

(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2005-529862

(P2005-529862A)

(43) 公表日 平成17年10月6日(2005.10.6)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 7/08</b>	C07K 7/08 ZNA	4C084
<b>A61K 38/00</b>	A61P 1/18	4H045
<b>A61P 1/18</b>	A61P 3/04	
<b>A61P 3/04</b>	A61P 3/10	
<b>A61P 3/10</b>	A61P 43/00 105	
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 38 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2003-580362 (P2003-580362)	(71) 出願人	504326837 プロシディオン・リミテッド Prosidion Limited 英国オーエックス4・6エルティ、オックスフォード、ワトリントン・ロード、ウィンドラッシュ・コート
(86) (22) 出願日	平成15年3月28日 (2003. 3. 28)	(74) 代理人	100068526 弁理士 田村 恭生
(85) 翻訳文提出日	平成16年11月26日 (2004. 11. 26)	(74) 代理人	100076521 弁理士 坪井 有四郎
(86) 国際出願番号	PCT/EP2003/003307	(74) 代理人	100126778 弁理士 品川 永敏
(87) 国際公開番号	W02003/082898	(72) 発明者	サイモン・エイ・ヒンク ベルギー1040ブリュッセル、リュ・レオン・ドゥ・ランシェール14番 最終頁に続く
(87) 国際公開日	平成15年10月9日 (2003. 10. 9)		
(31) 優先権主張番号	60/368, 197		
(32) 優先日	平成14年3月28日 (2002. 3. 28)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 グルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチドの新規アナログ

## (57) 【要約】

本発明は、胃抑制性ポリペプチドの新規なC末端欠失した断片および新規なN末端修飾したアナログ並びにジペプチジルペプチダーゼIV(DPIV)耐性の改善および半減期の延長を目的としてペプチド結合が還元されたまたはDPIV特異的開裂部位に近接したアミノ酸の変化した種々のGIPアナログに関する。さらに、本発明は、GIPの潜在的なレセプター結合部位間に種々のリンカーを有する新規なアナログに関する。本発明の化合物および薬理的に許容しうるその塩は、インスリン非依存性糖尿病や肥満などのGIPレセプターによって媒体される状態の治療に有用である。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

天然の G I P ( 1 - 1 4 ) の配列を除く、アミノ酸配列：

Tyr-A-B-Gly-Thr-Phe-Ile-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Ala-Met

( 式中、A および B は、D - アミノ酸残基、N - メチル化アミノ酸残基または他のタンパク質非構成性アミノ酸残基を含むアミノ酸残基である ) を有する化合物または薬理的に許容しうるその塩。

## 【請求項 2】

1 位のチロシン残基の N 末端が、アルキル化、スルホニル化、グリケーション、ホモセリン形成、ピログルタミン酸形成、ジスルフィド結合形成、アスパラギンまたはグルタミン残基の脱アミド化、メチル化、t - ブチル化、t - ブチルオキシカルボニル化、4 - メチルベンジル化、チオアニシル化、チオクレシル化、ベンジルオキシメチル化、4 - ニトロフェニル化、ベンジルオキシカルボニル化、2 - ニトロベンゾイル化、2 - ニトロスルフェニル化、4 - トルエンスルホン化、ペンタフルオロフェニル化、ジフェニルメチル化、2 - クロロベンジルオキシカルボニル化、2, 4, 5 - トリクロロフェニル化、2 - ブロモベンジルオキシカルボニル化、9 - フルオレニルメチルオキシカルボニル化、トリフェニルメチル化、2, 2, 5, 7, 8 - ペンタメチルクロマン - 6 - スルホニル化、ヒドロキシ化、メチオニンの酸化、ホルミル化、アセチル化、アニシル化、ベンジル化、ベンゾイル化、トリフルオロアセチル化、アスパラギン酸またはグルタミン酸のカルボキシル化、リン酸化、硫酸化、システイン化、ペントース、デオキシヘキソース、ヘキソサミン、ヘキソースまたは N - アセチルヘキソサミンとのグリコシル化、ファルネシル化、ミリストイル化、ピオチン化、パルミトイル化、ステアロイル化、ゲラニルゲラニル化、グルタチオン化、5' - アデノシル化、ADP - リボシル化、N - グリコリルノイラミン酸、N - アセチルノイラミン酸、ピリドキサルリン酸、リポ酸、4' - ホスホパンテテイン、および N - ヒドロキシスクシンイミドでの修飾によって修飾することができる、請求項 1 に記載の化合物。

## 【請求項 3】

該ペプチドが、いずれかのアミノ酸位置において少なくとも 1 の - アミノ脂肪酸アシル化リシンの導入によって修飾されている、請求項 1 または 2 に記載の化合物。

## 【請求項 4】

アミノ酸配列：

Tyr-(D-Ala)-Glu-Gly-Thr-Phe-Ile-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Ala-Met

を有する、請求項 1、2 または 3 に記載の化合物。

## 【請求項 5】

アミノ酸配列：

Tyr-Ala-Pro-Gly-Thr-Phe-Ile-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Ala-Met

を有する、請求項 1、2 または 3 に記載の化合物。

## 【請求項 6】

還元されたペプチド結合を含む下記アミノ酸配列：

Tyr-Ala- (CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>)-Glu-Gly-Thr-Phe-Ile-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Ala-Met ; または

Tyr-Ala- (CH<sub>2</sub>NH)-Glu-Gly-Thr-Phe-Ile-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Ala-Met-Asp-Lys-Ile-His-Gln-Gln-Asp-Phe-Val-Asn-Trp-Leu-Leu-Ala-Gln-Lys

を有する化合物または薬理的に許容しうるその塩。

## 【請求項 7】

アミノ酸配列：

Tyr-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Ile-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Tyr-Met

を有する化合物または薬理的に許容しうるその塩。

## 【請求項 8】

アミノ酸配列：

Ala-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Ile-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Ala-Met ;

Tyr-Ala-Ala-Gly-Thr-Phe-Ile-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Ala-Met ;  
 Tyr-Ala-Glu-Ala-Thr-Phe-Ile-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Ala-Met ;  
 Tyr-Ala-Glu-Gly-Ala-Phe-Ile-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Ala-Met ;  
 Tyr-Ala-Glu-Gly-Thr-Ala-Ile-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Ala-Met ;  
 Tyr-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Ala-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Ala-Met ;  
 Tyr-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Ile-Ala-Asp-Tyr-Ser-Ile-Ala-Met ;  
 Tyr-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Ile-Ser-Ala-Tyr-Ser-Ile-Ala-Met ;  
 Tyr-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Ile-Ser-Asp-Ala-Ser-Ile-Ala-Met ;  
 Tyr-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Ile-Ser-Asp-Tyr-Ala-Ile-Ala-Met ;  
 Tyr-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Ile-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ala-Ala-Met ; または  
 Tyr-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Ile-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Ala-Ala  
 を有する化合物または薬理的に許容しうるその塩。

10

## 【請求項 9】

1 またはそれ以上のリンカーペプチドを含む下記アミノ酸配列：

Tyr-A-B-Gly-Thr-Phe-C-Gln-Gln-Asp-Phe-Val-Asn-Trp-Leu-Leu-Ala-Gln-Lys-Gly-Lys-Lys-Asn-Asp-Trp-Lys-His-Asn-Ile-Thr-Gln

(式中、Cは、

(a) 使用されない、

(b) アミノ酸残基、D-アミノ酸およびタンパク質非構成性アミノ酸よりなる群から選ばれた4のアミノ酸残基を含むリンカーペプチド、

20

(c) Glu-Lys-Glu-Lys、

(d) Ala-Ala-Ala-Ala、

(e) アミノ酸残基、D-アミノ酸およびタンパク質非構成性アミノ酸よりなる群から選ばれた12のアミノ酸残基を含むリンカーペプチド、

(f) Glu-Lys-Glu-Glu-Lys-Glu-Lys-Glu-Glu-Lys-Glu-Lys、

(g) 6-Ahx<sub>n</sub> (6-アミノヘキサン酸) (n = 1 ~ 3) ; または

(h) 6ないし34個の炭素原子を有するオメガ-アミノ脂肪酸(飽和および/または不飽和) ; および

AおよびBは、アミノ酸残基、D-アミノ酸残基、N-メチル化アミノ酸残基または他のタンパク質非構成性アミノ酸残基である)を有する化合物または薬理的に許容しうるその塩。

30

## 【請求項 10】

1位のチロシン残基のN末端が、アルキル化、スルホニル化、グリケーション、ホモセリン形成、ピログルタミン酸形成、ジスルフィド結合形成、アスパラギンまたはグルタミン残基の脱アミド化、メチル化、t-ブチル化、t-ブチルオキシカルボニル化、4-メチルベンジル化、チオアニシル化、チオクレシル化、ベンジルオキシメチル化、4-ニトロフェニル化、ベンジルオキシカルボニル化、2-ニトロベンゾイル化、2-ニトロスルフェニル化、4-トルエンスルホン化、ペンタフルオロフェニル化、ジフェニルメチル化、2-クロロベンジルオキシカルボニル化、2,4,5-トリクロロフェニル化、2-ブromoベンジルオキシカルボニル化、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル化、トリフェニルメチル化、2,2,5,7,8-ペンタメチルクroman-6-スルホニル化、ヒドロキシル化、メチオニンの酸化、ホルミル化、アセチル化、アニシル化、ベンジル化、ベンゾイル化、トリフルオロアセチル化、アスパラギン酸またはグルタミン酸のカルボキシル化、リン酸化、硫酸化、システイン化、ペントース、デオキシヘキソース、ヘキソサミン、ヘキソースまたはN-アセチルヘキソサミンとのグリコシル化、ファルネシル化、ミリストイル化、ピオチン化、パルミトイル化、ステアロイル化、ゲラニルゲラニル化、グルタチオン化、5'-アデノシル化、ADP-リボシル化、N-グリコリルノイラミン酸、N-アセチルノイラミン酸、ピリドキサルリン酸、リポ酸、4'-ホスホパンテテイン、およびN-ヒドロキシスクシンイミドでの修飾によって修飾することができる、請求項9に記載の化合物。

40

50

## 【請求項 1 1】

該ペプチドが、いずれかのアミノ酸位置において少なくとも1の - アミノ脂肪酸アシル化リシンの導入によって修飾されている、請求項 9 または 10 に記載の化合物。

## 【請求項 1 2】

該ペプチドが、A と B との間での還元されたペプチド結合またはペプチド結合の他の修飾の導入によって修飾されている、請求項 9、10 または 11 に記載の化合物。

## 【請求項 1 3】

1 またはそれ以上のリンカーペプチドを含む下記アミノ酸配列：

Tyr-A-B-Gly-Thr-Phe-Ile-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Ala-Met-D-Gln-Gln-Asp-Phe-Val-Asn-Trp-Leu-Leu-Ala-Gln-Lys-Gly-Lys-Lys-Asn-Asp-Trp-Lys-His-Asn-Ile-Thr-Gln

10

(式中、D は、

(a) 使用されない、

(b) アミノ酸残基、D - アミノ酸およびタンパク質非構成性アミノ酸よりなる群から選ばれた4のアミノ酸残基を含むリンカーペプチド、

(c) Ala-Ala-Ala-Ala、

(d) Glu-Lys-Glu-Lys、

(e) 6-Ahx<sub>n</sub> (6 - アミノヘキサン酸) (n = 1 ~ 3) ; または

(f) 6 ないし 3 4 個の炭素原子を有するオメガ - アミノ脂肪酸 (飽和および / または不飽和) ; および

A および B は、アミノ酸残基、D - アミノ酸残基、N - メチル化アミノ酸残基または他のタンパク質非構成性アミノ酸残基である) を有する化合物および薬理的に許容しうるその塩。

20

## 【請求項 1 4】

1 位のチロシン残基の N 末端が、アルキル化、アセチル化またはグリケーションによって修飾することができる、請求項 1 3 に記載の化合物。

## 【請求項 1 5】

該ペプチドが、いずれかのアミノ酸位置において少なくとも1の - アミノ脂肪酸アシル化リシンの導入によって修飾されている、請求項 1 3 または 1 4 に記載の化合物。

## 【請求項 1 6】

該ペプチドが、A と B との間での還元されたペプチド結合またはペプチド結合の他の修飾の導入によって修飾されている、請求項 1 3、1 4 または 1 5 に記載の化合物。

30

## 【請求項 1 7】

リン酸化セリル残基を含む下記アミノ酸配列：

Tyr-[Ser(P)]-Glu-Gly-Thr-Phe-Ile-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Ala-Met、

Tyr-[Ser(P)]-Glu-Gly-Thr-Phe-Ile-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Ala-Met-Asp-Lys-Ile-His-Gln-Gln-Asp-Phe-Val-Asn-Trp-Leu-Leu-Ala-Gln-Lys、または

Tyr-[Ser(P)]-Glu-Gly-Thr-Phe-Ile-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Ala-Met-Asp-Lys-Ile-His-Gln-Gln-Asp-Phe-Val-Asn-Trp-Leu-Leu-Ala-Gln-Lys-Gly-Lys-Lys-Asn-Asp-Trp-Lys-His-Asn-Ile-Thr-Gln

を有する化合物または薬理的に許容しうるその塩。

40

## 【請求項 1 8】

アミノ酸配列：

Tyr-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Ile-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Ala-Met-

Asp-Lys-Ile-His-Gln-Gln-Asp-Phe-Val-Asn-Trp-Leu-Leu-Ala-Gln-Lys

を有する化合物または薬理的に許容しうるその塩。

## 【請求項 1 9】

遊離のカルボン酸の形態または薬理的に許容しうるその塩である、請求項 1 ないし 1 8 のいずれかに記載の化合物。

## 【請求項 2 0】

50

アミドの形態または薬理的に許容しうるその塩である、請求項 1 ないし 18 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 21】

ジペプチジルペプチダーゼ I V またはジペプチジルペプチダーゼ I V 様の酵素活性による分解に対して耐性である、請求項 1 ないし 20 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 22】

G I P - レセプターアゴニストである、請求項 1 ないし 21 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 23】

G I P - レセプターアンタゴニストである、請求項 1 ないし 21 のいずれかに記載の化合物。 10

【請求項 24】

サイクリック A M P 産生を増大させる、請求項 1 ないし 23 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 25】

カパーゼ - 3 の活性化を阻止する、請求項 1 ないし 24 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 26】

薬理的に許容しうる担体または希釈液および請求項 1 ないし 25 のいずれかに記載の化合物または薬理的に許容しうるその酸付加塩を含む医薬組成物。

【請求項 27】

G I P - レセプターアナログの損なわれた結合に関連する疾患または状態の予防または治療用医薬の製造のための、請求項 1 ないし 26 のいずれかに記載の医薬組成物または化合物または薬理的に許容しうるその酸付加塩の使用。 20

【請求項 28】

細胞アポトーシスの予防または治療用医薬の製造のための請求項 27 に記載の使用。

【請求項 29】

膵細胞のグルコース依存性増殖の増大用医薬の製造のための請求項 27 に記載の使用。

【請求項 30】

インスリン非依存性糖尿病および肥満の治療用医薬の製造のための請求項 27 に記載の使用。 30

【請求項 31】

G I P - レセプター結合によって媒体される状態の治療方法であって、そのような治療を必要とする哺乳動物に治療学的有効量の請求項 1 ないし 26 のいずれかに記載の化合物または医薬組成物を投与することを含む方法。

【請求項 32】

食物摂取の結果、哺乳動物において上昇した血中グルコースレベルを低下させる方法であって、治療学的有効量の請求項 1 ないし 26 のいずれかに記載の少なくとも 1 の化合物または医薬組成物を投与することを含む方法。

【請求項 33】

ペプチド配列の 2 つのアミノ酸残基間での側鎖ラクタム架橋の導入によって修飾されている、請求項 1 ないし 26 のいずれかに記載の化合物または医薬組成物または薬理的に許容しうるその塩。 40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、グルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド (G I P) の新規アナログ、該化合物を含む医薬組成物、および G I P レセプターによって媒体された状態の治療のための G I P レセプターアゴニストまたはアンタゴニストとしての該化合物の使用の領域に関する。 50

## 【背景技術】

## 【0002】

42アミノ酸ペプチドであるインクレチン (incretin) GIP (グルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド) は、経口で栄養を摂取したのに応答して小腸のK細胞から血中に放出される。GIPは、胃酸の分泌を抑制し、膵臓島細胞からのインスリンの放出を促進する [ 1 , 2 ]。GIPとグルカゴン様ペプチド - 1<sub>7-36</sub> (tGLP - 1) との併合作用が、腸 - ランゲルハンス島軸 (entero-insular axis) の全インクレチン作用を説明するのに十分であることが示されている [ 3 ]。GIPおよび関連ホルモンである tGLP - 1 は、II型 (インスリン非依存性) 糖尿病の病因に関与していると考えられている。インクレチン、とりわけGLP - 1の生理作用は、インスリン分泌の促進のみならず、胃の空隙化 (gastric emptying) の抑制 [ 4 ] およびグルカゴン放出の抑制 [ 5 , 6 , 7 , 8 ] によっても示されており、改善されたグルコース耐性という結果となる。さらに、GIPは脂肪細胞機能の重要なレギュレーターであり、GIP機能の変化はヒトの肥満の進行に貢献しうる [ 9 ]。

10

## 【0003】

血清中ではGIPおよびtGLP - 1の両インクレチンがジペプチジルペプチダーゼIV (DPIV) により分解される。その結果として短い半減期 (インビボでは ~ 2分) はGIPおよびtGLP - 1の治療目的の使用を制限している [ 10 , 11 , 12 ]。tGLP - 1の場合、DPIV耐性の改善された生物学的に活性なtGLP - 1アナログを得ることに幾つかの研究が向けられている [ 13 , 14 ]。GIPについては、DPIV耐性の改善されたアナログを得るべく予備的研究がなされている [ 20 ]。最近、完全長GIP (1 - 30) アナログである Tyr<sup>1</sup> - グルシトール - GIP [ 15 ] および (Pro<sup>3</sup>) GIP [ 20 , 21 ] が DPIV耐性および向上した生物活性を示すことが証明された。

20

## 【0004】

Gタンパク質結合レセプターファミリー [ 16 , 17 ] の一員であるGIPレセプターはGIPに対して高い特異性を有し、グルカゴンファミリーの他のペプチドには結合しない。この理由からGLP - 1 / GIPキメラペプチドはGIPレセプターに対する親和性を殆ど示さない [ 18 ]。そのような研究に基づき、GIP<sub>1-42</sub>分子のGIP<sub>1-30</sub>配列はレセプター認識のために必須であると結論付けられている。このことは、Gellingら [ 19 ] によって確認された。Gellingらは、GIP<sub>6-30</sub>アミド (GIP<sub>6-30a</sub>) がGIP<sub>1-42</sub>の高親和性結合領域を含むが、他のN末端欠失形態がそうであるようにアンタゴニスト活性を示すことを示した。

30

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0005】

種々の標的臓器の機能に対するGIPアナログの作用および治療剤としてのGIPアナログの潜在的使用に関連して以下の特許出願がなされている。

## 【0006】

DE 19921537は、インスリン産生細胞の増殖の刺激およびそのプログラムされた細胞死の回避により該細胞の生存を引き延ばす方法を開示している。その特別の目標は、内生のインスリン含量および上昇した血中グルコースレベルに対するインスリン応答を増大させることである。この発明の重要な要素は、GLP - 1、GIP、エクセンディン - 4 (Exendin-4) やGLP - 1レセプターアゴニストまたはGIPレセプターアゴニストなどのエフェクターの投与に応答したインスリン産生細胞中でのプロテインキナーゼB / Aktの活性化である。

40

## 【0007】

EP 0479210は、式：GIP(1-13)-X-GIP(15-30)-Y [ 式中、XはMet以外のアミノ酸残基、Yはホモセリン (ホモセリン - ラクトンを含み、「Hse」と称する)、ホモセリンアミド (Hse - NH<sub>2</sub>)、H-Gly-Lys-Lys-Asn-Asp-Trp-Lys-His-Asn-Ile-Thr-Gln

50

-HseまたはH-Gly-Lys-Lys-Asn-Asp-Trp-Lys-His-Asn-Ile-Thr-Gln-Hse-NH<sub>2</sub>から選ばれる ]で示される新規GIPアナログを開示している。

【0008】

WO98/24464は、GIPの配列の位置7~30に対応する24アミノ酸ポリペプチドから本質的になるグルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド(GIP)のアンタゴニスト、インスリン非依存性糖尿病の治療方法およびインスリン非依存性糖尿病患者においてグルコース耐性を改善する方法を開示している。

【0009】

WO00/58360は、インスリンの放出を刺激するペプチドを開示している。この発明は、とりわけ、GIPのN末端を修飾する方法および糖尿病の治療のための該ペプチドアナログの使用を提供している。この発明に開示された特別のペプチドアナログは、GIP(1-42)のN末端からの少なくとも15アミノ酸残基を含む。他の態様において、Tyr<sup>1</sup>グルシトールGIP(1-42)が開示されている。

10

【0010】

WO00/20592は、骨密度または骨形成を維持または増大させるためのGIPアナログとしてのGIPまたはGIPもしくはその断片の抗イディオタイプ抗体を開示している。

【0011】

参考文献

【表1】

20

1. Brown, J. C., Mutt, V. および Pederson, R. A. (1970). Further purification of a polypeptide demonstrating enterogastrone activity. *J Physiol (Lond)* 209 (1):57-64
2. Creutzfeldt, W. (1979) The incretin concept today. *Diabetologia* ;16, 75-85
3. Fehmman, H.C., Goke, B., Goke, R., ら (1989) Synergistic stimulatory effect of glucagon-like peptide-1 (7-36) amide and glucose-dependent insulin-releasing polypeptide on the endocrine rat pancreas. *FEBS Lett* ;252, 109-112
4. Nauck, M.A., Niedereichholz, U., Ettler, R., ら (1997) Glucagon-like peptide 1 inhibition of gastric emptying outweighs its insulinotropic effects in healthy humans. *Am J Physiol* ;273, E981-E988
5. Gutniak, M.K., Linde, B., Holst, J. J., ら (1994) Subcutaneous injection of the incretin hormone glucagon-like peptide 1 abolishes postprandial glycemia in NIDDM. *Diabetes Care* ;17, 1039-1044
6. Gutniak, M., Orskov, C., Holst, J. J., ら (1992) Antidiabetogenic effect of glucagon-like peptide-1 (7-36)amide in normal subjects and patients with diabetes mellitus [see comments]. *N Engl J Med* ;326, 1316
7. Nauck, M.A., Woitschlager, D., Werner, J., ら (1996) Effects of subcutaneous glucagon-like peptide 1 (GLP-1 [7-36 amide]) in patients with NIDDM. *Diabetologia* ; 39, 1546
8. Nauck, M.A., Kleine, N., Orskov, C., ら (1993) Normalization of fasting hyperglycaemia by exogenous glucagon-like peptide 1 (7-36 amide) in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* ;36, 741-744
9. McIntosh, C.H., Bremsak, I., Lynn, F. C., ら (1999) Glucose-dependent insulinotropic polypeptide stimulation of lipolysis in differentiated 3T3-L1 cells: wortmannin-sensitive inhibition by insulin. *Endocrinology* ;140, 398
10. Mentlein, R., Gallwitz, B., Schmidt, W. E. (1993) Dipeptidyl-peptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1(7-36)amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum. *Eur.J.Biochem.* 214, 829-835

30

【0012】

40

## 【表 2】

11. Kieffer, T.J., McIntosh, C. H., Pederson, R. A. (1995) Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV. *Endocrinology* 136, 3585-3596
12. Pauly, R. P., Rosche, F., Wermann, M., McIntosh, C. H. S., Pederson, R. A., および Demuth, H. U. Investigation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide-(1-42) and glucagon-like peptide-1-(7-36) degradation in vitro by dipeptidyl peptidase IV using matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry - A novel kinetic approach. *J Biol Chem* 271(38), 23222-23229. 1996.
13. Deacon, C.F., Knudsen, L. B., Madsen, K., ら (1998) Dipeptidyl peptidase IV resistant analogues of glucagon-like peptide-1 which have extended metabolic stability and improved biological activity. *Diabetologia* 41, 271-278
14. Siegel, E.G., Gallwitz, B., Scharf, G., ら (1999) Biological activity of GLP-1-analogues with N-terminal modifications. *Regul Pept* 79, 93-102 10
15. O'Harte, F.P., Mooney, M. H., Flatt, P. R. (1999) NH<sub>2</sub>-terminally modified gastric inhibitory polypeptide exhibits amino-peptidase resistance and enhanced antihyperglycemic activity. *Diabetes* 48, 758-765
16. Gallwitz, B., Witt, M., Folsch, U. R., ら (1993) Binding specificity and signal transduction of receptors for glucagon-like peptide-1(7-36)amide and gastric inhibitory polypeptide on RINm5F insulinoma cells. *J Mol Endocrinol* 10, 259-268
17. Amiranoff, B., Vauclin-Jacques, N., Laburthe, M. (1984) Functional GIP-receptors in a hamster pancreatic beta cell line, In 111: specific binding and biological effects. *Biochem Biophys Res Commun* 123, 671-676
18. Gallwitz, B., Witt, M., Morys-Wortmann, C., ら (1996) GLP-1/GIP chimeric peptides define the structural requirements for specific ligand-receptor interaction of GLP-1. *Regul Pept* 63, 17-22
19. Gelling, R.W., Coy, D. H., Pederson, R. A., ら (1997) GIP(6-30amide) contains the high affinity binding region of GIP and is a potent inhibitor of GIP1-42 action in vitro. *Regul Pept* 69, 151-154 20
20. Kühn-Wache, K., Manhart, S., Hoffmann, T., ら (2000) Analogs of Glucose-dependent insulinotropic polypeptide with increased dipeptidyl peptidase IV resistance. IN: Langner & Ansorge, *Cellular peptidases in Immune Functions and Diseases 2*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, 187-195
21. Gault, V.A., O'Harte, F.P.M., Harriott, P. ら (2002) Characterization of the cellular and metabolic effects of a novel enzyme-resistant antagonist of Glucose-dependent insulinotropic polypeptide. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 290, 1420-1426.

## 【課題を解決するための手段】

## 【0013】

本発明は、胃抑制性ポリペプチドの新規なC末端欠失した断片および新規なN末端修飾したアナログ並びにジペプチジルペプチダーゼIV(DPIV)耐性の改善および半減期の延長を目的としてペプチド結合が還元されたまたはDPIV特異的開裂部位に近接したアミノ酸の変化した種々のGIPアナログに関する。さらに、本発明は、GIPの潜在的なレセプター結合部位間に種々のリンカーを有する新規なアナログに関する。 30

## 【0014】

本発明の化合物およびその薬理的に許容しうる塩は、インスリン非依存性糖尿病を含む、GIPレセプター機能が変化した状態を治療するのに有用である。2つの特別の応用が提唱される：

1. 本発明の化合物は、膵細胞のグルコース依存性増殖を増大させることができる。
2. 本発明の化合物は、膵細胞に対して抗アポトーシス作用を有する。 40

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0015】

本発明は、グルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチドの新規なC末端欠失した断片および新規なN末端修飾したアナログ並びにジペプチジルペプチダーゼIV(DPIV)耐性の改善および半減期の延長を目的としてペプチド結合が還元されたまたはDPIV特異的開裂部位に近接したアミノ酸の変化した種々のGIPアナログに関する。本発明によるアミノ酸の変化は、L-アミノ酸、D-アミノ酸、タンパク質構成性(proteinogenic)アミノ酸およびタンパク質非構成性(non-proteinogenic)アミノ酸の残基を包含する。タンパク質構成性アミノ酸は、天然のタンパク質由来の -アミノ酸として定義される。タンパク質非構成性アミノ酸は、通常天然タンパク質の構築ブロックを構成しない 50

他のすべてのアミノ酸として定義される。

【0016】

さらに、本発明は、GIPの潜在的なレセプター結合部位間に種々のリンカーを有する新規なアナログに関する。

【0017】

さらに詳細には、本発明は、式(1)：



(式中、AおよびBは、D-アミノ酸残基、N-メチル化アミノ酸残基または他のタンパク質非構成性アミノ酸残基を含むアミノ酸残基である)により示される一般的なアミノ酸配列を有する新規なGIPアナログに関する。さらに、1位のチロシン残基のN末端は、アルキル化、スルホニル化、グリケーション、ホモセリン形成、ピログルタミン酸形成、ジスルフィド結合形成、アスパラギンまたはグルタミン残基の脱アミド化、メチル化、t-ブチル化、t-ブチルオキシカルボニル化、4-メチルベンジル化、チオアニシル化(thioanysilation)、チオクレシル化(thiocresylation)、ベンジルオキシメチル化、4-ニトロフェニル化、ベンジルオキシカルボニル化、2-ニトロベンゾイル化、2-ニトロスルフェニル化、4-トルエンスルホン化、ペンタフルオロフェニル化、ジフェニルメチル化、2-クロロベンジルオキシカルボニル化、2,4,5-トリクロロフェニル化、2-プロモベンジルオキシカルボニル化、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル化、トリフェニルメチル化、2,2,5,7,8-ペンタメチルクロマン-6-スルホニル化、ヒドロキシル化、メチオニンの酸化、ホルミル化、アセチル化、アニシル化、ベンジル化、ベンゾイル化、トリフルオロアセチル化、アスパラギン酸またはグルタミン酸のカルボキシル化、リン酸化、硫酸化、システイン化、ペントース、デオキシヘキソース、ヘキソサミン、ヘキソースまたはN-アセチルヘキソサミンとのグリコシル化、ファルネシル化、ミリストイル化、ピオチン化、パルミトイル化、ステアロイル化、ゲラニルゲラニル化、グルタチオン化、5'-アデノシル化、ADP-リボシル化、N-グリコリルノイラミン酸、N-アセチルノイラミン酸、ピリドキサルリン酸、リポ酸、4'-ホスホパンテテイン、およびN-ヒドロキシスクシンイミドでの修飾によって修飾することができる。式1のペプチドは、いずれのアミノ酸位置においても少なくとも1の-アミノ脂肪酸アシル化リシンの導入により修飾することができる。

10

20

【0018】

天然のGIP(1-14)の配列は本発明から除外される。

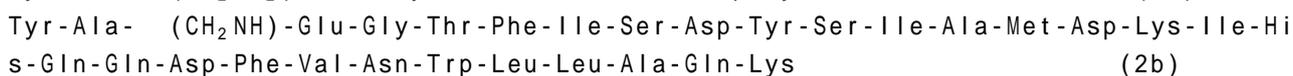
30

【0019】

式(1)で示される最も好ましい化合物は、D-Ala<sup>2</sup>-GIP(1-14)、Pro<sup>3</sup>-GIP(1-14)およびSer<sup>2</sup>-GIP(1-14)である。

【0020】

他の好ましい態様において、本発明は、式(2)：



により示される、還元されたペプチド結合を有するGIPアナログに関する。

40

【0021】

さらなる態様において、本発明は、式(3)：



により示される一般的なアミノ酸配列を有する新規なGIPアナログに関する。

【0022】

別の態様において、本発明は、アラニンスキャニングの結果として得られる式4a~4lで示される新規なGIPアナログを提供する。詳細には、これらは式：



50

Tyr-Ala-Glu-Gly-Ala-Phe-Ile-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Ala-Met (4d)  
 Tyr-Ala-Glu-Gly-Thr-Ala-Ile-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Ala-Met (4e)  
 Tyr-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Ala-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Ala-Met (4f)  
 Tyr-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Ile-Ala-Asp-Tyr-Ser-Ile-Ala-Met (4g)  
 Tyr-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Ile-Ser-Ala-Tyr-Ser-Ile-Ala-Met (4h)  
 Tyr-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Ile-Ser-Asp-Ala-Ser-Ile-Ala-Met (4i)  
 Tyr-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Ile-Ser-Asp-Tyr-Ala-Ile-Ala-Met (4j)  
 Tyr-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Ile-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ala-Ala-Met (4k)  
 Tyr-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Ile-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Ala-Ala (4l)

で示されるものである。

10

【0023】

新規なGIPアナログはリンカーペプチドの合成により得ることができる。それゆえ、本発明は、式(5)：

Tyr-A-B-Gly-Thr-Phe-C-Gln-Gln-Asp-Phe-Val-Asn-Trp-Leu-Leu-Ala-Gln-Lys-Gly-Lys-Lys-Asn-Asp-Trp-Lys-His-Asn-Ile-Thr-Gln (5)

(式中、Cは、

(a) 使用されない、

(b) 4アミノ酸残基からなるリンカーペプチド；D-アミノ酸およびタンパク質非構成性アミノ酸の残基を含む、アミノ酸残基のあらゆる組み合わせが可能であり、本発明の範囲に包含される、

20

(c) Glu-Lys-Glu-Lys、

(d) Ala-Ala-Ala-Ala、

(e) 12アミノ酸残基からなるリンカーペプチド；D-アミノ酸およびタンパク質非構成性アミノ酸の残基を含む、アミノ酸残基のあらゆる組み合わせが可能であり、本発明の範囲に包含される、

(f) Glu-Lys-Glu-Glu-Lys-Glu-Lys-Glu-Glu-Lys-Glu-Lys、

(g) 6-Ahx<sub>n</sub> (6-アミノヘキサ酸) (n = 1 ~ 3)；または

(h) 6ないし34個の炭素原子、好ましくは6ないし21個の炭素原子を有するオメガ-アミノ脂肪酸(飽和および/または不飽和)；

AおよびBは、D-アミノ酸残基、N-メチル化アミノ酸残基または他のタンパク質非構成性アミノ酸残基を含むアミノ酸残基である)により示されるリンカーペプチドを提供する。

30

【0024】

1位のチロシン残基のN末端は、アルキル化、スルホニル化、グリケーション、ホモセリン形成、ピログルタミン酸形成、ジスルフィド結合形成、アスパラギンまたはグルタミン残基の脱アミド化、メチル化、t-ブチル化、t-ブチルオキシカルボニル化、4-メチルベンジル化、チオアニシル化、チオクレシル化、ベンジルオキシメチル化、4-ニトロフェニル化、ベンジルオキシカルボニル化、2-ニトロベンゾイル化、2-ニトロスルフェニル化、4-トルエンスルホン化、ペンタフルオロフェニル化、ジフェニルメチル化、2-クロロベンジルオキシカルボニル化、2,4,5-トリクロロフェニル化、2-プロモベンジルオキシカルボニル化、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル化、トリフェニルメチル化、2,2,5,7,8-ペンタメチルクロマン-6-スルホニル化、ヒドロキシ化、メチオニンの酸化、ホルミル化、アセチル化、アニシル化、ベンジル化、ベンゾイル化、トリフルオロアセチル化、アスパラギン酸またはグルタミン酸のカルボキシル化、リン酸化、硫酸化、システイン化、ペントース、デオキシヘキソース、ヘキソサミン、ヘキソースまたはN-アセチルヘキソサミンとのグリコシル化、ファルネシル化、ミリストイル化、ピオチン化、パルミトイル化、ステアロイル化、ゲラニルゲラニル化、グルタチオン化、5'-アデノシル化、ADP-リボシル化、N-グリコリルノイラミン酸、N-アセチルノイラミン酸、ピリドキサルリン酸、リポ酸、4'-ホスホパンテテイン、およびN-ヒドロキシスクシンイミドでの修飾によって修飾することができる。さらに、2

40

50

位と3位との間での還元されたペプチド結合またはペプチド結合の他の修飾の導入が提供される。式5のペプチドは、いずれのアミノ酸位置においても少なくとも1の - アミノ脂肪酸アシル化リシンの導入により修飾することができる。

## 【0025】

さらに、本発明は、式(6)：

Tyr-A-B-Gly-Thr-Phe-Ile-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Ala-Met-D-Gln-Gln-Asp-Phe-Val-Asn-Trp-Leu-Leu-Ala-Gln-Lys-Gly-Lys-Lys-Asn-Asp-Trp-Lys-His-Asn-Ile-Thr-Gln (6)

(式中、Dは、

(g)使用されない、

(h)4アミノ酸残基からなるリンカーペプチド；D-アミノ酸およびタンパク質非構成性アミノ酸の残基を含む、アミノ酸残基のあらゆる組み合わせが可能であり、本発明の範囲に包含される、

(i)Ala-Ala-Ala-Ala、

(j)Glu-Lys-Glu-Lys、

(k)6-Ahx<sub>n</sub> (6-アミノヘキサ酸) (n=1~3)；または

(l)6ないし34個の炭素原子、好ましくは6ないし21個の炭素原子を有するオメガ-アミノ脂肪酸(飽和および/または不飽和)；

AおよびBは、D-アミノ酸残基、N-メチル化アミノ酸残基または他のタンパク質非構成性アミノ酸残基を含むアミノ酸残基である)により示されるリンカーペプチドを提供する。

## 【0026】

1位のチロシン残基のN末端は、アルキル化、アセチル化およびグリケーションにより修飾することができる。さらに、2位と3位との間での還元されたペプチド結合またはペプチド結合の他の修飾の導入が提供される。式6のペプチドは、いずれのアミノ酸位置においても少なくとも1の - アミノ脂肪酸アシル化リシンの導入により修飾することができる。

## 【0027】

他の新規なGIPアナログは、Ser<sup>2</sup>のリン酸化により得ることができる。本発明の好ましい化合物は式7a~7cに示す化合物である。

リン酸化セリル残基を含む式7a~7cで示される新規なGIPアナログ：

Tyr-[Ser(P)]-Glu-Gly-Thr-Phe-Ile-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Ala-Met (7a)

Tyr-[Ser(P)]-Glu-Gly-Thr-Phe-Ile-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Ala-Met-Asp-Lys-Ile-His-Gln-Gln-Asp-Phe-Val-Asn-Trp-Leu-Leu-Ala-Gln-Lys (7b)

Tyr-[Ser(P)]-Glu-Gly-Thr-Phe-Ile-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Ala-Met-Asp-Lys-Ile-His-Gln-Gln-Asp-Phe-Val-Asn-Trp-Leu-Leu-Ala-Gln-Lys-Gly-Lys-Lys-Asn-Asp-Trp-Lys-His-Asn-Ile-Thr-Gln (7c)

## 【0028】

さらに、新規なGIPアナログは、ペプチド配列のAsp/Glu残基とLys残基との間での側鎖ラクタム架橋の導入による拘束された(constrained)GIPアナログである。本発明の一つの好ましい化合物は、式8：

Tyr-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Ile-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Ala-Met-

Asp-Lys-Ile-His-Gln-Gln-Asp-Phe-Val-Asn-Trp-Leu-Leu-Ala-Gln-Lys

により示される[シクロ(Lys<sup>16</sup>, Asp<sup>21</sup>)]GIP(1-30)である。

## 【0029】

本発明はさらに、その範囲に本発明の化合物のアミド形態および遊離のカルボン酸形態の両者を包含する。遊離の化合物とそのアミドの形態である化合物とが密接に関連していることに鑑み、化合物をこの文脈で言及する場合はいつでも、アミド並びに遊離のカルボン酸の形態を意図している(事情に応じ、そのようにすることが可能であり適切であることを前提として)。

10

20

30

40

50

## 【0030】

本発明の化合物は、酸付加塩、とりわけ薬理的に許容しうる酸付加塩に変換することができる。薬理的に許容しうる塩は、一般に、アミノ酸の塩基性側鎖が無機または有機の酸でプロトン化された形態をとる。代表的な有機または無機酸としては、塩酸、臭化水素酸、過塩素酸、硫酸、硝酸、リン酸、酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、乳酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、安息香酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、ヒドロキシエタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、シュウ酸、パモール酸 (pamoic)、2-ナフタレンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、シクロヘキサンスルファミン酸、サリチル酸、サッカリン酸またはトリフルオロ酢酸が挙げられる。本発明の化合物のすべての薬理的に許容しうる酸付加塩の形態が本発明の範囲に包含される。 10

## 【0031】

遊離の化合物とその塩の形態である化合物とが密接に関連していることに鑑み、化合物をこの文脈で言及する場合はいつでも、対応の塩をも意図している（事情に応じ、そのようにすることが可能であり適切であることを前提として）。

## 【0032】

本発明はさらに、その範囲に本発明の化合物のプロドラッグを包含する。一般に、そのような化合物は、化合物の機能的な誘導体であり、インビボで所望の治療学的に活性な化合物に容易に変換されうるものである。それゆえ、これら場合において、本発明の治療方法では「投与」なる語には、記載の種々の疾患を本願の特許請求した1またはそれ以上の化合物のプロドラッグ形態（該プロドラッグ形態は、患者に投与後にインビボで上記で特定した化合物に変換される）で治療することも包含される。適当なプロドラッグ誘導体の選択および調製のための常法は、たとえば、“Design of Prodrugs”、H. Bundgaard編、Elsevier、1985および特許出願DE 19828113号およびDE 19828114号（参照のためその全内容を引用する）に記載されている。 20

## 【0033】

本発明による化合物が少なくとも1つのキラル中心を有する場合は、それら化合物はエナンチオマーとして存在してよい。これら化合物が2またはそれ以上のキラル中心を有する場合には、それら化合物はさらにジアステレオマーとして存在してよい。そのような異性体およびその混合物は、すべて本発明の範囲に包含されることが理解されなければならない。さらに、これら化合物の結晶形のあるものは多形として存在してよく、そのようなものも本発明の範囲に包含されることが意図される。さらに、これら化合物のあるものは水（すなわち、水和物）または一般の有機溶媒との溶媒和物を形成してよく、そのような溶媒和物もまた本発明の範囲に包含されることが意図される。 30

## 【0034】

これら化合物（その塩を含む）はまた、その水和物の形態で得ることができ、あるいはその結晶化に使用した他の溶媒を含んでいてよい。

## 【0035】

本発明の幾つかの化合物は、その態様の薬理的に許容しうる塩も含めて、ジペプチジルペプチダーゼIV（DPIV）またはDPIV様酵素の酵素活性による分解に対して改善された耐性を有する。DPIVは、広範囲の様々な器官および組織、たとえば、腸の刷子縁（Gutschmidt S.ら、“In situ”-measurements of protein contents in the brush border region along rat jejunal villi and their correlations with four enzyme activities. *Histochemistry* 1981, 72(3), 467-79）、外分泌上皮、肝細胞、腎細管、内皮、筋線維芽細胞（Feller A. C.ら、A monoclonal antibody detecting dipeptidyl peptidase IV in human tissue. *Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.* 1986; 409(2): 263-73）、神経細胞、ある種の表面上皮、たとえばファローピウス管、子宮および小胞腺（vesicular gland）の外（lateral）膜、たとえば小胞腺上皮の管腔細胞質内、およびブルナー腺の粘液細胞内（Hartel S.ら、Dipeptidyl peptidase (DPP) IV in rat organs. Comparison of immunohistochemistry and activity histochemistry. *Histochemi* 40 50

stry 1988: 89(2): 151-61)、生殖器官、たとえば精巣上体の尾および膨大部、精嚢およびその分泌物 (Agrawal & Vanha-Perittula, Dipeptidyl peptidases in bovine reproductive organs and secretions. *Int. J. Androl.* 1986, 9(6): 435-52) に存在している。ヒト血清中では2つの分子形のジペプチジルペプチダーゼが存在している (Krepela E.ら、Demonstration of two molecular forms of dipeptidyl peptidase IV in normal human serum. *Physiol. Bohemoslov.* 1983, 32(6): 486-96)。D P I V の血清高分子量形は活性化T細胞の表面に発現される (Duke-Cohan J.S.ら、Serum high molecular weight dipeptidyl peptidase IV (CD26) is similar to a novel antigen DPPT-L released from activated T cells. *J. Immunol.* 1996, 156(5): 1714-21)。本発明の一つの態様において、未だ発見されていないものも含めて、すべての哺乳動物の組織および器官からのD P I V のすべての分子形、ホモログおよびエピトープが本発明の範囲に含まれることが意図される。

10

## 【0036】

プロリン特異的プロテアーゼの稀な一群の中で、D P I V は最初、ポリペプチド鎖のアミノ末端から2番目の残基としてのプロリンに特異的な唯一の膜結合酵素であると考えられていた。しかしながら、最近、D P I V とは構造的には非相同 (non-homologous) であるが対応する酵素活性を示す他の分子が同定された。これまでに同定されたD P I V 様酵素としては、繊維芽細胞活性化タンパク質、ジペプチジルペプチダーゼI V、ジペプチジルアミノペプチダーゼ様タンパク質、N-アセチル化結合酸性ジペプチダーゼ、静止 (quiescent) 細胞プロリンジペプチダーゼ、ジペプチジルペプチダーゼI I、アトラクチン (attractin) およびジペプチジルペプチダーゼI V 関連タンパク質 (D P P 8) があり、これらはSedo & Malikによる論説に記載されている (Sedo & Malik, Dipeptidyl peptidase IV-like molecules: homologous proteins or homologous activities? *Bioc himica et Biophysica Acta* 2001, 36506: 1-10)。本発明の他の好ましい態様において、未だ発見されていないものも含めて、すべての哺乳動物の組織および器官からのD P I V 様酵素活性を含むタンパク質のすべての分子形、ホモログおよびエピトープが本発明の範囲に含まれることが意図される。

20

## 【0037】

対応する薬理的に許容しうる塩を含む本発明の化合物に共通する特性は、D P I V またはD P I V 様酵素による分解に対する改善された耐性であり、これはM A L D I - T O F マススペクトロメトリーにより測定することができる。本発明による選択したG I P アナログについての結果を表1から実施例3に示す。M A L D I - T O F - M S により、開裂部位でのアミノ酸のD - A l a<sup>2</sup>、N M e G l u<sup>3</sup>、P r o<sup>3</sup>による置換または還元されたペプチド結合の導入が、G I P<sub>1-30</sub>アナログ並びに対応G I P<sub>1-14</sub>アナログにおいてD P I V 分解に対して24時間までの耐性に導くことが示された。A l a<sup>2</sup>をV a l、G l y、S e r 置換したアナログまたはG l u<sup>3</sup>をD - G l u 置換したアナログは、D P I V による低減した加水分解速度を示した。これら結果については表1をも参照のこと。

30

## 【0038】

表1: 合成G I P アナログのN末端配列、質量およびD P I V 耐性

【表 3】

GIP-アナログ	N-末端配列	計算した 質量 (M)	MALDIM + H <sup>+</sup>	DPIV ととも にインキュ ベーション した後の半 減期	
GIP <sub>1-42a</sub>	Tyr-Ala-Glu-Gly....	4983.64	4983.9	決定せず	
GIP <sub>1-30a</sub>	Tyr-Ala-Glu-Gly....	3552.02	3553.3	<15 分 <sup>a</sup>	
GIP <sub>3-42a</sub>	Glu-Gly...	4749.38	4751.4	決定せず	
D-Ala <sup>2</sup> -GIP <sub>1-30a</sub>	Tyr-D-Ala-Glu-Gly...	3552.02	3553.8	安定	10
N-MeGlu <sup>3</sup> -GIP <sub>1-30a</sub>	Tyr-Ala-MeGlu-Gly....	3565.07	3566.1	安定	
D-Glu <sup>3</sup> -GIP <sub>1-30</sub>	Tyr-Ala-D-Glu-Gly....	3551.07	3553.0	40.3 ± 4.8	
Pro <sup>3</sup> -GIP <sub>1-30</sub>	Tyr-Ala-Pro-Gly....	3519.07	3522.9	安定	
Ser <sup>2</sup> -GIP <sub>1-30a</sub>	Tyr-Ser-Glu-Gly....	3567.07	3568.0	137.1 ± 12.3	
Val <sup>2</sup> -GIP <sub>1-30a</sub>	Tyr-Val-Glu-Gly....	3579.12	3580.7	298.3 ± 92.2	
Gly <sup>2</sup> -GIP <sub>1-30a</sub>	Tyr-Gly-Glu-Gly....	3537.04	3539.1	150.5 ± 27.3	
YAψ(CH <sub>2</sub> NH)-GIP <sub>3-30a</sub>	Tyr-Alaψ(CH <sub>2</sub> NH)-Glu-Gly...	3537.07	3539.0	安定	
GIP <sub>1-6a</sub>	Tyr-Ala-Glu-Gly....	685.74	686.9	> 7.5 分	20
D-Ala <sup>2</sup> -GIP <sub>1-6a</sub>	Tyr-D-Ala-Glu-Gly....	685.74	686.7	安定	
Gly <sup>2</sup> -GIP <sub>1-6a</sub>	Tyr-Gly-Glu-Gly....	671.71	672.0	検出できず <sup>b</sup>	
Ser <sup>2</sup> -GIP <sub>1-6a</sub>	Tyr-Ser-Glu-Gly....	701.74	702.0	79.0 ± 12.2	
Pro <sup>2</sup> -GIP <sub>1-6a</sub>	Tyr-Pro-Glu-Gly....	711.78	712.7	> 7.5 分	
Val <sup>2</sup> -GIP <sub>1-6a</sub>	Tyr-Val-Glu-Gly....	713.79	715.2	検出できず	
Pro <sub>3</sub> -GIP <sub>1-6a</sub>	Tyr-Ala-Pro-Gly....	653.78	655.0	安定	
YAψ(CH <sub>2</sub> NH)-GIP <sub>3-14a</sub>	Tyr-Alaψ(CH <sub>2</sub> NH)-Glu-Gly...	1553.75	1555.7	安定	
Pro <sup>3</sup> -GIP <sub>1-14</sub>	Tyr-Ala-Pro-Gly....	1535.75	1534.0	安定	
D-Ala <sup>2</sup> -GIP <sub>1-14</sub>	Tyr-D-Ala-Glu-Gly...	1567.75	1570.6	安定	30
GIP <sub>1-13</sub>	Tyr-Ala-Glu-Gly....	1435.57	1435.6	11.5 ± 2.5	
GIP <sub>1-15</sub>	Tyr-Ala-Glu-Gly....	1681.85	1682.6	35.0 ± 5.2	
GIP <sub>15-30a</sub>	Asp-Lys-Ile-Arg....	2001.34	2003.3	決定せず	
GIP <sub>17-30a</sub>	Ile-Arg-Gln-Gln	1758.07	1761.1	決定せず	
GIP <sub>19-30a</sub>	Gln-Gln-Asp-Phe	1488.72	1489.8	決定せず	
GIP <sub>7-30a</sub>	Ile-Ser-Asp-Tyr	2882.31	2886.9	130.1 ± 10.6	

<sup>a</sup> : 15 分後に G I P<sub>1-30</sub> の 92% が加水分解された

<sup>b</sup> : 1500 分後に G<sup>2</sup> G I P<sub>1-30</sub> の 25% しか分解されなかった

40

## 【0039】

他の好ましい態様において、本発明の化合物は、対応する薬理的に許容しうる塩を含めて、DPIV-レセプターに結合する能力によって特徴付けられる。対応する薬理的に許容しうる塩を含む本発明の化合物が GIP-レセプターに結合する能力は、実施例 4 に記載する方法などに従って<sup>125</sup>I 標識した s p G I P<sub>1-42</sub> を用いた結合試験を採用して測定することができる。

## 【0040】

置換試験は、レセプターに対する本発明の化合物の非特異的な結合を示していない。これは、過剰の ( 1 μ M ) G I P<sub>1-42</sub> ( または G I P<sub>1-30</sub> ) の存在下で残留する結合を記載するのに用いる術語である。

50

## 【0041】

GIP - レセプターに結合しGIP - レセプターから $^{125}\text{I}$  - GIP<sub>1-42</sub>を置換する本発明の化合物の例を図8、10および11および表2および3に示す。

## 【0042】

驚くべきことに、本発明の化合物は機能的に活性である。本発明の化合物の生物学的活性は、対応の薬理的に許容しうる塩も含めて、レセプター結合後のサイクリックAMPの産生を決定することによって測定することができる。cAMP産生アッセイは実施例4に記載してある。Glu<sup>3</sup>へのD - Gluの置換およびAla<sup>2</sup>へのD - Alaの置換はアデニルシクラーゼを刺激する能力がわずかに低減したペプチドという結果となったが、一方、Val<sup>2</sup>およびGly<sup>2</sup>アナログは効力において有意の低減を示した。興味深いことに、還元したペプチド結合の導入はcAMP産生の劇的な低減という結果となった。このことはGIPのN末端の完全性の重要性を確認するものである。さらなる結果を表2および3および図1～7に示す。

## 【0043】

表2：様々な長さのGIPアナログに対するサイクリックAMP産生および競合結合置換試験

## 【表4】

合成ペプチド	cAMP産生 (基礎に対する倍数 <sup>a</sup> )		レセプター結合	
	10 μM	20 μM	10 μMでの 置換%	IC <sub>50</sub> (nM)
GIP(1-42) <sub>OH</sub>	119 ± 11	-	100	3.2 ± 0.3
1-6 <sub>NH2</sub>	1.27 ± 0.18	1.08 ± 0.03	-3.6 ± 7.8	-
1-7 <sub>NH2</sub>	0.92 ± 0.05	1.06 ± 0.06	-6.1 ± 3.4	-
1-13 <sub>OH</sub>	1.03 ± 0.06	1.15 ± 0.07	-0.2 ± 3.4	-
1-13 <sub>NH2</sub>	6.51 ± 1.33	15.7 ± 3.0	5.0 ± 1.1*	-
1-14 <sub>OH</sub>	88.9 ± 9.5	85.2 ± 7.6	51.3 ± 1.2	-
1-14 <sub>NH2</sub>	75.4 ± 10.7	88.3 ± 5.9	27.9 ± 2.8	-
1-15 <sub>OH</sub>	0.97 ± 0.06	0.91 ± 0.05	-3.1 ± 4.3	-
1-15 <sub>NH2</sub>	2.26 ± 0.32	4.37 ± 0.51*	4.2 ± 1.7	-
1-30 <sub>NH2</sub>	108 ± 12	- <sup>c</sup>	99.8 ± 1.2	2.0 ± 0.7
7-30 <sub>NH2</sub>	0.89 ± 0.06	0.85 ± 0.03	99.3 ± 1.0	23.7 ± 3.7
15-42 <sub>OH</sub>	1.02 ± 0.10	1.01 ± 0.03	83.3 ± 0.7	1270 ± 150
15-30 <sub>NH2</sub>	1.24 ± 0.28	1.01 ± 0.11	82.7 ± 1.0	1400 ± 310
16-30 <sub>NH2</sub>	1.04 ± 0.06	0.80 ± 0.02	82.1 ± 1.9	2530 ± 450
17-30 <sub>NH2</sub>	1.13 ± 0.09	1.12 ± 0.05	81.9 ± 2.1	1540 ± 550
19-30 <sub>NH2</sub>	20.1 ± 1.3	45.0 ± 1.6	52.3 ± 0.6	-

\* : p < 0.05

<sup>a</sup> : 基礎サイクリックAMP = 2.737 ± 0.079 フェムトモル / 1000細胞

<sup>b</sup> : プラトーレベルが達成されなかった場合には、サイクリックAMPは20 μMペプチドにより刺激された

<sup>c</sup> : 定義により、10 μMのGIP<sub>1-42</sub>は特異的な $^{125}\text{I}$ -GIP結合をすべて置換する

<sup>d</sup> : 最大GIP<sub>1-42</sub>刺激cAMPを用いて評価

## 【0044】

表3：ラットGIP - レセプターでトランスフェクションしたCHO - K1細胞を用いた合成GIP断片に対するサイクリックAMP産生および競合結合置換試験についての統計のまとめ

10

20

30

40

【表 5】

合成ペプチド	分子量 (ダルトン)		cAMP産生		レセプター結合	
	理論値	測定値	最大cAMP <sup>a</sup> (基礎に對する 倍数)	EC <sub>50</sub>	20 μMでの 置換%	IC <sub>50</sub>
GIP <sub>(1-42OH)</sub>	4984.3	4984.7	122±10	231±34pM	100 <sup>b</sup>	4.18±0.47nM
GIP <sub>(1-6)(19-30)NH<sub>2</sub></sub>	2157.6	2158.8	1.81±0.42*	-	88.2±0.7	2.74±0.37□M
GIP <sub>(1-6)(AAA)(19-30)NH<sub>2</sub></sub>	2441.8	2440.5	7.21±0.99*	-	88.7±3.0	2.41±0.46□M
GIP <sub>(1-6)(EKEK)(19-30)NH<sub>2</sub></sub>	2672.1	2674.1	8.17±0.87*	-	86.8±1.6	2.09±0.23□M
GIP <sub>(1-6)(EKEKEKEKE)(19-30)NH<sub>2</sub></sub>	3574.0	3575.9	84.9±8.1*	8.39±0.18μM <sup>*d</sup>	75.1±2.7	4.27±0.14□M
GIP <sub>(1-6)(Ahx)1(19-30)NH<sub>2</sub></sub>	2270.7	2274.0	95.9±8.6*	14.5±4.7μM <sup>*d</sup>	62.0±4.3	8.73±2.24□M
GIP <sub>(1-6)(Ahx)2(19-30)NH<sub>2</sub></sub>	2383.8	2386.0	2.55±0.84*	-	75.3±3.3	4.98±0.40□M
GIP <sub>(1-6)(Ahx)3(19-30)NH<sub>2</sub></sub>	2497.0	2498.8	13.5±1.5*	-	67.1±1.0	4.03±0.64□M
GIP <sub>(1-14)(19-30)NH<sub>2</sub></sub>	3038.6	3040.6	127±22	78.7±2.3nM*	95.4±0.7	1.37±0.06□M
GIP <sub>(1-14)(AAA)(19-30)NH<sub>2</sub></sub>	3322.9	3328.3	82.1±2.8*	58.7±2.7pM*	100.0±0.9	66.3±7.5nM
GIP <sub>(1-14)(EKEK)(19-30)NH<sub>2</sub></sub>	3553.0	3551.6	80.6±5.6*	77.0±6.1pM*	98.7±1.1	26.0±1.6nM
GIP <sub>(1-14)(Ahx)1(19-30)NH<sub>2</sub></sub>	3151.6	3155.6	102.1±5.0	1.41±0.32μM <sup>*d</sup>	86.1±1.9	2.71±0.23□M
GIP <sub>(1-14)(Ahx)2(19-30)NH<sub>2</sub></sub>	3264.9	3264.8	95.9±3.2*	2.51±0.25μM <sup>*d</sup>	85.8±1.6	2.77±0.14□M
GIP <sub>(1-14)(Ahx)3(19-30)NH<sub>2</sub></sub>	3377.9	3389.4	49.5±1.6*	~ 20μM <sup>*d</sup>	82.7±3.2	3.21±0.44□M

\* : p &lt; 0.05

<sup>a</sup> : 基礎サイクリックAMP = 2.737 ± 0.079 フェムトモル / 1000 細胞<sup>b</sup> : プラトーレベルが達成されなかった場合には、サイクリックAMPは20 μMペプチドにより刺激された<sup>c</sup> : 定義により、10 μMのGIP<sub>1-42</sub>は特異的な<sup>1,2,5</sup>I-GIP結合をすべて置換する<sup>d</sup> : 最大GIP<sub>1-42</sub>刺激cAMPを用いて評価

## 【0045】

インビトロでの機能的活性に基づき、本発明の化合物が哺乳動物においてインビボでグルコース耐性を改善しグルコースAUCを低減させる能力、それゆえインスリン非依存性糖尿病(NIDDM)の治療に有用であることを試験した。本発明の化合物が哺乳動物においてインビボでグルコース耐性を改善しグルコースAUCを低減させる能力は、対応の薬理的に許容する塩も含めて、ウイスターラットモデルを用いて測定することができる。その方法は実施例5に記載してある。結果を図12、13および14に示す。

## 【 0 0 4 6 】

本発明の化合物は、レセプター結合能および c A M P 放出に対する刺激作用に基づき、膵細胞のグルコースに依存した増殖を増大しうることがわかった。驚くべきことに、また特に好ましい態様として、本発明の化合物はグルコースの存在とは独立に細胞の生存に対して濃度依存性の作用を示す。対応の薬理的に許容しうる塩も含めて本発明の化合物がグルコース依存性の細胞増殖並びにグルコース非依存性の細胞生存を増大させる能力は、実施例 6 に記載するような I N S - 1 細胞を用いたアッセイを用いて測定することができる。

## 【 0 0 4 7 】

最も驚くべき知見の一つは、本発明の化合物が膵細胞に対して抗アポトーシス作用を有することである。対応の薬理的に許容しうる塩も含めて本発明の化合物の抗アポトーシス作用は、実施例 7 に記載するようなカスパーゼ - 3 活性化アッセイを用いて測定することができる。その結果を図 1 8 A に示す。カスパーゼ - 3 の活性化は、細胞のアポトーシス誘発のマーカーである。本発明の化合物は、レセプター結合能および c A M P 放出に対する刺激作用に基づき、グルコース引き上げ ( withdrawal ) に応答したカスパーゼ - 3 の活性化を選択的に阻止できるとわかった。

## 【 0 0 4 8 】

他のインビトロアッセイとして、I N S - 1 細胞のストレプトゾトシン ( S T Z ) 誘発細胞死において、本発明の化合物は対応の薬理的に許容しうる塩も含めて S T Z の前アポトーシス ( カスパーゼ - 3 活性化 ) 作用に対して完全に防御できるとわかった。その方法は実施例 7 に記載してある。その結果を図 1 8 B に示す。

## 【 0 0 4 9 】

さらなる態様において、本発明は、薬理的に許容しうる担体または希釈液および治療学的有効量の式 1 ~ 8 に示す本発明の化合物または薬理的に許容しうるその塩を含む、たとえば G I P - レセプター結合に有用な医薬組成物を提供する。

## 【 0 0 5 0 】

さらに他の態様において、本発明は、G I P - レセプターを結合または阻止する方法であって、そのような処置を必要とする哺乳動物に治療学的有効量の式 1 ~ 8 に示す本発明の化合物または薬理的に許容しうるその塩を投与することを含む方法を提供する。

## 【 0 0 5 1 】

さらなる態様において、本発明は、G I P - レセプター結合によって媒体される状態の治療方法であって、そのような治療を必要とする哺乳動物に治療学的有効量の式 1 ~ 8 に示す本発明の化合物または薬理的に許容しうるその塩を投与することを含む方法を提供する。

## 【 0 0 5 2 】

本発明はまた、たとえば G I P - レセプターシグナル伝達に関連する疾患または状態の予防または治療用医薬の製造のための、本発明による化合物または薬理的に許容しうるその塩の使用にも関する。

## 【 0 0 5 3 】

好ましい態様において、本発明は、たとえば糖尿病および肥満の予防または治療用医薬の製造のための、本発明による化合物または薬理的に許容しうるその塩の使用にも関する。

## 【 0 0 5 4 】

本発明の実施例実施例 1 : ペプチドの固相合成

改変 F m o c - プロトコルを用い、G I P アナログを自動合成機 SYMPHONY ( RAININ ) で合成した。5 倍過剰量の F m o c - アミノ酸およびカップリング試薬とのペプチドの C 末端から 1 5 番目のアミノ酸からの二重カップリングを用いることにより、サイクルを改変した。ペプチドのカップリングを、0 . 2 3 ミリモルの置換 NovaSyn T G R - 樹脂または 2 5 μ モルスケールでの対応のプレローディング ( preloaded ) W a n g - 樹脂を用い

10

20

30

40

50

たTBTU/NMM活性化により行った。樹脂からの開裂は、94.5% TFA、2.5% 水、2.5% EDTおよび1% TISからなる開裂カクテルにより行った。

【0055】

分析的および分取HPLCを、Merck-HitachiのLiChrograph HPLCシステム上での異なる勾配を用いて行った。勾配は、2つの溶媒：(A) H<sub>2</sub>O中の0.1% TFAおよび(B) アセトニトリル中の0.1% TFAから構成された。分析的HPLCは以下の条件で行った：溶媒を、UV検出(λ = 220 nm)を用い、125-4 Nucleosil RP18-カラムに5% - 50% Bを15分間、ついで95% Bまで20分までの勾配で流した(1 ml / 分)。ペプチドの精製は、ペプチド鎖の長さに応じた種々の条件下、250-20 Nucleosil 100 RP8-カラムかまたは250-10 LiChrospher 300 RP18-カラム(流速6 ml / 分、220 nm)のいずれかでの分取HPLCにより行った。

10

【0056】

ペプチドアナログの同定には、Hewlett-PackardのHP G2025 MALDI-TOFシステムを用いたレーザー脱着(desorption)マスマススペクトロメトリーを用いた。

【0057】

実施例2：還元されたペプチド結合を有するGIPアナログの合成

2当量のFmoc-Tyr(tBu)(CH<sub>2</sub>NH)-Glu(tBu)-Gly-OHをTBTU/DIPEA活性化および二重カップリングを4時間行うことによりカップリングして、Tyr-Ala(CH<sub>2</sub>NH)-GIP<sub>3-30a</sub>およびTyr-Ala(CH<sub>2</sub>NH)-GIP<sub>3-14a</sub>を合成した。対応のGIP<sub>5-30</sub>をおよびGIP<sub>5-14</sub>断片を上記と同様にして合成した。完全に保護したテトラペプチドTyr-Ala(CH<sub>2</sub>NH)-Glu(tBu)-Gly-OHの合成を、半合成ペプチド合成機Labortec(BACHEM)を用い、実施例1の記載と同様にして酸感受性Sasrin樹脂上で0.7ミリモルのスケールで行った。保護テトラペプチドを1% TFAにより樹脂から開裂した。還元されたペプチド結合は、Fmoc-アラニナルを用いたsasrin樹脂上でのN末端脱保護ペプチドの還元的アルキル化により導入された。

20

【0058】

実施例3：MALDI-TOFマスマススペクトロメトリーによるDP IV耐性の決定

精製腎DP IVによるペプチドアナログの加水分解を以前に記載されたようにして調べた[12]。簡単に説明すると、ペプチドを0.04 M トリス緩衝液(pH 7.6)およびDP IV中で24時間までインキュベートした。試料をインキュベーション混合物から取り出し、Pauly, R. P., Rosche, F., Wermann, M., McIntosh, C. H. S., Pederson, R. A. および Demuth, H. U. Investigation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide-(1-42) and glucagon-like peptide-1-(7-36) degradation in vitro by dipeptidyl peptidase IV using matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry - A novel kinetic approach. J Biol Chem 271(38), 23222-23229. 1996の記載に従ってMALDI-TOFマスマススペクトロメトリー用に調製した。

30

【0059】

実施例4：インビトロ試験

ラット膵臓島(野生型)GIP-レセプターを安定に発現するチャイニーズハムスター卵巣(CHO-K1)細胞(wtGIP-R1細胞)を以前に記載されたようにして調製した[19, 21]。細胞を、10% 新生仔ウシ血清、50単位/ml ペニシリンG、および50 μg/ml ストレプトマイシンを添加したDMEM/F12中で培養した(培地および抗生物質はGibco BRL, Life Technologiesから)。細胞を75 cm<sup>2</sup> フラスコ中で増殖させ、80~90% コンフルエントになったときに剥がし、24 ウェルプレートに50,000細胞/ウェルの密度で播種した。実験は48時間後に行った。

40

【0060】

結合試験

高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により精製した<sup>125</sup>I-標識 spGIP<sub>1-42</sub>を用いた結合試験を本質的に以前に記載されたようにして行った[21]。wtGIP-

50

R1細胞 ( $1 - 5 \times 10^5$  / ウエル) を、DMEM / F12 (GIBCO)、15 mM HEPES、0.1% ウシ血清アルブミン (BSA)、1% Trasylol (アプロチニン; Bayer) からなる結合緩衝液 (BB; pH 7.4) 中、4℃ で2回洗浄した。これら細胞を非標識 GIP<sub>1-42</sub> またはアナログの存在下または不在下、 $^{125}\text{I}$ -s p GIP (50,000 cpm) とともに4℃ で12~16時間インキュベートした。インキュベーション後、細胞を氷冷緩衝液で2回洗浄し、0.1 M NaOH (1 ml) で可溶化し、ついで細胞に結合した放射能をカウントするために培養チューブに移した。非特異的結合は1  $\mu\text{M}$  の GIP<sub>1-42</sub> または GIP<sub>1-30</sub> の存在下で測定した結合として定義され、特異的結合は競合体の不在下での結合の% (% B / B<sub>0</sub>) として表した。

【0061】

10

#### cAMP 産生

野生型 GIP - R1細胞を48時間培養し、BB中で37℃にて洗浄し、ついで0.5 mM IBMX (Research Biochemicals Intl.、ナティック、マサチューセッツ) の存在下での被験剤との30分間の刺激の前に1時間プレインキュベートした [19, 21]。抑制実験を用い、1 nM s h GIP<sub>1-42</sub> での30分間の刺激の前に細胞をGIPアナログとともに15分間インキュベートした。細胞を70%エタノールで抽出し、cAMPレベルをラジオイムノアッセイ (Biomedical Technologies、ストートン、マサチューセッツ) により測定した [19, 21]。データはフェムトモル / 1000細胞またはGIP<sub>1-42</sub> 刺激によるcAMP産生の最大%として表してある (抑制実験)。

【0062】

20

#### 実施例5: ウイスターラットへの合成GIPアナログの皮下投与後のグルコース耐性の改善

雄ウイスターラット (250~350 g) を自由に飲水させながら一夜 (16~18時間) 飢餓させた。血中グルコースの決定のため (手動のグルコメーターを使用)、全血試料を覚醒した非拘束ラットの尾静脈から採取した; 血漿インスリン濃度の測定のため、血漿を遠心分離 (20分間、12,000 rpm、4℃) により分離した。基礎試料を、経口グルコース耐性試験 (1 g グルコース / Kg 体重) およびペプチドアナログ (8 ナノモル / Kg 体重) または食塩水対照 (500  $\mu\text{l}$  注射容量) の肩胛骨内皮下注射の直前に得た。血液試料をインスリン決定のために t = 2、10、20、30 および60にて採取し、血中グルコースを10分間隔で測定した。台形計算法を用い、ベースラインを差し引いてグルコース応答面積 (integrated glucose response) を計算した。

30

【0063】

#### 実施例6: GIPは細胞増殖を刺激し (INS-1) 細胞の生存を促進する細胞培養および試薬

INS-1細胞 (クローン832 / 13) を、2 mM グルタミン、50  $\mu\text{M}$   $\beta$ -メルカプトエタノール、10 mM HEPES、1 mM ピルビン酸ナトリウム、および10% ウシ胎仔血清 (Cansera、レクスデール、オンタリオ、カナダ) を添加した11 mM グルコース RPMI (Sigma Laboratories、ナティック、マサチューセッツ、米国) 中で培養した。実験に先立って細胞を6-ウエル ( $2 \times 10^6$  細胞 / ウエル; Becton Dickinson、リンカーンパーク、ニュージャージー、米国)、24-ウエル ( $5 \times 10^5$  細胞 / ウエル) 、または96-ウエル ( $5 \times 10^4$  細胞 / ウエル) プレートに回収した。細胞継代45-60を用いた。

40

【0064】

#### GIP-レセプター特徴付け試験; 競合結合、cAMP、およびインスリン放出

合成ブタGIP (5  $\mu\text{g}$ ) をクロラミン-T法によりヨード化し、 $^{125}\text{I}$ -GIPを比活性250~300  $\mu\text{Ci} / \mu\text{g}$  まで逆相高速液体クロマトグラフィーによりさらに精製した。競合結合分析を実施例4の記載と同様にして行った。cAMP試験については、細胞を2回洗浄し、ついでホスホジエステラーゼインヒビターである3-イソブチル-1-メチルキサンチン (0.5 mM IBMX; RBI/Sigma、ナティック、マサチューセッツ、米国) の存在下でGIPで30分間刺激した。刺激後、反応を停止させ、細胞を70%氷

50

冷エタノール中で溶解し、細胞破砕物を遠心分離により除去し、その後、cAMPをラジオイムノアッセイ (RIA; Biomedical Technologies Inc.、ストートン、マサチューセッツ) により定量した。インスリン放出実験はすべてIBMXの不在下で60分間行い、培地中に分泌されたインスリンをRIAにより定量した。

#### 【0065】

INS-1クローン832/13細胞株でのGIP-レセプターは以前に特徴付けられているので、結合、アデニルシクラーゼ刺激およびGIPに対するインスリン分泌応答を最初に調べた。細胞は $1571 \pm 289$ 結合部位/細胞 ( $n=3$ ) の密度でレセプターを発現し、結合の $IC_{50}$ は $21.1 \pm 2.49$  nM ( $n=3$ ) および $K_D=106.2 \pm 4.3$  フェムトモル ( $n=3$ ) であった; cAMP産生はGIPによって刺激され、 $EC_{50}$ は $4.70 \pm 1.81$  nM ( $n=4$ ) であった; 5.5 mMグルコースにより刺激されたインスリン分泌は、10 nM GIPにより増大した (5.5 mMグルコースに対して $1.63 \pm 0.183$  %の全インスリン分泌 vs  $2.44 \pm 0.29$  %の全インスリン分泌 ( $p < 0.05$ ,  $n=3$ ))。

10

#### 【0066】

##### 細胞の定量

細胞を実験に先立って96-ウエルプレートに播種した ( $5 \times 10^4$  細胞/ウエル)。血清の不在下で24時間、代謝の静止状態を確立した後、細胞をアゴニスト (グルコース、グルコース+GIP/GLP-1/GH) とともに低グルコース培地 (0.1%BSAを添加したRPMI) 中でさらに24時間培養した。その後、細胞をKRBH (115 mM NaCl、4.7 mM KCl、1.2 mM  $KH_2PO_4$ 、10 mM  $NaHCO_3$ 、1.28 mM  $CaCl_2$ 、1.2 mM  $MgSO_4$  を含む10 mM HEPESおよび0.1%ウシ血清、pH 7.4) で洗浄し、アッセイするときまで $-70^\circ$  で凍結した。CYQUANT<sup>TM</sup> アッセイシステム (Molecular Probes、ユージーン、オレゴン、米国) を用い、製造業者のプロトコールに従って細胞を定量した。最終的な細胞数は、細胞増殖を評価するためにプレーティングした最初の細胞数よりも常に多かった。

20

#### 【0067】

細胞の生存を、長期化したグルコース枯渇の存在下で評価した。グルコース枯渇 (0.1%BSAを含むRPMI) の24時間後、GIPまたはフォルスコリンをさらに24時間加え、細胞数を定量した。最終的な細胞数は、細胞の生存を評価するためにプレーティングした最初の細胞数よりも常に少なかった。

30

#### 【0068】

##### GIPはグルコース依存性の細胞増殖を増大させる

INS-1細胞株は、細胞増殖のための細胞モデルとして以前に十分に調べられている (Hugl SR, White MF, Rhodes CJ 1998: Insulin-like growth factor 1 (IGF-1)-stimulated pancreatic beta-cell growth is glucose-dependent. J. Biol. Chem. 273: 17771-17779; Dickson LM, Linghor MK, McCuaig J, Hugl SR, Snow L, Kahn BB, Myers Jr. MG, Rhodes CJ (2001), Differential activation of protein kinase B and p70S6K by glucose and insulin-like growth factor 1 in pancreatic beta cells (INS-1). J. Biol. Chem. 276: 21110-21120)。GIPはGHで得られるのに匹敵するレベルまで11 mMグルコース媒体 細胞増殖を増大させることがわかった (5.5 mMグルコースの存在下、100 nM GIPでは増殖の $158 \pm 16$  %、10 nM GHでは増殖の $158 \pm 9$  % ( $n=3 \sim 5$ ); 図15A)。別の実験では (図16B)、100 nM GIPは5.5 mMグルコースの存在下で測定される細胞増殖の $131 \pm 7$  %まで細胞増殖を刺激し、これは100 nM GLP-1に対する増殖応答 ( $129 \pm 4$  %;  $n=4$ ) と同様であった。

40

#### 【0069】

##### GIPは0 mMグルコースの不利な効果を逆転させる

これら増殖促進効果のグルコース依存性を決定する際に、GIPは細胞生存に対する0 mMグルコース培地の不利な効果を逆転させ得ることが観察された。0 mMグルコース培

50

地の存在下での細胞の48時間のインキュベーションは、約50%の細胞死という結果となった(図16A)。驚くべきことに、培地に100nM GIPを添加したときにはプレートした細胞の91±10%が24時間後に生存していた。これらGIPの細胞生存効果は濃度依存的であり、EC<sub>50</sub>値は1.24±0.48nM GIPであった(n=4; 図16B)。

#### GIPはウォルトマンニン誘発細胞死に対して保護作用を有する

どの細胞内シグナル伝達経路がGIPにより誘発された細胞生存に関与しているかを確立するため、薬理的インヒビターを候補プロテインキナーゼに対する選択性の示される濃度にて用いて研究を行った(図17)。フォルスコリンによるアデニリルシクラーゼの刺激は細胞の生存に対するGIPの効果を擬態したが、H89の効果の欠如(図18AおよびB)はPKAに依存しない作用態様を示している。MeK1/2インヒビターであるPD98059(50および100μM)およびU0126(10μM)は、いずれも細胞生存に対するGIPの効果を阻害しなかった(n=3)。細胞生存を促進するGIPの能力は、PI3キナーゼ-PKB経路インヒビターであるウォルトマンニンの作用に関する研究によってさらに支持された(図17C)。ウォルトマンニン単独で細胞の損失を促進したので、GIPがPI3キナーゼ-PKB経路を活性化するか否かを決定することはできなかった。しかしながら、GIP処理によって細胞はウォルトマンニン誘発細胞損失に対して部分的に防護された(n=3、p<0.05)。試験した化合物でGIP媒体細胞生存に影響を及ぼした唯一のものはインヒビターのSB202190であり(図17D)、GIPがp38MAPKとして作用し得ることを示していた。

【0070】

#### 実施例7：GIPは抗アポトーシス作用を有する

##### カスパーゼ-3活性

6-ウエルプレートに播種したINS-1細胞(クローン832/13)を12~24時間、血清飢餓させ、グルコース枯渇(0.1%BSAを含むRPMI)かまたは2mMストレプトゾトシン(STZ)処理に供した。GIPおよびGLP-1をSTZ処理の10分前およびSTZ処理の間の30分間加えた。処理後、カスパーゼ-3活性を製造業者のプロトコル(Molecular Probes、ユージーン、オレゴン、米国)に従って2、6、または24時間後に決定した。カスパーゼ-3活性/ウエルをBCAタンパク質アッセイ(Pierce、ロックスフォード、イリノイ、米国)を用いて全タンパク質含量に対して補正した。

【0071】

カスパーゼ-3活性は細胞のアポトーシス誘発のマーカーである。GIPの細胞生存作用が該ポリペプチドの抗アポトーシス作用によるものかどうかを確立するため、グルコース枯渇によって誘発されたカスパーゼ-3の活性化を調べた。図18Aは、0mMグルコースが6時間までに(2時間までには促進しなかった; データは示していない)アポトーシスを促進したこと、およびこの効果がGIPまたはフォルスコリンの添加によって完全に逆転されたことを説明している。グルコースの引き上げに反応したカスパーゼ-3の活性化をGIPが選択的に阻止するとの結論は、カスパーゼ-3の特異的なアルデヒドインヒビターであるAc-DEVD-CHOが低グルコース活性化を完全に阻止したことによって確認された(図19A)。

【0072】

##### STZ誘発細胞死

GIPがストレプトゾトシン(STZ)によって誘発された細胞死に対して防御する能力を調べた。STZに暴露する10分前および暴露の間の30分間にGIPを加えると、GIPはSTZの前アポトーシス(カスパーゼ-3活性化)作用に対して完全に防御することができた(図18B)。

【図面の簡単な説明】

【0073】

【図1】ラット膵臓ランゲルハンス島GIP-レセプターで安定にトランスフェクション

10

20

30

40

50

したCHO-K1細胞(wtGIPR細胞)におけるN末端修飾したGIPアナログによるサイクリックAMPの産生。図示した濃度のペプチドの存在下または不在下、15mM HEPES緩衝(pH7.4)DMEM/F12+0.1%BSAおよび0.5mM IBMX中、37℃で30分間、刺激を行った。細胞内容物を氷冷70%エタノールで抽出し、真空乾燥させ、サイクリックAMPをラジオイムノアッセイにより測定した。データは、少なくとも3回の独立した実験の平均±SEMを表す。データは、GIP<sub>1-30NH<sub>2</sub></sub>により刺激した最大cAMPに対して正規化してある。

【0074】

【図2】天然ホルモンと比較した、修飾GIP<sub>1-140H</sub>ペプチドによるwtGIPR細胞中のサイクリックAMPの産生。図示した濃度のペプチドの存在下または不在下、15mM HEPES緩衝(pH7.4)DMEM/F12+0.1%BSAおよび0.5mM IBMX中、37℃で30分間、刺激を行った。細胞内容物を氷冷70%エタノールで抽出し、真空乾燥させ、サイクリックAMPをラジオイムノアッセイにより測定した。データは、少なくとも3回の独立した実験の平均±SEMを表す。データは、細胞数に対して正規化してある。

10

【0075】

【図3】wtGIPR細胞中の修飾GIP<sub>1-140H</sub>ペプチド(20マイクロモル)によるサイクリックAMPの産生。データは図2からのものであり、細胞中の基礎サイクリックAMP含量の因数として表してある。<sup>\*</sup> = GIP<sub>1-42</sub>による1nM刺激したcAMPに対してp < 0.05; # = 基礎サイクリックAMPに対してp < 0.05 (n = 3)。

20

【0076】

【図4】アラニンスキヤニングにより修飾したGIP<sub>1-140H</sub>ペプチド(40マイクロモル)によるサイクリックAMPの産生。アラニンが天然の一次配列に存在する2位および13位では、これら位置でのアミノ酸は関連ホルモンであるグルカゴンの一次配列において認められるもので置換した。図示した濃度のペプチドの存在下または不在下、15mM HEPES緩衝(pH7.4)DMEM/F12+0.1%BSAおよび0.5mM IBMX中、37℃で30分間、刺激を行った。細胞内容物を氷冷70%エタノールで抽出し、真空乾燥させ、サイクリックAMPをラジオイムノアッセイにより測定した。データは、細胞中の基礎サイクリックAMP含量の因数として表してある。<sup>\*</sup> = GIP<sub>1-42</sub>による1nM刺激したcAMPに対してp < 0.05; # = 基礎サイクリックAMPに対してp < 0.05 (n = 3)。

30

【0077】

【図5】天然ホルモンと比較した、コア配列欠失またはアルファらせん挿入を有する修飾GIPペプチドによるwtGIPR細胞中のサイクリックAMPの産生。図示した濃度のペプチドの存在下または不在下、15mM HEPES緩衝(pH7.4)DMEM/F12+0.1%BSAおよび0.5mM IBMX中、37℃で30分間、刺激を行った。細胞内容物を氷冷70%エタノールで抽出し、真空乾燥させ、サイクリックAMPをラジオイムノアッセイにより測定した。データは、少なくとも3回の独立した実験の平均±SEMを表す。データは、細胞数に対して正規化してある。

【0078】

【図6】天然ホルモンと比較した、コア配列欠失またはアルファらせん挿入を有する修飾GIPペプチドによるwtGIPR細胞中のサイクリックAMPの産生。図示した濃度のペプチドの存在下または不在下、15mM HEPES緩衝(pH7.4)DMEM/F12+0.1%BSAおよび0.5mM IBMX中、37℃で30分間、刺激を行った。細胞内容物を氷冷70%エタノールで抽出し、真空乾燥させ、サイクリックAMPをラジオイムノアッセイにより測定した。データは、少なくとも3回の独立した実験の平均±SEMを表す。データは、細胞数に対して正規化してある。

40

【0079】

【図7】天然ホルモンと比較した、N末端修飾したまたはアミノ酸16と21との間で環状化した修飾GIPペプチドによるwtGIPR細胞中のサイクリックAMPの産生。

50

図示した濃度のペプチドの存在下または不在下、15 mM HEPES 緩衝 (pH 7.4) DMEM / F12 + 0.1% BSA および 0.5 mM IBMX 中、37 で 30 分間、刺激を行った。細胞内容物を氷冷 70% エタノールで抽出し、真空乾燥させ、サイクリック AMP をラジオイムノアッセイにより測定した。データは、少なくとも 3 回の独立した実験の平均 ± SEM を表す。データは、GIP<sub>1-42OH</sub> により産生された最大 cAMP に対して正規化してある。

【0080】

【図 8】図示した濃度の<sup>125</sup>I - GIP および修飾 GIP<sub>1-14</sub> ペプチドを対比して用いた、完全 wt GIPR 細胞における競合結合抑制試験。平衡結合は、15 mM HEPES 緩衝 (pH 7.4) DMEM / F12 + 0.1% BSA + 1% トラシロール (アプロチニン) 中、4 で 12 ~ 16 時間インキュベートした後に達成された。未結合の標識を洗浄工程の際に除去し、細胞を 0.2 M NaOH に可溶化し、細胞に付随した放射能をカウントするためにホウ珪酸チューブに移した。非特異的結合を、1 マイクロモルの GIP<sub>1-42</sub> の存在下で検出した細胞付随放射能として定義した。データは、3 回以上の実験の平均 ± SEM を表しており、競合物 (B<sub>0</sub>) の不在下で測定した<sup>125</sup>I - GIP の特異的結合に対して正規化してある。

10

【0081】

【図 9】50 マイクロモルのペプチドアナログ (アラニン、セリン、チロシン、D - アラニン、D - プロリン、還元された P2 - P3 ペプチド結合、または BTD 置換 / 修飾を有する GIP<sub>1-14</sub> ペプチド) による wt GIPR 細胞からの<sup>125</sup>I - GIP のパーセント置換。平衡結合は、15 mM HEPES 緩衝 (pH 7.4) DMEM / F12 + 0.1% BSA + 1% トラシロール (アプロチニン) 中、4 で 12 ~ 16 時間インキュベートした後に達成された。未結合の標識を洗浄工程の際に除去し、細胞を 0.2 M NaOH に可溶化し、細胞に付随した放射能をカウントするためにホウ珪酸チューブに移した。非特異的結合を、1 マイクロモルの GIP<sub>1-42</sub> の存在下で検出した細胞付随放射能として定義した。データは、3 回以上の実験の平均 ± SEM を表してある。\* = GIP<sub>1-14</sub> による % 置換に対して p < 0.05 ; # = 0 置換に対して p < 0.05 (すなわち、A3 および A5 のみが測定可能な<sup>125</sup>I - GIP 結合を置換することができなかった)。

20

【0082】

【図 10】天然ホルモンと比較した、図示した濃度の<sup>125</sup>I - GIP およびコア配列欠失またはアルファらせん挿入を有する GIP ペプチドを対比して用いた完全 wt GIPR 細胞における競合結合抑制試験。平衡結合は、15 mM HEPES 緩衝 (pH 7.4) DMEM / F12 + 0.1% BSA + 1% トラシロール (アプロチニン) 中、4 で 12 ~ 16 時間インキュベートした後に達成された。未結合の標識を洗浄工程の際に除去し、細胞を 0.2 M NaOH に可溶化し、細胞に付随した放射能をカウントするためにホウ珪酸チューブに移した。非特異的結合を、1 マイクロモルの GIP<sub>1-42</sub> の存在下で検出した細胞付随放射能として定義した。データは、3 回以上の実験の平均 ± SEM を表しており、競合物 (B<sub>0</sub>) の不在下で測定した<sup>125</sup>I - GIP の特異的結合に対して正規化してある。

30

【0083】

【図 11】天然ホルモンと比較した、図示した濃度の<sup>125</sup>I - GIP およびコア配列欠失またはアルファらせん挿入を有する GIP ペプチドを対比して用いた完全 wt GIPR 細胞における競合結合抑制試験。平衡結合は、15 mM HEPES 緩衝 (pH 7.4) DMEM / F12 + 0.1% BSA + 1% トラシロール (アプロチニン) 中、4 で 12 ~ 16 時間インキュベートした後に達成された。未結合の標識を洗浄工程の際に除去し、細胞を 0.2 M NaOH に可溶化し、細胞に付随した放射能をカウントするためにホウ珪酸チューブに移した。非特異的結合を、1 マイクロモルの GIP<sub>1-42</sub> の存在下で検出した細胞付随放射能として定義した。データは、3 回以上の実験の平均 ± SEM を表しており、競合物 (B<sub>0</sub>) の不在下で測定した<sup>125</sup>I - GIP の特異的結合に対して正規化してある。

40

【0084】

【図 12】合成 GIP アナログを用いた麻酔 (65 mg / Kg のペントバルビタールナト

50

リウムIP)雄ウイスターラットでの腹腔内グルコース耐性試験。食塩水またはペプチド (A: 1ピコモル/分/100g体重またはB: 100ピコモル/分/100g体重)の静脈内(頸静脈内)注入を、1gグルコース/Kg体重の腹腔内注射の5分前に開始した。注入の前(基礎試料)および10分間隔で1時間、尾静脈から血液試料を採取した。血液グルコースの測定を手動のグルコメーター(glucometer)を用いて行った。<sup>\*</sup> = 食塩水対象に対して $p < 0.05$ 。データは、4匹の動物の平均 $\pm$ SEMを表す。

【0085】

【図13】皮下ペプチド注射(8ナノモル/Kg体重を500 $\mu$ L容量にて;または1の例では80ナノモル/Kg体重)したまたは注射していない覚醒非拘束雄ウイスターラットでの経口グルコース耐性試験(1g/Kg体重)。基礎試料は、経口グルコースおよびペプチド注射の前に尾静脈から得た。ついで、試料を指定の時点で得、手動のグルコメーターを用いて全血液グルコースを測定した。データは、4匹の動物の平均 $\pm$ SEMを表す。

10

【0086】

【図14】経口グルコース耐性試験および皮下ペプチド注射を同時に行った覚醒非拘束雄ウイスターラットからの総和(integrated)グルコース応答(すなわち、図13からの総和(integrated)データ)。曲線下面積の計算は、台形法を用い、ベースラインを差し引いて行った。データは、4匹の動物の平均 $\pm$ SEMを表す。

【0087】

【図15】GIPは、INS-1(832/13)細胞においてGH(A)およびGLP-1(B)と同レベルに11mMグルコース誘導細胞の増殖を増大させる。実験の前および実験中に細胞を血清飢餓させた。最終的な細胞数は常に最初のプレーティング密度よりも大きく、有糸分裂生起を示しており、最終的な細胞数はCYQUANT<sup>TM</sup>により蛍光測定で定量した。値は、3つずつの5(A)または4(B)の個々の実験の平均であり、<sup>\*</sup>は $p < 0.05$ を表す。

20

【0088】

【図16】GIPは、グルコース枯渇の際にINS-1(832/13)細胞の生存を濃度に依存した仕方で促進させる。細胞を48時間、血清およびグルコース飢餓させ、培養の最後の24時間の期間にGIPを加えた。最終的な細胞数は常に最初のプレーティング密度よりも小さく、細胞死の生じたことを示しており、最終的な細胞数はCYQUANT<sup>TM</sup>により蛍光測定で定量した。値は、3つずつの3(A)または4(B)の個々の実験の平均であり、<sup>\*</sup>は $p < 0.05$ を表す。

30

【0089】

【図17】グルコース枯渇の際のINS-1(832/13)細胞の生存のGIP促進にはp38MAPKが関与する。100nMGIPの不在下または存在下、プロテインキナーゼインヒビターを最後の24時間培養の15分前に培地に加えた。PKAインヒビターであるH89は、GIP(A)またはフォルスコリン(Forskolin)(B)によって媒体された細胞の生存を逆転させることはできなかった。ウォルトマンニンは細胞の生存に対して有害な作用を有し(C)、これはGIPによって部分的に逆転された。パネルDは、SB202190との特異的な抑制によりp38MAPKの関与を示す。最終的な細胞数はCYQUANT<sup>TM</sup>により蛍光測定で定量してあり、データは3つずつで行った3~8の実験の平均を表しており、<sup>\*</sup>および<sup>#</sup>は各対照に対して $p < 0.05$ を表す。

40

【0090】

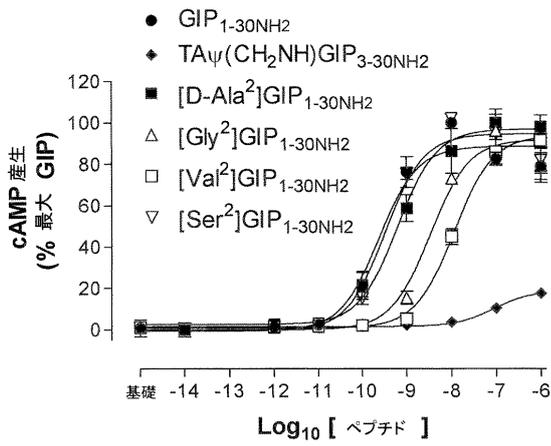
【図18】GIPは0mMグルコースを排除し(ablates)(A)、STZ(B)はINS-1(832/13)細胞においてカスパーゼ-3活性を誘起した。実験の前および実験中に細胞を血清飢餓させ、グルコース(3mM)またはSTZの存在下または不在下で100nMGIP、10Mフォルスコリン、または100nMGLP-1を6時間かけて加えてカスパーゼ-3活性に対する効果を評価した。カスパーゼ-3活性の定量は、アミノメチルクマリン(AMC)から誘導した物質であるZ-DEVD-AMCを用い、全タンパク質濃度について補正して行い、<sup>\*</sup>および<sup>#</sup>は各対照に対して $p < 0.05$ を表し

50

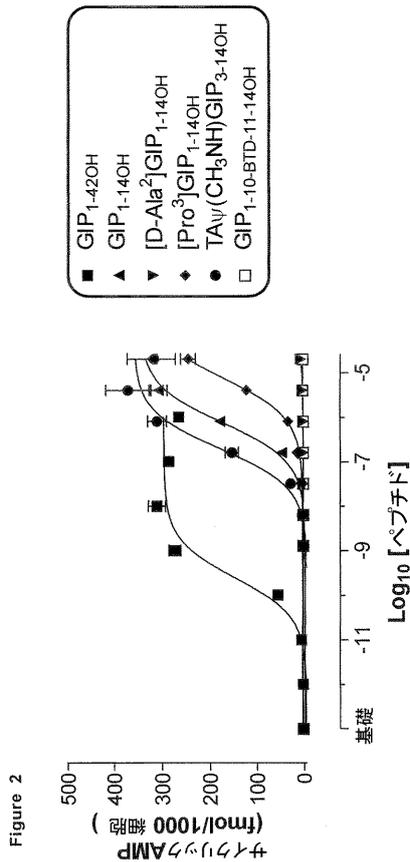
ている ( A、n = 3 ; B、n = 5 )。相対活性は特異的なものであることがカスパーゼ - 3 インヒビターである Ac - DEVD - CHO を用いることにより確認された ( A、挿入 図 )。

【 図 1 】

Figure 1

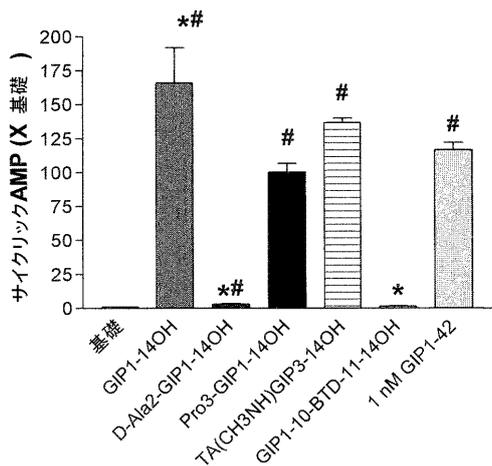


【 図 2 】



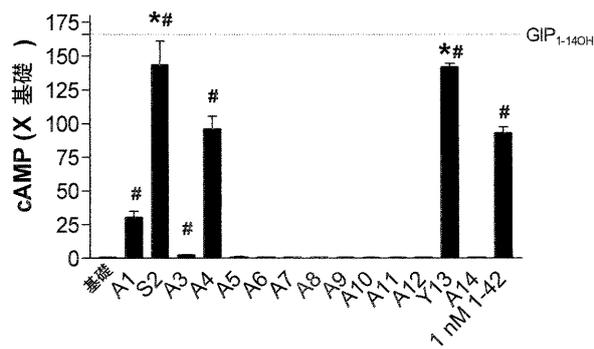
【 図 3 】

Figure 3



【 図 4 】

Figure 4



【 図 5 】

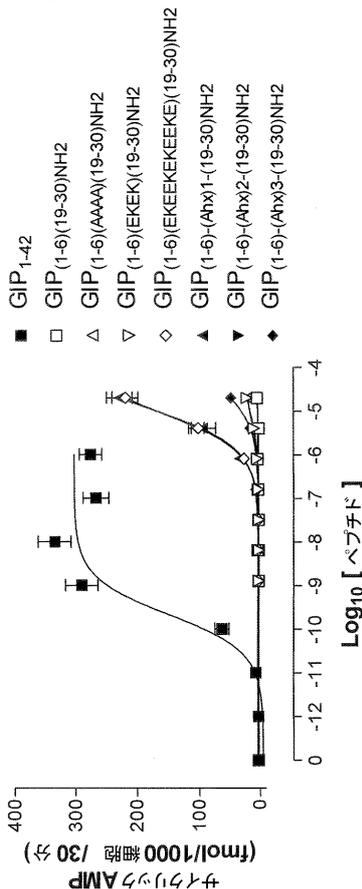


Figure 5

【 図 6 】

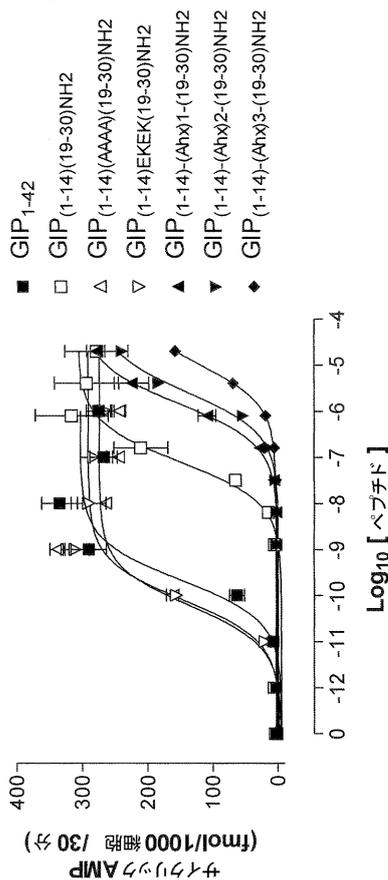


Figure 6

【 図 7 】

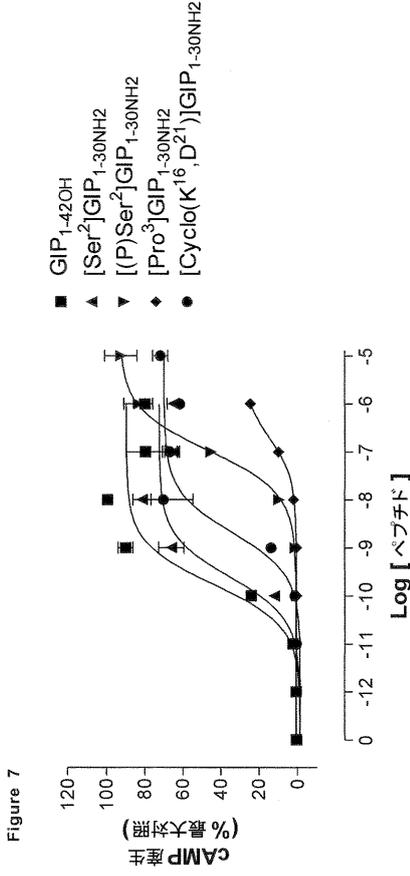


Figure 7

【 図 8 】

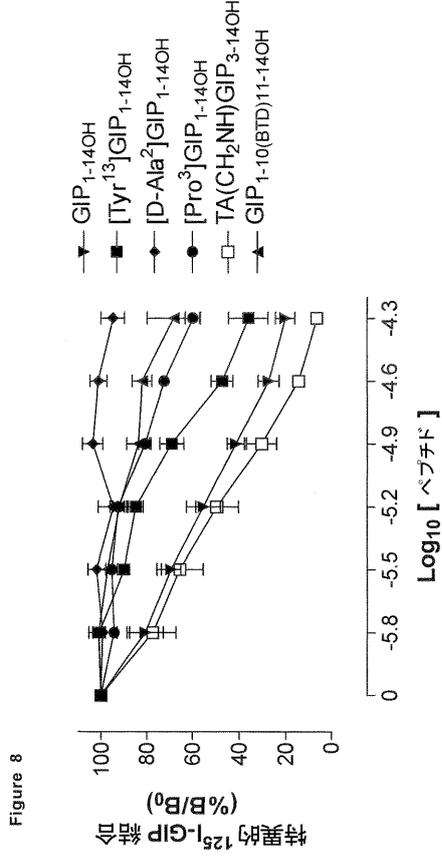


Figure 8

【 図 9 】

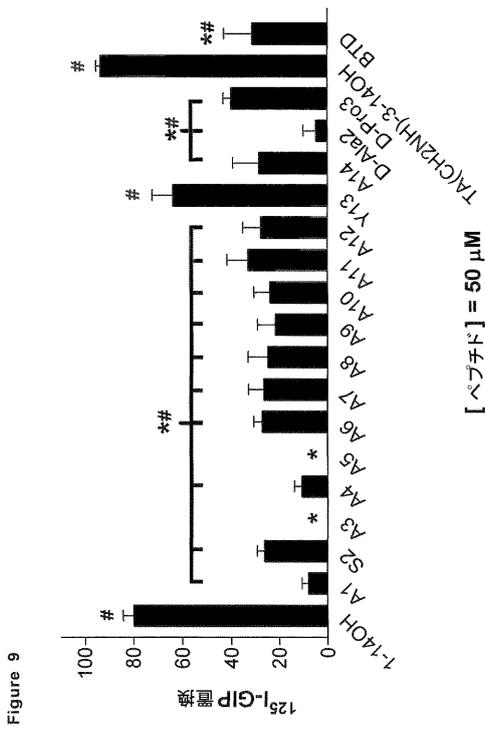


Figure 9

【 図 10 】

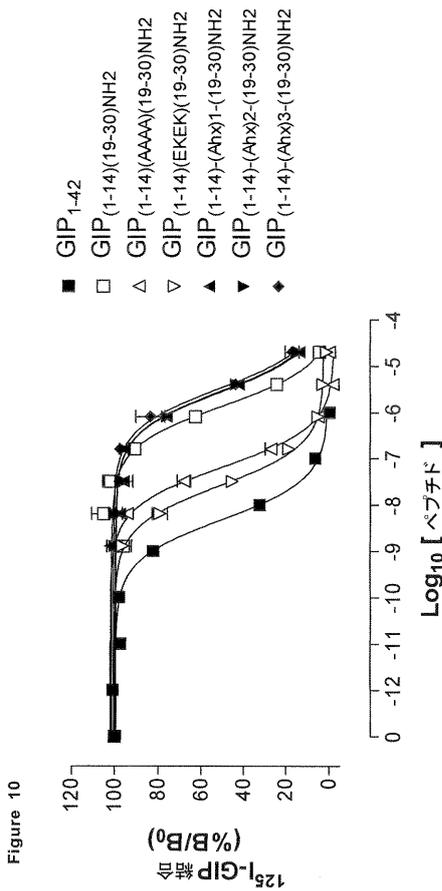


Figure 10

【 図 1 1 】

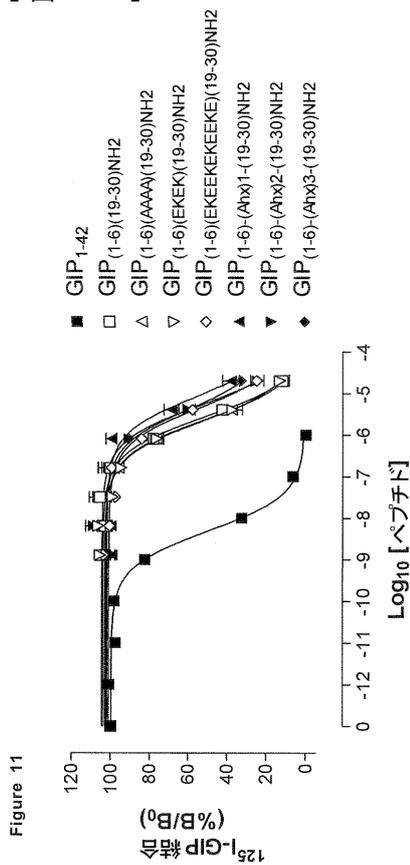
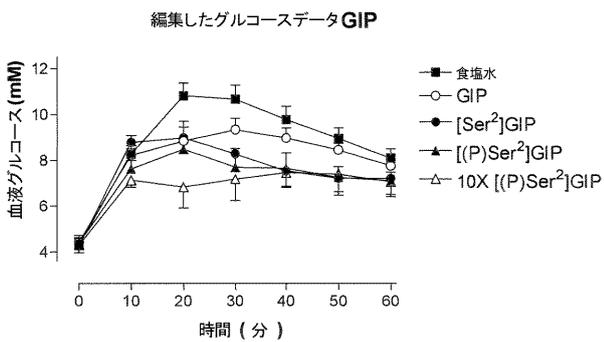


Figure 11

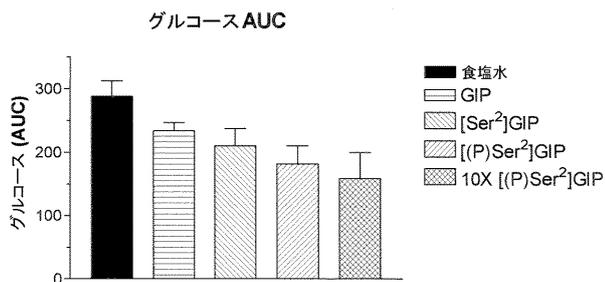
【 図 1 3 】

Figure 13

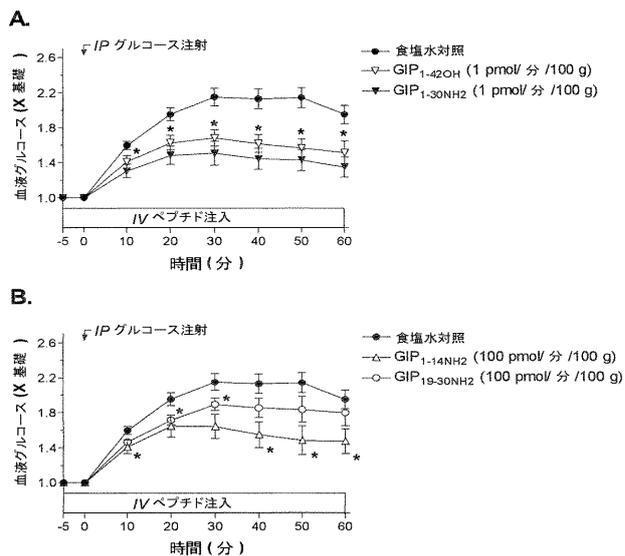


【 図 1 4 】

Figure 14

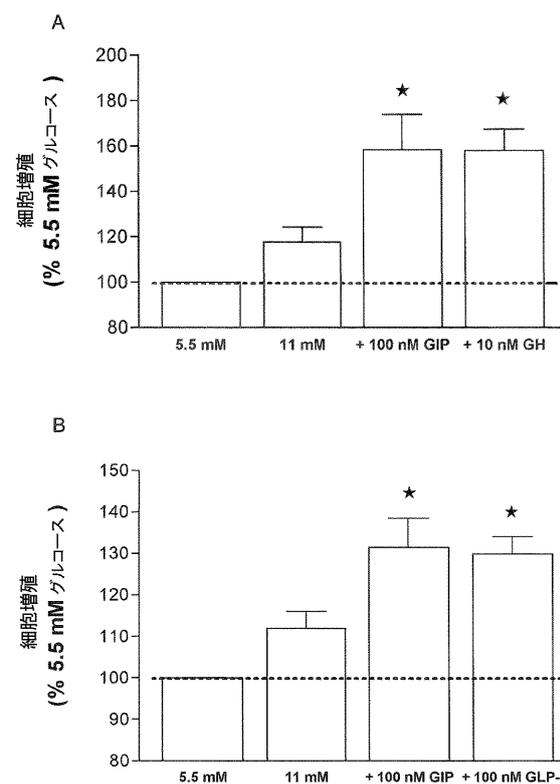


【 図 1 2 】



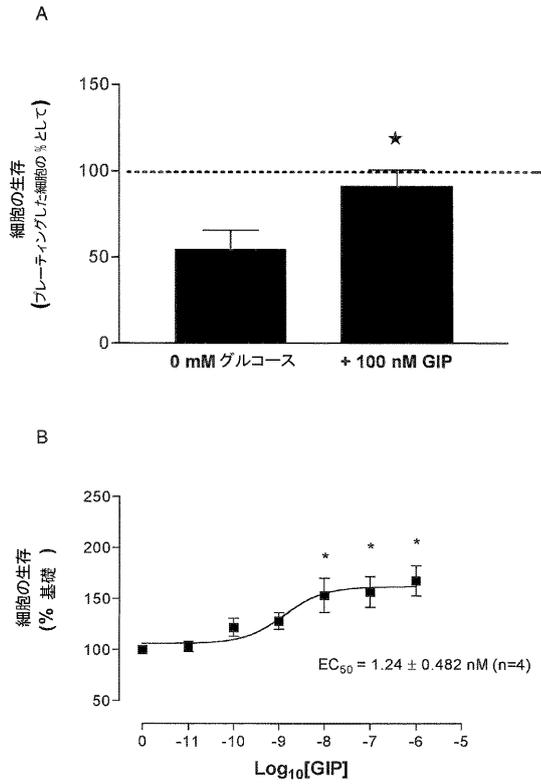
【 図 1 5 】

Figure 15



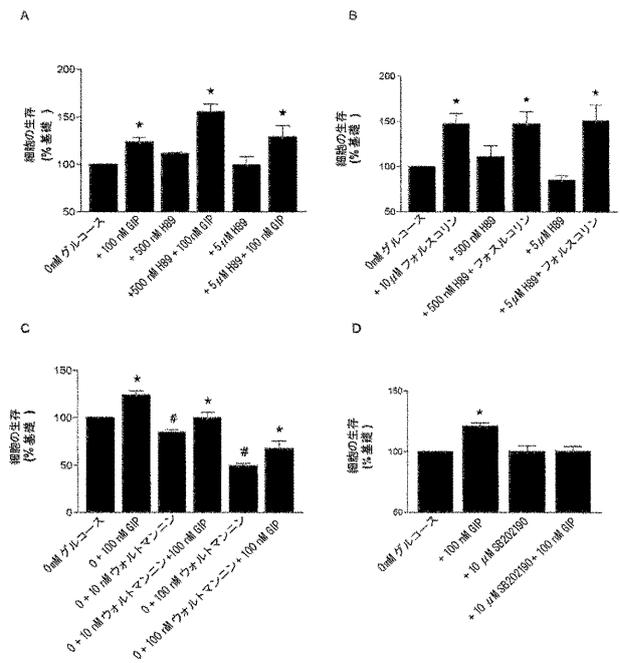
【 図 1 6 】

Figure 16



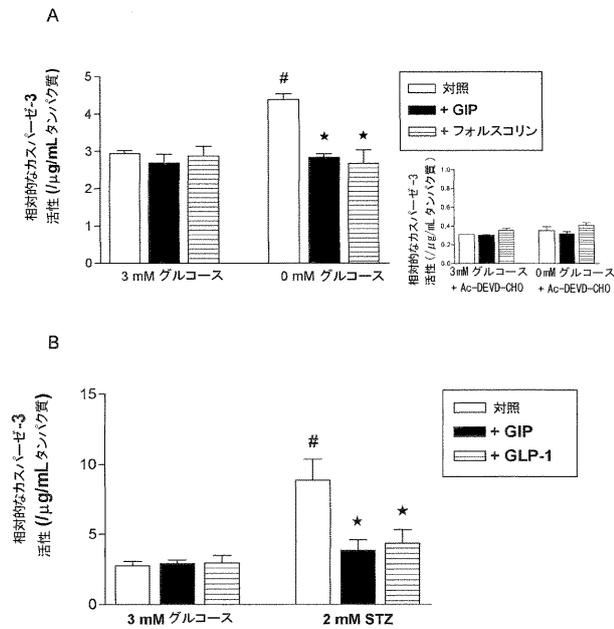
【 図 1 7 】

Figure 17



【 図 1 8 】

Figure 18



【手続補正書】

【提出日】平成16年11月30日(2004.11.30)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2005529862000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 03/03307

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K7/08 C07K7/02 C07K14/645 C07K14/00 A61K38/10 A61K38/16 A61K38/17		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HINKE SIMON A ET AL: "Dipeptidyl peptidase IV-resistant (D-Ala <sup>2</sup> )glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) improves glucose tolerance in normal and obese diabetic rats." DIABETES, vol. 51, no. 3, March 2002 (2002-03), pages 652-661, XP002255742 March, 2002 ISSN: 0012-1797	1,2,4, 19,21, 22,24,26
Y	page 658, column 2, paragraph 2	3,5,20, 23,25, 27-33
----- /--		
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of box C.	<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents :		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*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	
*E* earlier document but published on or after the international filing date	*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	
*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)	*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.	
*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	*&* document member of the same patent family	
*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 3 November 2003	Date of mailing of the international search report 19.04.04	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Mabit, H	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 03/03307

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KÜHN-WACHE K. ET AL.: "Analog of glucose-dependent insulintropic polypeptide with increased dipeptidyl peptidase IV resistance" CELLULAR PEPTIDASES IN IMMUNE FUNCTIONS AND DISEASES 2, 2000, pages 187-195, XP009018078 cited in the application	1,2,4,5, 20-24,26
Y	tables 1,2	1-5,17, 19-33
Y	HINKE SIMON A ET AL: "Identification of a bioactive domain in the amino-terminus of glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP)." BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 1547, no. 1, 2001, pages 143-155, XP004239382 ISSN: 0006-3002 page 153, column 1, paragraph 2	1-5,17, 19-33
X	WO 00/58360 A (FLATT PETER RAYMOND ;HARTE FINBARR PAUL MARY O (GB); UNIV ULSTER ()) 5 October 2000 (2000-10-05) cited in the application	1,2,4,5, 19, 21-24,26
Y	page 6, line 11 - page 7, line 30; claims 1-11; tables 1,2	1-5,17, 19-33
X	GAULT VICTOR A ET AL: "Characterization of the cellular and metabolic effects of a novel enzyme-resistant antagonist of glucose-dependent insulintropic polypeptide." BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 290, no. 5, 8 February 2002 (2002-02-08), pages 1420-1426, XP002255743 February 8, 2002 ISSN: 0006-291X page 1425, column 1, lines 1-12; figure 2	1,2,5, 21-24,26
P,X	HINKE S A ET AL: "Further development of antidiabetic enzyme resistant incretin analogues" DIABETOLOGIA, vol. 45, no. Supplement 2, August 2002 (2002-08), pages A 176-A 177, XP009019144 38th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes (EASD);Budapest, Hungary; September 01-05, 2002 ISSN: 0012-186X the whole document	17,19-33

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP 03/03307**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 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:  
Although claims 31-32 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2.  Claims Nos.:  
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:
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 II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

see additional sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
1-5, 7-8, 17 and 19-33 partially

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/EP 03/03307

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

Inventions 1-3: claims 1-5, 7-8, 17 and claims 19-33 partially

International Application No. PCT/JP 03 03307

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

1. Invention 1: claims 1-5 and claims 19-33 partially  
A compound having the amino acid sequence:

Tyr-A-B-Gly-Thr-Phe-Ile-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Ala-Met wherein A and B are amino acid residues including D-amino acid residues, N-methylated amino acid residues and any other non-proteinogenic amino acid residues or a pharmaceutical acceptable salt thereof, excluding the sequence of native GIP(1-14)(Claims 1-5 and claims 19-25, 33 partially),

A pharmaceutical composition containing said compound (claim 26 partially; use of said pharmaceutical composition (claims 27-30); methods of treatment using said compounds or compositions (claims 31-32 partially).

2. Invention 2: claim 17 and claims 19-33 partially

A compound having the following amino acid sequence:

A compound having the following amino acid sequence and comprising a phosphorylated seryl residue:

Tyr-Ser(P)-Glu-Gly-Thr-Phe-Ile-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Ala-Met  
or

Tyr-Ser(P)-Glu-Gly-Thr-Phe-Ile-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Ala-Met-Asp-Lys-Ile-His-Gln-Gln-Asp-Phe-Val-Asn-Trp-Leu-Leu-Ala-Gln-Lysor

Tyr-Ser(P)-Glu-Gly-Thr-Phe-Ile-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Ala-Met-Asp-Lys-Ile-His-Gln-Gln-Asp-Phe-Val-Asn-Trp-Leu-Leu-Ala-Gln-Lys-Gly-ys-Lys-Asn-Asp-Trp-Lys-His-Asn-Ile-Thr-Gln (claim 17 and claims 19-25, 33 partially),

A pharmaceutical composition containing said compound (claim 26 partially; use of said pharmaceutical composition (claims 27-30); methods of treatment using said compounds or compositions (claims 31-32 partially).

3. Invention 3: claims 7-8, and claims 19-33 partially

A compound having the following amino acid sequence:

Tyr-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Ile-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Tyr-Met (claim 7 and claims 19-25, 33 partially) and all peptides of claim 8 and claims 19-25, 33 partially; A pharmaceutical composition containing said compounds (claim 26 partially); use of said pharmaceutical composition (claims 27-30); methods of treatment using said compounds or compositions (claims 31-32 partially).

International Application No. PCT/JP 03 03307

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

---

Invention 4: claim 6 and claims 19-33 partially

A compound having the amino acid sequence and comprising a reduced peptide bound:  
 Tyr-Ala-Psi(CH<sub>2</sub>NH)-Glu-Gly-Thr-Phe-Ile-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Ala-Met, or  
 Tyr-Ala-Psi(CH<sub>2</sub>NH)-Glu-Gly-Thr-Phe-Ile-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Ala-Met-Asp-Lys-Ile-His-Gln-Gln-Asp-Phe-Val-Asn-Trp-Leu-Leu-Ala-Gln-Lys, (claim 6, and claims 19-25, and 33 partially); A pharmaceutical composition containing said compound (claim 26 partially); use of said pharmaceutical composition (claims 27-30); methods of treatment using said compounds or compositions (claims 31-32 partially).

---

Invention 5: claims 9-16, and claims 19-33 partially

Compounds having the following amino acid sequence and comprising one or more linker peptides:

a.  
 Tyr-A-B-Gly-Thr-Phe-C-Gln-Gln-Asp-Phe-Val-Asn-Trp-Leu-Leu-Ala-Gln-Lys-Gly-Lys-Lys-Asn-Asp-Trp-Lys-His-Asn-Ile-Thr-Gln (claims 9-12, and claims 19-25, 33 partially)

b.  
 Tyr-A-B-Gly-Thr-Phe-Ile-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Ala-Met-D-Gln-Gln-Asp-Phe-Val-Asn-Trp-Leu-Leu-Ala-Gln-Lys-Gly-Lys-Asn-Asp-Trp-Lys-His-Asn-Ile-Thr-Gln (claims 13-16, and claims 19-25, 33 partially)

A pharmaceutical composition containing said compounds (claim 26 partially); use of said pharmaceutical composition (claims 27-30); methods of treatment using said compounds or compositions (claims 31-32 partially).

---

Invention 6: claim 18 and claims 19-33 partially

A compound having the amino acid sequence:

Tyr-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Ile-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Ala-Met-Asp-Lys-Ile-His-Gln-Gln-Asp-Phe-Val-Asn-Trp-Leu-Leu-Ala-Gln-Lys with a side chain lactam bridge between lys at position 16 and Asp at position 21; A pharmaceutical composition containing said compound (claim 26 partially); use of said pharmaceutical composition (claims 27-30); methods of treatment using said compounds or compositions (claims 31-32 partially).

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/03307

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0058360 A	05-10-2000	AU 3441400 A	16-10-2000
		CA 2367856 A1	05-10-2000
		EP 1171465 A2	16-01-2002
		WO 0058360 A2	05-10-2000

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 0 7 K 14/00	C 0 7 K 14/00	
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 14/47	
	A 6 1 K 37/02	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, 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, IT, LU, MC, NL, 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, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 ズザンネ・マンハルト

ドイツ連邦共和国デー - 0 6 1 1 0 ハレノザーレ、ルドルフ・ハイム・シュトラッセ 2 1 番

(72) 発明者 ジャン・エイ・イーシーズ

カナダ、ブイ 6 エム・3 エックス 1、プリティッシュ・コロンビア、バンクーバー、ウエスト・ブールバード 4 - 5 9 5 9 番

(72) 発明者 クリストファー・エイチ・エス・マッキントッシュ

カナダ、ブイ 6 ティ・1 ティ 7、プリティッシュ・コロンビア、バンクーバー、アリソン・ロード 6 0 5 - 2 2 3 3 番

(72) 発明者 ハンス・ウルリッヒ・デムート

ドイツ連邦共和国デー - 0 6 1 1 4 ハレノザーレ、ヘーゲルシュトラッセ 1 4 番

(72) 発明者 レイモンド・エイ・ペダーソン

カナダ、ブイ 6 エス・1 ケイ 9、プリティッシュ・コロンビア、バンクーバー、ウエスト・2 3 アベニュー 3 8 7 6 番

F ターム(参考) 4C084 AA02 AA03 AA07 BA10 BA18 BA19 BA23 BA24 MA66 NA14

ZA702 ZB222 ZC352 ZC412 ZC422

4H045 AA10 AA20 AA30 BA16 BA18 BA19 CA40 FA33