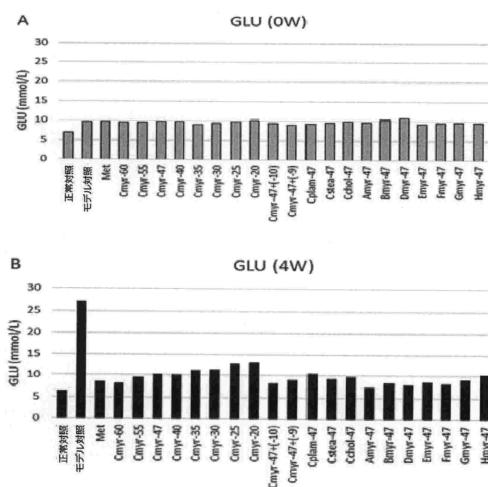
40

50

【図17】

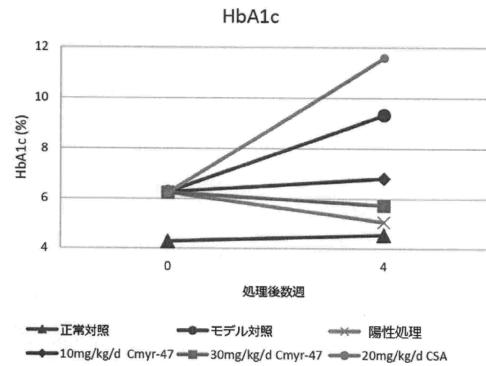


【図18】

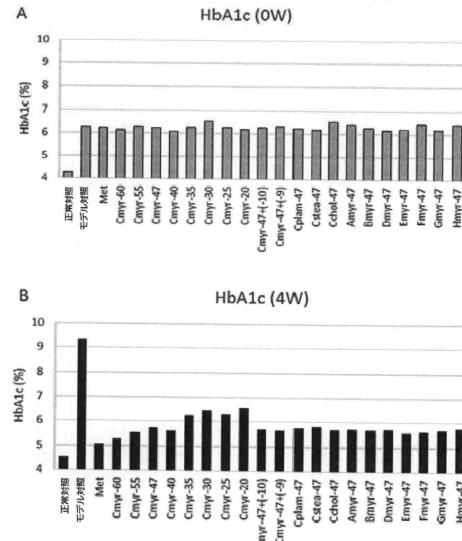


10

【図19】



【図20】



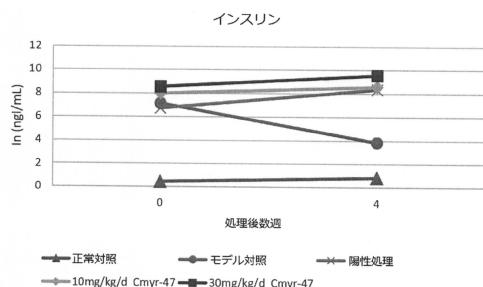
20

30

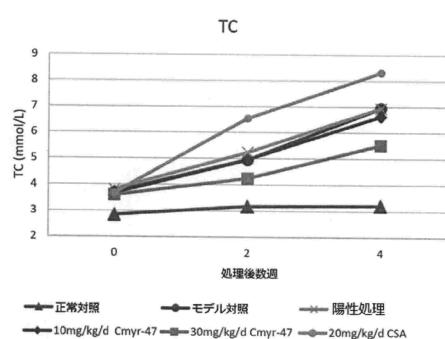
40

50

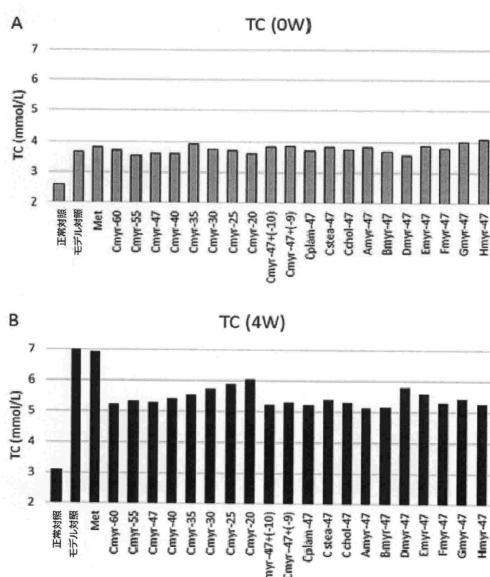
【図 2 1】



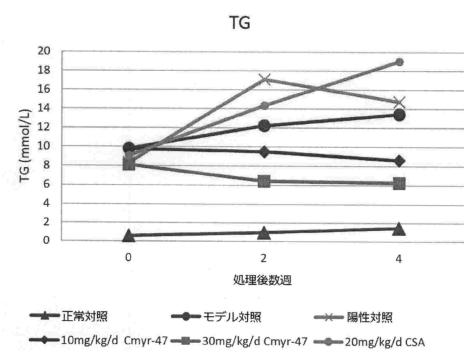
【図 2 2】



【図 2 3】



【図 2 4】



10

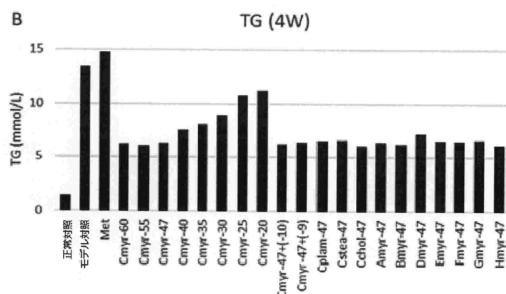
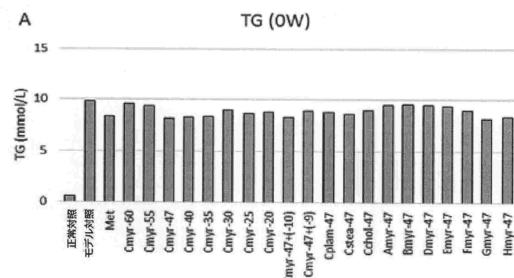
20

30

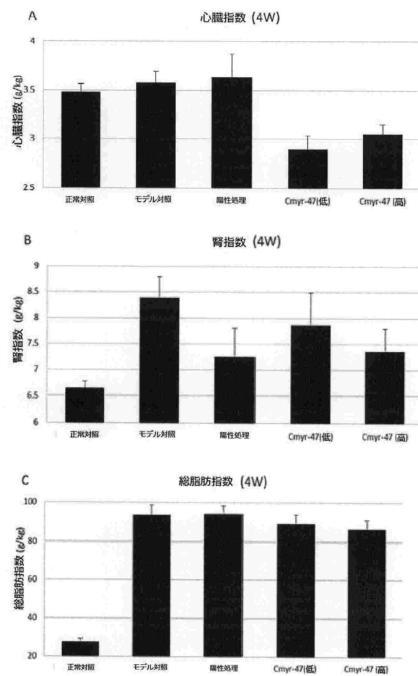
40

50

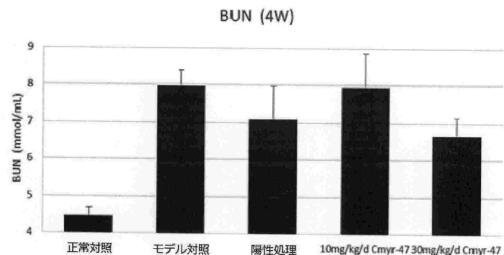
【図25】



【図27】

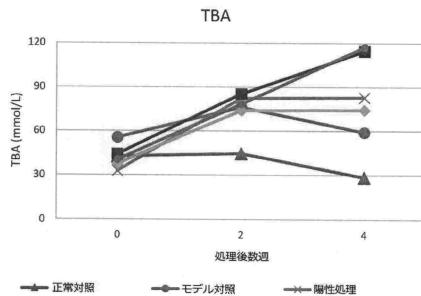


【図26】



10

【図28】



20

30

【配列表】

0007684788000001.app

40

50

フロントページの続き

中国(CN)
新区蔡倫路720号1号樓601室

合議体

審判長 吉田 佳代子

審判官 斎藤 恵

審判官 岡山 太一郎

(56)参考文献 国際公開第2014 / 72524 (WO , A1)

XXIII INTERNATIONAL BILE ACID MEETING BILE ACIDS AS SIGNAL INTEGRATORS AND METABOLIC MODULATORS; OCT, 2014, FREIBERG GERMANY(2011) VOL.194, P.102

Hepatology (2014) vol.60, no.5, p.1458-1460

Hepatology (2014) vol.60, no.5, p.1483-1493

(58)調査した分野 (Int.Cl. , DB名)

A 61K 38 /

PubMed

CAplus/REGISTRY(STN)

BIOSIS/MEDLINE/EMBASE/WPIDS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq