

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-526750

(P2009-526750A)

(43) 公表日 平成21年7月23日(2009.7.23)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02 Z N A	4 B 0 2 4
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D	4 B 0 6 3
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 B 0 6 5
A 6 1 P 3/04 (2006.01)	A 6 1 P 3/04	4 C 0 8 4
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 B	4 C 0 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 68 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2008-547703 (P2008-547703)	(71) 出願人	503054122
(86) (22) 出願日	平成18年12月18日 (2006.12.18)		セントカー・インコーポレーテッド
(85) 翻訳文提出日	平成20年8月19日 (2008.8.19)		アメリカ合衆国ペンシルベニア州1935
(86) 国際出願番号	PCT/US2006/062223		5 マルバーン・グレートバレイパークウエ
(87) 国際公開番号	W02007/076319		イ200
(87) 国際公開日	平成19年7月5日 (2007.7.5)	(74) 代理人	110000741
(31) 優先権主張番号	60/752, 826		特許業務法人小田島特許事務所
(32) 優先日	平成17年12月22日 (2005.12.22)	(72) 発明者	オニール, カリン・テイ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国ペンシルベニア州1934
			8 ケネットスクエア・カークブレロード2
			22
		(72) 発明者	ピチャ, クリステン
			アメリカ合衆国ペンシルベニア州1935
			5 マルバーン・イエロースプリングスロー
			ド2065
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 GLP-1 アゴニスト、組成物、方法および使用

(57) 【要約】

本発明は、少なくとも1つの新規ヒトGLP-1 ミメティポディ、または特定部分またはバリエーションに関し、少なくとも1つのGLP-1 ミメティポディまたは特定部分またはバリエーションをコードする単離された核酸、GLP-1 ミメティポディまたは特定部分またはバリエーション、ベクター、宿主細胞、トランスジェニック動物もしくは植物、ならびに肥満関連障害を処置するための治療用組成物、方法およびデバイスを含むそれらの作成および使用方法を含む。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞、組織、器官または動物の G L P - 1 肥満関連状態を診断または処置する方法であって、有効量の G L P - 1 アゴニストまたはミメティボディ核酸、ポリペプチドまたは抗体の少なくとも 1 つを含んでなる組成物を、該細胞、組織、器官または動物に接触または投与することを含んでなり、ここで該少なくとも 1 つの G L P - 1 C H 1 欠失ミメティボディ核酸が、配列番号 2 または 4 のアミノ酸配列をコードする少なくとも 1 つのポリヌクレオチド、またはそれに相補的なポリヌクレオチドを含んでなる上記方法。

【請求項 2】

細胞、組織、器官または動物の G L P - 1 肥満関連状態を診断または処置する方法であって、有効量の G L P - 1 アゴニストまたはミメティボディ核酸、ポリペプチドまたは抗体の少なくとも 1 つを含んでなる組成物を、該細胞、組織、器官または動物に接触または投与することを含んでなり、ここで該少なくとも 1 つの G L P - 1 C H 1 欠失ミメティボディ核酸が、配列番号 7 ~ 1 4 から選択される少なくとも 1 つを含んでなるアミノ酸配列をコードする少なくとも 1 つのポリヌクレオチド、またはそれに相補的なポリヌクレオチドを含んでなる上記方法。

10

【請求項 3】

細胞、組織、器官または動物の G L P - 1 肥満関連状態を診断または処置する方法であって、有効量の G L P - 1 アゴニストまたはミメティボディ核酸、ポリペプチドまたは抗体の少なくとも 1 つを含んでなる組成物を、該細胞、組織、器官または動物に接触または投与することを含んでなり、ここで該少なくとも 1 つの G L P - 1 C H 1 欠失ミメティボディ核酸が、P または式 (I) :

20

$$(P e p (n) - L (o) - V (p) - H (q) - C H 2 (r) - C H 3 (s)) (t)$$

[式中、P は生物活性 G L P - 1 ペプチド、バリエーションまたは誘導体の少なくとも 1 つであり、L は少なくとも 1 つのリンカー配列であり、これはミメティボディに選択的な配向および結合特性を持つことを可能にすることにより構造的柔軟性を提供するポリペプチドであることができ、V は免疫グロブリン可変領域の C - 末端の少なくとも一部であり、H は免疫グロブリン可変ヒンジ領域の少なくとも部分であり、C H 2 は免疫グロブリン C H 2 定常領域の少なくとも部分であり、C H 3 は免疫グロブリン C H 3 定常領域の少なくとも部分であり、n は 1 ~ 1 0 の整数であり、そして o、p、q、r、s および t は独立して 0 ~ 1 0 の整数であることができる]

30

に従うポリペプチドをコードする少なくとも 1 つのポリヌクレオチドを含んでなる上記方法。

【請求項 4】

細胞、組織、器官または動物の G L P - 1 肥満関連状態を診断または処置する方法であって、有効量の G L P - 1 アゴニストまたはミメティボディ核酸、ポリペプチドまたは抗体の少なくとも 1 つを含んでなる組成物を、該細胞、組織、器官または動物に接触または投与することを含んでなり、ここで該少なくとも 1 つの G L P - 1 C H 1 欠失ミメティボディが配列番号 2 または 4 の連続するすべてのアミノ酸を含んでなる上記方法。

【請求項 5】

細胞、組織、器官または動物の G L P - 1 肥満関連状態を診断または処置する方法であって、有効量の G L P - 1 アゴニストまたはミメティボディ核酸、ポリペプチドまたは抗体の少なくとも 1 つを含んでなる組成物を、該細胞、組織、器官または動物に接触または投与することを含んでなり、ここで該少なくとも 1 つの G L P - 1 C H 1 欠失ミメティボディまたはアゴニストが少なくとも 1 つの配列番号 7 ~ 1 4 の連続するすべてのアミノ酸を含んでなる上記方法。

40

【請求項 6】

細胞、組織、器官または動物の G L P - 1 肥満関連状態を診断または処置する方法であって、有効量の G L P - 1 アゴニストまたはミメティボディ核酸、ポリペプチドまたは抗体の少なくとも 1 つを含んでなる組成物を、該細胞、組織、器官または動物に接触または

50

投与することを含んでなり、ここで該少なくとも1つのGLP-1 CH1欠失ミメティボディが、Pまたは式(I)：

(Pep(n) - L(o) - V(p) - H(q) - CH2(r) - CH3(s))(t)

[式中、Pは配列番号1および6から選択される少なくとも1つの生物活性GLP-1ペプチドであり、LはGS, GGS, GGGs(配列番号:16), GSGGGs(配列番号:17), GGS GGGs(配列番号:18), GGS GGGs GG(配列番号:19)およびGGGS GGGs GG(配列番号:20)から選択され、VはGTLVTVSS(配列番号:21), GTLVAVSS(配列番号:22), GTAVTVSS(配列番号:23), TVSS(配列番号:24)およびAVSS(配列番号:25)から選択され、HはEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP(配列番号:26)であり、CH2はSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAK(配列番号:43)であり、CH3はGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(配列番号:44)であり、nは1~10の整数であり、そしてo、p、q、r、sおよびtは独立して0~10の整数であることができる]

に従うポリペプチドを含んでなる上記方法。

【請求項7】

細胞、組織、器官または動物のGLP-1肥満関連状態を診断または処置する方法であって、有効量のGLP-1アゴニストまたはミメティボディ核酸、ポリペプチドまたは抗体の少なくとも1つを含んでなる組成物を、該細胞、組織、器官または動物に接触または投与することを含んでなり、ここで該少なくとも1つのGLP-1 CH1欠失ミメティボディが、Pまたは式(I)：

(Pep(n) - L(o) - V(p) - H(q) - CH2(r) - CH3(s))(t)

[式中、Pは配列番号6の少なくとも1つの生物活性GLP-1ペプチドであり、LはGS, GGS, GGGs(配列番号:16), GSGGGs(配列番号:17), GGS GGGs(配列番号:18), GGS GGGs GG(配列番号:19)およびGGGS GGGs GG(配列番号:20)から選択され、VはGTLVTVSS(配列番号:21), GTLVAVSS(配列番号:22), GTAVTVSS(配列番号:23), TVSS(配列番号:24)およびAVSS(配列番号:25)から選択され、HはESKYGPPCPSCPAPEFLGGP(配列番号:27)であり、CH2はSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAK(配列番号:45)であり、CH3はGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(配列番号:46)であり、nは1~10の整数であり、そしてo、p、q、r、sおよびtは独立して0~10の整数であることができる]

に従うポリペプチドを含んでなる上記方法。

【請求項8】

細胞、組織、器官または動物のGLP-1肥満関連状態を診断または処置する方法であって、有効量のGLP-1アゴニストまたはミメティボディ核酸、ポリペプチドまたは抗体の少なくとも1つを含んでなる組成物を、該細胞、組織、器官または動物に接触または投与することを含んでなり、ここで該少なくとも1つのGLP-1 CH1欠失ミメティボディが、Pまたは式(I)：

(Pep(n) - L(o) - V(p) - H(q) - CH2(r) - CH3(s))(t)

[式中、Pは配列番号6の少なくとも1つの生物活性GLP-1ペプチドであり、Lは

10

20

30

40

50

GS, GGS, GGGs (配列番号: 16), GSGGGs (配列番号: 17), GGS
GGGS (配列番号: 18), GGS GGGs GG (配列番号: 19) および GGGs G
GGs GG (配列番号: 20) から選択され、VはGTLVTVSS (配列番号: 21)
, GTLVAVSS (配列番号: 22), GTAVTVSS (配列番号: 23), TVSS
(配列番号: 24) および AVSS (配列番号: 25) から選択され、HはESKYG
PPCPPCPAPEAAGGP (配列番号: 28) であり、CH2はSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
GLPSSIEKTKISKAK (配列番号: 45) であり、CH3はGQPREPQVY
TLPSPSEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号: 46) であり、nは1~10の整数
であり、そしてo、p、q、r、sおよびtは独立して0~10の整数であることが
できる]

10

に従うポリペプチドを含んでなる上記方法。

【請求項9】

細胞、組織、器官または動物のGLP-1肥満関連状態を診断または処置する方法であ
って、有効量のGLP-1アゴニストまたはミメティポディ核酸、ポリペプチドまたは抗
体の少なくとも1つを含んでなる組成物を、該細胞、組織、器官または動物に接触または
投与することを含んでなり、ここで該少なくとも1つのGLP-1 CH1欠失ミメティ
ポディが、Pまたは式(I):

20

(Pep(n) - L(o) - V(p) - H(q) - CH2(r) - CH3(s))(t)

[式中、Pは生物活性GLP-1ペプチド、バリエーションまたは誘導体の少なくとも1つ
であり、Lは少なくとも1つのリンカー配列であり、これはミメティポディに選択的な配
向および結合特性を持つことを可能にすることにより構造的柔軟性を提供するポリペプチ
ドであることができ、Vは免疫グロブリン可変領域のC-末端の少なくとも一部分であり
、Hは免疫グロブリン可変ヒンジ領域の少なくとも一部分であり、CH2はSVFLFPP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTKISKAK (配列番号: 43) であり、CH3はGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号: 44) であり、nは1~10の整
数であり、そしてo、p、q、r、sおよびtは独立して0~10の整数であることが
できる]

30

に従うポリペプチドを含んでなる上記方法。

【請求項10】

細胞、組織、器官または動物のGLP-1肥満関連状態を診断または処置する方法であ
って、有効量のGLP-1アゴニストまたはミメティポディ核酸、ポリペプチドまたは抗
体の少なくとも1つを含んでなる組成物を、該細胞、組織、器官または動物に接触または
投与することを含んでなり、ここで該少なくとも1つのGLP-1 CH1欠失ミメティ
ポディが、Pまたは式(I):

40

(Pep(n) - L(o) - V(p) - H(q) - CH2(r) - CH3(s))(t)

[式中、Pは生物活性GLP-1ペプチド、バリエーションまたは誘導体の少なくとも1つ
であり、Lは少なくとも1つのリンカー配列であり、これはミメティポディに選択的な配
向および結合特性を持つことを可能にすることにより構造的柔軟性を提供するポリペプチ
ドであることができ、Vは免疫グロブリン可変領域のC-末端の少なくとも一部分であり
、Hは免疫グロブリン可変ヒンジ領域の少なくとも一部分であり、CH2はSVFLFPP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN

50

KGLPSSIEKTISKAK (配列番号: 45) であり、CH3はGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (配列番号: 46) であり、nは1~10の整数であり、そしてo、p、q、r、sおよびtは独立して0~10の整数であることができる]

に従うポリペプチドを含んでなる上記方法。

【請求項11】

細胞、組織、器官または動物のGLP-1肥満関連状態を診断または処置する方法であって、有効量のGLP-1アゴニストまたはミメティポディ核酸、ポリペプチドまたは抗体の少なくとも1つを含んでなる組成物を、該細胞、組織、器官または動物に接触または投与することを含んでなり、ここで該少なくとも1つのGLP-1 CH1欠失ミメティポディが、Pまたは式(I):

$(Pep(n) - L(o) - V(p) - H(q) - CH2(r) - CH3(s))(t)$

[式中、Pは配列番号6の少なくとも1つの生物活性GLP-1ペプチドであり、Lは少なくとも1つのリンカー配列であり、これはミメティポディに選択的な配向および結合特性を持つことを可能にすることにより構造的柔軟性を提供するポリペプチドであることができ、Vは免疫グロブリン可変領域のC-末端の少なくとも一部分であり、Hは免疫グロブリン可変ヒンジ領域の少なくとも一部分であり、CH2は免疫グロブリンCH2定常領域の少なくとも一部分であり、CH3は免疫グロブリンCH3定常領域の少なくとも一部分であり、nは1~10の整数であり、そしてo、p、q、r、sおよびtは独立して0~10の整数であることができる]

に従うポリペプチドを含んでなる上記方法。

【請求項12】

細胞、組織、器官または動物のGLP-1肥満関連状態を診断または処置する方法であって、有効量のGLP-1アゴニストまたはミメティポディ核酸、ポリペプチドまたは抗体の少なくとも1つを含んでなる組成物を、該細胞、組織、器官または動物に接触または投与することを含んでなり、ここで該少なくとも1つのGLP-1 CH1欠失ミメティポディが、Pまたは式(I):

$(Pep(n) - L(o) - V(p) - H(q) - CH2(r) - CH3(s))(t)$

[式中、Pは生物活性GLP-1ペプチド、バリエーションまたは誘導体の少なくとも1つであり、LはGS, GGS, GGS (配列番号: 16), GSGGS (配列番号: 17), GSGGS (配列番号: 18), GSGGS (配列番号: 19) およびGSGGS (配列番号: 20) から選択され、Vは免疫グロブリン可変領域のC-末端の少なくとも一部分であり、Hは免疫グロブリン可変ヒンジ領域の少なくとも一部分であり、CH2は免疫グロブリンCH2定常領域の少なくとも一部分であり、CH3は免疫グロブリンCH3定常領域の少なくとも一部分であり、nは1~10の整数であり、そしてo、p、q、r、sおよびtは独立して0~10の整数であることができる]

に従うポリペプチドを含んでなる上記方法。

【請求項13】

細胞、組織、器官または動物のGLP-1肥満関連状態を診断または処置する方法であって、有効量のGLP-1アゴニストまたはミメティポディ核酸、ポリペプチドまたは抗体の少なくとも1つを含んでなる組成物を、該細胞、組織、器官または動物に接触または投与することを含んでなり、ここで該少なくとも1つのGLP-1 CH1欠失ミメティポディが、Pまたは式(I):

$(Pep(n) - L(o) - V(p) - H(q) - CH2(r) - CH3(s))(t)$

[式中、Pは生物活性GLP-1ペプチド、バリエーションまたは誘導体の少なくとも1つであり、Lは少なくとも1つのリンカー配列であり、これはミメティポディに選択的な配向および結合特性を持つことを可能にすることにより構造的柔軟性を提供するポリペプチドであることができ、VはGTLVTVSS (配列番号: 21), GTLVAVSS (配

10

20

30

40

50

列番号：22)，G T A V T V S S（配列番号：23），T V S S（配列番号：24）およびA V S S（配列番号：25）から選択され、Hは免疫グロブリン可変ヒンジ領域の少なくとも部分であり、C H 2は免疫グロブリンC H 2定常領域の少なくとも部分であり、C H 3は免疫グロブリンC H 3定常領域の少なくとも部分であり、nは1～10の整数であり、そしてo、p、q、r、sおよびtは独立して0～10の整数であることができる]

に従うポリペプチドを含んでなる上記方法。

【請求項14】

細胞、組織、器官または動物のG L P - 1肥満関連状態を診断または処置する方法であって、有効量のG L P - 1アゴニストまたはミメティポディ核酸、ポリペプチドまたは抗体の少なくとも1つを含んでなる組成物を、該細胞、組織、器官または動物に接触または投与することを含んでなり、ここで該少なくとも1つのG L P - 1 C H 1欠失ミメティポディが、Pまたは式(I)：

(P e p (n) - L (o) - V (p) - H (q) - C H 2 (r) - C H 3 (s)) (t)

[式中、Pは生物活性G L P - 1ペプチド、バリエーションまたは誘導体の少なくとも1つであり、Lは少なくとも1つのリンカー配列であり、これはミメティポディに選択的な配向および結合特性を持つことを可能にすることにより構造的柔軟性を提供するポリペプチドであることができ、Vは免疫グロブリン可変領域のC - 末端の少なくとも一部分であり、HはE P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P（配列番号：26），E S K Y G P P C P S C P A P E F L G G P（配列番号：27）およびE S K Y G P P C P P C P A P E A A G G P（配列番号：28）から選択され、C H 2は免疫グロブリンC H 2定常領域の少なくとも部分であり、C H 3は免疫グロブリンC H 3定常領域の少なくとも部分であり、nは1～10の整数であり、そしてo、p、q、r、sおよびtは独立して0～10の整数であることができる]

に従うポリペプチドを含んでなる上記方法。

【請求項15】

細胞、組織、器官または動物のG L P - 1肥満関連状態を診断または処置する方法であって、有効量のG L P - 1アゴニストまたはミメティポディ核酸、ポリペプチドまたは抗体の少なくとも1つを含んでなる組成物を、該細胞、組織、器官または動物に接触または投与することを含んでなり、ここで該少なくとも1つのG L P - 1 C H 1欠失ミメティポディが、Pまたは式(I)：

(P e p (n) - L (o) - V (p) - H (q) - C H 2 (r) - C H 3 (s)) (t)

[式中、Pは生物活性G L P - 1ペプチド、バリエーションまたは誘導体の少なくとも1つであり、Lは少なくとも1つのリンカー配列であり、これはミメティポディに選択的な配向および結合特性を持つことを可能にすることにより構造的柔軟性を提供するポリペプチドであることができ、Vは免疫グロブリン可変領域のC - 末端の少なくとも一部分であり、HはE P K S A D K T H T C P P C P A P E A A G G P（配列番号：29），E P K S A D K T H T C P P C P A P E L A G G P（配列番号：30），E P K S A D K T H T C P P C P A P E A L G G P（配列番号：31），E P K S A D K T H T C P P C P A P E L E G G P（配列番号：32），E P K S S D K T H T C P P C P A P E F L G G P（配列番号：33），E P K S A D K T H A C P P C P A P E L L G G P（配列番号：34），E P K S A D K A H T C P P C P A P E L L G G P（配列番号：35），およびE P K S A D K T H T C P P C P A P E L L G G P（配列番号：36），A D K T H T C P P C P A P E L L G G P（配列番号：37），T H T C P P C P A P E L L G G P（配列番号：38），E S K Y G P P C P S C P A P E A A G G P（配列番号：39），E S K Y G P P C P P C P A P E L L G G P（配列番号：40），C P P C P A P E L L G G P（配列番号：41）およびC P P C P A P E A A G G P（配列番号：42）から選択され、C H 2は免疫グロブリンC H 2定常領域の少なくとも部分であり、C H 3は免疫グロブリンC H 3定常領域の少なくとも部分であり、nは1～10の整数であり、そしてo、p、q、r、sおよびtは独立して0～10の整数であることができる]

10

20

30

40

50

に従うポリペプチドを含んでなる上記方法。

【請求項 16】

細胞、組織、器官または動物の G L P - 1 肥満関連状態を診断または処置する方法であって、有効量の G L P - 1 アゴニストまたはミメティポディ核酸、ポリペプチドまたは抗体の少なくとも 1 つを含んでなる組成物を、該細胞、組織、器官または動物に接触または投与することを含んでなり、ここで該少なくとも 1 つの G L P - 1 C H 1 欠失ミメティポディが、P または式 (I) :

(P e p (n) - L (o) - V (p) - H (q) - C H 2 (r) - C H 3 (s)) (t)

[式中、P は生物活性 G L P - 1 ペプチド、バリエーションまたは誘導体の少なくとも 1 つであり、L は少なくとも 1 つのリンカー配列であり、これはミメティポディに選択的な配向および結合特性を持つことを可能にすることにより構造的柔軟性を提供するポリペプチドであることができ、V は免疫グロブリン可変領域の C - 末端の少なくとも一部分であり、H は免疫グロブリン可変ヒンジ領域の少なくとも一部分であり、C H 2 は免疫グロブリン C H 2 定常領域の少なくとも一部分であり、C H 3 は免疫グロブリン C H 3 定常領域の少なくとも一部分であり、n は 1 ~ 10 の整数であり、そして o、p、q、r、s および t は独立して 0 ~ 10 の整数であることができる]

に従うポリペプチドを含んでなる上記方法。

【請求項 17】

上記ポリペプチドが式 I の少なくとも 1 つの P ポリペプチドの少なくとも 1 つの活性を有する、請求項 1 に記載の G L P - 1 C H 1 欠失ミメティポディ核酸または G L P - 1 C H 1 欠失ミメティポディポリペプチド。

【請求項 18】

上記方法が、治療に有効な量の少なくとも 1 つの化合物を含んでなる少なくとも 1 つの組成物、脂肪低減薬、脂肪代謝薬、脂肪吸収薬、糖尿病薬、インスリン代謝関連薬、検出可能な標識もしくはレポーター、T N F アントゴニスト、抗感染薬、心血管 (C V) 系薬、中枢神経系 (C N S) 薬、自律神経系 (A N S) 薬、気道薬、胃腸管 (G I) 薬、ホルモン薬、流体もしくは電解質バランスのための薬剤、血液製剤、抗腫瘍薬、免疫調節薬、目、耳もしくは鼻の薬、局所薬、栄養剤、サイトカインまたはサイトカインアンタゴニストから選択される少なくとも 1 つの組成物またはポリペプチドを投与することをさらに含んでなる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 19】

上記の有効量が、上記細胞、組織、器官または動物 1 キログラムあたり 0 . 0 0 1 - 5 0 m g の G L P - 1 C H 1 欠失ミメティポディまたはアゴニスト、0 . 0 0 0 0 0 1 ~ 5 0 0 m g の該 G L P - 1 C H 1 欠失ミメティポディまたはアゴニスト、または 0 . 0 0 0 1 ~ 1 0 0 μ g の該 G L P - 1 C H 1 欠失ミメティポディまたはアゴニスト核酸、または均等な濃度である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 20】

上記接触または上記投与が、非経口、皮下、筋肉内、静脈内、網内、気管支内、腹内、嚢内、軟骨内、洞内、腔内、小脳内、脳室内、結腸内、頸管内、胃内、肝臓内、心筋内、骨内、骨盤内、心膜内、腹腔内、胸膜腔内、前立腺内、肺内、直腸内、腎臓内、網膜内、脊椎内、滑液包内、胸内、子宮内、膀胱内、病変内局所、ポーラス、膺、直腸、頬内、舌下、鼻内または経皮から選択される少なくとも 1 つの様式による、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 21】

上記 G L P - 1 関連状態が代謝障害または過食障害である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 22】

上記代謝障害が高血糖症である請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

上記代謝障害が糖尿病である請求項 21 に記載の方法。

【請求項 24】

10

20

30

40

50

上記有効量が、処置が必要な動物の血中グルコースレベルを下げることにより該代謝障害を処置する、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 5】

上記有効量が、インスリン生産細胞からのインスリンの分泌を上げることにより該代謝障害を処置する、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 6】

上記有効量が、インスリン生産細胞のアポトーシスを防止することにより該代謝障害を処置する、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 7】

上記有効量が、インスリン生産細胞の増殖を上げることにより該代謝障害を処置する、請求項 2 1 に記載の方法。

10

【請求項 2 8】

上記 G L P - 1 関連状態が糖尿病に関連する請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 9】

上記 G L P - 1 ミメティポディが配列番号 6 9 のアミノ酸配列を含んでなる、請求項 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

優先権

20

本出願は、引用により全部、本明細書に編入する 2 0 0 5 年 1 2 月 2 2 日に出願された特許文献 1 の優先権を主張する。

発明の分野

本発明は、哺乳動物の G L P - 1 ミメティポディ、生物学的に活性なタンパク質に特異的な特定部分およびバリエーション、フラグメントまたはリガンド、G L P - 1 ミメティポディをコードする核酸および相補的核酸、宿主細胞、ならびに肥満関連障害を処置するための治療用製剤、投与およびデバイスを含むそれらの作成法および使用方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

関連技術

30

組換えタンパク質は新興している治療薬の種類である。そのような組換え治療薬は、タンパク質製剤および化学的修飾に進歩を生んだ。そのような修飾は、血清半減期を上昇させ（例えばタンパク質分解酵素に対してそれらの暴露を遮断することにより）、生物学的活性を強化し、または望ましくない副作用を減少させることによるように、治療用タンパク質の治療的用途を潜在的に強化することができる。1つのそのような修飾は、エンテラセプト（entercept）のようなレセプタータンパク質に融合した免疫グロブリンフラグメントの使用である。また治療用タンパク質は、より長い半減期を提供するために、あるいは F c 受容体結合、プロテイン A 結合および補体固定化のような機能を包含するために、抗体の F c ドメインを使用して構築されてきた。

【0 0 0 3】

40

肥満は、身体のサイズに比して過剰な脂肪量が現れる慢性疾患である。およそ 1 / 3 の米国人がボディマス指数に基づき太り過ぎであり（BMI > 2 5 k g / m ²）、そして肥満は流行病の規模に達しつつあると認識されている。肥満が健康を脅かす重要性は、肥満が 2 型糖尿病、心血管疾患、骨関節症および睡眠時無呼吸のような他の疾患の元となる原因またはリスクファクターであるという事実により強調される。体重がわずかでも減少すれば（初期の体重の 5 ~ 1 0 %）、肥満関連疾患を発症するリスクファクターはかなり減少し、そして肥満、アテローム異常脂質血症、血圧上昇およびインスリン耐性を特徴とするメタボリックシンドローム状態を改善することができる。

【0 0 0 4】

肥満を処置する必要性は広く認識され、そして成功裏の治療を開発するためにすべての

50

大手製薬会社で研究がなされている。肥満は：1) ライフサイクルの変化、2) 体重の低下にゆるやかな効果を有し、そして重要な副作用を伴う現在市場に出されている3つの薬剤(フェントラミン(Phentramine)、オルリセタ(Orlistat)およびシブトラミン(Sibutramine))、および3) 手術により現在は処置されている。

【0005】

グルカゴン様ペプチド-1(GLP-1)は、栄養物の摂取にตอบสนองして腸の内分泌細胞から分泌される30個のアミノ酸ホルモンである。GLP-1は循環を移動し、そして膵臓上のGLP-1受容体に結合し、インスリン分泌に上昇をもたらす。さらにGLP-1は循環に放出されるグルコースの量を減少する胃排出能を下げる。これらの作用は血中グルコースレベルを下げることに組合わさる。このようにGLP-1の生物活性のメカニズムは、2型糖尿病の処置に魅力的な治療薬となり得ることが示唆される。またGLP-1は肥満の処置にも有望である。幾つかの研究では、末梢または脳室内(ICV)のいずれかに投与されたGLP-1が動物モデルにおいて食物摂取を下げることを示された。肥満した糖尿病患者を対象として5日間、連続してGLP-1を送達するヒトでの実験では、食物摂取の減少および体重に減少を生じた。しかしGLP-1はその極端に短い半減期(T_{1/2}~1-2分)により治療薬として開発されていない。これはジペプチジルプロテアーゼ(DPP-IV)により急速に分解され、これがペプチドの長さをN-末端で2アミノ酸の長さまで下げ、そしてそれを不活性化する。

10

【0006】

現在開発中、または市場に出されている幾つかのGLP-1類似体がある。Byetta(商標)はアミリン(Amylin)およびイーライリリー(Eli Lilly)により開発され、最近市場に出されたGLP-1類似体である。これはメキシコドクトカゲの唾液から初めて同定され、そしてGLP-1と53%同一である。Byetta(商標)はDPP-IVに耐性であるが、それでもその短いインビボ半減期(30分未満)により、1日2回の食事前投与が必要である。Byetta(商標)が2型糖尿病の治療として評価された臨床試験中、HbA_{1c}レベルは処置後82週間、約1%下がった。興味深いことに、Byetta(商標)を摂取した患者は試験の過程で体重に持続的な減少があり(5~10ポンド)、GLP-1類似体が肥満の処置に可能性を有することを支持する。リラグルチド(Liraglutide)はノボノルディスク(Novo Nordisk)により開発された脂質化GLP-1類似体であり、そして現在、臨床試験中である。この分子の薬物動態学に基づき、リラグルチドは1日に1回投与されることが想定される。1週間または1カ月に1回投与できるように、増大した半減期を持つGLP-1療法は開発中の他のGLP-1ペプチドに優る重要な利点を有する。

20

30

【0007】

したがって1もしくは複数のこれらおよび当該技術分野で知られている他の問題を克服するGLP-1治療用タンパク質の改善され、かつ/または修飾された変更体を提供する必要性が存在する。ミメティボディ技術は、ペプチド治療薬に新規な送達プラットフォームを提供する。GLP-1ミメティボディは徐放性の様式でGLP-1を送達する手段を提供することができ、現在開発中のGLP-1ペプチドに対する改善を提供する。さらにその二量体構造およびその組織分布特性に基づき、GLP-1ミメティボディはインスリン分泌、細胞保護および食物摂取に関して区別可能な特徴を有することができた。

40

【参考文献】

【0008】

【特許文献1】米国特許仮出願第60/752,826号明細書

【発明の開示】

【0009】

発明の要約

本発明は、当該技術分野で知られている事柄と組み合わせ、本明細書に記載し、かつ/または本明細書で可能となるような、修飾された免疫グロブリン、その分解産物および

50

他の特定部分およびそのバリエーションを含むヒトのGLP-1ミメティボディ、ならびにミメティボディ組成物、コードまたは相補的核酸、ベクター、宿主細胞、組成物、製剤、デバイス、トランスジェニック動物、トランスジェニック植物、およびそれらの作成法および使用法を提供する。

【0010】

ミメティボディ(商標)技術は、ペプチド治療薬に新たな送達プラットフォームを提供する。GLP-1ミメティボディ(商標)は、GLP-1ペプチドを徐放性様式で送達する手段を提供し、現在開発中のGLP-1ペプチドに優る改善を提供する。Byetta(商標)は、たとえ分子の半減期が比較的短くても持続的な体重の減少を表す。徐放性の薬物動態学プロファイルを持つGLP-1類似体は、食物摂取および体重を大幅に減少させる可能性を有する。さらにGLP-1ミメティボディ(商標)は、開発中または市場に出ている他のGLP-1類似体とは極めて異なる。これはペプチドというよりもむしろ大きなタンパク質であり、そして分子あたり2つのペプチドを有する。そのサイズおよび二量体構造に基づき、GLP-1ミメティボディ(商標)は、他の分子に対して区別することができる特徴を有する。例えば二量体分子によるGLP-1受容体の活性化は、単量体分子とは異なり、シグナリング経路における差異を生じることが可能である。加えて、分子サイズにより大変異なる組織分布プロファイルを生じることが可能であり、これは異なる薬物動態学的特性をもたらすことができる。

10

【0011】

GLP-1ペプチドを包含しているミメティボディ(商標)構築物は、肥満している個体の体重を減少する新規治療を提供する。治療効力と相関することが知られている動物モデルでは、CNT0736、GLP-1ミメティボディ(商標)が食物摂取および脂肪量の減少により体重を減少させる。

20

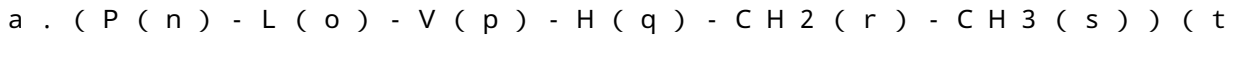
【0012】

また本発明は、本明細書に記載し、かつ/または当該技術分野で知られているような少なくとも1つの単離されたGLP-1ミメティボディまたは特定部分またはバリエーションも提供する。GLP-1ミメティボディは任意選択により、少なくとも1つのGLP-1治療用ペプチド(P)に直接連結した任意選択のリンカー配列(L)に直接連結した少なくとも1つの部分的可変領域(V)に直接連結した少なくとも1つのヒンジ領域またはそのフラグメント(H)の少なくとも一部に直接連結した少なくとも1つのCH2領域に直接連結した少なくとも1つのCH3領域を含んでなることができる。

30

【0013】

好適な態様である1対のCH3-CH2-ヒンジ-部分V領域配列-リンカー-治療用ペプチド配列では、この対は場合により例えば限定するわけではないが少なくとも1つのCys-Cysジスルフィド結合または少なくとも1つのCH4または他の免疫グロブリン配列のような会合もしくは共有結合により連結されている。1つの態様では、GLP-1ミメティボディは式(I)：



[式中、Pは生物活性GLP-1ペプチド、バリエーションまたは誘導体の少なくとも1つであり、Lは少なくとも1つのリンカー配列であり、これはミメティボディに選択的な配向および結合特性(alternative orientations and binding properties)を持つことを可能にすることにより構造的柔軟性を提供するポリペプチドであることができ、Vは免疫グロブリン可変領域のC-末端の少なくとも一部分であり、Hは免疫グロブリン可変ヒンジ領域の少なくとも一部分であり、CH2は免疫グロブリンCH2定常領域の少なくとも一部分であり、CH3は免疫グロブリンCH3定常領域の少なくとも一部分であり、nは1~10の整数であり、そしてo、p、q、r、sおよびtは独立して0~10の整数であることができる]を含んでなり、免疫グロブリン分子の種々の型、例えば限定するわけではないがIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgM、IgD、IgE等またはその任意のサブクラ

40

50

ス等、またはそれらの組み合わせを模する。

【0014】

抗体配列の可変領域は、限定するわけではないが表1に記載するような少なくとも1つの配列番号47～55の少なくとも一部分、またはそのフラグメントであることができ、さらに2004年6月24日に出願され、そして2005年1月20日に公開された国際公開WO05/05604号明細書(PCTUS04/19898)の図1-9に記載されているように、配列番号1-9に対応して場合により置換、挿入または欠失の少なくとも1つを含んでなることができる。CH2、CH3およびヒンジ領域は、限定するわけではないが表1に記載するような少なくとも1つの配列番号56～64の少なくとも一部分、またはそのフラグメントであることができ、さらに2004年6月24日に出願され、

10

【0015】

すなわち本発明のGLP-1ミメティポディは、その本来の特性および機能を持つ抗体または免疫グロブリン構造または機能の少なくとも部分を模すると同時に、GLP-1治療用ペプチドおよびその本来の、または獲得した*in vitro*、*in vivo*または*in situ*特性または活性を提供する。抗体の種々の部分および本発明のGLP-1ミメティポディの治療用ペプチド部分は、当該技術分野で知られている事柄と組み合わせる本明細書に記載するように変動させることができる。

20

【0016】

また本発明は、本明細書に記載し、または当該技術分野で知られているような限定するわけではないが少なくとも1つの生物活性GLP-1ペプチドまたは式(I)のP部分に対応するポリペプチドの既知の生物学的活性のような、少なくとも1つの活性を有する少なくとも1つの単離されたGLP-1ミメティポディまたは特定部分またはバリエーションを提供する。

【0017】

1つの観点では、本発明は配列番号1の、または場合により本明細書に記載するような、または当該技術分野で知られているような任意の1もしくは複数の置換、欠失または挿入を含む配列番号1の少なくとも1つのポリペプチド配列を含んでなる単離されたヒトのGLP-1ミメティポディの少なくとも1つを提供する。別の観点では本発明のGLP-1ミメティポディまたは特定部分またはバリエーションの少なくとも1つは、式(I)のミメティポディのP部分に対応する少なくとも1つのGLP-1ペプチドまたはポリペプチドの、少なくとも1つのリガンドの1～3個から全アミノ酸配列を含んでなる少なくとも1つのエピトープ、例えば限定するわけではないがGLP-1受容体、そのフラグメントへの結合を模し、ここでリガンドは配列番号1の少なくとも一部分、または場合により本明細書に記載するか、または当該技術分野で知られているような1もしくは複数の置換、欠失もしくは挿入を含む配列番号1の少なくとも一部分に結合する。少なくとも1つのGLP-1ミメティポディは、場合により少なくとも 10^{-9} M、少なくとも 10^{-10} M、少なくとも 10^{-11} Mまたは少なくとも 10^{-12} Mの親和性でGLP-1受容体と結合

30

40

【0018】

本発明はさらに、本発明の少なくとも1つのGLP-1ミメティポディに対する少なくとも1つの抗-イディオタイプ抗体を提供する。抗-イディオタイプ抗体またはフラグメントは、本発明の少なくとも1つのGLP-1ミメティポディに特異的に結合する。抗イディオタイプ抗体には、限定するわけではないが、本発明の少なくとも1つのGLP-1ミメティポディのGLP-1リガンド結合領域に競合的に結合する重鎖もしくは軽鎖の少なくとも1つの相補性決定領域(CDR)またはそれらのリガンド結合部分、重鎖もしくは

50

は軽鎖可変領域、重鎖もしくは軽鎖定常領域、骨格領域、またはそれらの任意の部分のような免疫グロブリン分子の少なくとも一部分を含んでなる分子を含有する任意のタンパク質またはペプチドを含む。本発明のそのようなイディオタイプ抗体は、限定するわけではないがヒト、マウス、ウサギ、ラット、齧歯類、霊長類等のような任意の哺乳動物を含むか、またはそれらに由来することができる。

【0019】

本発明は1つの観点において、少なくとも1つのGLP-1ミメティボディまたはGLP-1ミメティボディ抗-イディオタイプ抗体、あるいは少なくとも1つの特定した配列、それらのドメイン、部分またはバリエーションを含んで成る特定部分またはバリエーションをコードするポリヌクレオチドを含んでなる、それと相補的な、有意な同一性を有する、またはハイブリダイズする単離された核酸分子を提供する。本発明はさらに、少なくとも1つの該単離されたGLP-1ミメティボディ、またはGLP-1ミメティボディ抗-イディオタイプ抗体をコードする核酸分子を含んで成る組換えベクター、そのような核酸および/または組換えベクターを含む宿主細胞、ならびにそのようなGLP-1ミメティボディまたはGLP-1ミメティボディ抗-イディオタイプ抗体核酸、ベクターおよび/または宿主細胞の作成法および/または使用方法を提供する。

10

【0020】

また提供するのは、少なくとも1つの単離された哺乳動物のGLP-1ミメティボディまたはGLP-1ミメティボディ抗-イディオタイプ抗体；単離された核酸を含んでなる単離された核酸ベクター、および/または単離された核酸を含んでなる原核もしくは真核宿主細胞である。宿主細胞は、場合によりCOS-1、COS-7、HEK293、BHK21、CHO、BSC-1、HepG2、653、SP2/0、293、HeLa、骨髄腫もしくはリンパ腫細胞、またはそれらの任意の誘導体、不死化または形質転換した細胞から選択される少なくとも1つであることができる。

20

【0021】

また本発明は、少なくとも1つのGLP-1ミメティボディまたはGLP-1ミメティボディ抗イディオタイプ抗体、または特定部分またはバリエーションを宿主細胞中で発現させる少なくとも1つの方法も提供し、この方法は本明細書に記載し、かつ/または当該技術分野で知られている宿主細胞を、少なくとも1つのGLP-1ミメティボディまたはGLP-1ミメティボディ抗イディオタイプ抗体、または特定部分またはバリエーションが検出可能かつ/または回収可能な量で発現される条件下で培養することを含んで成る。また本発明で提供されるのは、GLP-1ミメティボディまたはGLP-1ミメティボディ抗イディオタイプ抗体が検出可能または回収可能な量で発現されるように、*in vitro*、*in vivo*もしくは*in situ*の条件下で、GLP-1ミメティボディまたはGLP-1ミメティボディ抗イディオタイプ抗体をコードする核酸を翻訳することを含んでなる、少なくとも1つのGLP-1ミメティボディまたはGLP-1ミメティボディ抗イディオタイプ抗体の生産法である。

30

【0022】

また提供するのは本発明の少なくとも1つの単離されたヒトのGLP-1ミメティボディまたはGLP-1抗-イディオタイプ抗体を生産する方法であり、この方法は回収可能な量でGLP-1ミメティボディまたはGLP-1抗-イディオタイプ抗体を発現することができる宿主細胞またはトランスジェニック動物またはトランスジェニック植物を提供することを含んでなる。

40

【0023】

さらに本発明で提供するのは、上記方法により生産された少なくとも1つのGLP-1ミメティボディである。

【0024】

また本発明は、(a)本明細書に記載する単離されたGLP-1ミメティボディまたは特定部分またはバリエーションをコードする核酸および/またはGLP-1ミメティボディ；および(b)適切な担体もしくは希釈剤を含んで成る少なくとも1つの組成物も提供する

50

。担体もしくは希釈剤は、既知の方法に従い任意の製薬学的に許容され得るものであることができる。組成物は場合により少なくとも1つのさらなる化合物、タンパク質または組成物をさらに含むことができる。

【0025】

また提供するものは、少なくとも1つの単離されたヒトのGLP-1ミメティポディおよび少なくとも1つの製薬学的に許容され得る担体または希釈剤を含んでなる組成物である。組成物は場合により少なくとも1つの検出可能な標識もしくはレポーター、抗感染薬、糖尿病薬もしくはインスリン代謝関連薬、心血管(CV)系薬、中枢神経系(CNS)薬、自律神経系(ANS)薬、気道薬、胃腸管(GI)薬、ホルモン薬、流体もしくは電解質バランスのための薬剤、血液製剤、抗腫瘍性薬、免疫調節薬、目、耳もしくは鼻の薬、局所薬、栄養剤、TNFアンタゴニスト、抗リウマチ薬、筋弛緩剤、麻薬、非-ステロイド系抗炎症薬(NTHE)、鎮痛剤、麻酔薬、鎮静剤、局所麻酔薬、神経筋遮断薬、抗菌薬、止痒薬、コルチコステロイド、同化性ステロイド、エリスロポエチン、免疫感作、免疫グロブリン、免疫抑制剤、成長ホルモン、ホルモン代用薬、放射性薬品、抗鬱薬、抗精神病薬、刺激物質、喘息薬物療法、ベータアゴニスト、吸入ステロイド、エピネフリンもしくは類似体、サイトカインもしくはサイトカインアンタゴニストから選択される有効量の少なくとも1つの化合物またはタンパク質をさらに含んでなることができる。

10

【0026】

また本発明は、本発明に従い治療的もしくは予防的に有効な量の少なくとも1つのGLP-1ミメティポディまたは特定部分またはバリエーションを送達するための少なくとも1つの組成物、デバイスおよび/または方法も提供する。

20

【0027】

本発明はさらに、細胞、組織、器官、動物または患者における少なくとも1つのGLP-1関連状態をモジュレートまたは処置するために、かつ/または当該技術分野で知られ、かつ/または本明細書に記載するような関連状態の前、後または最中に、治療に有効量を投与するための少なくとも1つのGLP-1ミメティポディ法または組成物を提供する。

【0028】

さらに本発明は、細胞、組織、器官、動物または患者における少なくとも1つの代謝、免疫、心血管、感染性、悪性および/または神経疾患の症状をモジュレートするために、処置もしくは減少するために治療に有効な量で投与する時、かつ/または限定するわけではないが、当該技術分野で知られているような関連疾患または処置条件の前、後または最中のような多くの異なる条件下で必要に応じて、少なくとも1つのGLP-1ミメティポディ、特定部分またはバリエーションを方法または組成物を提供する。

30

【0029】

本発明はさらに、少なくとも1つの糖尿病もしくはインスリン代謝関連障害、骨および関節障害、心血管障害、歯または経口障害、皮膚学的障害、耳、鼻もしくは喉の障害、内分泌もしくは代謝障害、胃腸管障害、婦人科学的障害、肝臓もしくは胆管障害、産科学的障害、血液学的障害、免疫学的もしくはアレルギー障害、感染性疾患、筋肉骨格障害、癌性障害、神経障害、栄養障害、眼科的障害、小児科学的障害、毒性障害、精神障害、腎臓障害、肺障害または任意の他の障害の症状をモジュレートするために、処置もしくは減少するために治療に有効な量で投与する時に(例えばメルクマニユアル(Merck Manual)、第17版、メルクリサーチラボラトリーズ、メルク社(Merck and Co.)、ホワイトハウスステーション、ニュージャージー州(1999)を参照にされたい。これは引用により全部、本明細書に編入する)、限定するわけではないが当該技術分野で知られている関連疾患または処置条件の前、後または最中のような多くの異なる条件において必要に応じて、少なくとも1つのGLP-1ミメティポディ、特定部分またはバリエーションを方法または組成物に提供する。

40

【0030】

また本発明は、GLP-1関連状態を診断するために、本発明に従い少なくとも1つの

50

GLP-1ミメティボディの少なくとも1つの組成物、デバイスおよび/または送達方法も提供する。

【0031】

本発明はさらに、細胞、組織、器官、動物または患者の少なくとも1つのGLP-1関連状態を診断するための、かつ/または当該技術分野で既知であり、かつ/または本明細書に記載するような関連状態の前、後または最中に診断するための少なくとも1つのGLP-1ミメティボディ法または組成物を提供する。

【0032】

また提供するものは、(a)本発明の少なくとも1つの単離されたヒトのGLP-1ミメティボディの有効量を含んで成る組成物を、細胞、組織、器官または動物に接触または投与することを含んで成る、細胞、組織、器官または動物の疾患状態を診断または処置する方法である。この方法は場合によりさらに、0.001~50mg/(キログラムの細胞、組織、器官または動物)の有効量で、0~24時間に、1~7日間に、1~52週間に、1~24カ月の間に、1~30年の間に、またはその範囲で、またはその中の値で使用することを含んでなることができる。この方法は場合によりさらに、非経口、皮下、筋肉内、静脈内、網内、気管支内、腹内、嚢内、軟骨内、洞内、腔内、小脳内、脳室内、結腸内、頸管内、胃内、肝臓内、心筋内、骨内、骨盤内、心膜内、腹腔内、胸膜腔内、前立腺内、肺内、直腸内、腎臓内、網膜内、脊椎内、滑液包内、胸内、子宮内、膀胱内、ポラス、膣、直腸、頬内、舌下、鼻内または経皮から選択される少なくとも1つの様式による接触または投与を使用することを含んでなることができる。この方法は場合により、(a)少なくとも1つの検出可能な標識もしくはレポーター、抗感染薬、糖尿病薬もしくはインスリン代謝関連薬、心血管(CV)系薬、中枢神経系(CNS)薬、自律神経系(ANS)薬、気道薬、胃腸管(GI)薬、ホルモン薬、流体もしくは電解質バランスのための薬剤、血液製剤、抗腫瘍薬、免疫調節薬、目、耳もしくは鼻の薬、局所薬、栄養剤、TNFアンタゴニスト、抗リウマチ薬、筋弛緩剤、睡眠薬、非-ステロイド系抗炎症薬(NSAID)、鎮痛薬、麻酔薬、鎮静薬、局所麻酔薬、神経筋遮断剤、抗菌剤、止痒薬、コルチコステロイド、同化性ステロイド、エリスロポエチン、免疫感作、免疫グロブリン、免疫抑制剤、成長ホルモン、ホルモン代用薬、放射性薬品、抗鬱薬、抗精神薬、刺激物、喘息薬物療法、ベータアゴニスト、吸入型ステロイド、エピネフリンもしくは類似体、サイトカインもしくはサインカインアンタゴニストから選択される有効量の少なくとも1つの化合物またはタンパク質を含んで成る少なくとも1つの組成物を接触または投与する前に、それと同時にまたは後に投与することをさらに含んでなることができる。

10

20

30

【0033】

また本発明の少なくとも1つの単離されたヒトのGLP-1ミメティボディを含んで成る医療用デバイスも提供し、ここでこのデバイスは、非経口、皮下、筋肉内、静脈内、網内、気管支内、腹内、嚢内、軟骨内、洞内、腔内、小脳内、脳室内、結腸内、頸管内、胃内、肝臓内、心筋内、骨内、骨盤内、心膜内、腹腔内、胸膜腔内、前立腺内、肺内、直腸内、腎臓内、網膜内、脊椎内、滑液包内、胸内、子宮内、膀胱内、ポラス、膣、直腸、頬内、舌下、鼻内または経皮から選択される少なくとも1つの様式により、少なくとも1つのGLP-1ミメティボディを接触または投与するのに適している。

40

【0034】

また提供するものは、ヒトの製薬学的または診断的使用のための製品であり、これは包装材料および溶液もしくは凍結乾燥形態の本発明の少なくとも1つの単離されたヒトのGLP-1ミメティボディを含んでなる容器を含んでなる。この製品は場合により構成要素として、非経口、皮下、筋肉内、静脈内、網内、気管支内、腹内、嚢内、軟骨内、洞内、腔内、小脳内、脳室内、結腸内、頸管内、胃内、肝臓内、心筋内、骨内、骨盤内、心膜内、腹腔内、胸膜腔内、前立腺内、肺内、直腸内、腎臓内、網膜内、脊椎内、滑液包内、胸内、子宮内、膀胱内、ポラス、膣、直腸、頬内、舌下、鼻内または経皮送達デバイスまたはシステムの容器を有することを含んでなることができる。

【0035】

50

本発明は、本明細書に記載する任意の発明をさらに提供する。

【0036】

発明の説明

本発明は、単離された、組換えおよび/または合成のミメティポディまたは特定部分またはバリエーション、ならびに少なくとも1つのGLP-1ミメティポディをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドを含んでなる、組成物およびコード核酸分子を提供する。本発明のそのようなミメティポディまたは特定部分またはバリエーションは、特異的なGLP-1ミメティポディ配列、ドメイン、フラグメントおよびその特定バリエーション、ならびに治療用組成物、方法およびデバイスを含む該核酸およびミメティポディまたは特定部分またはバリエーションの作成法および使用法も提供する。

10

【0037】

また本発明は本明細書に記載し、かつ/または当該技術分野で既知の単離されたGLP-1ミメティポディまたは特定部分またはバリエーションの少なくとも1つも提供する。GLP-1ミメティポディは任意選択により、少なくとも1つのGLP-1療用ペプチド(P)に直接連結した任意選択のリンカー配列(L)に直接連結した少なくとも1つの部分的可変領域(V)に直接連結した少なくとも1つのヒンジ領域またはそのフラグメント(H)に直接連結した少なくとも1つのCH₂領域に直接連結した少なくとも1つのCH₃領域を含んでなることができる。

【0038】

好適な態様では、GLP-1ミメティポディは式(I)：

20

(I) (P(n) - L(o) - V(p) - H(q) - CH₂(r) - CH₃(s)) (t)

[式中、Pは少なくとも1つの生物活性GLP-1ポリペプチドであり、Lは少なくとも1つのリンカー配列であり、これはミメティポディに選択的な配向および結合特性を持つことを可能にすることにより構造的柔軟性を提供するポリペプチドであることができ、Vは免疫グロブリン可変領域のC-末端の少なくとも一部分であり、Hは免疫グロブリン可変ヒンジ領域の少なくとも一部分であり、CH₂は免疫グロブリンCH₂定常領域の少なくとも一部分であり、CH₃は免疫グロブリンCH₃定常領域の少なくとも一部分であり、m、n、o、p、q、r、sおよびtは独立して0~10を含むその範囲の整数であることができる]

30

を含んでなり、免疫グロブリン分子の種々の型、例えば限定するわけではないがIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgM、IgD、IgEまたはその任意のサブクラス等、またはそれらの組み合わせを模する。

【0039】

このように本発明のGLP-1ミメティポディは、その本来の特性および機能を持つ抗体構造を模すると同時に、治療用ペプチドおよびその本来の、または獲得した*in vitro*、*in vivo*または*in situ*特性または活性を提供する。t=1である好適な態様では、単量体CH₃-CH₂-ヒンジ-部分J配列-リンカー-治療用ペプチドは、会合または限定するわけではないがCys-Cysジスルフィド結合のような共有結合により他の単量体と連結することができる。抗体の種々の部分および本発明の少なくとも1つのGLP-1ミメティポディのGLP-1治療用ペプチド部分は、当該技術分野で知られている事柄と組み合わせる本明細書に記載するように変動させることができる。

40

【0040】

CH₃-CH₂-ヒンジの部分は、サルベージ受容体への結合が維持されるならば徹底的に修飾して本発明に従うバリエーションを形成することができる。そのようなバリエーションは、本発明の融合分子により要求されない構造的特徴または機能的活性を提供する1もしくは複数の自然な部位を除去してよい。これらの部位は例えば残基を置換または削除することにより、残基を部位に挿入することにより、または部位を含有する部位を短縮化することにより除去することができる。挿入または置換された残基は、ペプチドミメティックまたはD-アミノ酸のような改変されたアミノ酸になることもできる。CH₃-CH₂

50

- ヒンジのバリエーションは、(1)ジスルフィド結合の形成、(2)選択した宿主細胞との不適合性、(3)選択した宿主細胞中の発現での異種性、(4)グリコシル化、(5)補体との相互作用、(6)サルベージ受容体以外のFc受容体への結合、あるいは(7)抗体依存的細胞傷害性(ADCC)に影響を及ぼすか、または関与する1もしくは複数の天然の部位または残基を欠いてもよい。CH₃-CH₂-ヒンジバリエーションの例には以下の分子または配列を含む。1.ジスルフィド結合の形成に関与する部位が除去されている。そのような除去は、本発明の分子を生産するために使用する宿主細胞に存在する他のシステイン含有タンパク質との反応を回避することができる。この目的に、システイン残基は削除するか、または他のアミノ酸(例えばアラニル、セリル)と置換することができる。システイン残基が除去された場合でも、やはり単鎖CH₃-CH₂-ヒンジドメインは、非共有的に一緒に保持されている二量体のCH₃-CH₂-ヒンジドメインを形成することができる。2. CH₃-CH₂-ヒンジ領域は、選択した宿主細胞とさらに適合性とするように修飾される。例えば分子が大腸菌(*E. coli*)のような細菌細胞で組換え的に発現される場合、プロリンイミノペプチダーゼのような大腸菌(*E. coli*)中の消化酵素により認識され得るヒンジ中のPA配列を除去することができる。3. ヒンジ領域の部分は、選択した宿主細胞で発現される場合、異種性を防止するために除去されるか、または他のアミノ酸と置換される。4. 1もしくは複数のグリコシル化部位が除去される。典型的にグリコシル化される残基(例えばアスパラギン)は、細胞分解(cytolytic)応答を付与することができる。そのような残基は削除するか、または非グリコシル化残基(例えばアラニン)と置換することができる。5. C1q結合部位のような補体との相互作用に関与する部位は除去される。補体集合は本発明の分子に有利とはなり得ないので、そのようなバリエーションは回避され得る。6. サルベージ受容体以外のFc受容体への結合に影響を及ぼす部位は除去される。CH₃-CH₂-ヒンジ領域は、本発明の融合分子に必要な特定の白血球との相互作用に関する部位を有する可能性があるため除去することができる。7. ADCC部位は除去される。ADCC部位は当該技術分野では例えばMolec. Immunol. 29(5)633-9(1992)で、IgG1中のADCC部位に関して知られている。これらの部位も本発明の融合部位には必要ではないので除去することができる。

10

20

30

40

50

【0041】

リンカーポリペプチドは、ミメティボディに選択的な配向および結合特性を持つことを可能にすることにより、構造的柔軟性を提供する。存在する場合、その化学的構造は重要ではない。リンカーは好ましくは、ペプチド結合により一緒に連結されたアミノ酸から作られる。すなわち好適な態様では、リンカーはペプチド結合により連結された1~20個のアミノ酸で作られ、ここでアミノ酸は20個の自然に存在するアミノ酸から選択される。これらのアミノ酸の幾つかは当業者に十分に理解されているようにグリコシル化され得る。さらに好適な態様では、1~20個のアミノ酸が、グリシン、アラニン、セリン、プロリン、アスパラギン、グルタミンおよびリシンから選択される。さらに好ましくは、リンカーはグリシンおよびアラニンのような空間的に制約されていないほとんどのアミノ酸から作られる。すなわち好適なリンカーはポリ(Gly-Ser)、ポリグリシン(特に(Gly)₄, (Gly)₅)、ポリ(Gly-Ala)、およびポリアラニンである。他の具体的なリンカーの例は:(Gly)₃Lys(Gly)₄(配列番号:65)、(Gly)₃AsnGlySer(Gly)₂(配列番号:66)、(Gly)₃Cys(Gly)₄(配列番号:67)、およびGlyProAsnGlyGly(配列番号:68)である。

【0042】

上記の命名について説明するために、例えば(Gly)₃Lys(Gly)₄はGly-Gly-Gly-Lys-Gly-Gly-Gly-Glyを意味する。GlyおよびAlaの組み合わせも好適である。示したリンカーは例であり、本発明の範囲に入るリンカーはさらに長くてよく、そして他の残基を含んでもよい。

【0043】

非ペプチド-リンカーも可能である。例えば -NH-(CH₂)_s-C(O)- のようなアルキルリンカー(ここで s = 2 ~ 20)を使用することができる。これらのアルキルリンカーはさらに、低級アルキル(例えば C₁ - C₆)、低級アシル、ハロゲン(例えば Cl, Br)、CN、NH₂、フェニル等のような空間的に制約の無い基で置換してもよい。非-ペプチドリンカーの例は 100 ~ 5000 kD、好ましくは 100 ~ 500 kD の分子量を有する PEG リンカーである。ペプチドリンカーは上記と同じ様式で誘導体を形成するように改変することができる。

【0044】

本明細書で使用する“GLP-1ペプチド”または“GLP-1ペプチド、バリエーションまたは誘導体”は、GLP-1ペプチド、GLP-1フラグメント、GLP-1相同体、GLP-1類似体、またはGLP-1誘導体の少なくとも1つであることができる。GLP-1ペプチドは天然のGLP-1(7-37)と十分な相同性を有する約25~約45個の自然に存在する、または自然には存在しないアミノ酸を有するので、それらは膵臓のβ-細胞上のGLP-1受容体に結合することによりインスリン分泌刺激活性を現す。GLP-1(7-37)は配列番号15: His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Glyのアミノ酸配列を有する。

【0045】

GLP-1フラグメントは、GLP-1(7-37)もしくはその類似体もしくは誘導体のN-末端および/またはC-末端に由来する1もしくは複数のアミノ酸を短縮した後得られるポリペプチドである。GLP-1相同体は、1もしくは複数のアミノ酸がGLP-1(7-37)のN-末端および/またはC-末端に加えられたペプチド、もしくはそのフラグメントもしくは類似体である。GLP-1類似体は、GLP-1(7-37)の1もしくは複数のアミノ酸が修飾かつ/または置換されたペプチドである。GLP-1類似体はGLP-1(7-37)またはGLP-1(7-37)のフラグメントと十分な相同性を有するので、類似体はインスリン分泌刺激活性を有する。GLP-1誘導体は、GLP-1ペプチド、GLP-1相同体またはGLP-1類似体のアミノ酸配列を有する分子と定義されるが、さらにそのアミノ酸側基、炭素原子、末端アミノ基または末端カルボン酸基に1もしくは複数の化学修飾を有する。

【0046】

多数の活性GLP-1フラグメント、類似体および誘導体が当該技術分野で知られ、そしてこれらの類似体および誘導体のいずれも本発明のGLP-1ミメティボディの一部となることができる。当該技術分野で既知の幾つかのGLP-1類似体およびGLP-1フラグメントは米国特許第5,118,666号、5,977,071号および5,545,618号明細書、および Adelhorst, et al., J. Biol. Chem. 269:6275(1994)に開示されている。例には限定するわけではないがGLP-1(7-34), GLP-1(7-35), GLP-1(7-36), Gln⁹-GLP-1(7-37), D-Gln⁹-GLP-1(7-37), Thr¹⁶-Lys¹⁸-GLP-1(7-37)およびLys¹⁸-GLP-1(7-37)がある。

【0047】

「GLP-1ミメティボディ」、「GLP-1ミメティボディ部分」または「GLP-1ミメティボディフラグメント」および/または「GLP-1ミメティボディバリエーション」等は、限定するわけではないが、少なくとも1つの配列番号1のような、少なくとも1つのGLP-1ペプチド、バリエーションもしくは誘導体のリガンド結合、in vitro、in situおよび/または好ましくはin vivoでの活性のような、少なくとも1つの生物学的活性を模するか、有するか、または刺激する。例えば適当なGLP-1ミメティボディ、特定部分もしくはバリエーションは、少なくとも1つのGLP-1受容体シグナリングまたは他の測定可能もしくは検出可能な活性をモジュレート、増加、修飾、活性化することもできる。

10

20

30

40

50

【0048】

本発明の方法および組成物に有用なGLP-1ミメティポディは、タンパク質リガンド、例えばGLP-1受容体に対する適切な結合親和性を特徴とし、そして場合により、そして好ましくは低い毒性を有する。特にGLP-1ミメティポディは、可変領域、定常領域(CH1部分を含まない)および骨格の部分、またはそれらの任意の部分(例えば可変重または軽鎖のJ、DまたはV領域の部分;少なくとも1つのヒンジ領域、定常重鎖または軽鎖等の少なくとも部分)のような個々の成分が個別に、かつ/または集合的に任意に、そして好ましくは低い免疫原性を有する場合に本発明に有用である。本発明に使用することができるミメティポディは場合により良好から優れた症状の緩和および低毒性で長期間、患者を処置するそれらの能力により特徴付けられる。低い免疫原性および/または高い親和性、ならびに他の不確定な特性は、達成される治療的結果に貢献し得る。本明細書では「低い免疫原性」を、処置した患者の約75%未満、または好ましくは約50、45、40、35、30、35、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2および/または1%未満に有意なHAMA、HACAまたはHAAHA応答を生じ、かつ/または処置した患者に低い力価を生じる(二重抗原酵素イムノアッセイで測定した時、約300未満、好ましくは約100未満)と定める(例えばElliot et al., Lancet 344: 1125 - 1127 (1994)を参照にされたい)。

10

【0049】

用途

本発明の単離された核酸は、少なくとも1つのGLP-1ミメティポディ、そのフラグメントもしくは特定バリエーションの生産に使用することができ、これは限定するわけではないが少なくとも1つの肥満関連障害、過剰な体脂肪に関連する太り過ぎ状態、インスリン代謝関連障害、免疫障害もしくは疾患、心血管障害もしくは疾患、感染、悪性および/または神経障害もしくは疾患、ならびに他の既知の、または特定されたタンパク質関連状態から選択される少なくとも1つの肥満関連状態の症状をモジュレートし、処置し、緩和し、発生の防止を助け、または低減するために、細胞、組織、器官または動物(哺乳動物およびヒトを含む)で行うために使用できる。

20

【0050】

そのような方法は少なくとも1つのGLP-1ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーションを含んでなる有効量の組成物または製薬学的組成物を、症状、効果もしくはメカニズムにおいてそのようなモジュレーション、処置、緩和、防止または低減が必要な細胞、組織、器官、動物または患者に投与することを含んでなることができる。有効量は単回または多回投与あたり約0.0001~500mg/kgの量、または単回または多回投与あたり約0.01~5000μg/mlの血清濃度を達成する量、または本明細書に記載する、または関連する技術分野で知られている既知の方法を使用してなされ、そして決定された任意の有効範囲またはその中の値の量を含んでなることができる。

30

【0051】

引用

本明細書に引用するすべての刊行物または特許は全部、それらが本発明のこの時点の技術の状況を示し、かつ/または本発明の説明および可能性を提供するので参考により本明細書に編入する。刊行物とは任意の科学的もしくは特許刊行物、またはすべての記録された、電子的または印刷形式を含む任意の媒体形式で入手できる任意の他の情報を称する。以下の参考文献は引用により全部、本明細書に編入する: Ausubel, et al., 編集、分子生物学の現在のプロトコル(Current Protocols in Molecular Biology)、ジョン ウィリー&サンズ社(John Wiley & Sons, Inc.)、ニューヨーク、ニューヨーク州(1987-2003): Sambrook, et al., モレキュラークローニング: ア ラボラトリーマニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)、第2版、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク州(1989); Harlow and Lane、抗体(Antibodies)、ア ラボラトリーマニユア

40

50

ル、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク州(1989); Colligan, et al. 編集、免疫学の現在のプロトコル(Current Protocols in Immunology)、ジョン ウィリー&サンズ社、ニューヨーク州(1994-2003); Colligan, et al., タンパク質科学の現在のプロトコル(Current Protocols in Protein Science)、ジョン ウィリー&サンズ社、ニューヨーク、ニューヨーク州、(1997-2003)。

【0052】

本発明のミメティボディ

GLP-1ミメティボディは任意選択により、少なくとも1つのGLP-1治療用ペプチド(P)に直接連結した任意選択のリンカー配列(L)に直接連結した少なくとも1つの部分的可変領域(V)に直接連結した少なくとも1つのヒンジ領域を含んでなるような、少なくとも1つのヒンジ領域フラグメント(H)の少なくとも一部に直接連結した少なくとも1つのCH2領域に直接連結した少なくとも1つのCH3領域を含んでなることができる。好適な態様では、1対のCH3-CH2-H-V-L-Pが限定するわけではないがCys-Cysジスルフィド結合のような会合もしくは共有結合により連結され得る。すなわち本発明のGLP-1ミメティボディは、本来の特性および機能を持つ抗体構造および機能を模すると同時に、治療用ペプチドおよびその本来の、または獲得したin vitro、in vivoまたはin situ特性または活性を提供する。抗体の種々の部分および本発明の少なくとも1つのGLP-1ミメティボディの治療用ペプチド部分は、当該技術分野で知られている事柄と組み合わせて本明細書に記載するように変動させることができる。

【0053】

このように本発明のミメティボディは、既知のタンパク質に比べて、限定するわけではないが少なくとも1つの増加した半減期、増加した活性、より特異的な活性、増加したアビディティ、増加または減少したオフレート(off rate)、選択された、またはより適切な活性のサブセット、低い免疫原性、少なくとも1つの所望する治療効果の増加した質または期間、低い副作用等のような、少なくとも1つの適切な特性を提供する。

【0054】

式(I)のミメティボディのフラグメントは、当該技術分野で知られ、かつ/または本明細書に記載するような酵素的分解、合成または組換え技術により生産することができる。またミメティボディは1もしくは複数の終結コドンが天然の終結部位の上流に導入された抗体遺伝子を使用して、種々の短縮形で生成することもできる。ミメティボディの種々の部分は通常の技術により化学的に一緒に連結することができ、または遺伝子工学技術を使用して連続するタンパク質として調製することができる。例えばヒト抗体鎖の少なくとも1つの定常領域をコードする核酸は、本発明のミメティボディに使用するための連続タンパク質を生産するために発現させることができる。例えば単鎖抗体に関してはLadner et al., 米国特許第4,946,778号明細書、およびBird, R. E. et al., Science, 242: 423-426 (1988)を参照にされたい。

【0055】

本明細書で使用する「ヒトの抗体」という用語は、実質的にタンパク質の各部分(例えばGLP-1ペプチド、CHドメイン(例えばCH₂、CH₃)、ヒンジ、V)がヒトで実質的に非免疫原性であり、わずかな配列の変化(change)または変更(variation)を含むと期待される抗体を指す。そのような変化または変更は任意に、そして好ましくは非修飾ヒト抗体または本発明のミメティボディに比べて、ヒトにおける免疫原性を保持しているか、または減少している。すなわちヒト抗体および対応する本発明のGLP-1ミメティボディは、キメラまたはヒト化抗体とは区別される。GLP-1ミメティボディは、ヒトの免疫グロブリン(例えば重鎖および/または軽鎖)遺伝子を発現することができる非ヒト動物または細胞により生産されることができると指摘される。

【 0 0 5 6 】

その少なくとも1つのタンパク質リガンドに特異的なヒトのミメティボディは、単離されたGLP-1受容体またはその部分(合成ペプチドのような合成分子を含む)のような適切なリガンドに対して設計することができる。そのようなミメティボディの調製を既知の技術を使用して行い、そして少なくとも1つのタンパク質またはその部分のリガンド結合領域または配列を同定し、そして特性決定する。

【 0 0 5 7 】

好適な態様では、本発明の少なくとも1つのGLP-1ミメティボディもしくは特定部分もしくはバリエーションは、少なくとも1つの細胞株、混合細胞株、不死化細胞、または不死化および/または培養細胞のクローン群により生産される。不死化したタンパク質生産細胞は、適当な方法を使用して生産することができる。好ましくは少なくとも1つのGLP-1ミメティボディもしくは特定部分もしくはバリエーションは、機能的に再配列されたか、または機能的な再配列を受けることができ、そしてさらに本明細書に記載するミメティボディ構造、例えば限定するわけではないが式(I)を含んでなる少なくとも1つのヒト免疫グロブリン座から誘導されるか、またはそれに実質的に類似する配列を有するDNAを含んでなる核酸またはベクターを提供することにより生成され、ここで当該技術分野で知られているようにC-末端可変領域の部分はVに、ヒンジ領域はHに、CH2はCH2に、そしてCH3はCH3に使用することができる。

【 0 0 5 8 】

本明細書で使用する用語「機能的に再配列された」とは、V(D)J組換えを受け、それにより免疫グロブリン鎖(例えば重鎖)、またはその任意の部分をコードする免疫グロブリン遺伝子を生産する免疫グロブリン座に由来する核酸のセグメントを指す。機能的に再配列された免疫グロブリン遺伝子は、例えばヌクレオチドシーケンシング、ハイブリダイゼーション(例えばサザンブロッティング、ノーザンブロッティング)のような適切な方法を使用して、遺伝子セグメント間のコーディングジョイント(coding joints)にアニールすることができるプローブ、または遺伝子セグメント間のコーディングジョイントにアニールすることができるプライマーを用いた免疫グロブリン遺伝子の酵素的増幅(例えばポリメラーゼ連鎖反応)を使用して、直接的または間接的に同定することができる。細胞が特定の可変領域または特定の配列(例えば少なくとも1つのP配列)を含んでなる可変領域を含んでなるGLP-1ミメティボディもしくは部分もしくはバリエーションを生産するかどうか、適切な方法を使用して決定することができる。

【 0 0 5 9 】

本発明のミメティボディ、特定部分およびバリエーションは、そのようなミメティボディもしくは特定部分もしくはバリエーションを乳の中に生産するヤギ、ウシ、ウマ、ヒツジ等のようなトランスジェニック動物または哺乳動物を提供するために、少なくとも1つのGLP-1ミメティボディもしくは特定部分もしくはバリエーションをコードする核酸を使用して調製することもできる。そのような動物は抗体コード配列について応用される既知の方法を使用して提供することができる。例えば限定するわけではないが、米国特許第5,827,690号;同第5,849,992号;同第4,873,316号;同第5,849,992号;同第5,994,616号;同第5,565,362号;同第5,304,489号明細書等(これらの各々は引用により全部、本明細書に編入する)を参照にされたい。

【 0 0 6 0 】

本発明のミメティボディ、特定部分およびバリエーションは、そのようなミメティボディ、特定部分もしくはバリエーションを、植物の一部またはそれらから培養した細胞中に生産するトランスジェニック植物および培養植物細胞(例えば限定するわけではないが、タバコおよびメイズ)を提供するために、少なくとも1つのGLP-1ミメティボディもしくは特定部分もしくはバリエーションをコードする核酸を使用してさらに調製することができる。非限定的な例として、組換えタンパク質を発現するトランスジェニックタバコの葉が、例えば誘導性プロモーターを使用して大量の組換えタンパク質を提供するために成功裏に使用

されてきた。例えばCramer et al., Curr. Top. Microbiol. Immunol. 240: 95 - 118 (1999)およびそこに引用されている技術文献を参照にされたい。またトランスジェニックメイズまたはコーンは、他の組換え系で生産されたものに、または天然の起源から精製されたものに均等な生物学的活性を持つ哺乳動物のタンパク質を工業的生産レベルで発現するために使用されてきた。例えばHood et al., Adv. Exp. Med. Biol. 464: 127 - 147 (1999)およびそこに引用されている技術文献を参照にされたい。単鎖ミメティボディ(s c F v ' s)のような抗体フラグメントを含め、抗体はタバコ種子およびジャガイモの塊茎を含むトランスジェニック植物の種子からも大量に生産されてきた。例えばConrad et al., Plant Mol. Biol. 38: 101 - 109 (1998)およびそこに引用されている技術文献を参照にされたい。すなわち本発明のミメティボディ、特定部分およびバリエーションは、既知の方法に従いトランスジェニック植物を使用して生産することもできる。また例えば、Fischer et al., Biotechnol. Appl. Biochem. 30: 99 - 108 (Oct., 1999)、Ma et al., Trends Biotechnol. 13: 522 - 7 (1995); Ma et al., Plant Physiol. 109: 341 - 6 (1995); Whitelam et al., Biochem. Soc. Trans. 22: 940 - 944 (1994); およびそこに引用されている技術文献を参照にされたい。上記参考文献は引用により全部、本明細書に編入する。

10

20

【0061】

本発明のミメティボディは、広い範囲の親和性(K_D)でヒトのタンパク質リガンドに結合することができる。好適な態様では、本発明の少なくとも1つのヒトGLP-1ミメティボディは場合により高い親和性で少なくとも1つのタンパク質リガンドに結合することができる。例えば本発明の少なくとも1つのGLP-1ミメティボディは、約 10^{-7} M以下の K_D 、またはより好ましくは約 $0.1 \sim 9.9$ (またはこの中の任意の範囲もしくは値) $\times 10^{-7}$ 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} M、 10^{-11} 、 10^{-12} または 10^{-13} 以下の K_D 、またはこの中の任意の範囲もしくは値で少なくとも1つのタンパク質リガンドに結合することができる。

【0062】

少なくとも1つのタンパク質リガンドに関するGLP-1ミメティボディの親和性またはアビディティは、例えば抗体-抗原結合親和性またはアビディティを決定するために使用されるような適当な方法を使用して実験的に定めることができる。(例えばBerzofsky, et al., 「抗体-抗原相互作用(Antibody-Antigen Interactions)」、基本的免疫学(Fundamental Immunology)で、Paul, W. E. 編集、ラベン(Raven)出版: ニューヨーク、ニューヨーク州(1984); Kuby, Janis 免疫学(Immunology)、W. H. フリーマン アンド カンパニー(Freeman and Company): ニューヨーク、ニューヨーク州(1992); およびそこに記載されている方法を参照にされたい)。測定された特定のGLP-1ミメティボディ-リガンド相互作用の親和性は、異なる条件下(例えば、塩濃度、pH)で測定すれば変動し得る。すなわち親和性および他のリガンド-結合パラメーター(例えば K_D 、 K_a 、 K_d)の測定は、好ましくはGLP-1ミメティボディおよびリガンドの標準化された溶液、および本明細書に記載するか、または当該技術分野で知られているバッファーのような標準化バッファーを用いて作成される。

30

40

【0063】

核酸分子

少なくとも1つの配列番号1および6ならびに抗体の少なくとも1つの部分の連続するアミノ酸の少なくとも90-100%をコードするヌクレオチド配列(ここで上記配列は式(I)のP配列として挿入されて、本発明のGLP-1ミメティボディを提供し、さらに特定のフラグメント、バリエーションまたはそのコンセンサス配列を含んでなる)、または

50

これらの配列の少なくとも1つを含んでなる寄託されたベクターのような本明細書に提供する情報を使用して、少なくとも1つのGLP-1ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーションをコードする本発明の核酸分子は、本明細書に記載する方法または当該技術分野で知られているように得ることができる。

【0064】

本発明の核酸分子は、mRNA、hnRNA、tRNAまたは他の任意の形態のようなRNAの形態、あるいは限定するわけではないがクローニングにより得た、または合成的に生成されたcDNAおよびゲノムDNAを含むDNAの形態、またはそれらの任意の組み合わせであることができる。DNAは3本鎖、2本鎖もしくは1本鎖、またはそれらの組み合わせであることができる。DNAまたはRNAの少なくとも1つの鎖の部分はコード鎖（センス鎖としても知られている）であることができ、またはそれは非コード鎖（アンチ-センス鎖とも言われる）であることができる。

10

【0065】

本発明の単離された核酸分子は、場合により1もしくは複数のイントロンを含むオープンリーディングフレーム（ORF）を含んでなる核酸分子、GLP-1ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーションのコード配列を含んでなる核酸分子、および上記のものとは実質的に異なるが、遺伝子暗号の縮重によりそれでも本明細書に記載し、かつ/または当該技術分野で既知の少なくとも1つのGLP-1ミメティポディをコードするヌクレオチド配列を含んで成る核酸分子を含むことができる。もちろん遺伝子暗号は当該技術分野では周知である。すなわち当業者には本発明の特異的なGLP-1ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーションをコードするそのような縮重核酸バリエーションを生成することは日常的なことである。例えばAusubel, et al., 同上を参照にされたい。そしてそのような核酸バリエーションは本発明に包含される。

20

【0066】

本明細書に示すように、GLP-1ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーションをコードする核酸を含んで成る本発明の核酸分子は、限定するわけではないが自身によりGLP-1ミメティポディフラグメントのアミノ酸配列をコードするもの；全GLP-1ミメティポディもしくはそれらの部分のコード配列；GLP-1ミメティポディ、フラグメントもしくは部分のコード配列、ならびにスプライシングおよびポリアデニル化シグナルを含む（例えば、リボソーム結合およびmRNAの安定性）転写、mRNAプロセッシングに役割を果たす、転写された、非翻訳配列のような限定するわけではない非コード5'および3'配列を含むさらなる非コード配列と一緒に、少なくとも1つのイントロンのような前記のさらなるコード配列を含むか、または含まない少なくとも1つのシグナルリーダーまたは融合ペプチドのコード配列のようなさらなる配列；さらなる機能性を提供する配列のようなさらなるアミノ酸をコードするさらなるコード配列を含むことができる。すなわちGLP-1ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーションをコードする配列は、GLP-1ミメティポディフラグメントもしくは部分を含んで成る融合GLP-1ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーションの精製を容易にするペプチドをコードする配列のようなマーカー配列と融合させることができる。

30

【0067】

本明細書に記載するポリヌクレオチドに選択的にハイブリダイズするポリヌクレオチド

本発明は選択的なハイブリダイゼーション条件下で、本明細書に開示するポリヌクレオチド、またはその特定バリエーションもしくは部分を含む本明細書に開示する他のものとハイブリダイズする単離された核酸を提供する。すなわち本態様のポリヌクレオチドは、そのようなポリヌクレオチドを含んで成る核酸を単離し、検出し、かつ/または定量するために使用することができる。

40

【0068】

低または中程度のストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件は、典型的（しかし排他的ではなく）には相補的配列に比べて低下した配列同一性を有する配列に採用される。中および高ストリンジェンシー条件も、より大きな同一性の配列のために場合により

50

使用することができる。低ストリンジエンシー条件は、約40 - 99%の配列同一性を有する配列の選択的ハイブリダイゼーションを可能とし、そしてオーソログス(orthologous)またはパラログス(paralogous)配列を同定するために使用することができる。

【0069】

場合により本発明のポリヌクレオチドは、本明細書に記載するポリヌクレオチドによりコードされるGLP-1ミメティポディまたは特定部分またはバリエーションの少なくとも一部をコードする。本発明のポリヌクレオチドは、本発明のGLP-1ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーションをコードするポリヌクレオチドへの選択的ハイブリダイゼーションに使用できる核酸配列を包含する。例えばAusubel、同上; Colligan、同上を参照にされたい(各々、引用により全部、本明細書に編入する)。

10

【0070】

核酸の構築

本発明の単離された核酸は、当該技術分野で周知な(a)組換え法、(b)合成技術、(c)精製技術、またはそれらの組み合わせを使用して作成することができる。

【0071】

核酸は本発明のポリヌクレオチドに加えた配列を都合よく含んで成ることができる。例えばポリヌクレオチドの単離を補助するために、1もしくは複数のエンドヌクレアーゼ制限部位を含んで成るマルチクローニング部位を核酸に挿入することができる。また翻訳可能な配列を、本発明の翻訳されたポリヌクレオチドの単離を補助するために挿入することができる。例えばヘキサ-ヒスチジンマーカ配列は、本発明のタンパク質を精製するための都合のよい手段を提供する。本発明の核酸(コード配列を除く)は場合により、本発明のポリヌクレオチドのクローニングおよび/または発現のためのベクター、アダプターまたはリンカーである。

20

【0072】

クローニングおよび/または発現における機能を至適化するために、ポリヌクレオチドの単離を補助するために、またはポリヌクレオチドの細胞への導入を向上させるために、そのようなクローニングおよび/または発現配列にさらなる配列を加えることができる。クローニングベクター、発現ベクター、アダプターおよびリンカーの使用は、当該技術分野では周知である。例えばAusubel、同上; またはSambrook、同上を参照にされたい。

30

【0073】

核酸を構築するための組換え法

RNA、cDNA、ゲノムDNAまたはそれらの任意の組み合わせのような本発明の単離された核酸組成物は、当業者に既知の多数のクローニング法を使用して生物起源から得ることができる。幾つかの態様では、cDNAまたはゲノムDNAライブラリー中の所望する配列を同定するために、適切なストリンジエンシー条件下で本発明のポリヌクレオチドと選択的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプローブを使用する。RNAの単離、およびcDNAおよびゲノムライブラリーの構築は、当業者には周知である。(例えばAusubel、同上; またはSambrook、同上を参照にされたい)。

40

【0074】

核酸分子を構築するための合成法

本発明の単離された核酸は、既知の方法で直接的な化学合成により調製することもできる(例えばAusubel et al.、同上を参照にされたい)。化学合成は一般に1本鎖オリゴヌクレオチドを生成し、これを相補的配列とのハイブリダイゼーションにより、または1本鎖を鋳型として使用したDNAポリメラーゼによる重合化により2本鎖DNAに転換することができる。当業者はDNAの化学合成は約100以上の塩基の配列に限定され得るが、より長い配列は短い配列の連結により得ることができると認識するだろう。

【0075】

50

組換え発現カセット

本発明はさらに、本発明の核酸を含んでなる組換え発現カセットを提供する。本発明の核酸配列、例えば本発明のGLP-1ミメティボディもしくは特定部分もしくはバリエーションをコードするcDNAまたはゲノム配列は、少なくとも1つの所望する宿主細胞に導入することができる組換え発現カセットを構築するために使用することができる。組換え発現カセットは典型的には、意図する宿主細胞でポリヌクレオチドの転写を支配する転写開始調節配列に操作可能に連結された本発明のポリヌクレオチドを含んでなる。ヘテロロガスおよび非ヘテロロガス(すなわち内因性)の両方のプロモーターを使用して、本発明の核酸の発現を支配することができる。

【0076】

幾つかの態様では、プロモーター、エンハンサーまたは他の要素として役立つ単離された核酸は、本発明のポリヌクレオチドの発現をアップまたはダウンレギュレートするように、非ヘテロロガス状態の本発明のポリヌクレオチドの適当な位置(上流、下流またはイントロン中)に導入することができる。例えば内因性プロモーターを当該技術分野で知られているように突然変異、欠失および/または置換によりインビボまたはインビトロで改変することができる。本発明のポリヌクレオチドは、所望によりセンスまたはアンチセンス方向のいずれかで発現することができる。センスまたはアンチセンス方向のいずれかの遺伝子発現の制御は、観察可能な特性に直接的な影響を有することができると考えられる。サブプレッションの別の方法はセンスサブプレッションである。センス方向に形成された核酸の導入は、標的遺伝子の転写を遮断する効果的な手段であることが示された。

【0077】

ベクターおよび宿主細胞

また本発明は、本発明の単離された核酸分子を含むベクター、組換えベクターにより遺伝的に操作された宿主細胞、および当該技術分野で周知な組換え法による少なくとも1つのGLP-1ミメティボディまたは特定部分またはバリエーションの生産に関する。例えばSambrook, et al., 同上; Ausubel et al., 同上(各々、引用により全部、本明細書に編入する)を参照にされたい。

【0078】

ポリヌクレオチドは場合により、宿主中での増殖のために選択可能なマーカを含むベクターに連結することができる。一般にプラスミドベクターは電気穿孔等のような適当な既知の方法を使用して細胞に導入され、他の既知の方法にはリン酸カルシウム沈殿のような沈殿として、または荷電した脂質との複合体でのベクターの使用を含む。ベクターがウイルスである場合、適当なパッケージング細胞株を使用してインビトロでパッケージングし、そして次いで宿主細胞に形質導入することができる。

【0079】

DNA挿入物は適当なプロモーターに操作可能に連結されるべきである。発現構築物は任意に少なくとも1つの転写開始、終結用の部位、および転写領域中に翻訳のためのリボソーム結合部位をさらに含むだろう。構築物により発現された成熟転写産物のコード部分は、好ましくは最初に翻訳開始、および翻訳されるべきmRNAの終わりに適切に位置する終結コドン(例えばUAA、UGAまたはUAG)を含み、UAAおよびUAGが哺乳動物または真核細胞の発現には好適である。

【0080】

発現ベクターは好ましくは、しかし任意に少なくとも1つの選択可能なマーカを含む。そのようなマーカには例えば限定するわけではないが、真核細胞培養用のメトトレキサート(MTX)、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR、米国特許第4,399,216号、同第4,634,655号、同第4,656,134号、同第4,956,288号、同第5,149,636号、同第5,179,017号明細書、アンピシリン、ネオマイシン(G418)、マイコフェノール酸、またはグルタミンシンターゼ(GS、米国特許第5,122,464号、同第5,770,359号、同第5,827,739号明細書)耐性、そして大腸菌(E. coli)および他の細菌または原核細胞での培養には

10

20

30

40

50

テトラサイクリンまたはアンピシリン耐性遺伝子を含む（上記の特許明細書は引用により全部、本明細書に編入する）。上記の宿主細胞に関する適当な培養基および条件は、当該技術分野では既知である。適当なベクターは当業者には直ちに明らかである。ベクター構築物の宿主細胞への導入は、リン酸カルシウムトランスフェクション、D E A E - デキストラン媒介トランスフェクション、カチオン性脂質媒介トランスフェクション、電気穿孔、形質導入、感染または他の既知の方法により行うことができる。そのような方法は S a m b r o o k、同上、第 1 ~ 4 および 1 6 ~ 1 8 章、A u s u b e l、同上、第 1、9、1 3、1 5、1 6 章のように当該技術分野で記載されている。

【 0 0 8 1 】

本発明の少なくとも 1 つの G L P - 1 ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーションは、融合タンパク質のように修飾された形態で発現することができ、そして分泌シグナルだけでなく、さらにヘテロロガスな機能的領域を含むことができる。例えばさらなるアミノ酸の領域、特に荷電したアミノ酸を、G L P - 1 ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーションの N - 末端に付加して、宿主細胞中の、精製中の、あるいは後の取り扱いおよび保存中の安定性および持続性を向上させることができる。またペプチド部分を本発明の G L P - 1 ミメティポディまたは特定部分またはバリエーションに付加して、精製を容易することができる。そのような領域は、G L P - 1 ミメティポディまたはその少なくとも 1 つのフラグメントの最終調製前に除去することができる。そのような方法は多くの標準的な研究室用マニュアル、例えば S a m b r o o k、同上、第 1 7 . 2 9 ~ 1 7 . 4 2 および 1 8 . 1 ~ 1 8 . 7 4 章；A u s u b e l、同上、第 1 6、1 7 および 1 8 章に記載されている（引用により全部、本明細書に編入する）。

【 0 0 8 2 】

当業者は本発明のタンパク質をコードする核酸の発現に利用可能な多数の発現系についての知識がある。

【 0 0 8 3 】

ミメティポディ、その特定部分もしくはバリエーションの生産に有用な細胞培養の具体例は哺乳動物細胞である。哺乳動物細胞系は単層状態の細胞であることが多いが、哺乳動物細胞懸濁物またはバイオリクターも使用することができる。完全なグリコシル化タンパク質を発現することができる多数の適当な宿主細胞株が当該技術分野で開発され、そしてそれには C O S - 1（例えば A T C C C R L 1 6 5 0）、C O S - 7（例えば A T C C C R L - 1 6 5 1）、H E K 2 9 3、B H K 2 1（例えば A T C C C R L - 1 0）、C H O（例えば A T C C C R L 1 6 1 0、D G - 4 4）および B S C - 1（例えば A T C C C R L - 2 6）細胞株、h e p G 2 細胞、P 3 X 6 3 A g 8 . 6 5 3、S P 2 / 0 - A g 1 4、2 9 3 細胞、H e L a 細胞等を含み、これらは例えばバージニア州マナッサスのアメリカンタイプカルチャーコレクションから容易に入手できる（w w w . a t c c . c o m）。好適な宿主細胞には骨髓腫およびリンパ腫細胞のようなリンパ節起源の細胞を含む。特に好適な宿主細胞は、P 3 X 6 3 A g 8 . 6 5 3 細胞（A T C C 寄託番号 C R L - 1 5 8 0）および S P 2 / 0 - A g 1 4 細胞（A T C C 寄託番号 C R L - 1 8 5 1）である。

【 0 0 8 4 】

これらの細胞用の発現ベクターは、限定するわけではないが 1 もしくは複数の以下のような発現制御配列を含むことができる；複製起点、プロモーター（例えば後期または初期 S V 4 0 プロモーター、C M V プロモーター（例えば米国特許第 5, 1 6 8, 0 6 2 号；同第 5, 3 8 5, 8 3 9 号明細書）、H S V t k プロモーター、p g k（ホスホリグリセレート キナーゼ）プロモーター、E F - 1 アルファプロモーター（米国特許第 5, 2 6 6, 4 9 1 号明細書）、少なくとも 1 つのヒト免疫グロブリンプロモーター、エンハンサーおよび / またはリボソーム結合部位、R N A スプライス部位、ポリアデニル化部位（例えば S V 4 0 ラージ T A g ポリ A 付加部位）および転写終結配列のようなプロセッシング情報部位。例えば、A u s u b e l, e t a l .、同上；S a m b r o o k, e t a l .、同上を参照にされたい。本発明の核酸またはタンパク質の生産に有用な他の細胞

は知られており、かつ/または例えば細胞株およびハイブリドーマのアメリカンタイプカルチャーコレクションカタログ (www.atcc.org) あるいは既知の他の市販の供給源から入手可能である。

【0085】

真核宿主細胞を使用する時、典型的にはポリアデニル化または転写終結配列をベクターに包含する。終結配列の例は、ウシ成長ホルモン遺伝子に由来するポリアデニル化配列である。転写の正確なスプライシングのための配列も含むことができる。スプライシング配列の例は、SV40に由来するVP1イントロン (Sprague, et al., J. Virol. 45: 773-781 (1983)) である。さらに当該技術分野で既知であるように、宿主細胞中で複製を制御する遺伝子配列をベクターに包含することができる。

10

【0086】

GLP-1ミメティポディもしくはその特定部分もしくはバリエーションの精製

GLP-1ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーションは、限定するわけではないがプロテインA精製、硫酸アンモニウムもしくはエタノール沈殿、酸抽出、アニオンもしくはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ハイドロキシルアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーを含む周知な方法により、組換え細胞培養物から回収し、そして精製することができる。高性能液体クロマトグラフィー (“HPLC”) も精製に使用することができる。例えばColligan、免疫学における現在のプロトコル、またはタンパク質科学における現在のプロトコル、ジョン ウィリー & サンズ、ニューヨーク、ニューヨーク州 (1997-2003)、例えば第1、4、6、8、9、10章を参照にされたい (各々が全部、引用により本明細書に編入される)。

20

【0087】

本発明のミメティポディまたは特定部分またはバリエーションには、自然に精製された生成物、化学合成法の生成物、および例えば酵母、高等植物、昆虫および哺乳動物細胞を含む真核細胞宿主から組換え技術により生産される産物を含む。組換え生産法で使用する宿主に依存して、本発明のGLP-1ミメティポディもしくは特定部分またはバリエーションはグリコシル化されることができ、または非グリコシル化であることができるが、グリコシル化が好適である。そのような方法は: Sambrook、同上、第17.37~17.42; Ausubel、同上、第10、12、13、16、18および20章、Colligan、タンパク質科学 (Protein Science)、同上、第12~14 (すべて引用により本明細書に編入する) のような多くの標準的な研究室マニュアルに記載されている。

30

【0088】

ミメティポディ、特定フラグメントおよび/またはバリエーション

本発明の単離されたミメティポディは、本明細書でさらに完全に検討する本発明の1つのポリヌクレオチドによりコードされるGLP-1ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーション、あるいは任意の単離もしくは調製されたGLP-1ミメティポディもしくはその特定部分もしくはバリエーションを含んでなる。

40

【0089】

好ましくはGLP-1ミメティポディもしくはリガンド結合部分またはバリエーションは、少なくとも1つのGLP-1タンパク質リガンドに結合し、そしてこれにより対応するタンパク質またはそのフラグメントの少なくとも1つのGLP-1生物活性を提供する。種々の治療的または診断的に重要なタンパク質が当該技術分野では周知であり、そしてそのようなタンパク質の適切なアッセイまたは生物学的活性も当該技術分野では周知である。

【0090】

本発明に適切なGLP-1ペプチド、バリエーションおよび誘導体の非限定的例は、配列番号1に表される: His - Xaa2 - Xaa3 - Gly - Xaa5 - Xaa6 - Xaa7

50

- Xaa8 - Xaa9 - Xaa10 - Xaa11 - Xaa12 - Xaa13 - Xaa14
 - Xaa15 - Xaa16 - Xaa17 - Xaa18 - Xaa19 - Xaa20 - Xaa
 21 - Phe - Xaa23 - Xaa24 - Xaa25 - Xaa26 - Xaa27 - Xaa
 28 - Xaa29 - Xaa30 - Xaa31、ここで：Xaa2はAla, Gly, Se
 r, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, AspまたはLysであり；Xaa3は
 Glu, AspまたはLysであり；Xaa5はThr, Ala, Gly, Ser, Le
 u, Ile, Val, Arg, His, Glu, AspまたはLysであり；Xaa6は
 Phe, His, TrpまたはTyrであり；Xaa7はThrまたはAsnであり；X
 aa8はSer, Ala, Gly, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Aspま
 たはLysであり；Xaa9はAspまたはGluであり；Xaa10はVal, Ala
 , Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Met, Tyr, Trp, His, Phe
 , Glu, AspまたはLysであり；Xaa11はSer, Val, Ala, Gly,
 Thr, Leu, Ile, Glu, AspまたはLysであり；Xaa12はSer, V
 al, Ala, Gly, Thr, Leu, Ile, Glu, AspまたはLysであり；
 Xaa13はTyr, Phe, Trp, Glu, AspまたはLysであり；Xaa14
 はLeu, Ala, Met, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu
 , AspまたはLysであり；Xaa15はGlu, Ala, Thr, Ser, Gly,
 Gln, AspまたはLysであり；Xaa16はGly, Ala, Ser, Thr, L
 eu, Ile, Val, Gln, Asn, Arg, Cys, Glu, AspまたはLys
 であり；Xaa17はGln, Asn, Arg, His, Glu, AspまたはLys
 であり；Xaa18はAla, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Ar
 g, Glu, AspまたはLysであり；Xaa19はAla, Gly, Ser, Thr
 , Leu, Ile, Val, Met, Glu, AspまたはLysであり；Xaa20は
 Lys, Arg, His, Gln, Trp, Tyr, Phe, GluまたはAspであり
 ；Xaa21はGlu, Leu, Ala, His, Phe, Tyr, Trp, Arg, G
 ln, Thr, Ser, Gly, AspまたはLysであり；Xaa23はIle, Al
 a, Val, LeuまたはGluであり；Xaa24はAla, Gly, Ser, Thr
 , Leu, Ile, Val, His, Glu, AspまたはLysであり；Xaa25は
 Trp, Phe, Tyr, Glu, AspまたはLysであり；Xaa26 is Le
 u, Gly, Ala, Ser, Thr, Ile, Val, Glu, AspまたはLysで
 あり；Xaa27はVal, Leu, Gly, Ala, Ser, Thr, Ile, Arg
 , Glu, AspまたはLysであり；Xaa28はLys, Asn, Arg, His,
 GluまたはAspであり；Xaa29はGly, Ala, Ser, Thr, Leu, I
 le, Val, Arg, Trp, Tyr, Phe, Pro, His, Glu, Aspまた
 はLysであり；Xaa30はArg, His, Thr, Ser, Trp, Tyr, Ph
 e, Glu, AspまたはLysであり；そしてXaa31はGly, Ala, Ser,
 Thr, Leu, Ile, Val, Arg, Trp, Tyr, Phe, His, Glu,
 Asp, Lysである。

【0091】

別の好適なGLP-1ペプチド、バリエーションまたは誘導体の群は、配列番号6に例示さ
 れる：His - Xaa2 - Xaa3 - Gly - Thr - Xaa6 - Xaa7 - Xaa8 -
 Xaa9 - Xaa10 - Ser - Xaa12 - Tyr - Xaa14 - Glu - Xaa16
 - Xaa17 - Xaa18 - Xaa19 - Lys - Xaa21 - Phe - Xaa23 - A
 la - Trp - Leu - Xaa27 - Xaa28 - Gly - Xaa30、ここで：Xaa
 2はAla, GlyまたはSerであり；Xaa3はGluまたはAspであり；Xaa
 6はPheまたはTyrであり；Xaa7はThrまたはAsnであり；Xaa8はSe
 r, ThrまたはAlaであり；Xaa9はAspまたはGluであり；Xaa10はV
 al, Leu, MetまたはIleであり；Xaa12はSerまたはLysであり；X
 aa14はLeu, AlaまたはMetであり；Xaa16はGly, Ala, Gluま
 たはAspであり；Xaa17はGlnまたはGluであり；Xaa18はAlaまたは

Lysであり；Xaa19はAla, Val, Ile, LeuまたはMetであり；Xaa21はGluまたはLeuであり；Xaa23はIle, Ala, Val, LeuまたはGluであり；Xaa27はValまたはLysであり；Xaa28はLysまたはAsnであり；そしてXaa30はArgまたはGluである。

【0092】

これらのペプチドは開示され、かつ/または当該技術分野で既知の方法により調製することができる。配列中（および他に特別な場合を特定しない限り本明細書中）のXaasは特定のアミノ酸残基、その誘導体または修飾アミノ酸を含む。酵素であるジペプチジル-ペプチダーゼIV（DPP-IV）は、投与したGLP-1で観察される迅速なインビボ不活性化の原因となり得るので、ミメティポディの内容においてDPP-IVの活性から保護されるGLP-1ペプチド、相同体、類似体および誘導体が好適である。

10

【0093】

少なくとも1つのGLP-1の生物学的活性を一部または好ましくは実質的に提供するGLP-1ミメティポディ、またはその特定部分もしくはそのバリエーションは、GLP-1リガンドに結合し、そしてこれによりGLP-1受容体のようなGLP-1の少なくとも1つのリガンドへの結合を介して、または他のタンパク質依存的もしくは媒介型メカニズムを介して媒介される少なくとも1つの活性を提供することができる。本明細書で使用する用語「GLP-1ミメティポディ活性」とは、アッセイに依存して約20-10,000%まで、好ましくは少なくとも約60,70,80,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100,110,120,130,140,150,160,170,180,190,200,250,300,350,400,450,500,550,600,700,800,900,1000,2000,3000,4000,5000,6000,7000,8000,9000%以上まで、少なくとも1つのGLP-1依存的活性をモジュレートまたは引き起こすことができるGLP-1ミメティポディを指す。

20

【0094】

GLP-1ミメティポディまたは特定部分またはバリエーションが少なくとも1つのタンパク質依存的活性を提供する能力は、好ましくは本明細書に記載し、かつ/または当該技術分野で既知の少なくとも1つの適当なタンパク質の生物学的アッセイにより評価される。本発明のヒトGLP-1ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーションは、任意のクラス（IgG, IgA, IgM等）またはアイソタイプに類似することができ、そして少なくともカップまたはラムダ軽鎖の部分を含んでなることができる。1つの態様では、ヒトGLP-1ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーションは、IgG重鎖可変フラグメント、ヒンジ領域、例えば少なくとも1つのアイソタイプ、例えばIgG1, IgG2, IgG3またはIgG4のCH2およびCH3を含んでなる。

30

【0095】

本発明の少なくとも1つのGLP-1ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーションは、少なくとも1つのリガンド、サブユニット、フラグメント、部分またはそれらの任意の組み合わせに結合する。本発明の少なくとも1つのGLP-1ミメティポディ、特定部分もしくはバリエーションの少なくとも1つのGLP-1ペプチド、バリエーションまたは誘導体は、場合によりリガンドの少なくとも1つの特定したエピトープに結合することができる。結合するエピトープは、少なくとも1-3個のアミノ酸の少なくとも1つのアミノ酸配列から、GLP-1受容体またはその部分のようなタンパク質リガンドの配列の連続するアミノ酸の全特定部分の任意の組み合わせを含んでなることができる。

40

【0096】

そのようなミメティポディは、既知の技術を使用して式（I）のGLP-1ミメティポディの種々の部分を一緒に連結することにより、組換えDNA技術の既知の技術を使用してGLP-1ミメティポディをコードする少なくとも1つの核酸分子を調製し、そして発現させることにより、あるいは化学合成のような他の適切な方法を使用することにより調製することができる。

50

【0097】

受容体のようなヒトのGLP-1リガンドに結合し、そして定めた重鎖または軽鎖可変領域またはその一部を含んでなるミメティボディは、ファージディスプレイ (Katsube, Y., et al., Int J Mol Med, 1 (5) : 863 - 868 (1998) 引用により全部、本明細書に編入する)、または当該技術分野で知られているようなトランスジェニック動物を使用する方法のような適切な方法を使用して調製することができる。GLP-1ミメティボディ、特定部分もしくはバリエーションは、コード核酸またはその部分を適当な宿主細胞で使用して発現させることができる。

【0098】

また本発明は、本明細書に記載するアミノ酸配列と実質的に同じ配列中のアミノ酸を含んでなるミメティボディ、リガンド結合フラグメントおよび免疫グロブリン鎖に関する。好ましくはそのようなミメティボディまたはそのリガンド結合フラグメントは、受容体のようなヒトのGLP-1リガンドと高い親和性で(例えば約 10^{-7} M以下の K_D)で結合できる。本明細書に記載する配列と実質的に同じアミノ酸配列には、保存的アミノ酸置換、ならびにアミノ酸欠失および/または挿入を含んで成る配列を含む。保存的アミノ酸置換とは、第1アミノ酸と類似の化学的および/または物理的特性(例えば、荷電、構造、極性、疎水性/親水性)を有する第2のアミノ酸に、第1アミノ酸を置き換えることを言う。保存的置換には、以下の群内で1つのアミノ酸が別のアミノ酸に置き換わることを含む: リシン(K)、アルギニン(R)およびヒスチジン(H); アスパルテート(D)およびグルタメート(E); アスパラギン(N)、グルタミン(Q)、セリン(S)、トレオニン(T)、チロシン(Y)、K、R、H、DおよびE; アラニン(A)、バリン(V)、ロイシン(L)、イソロイシン(I)、プロリン(P)、フェニルアラニン(F)、トリプトファン(W)、メチオニン(M)、システイン(C)およびグリシン(G); F、WおよびY; C、SおよびT。

【0099】

アミノ酸暗号

本発明のミメティボディまたは特定部分またはバリエーションを作るアミノ酸は、しばしば略記される。アミノ酸の命名法は当該技術分野でよく知られているような、その1文字暗号、その3文字暗号、名前または3ヌクレオチドコドン(1つまたは複数)によるアミノ酸の命名により示すことができる(Alberts, B., et al., 細胞の分子生物学 (Molecular Biology of The Cell), 第3版、ガーランド(Garland)出版社、ニューヨーク、1994を参照にされたい):

【0100】

10

20

30

【表 1】

1文字暗号	3文字暗号	名前	3ヌクレオチドコドン	
A	Ala	アラニン	GCA, GCC, GCG, GCU	
C	Cys	システイン	UGC, UGU	
D	Asp	アスパラギン酸	GAC, GAU	
E	Glu	グルタミン酸	GAA, GAG	
F	Phe	フェニルアラニン	UUC, UUU	
G	Gly	グリシン	GGA, GGC, GGG, GGU	10
H	His	ヒスチジン	CAC, CAU	
I	Ile	イソロイシン	AUA, AUC, AUU	
K	Lys	リシン	AAA, AAG	
L	Leu	ロイシン	UUA, UUG, CUA, CUC, CUG, CUU	
M	Met	メチオニン	AUG	
N	Asn	アスパラギン	AAC, AAU	
P	Pro	プロリン	CCA, CCC, CCG, CCU	
Q	Gln	グルタミン	CAA, CAG	20
R	Arg	アルギニン	AGA, AGG, CGA, CGC, CGG, CGU	
S	Ser	セリン	AGC, AGU, UCA, UCC, UCG, UCU	
T	Thr	トレオニン	ACA, ACC, ACG, ACU	
V	Val	バリン	GUA, GUC, GUG, GUU	
W	Trp	トリプトファン	UGG	
Y	Tyr	チロシン	UAC, UAU	

【0101】

本発明のGLP-1ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーションは、本明細書で特定する自然な突然変異またはヒトの操作のいずれかに由来する1もしくは複数のアミノ酸置換、欠失または付加を含むことができる。本発明に使用することができるそのようなまたは他の配列には、限定するわけではないが配列番号47~64に提示する以下の配列を含み、ここで抗体配列の部分的可変領域は、限定するわけではないが表1に記載するような少なくとも1つの配列番号47~55の少なくとも一部、またはそのフラグメントであることができ、そしてさらに場合により配列番号1~9に対応して、2004年6月24日に出願され、そして2005年1月20日に公開された国際公開第WO05/05604(PCT/US04/19898)の図1~9にさらに記載されている少なくとも1つの置換、挿入または欠失を含んでなる。CH2、CH3およびヒンジ領域は、限定するわけではないが表1に記載するような少なくとも1つの配列番号56~64の少なくとも一部、またはそのフラグメントであることができ、そしてさらに場合により配列番号32~40に対応して、2004年6月24日に出願され、そして2005年1月20日に公開された国際公開第WO05/05604(PCT/US04/19898)の図32~40にさらに記載されている少なくとも1つの置換、挿入または欠失を含んでなる。もちろん当業者は多くのアミノ酸置換を、上記に記載したものを多く含む多くの因子に依存して作るだろう。一般に、少なくとも1つのGLP-1ミメティポディのアミノ酸置換、挿入または欠失の数は、本明細書に特定するように1~30またはその中の範囲もしくは値のように40、30、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1個のアミノ酸より多くない。

【0102】

本発明の式 I ((P(n) - L(o) - V(p) - H(q) - CH2(r) - CH3(

s)) (t))では、式IのV、H、CH2、CH3部分は、任意の適切なヒトまたはヒトに適合した配列(例えば表1に提示するような)であることができ、ここで抗体配列の部分的可変領域は、限定するわけではないが表1に記載するような少なくとも1つの配列番号47~55の少なくとも1つの部分、またはその断片であることができ、さらに場合により2004年6月24日に出願し、そして2005年1月20日に公開されたPCT国際公開第05/05604号パンフレット(PCT US04/19898)の図1~9に記載されたような少なくとも1つの置換、挿入または欠失を含んでなり(配列番号1~9に対応する):そしてここでCH2、CH3およびヒンジ領域は、限定するわけではないが表1に記載するような少なくとも1つの配列番号56~64の少なくとも1つの部分、またはその断片であることができ、さらに場合により2004年6月24日に出願し、そして2005年1月20日に公開されたPCT国際公開第05/05604号パンフレット(PCT US04/19898)の図32~40に記載されたような少なくとも1つの置換、挿入または欠失を含んでなり(配列番号32~40に対応する)、または当該技術分野で知られているような配列、またはその組み合わせもしくはコンセンサス配列、またはその任意の融合タンパク質、好ましくはヒトに投与した時に免疫原性を最少にするために操作されたヒト起源のものであることができる。

10

【0103】

P部分は、限定するわけではないが配列番号1に提示されるような、またはその任意の組み合わせもしくはコンセンサス配列のような当該技術分野で知られ、または本明細書に記載する少なくとも1つのGLP-1治療用ペプチド、またはその融合タンパク質を含んでなることができる。好適な態様では、P部分は少なくとも1つの配列番号6の配列、またはその組み合わせもしくはコンセンサス配列を有する少なくとも1つのGLP-1ペプチド、またはその任意の融合タンパク質を含んでなることができる。

20

【0104】

任意のリンカー配列は、当該技術分野で知られているような任意の適切なペプチドリリンカーであることができる。好適な配列にはGおよびSの組み合わせ、例えばX1-X2-X3-X4-...-Xnを含み、ここでXはGまたはSであることができ、そしてnは5~30であることができる。非限定的例には、GS、GGS、GGGS(配列番号16)、GSGGS(配列番号17)、GGSGGGS(配列番号18)、GGSGGGS GG(配列番号19)およびGGGS GGGS GG(配列番号20)等を含む。

30

【0105】

機能に必須な本発明のGLP-1ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーションのアミノ酸は、位置指定突然変異誘発法またはアラニン走査突然変異誘発法(例えばAusubel、同上、第8、15章;Cunningham and Wells, Science 244:1081-1085(1989))のような当該技術分野で知られている方法により同定することができる。後者の手法は、1つのアラニン突然変異を分子の各残基に導入する。次いで生じた変異体分子は、限定するわけではないが本明細書に特定し、または当該技術分野で知られているような少なくとも1つのタンパク質関連活性のような生物学的活性について試験される。またGLP-1ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーションの結合に重要な部位は、結晶化、核磁気共鳴法または光親和性(photoaffinity)標識のような構造的解析により同定することができる(Smith, et al, J. Mol. Biol. 224:899-904(1992)およびde Vos, et al, Science 255:306-312(1992))。

40

【0106】

本発明のミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーションは、式(I)のP部分として、例えば限定するわけではないが少なくとも配列番号1および6の少なくとも一部分を含んでなることができる。GLP-1ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーションは、さらに式(I)のP部分として少なくとも1つのポリペプチドの少なくとも1つの機能的部分、配列番号1および6の少なくとも1つの少なくとも90~100%を場合により含んでなることができる。上に列挙した活性の少なくとも1つを強化または維持す

50

ることができる非限定的なバリエーションには、限定するわけではないが、該GLP-1ミメティポディの適切な生物学的活性もしくは機能に有意な影響を及ぼさない置換、挿入もしくは欠失の少なくとも1つに対応する少なくとも1つの突然変異をさらに含んでなる任意の上記ポリペプチドを含む。

【0107】

1つの態様では、Pアミノ酸配列またはその部分は、配列番号1および6の少なくとも1つに対応する部分のアミノ酸配列に対応する約90~100%の同一性(すなわち90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100またはその中の任意の範囲および値)を有する。好ましくは90~100%のアミノ酸同一性(すなわち90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100またはその中の任意の範囲および値)は、当該技術分野で知られているような適切なコンピュータアルゴリズムを使用して決定される。

10

【0108】

本発明のミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーションは、本発明のGLP-1ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーションに由来する任意の数の連続したアミノ酸残基を含んでなることができ、ここでその数はGLP-1ミメティポディ中の連続残基の10~100%の数からなる整数群から選択される。場合により連続するアミノ酸のこの部分列(subsequence)は、少なくとも約2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250以上のアミノ酸長、またはその中の任意の範囲もしくは値である。さらにそのような部分列の数は、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20以上のような1から20からなる群から選択される任意の整数であることができる。

20

【0109】

当業者は、本発明が少なくとも1つの生物学的に活性な本発明のGLP-1ミメティポディまたは特定部分またはバリエーションを含むと考えるだろう。生物学的に活性なミメティポディまたは特定部分またはバリエーションは、天然(非-合成)、内因性または関連する、および既知の挿入され、または融合されたタンパク質または特定部分またはバリエーションの少なくとも20%、30%または40%、そして好ましくは少なくとも50%、60%または70%、そして最も好ましくは少なくとも80%、90%または95%~100%の比活性を有する。酵素活性および基質特異性を測定するアッセイおよび定量法は、当業者には周知である。

30

【0110】

別の観点では、本発明は有機部分の共有結合により修飾された本明細書に記載するヒトのミメティポディおよびリガンド結合フラグメントに関する。そのような修飾は改善された薬物動態学的特性(例えばインピボ血清半減期の上昇)を持つGLP-1ミメティポディまたはリガンド結合フラグメントを生じることができる。この有機部分は直鎖または分岐した親水性のポリマー性基、脂肪酸基、または脂肪酸エステル基であることができる。特定の態様では親水性のポリマー性基は約800~約120,000ダルトンの分子量を有することができる、そしてポリアルカングリコール(例えばポリエチレングリコール(PEG)、ポリプロピレングリコール(PPG))、炭水化物ポリマー、アミノ酸ポリマーまたはポリビニルピロリドンであることができ、そして脂肪酸または脂肪酸エステル基は約8~約40個の炭素原子を含んで成ることができる。

40

【0111】

本発明の修飾されたミメティポディおよびリガンド結合フラグメントは、直接的または間接的にGLP-1ミメティポディまたは特定部分またはバリエーションに共有的に結合した1以上の有機部分を含んで成ることができる。本発明のGLP-1ミメティポディまたは

50

リガンド結合フラグメントに結合する各有機部分は、独立して親水性ポリマー性基、脂肪酸基または脂肪酸エステル基であることができる。本明細書で使用する用語「脂肪酸」は、モノ-カルボン酸およびジ-カルボン酸を包含する。本明細書で使用する用語「親水性のポリマー性基」とは、水中でオクタン中よりも溶解性の有機ポリマーを指す。例えばポリリシンは水中でオクタン中より可溶性である。すなわちポリリシンの共有結合により修飾されたGLP-1ミメティポディは、本発明に包含される。本発明のミメティポディを修飾するために適する親水性ポリマーは直鎖または分岐であることができ、そして例えばポリアルカングリコール（例えば、PEG、モノメトキシ-ポリエチレングリコール（mPEG）、PPG等）、炭水化物（例えばデキストラン、セルロース、オリゴ糖、多糖等）、親水性アミノ酸のポリマー（例えばポリリシン、ポリアルギニン、ポリアスパルテート等）、ポリアルカンオキシド（例えばポリエチレンオキシド、ポリプロピレンオキシド等）、およびポリビニルピロリドンを含む。好ましくは本発明のGLP-1ミメティポディを修飾する親水性ポリマーは、別個の分子量の物体として約800～約150,000ダルトンの分子量を有する。例えばPEG₂₅₀₀、PEG₅₀₀₀、PEG₇₅₀₀、PEG₉₀₀₀、PEG₁₀₀₀₀、PEG₁₂₅₀₀、PEG₁₅₀₀₀およびPEG_{20,000}（ここで下付文字は、ダルトンでのポリマーの平均分子量である）を使用することができる。

10

【0112】

親水性のポリマー性基は1～約6個のアルキル、脂肪酸または脂肪酸エステル基で置換することができる。脂肪酸または脂肪酸エステル基で置換される親水性ポリマーは、適当な方法を使用することにより調製することができる。例えばアミン基を含んで成るポリマーは、脂肪酸または脂肪酸エステルのカルボキシレートにカップリングすることができ、そして脂肪酸または脂肪酸エステル上で活性化されたカルボキシレート（例えばN,N-カルボニルジイミダゾールにより活性化される）を、ポリマー上のヒドロキシル基にカップリングすることができる。

20

【0113】

本発明のミメティポディを修飾するために適切な脂肪酸および脂肪酸エステルは飽和であることができ、あるいは1もしくは複数の不飽和単位を含むことができる。本発明のミメティポディを修飾するために適切な脂肪酸には、例えばn-ドデカノエート（C₁₂、ラウレート）、n-テトラデカノエート（C₁₄、ミリストート）、n-オクタデカノエート（C₁₈、ステアレート）、n-エイコサノエート（C₂₀、アラキデート）、n-ドコサノエート（C₂₂、ベヘネート）、n-トリアコンタノエート（C₃₀）、n-テトラコンタノエート（C₄₀）、シス-9-オクタデカノエート（C₁₈、オレート）、オールシス-5,8,11,14-エイコサテトラエノエート（C₂₀、アラキドネート）、オクタン二酸、テトラデカン二酸、オクタデカン二酸、ドコサン二酸等を含む。適当な脂肪酸エステルには、直鎖もしくは分枝低級アルキル基を含んで成るジカルボン酸のモノ-エステルを含む。低級アルキル基は、1から約12、好ましくは1から約6個の炭素原子を含んで成ることができる。

30

【0114】

修飾されたヒトミメティポディおよびリガンド結合フラグメントは、1もしくは複数の修飾剤を用いた反応によるような適当な方法を使用して調製することができる。本明細書で使用する用語「修飾剤」は、活性化基を含んで成る適当な有機基（例えば親水性ポリマー、脂肪酸、脂肪酸エステル）を指す。「活性化基」は、適当な条件下で第2の化学基と反応し、これにより修飾剤と第2の化学基との間に共有結合を形成することができる化学的部分または官能基である。例えばアミン反応性の活性化基には、トシラート、メシラート、ハロ（クロロ、プロモ、フルオロ、ヨード）、N-ヒドロキシスクシンイミジルエステル（NH₅）等のような求電子性基を含む。チオールと反応することができる活性化基には、例えばマレイミド、ヨードアセチル、アクリロリル、ピリジルスルフィド、5-チオール-2-ニトロ安息香酸チオール（TNB-チオール）等を含む。アルデヒド官能基をアミンまたはヒドラジドを含有する分子にカップリングさせることができ、そしてア

40

50

ジド基を三価のリン基と反応させてホスホルアミデートまたはホスホルイミド結合を形成することができる。活性化基を分子に導入する適当な方法は、当該技術分野で既知である（例えば、Hermanson, G. T. 生物結合法 (Bioconjugate Techniques)、アカデミック出版；サンディエゴ、カリフォルニア州、(1996)を参照にされたい)。活性化基は有機基（例えば親水性ポリマー、脂肪酸、脂肪酸エステル）に直接、またはリンカー部分、例えば二価のC₁-C₁₂基（ここで1もしくは複数の炭素原子が酸素、窒素または硫黄のようなヘテロ原子に置き換わることができる）を介して結合させることができる。適当なリンカー部分には、例えばテトラエチレングリコール、-(CH₂)₃-、-NH-(CH₂)₆-NH-、-(CH₂)₂-NH-および-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-NH-を含む。リンカー部分を含んで成る修飾剤は、例えばモノ-Boc-アルキルジアミン（例えばモノ-Boc-エチレンジアミン、モノ-Boc-ジアミノヘキサン）を、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)の存在下で脂肪酸と反応させて、遊離アミンと脂肪酸カルボキシレートとの間にアミド結合を形成することにより生成することができる。Boc保護基はトリフルオロ酢酸(TFA)を用いた処理により生成物から除去し、記載した別のカルボキシレートにカップリングすることができる1級アミンを露出することができるか、または無水マレイン酸と反応させ、そして生じた生成物を環化して脂肪酸の活性化マレイミド誘導体を生成することができる（例えばThompson, et al., 国際公開第92/16221号パンフレットを参照にされたい（この教示は全部、引用により本明細書に編入する））。

10

20

【0115】

本発明の修飾したミメティポディは、ヒトGLP-1ミメティポディまたはリガンド結合フラグメントを修飾剤と反応させることにより生成することができる。例えば有機部分は、アミン-反応性修飾剤（例えばPEGのNHSエステル）を使用することにより、非-部位特異的様式でGLP-1ミメティポディに結合させることができる。修飾したヒトミメティポディまたはリガンド結合フラグメントは、GLP-1ミメティポディまたはリガンド結合フラグメントのジスルフィド結合（例えば鎖内ジスルフィド結合）を還元することにより調製することもできる。還元されたGLP-1ミメティポディまたはリガンド結合フラグメントは、次いでチオール-反応性の修飾剤と反応させて、本発明の修飾されたGLP-1ミメティポディを生成することができる。本発明のGLP-1ミメティポディまたは特定部分またはバリエーションの特異的部位に結合する有機部分を含んで成る修飾されたヒトミメティポディおよびリガンド結合フラグメントは、逆タンパク質溶解(Fisch et al., Bioconjugate Chem., 3:147-153(1992); Werlen et al., Bioconjugate Chem., 5:411-417(1994); Kumaran et al., Protein Sci. 6(10):2233-2241(1997); Itoh et al., Bioorg. Chem., 24(1):59-68(1996); Capellas et al., Biotechnol. Bioeng., 56(4):456-463(1997)のような適当な方法、およびHermanson, G. T., 生物結合法 (Bioconjugate Techniques)、アカデミック出版；サンディエゴ、カリフォルニア州(1996)に記載されている方法を使用して調製することができる。

30

40

【0116】

GLP-1ミメティポディ組成物

また本発明は、自然には存在しない組成物、混合物または形態で提供される、本明細書に記載し、かつ/または当該技術分野で既知であるような少なくとも1つの、少なくとも2つの、少なくとも3つの、少なくとも4つの、少なくとも5つの、少なくとも6以上のミメティポディまたはその特定部分またはバリエーションを含んで成る、少なくとも1つのGLP-1ミメティポディまたは特定部分またはバリエーション組成物を提供する。そのような組成物の割合は、当該技術分野で既知の、または本明細書に記載するような液体もしくは乾燥溶液、混合物、懸濁液、乳液またはコロイドとしての重量、容量、濃度、容量モル濃

50

度または重量モル濃度による。

【0117】

そのような組成物は、限定するわけではないが0.00001、0.00003、0.00005、0.00009、0.0001、0.0003、0.0005、0.0009、0.001、0.003、0.005、0.009、0.01、0.02、0.03、0.05、0.09、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.3、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、99.1、99.2、99.3、99.4、99.5、99.6、99.7、99.8、99.9%のような、当該技術分野で既知の、または本明細書に記載するような液体、ガスもしくは乾燥溶液、混合物、懸濁液、乳液またはコロイドとしての重量、容量、濃度、容量モル濃度またはモル重量濃度で0.00001~99.9999パーセントを含んでなることができる。本発明のそのような組成物は、このように限定するわけではないが0.00001~100mg/mlおよび/または0.00001~100mg/gを含む。

10

20

【0118】

組成物は場合により、さらに少なくとも1つの肥満関連薬、抗感染薬、心血管(CV)系薬、中枢神経系(CNS)薬、自律神経系(ANS)薬、気道薬、胃腸管(GI)薬、ホルモン薬、流体もしくは電解質バランスのための薬剤、血液製剤、抗腫瘍薬、免疫調節薬、目、耳もしくは鼻の薬、局所薬、栄養剤等から選択される少なくとも1つの化合物またはタンパク質の有効量を含んでなることができる。そのような薬剤は当該技術分野では周知であり、本明細書で提示するそれぞれについて製剤、適用、投薬および投与を含む(例えばNursing 2001 薬剤のハンドブック(Handbook of Drugs)、第21版、スプリングハウス(Springhouse)社、スプリングハウス、ペンシルバニア州、2001:健康の専門家の薬剤ガイド(Health Professionals' Drug Guide)2001、編集、Shannon, Wilson, Stang、プレントイス-ホール(Prentice-Hall)社、アッパー サドル リバー、ニュージャージー州;薬理治療ハンドブック(Pharmacotherapy Handbook)、Wells et al、編集、アペルトン&ランゲ(Appleton & Lange)、スタムフォード、コネチカット州を参照にされたい(それぞれ引用により全部、本明細書に編入する))。

30

【0119】

肥満関連薬は、脂肪異化作用化合物または処置、カフェイン、グリタゾン、インスリンおよび誘導体、スルホニルウレア、メグリチニド、ビグアニド(biguanide)、アルファ-グルコシダーゼインヒビター、タンパク質チロシンホスファターゼ-1B、グリコーゲンシンターゼキナーゼ3、糖新生インヒビター、ピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ(PDH)インヒビター、脂肪分解インヒビター、脂肪酸化インヒビター、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼIおよび/またはIIインヒビター、ベータ-3アドレノレセプターアゴニスト、ナトリウムおよびグルコースコトランスポーター(SGLT)インヒビターの少なくとも1つ、あるいは自己免疫抑制、免疫調節、T細胞の活性化、増殖、移動および/またはサプレッサー細胞機能、T細胞受容体/ペプチド/MHC-II相互作用の阻害、T細胞アネルギーの誘導、自己反応性T細胞の欠失、血液脳関門をわたるトラフィックの減少、炎症性(pro-inflammatory)(Th1)および免疫調節(immunomodulatory)(Th2)サイトカインのバランスの変化、マトリックスメタロプロテアーゼインヒビターの阻害、神経保護、グリオ

40

50

ーシスの減少、再 - 髄鞘形成の促進の 1 もしくは複数に作用する化合物の少なくとも 1 つであることができる。

【0120】

G I 管薬は、制酸、吸着薬、抗発張剤 (a n t i f l a t u l e n t)、消化酵素、胆石溶解剤、止瀉薬、緩下薬、制吐薬および抗潰瘍薬から選択される少なくとも 1 つであることができる。ホルモン薬はコルチコステロイド、アンドロゲン、同化性ステロイド、エストロゲン、プロゲステロン、ゴナドトロピン、抗糖尿病薬から選択される少なくとも 1 つ、少なくとも 1 つのグルカゴン、甲状腺ホルモン、甲状腺ホルモンアンタゴニスト、下垂体ホルモン、および副甲状腺様薬であることができる。流体および電解質バランスのための薬剤は、利尿剤、電解質、代替溶液、酸化剤およびアルカリ化剤から選択される少なくとも 1 つであることができる。血液製剤は造血薬、抗凝固薬、血液誘導体および血栓溶解酵素から選択される少なくとも 1 つであることができる。抗腫瘍薬はアルキル化剤、代謝拮抗物質、抗生物質系抗腫瘍薬、ホルモンバランスを改変する抗腫瘍薬、および種々雑多な抗腫瘍性薬から選択される少なくとも 1 つであることができる。免疫調節薬は免疫抑制剤、ワクチン、毒素、抗毒素、抗蛇毒素、免疫血清および生物学的応答モディファイヤーから選択される少なくとも 1 つであることができる。目、耳および鼻の薬は、目の抗感染薬、目の抗炎症薬、縮瞳薬、散瞳薬、目の血管収縮薬および種々雑多な目、耳、鼻の薬から選択される少なくとも 1 つであることができる。局所薬は局所用抗感染薬、殺疥癬虫薬、殺シラミ薬および局所用コルチコステロイドから選択される少なくとも 1 つであることができる。栄養剤はビタミン、無機物または熱量源 (c a l o r i c) から選択される少なくとも 1 つであることができる。例えばナーシング 2001 ドラッグハンドブック (N u r s i n g 2001 D r u g H a n d b o o k)、同上を参照にされたい。

10

20

【0121】

少なくとも 1 つの制酸薬、吸着薬または抗発張薬は、炭酸アルミニウム、水酸化アルミニウムおよび炭酸カルシウム、マгалドレート、水酸化マグネシウム、酸化マグネシウム、シメチコン、重炭酸ナトリウムから選択される少なくとも 1 つであることができる。少なくとも 1 つの消化酵素または胆石溶解薬は、パンクレアチン、パンクレリパーゼおよびウルソジオール (u r s o d i o l) から選択される少なくとも 1 つであることができる。少なくとも 1 つの止瀉薬はアタパルジャイト、次サリチル酸ビスマス、ポリカルボフィルカルシウム、塩酸ジフェノキシレートもしくは硫酸アトロピン、ロペラミド、酢酸オクトレオチド (o c t r e o t i d e)、オピウムチンキ、オピウムチンキ (樟脳処理) から選択される少なくとも 1 つであることができる。少なくとも 1 つの緩下薬は、ピソコジル (b i s o c o d y l)、ポリカルボフィルカルシウム、カスカラサグラダ、カスカラサグラダ芳香性流エキス剤、カスカラサグラダ流エキス剤、ひまし油、ドキュセートカルシウム、ドキュセートナトリウム、グリセリン、ラクチュロース、クエン酸マグネシウム、水酸化マグネシウム、硫酸マグネシウム、メチルセルロース、鉱物油、ポリエチレングリコールもしくは電解質溶液、車前子 (p s y l l i u m)、センナ、リン酸ナトリウムから選択される少なくとも 1 つであることができる。少なくとも 1 つの制吐薬は、塩酸クロルプロマジン、ジメンヒドリネート、メシル酸ドラセトロン (d o l a s e t r o n)、ドロナビノール、塩酸グラニセトロン (g r a n i s e t r o n)、塩酸メクリジン、塩酸メトクロプラミド、塩酸オンダンセトロン、ペルフェナジン、プロクロルペラジン、プロクロルペラジンエジシレート (e d i s y l a t e)、マレイン酸プロクロルペラジン、塩酸プロメタジン、スコポラミン、マレイン酸チエチルペラジン、塩酸トリメトベンザミドから選択される少なくとも 1 つであることができる。少なくとも 1 つの抗潰瘍薬は、シメチジン、塩酸シメチジン、ファモチジン、ランソプラゾール (l a n s o p r a z o l e)、ミソプロストール、ニザチジン、オメプラゾール、ラベプラゾールナトリウム、クエン酸ランチジン (r a n t i d i n e) ビスマス、塩酸ラニチジン、スクラルフェートから選択される少なくとも 1 つであることができる。(例えばナーシング 2001 ドラッグハンドブックの第 643 ~ 95 頁を参照されたい。) 少なくとも 1 つの抗糖尿病薬またはグルカオンはアカルボース、クロロプロバミド、グリメピリド (g l i m e

30

40

50

piride)、グリピジド(glipizide)、グルカゴン、グリブリド、インスリン、塩酸メトホルミン、ミグリトール(migliitol)、塩酸ピオグリタゾン(pioglitazone)、レパグリニド(repaglinide)、マレイン酸ロシグリタゾン(rosiglitazone)、トログリタゾンから選択される少なくとも1つであることができる。少なくとも1つの甲状腺ホルモンは、レボチロキシン(levothyroxine)ナトリウム、リオチロニン(liothyronine)ナトリウム、リオトリックス(liotrix)、チロイド(thyroid)から選択される少なくとも1つであることができる。少なくとも1つの甲状腺ホルモンアンタゴニストは、メチマゾール、ヨウ化カリウム、ヨウ化カリウム(飽和溶液)、プロピルチオウラシル、放射性ヨウ素(ヨウ化ナトリウム¹³¹I)、強いヨウ素溶液から選択される少なくとも1つであることができる。少なくとも1つの下垂体ホルモンは、コルチコトロピン、コシントロピン、酢酸デスマプレシン、酢酸ロイプロリド、rGLP-1シトリ-コルチコトロピン、ソマトレム、ソマトロピン、バソプレッシンから選択される少なくとも1つであることができる。少なくとも1つの副甲状腺様薬は、カルシフェジオール(calcifediol)、カルシトニン(ヒト)、カルシトニン(サケ)、カルシトリオール、ジヒドロタキステロール(dihydrotachysterol)、エチドロネートナトリウムから選択される少なくとも1つであることができる。(例えばナーシング 2001 ドラッグハンドブックの第696~796頁を参照されたい。)

少なくとも1つの利尿剤は、アセタゾラミド、アセタゾラミドナトリウム、塩酸アミロライド、ブメタニド(bumetanide)、クロルタリドン、エタクリネートナトリウム、エタクリン酸、フロセミド、ヒドロクロロチアジド、インダパミド(indapamide)、マンニトール、メトラゾン、スピロノラクトン、トルセミド(torsemide)、トリアムテレン、尿素から選択される少なくとも1つであることができる。少なくとも1つの電解質または代替溶液は、酢酸カルシウム、炭酸カルシウム、塩化カルシウム、クエン酸カルシウム、カルシウムグルビオネート、カルシウムグルセプテート、グルコン酸カルシウム、乳酸カルシウム、リン酸カルシウム(二塩基性)、リン酸カルシウム(三塩基性)、デキストラン(高分子量)、デキストラン(低分子量)、ヘタスターチ、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウム、酢酸カリウム、重炭酸カリウム、塩化カリウム、グルコン酸カリウム、リンゲル注射液、リンゲル注射液(乳酸化)、塩化ナトリウムから選択される少なくとも1つであることができる。少なくとも1つの酸性化剤またはアルカリ性化剤は、重炭酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、トロメタミンから選択される少なくとも1つであることができる。(例えばナーシング 2001 ドラッグハンドブックの第797~833頁を参照されたい。)

【0122】

少なくとも1つの造血薬は、フマル酸鉄、グルコン酸鉄、硫酸鉄、硫酸鉄(乾燥化)、デキストラン鉄、ソルビトール鉄、多糖-鉄錯体、グルコン酸鉄ナトリウム錯体から選択される少なくとも1つであることができる。少なくとも1つの抗凝固薬は、アルデパリン(ardeparin)ナトリウム、ダルテパリン(dalteparin)ナトリウム、ダナパロイド(danaparoid)ナトリウム、エノキサパリン(enoxaparin)ナトリウム、ヘパリンカルシウム、ヘパリンナトリウム、ワルファリンナトリウムから選択される少なくとも1つであることができる。少なくとも1つの血液誘導体は、アルブミン5%、アルブミン25%、抗血友病因子、抗-インヒビター凝固複合体、アンチトロンビンIII(ヒト)、第IX因子(ヒト)、第IX因子複合体、血漿タンパク質画分から選択される少なくとも1つであることができる。少なくとも1つの血栓溶解酵素はアルテプラゼ(alteplase)、アニストレプラゼ(anistreplase)、レテプラゼ(reteplase)(組換え)、ストレプトキナーゼ、ウロキナーゼから選択される少なくとも1つであることができる。(例えばナーシング 2001 ドラッグハンドブックの第834~66頁を参照されたい。)

【0123】

少なくとも1つの局所抗感染剤は、アシクロビル、アンフォテリシンB、アゼラ酸(a

zelaic acid) クリーム、バシトラシン、硝酸ブトコナゾール、リン酸クリンダマイシン、クロトリマゾール、硝酸エコナゾール、エリスロマイシン、硫酸ゲンタマイシン、ケトコナゾール、酢酸マフェナイド、メトロニダゾール(局所)、硝酸ミコナゾール、ムピロシン(mupirocin)、塩酸ナフチファイン、硫酸ネオマイシン、ニトロフラゾン、ニスタチン、銀スルファジアジン、塩酸テルビナファイン(terbinafine)、テルコナゾール(terconazole)、塩酸テトラサイクリン、チオコナゾール、トルナフテートから選択される少なくとも1つであることができる。少なくとも1つの殺疥癬虫薬または殺シラミ薬は、クロタミトン、リンダン、ペルメトリン(permethrin)およびピレトリンから選択される少なくとも1つであることができる。少なくとも1つの局所コルチステロイドは、ベタメタゾンジプロピオネート、吉草酸ベタメタゾン、プロピオン酸クロベタゾール、デソニド、デスオキシメタゾン、デキサメタゾン、リン酸ナトリウムデキサメタゾン、ジフロラゾンジアセテート、フルオシノロンアセトニド、フルオシノニド、フルランドレノリド、プロピオン酸フルチカゾン(fluticasone)、ハルシオニド(halcionide)、ヒドロコルチゾン、酢酸ヒドロコルチゾン、酪酸ヒドロコルチゾン、吉草酸ヒドロコルチゾン、モメタゾンフロエート(mometasone furoate)、トリアムシノロンアセトニドから選択される少なくとも1つであることができる。(例えばナーシング 2001 ドラッグハンドブックの第1098~1136頁を参照されたい。)

少なくとも1つのビタミンまたは無機物は、ビタミンA、ビタミンB複合体、シアノコバラミン、葉酸、ヒドロキソコバラミン、ロイコボリンカルシウム、ナイアシン、ナイアシンアミド、塩酸ピリドキシン、リボフラビン、塩酸チアミン、ビタミンC、ビタミンD、コレカルシフェロール、エルゴカルシフェロール、ビタミンD類似体、ドキセルカルシフェロール(doxercalciferol)、パリカルシトール(paricalcitol)、ビタミンE、ビタミンK類似体、フィトナジオン、弗化ナトリウム、弗化ナトリウム(局所)、微量元素、クロム、銅、ヨウ素、マンガン、セレン、亜鉛から選択される少なくとも1つであることができる。少なくとも1つの熱量源は、アミノ酸浸剤(結晶)、デキストロース中のアミノ酸浸剤、電解質とのアミノ酸浸剤、デキストロース中の電解質とのアミノ酸浸剤、肝不全のためのアミノ酸浸剤、高代謝ストレスのためのアミノ酸浸剤、腎不全のためのアミノ酸浸剤、デキストロース、脂肪乳剤、中鎖トリグリセリドから選択される少なくとも1つであることができる。(例えばナーシング 2001 ドラッグハンドブックの第1137~63頁を参照されたい。)

【0124】

本発明のGLP-1ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーション組成物は、さらに限定するわけではないが希釈剤、結合剤、安定化剤、バッファー、塩、親油性溶媒、保存剤、アジュバント等のような少なくとも1つの任意の適切な補助剤を含んで成ることができる。製薬学的に許容される補助剤が好適である。そのような滅菌溶液の非限定的な例および調製法は、限定するわけではないがGennaro、編集、レミングトンの製薬科学、第18版、メルク出版社(イーストン、ペンシルバニア州)1990のように当該技術分野では周知である。GLP-1ミメティポディ組成物の投与様式、溶解性および/または安定性に適する製薬学的に許容され得る担体は日常的に、ならびに当該技術分野で周知であるように、または本明細書に記載するように通常に選択され得る。

【0125】

本組成物に有用な製薬学的賦形剤および添加剤には、限定するわけではないがタンパク質、ペプチド、アミノ酸、脂質および炭水化物(例えば単糖、二-、三-、四-およびオリゴ糖、アルジトール、アルドン酸、エステル化糖のような誘導化糖、および多糖または糖ポリマーを含む糖類)を含み、これらは単独で、または1~99.99重量もしくは容量%の組み合わせで存在することができる。例示的タンパク質は賦形剤は、ヒト血清アルブミン(HSA)、組換えヒト血清アルブミン(rHA)のような血清アルブミン、ゼラチン、カゼイン等を含む。緩衝能においても機能し得る代表的なアミノ酸/GLP-1ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーション成分には、アラニン、グリシン、アル

10

20

30

40

50

ギニン、ベタイン、ヒスチジン、グルタミン酸、アスパラギン酸、システイン、リシン、ロイシン、イソロイシン、バリン、メチオニン、フェニルアラニン、アスパルテーム等を含む。1つの好適なアミノ酸はグリシンである。

【0126】

本発明の使用に適する炭水化物賦形剤には、例えばフルクトース、マルトース、ガラクトース、グルコース、D-マンノース、ソルボース等のような単糖、ラクトース、シュクロース、トレハロース、セルビオース糖の二糖、ラフィノース、メレジトース、マルトデキストリン、デキストラン、澱粉糖の多糖、およびマンニトール、キシリトール、マルチトール、ラクチトール、キシリトール、ソルビトール(グルシトール)、ミオイノシトール等のアルジトールを含む。本発明の使用に適する好適な炭水化物賦形剤は、マンニトール、トレハロースおよびラフィノースである。

10

【0127】

GLP-1ミメティボディ組成物は、バッファーまたはpH調整剤を含むこともでき；典型的にはバッファーは有機酸または塩基から調製される塩である。代表的なバッファーには、クエン酸、アスコルビン酸、グルコン酸、カルボン酸、酒石酸、コハク酸、酢酸またはフタル酸の塩のような有機酸塩；Tris、トロメタミン塩酸塩またはリン酸バッファーを含む。本組成物の使用に好適なバッファーはクエン酸塩のような有機酸塩である。

【0128】

さらに本発明のGLP-1ミメティボディもしくは特定部分もしくはバリエーション組成物は、ポリビニルピロリドン、フィコール(ポリマー性糖)、デキストレート(例えば2-ヒドロキシプロピル-シクロデキストリンのようなシクロデキストリン)、ポリエチレングリコールのようなポリマー性賦形剤/添加剤、風味剤、抗微生物剤、甘味剤、酸化防止剤、帯電防止剤、表面活性剤(例えば“TWEEN 20”および“TWEEN 80”のようなポリソルベート)、脂質(例えばリン脂質、脂肪酸)、ステロイド(例えばコレステロール)およびキレート化剤(例えばEDTA)を含むことができる。

20

【0129】

本発明によるGLP-1ミメティボディ組成物で使用するために適するこれらのおよびさらに知られている製薬学的賦形剤および/または添加剤は当該技術分野では既知であり、例えば「レミングトン：薬学の科学&実践(Remington: The Science & Practice of Pharmacy)」、第19版、ウィリアムス&ウィリアムス(Williams & Williams)、(1995)および「医師の卓上レファレンス(Physician's Desk Reference)」、第52版、メディカルエコノミクス、モンタレー、ニュージャージー州(1998)に列挙され、この開示は引用により全部、本明細書に編入する。好適なキャリアーまたは賦形剤材料は炭水化物(例えば糖およびアルジトール)およびバッファー(例えばクエン酸塩)またはポリマー性剤である。

30

【0130】

製剤

上記のように本発明は安定な製剤を提供し、これは好ましくは食水または選択した塩を含む適当なバッファー、ならびに保存剤を含有する任意選択の保存溶液および製剤、ならびに製薬学的または獣医学的使用に適する多用途保存製剤であり、少なくとも1つのGLP-1ミメティボディもしくは特定部分もしくはバリエーションを製薬学的に許容される製剤中に含んで成る。保存製剤は少なくとも1つの既知の保存剤または任意に少なくとも1つのフェノール、m-クレゾール、p-クレゾール、o-クレゾール、クロロクレゾール、ベンジルアルコール、亜硝酸フェニル水銀、フェノキシエタノール、ホルムアルデヒド、クロロブタノール、塩化マンガン(例えばヘキサヒドレート)、アルキルパラベン(メチル、エチル、プロピル、ブチル等)、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンズエトニウム、デヒドロ酢酸ナトリウムおよびチメロサル、またはそれらの混合物から成る群から選択される保存剤を水性希釈剤中に含む。適当な濃度または混合物は、0.001~5%のような、または限定するわけではないが0.001、0.003、0.005、0.009、

40

50

0.01、0.02、0.03、0.05、0.09、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.3、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9またはこの中の任意の範囲または値のような、当該技術分野で知られているように使用することができる。非限定的な例には、保存剤なし、0.1~2% m-クレゾール（例えば0.2、0.3、0.4、0.5、0.9、1.0%）、0.1~3%ベンジルアルコール（例えば0.5、0.9、1.1、1.5、1.9、2.0、2.5%）、0.001~0.5%チメロサル（例えば0.005、0.01）、0.001~2.0%フェノール（例えば0.05、0.25、0.28、0.5、0.9、1.0%）、0.0005~1.0%アルキルパラベン（1つまたは複数）（例えば0.00075、0.0009、0.001、0.002、0.005、0.0075、0.009、0.01、0.02、0.05、0.075、0.09、0.1、0.2、0.3、0.5、0.75、0.9、1.0%）等を含む。

【0131】

上記のように、本発明は包装材料および場合により水性希釈剤中に処方されたバッファーおよび/または保存剤を含む少なくとも1つのGLP-1ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーションの溶液を含んで成る少なくとも1つのバイアルを含んで成る製品を提供し、ここで該包装材料は、そのような溶液が1、2、3、4、5、6、9、12、18、20、24、30、36、40、48、54、60、66、72時間以上保持できることを示すラベルを含んで成る。本発明はさらに、包装材料、凍結乾燥した少なくとも1つのGLP-1ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーションを含んで成る第1バイアル、および処方されたバッファーまたは保存剤の水性希釈剤を含んで成る第2バイアルを含んで成る製品を含んで成り、ここで該包装材料は患者が少なくとも1つのGLP-1ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーションを水性希釈剤中に再構成して、24時間以上の期間にわたり保持できる溶液を形成することを指導するラベルを含んで成る。

【0132】

本発明に従い使用する少なくとも1つのGLP-1ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーションは、哺乳動物細胞または導入遺伝子調製物を含む組換え手段により生産できるか、あるいは本明細書に記載し、または当該技術分野で既知の他の生物起源から精製することができる。

【0133】

本発明の生成物中の少なくとも1つのGLP-1ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーションの量の範囲は、湿潤/乾燥系である場合、構成時に約0.01 μ g/ml~約100mg/mlの濃度を生じる量を含むが、より低および高濃度も操作可能であり、そして意図する送達賦形剤に依存し、例えば溶液組成は経皮用パッチ、肺、経粘膜または浸透圧もしくはマイクロポンプ法とは異なるだろう。

【0134】

好ましくは水性希釈剤は場合によりさらに製薬学的に許容できる保存剤を含んで成る。好適な保存剤には、フェノール、m-クレゾール、p-クレゾール、o-クレゾール、クロロクレゾール、ベンジルアルコール、アルキルパラベン（メチル、エチル、プロピル、ブチル等）、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンズエトニウム、デヒドロ酢酸ナトリウムおよびチメロサル、またはそれらの混合物から成る群から選択されるものを含む。製剤中に使用する保存剤の濃度は、抗-微生物効果を生じるために十分な濃度である。そのような濃度は選択した保存剤に依存し、そして当業者により容易に決定される。

【0135】

他の賦形剤、例えば張性調整剤、バッファー、酸化防止剤、保存強化剤を場合により、そして好ましくは希釈剤に加えることができる。グリセリンのような張性調整剤は既知の

10

20

30

40

50

濃度で通常に使用される。生理学的に耐容されるバッファーは好ましくは改善された pH 制御を提供するために加える。製剤は約 pH 4 ~ 約 pH 10 のような広い pH 範囲を網羅することができ、そして好ましい範囲は約 pH 5 ~ 約 pH 9、そして最も好ましくは約 6.0 ~ 約 8.0 の範囲である。好ましくは本発明の製剤は約 6.8 から約 7.8 の間の pH を有する。好適なバッファーにはリン酸バッファー、最も好ましくはリン酸ナトリウム、特にリン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) を含む。

【0136】

Tween 20 (ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノラウレート)、Tween 40 (ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノパルミテート)、Tween 80 (ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノオレート)、Pluronic F68 (ポリオキシエチレン ポリオキシプロピレン ブロック コポリマー) および PEG (ポリエチレングリコール)、あるいはポリソルベート 20 もしくは 80、またはポリオキサマー 184 もしくは 188、Pluronic (商標) ポリリス (polyls)、他のブロック コポリマーのような非イオン性表面活性剤のような製薬学的に許容される可溶化剤、および EDTA および EGTA のようなキレターのような他の添加剤を、凝集を減らすために製剤または組成物に場合により加えることができる。これらの添加剤は製剤を投与するためにポンプまたはプラスチック容器が使用される場合に特に有用である。製薬学的に許容される表面活性剤の存在は、タンパク質が凝集する傾向を緩和する。

10

【0137】

本発明の製剤は、少なくとも 1 つの GLP-1 ミメティボディもしくは特定部分もしくはバリエーション、およびフェノール、m-クレゾール、p-クレゾール、o-クレゾール、クロロクレゾール、ベンジルアルコール、アルキルパラベン (メチル、エチル、プロピル、ブチル等)、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンズエトニウム、デヒドロ酢酸ナトリウム およびチメロサルまたはそれらの混合物から成る群から選択される保存剤を、水性希釈剤中で混合することを含んで成る方法により調製することができる。少なくとも 1 つの GLP-1 ミメティボディもしくは特定部分もしくはバリエーションおよび保存剤を水性希釈剤中で混合することは、通例の溶解および混合手順を使用して行う。適切な製剤を調製するために、例えば所望の濃度のタンパク質および保存剤を提供するために十分な量で、バッファー溶液中の計測した量で少なくとも 1 つの GLP-1 ミメティボディもしくは特定部分もしくはバリエーションをバッファー溶液中の所望の保存剤と合わせる。この方法の変法は当業者により認識されているだろう。例えば加える成分の順序、さらなる添加剤を使用するのかどうか、製剤が調製される温度および pH は、濃度および使用する投与手段のために至適化され得るすべての因子である。

20

30

【0138】

特許請求する製剤は、透明溶液として、または水、保存剤および / または賦形剤、好ましくはリン酸バッファーおよび / または食塩および選択した塩を水性希釈剤中に含む第 2 バイアルで再構成する凍結乾燥した少なくとも 1 つの GLP-1 ミメティボディもしくは特定部分もしくはバリエーションのバイアルを含んで成る 2 個のバイアルの状態では患者に提供することができる。単一溶液のバイアルまたは再構成が必要な 2 個のバイアルのいずれも複数回、再使用され、そして患者処置の単回または多回サイクルを満たし、そしてこれにより現在利用できるものより都合よい処置法を提供することができる。

40

【0139】

特許請求する製品は、すぐに、そして 24 時間以上の期間にわたり投与するために有用である。したがってここで特許請求する製品は、患者に重要な利点を提供する。本発明の製剤は場合により約 2 ~ 約 40 の温度で安全に保存され、そして長期間にわたりタンパク質の生物活性を保持することができ、すなわちその溶液が 6、12、18、24、36、48、72 または 96 時間以上の期間にわたり保持でき、かつ / または使用できることを示す包装ラベルを付すことを可能とする。保存希釈剤を使用する場合、そのようなラベルは 1 ~ 12 カ月、半年、1 年半および / または 2 年までの少なくとも 1 つの使用を含むことができる。

50

【0140】

本発明の少なくとも1つのGLP-1ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーションの溶液は、少なくとも1つのGLP-1ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーションを水性希釈剤中で混合することを含んで成る方法により調製することができる。混合は通例の溶解および混合手順を使用して行う。適当な希釈剤を調製するためには、例えば所望の濃度のタンパク質および場合により保存剤またはバッファーを提供するために十分な量で、水またはバッファー中に計測した少なくとも1つのGLP-1ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーション量を合わせる。この方法の変法は当業者により認識されているだろう。例えば加える成分の順序、さらなる添加剤を使用するかどうか、製剤が調製される温度およびpHは、濃度および使用する投与の手段のために至適化されるすべての因子である。

10

【0141】

特許請求する製品は、透明溶液として、または水性希釈剤を含む第2バイアルで再構成する凍結乾燥した少なくとも1つのGLP-1ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーションのバイアルを含んで成る2個のバイアルとして患者に提供することができる。単一溶液のバイアルまたは再構成が必要な2個のバイアルのいずれかは多数回、再使用することができる、そして患者処置の単回または多回サイクルを満たし、そしてこれにより現在利用できるものより都合よい処置法を提供する。

【0142】

特許請求する製品は、薬局、医院または他のそのような研究所および施設に、透明溶液または水性希釈剤を含む第2バイアルで再構成する凍結乾燥した少なくとも1つのGLP-1ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーションのバイアルを含んで成る2個のバイアルを提供することより、患者に間接的に提供することができる。この場合、透明溶液は1リットルまで、またはそれより大きなサイズであることができ、大きなりザーバーを提供して、そこからより小さいバイアルに移すために、より少量の少なくとも1つのGLP-1ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーション溶液が1または多数回引き出され、そして薬局または医院により使用者および/または患者に提供され得る。

20

【0143】

これらの単一バイアル系を含んで成る認識されているデバイスは、Humaject (商標)、NovoPen (商標)、B-D (商標) Pen、AutoPen (商標) およびOptiPen (商標) のような溶液送達用のペン型注入デバイスを含む。2個のバイアル系を含んで成る認識されているデバイスは、HumatroPen (商標) のような再構成された溶液を送達するためのカートリッジ中で、凍結乾燥された薬剤を再構成するためのそれらペン-注入系を含む。

30

【0144】

ここで特許請求する製品には包装材料を含む。包装材料は管理会社が必要とする情報に加えて、製品を使用できる条件を提供する。本発明の包装材料は、2つのバイアルの湿潤/乾燥製品について、患者が水性希釈剤中で少なくとも1つのGLP-1ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーションを再構成して溶液を形成し、そして2~24時間以上の期間にわたり溶液を使用するための使用説明を提供する。単一バイアル溶液の製品については、ラベルはそのような溶液が2~24時間以上にわたり使用できることを示す。ここで特許請求する製品は、ヒトの医薬品としての使用に有用である。

40

【0145】

本発明の製剤は少なくとも1つのGLP-1ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーションおよび選択されたバッファー、好ましくは食塩または選択した塩を含むリン酸バッファーを混合することを含んで成る方法により調製することができる。少なくとも1つのGLP-1ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーションおよびバッファーを水性希釈剤中で混合することは、通例の溶解および混合方法を使用して行う。適当な製剤を調製するためには、例えば所望の濃度のタンパク質およびバッファーを提供するために十分な量で、計測した量の少なくとも1つGLP-1ミメティポディもしくは定部分もし

50

くはバリエーションを、水中の所望の緩衝剤と水中で合わせる。この方法の変法は当業者により認識されているだろう。例えば加える成分の順序、さらなる添加剤を使用するかどうか、製剤が調製される温度および pH は、濃度および使用する投与の手段のために最適化され得るすべての因子である。

【0146】

特許請求する安定な、または保存された製剤は、透明溶液として、または水性希釈剤中に保存剤またはバッファーおよび賦形剤を含む第 2 バイアルで再構成する凍結乾燥した少なくとも 1 つの GLP - 1 ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーションのバイアルを含んで成る 2 個のバイアルとして患者に提供することができる。単一溶液のバイアルまたは再構成が必要な 2 個のバイアルのいずれも多数回、再使用することができ、そして

10

【0147】

本明細書に記載する安定な、または保存された製剤または溶液のいずれかの中の少なくとも 1 つの GLP - 1 ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーションは、本発明に従い SC または IM 注射；経皮、肺、経粘膜、インプラント、浸透圧ポンプ、カートリッジ、マイクロポンプまたは当業者により、あるいは当該技術分野で周知であるような他の手段を含む種々の送達法を介して患者に投与することができる。

【0148】

治療的応用

20

またミメティポディに関する本発明は、成人発症または若年性のインスリン依存性、非インスリン依存性等の肥満関連障害を調節し、または処置する方法を提供し、それらには限定するわけではないが細胞、組織、器官、動物または患者におけるインスリン耐性、高血糖、低血糖、膵炎、クッシング症候群 (Sushing's syndrome)、黒色表皮症、脂肪組織萎縮糖尿病、網膜症、ネフロパシー、多発性神経障害、単神経障害、自律性神経障害、潰瘍、足潰瘍、関節の問題、感染 (例えば真菌もしくは細菌性) 等のような随伴する兆候および症状を含む。

【0149】

また本発明は、細胞、組織、器官、動物または患者における少なくとも 1 つの肥満関連免疫疾患をモジュレートまたは処置する方法を提供し、これらの疾患には限定するわけではないが、成人発症または若年性のインスリン依存性、非インスリン依存性等の少なくとも 1 つの I 型または II 型糖尿病気を含み、限定するわけではないがインスリン耐性、非インスリン耐性、高血糖、低血糖、膵炎、クッシング症候群、黒色表皮症、脂肪組織萎縮糖尿病、網膜症、ネフロパシー、多発性神経障害、単神経障害、自律性神経障害、潰瘍、足潰瘍、関節の問題、感染 (例えば真菌もしくは細菌性) 等のような随伴する兆候および症状を含む。例えばメルクマニュアル (Merck Manual)、第 12 ~ 第 17 版、メルク & カンパニー (Merck & Company)、ラーウェイ、ニュージャージー州 (1972、1977、1982、1987、1992、1999)、薬理療法ハンドブック、Wells et al.、編集、第 2 版、アペルトン アンド ランジ、スタムフォード、コネチカット州 (1998、2001) を参照にされたい。各々、引用

30

40

【0150】

そのような方法は場合により、少なくとも 1 つの GLP - 1 ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーションを含んで成る有効量の組成物または製薬学的組成物を、そのようなモジュレーション、処置または治療が必要な細胞、組織、器官、動物または患者に投与することを含んで成る。

【0151】

本発明の任意の方法は、少なくとも 1 つの GLP - 1 ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーションを含んで成る有効量の組成物または製薬学的組成物を、そのようなモジュレーション、処置または治療が必要な細胞、組織、器官、動物または患者に投与する

50

ことを含んで成る。そのような方法は場合よりそのような免疫疾患を処置するためのさらに同時投与または併用療法を含んで成ることができ、ここで該少なくとも1つGLP-1ミメティボディ、それらの特定部分もしくはバリエーションの投与は、さらに事前、同時および/または後に、少なくとも1つのTNFアンタゴニスト（例えば限定するわけではないが、TNF抗体もしくはフラグメント、可溶性TNF受容体もしくはフラグメント、それらの融合タンパク質、または低分子TNFアンタゴニスト）、抗リウマチ薬、筋弛緩剤、麻薬、非-ステロイド系抗炎症剤（NSAID）、鎮痛剤、麻酔薬、鎮静剤、局所麻酔薬、神経筋遮断剤、抗菌剤（例えばアミノグルコシド、抗菌・カビ剤、駆虫剤、抗ウイルス剤、カルバペネム（carbapenem）、セファロsporin、フルオロキノロン（fluroquinolone）、マクロライド、ペニシリン、スルホンアミド、テトラサイクリン、他の抗微生物剤）、止痒剤、コルチコステロイド、同化性ステロイド、糖尿病関連薬、無機類、栄養、甲状腺剤、ビタミン、カルシウム関連ホルモン、止瀉薬、鎮咳剤、制吐剤、抗潰瘍剤、緩下剤、抗凝血剤、エリスロポエチン（例えばGLP-1エチンアルファ）、フィルグラスチム（filgrastim）（例えばG-CSF、Neupogen）、サルグラモスチン（GM-CSF、Leukine）、免疫感作、免疫グロブリン、免疫抑制薬（例えばパシリキシマブ、シクロsporin、ダクリズマブ）、成長ホルモン、ホルモン代用薬、エストロゲン受容体モジュレーター、散瞳薬、毛様体筋麻痺薬、アルキル化薬、代謝拮抗物質、有糸分裂インヒビター、放射性薬品、抗鬱薬、抗躁薬、抗精神病薬、抗不安薬、催眠薬、交換神経作用薬、刺激物質、ドネゼビル、タクリン、喘息薬物療法、ベータアゴニスト、吸入ステロイド、ロイコトリエンインヒビター、メチルキサンチン、クロモリン、エピネフリンもしくは類似体、ドルナーゼアルファ（Pulmozyme）、サイトカインもしくはサイトカインアンタゴニストから選択される少なくとも1つを投与すること含んで成る。適切な投薬用量は、当該技術分野では周知である。例えばWells et al.、編集、薬理療法ハンドブック（Pharmacotherapy Handbook）、第2版、アペルトンアンドランジ（Appleton and Lange）、スタムフォード、コネチカット州（2000）：PDR薬局方、タラスコンポケット薬局方（Tarascon Pocket Pharmacopoeia）2000、豪華版、タラスコン出版社、ローマリング、カリフォルニア州（2000）を参照にされたい（それぞれ引用により全部、本明細書に編入する）。

10

20

30

40

50

【0152】

典型的には病的状態の処置は少なくとも1つのGLP-1ミメティボディ組成物の有効量または投薬用量を投与することにより行われ、この量は用量あたり組成物中に含まれる比活性に依存して投与あたり全部で、平均して、範囲で少なくとも約0.0001から500ミリグラムの少なくとも1つのGLP-1ミメティボディもしくは特定部分もしくはバリエーション/（患者1キログラム）、そして好ましくは単回または多回投与あたり少なくとも約0.001~100ミリグラムのGLP-1ミメティボディもしくは特定部分またはバリエーション/（患者体重1キログラム）である。あるいは効果的な血清濃度は、単回または多回投与あたり0.001~5000 μ g/mlの血清濃度を構成することができる。適当な投薬用量は医師が知っており、そしてもちろん特定の疾患状態、投与する組成物の比活性、および処置を受ける特定の患者に依存する。場合により所望する治療的量を達成するために、繰り返し投与、すなわち特定の監視され、または計量された用量の反復個別投与を提供することが必要となる可能性があり、ここで個別投与は所望の毎日の用量または効果が達成されるまで繰り返される。

【0153】

好適な用量は任意に、0.0001、0.0002、0.0003、0.0004、0.0005、0.0006、0.0007、0.0008、0.0009、0.001、0.002、0.003、0.004、0.005、0.006、0.007、0.008、0.009、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、1

4、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29および/または30mg/kg投与、あるいはそれらの任意の範囲、値または画分を含むことができ、あるいは単回または多回投与あたり0.0001、0.0002、0.0003、0.0004、0.0005、0.0006、0.0007、0.0008、0.0009、0.001、0.002、0.003、0.004、0.005、0.006、0.007、0.008、0.009、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.5、0.9、1.0、1.1、1.2、1.5、1.9、2.0、2.5、2.9、3.0、3.5、3.9、4.0、4.5、4.9、5.5、5.9、6.0、6.5、6.9、7.0、7.5、7.9、8.0、8.5、8.9、9.0、9.5、9.9、10、10.5、10.9、11、11.5、11.9、20、12.5、12.9、13.0、13.5、13.9、14.0、14.5、4.9、5.0、5.5、5.9、6.0、6.5、6.9、7.0、7.5、7.9、8.0、8.5、8.9、9.0、9.5、9.9、10、10.5、10.9、11、11.5、11.9、12、12.5、12.9、13.0、13.5、13.9、14、14.5、15、15.5、15.9、16、16.5、16.9、17、17.5、17.9、18、18.5、18.9、19、19.5、19.9、20、20.5、20.9、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、96、100、200、300、400および/または500μg/ml血清濃度あるいはそれらの任意の範囲、値または画分の血清濃度を達するために含むことができる。

10

20

【0154】

あるいは投与する投薬用量は、特定の薬剤の薬物動態学的特性、およびその投与の様式および経路；受容体の年齢、健康および体重；症状の性質および程度、現行処置の種類、処置の頻度、および所望する効果のような既知の因子に大変依存し得る。通常、有効成分の投薬用量は、体重1キログラムあたり約0.0001~100ミリグラムとなり得る。多くは投与あたり1キログラムにつき0.001~10、そして好ましくは0.001~1ミリグラムであることができ、あるいは徐放性形態が所望の効果をj得るために効果的である。

30

【0155】

非限定的な例として、ヒトまたは動物の処置は、1日あたり0.0002、0.0003、0.0004、0.0005、0.0006、0.0007、0.0008、0.0009、0.001、0.002、0.003、0.004、0.005、0.006、0.007、0.008、0.009、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.9、1.0、1.1、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9または10mg/kgのような0.0001~100mg/kgの本発明の少なくとも1つのGLP-1ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエントを1回に、または周期的用量として、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39または40日に少なくとも1回、あるいは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20週に少なくとも1回、あるいはそれらを組み合わせ、単回、注入または反復投与を使用して提供することができる。

40

【0156】

内部投与に適する剤形(組成物)は、一般に単位または容器あたり約0.0001ミリグラム~約500ミリグラムの有効成分を含む。これらの製薬学的組成物では、有効成分は通常、組成物の総重量に基づき約0.5~99.999重量%の量で存在するだろう。

【0157】

非経口投与には、GLP-1ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエントは溶

50

液、懸濁液、乳液または凍結乾燥粉末として製剤することができ、一緒にまたは別に製薬学的に許容される非経口賦形剤が提供される。そのような賦形剤の例は、水、塩水、リンゲル溶液、デキストロース溶液および5%ヒト血清アルブミンである。リポソームおよび固定油のような非水性賦形剤を使用することもできる。賦形剤または凍結乾燥粉末は、等張性（例えば塩化ナトリウム、マンニトール）および化学的安定性（例えばバッファーおよび保存剤）を維持するための添加剤を含むことができる。製剤は既知のまたは適当な技術で滅菌される。

【0158】

適当な製薬学的キャリアーは、この分野の標準的な参考書である最新版のレミングトンの製薬科学 (Remington's Pharmaceutical Science)、A. Osolに記載されている。

10

【0159】

治療的投与

多くの既知の、および開発された様式を、製薬学的に有効な量の本発明の少なくとも1つのGLP-1ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーションを投与するために使用することができる。本発明のGLP-1ミメティポディは、溶液、乳液、コロイドもしくは懸濁液として、または粉末として、吸入または本明細書に記載し、もしくは当該技術分野で既知の他の様式により投与するために適する種々のデバイスおよび方法を使用することにより担体中で送達することができる。

【0160】

20

非経口製剤および投与

非経口投与用の製剤は、通常の賦形剤として滅菌水または塩水、ポリエチレングリコールのようなポリアルキレングリコール、植物起源の油、水素化ナフタレン等を含むことができる。注入用の水性または油性懸濁液は、既知の方法に従い適当な乳化剤または加湿剤および沈殿防止剤を使用して調製することができる。注入用の薬剤は、水溶液または滅菌された注入可能溶液または溶媒中の懸濁液のような非毒性で、非経口投与可能な希釈剤であることができる。使用可能な賦形剤または溶剤として、水、リンゲル溶液、等張性塩水等を利用できる；通例の溶媒、または沈殿防止溶媒として、滅菌された非揮発性油を使用することができる。これらの目的のために、任意の種類非揮発性油および脂肪酸を使用でき、それらには天然または合成または半合成の脂肪油または脂肪酸；天然または合成または半合成のモノ-もしくはジ-またはトリ-グリセリドを含む。非経口投与は当該技術分野で知られており、そして限定するわけではないが通例の注入手段、米国特許第5,851,198号明細書に記載されたガスで圧縮した、針を含まない注入デバイス、および米国特許第5,839,446号明細書に記載されたレーザーパーホレーターデバイスを含む（これらの明細書は引用により全部、本明細書に編入する）。

30

【0161】

代替送達

本発明はさらに少なくとも1つのGLP-1ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーションの、非経口的、皮下、筋肉内、静脈内、ポーラス、腔、直腸、頬内、舌下、鼻内または経皮的手段による投与に関する。タンパク質、GLP-1ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーション組成物は、非経口（皮下、筋肉内もしくは静脈内）投与、特に液体溶液もしくは懸濁液の状態で使用するために；腔または直腸投与、特にクリームおよび坐薬のような半固体形で使用するために；頬内、または舌下投与、特に錠剤またはカプセル形態で；あるいは鼻内、特に粉末、点鼻またはエアロゾルまたは特定薬剤 (certain agent) の形態で；あるいは皮膚構造をモディファイし、または経皮パッチ中の薬剤濃度を上げるためのジメチルスルフォキシドのような化学的エンハンサー (Junginger et al., 「薬剤の浸透強化 (Drug Permeation Enhancement)」; Hsieh, D. S., 編集、第59-90頁 (マルセルデッカー (Marcel Dekker) 社、ニューヨーク 1994、引用により全部、本明細書に編入する)) を用いて、またはタンパク質およびペプチドを含む製剤の皮

40

50

膚上への適用を可能にする酸化剤（国際公開第98/53847号パンフレット）を用いて、または電気穿孔のような一過性の輸送路を作るために電場を適用して、またはイオン導入法のような皮膚を通る荷電した薬剤の移動性を上げるために、またはソノホレシス（sonophoresis）のような超音波を適用して（米国特許第4,309,989号および同第4,767,402号明細書）、経皮的に、特にゲル、軟膏、ローション、懸濁液またはパッチ送達系の状態で使用するために調製することができる（上記の刊行物および特許は引用により全部、本明細書に編入する）。

【0162】

肺/鼻投与

肺投与には、好ましくは少なくとも1つのGLP-1ミメティボディもしくは特定部分もしくはバリエーション組成物は、肺または洞のより下部気道に到達するために効果的な粒子サイズで送達される。本発明に従い、少なくとも1つのGLP-1ミメティボディもしくは特定部分もしくはバリエーションは、吸入による治療薬の投与について当該技術分野で既知の種々の吸入または鼻デバイスにより送達することができる。エーロゾル化した製剤を患者の洞腔または肺胞に沈積させることができるこれらのデバイスには、定量吸入器、ネブライザー、乾燥粉末ジェネレーター、噴霧器等を含む。GLP-1ミメティボディもしくは特定部分もしくはバリエーションを肺または鼻投与に向けるための適当な他のデバイスも当該技術分野では既知である。すべてのそのようなデバイスは、エーロゾル中のGLP-1ミメティボディもしくは特定部分もしくはバリエーションを分配するための投与に適する製剤に使用することができる。そのようなエーロゾルは、溶液（水性または非水性の両方）または固体粒子のいずれかから成ることができる。Ventolin（商標）定量吸入器のような定量吸入器は、多くは推進ガスを使用し、そして吸息中の作動が必要である（例えば国際公開第94/16970号、同第98/35888号パンフレットを参照にされたい）。Turbuhaler（商標）（アストラ：Astra）、Rotahaler（商標）（グラクソ：Glaxo）、Diskus（商標）（グラクソ）、Spiros（商標）吸入器（ジュラ：Dura）、インハーレセラピューティクス（Inhale Therapeutics）により販売されているデバイスおよびSpinhaler（商標）粉末吸入器（フィソンス：Fisons）のような粉末吸入器は、混合粉末の呼吸作動を使用する（米国特許第4668218号明細書 アストラ、欧州特許第237507号明細書 アストラ、国際公開第97/25086号パンフレット グラクソ、国際公開第94/08552号パンフレット ジュラ、米国特許第5458135号明細書 インハーレ、国際公開第94/06498号パンフレット フィソンス、すべて引用により本明細書に編入する）。AERx（商標）アラディギム（Aradigm）、Ultravent（商標）ネブライザー（マリノクロッド：Mallinckrodt）、およびAcorn II（商標）ネブライザー（マークエスト メディカル プロダクツ：Marquest Medical Products）（米国特許第5404871号明細書 アラディギム、国際公開第97/22376号パンフレット）のようなネブライザー（上記技術文献は引用により全部、本明細書に編入する）は、溶液からエーロゾルを生成するが、定量吸入器、乾燥粉末吸入器等は、小さい粒子のエーロゾルを生成する。市販されている吸入器デバイスのこれらの具体的例は、本発明の実施に適する具体的なデバイスの代表例であることを意図し、そして本発明の範囲を限定するものではない。好ましくは少なくとも1つのGLP-1ミメティボディもしくは特定部分もしくはバリエーションを含んで成る組成物は、乾燥粉末吸入器または噴霧器により送達される。本発明の少なくとも1つのGLP-1ミメティボディもしくは特定部分もしくはバリエーションを投与するための吸入デバイスには幾つかの望ましい特徴がある。例えば吸入デバイスによる送達は有利には、信頼性があり、再現性があり、そして正確であることである。吸入デバイスは場合により、良好な呼吸適性のために小さい乾燥粒子（例えば約10 μm未満、好ましくは約1~5 μm）を送達することができる。

【0163】

噴霧としてのGLP-1ミメティボディもしくは特定部分もしくはバリエーション組成物の投

与

GLP-1ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーション組成物タンパク質を含む噴霧は、少なくとも1つのGLP-1ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーションの懸濁液または溶液を、加圧下のノズルを通すことにより生成することができる。ノズルのサイズおよび形状、かける圧力および液体供給速度は、所望の出力および粒子サイズを達成するために選択することができる。電気噴霧は例えば毛細管またはノズル供給部に連結した電場により生成できる。有利には噴霧器により送達される少なくとも1つのGLP-1ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーション組成物タンパク質の粒子は、約10 μ m未満、好ましくは約1~約5 μ mの範囲、そして最も好ましくは約2 μ m~3 μ mの粒子サイズを有する。

10

【0164】

噴霧器で使用するために適当な少なくとも1つのGLP-1ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーション組成物タンパク質の製剤は、典型的には水溶液中、1mlの溶液あたり約1mg~約20mgの濃度で少なくとも1つのGLP-1ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーション組成物タンパク質の濃度で、水溶液中にGLP-1ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーション組成物タンパク質を含む。製剤は賦形剤、バッファー、張性調整剤、保存剤、表面活性剤および好ましくは亜鉛のような作用物質(agent)を含むことができる。製剤はまた、GLP-1ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーション組成物タンパク質を安定化するために、バッファー、還元剤、バルクタンパク質または炭水化物のような賦形剤または作用物質を含むこともできる。GLP-1ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーション組成物タンパク質を製剤するために有用なバルクタンパク質には、アルブミン、プロタミン等を含む。GLP-1ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーション組成物タンパク質を製剤するために有用な典型的な炭水化物には、シュクロース、マンニトール、ラクトース、トレハロース、グルコース等を含む。GLP-1ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーション組成物タンパク質製剤は、エアロゾルを形成する溶液の噴霧化により引き起こされるGLP-1ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーション組成物タンパク質の表面が誘導する凝集を下げ、または防止することができる表面活性剤を含むこともできる。ポリオキシエチレン脂肪酸エステルおよびアルコールおよびポリオキシエチレンソルビトール脂肪酸エステルのような種々の通例の表面活性剤を使用することができる。量は一般に製剤の0.001から14重量%の間である。本発明の目的に特に好適な表面活性剤は、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレート、ポリソルベート80、ポリソルベート20等である。ミメティポディまたは特定部分またはバリエーションのようなタンパク質の製剤のために、当該技術分野で既知のさらなる作用物質も製剤に含むことができる。

20

30

【0165】

ネブライザーによるGLP-1ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーション組成物の投与

GLP-1ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーション組成物タンパク質は、ジェットネブライザーまたは超音波ネブライザーのようなネブライザーにより投与することができる。典型的にはジェットネブライザーでは、圧縮空気源を使用して開口部を通る高速エアジェットを作成する。ガスがノズルを越えて膨張すると低圧領域が作成され、これが液体リザーバーに連結された毛細管を通してGLP-1ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーション組成物タンパク質の溶液を引き出す。毛細管からの液流は、管から出る時に不安定なフィラメントおよび液滴に剪断され、エアロゾルを作成する。ある範囲の形状、流速、およびそれらを使用して、上記のジェットネブライザーから所望の性能特性を達成することができる。超音波ネブライザーでは、高周波電気エネルギーを使用して、典型的には圧電変圧器を使用して、振動的、機械的エネルギーを作成することができる。このエネルギーを直接的に、またはカップリング流体を通すいずれかでGLP-1ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーション組成物タンパク質の製剤に伝え、GLP-1ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーション組成物タンパク質を含む工

40

50

ーロゾルを作成する。有利にはネブライザーにより送達される G L P - 1 ミメティボディもしくは特定部分もしくはバリエーション組成物タンパク質の粒子は、約 10 μm 未満、好ましくは約 1 μm ~ 約 5 μm の範囲、そして最も好ましくは約 2 μm ~ 3 μm の粒子サイズを有する。

【 0 1 6 6 】

ジェットまたは超音波のいずれのネブライザーを用いても、使用するために適当な少なくとも 1 つの G L P - 1 ミメティボディもしくは特定部分もしくはバリエーションの製剤は、典型的には、1 ml の溶液あたり約 1 mg ~ 約 20 mg の濃度の少なくとも 1 つの G L P - 1 ミメティボディもしくは特定部分またはバリエーションタンパク質で、水溶液中に G L P - 1 ミメティボディもしくは特定部分もしくはバリエーション組成物タンパク質を含む。製剤は賦形剤、バッファー、張性調整剤、保存剤、表面活性剤および好ましくは亜鉛のような作用物質を含むこともできる。また製剤は、バッファー、還元剤、バルクタンパク質または炭水化物のような、少なくとも 1 つの G L P - 1 ミメティボディもしくは特定部分もしくはバリエーション組成物タンパク質を安定化するための賦形剤または作用物質も含むこともできる。少なくとも 1 つの G L P - 1 ミメティボディもしくは特定部分もしくはバリエーション組成物タンパク質を製剤するために有用なバルクタンパク質には、アルブミン、プロタミン等を含む。少なくとも 1 つの G L P - 1 ミメティボディもしくは特定部分もしくはバリエーションを製剤するために有用な典型的な炭水化物には、シュクロース、マンニトール、ラクトース、トレハロース、グルコース等を含む。少なくとも 1 つの G L P - 1 ミメティボディもしくは特定部分もしくはバリエーション製剤はエーロゾルを形成する溶液の噴霧化により引き起こされる少なくとも 1 つの G L P - 1 ミメティボディもしくは特定部分もしくはバリエーションの表面が誘導する凝集を下げ、または防止することができる表面活性剤も含むこともできる。ポリオキシエチレン脂肪酸エステルおよびアルコールおよびポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルのような種々の通例の表面活性剤を使用することができる。量は一般に製剤の 0.001 から 4 重量% の間の範囲である。本発明の目的に特に好適な表面活性剤は、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレート、ポリソルベート 80、ポリソルベート 20 等である。G L P - 1 ミメティボディもしくは特定部分もしくはバリエーションタンパク質のようなタンパク質の製剤のために当該技術分野で既知のさらなる作用物質も製剤に含むことができる。

10

20

30

【 0 1 6 7 】

定量吸入器による G L P - 1 ミメティボディもしくは特定部分もしくはバリエーション組成物の投与

定量吸入器 (M D I) では、推進剤、少なくとも 1 つの G L P - 1 ミメティボディもしくは特定部分もしくはバリエーション、および任意の賦形剤または他の添加剤を、液化圧縮ガスを含む混合物としてキャニスターに含む。定量パルプの作動は好ましくは、約 10 μm 未満、好ましくは約 1 μm ~ 約 5 μm、そして最も好ましくは約 2 μm ~ 3 μm の範囲のサイズの粒子を含むエーロゾルとして混合物を放出する。所望のエーロゾル粒子サイズは、ジェット-ミル (j e t - m i l l i n g)、噴霧乾燥、臨界点縮合等を含む当業者に既知の様々な方法により生成される G L P - 1 ミメティボディもしくは特定部分もしくはバリエーション組成物タンパク質の製剤を使用することにより得られる。好適な定量吸入器には、3 M またはグラクソにより製造され、そしてヒドロフルオロカーボン推進剤を採用するものを含む。

40

【 0 1 6 8 】

定量吸入器デバイスを用いて使用するための少なくとも 1 つの G L P - 1 ミメティボディもしくは特定部分もしくはバリエーションの製剤は、一般に少なくとも 1 つの G L P - 1 ミメティボディもしくは特定部分もしくはバリエーションを含む細かく分割した粉末を、懸濁液として非水性媒質中に、例えば表面活性剤により推進剤に懸濁して含む。推進剤は、トリクロロフルオロメタン、ジクロロジフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタノールおよび 1, 1, 1, 2 - テトラフルオロエタン、H F A - 1 3 4 a (ヒドロフルオロアルカン - 1 3 4 a)、H F A - 2 2 7 (ヒドロフルオロアルカン - 2 2 7) 等を含むクロロ

50

フルオロカーボン、ヒドロクロフルオロカーボン、ヒドロフルオロカーボンまたは炭化水素のような、この目的に使用される任意の通例の材料であることができる。好ましくは推進剤はヒドロフルオロカーボンである。表面活性剤は、推進剤中の懸濁液として少なくとも1つのGLP-1ミメティボディもしくは特定部分もしくはバリエーションを安定化するために、化学分解等に対して活性剤を保護する等のために選択することができる。適当な表面活性剤にはソルビタントリオレート、ダイズレシチン、オレイン酸等を含む。場合により溶液エロゾルは、エタノールのような溶媒を使用することが好ましい。タンパク質のようなタンパク質の製剤に当該技術分野で既知のさらなる作用物質を、製剤に含むこともできる。

【0169】

当業者は、本発明の方法を本明細書に記載していないデバイスを介して少なくとも1つのGLP-1ミメティボディもしくは特定部分もしくはバリエーション組成物を肺投与することにより達成できることを認識しているだろう。

【0170】

粘膜製剤および投与

粘膜表面を通して吸収させるために、少なくとも1つのGLP-1ミメティボディもしくは特定部分もしくはバリエーションを投与する組成物および方法には、複数のミクロン以下の粒子、粘膜接着性高分子、生物活性ペプチドおよび水性の連続相を含んで成る乳液を含み、これは乳液粒子の粘膜接着を達成することにより粘膜表面を通る吸収を促進する（米国特許第5,514,670号明細書）。本発明の乳液の適用に適する粘膜表面には、角膜、結膜、頬、舌、鼻、腔、肺、胃、腸および直腸経路の投与を含む。腔または直腸投与用の製剤、例えば坐薬は、賦形剤として例えばポリアルキレングリコール、ワセリン、カカオ脂等を含むことができる。鼻内投与用の製剤は固体であることができ、そして賦形剤として例えばラクトースを含み、または点鼻の水性もしくは油性溶液であることができる。頬内投与には賦形剤は糖、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、糊化（pregelinated）澱粉等を含む（米国特許第5,849,695号明細書）。

【0171】

経口製剤および投与

経口用の製剤は、腸壁の透過性を人工的に上げるための補助剤（例えばレゾルシノールおよびポリオキシエチレンオレイルエーテルおよびn-ヘキサデシルポリエチレンエーテルのような非イオン性表面活性剤）の同時投与、ならびに酵素的分解を阻害するための酵素阻害剤（例えば膵臓トリプシンインヒビター、ジイソプロピルフルオロホスフェート（DFP）およびトラシロール）の同時投与に依存する。経口投与用の固体型剤形の活性成分化合物を、シュクロース、ラクトース、セルロース、マンニトール、トレハロース、ラフィノース、マルチトール、デキストラン、澱粉、寒天、アルギネート、キチン、キトサン、ペクチン、トラガカントガム、アラビアガム、ゼラチン、コラーゲン、カゼイン、アルブミン、合成もしくは半合成ポリマーおよびグリセリドを含む少なくとも1つの添加剤と混合することができる。またこれらの剤形は他の種類（1つまたは複数）の添加剤、例えば不活性な希釈剤、ステアリン酸マグネシウム、パラベンのような潤滑剤、ソルビン酸、アスコルビン酸、アルファ-トコフェロールのような保存剤、システインのような酸化防止剤、崩壊剤、結合剤、増粘剤、緩衝剤、甘味料、風味剤（flavoring agent）、香料等も含むことができる。

【0172】

錠剤およびピルはさらに腸溶性コート調製物に加工することができる。経口投与用の液体調製物には、医学的使用が可能な乳液、シロップ、エリキシル、懸濁液および溶液調製物を含む。これらの調製物は該分野で通常使用されている不活性希釈剤、例えば水を含むことができる。インスリンおよびヘパリンの薬剤送達系としてリボソームも記載された（米国特許第4,239,754号明細書）。さらに最近では、混合アミノ酸（プロテインイド）の人工ポリマーの微小球も、薬剤を送達するために使用された（米国特許第4,9

10

20

30

40

50

25, 673号明細書)。さらに米国特許第5, 879, 681号および同第5, 5, 871, 753号明細書に記載された担体化合物も生物学的に活性な作用物質を経口で送達するために使用され、そして当該技術分野で既知である。

【0173】

経皮製剤および投与

経皮投与には、少なくとも1つのGLP-1ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーションを、リポソームまたはポリマー性ナノ粒子、マイクロ粒子、マイクロカプセルまたは微小球（特に言及しない限り、集合的にマイクロ粒子と呼ぶ）のような送達デバイスにカプセル化する。多数の適当なデバイスが知られており、それらにはポリ乳酸、ポリグリコール酸およびそれらのコポリマーのようなポリヒドロキシ酸、ポリオルトエステル、ポリ無水物およびポリホスファゼンのような合成ポリマー、ならびにコラーゲン、ポリアミノ酸、アルブミンおよび他のタンパク質、アルギネートおよび他の多糖およびそれらの組み合わせのような天然ポリマーから作られたマイクロ粒子を含む（米国特許第5, 814, 599号明細書）。

【0174】

持効性 (prolonged) 投与および製剤

本発明の化合物を個体に長期間、例えば単回投与で1週間から1年の期間送達することがしばしば望ましい。種々の緩効性、貯蔵またはインプラント剤形を利用することができる。例えば剤形は、体液中での溶解度が低い化合物の製薬学的に許容される非毒性塩、例えば(a)リン酸、硫酸、クエン酸、酒石酸、タンニン酸、パモ酸、アルギン酸、ポリグルタミン酸、ナフタレンモノ-もしくはジ-スルホン酸、ポリガラクトロン酸等のような多塩基性酸との酸付加塩；(b)亜鉛、カルシウム、ビスマス、バリウム、マグネシウム、アルミニウム、銅、コバルト、ニッケル、カドミウム等のような多価金属カチオン、または例えばN, N'-ジベンジル-エチレンジアミンまたはエチレンジアミンから形成される有機カチオンとの塩；あるいは(c)(a)および(b)の組み合わせ、例えばタンニン酸亜鉛塩を含むことができる。さらに本発明の化合物は、または好ましくは今ちょうど記載したような比較的不溶性の塩をゲル、例えば注入に適するゴマ油を含む例えばモノステアリン酸アルミニウムゲルに配合することができる。特に好適な塩は、亜鉛塩、タンニン酸亜鉛塩、パモ酸塩等である。注入用の別の種類の遅延放出型dGLP-1製剤は、例えば米国特許第3, 773, 919号明細書に記載されているようなポリ乳酸/ポリグリコール酸ポリマーのような緩効分解型(slow degrading)の非毒性、非抗原性ポリマー中にカプセル化するために分散した化合物または塩を含む。化合物または好ましくは上記の比較的不溶性の塩は、特に動物で使用するために、コレステロールマトリックシラスティック(silastic)ペレット中に配合することもできる。さらなる緩効性の、dGLP-1またはインプラント製剤、例えばガスまたは液体リポソームが技術文献で知られている（米国特許第5, 770, 222号明細書および「徐放性および放出制御薬剤送達系(Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems)」、J. R. Robinson 編集、マルセルデッカー社、ニューヨーク、1978）。

【0175】

本発明を一般的に記載してきたが、これは具体的説明により提供され、そして限定を意味しない以下の実施例を参照することにより、より容易に理解できるだろう。

【実施例】

【0176】

実施例1：哺乳動物細胞中でのGLP-1ミメティポディのクローニングおよび発現

典型的な哺乳動物発現ベクターは、mRNAの転写の開始を媒介する少なくとも1つのプロモーター要素、GLP-1ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーションのコード配列、および転写の終結および転写産物のポリアデニル化に必要なシグナルを含む。さらなる要素にはエンハンサー、Kozak配列およびRNAスプライシングのための供与および受容部位により挟まれた介在配列を含む。高度に効率的な転写はSV40に由来

10

20

30

40

50

する初期および後期プロモーター、レトロウイルス、例えばRSV、HTLV I、HIV Iに由来する長い末端反復配列(LTRS)、およびサイトメガロウイルス(CMV)の初期プロモーターにより達成され得る。しかし細胞要素(例えばヒトアクチンプロモーター)も使用することができる。本発明の実施に使用するために適当な発現ベクターには、例えばpIRES1neo、pRetro-Off、pRetro-On、PLXSNまたはpLNCX(クロンテック ラボズ(Clonetech Labo)、パロアルト、カリフォルニア州)、pcDNA3.1(+/-)、pcDNA/Zeo(+/-)またはpcDNA3.1/Hygro(+/-)(インビトロジェン(Invitrogen))、PSVLおよびPMSG(ファルマシア(Pharmacia)、ウブサラ、スウェーデン)、pRSVcat(ATCC37152)、pSV2dhfr(ATCC37146)およびpBC12MI(ATCC67109)のようなベクターを含む。使用できた哺乳動物宿主細胞には、ヒトHeLa 293、H9およびJurkat細胞、マウスNIH3T3およびC127細胞、Cos1、Cos7およびCV1、quailQC1-3細胞、マウスL細胞およびチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞を含む。

【0177】

あるいは遺伝子は染色体に組み込まれた遺伝子を含む安定な細胞株で発現させることができる。dhfr、gpt、ネオマイシンまたはハイグロマイシンのような選択可能なマーカーを用いたコートランスフェクションにより、トランスフェクトした細胞の同定および単離が可能となる。

【0178】

トランスフェクトした遺伝子は、大量のコードされたGLP-1ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーションを発現させるために増幅することもできる。DHFR(ジヒドロ葉酸レダクターゼ)マーカーは、数百またはさらに数千の目的遺伝子のコピーを持つ細胞株を開発するために有用である。別の有用な選択マーカーは、酵素グルタミンシンターゼ(GS)(Murphy, et al., Biochem. J. 227:277-279 (1991); Bebbington, et al., Bio/Technology 10:169-175 (1992))である。これらのマーカーを使用して、哺乳動物細胞を選択培地で成長させ、そして最高の耐性を持つ細胞を選択する。これらの細胞株は、染色体に組み込まれた増幅した遺伝子(1つまたは複数)を含む。チャイニーズハムスター卵巣(CHO)およびNSO細胞は、GLP-1ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーションの生産によく使用される。

【0179】

発現ベクターpC1およびpC4は、ラウス肉腫ウイルスの強力なプロモーター(LTR)(Cullen et al., Molec. Cell. Biol. 5:438-447 (1985))に加えてCMV-エンハンサーのフラグメント(Boshart, et al., Cell 41:521-530 (1985))を含む。多クローニング部位、例えば制限酵素開裂部位であるBamHI、XbaIおよびAsp718は、目的遺伝子のクローニングを容易にする。ベクターは3'イントロンに加えて、ラットのプレプロインスリン遺伝子のポリアデニル化および終結シグナルを含む。

【0180】

CHO細胞中でのクローニングおよび発現

ベクターpC4をGLP-1ミメティポディもしくは特定部分もしくはバリエーションの発現に使用する。プラスミドpC4は、プラスミドpSV2-dhfr(ATCC寄託番号37146)の誘導體である。プラスミドはマウスDHFR遺伝子をSV40初期プロモーターの制御下に含む。これらのプラスミドでトランスフェクトしたジヒドロ葉酸活性を欠くチャイニーズハムスター卵巣または他の細胞は、細胞を化学療法剤であるメトトレキセートを補充した選択培地(例えばアルファマイナスMEM、ライフテクノロジーズ(Life Technologies)、ゲチスバーグ、メリーランド州)中で成長させることにより選択することができる。メトトレキセート(MTX)に対して耐性の細胞中でDHFR遺伝子の増幅が十分に示された(例えば、F.W.Alt, et al., J.

10

20

30

40

50

Biol. Chem. 253:1357-1370 (1978); J. L. Hamlin and C. Ma. Biochem. et Biophys. Acta 1097:107-143 (1990); および M. J. Page and M. A. Sydenham, Biotechnology 9:64-68 (1991) を参照にされたい)。M T X の濃度を上昇させて成長させた細胞は、D H F R 遺伝子の増幅の結果として目的酵素である D H F R の過剰生産により薬剤への耐性を生じる。第 2 遺伝子が D H F R 遺伝子に連結されている場合、これは通常、同時に増幅され (co-amplified)、そして過剰に発現される。当該技術分野では、この取り組みを使用して 1,000 コピー以上の増幅した遺伝子 (1 つまたは複数) を持つ細胞株を発生できることが知られている。続いてメトトレキセートを離脱する時、宿主細胞の 1 もしくは複数の染色体 (1 つまたは複数) に組み込まれた増幅された遺伝子を含む細胞株が得られる。

10

【0181】

プラスミド p C 4 は目的遺伝子を発現するために、ラウス肉腫ウイルスの長い末端反復配列 (L T R) の強力なプロモーター (Cullen et al., Molec. Cell. Biol. 5:438-447 (1985)) に加えて、ヒトサイトメガロウイルス (C M V) の前初期遺伝子のエンハンサーから単離されたフラグメント (Boshart, et al., Cell 41:521-530 (1985)) を含む。プロモーターの下流は、遺伝子の組み込みを可能とする B a m H I、X b a I および A s p 7 1 8 制限酵素開裂部位である。これらのクローニング部位の後に、プラスミドはラットのプレプロインスリン遺伝子の 3'イントロンおよびポリアデニル化部位を含む。他の高効率プロモーター、例えばヒト b - アクチンプロモーター、S V 4 0 初期および後期プロモーターまたは他のレトロウイルス (例えば H I V および H T L V I) に由来する長い末端反復配列も発現に使用することができる。クロンテックの T e t - O f f および T e t - O n 遺伝子発現系および同様な系は、哺乳動物細胞中で調節された様式で G L P - 1 を発現させるために使用できる (M. Gossen, and H. Bujard, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5547-5551 (1992))。m R N A のポリアデニル化には、他のシグナル、例えばヒト成長ホルモンまたはグロビン遺伝子に由来するシグナルも使用することができる。染色体に組み込まれた目的の遺伝子を持つ安定な細胞株は、g p t、G 4 1 8 またはハイグロマイシンのような選択可能マーカーを用いたコ-トランスフェクションでも選択できる。始めに 1 より多くの選択可能なマーカー (例えば G 4 1 8 に加えてメトトレキセート) を使用することが有利である。

20

30

【0182】

プラスミド p C 4 を制限酵素で消化し、そして次いでウシの腸ホスファターゼを使用して当該技術分野で既知の手法により脱リン酸化する。次いでベクターを 1% アガロースゲルから単離する。

【0183】

本発明の G L P - 1 ミメティポディの H C および L C 可変領域に対応する、完全な G L P - 1 ミメティポディまたは特定部分またはバリエーションをコードする D N A 配列を、既知の方法の工程に従い使用する。適切なヒト定常領域 (すなわち H C および L C 領域) をコードする単離された核酸もこの構築物に使用される。

40

【0184】

単離された可変および定常領域をコードする D N A および脱リン酸化ベクターは、次いで T 4 D N A リガーゼで連結される。次いで大腸菌 (E. coli) H B 1 0 1 または X L - 1 ブルー細胞を形質転換し、そしてプラスミド p C 4 中に挿入されたフラグメントを含む細菌が、例えば制限酵素分析を使用して確認される。

【0185】

活性な D H F R 遺伝子を欠くチャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞をトランスフェクションに使用する。5 μ g の発現プラスミド p C 4 を 0.5 μ g のプラスミド p S V 2 - n e o を用いてリポフェクションを使用してコ-トランスフェクトする。プラスミド p S V 2 n e o は、G 4 1 8 を含む抗生物質群に対する耐性を付与する酵素をコードする T

50

n 5 に由来するドミナント選択性マーカーである neo 遺伝子を含む。この細胞を、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の G 4 1 8 を補充したアルファマイナス MEM にまく。2 日後、細胞をトリプシン処理し、そして 10、25 または 50 ng/ml のメトトレキサートに加えて $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の G 4 1 8 を補充したアルファマイナス MEM 中のハイブリドマクロニングプレート (グレイナー (Greiner)、独国) にまく。約 10 ~ 14 日後、1 つのクローンをトリプシン処理し、そして異なる濃度のメトトレキサート (50 nM、100 nM、200 nM、400 nM、800 nM) を使用して 6 - ウェルのペトリ皿または 10 ml のフラスコにまく。最高濃度のメトトレキサートで成長するクローンを、さらにより高濃度のメトトレキサート (1 mM、2 mM、5 mM、10 mM、20 mM) を含む新たな 6 - ウェルプレートに移す。100 ~ 200 mM 濃度で成長するクローンが得られるまで、同じ手順を繰り返す。所望の遺伝子産物の発現を例えば SDS - PAGE およびウエスタンブロットにより、または逆相 HPLC 分析により分析する。

10

【0186】

実施例 2 : 本発明の GLP - 1 ミメティボディの非限定的例

GLP - 1 は、経口グルコース対抗後に腸の L 細胞から分泌される 37 アミノ酸ペプチドである。生物学的に活性な GLP - 1 (7 - 37) ペプチド、バリエーションまたは誘導体を包含するミメティボディ構築物は、ペプチドの *in vivo* 寿命を延ばし、そして 2 型糖尿病患者の血中グルコースを下げるための新規療法を提供すると期待される。天然の GLP - 1 (7 - 37) ペプチドまたは DPP - IV 耐性類似体をコードするペプチドは、ミメティボディのスcaffoldに取り込まれることができる。これらの分子の幾つかが作成され、そして生じたミメティボディは *in vitro* の細胞に基づくアッセイにおける機能で活性が証明された。種々の *in vitro* アッセイおよび *in vivo* モデルをこれらの実験に使用することができ、そして効力は互いに比べることができず、または本明細書に提示する結果と比べることができないことに留意すべきである。

20

【0187】

GLP - 1 ミメティボディバリエーションを生成するために、ミメティボディ中の GLP - 1 ペプチド、リンカー、ヒンジまたは CH 2 および CH 3 配列を削除し、加え、置換し、変異させ、または修飾して、発現、効力、安定性またはエフェクター機能を改善することができた。

【0188】

野生型 GLP - 1 配列、ならびに GLP - 1 (A 2 S) または GLP - 1 (A 2 G) のような DPP - IV 耐性 GLP - 1 バリエーションは、ミメティボディのスcaffoldに取り込まれることができる。ペプチドの突然変異は GLP - 1 ミメティボディの特性を改善するために作成することができた。例えばアミノ末端残基中の突然変異はシグナリングを改善することができ、一方、ヘリックスドメイン中の突然変異はヘリックスを安定化することができ、これにより受容体への結合および / またはミメティボディの安定性を改善する。

30

【0189】

リンカーの長さおよび組成を変異させて、GLP - 1 ペプチドと Fc 領域との間の結合の柔軟性または安定性を変動させることができる。種々のアイソタイプを分子のヒンジ領域に取り込むことができる。さらに突然変異をミメティボディのヒンジ領域内に作成して分子を安定化することができる。例えばヒト Ig G 4 ヒンジを突然変異させて、Ser²²⁸ - > Pro バリエーションを作成し、ミメティボディの鎖間ジスルフィド結合を安定化することができる。ミメティボディの Fc 部分内の変更を作成し、分子の安定性を改善し、そして FcR 結合のようなエフェクター機能を変えることができた。例えば、Ala / Ala 突然変異を持つ Ig G 4 のようなヒトまたはマウスのアイソタイプ (またはこれら分子の変異体) を使用することができた。

40

【0190】

本発明の GLP - 1 ミメティボディ

本発明の具体的な非限定的例は、式 (I)

50

((P (n) - L (o) - V (p) - H (q) - C H 2 (r) - C H 3 (s)) (t) 、
 の G L P - 1 ミメティボディ構築物 (配列番号 2) であり、ここで P は生物活性 G L P -
 1 ペプチド (7 - 3 6) の 1 つのコピーであり、L は G l y - S e r または G l y - G l y -
 G l y - S e r のいずれかの柔軟性リンカーの直列反復であり、V は V H 配列の C -
 末端であり、すなわち自然に存在する I g G の J 領域であり、H は完全な I g G 1 ヒンジ
 領域であり、そして C H 2 & C H 3 は I g G 1 アイソタイプのサブクラスである。この構
 築物の半減期は、G L P - 1 ペプチドのみ、またはそのバリエーションまたは誘導体の多数倍
 であり、そして I g G の半減期に類似している。

【 0 1 9 1 】

上記の基本的構造に加えて、潜在的に好ましい生物学的特性を持つバリエーションを記載す
 る。これらには自己結合 (s e l f - a s s o c i a t e) に対する減少した傾向、減少
 した免疫エフェクター機能または減少した免疫原性を有することができる構築物を含む。
 生物学的に活性なペプチドの改善された立体配置、および血液脳関門をわたる移動のよう
 な望ましい特性を付与する他の修飾も構想する。提案されるバリエーションおよび修飾は任意
 の様式で組み合わせ、望ましい活性を有する構築物を得ることができる。

10

【 0 1 9 2 】

組換え D N A 法を使用して、G L P - 1 ペプチドを免疫グロブリンシグナルペプチドと
 ヒト J 配列との間の中間ベクターに挿入した。これは、ベクター中に存在する制限部位に
 コンパチブルな末端を持つ相補的な合成オリゴヌクレオチドを使用して行った。これらの
 オリゴヌクレオチドは、G L P - 1 ペプチドおよび 2 つの G G G S 反復からなる柔軟性リ
 ンカーのコード配列を含んでなった。次いで上記の機能的要素を含有する制限フラグメン
 トを発現ベクターに転移した。このベクターは抗 - C D 4 免疫グロブリンプロモーターお
 よびエンハンサー、およびヒト I g G 1 ヒンジ配列、H C 定常領域 2 (C H 2) および定
 常領域 3 (C H 3) のコード配列ならびにプラスミドの複製および細菌中での選択および
 哺乳動物細胞中で安定な発現の選択に必要な要素を含んだ。

20

【 0 1 9 3 】

このプラスミドを H E K 2 9 3 E 細胞に導入し、そして w t G L P - 1 ミメティボディ
 の発現がトランスフェクトされた細胞中で一時的に達成された。G L P - 1 ミメティボディ
 の精製は、標準的なプロテイン A および S u p e r o s e 1 2 アフィニティークロマト
 グラフィーにより行い、約 1 . 5 m g / L のトランスフェクトされた細胞を生じた。この
 タンパク質は以下に記載する実験の出発材料であった。

30

【 0 1 9 4 】

G L P - 1 ミメティボディのアミノ酸配列を図 1 に示す。機能的ドメインはペプチドコ
 ード配列の上に注記する。J 配列はさらに一層柔軟性を提供して、G L P - 1 二量体が正
 しい立体配置を取ることができるようにし、そして二量体が免疫グロブリンの球状構造か
 ら突出し、そして 2 つの G L P - 1 受容体の間の開裂を貫通できるようにする。3 つのシ
 ス테인が I g G 1 ヒンジ領域にも存在する。第 1 は通常、免疫グロブリン軽鎖 (L C)
 と対をなし、そして他の 2 つは 2 つの H C 間の鎖内結合に参加する。C H 2 および C H 3
 領域はタンパク質の嵩 (b u l k) を構成する。免疫グロブリンが長い血清半減期を有す
 ると考えられている 1 つの理由は、免疫グロブリンが、飲作用を受けた免疫グロブリンを
 細胞外空間に戻すことにより血清半減期を延ばす F c R n に結合する能力を有するからで
 ある。F c R n の結合部位は、C H 2 および C H 3 領域の連結部に重なる (S h e i l d
 s e t a l . , 2 0 0 1 , J . B i o l . C h e m . , v o l , 2 7 6 (9) , 6 5
 9 1 - 6 6 0 4) 。

40

【 0 1 9 5 】

2 つの I g G 重鎖は細胞プロセッシング中にヒンジ領域に位置するシステイン間のジス
 ルフィド結合を介して集成し、ホモ二量体を形成することがよく知られている。これは修
 飾されたペプチド間でも起こり、集成された G L P - 1 ミメティボディ構築物を形成す
 ると予想される。さらに G L P - 1 ペプチドの 2 つのシステイン間の鎖内ジスルフィド結合
 も形成すると予想される。この予想される G L P - 1 ミメティボディの構造は、2 つの G

50

LP-1ペプチドを含む。このペプチドの空間配置は、N-末端で隣接する配列の柔軟性と一緒にはペプチドが生物学的に活性な二量体を形成できるようにするはずである。

【0196】

実施例3：FACS結合アッセイ。GLP-1ミメティボディの活性は、*in vitro* FACS結合アッセイで試験した。GLP-1MMBがGLP-1Rに結合するかどうかを測定するために、GLP-1Rを過剰発現するHEK293細胞(1×10^6 細胞)をGLP-1MMB(20nM)と4で2時間、インキュベーションした。細胞を洗浄し、そして蛍光で標識した2次検出抗体(1 μ g/mLのヤギ抗-ヒトIgG、Fcガンマ特異的)を4で30分間加えた。細胞の蛍光強度はフローサイトメトリーを介して監視した。GLP-1MMBはGLP-1Rを過剰発現するHEK293細胞に結合する。GLP-1MMBは対照HEK293細胞には結合しない。GLP-1ペプチド類似体(A2S)はGLP-1Rを過剰発現しているHEK293細胞への結合をGLP-1MMBと競合することができる。

10

【0197】

実施例4：cAMPアッセイ。GLP-1のその受容体、G-タンパク質共役受容体への結合は、シグナリング分子3',5'-サイクリックAMP(cAMP)に用量依存的上昇をもたらす。cAMPはGLP-1Rを発現している細胞で*in vitro*アッセイを用いて測定することができる(アプライドバイオシステムズ: Applied Biosystems)。簡単に説明すると、Rinm細胞(100,000細胞)を、GLP-1ペプチド(0~30nM)またはGLP-1MMB(0~100nM)の濃度を増加させながらインキュベーションした。細胞を溶解し、そしてcAMPの量は、アルカリホスファターゼ標識cAMP結合体および化学発光基質(Tropix(商標)、CDPD(商標))を使用する競合アッセイを使用して測定した。wtGLP-1MMBに関する濃度依存的cAMP活性は、GLP-1ペプチドに匹敵する(それぞれEC50=11nM対0.4nM)。同様の実験では、IgG4のスカフォールド内のGLP-1(A2G)MMBおよびIgG4のスカフォールド内のGLP-1(A2S)MMBが、両方ともRinm細胞中のcAMPレベルを、IgG4のスカフォールド内のwtGLP-1MMBよりも有意に高いレベルまで上げた。

20

【0198】

実施例5：DPP-IV開裂アッセイ。GLP-1はDPP-IVにより急速に不活性化されるので、完全(すなわち非開裂)GLP-1MMBを定量する*in vitro*アッセイを確立した。簡単に説明すると、GLP-1MMBまたはペプチド(1.2nM)を室温でDPP-IV(1 μ g/mL、R&Dシステムズ)とインキュベーションした。種々の時間の後(0、5、10、15、20、30、40分)、DPP-IVインヒビター(100 μ M、リンコ(Linco))を加えて反応をクエンチした。完全なGLP-1ミメティボディまたはペプチドの量は、GLP-1活性ELISA(リンコ)およびGLP-1MMBまたはペプチドを使用して、各々の標準曲線について測定した。GLP-1MMBがGLP-1ペプチドに比べてDPP-IVによる開裂に対して有意により一層耐性であったことを示す。

30

【0199】

実施例6：ヒト血清の安定性アッセイ。血清中のGLP-1MMBの安定性も測定して、他の血清プロテアーゼがGLP-1MMBを開裂し、そして不活性化できないことを確認した。簡単に説明すると、GLP-1ペプチドまたはGLP-1MMB(30nM)を37でヒト血清中でインキュベーションした。様々な時間の後、反応は、DPP-IVインヒビター(100 μ M、リンコ)でクエンチし、そしてサンプルをリンコからのGLP-1活性ELISAを使用して分析した。GLP-1MMBはヒト血清中で24時間安定であるが、ペプチドは急速に減少する。

40

【0200】

実施例7：GLP-1MMBはRINm細胞にインスリンの分泌を引き起こす。インスリン分泌におけるGLP-1MMBの効果を試験するために、RINm細胞をGLP-1(

50

7 - 36) ペプチド (0 ~ 5 nM)、エキセンジン (exendin) - 4 ペプチド (0 ~ 5 nM) または種々の GLP - 1 ミメティポディ (5 または 50 nM) の濃度を上げて処理し、そして分泌するインスリンの量を ELISA を介して測定した。試験したすべての GLP - 1 MMB は、RINm 細胞にインスリン分泌を刺激する活性を有した。50 nM で、MMB は野生型 GLP - 1 (7 - 36) ペプチドに匹敵する活性を有した。

【0201】

実施例 8 : GLP - 1 MMB は db / db マウスのグルコースレベルを下げる。6 週齢の db / db マウスを 2 時間絶食させ、そして静脈内に賦形剤、GLP - 1 ペプチドまたは GLP - 1 (A2S) ミメティポディを投与した。血中グルコースは投与後、0.5、1、2、3 および 4 時間目に監視した。GLP - 1 ペプチドは血中グルコースを 30 分で下げたが、60 分までに血中グルコースは GLP - 1 ペプチドの短い半減期によるように再度上がり始めた。これと比較して、GLP - 1 (A2S) MMB は、GLP - 1 ペプチド用量よりも 100 倍低い用量で、全 4 時間にわたり血中グルコースに減少を誘導した。さらに血中グルコースの減少は用量依存的であった。

10

【0202】

実施例 9 : マウスおよびカニクイザルの GLP - 1 MMB の薬物動態学。4 種の GLP - 1 ミメティポディ (A2G、A2S、エキセンジン - cap、wt) の薬物動態を測定するために、C57 / B16 マウスに 1 mg / kg の MMB を静脈内投与した。血漿は異なる時点で屠殺したマウスの心穿刺を介して得た。種々の ELISA を使用して、Fc、全ミメティポディ、活性ミメティポディおよび活性ペプチドをそれらが動物中で経時的に代謝される時に測定した。活性な MMB はペプチドの完全な N 末端がミメティポディの Fc 領域に結合したままであることを反映している。ペプチド中の第 2 アミノ酸 (アラニン) のセリンもしくはグリシンへの置換が、循環中の活性 MMB を寿命を延ばす。

20

【0203】

カニクイザルに 1.0 mg / kg の 4 種の GLP - 1 MMB 構築物を静脈内注射し、そして血清サンプルを投与後 10 分から 5 日の異なる時点で採取した。血清サンプルは ELISA により評価して完全な MMB を定量した。4 種すべての MMB が急速な分布期、続いてゆっくりとした排除期を表す。薬物動態定数は、各構築物について計算し、そして T = 0 から T = 120 時間まで AUC により決定される類似の暴露で、約 3 日の T1 / 2 を示す。

30

【0204】

実施例 10 : 正常ラットへの CNTO736 の脳室内 (icv) 投与は、肥満の処置を支持する証拠を示す。

【0205】

体重 250 ~ 350 g の Sprague - Dawley ラットの側脳室に以下の条件でカニューレを挿入した : - 0.80 mm 前方、+ 1.2 mm 側方から プレグマ、- 3.2 mm 腹側から プレグマ。動物はアンジオテンシン II 試験にかけてカニューレが正しく配置されたことを確認した。ラットは逆にした明 / 暗サイクルおよび取り扱いに慣れさせた。給餌 (feeding) のベースラインを確立するために、単回の PBS 注射後、24 時間の絶食 / 再給餌 (refed) 測定を行った。動物は、PBS 注射から 24 時間の食物摂取に従い均一に分配された (10 匹の 3 群)。PBS 注射から 7 ~ 10 日後、ラットは 24 時間絶食させ、そして暗サイクルに入る前に icv を投与された。ラットは CNTO736 (3 nmol)、エキセンジン - 4 (3 nmol) または PBS のいずれかを 5 μ l の用量で投与された。食物摂取および水の摂取は、投与から 0 ~ 12 および 12 ~ 24 時間後に測定し、そして体重を 24 および 48 時間後に測定した。投与から最初の 12 時間で、エキセンジン - 4 および CNTO736 処置では食物および水の摂取に有意な減少があった。投与から次の 12 時間で (12 ~ 24 時間)、エキセンジン - 4 および CNTO736 の両方の処置には食物摂取に有意な減少があったが、水の摂取の減少はエキセンジン - 4 での処置のみに観察された。体重の減少がエキセンジン - 4 での処置で 24 および 48 時間の両方であったが、CNTO736 では無かった。

40

50

【0206】

実施例 1 1 正常ラットへの静脈内 (i v) C N T O 7 3 6 の投与

体重 250 ~ 350 g の Sprague - Dawley ラットは、逆にした明 / 暗サイクルおよび取り扱いに慣れさせた。給餌ベースラインを確立するために、単回の P B S 注射後、24 時間の絶食 / 再給餌測定を行った。動物は、P B S 注射から 24 時間の食物摂取に従い均一に分配された (10 匹の 3 群)。P B S 注射から 7 ~ 10 日後、ラットは 24 時間絶食させ、そして暗サイクルに入る前に i v 投与された。ラットは C N T O 7 3 6 (12 n m o l)、エキセジン - 4 (12 n m o l) または P B S のいずれかを投与された。食物摂取および水の摂取は、投与から 0 ~ 12 および 12 ~ 24 時間後に測定し、そして体重を 24 時間後に測定した。投与後、最初の 12 時間で、エキセジン - 4 および C N T O 7 3 6 処置では食物および水の摂取に有意な減少があった。投与後、次の 12 時間で (12 ~ 24 時間)、C N T O 7 3 6 処置の動物にのみ食物摂取に有意な減少があり、そして水の摂取の増加はエキセジン - 4 および C N T O 7 3 6 処置の動物の両方で観察された。体重の有意な減少はエキセジン - 4 および C N T O 7 3 6 処置で投与から 24 時間後にあった。

10

【0207】

実施例 1 2 正常ラットへの皮下 (s c) C N T O 7 3 6 投与

体重 250 ~ 350 g の Sprague - Dawley ラットは、逆にした明 / 暗サイクルおよび取り扱いに慣れさせた。給餌ベースラインを確立するために、単回の P B S 注射後、24 時間の絶食 / 再給餌測定を行った。動物は、P B S 注射から 24 時間の食物摂取に従い均一に分配された (10 匹の 3 群)。P B S 注射から 7 ~ 10 日後、ラットを 24 時間絶食させ、そして暗サイクルに入る前に皮下投与された。ラットは C N T O 7 3 6 (12 n m o l)、エキセジン - 4 (12 n m o l) または P B S のいずれかを投与された。食物摂取および水の摂取は、投与から 0 ~ 6、6 ~ 12 および 12 ~ 24 時間後に測定し、そして体重を 24 時間および 48 時間後に測定した。投与から最初の 6 時間で、エキセジン - 4 処置のみに食物および水の摂取に有意な減少があった。投与から次の 6 時間で (6 ~ 12 時間)、エキセジン - 4 および C N T O 7 3 6 処置の動物の両方に食物摂取に有意な減少があり、そして水の摂取の有意な減少がエキセジン - 4 処置動物にあった (C N T O 7 3 6 処置動物では有意ではなかった)。このデータは、s c 投与後の C N T O 7 3 6 に関する C m a x が約 6 時間であることを示す以前のデータと一致する。体重の有意な減少がエキセジン - 4 および C N T O 7 3 6 処置で投与から 48 時間ではなく 24 時間後にあった。

20

30

【0208】

実施例 1 3 : D I O マウスにおける C N T O 7 3 6 の長期投与

実験を始める前に (7 日)、I P G T T を D I O マウスに行った。簡単に説明すると、マウスを一晚 (21 時間) 絶食させ、そして基準の空腹時血中グルコース測定を t = - 5 分 (グルコース攻撃に対して) で取った。t = 0 分で、マウスに D - グルコース (1 . 0 m g / g) を i . p . 投与した。血中グルコースレベルは、15、30、60、90、120、150 および 180 分に測定した。I P G T T のデータは、血中グルコース対時間としてプロットし、そして A U C の使用してマウスを 4 群 (n = 7) に無作為化した。インスリンおよび H b A 1 c 測定のための血液は、実験を始める 3 日前に取った。

40

【0209】

実験開始の 1 日目に、マウスに C N T O 7 3 6 または賦形剤を 1 週間に 3 回 (月曜、水曜および金曜日) または毎日、全部で 6 週間投与した (表 3)。体重は毎日測定し、そして空腹時血中グルコースを 1 週間に 2 回測定した。I P G T T は処置から 2 週間後に繰り返し、そして再度、処置の 5 週間後に繰り返した。インスリンおよび H b A 1 c のための血液は、投与から 6 週間後に取った。また投与から 6 週間後に、1 および 2 群の動物を屠殺し、そして直ちに P I X 1 m u s を介して身体組成について分析した。

【0210】

【表 2】

表3

群	n	試験物質	用量 (mg/kg)	投与 スケジュール
1	7	賦形剤	N/A	1日あたり1X
2	7	CNTO 736	1	1日あたり1X
3	7	CNTO 736	0.1	1日あたり1X
4	7	CNTO 736	1	M, W, F

10

【0211】

CNTO736で毎日、または1週間に3回処置した動物の空腹時血中グルコースは、用量依存的様式で6週間にわたり低下した。処置した動物の体重も、賦形剤処置動物に比べて減少した。PBS処置動物は実験の過程で開始体重の6.5%増加したが、毎日CNTO736で処置した動物は、6週間後に体重が13.2%または1.2%(それぞれ1.0および0.1mg/kg)減少した。1週間に3回、CNTO736(1.0mg/kg)で処置した動物は、体重が5.8%減少した。PIXImus分析は、体重の減少が除脂肪量よりも脂肪量の損失によるものであることを明らかにした。

20

【0212】

まとめ：本明細書に記載するデータは、ミメティボディスカフォールド上のGLP-1ペプチドの提示が、肥満の治療薬としてのその用途を可能とする特性を持つ新規分子を生じることが示唆される。GLP-1ペプチド類似体は食物摂取および体重の減少を引き起こすことが示された。しかしこの効果の元にあるメカニズムは、十分に解明されていない。この効果は、脳のGLP-1受容体の活性化を介して媒介される得るか、あるいは末梢で発現するGLP-1が体重の調節に關与する求心性迷走神経経路を活性化できるのかもわからない。本明細書で提示するデータは、CNTO736が食物摂取および体重を減少させることができたことを示唆する。CNTO736の食物および水の摂取ならびに体重に及ぼす効果は、末梢または中枢投与のいずれかの後に観察され、中枢および末梢メカニズムは、GLP-1が媒介するエネルギーバランスに及ぼす効果に役割を果たすことができるらしいことを示唆している。CNTO736は、血液脳関門を通過しそうな高分子である(60kD)。すなわち末梢に投与されたCNTO736はその効果を迷走神経系の活性化を介して食物摂取に発揮するらしい。あるいはCNTO736は、血液脳関門の外側の脳領域に位置するGLP-1受容体を活性化して、食物および水の摂取に影響を及ぼす可能性がある。両方の仮説が試験されている。

30

利点：肥満を処置するための治療薬としてこの新規分子の使用は、他のGLP-1類似体に優る幾つかの利点を提供する。

【0213】

CNTO736は、他のGLP-1ペプチド類似体に比べて徐放性の薬物動態学的プロファイルを有する(カニクイザルでT1/2~5日)。これは、より長期間薬剤が循環に留まることを可能とし、これにより他の類似体よりも持続的な様式で食物摂取を減少させる。

40

【0214】

CNTO736は他のGLP-1ペプチド類似体よりも有意に大きい分子であり、そして血液脳関門を通過することができない。他のGLP-1類似体で観察される副作用(悪心および嘔吐)が中枢で媒介されるならば、CNTO736で処置された患者はこれらの副作用を体験しない可能性がある。

【0215】

50

このミメティボディ（商標）プラットフォームは、各ミメティボディ（商標）分子について2つのペプチドの発現を生じる。これはGLP-1ペプチドが互いに相互作用して、細胞表面のGLP-1受容体に対して上昇した親和性を持つ二量体リガンドの形成を可能にすることができる。

【0216】

参考文献

1. DE Cummings, M.S., Genetic and Pathophysiology of Human Obesity. *Annu. Rev. Med.*, 2003. 54: p. 453-471.
2. RR Wing, R.K., et al., Long-term Effects of Modest Weight Loss in Type II Diabetic Patients. *Arch. Intern. Med.*, 1987. 147: p. 1749-1753. 10
3. J Tuomilehto, J.L., et al., Prevention of Type II Diabetes Mellitus by Changes in Lifestyle Among Subjects with Impaired Glucose Tolerance. *New England Journal of Medicine*, 2001. 344: p. 1343-1350.
4. group, D.P.P.r., Reduction of the Incidence of Type II Diabetes with Lifestyle Intervention or Metformin. *New England Journal of Medicine*, 2002. 346: p. 393-403. 20
5. MJ Franz, J.B., et al., Evidence-based Nutrition Principles and recommendations for the Treatment of Diabetes and related Complications. *Diabetes Care*, 2002. 25: p. 148-198.
6. J.J. Holst, C.O., O. Vagn Nielsen and T.W. Schwartz, Truncated glucagon-like peptide I, an insulin-releasing hormone from the distal gut. 1987. 211(2): p. 169-174. 30
7. Svetlana Mojsov, G.H., Ira B. Wilson, Mariella Ravazzola, Lelio Orci, and Joel F. Habener, Preproglucagon Gene Expression in Pancrea and Intestine Diversifies at the Level of Post-translational Processing. *The Journal of Biological Chemistry*, 1986. 261(25): p. 11880-11884.
8. C. Orskov, L.R., A. Wettergren, H. Kofod, J.J. Holst, Tissue and plasma concentrations of amidated and glycine-extended glucagon-like peptide I in humans. *Diabetes*, 1994. 43(4): p. 535-539. 40
9. Daniel J. Drucker, J.P., Svetlana Mojsov, William L. Chick, and Joel F. Habener, Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987. 84: p. 3431-3438.
10. S. Suzuki, K.K., S. Ohashi, H. Mukai and K. 50

- Yamashita, Comparison of the effects of various C-terminal and N-terminal fragment peptides of glucagon-like peptide-1 on insulin and glucagon release from the isolated perfused rat pancreas. *Endocrinology*, 1989. 125: p. 3109-3114.
11. A Wettergren, B.S., PE Mortensen, J Myhre, J Christiansen, JJ Holst, Truncated GLP-1 (proglucagon 78-107-amide) inhibits gastric and pancreatic functions in man. *Dig Dis Sci*, 1993. 38(4): p. 665-673. 10
12. M Tang-Christensen, P.L., R Goke, A Fink-Jensen, DS Jessop, M Moller, SP Sheikh, Central administration of GLP-1 (7-36) amide inhibits food and water intake in rats. *American Journal of Physiology*, 1996. 271: p. R848-R856.
13. M.D. Turton, D.O.S., I. Gunn, S.A. Beak, C.M. B. Edwards, K. Meeran, S.J. Choi, G.M. Taylor, M.M. Heath, P.D. Lambert, J.P.H. Wilding, D.M. Smith, M.A. Ghatei, J. Herbert and S.R. Bloom, A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature*, 1996. 379: p. 69-72. 20
14. G van Dijk, T.T., RJ Seeley, SC Woods, IL Bernstein, Glucagon-like peptide-1 and satiety. *Nature*, 1997. 385: p. 214.
15. E Naslund, N.K., S Mansten, N Adner, JJ Holst, M Gutniak, PM Hellstrom, Prandial subcutaneous injections of glucagon-like peptide-1 cause weight loss in obese human subjects. *British Journal of Nutrition*, 2004. 91(3): p. 439-446. 30
16. Timothy J. Kieffer, C.H.S.M., and Raymond A. Pederson, Degradation of Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide and Truncated Glucagon-Like Peptide 1 in Vitro and in Vivo by Dipeptidyl Peptidase IV. *Endocrinology*, 1995. 136(9): p. 3585-3596.
17. John Eng, W.A.K., Latika Singh, Gurcharn Singh and Jean-Pierre Raufman, Isolation and Characterization of Exendin-4, an Exendin-3 Analogue, from Heloderma suspectum Venom. *The Journal of Biological Chemistry*, 1992. 267(11): p. 7402-7405. 40
18. C. Mark B. Edwards, S.A.S., Rachel Davis, Audrey E. Brynes, Gary S. Frost, Leighton J. Seal, Mohammad A. Ghatei, and Stephen R. Bloom, Exendin-4 reduces fasting and postprandial glucose and decreases energy intake 50

e in healthy volunteers. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2001. 281: p. E155 - E161.

19. Keating, G., Exenatide. Drugs, 2005. 65(12): p. 1681 - 1695.

20. Claus B. Juhl, M. H., Jeppe Sturis, Grethe Jakobsen, Henrik Agerso, Johannes Veldhuis, Niels Porksen and Ole Schmitz, Bedtime Administration of NN2211, a Long-Acting GLP-1 Derivative, Substantially Reduces Fasting and Postprandial Glycemia in Type 2 Diabetes. Diabetes, 2002. 51(2): p. 424 - 429.

10

21. Bodil Elbrond, G. J., Soren Larsen, Henrik Agerso, Lisbeth Bjerring Jensen, Paul Rolan, Jeppe Sturis, Vibeke Hatorp, Milan Zdravkovic, Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, Safety, and Tolerability of a Single-Dose of NN2211, a Long-Acting Glucagon-Like Peptide 1 Derivative, in Healthy Male Subjects. Diabetes Care, 2002. 25(8): p. 1398 - 1404.

20

【0217】

さらなる利点：肥満関連障害を処置するための治療薬としてこの新規分子の使用には、他のGLP-1アゴニストに優る幾つかの利点がある。例えば、GLP-1ペプチドの半減期を延ばすようである。またミメティボディスカフォールド中の野生型GLP-1ペプチドは、プロテアーゼ分解、特にDPP-IVに耐性である。これは変異体ペプチドよりも野生型GLP-1ペプチドでの処置を可能とすることができる。GLP-1は天然ペプチドであるので、変異したGLP-1類似体で処置した患者よりもGLP-1ミメティボディで処置した患者での免疫応答が低くなり得る。さらにGLP-1 MMBの大きなサイズによりそれが血液脳関門をわたることから排除される。これは悪心および不安が、脳のGLP-1Rに結びつくGLP-1に関連するので利点を提供できることになる。さらにミメティボディプラットフォームは各ミメティボディ分子上に2つのペプチドの発現を生じる。これはGLP-1ペプチドが互いに相互作用して、細胞表面のGLP-1受容体に対する親和性を上げることができる二量体リガンドの形成を可能とするかもしれない。

30

【0218】

本発明は前記説明および実施例に具体的に記載されている以外にも実施することができることは明白である。

【0219】

本発明の多くの修飾および変更が、上記教示に照らして可能であり、したがってそれらは本発明の範囲内にある。

40

【0220】

【表3】

表1

配列 番号			全 AA数	領域	
				FR1	FR4
47	重鎖 可変 領域	Vh1	125	1-31	81-125
48		Vh2	97	1-30	80-97
49		Vh3a	102	1-30	80-102
50		Vh3b	102	1-30	80-102
51		Vh3c	94	1-30	80-94
52		Vh4	106	1-30	80-106
53		Vh5	97	1-30	80-97
54		Vh6	91	1-30	80-91
55		Vh7	91	1-30	80-91

配列 番号			AA数	領域						
				ヒンジ1	ヒンジ2	ヒンジ3	ヒンジ4	CH2	CH3	
56	重鎖 定常 領域	IgA1	354	103-122					123-222	223-354
57		IgA2	340	103-108					109-209	210-340
58		IgD	384	102-135	319-497				160-267	268-384
59		IgE	497						104-210	211-318
60		IgG1	339	99-121					122-223	224-339
61		IgG2	326	99-117					118-219	220-326
62		IgG3	377	99-115			131-145	146-168	169-270	271-377
63		IgG4	327	99-110	324-476				111-220	221-327
64		IgM	476						105-217	218-323

【0221】

【表 4】

表2: MMB CNTO 736 GLP-1 アミノ酸配列

シグナル配列.....

Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln
 ATG GCT TGG GTG TGG ACC TTG CTA TTC CTG ATG GCG GCC GCC CAA

..... GLP-1.....

Ser Ile Gln Ala His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser
 AGT ATA CAG GCC CAT GCT GAA GGG ACC TTT ACT AGT GAT GTA AGT

.....

Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu
 TCT TAT TTG GAA GGC CAA GCT GCC AAG GAA TTC ATT GCT TGG CTG

..... リンカー VH.....

Val Lys Gly Arg Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr Leu
 GTG AAA GGC CGA GGA GGT GGA TCC GGT GGA GGC TCC GGT ACC TTA

..... ヒンジ

Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 GTC ACC GTC TCC TCA GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT CAC ACG

..... CH2.....

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 TGC CCA CCG TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC

.....

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CGG

.....

Thr Pro glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA GAC

.....

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG GTG CAT

.....

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr tyr
 AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC

.....

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 CGG GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT

.....

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA GCC

..... CH3.....

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA

.....

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG

.....

10

20

30

40

【 0 2 2 2 】

【表 5】

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC

.....
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC

.....
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC

.....
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 CTC TAC AGC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG

.....
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC

..... 停止
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys (SEQ ID NO:69)
 TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA (SEQ ID NO:70)

10

【配列表】

2009526750000001.app

20

【 国際調査報告 】

60800630009



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No.
 PCT/US 06/2223

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(B) - A61K 38/00, 38/04; C07K 5/00 (2006.04) USPC - 514/15; 530/327 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) USPC: 514/15; 530/327 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 435/69.7; 514/15-17; 530/324, 327-331; 564/162-163 (text search-see search terms below) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST(PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB); Google Search terms: GLP-1, mimetobody, linker, CH2, CH3		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/067175 A2 (O'NEIL et al.) 20 October 2005 (20.10.2005) para [0011]-[0012], [0177]-[0181], [0255]; claim 3	3 and 16
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 26 August 2008 (26.08.2008)		Date of mailing of the international search report 02 SEP 2008
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lea W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774 11.11.2008

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP 08/82223

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

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

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: 1-2, 4-15 and 17-29
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Claims 1-2, 4-15 and 17-29 are unsearchable as no valid CRF was filed in response to the ISA/225 of 13 November 2007.

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

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

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I			テーマコード(参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/00	B	4 H 0 4 5
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 N	5/00	C	
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q	1/68	A	
C 1 2 N 5/00 (2006.01)	C 1 2 Q	1/02		
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N	5/00	D	
C 0 7 K 14/605 (2006.01)	C 1 2 N	15/00	A	
	C 0 7 K	14/605		

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

(72)発明者 ストジヤノビク - ススリク, ベドラナ

アメリカ合衆国ニュージャージー州 0 8 5 5 0 プリンストンジャンクシヨン・ノーチエスタードライブ 2 6

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA08 BA80 CA04 DA01 DA02 DA06 EA04 GA11 HA03
 HA17
 4B063 QA18 QA19 QQ08 QQ09 QQ43 QQ52 QQ94 QR08 QR32 QR56
 QR62 QR77 QR78 QS25 QS34 QX02
 4B065 AA88X AA90X AB01 AC14 BA02 BB19 CA24 CA44 CA46 CA53
 4C084 AA02 AA17 BA01 BA22 BA23 BA35 DC50 NA14 ZA701
 4C085 AA13 AA15 BB11
 4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 CA40 DA30 EA28 EA50 FA74 GA21

专利名称(译)	GLP-1激动剂，组合物，方法和用途		
公开(公告)号	JP2009526750A	公开(公告)日	2009-07-23
申请号	JP2008547703	申请日	2006-12-18
[标]申请(专利权)人(译)	森托科尔公司		
申请(专利权)人(译)	Centocor公司，股份有限公司的Rete每次		
[标]发明人	オニールカリンティー ピチャクリステン ストジヤノビクススリクベドラナ		
发明人	オニール,カリン・ティー ピチャ,クリステン ストジヤノビク-ススリク,ベドラナ		
IPC分类号	A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61P3/04 G01N33/53 C12N5/10 C12Q1/68 C12Q1/02 C12N5/00 C12N15/09 C07K14/605		
CPC分类号	A61K38/26 A61K47/6811 A61K47/6849 A61K48/00 A61P3/04 C07K2319/30		
FI分类号	A61K37/02.ZNA A61K39/395.D A61K45/00 A61P3/04 G01N33/53.B C12N5/00.B C12N5/00.C C12Q1/68.A C12Q1/02 C12N5/00.D C12N15/00.A C07K14/605		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA08 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA03 4B024/HA17 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ09 4B063/QQ43 4B063/QQ52 4B063/QQ94 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QR78 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4B065/AA88X 4B065/AA90X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BB19 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4B065/CA53 4C084/AA02 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/BA35 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZA701 4C085/AA13 4C085/AA15 4C085/BB11 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA30 4H045/EA28 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA21		
优先权	60/752826 2005-12-22 US		
其他公开文献	JP2009526750A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及编码至少一种GLP-1模拟体或特定部分或变体的分离的核酸，至少一种新的人GLP-1模拟体，或特定部分或变体，GLP-1包括模拟体或特定部分或变体，载体，宿主细胞，转基因动物或植物，以及用于治疗肥胖相关病症的治疗组合物，方法和装置。

群	n	試験物質	用量 (mg/kg)	投与 スケジュール
1	7	賦形剤	N/A	1日あたり1X
2	7	CNTO 736	1	1日あたり1X
3	7	CNTO 736	0.1	1日あたり1X
4	7	CNTO 736	1	M, W, F