

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6084215号  
(P6084215)

(45) 発行日 平成29年2月22日(2017.2.22)

(24) 登録日 平成29年2月3日(2017.2.3)

(51) Int.Cl.

F I

<b>A 6 1 K 38/22</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 37/24
<b>A 6 1 K 47/50</b>	<b>(2017.01)</b>	A 6 1 K 47/48
<b>A 6 1 K 47/10</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 47/10
<b>A 6 1 P 3/10</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P 3/10
<b>C O 7 K 14/46</b>	<b>(2006.01)</b>	C O 7 K 14/46

請求項の数 21 (全 18 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-518803 (P2014-518803)
(86) (22) 出願日	平成24年6月28日 (2012.6.28)
(65) 公表番号	特表2014-520798 (P2014-520798A)
(43) 公表日	平成26年8月25日 (2014.8.25)
(86) 国際出願番号	PCT/KR2012/005137
(87) 国際公開番号	W02013/002580
(87) 国際公開日	平成25年1月3日 (2013.1.3)
審査請求日	平成27年6月26日 (2015.6.26)
(31) 優先権主張番号	10-2011-0062858
(32) 優先日	平成23年6月28日 (2011.6.28)
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)

(73) 特許権者	514248961 セラリー ファーマシューティカルズ インコーポレイテッド アメリカ合衆国 メリーランド 21075, エルクリッジ, コリアンダー プレイス 7751
(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(74) 代理人	100181674 弁理士 飯田 貴敏
(74) 代理人	100181641 弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ポリエチレングリコールまたはその誘導体でPEG化されたエキセンジン-4類似体、その調製法、および活性成分としてこれを含有する、糖尿病を予防または処置するための薬学的組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

エキセンジン - 4 の C 末端のアミノ酸 40 に導入され、ポリエチレングリコール (PEG) または PEG の誘導体の二つの分子で PEG 化されたシステイン (Cys) を含むエキセンジン - 4 類似体であって、該 PEG 誘導体は、メトキシポリエチレングリコールスクシンイミジルプロピオネート、メトキシポリエチレングリコール N - ヒドロキシスクシンイミド、メトキシポリエチレングリコールプロピオンアルデヒド、およびメトキシポリエチレングリコールマレイミドからなる群から選択され、該二つの分子は、スパーサーにより該システインに結合され、該スパーサーが、ポリエチレングリコールまたはその誘導体であり、三量体型 PEG またはその誘導体を形成する、エキセンジン - 4 類似体。

10

【請求項 2】

前記ポリエチレングリコールが、5 kDa ~ 60 kDa の分子量を有する、請求項 1 に記載のエキセンジン - 4 類似体。

【請求項 3】

前記ポリエチレングリコールが、20 kDa ~ 50 kDa の分子量を有する、請求項 2 に記載のエキセンジン - 4 類似体。

【請求項 4】

前記ポリエチレングリコール誘導体が、メトキシポリエチレングリコールスクシンイミジルプロピオネート、メトキシポリエチレングリコール N - ヒドロキシスクシンイミド、メトキシポリエチレングリコールプロピオンアルデヒド、およびメトキシポリエチレング

20

リコールマレイミドの分枝型誘導体である、請求項 1 に記載のエキセンジン - 4 類似体。

【請求項 5】

前記ポリエチレングリコール誘導体が、三量体メトキシポリエチレングリコールマレイミドである、請求項 1 に記載のエキセンジン - 4 類似体。

【請求項 6】

請求項 1 に記載のエキセンジン - 4 類似体を調製する方法であって、該方法は、該エキセンジン - 4 中の前記導入されたシステインを前記スパーサーと反応させるステップを含み、該スパーサーは、前記 P E G または P E G 誘導体分子に結合される、方法。

【請求項 7】

前記導入されたシステインを有する前記エキセンジン - 4 と、前記ポリエチレングリコールまたは前記その誘導体との反応モル比が 1 : 1 ~ 1 : 3 である、請求項 6 に記載の方法。

10

【請求項 8】

活性成分として請求項 1 に記載のエキセンジン - 4 類似体を含有する、1 型糖尿病もしくは 2 型糖尿病を処置するための薬学的組成物。

【請求項 9】

システインが前記 C 末端の アミノ酸 40 に導入された前記エキセンジン - 4、および前記ポリエチレングリコールまたはその誘導体をリン酸緩衝食塩溶液に溶解させるステップと、該溶解させた成分を室温で反応させるステップとをさらに含む、請求項 6 に記載の方法。

20

【請求項 10】

前記リン酸緩衝食塩水が、7.2 ~ 7.8 の pH 範囲を有する、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記ポリエチレングリコールまたは前記その誘導体が、20 kDa ~ 50 kDa の分子量を有する、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記ポリエチレングリコール誘導体が、三量体メトキシポリエチレングリコールマレイミドである、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 13】

注射のための、または散剤、錠剤、ペレット剤、硬/軟カプセル剤、懸濁剤、乳剤、シロップ剤、顆粒剤、およびエリキシル剤からなる群から選択される経口投与のための請求項 8 に記載の薬学的組成物。

30

【請求項 14】

糖尿病の処置を必要とする患者において糖尿病を処置するための組成物であって、該組成物は、請求項 1 に記載のエキセンジン - 4 類似体を含み、治療有効量の該組成物を含む第一用量の組成物が投与されることを特徴とする、組成物。

【請求項 15】

前記患者が 1 型糖尿病または 2 型糖尿病を有する、請求項 14 に記載の組成物。

【請求項 16】

前記ポリエチレングリコールまたは前記その誘導体が、20 kDa ~ 50 kDa の分子量を有する、請求項 14 に記載の組成物。

40

【請求項 17】

前記ポリエチレングリコール誘導体が、三量体メトキシポリエチレングリコールマレイミドである、請求項 14 に記載の組成物。

【請求項 18】

第一の後続用量が、前記第一の用量の投与から 3 日より長い期間の後に投与されることをさらに特徴とする、請求項 14 に記載の組成物。

【請求項 19】

前記組成物が、前記第一の用量の投与後から 24 時間より長い期間の間有効である、請

50

求項 1 4 に記載の組成物。

【請求項 2 0】

前記組成物が、前記第一の用量の投与後から 3 日より長い期間の間有効である、請求項 1 4 に記載の組成物。

【請求項 2 1】

前記組成物が、毎週投与されることを特徴とする、請求項 1 4 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本開示は、ポリエチレングリコールまたはその誘導体で P E G 化されたエキセンジン - 4 類似体、その調製法、および活性成分としてこれを含有する、糖尿病を予防または処置するための薬学的組成物に関する。

10

【背景技術】

【0 0 0 2】

薬学的技術の中で、治療目的のためのペプチドおよびタンパク質の P E G 化は、最も有効な技術である。ペプチドおよびタンパク質を P E G 化すると、その分子量、タンパク質分解部位防御力、および免疫原性部位防御力が増大し、したがってそれにより、i n v i v o 薬物の半減期が長くなり、ペプチドおよびタンパク質の免疫原性が低減する。したがって、P E G 化技術は、元の薬物の問題を解決することによって治療効果を増大させる効果を有し、このような強みのために、P E G 化ペプチドおよびタンパク質薬物送達システムの効果の増大に重要な役割を果たす。

20

【0 0 0 3】

また、ペプチドおよびタンパク質は、ポリエチレングリコール ( P E G ) と共有結合することによって治療効果を増大させる。このような技術により、分子量、代謝部位の防御力、および免疫原性部位の阻害が増大し、i n v i v o 半減期および安定性が増大し、免疫原性が低減する。さらに、P E G と結合したペプチドおよびタンパク質の腎排泄は、P E G によってペプチドおよびタンパク質の分子量が増大しているために低減され、その結果、P E G 化は、薬物動態学的および薬力学的の両方における効果を増大させる利点を有する。

【0 0 0 4】

30

ペプチドおよびタンパク質の P E G 化反応部位は、ランダムに分散しており、場合によっては生理活性部位に近い。しかし、従来の P E G 化では、P E G 反応部位、P E G 結合の数、および生物活性を考慮しない非特異的 P E G 化法が使用される。しかし、このような非特異的 P E G 化法は、異なる生理化学的、生物学的、および薬物動態学的特性を有する様々な分枝型の P E G 結合異性体を生じさせることにより、不十分なコンフォメーションをもたらすことによって治療効果を低下させる。このような問題を解決するために、特異的 P E G 化法が研究されており、最近、特異的 P E G 化法が急速に発展して、薬物の治療効果を最大にする方法となっており、その理由は、遺伝子操作技術および選択的官能基導入技術が急速に発展しているためである。関連技術において、顆粒球刺激因子 ( G - C S F ) および腫瘍壊死因子受容体に関する遺伝子操作法を使用して、第一級アミン部位を異なるアミノ酸で置換することによって反応部位を除去した後、N 末端部位に P E G を選択的に結合させる研究が以前に行われていた。

40

【0 0 0 5】

また、薬物、例えば、スタフィロキナーゼ、インターフェロン α - 2、抗体単鎖可変断片 ( S c F v ) のために、遺伝子操作法および置換技術を使用して特定の置換基を導入した後、置換基を選択的に P E G 化する技術を使用する研究が行われている。

【0 0 0 6】

エキセンジン - 4 はポリペプチド物質であり、アメリカドクトカゲの唾液物質のエキセンジン - 4 を合成することによって調製された、最初のインクレチン類似体の糖尿病薬である。エキセンジン - 4 は、# 2 および # 3 部位のみがエキセンジン - 3 と異なり、酵素

50

であるDPP - IVに対して2分より短い半減期を有する糖尿病薬であるグルカゴン様ペプチド - 1 (GLP - 1)より長い半減期を有することが公知であり、摂取後に哺乳動物の胃の中で生成されるインクレチンを直接分解する酵素、DPP - IV (ジペプチジルペプチダーゼ - 4)に対して耐性であることによって、インスリン分泌を促進し、血糖値を下げる有益な役割を果たし、またこれは、in vivo実験で2 ~ 4時間の半減期を示す。これは、1日当たり2 ~ 3回の腹腔内注射で十分な血中濃度に到達し得ることが確認されている。

#### 【0007】

また、エキセンジン - 4は、胃腸管の運動性を制御することが公知であり、食物摂取量を低減し、血漿グルカゴンを抑制する。最近、PLGA微小球型合成エキセンジン - 4 (製品名: Byetta)がUSFDAによって承認されており、発売間近である。しかし、このByettaLAR製品は、複雑な調製プロセスを有し、エキセンジン - 4についてin vivo半減期が約4 ~ 6時間と短いため、高用量のエキセンジン - 4の頻繁な投与を必要とし、4200未満という低分子量に起因する急速排泄に基づく薬物放出制御の問題、および免疫原性などの問題が依然として存在する。

10

#### 【0008】

したがって、エキセンジン - 4の投与頻度を減らし、エキセンジン - 4の低分子量問題を解決するための方法を研究しながら、本発明者らは、エキセンジン - 4のC末端の#39部位の次の部位(#40部位)にシステイン(Cys)アミノ酸を挿入することを介する選択的PEG化を実施することによって、PEG化エキセンジン - 4の生成収率および薬物の治療効果を増大させることが可能であるという事実を確認した後、本発明を完成させた。

20

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0009】

本発明の一目的は、システイン(Cys)がC末端の#40部位に導入され、ポリエチレングリコール(PEG)またはその誘導体でPEG化されたエキセンジン - 4類似体を提供することである。

#### 【0010】

本発明の別の目的は、エキセンジン - 4類似体を調製する方法を提供することである。

30

#### 【0011】

本発明のさらに別の目的は、活性成分としてエキセンジン - 4類似体を含有する、インスリン過分泌により引き起こされる疾患を予防または処置するための薬学的組成物を提供することである。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0012】

上記目的を達成するために、本発明は、C末端の#40部位に導入されたシステイン(Cys)を有し、ポリエチレングリコール(PEG)またはその誘導体でPEG化されたエキセンジン - 4類似体を提供する。

#### 【0013】

本発明は、上記エキセンジン - 4類似体を調製する方法も提供する。

40

#### 【0014】

さらに、本発明は、活性成分としてエキセンジン - 4類似体を含有する、インスリン過分泌により引き起こされる疾患を予防または処置するための薬学的組成物を提供する。

#### 【0015】

有利な効果

本発明によれば、選択的PEG化を実施することによって、システイン(Cys)がC末端の#40部位に導入され、ポリエチレングリコール(PEG)またはその誘導体でPEG化されたエキセンジン - 4類似体の収率を上げることができ、薬物の治療効果を増大させることができ、したがって、該エキセンジン - 4類似体は、インスリン過分泌により

50

引き起こされる疾患を予防または処置するための組成物として有利に使用することができる。

本発明の実施形態において、例えば以下の項目が提供される。

(項目1)

システイン(Cys)がC末端の#40部位に導入され、ポリエチレングリコール(PEG)またはその誘導体でPEG化されたエキセンジン-4類似体。

(項目2)

前記ポリエチレングリコールまたは前記その誘導体が、直鎖型または分枝型である、項目1に記載のエキセンジン-4類似体。

(項目3)

前記ポリエチレングリコールまたは前記その誘導体が、二量体型または三量体型である、項目1に記載のエキセンジン-4類似体。

(項目4)

前記ポリエチレングリコールまたは前記その誘導体が、前記三量体型である、項目3に記載のエキセンジン-4類似体。

(項目5)

前記ポリエチレングリコールまたは前記その誘導体が、5~60kDaの分子量を有する、項目1に記載のエキセンジン-4類似体。

(項目6)

前記ポリエチレングリコールまたは前記その誘導体が、20~50kDaの分子量を有する、項目5に記載のエキセンジン-4類似体。

(項目7)

前記ポリエチレングリコール誘導体が、メトキシポリエチレングリコールスクシンイミジルプロピオネート、メトキシポリエチレングリコールN-ヒドロキシスクシンイミド、メトキシポリエチレングリコールプロピオンアルデヒド、メトキシポリエチレングリコールマレイミド、または該誘導体の複数分枝型である、項目1に記載のエキセンジン-4類似体。

(項目8)

前記ポリエチレングリコール誘導体が、直鎖メトキシポリエチレングリコールマレイミド、二量体メトキシポリエチレングリコールマレイミド、または三量体メトキシポリエチレングリコールマレイミドからなる群から選択される、項目7に記載のエキセンジン-4類似体。

(項目9)

前記ポリエチレングリコール誘導体が、三量体メトキシポリエチレングリコールマレイミドである、項目8に記載のエキセンジン-4類似体。

(項目10)

項目1に記載のエキセンジン-4類似体を調製する方法であって、システインがC末端の#40部位に導入されたエキセンジン-4、およびポリエチレングリコールまたはその誘導体をリン酸緩衝食塩溶液に溶解させるステップと、溶解させた該成分を室温で反応させるステップとを含む、方法。

(項目11)

前記リン酸緩衝食塩水が、7.2~7.8のpH範囲を有する、項目10に記載の方法。

(項目12)

導入された前記システインを有する前記エキセンジン-4と、前記ポリエチレングリコールまたは前記その誘導体との反応モル比が1:1~3である、項目10に記載の方法。

(項目13)

活性成分として項目1に記載のエキセンジン-4類似体を含む、インスリン過分泌により引き起こされる疾患を予防または処置するための薬学的組成物。

(項目14)

10

20

30

40

50

インスリン過分泌により引き起こされる前記疾患が、1型糖尿病、2型糖尿病、または糖尿病合併症である、項目13に記載の薬学的組成物。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】図1は、システイン(Cys40)が本発明の実施例1のC末端に導入されたエキセンジン-4のPEG化を例示する概略図である。

【図2】図2は、本発明の比較実施例1のエキセンジン-4のリシンアミンについてのPEG化を例示する概略図である。

【図3】図3は、本発明の比較実施例2のエキセンジン-4のN末端についてのPEG化を例示する概略図である。

10

【図4】図4は、本発明の実施例1の吸光度を例示する図である。

【図5】図5は、本発明の比較実施例1a~1cの吸光度を例示する図である。

【図6】図6は、本発明の比較実施例2の吸光度を例示する図である。

【図7】図7は、本発明の実施例1の生成収率を例示する図である。

【図8】図8は、本発明の比較実施例1a~1cの生成物収率を例示する図面である。

【図9】図9は、本発明の比較実施例2の生成収率を例示する図である。

【図10】図10は、本発明の一実施例による、GLP-1受容体に対するPEG結合エキセンジン-4類似体の親和性を例示する図である。

【図11】図11は、本発明の実施例4および5のPEG結合エキセンジン-4類似体を例示する概略図である。

20

【図12】図12は、本発明の一実施例によるPEG結合エキセンジン-4類似体を投与された糖尿病マウスの血糖値を例示する図である。

【発明を実施するための形態】

【0017】

発明を実施するための態様

以下で本発明を詳細に記載する。

【0018】

本発明は、システイン(Cys)がC末端の#40部位に導入され、ポリエチレングリコール(PEG)またはその誘導体でPEG化されたエキセンジン-4類似体を提供する。

30

【0019】

本発明によるポリエチレングリコールまたはその誘導体の分子量は、5~60kDa、好ましくは20~50kDaであるが、それに限定されない。

【0020】

また、本発明によるポリエチレングリコールまたはその誘導体は、直鎖型または分枝型であり、分枝型については、好ましくは二量体型または三量体型を使用することができ、より好ましくは三量体型を使用することができる。

【0021】

具体的には、上記ポリエチレングリコール誘導体は、例えば、メトキシポリエチレングリコールスクシンイミジルプロピオネート、メトキシポリエチレングリコールN-ヒドロキシスクシンイミド、メトキシポリエチレングリコールプロピオンアルデヒド、メトキシポリエチレングリコールマレイミド、またはこれらの誘導体の複数分枝型(multiple branched type)である。好ましくは、上記ポリエチレングリコール誘導体は、直鎖メトキシポリエチレングリコールマレイミド、分枝型メトキシポリエチレングリコールマレイミド、または三量体メトキシポリエチレングリコールマレイミドであり、より好ましくは、三量体メトキシポリエチレングリコールマレイミドである。

40

【0022】

また、本発明は、上記ポリエチレングリコールまたはその誘導体でPEG化されたエキセンジン-4類似体を調製する方法であって、システインがC末端の#40部位に導入されたエキセンジン-4、およびポリエチレングリコールまたはその誘導体をリン酸緩衝食

50

塩溶液に溶解させ、これらを室温で反応させるプロセスを含む、方法を提供する。

【0023】

具体的には、ポリエチレングリコールまたはその誘導体でPEG化されたエキセンジン-4類似体は、7.2~7.8のpH範囲、好ましくはpH7.5を有するリン酸緩衝食塩水中1:1~3のモル比で、システインがC末端の#40部位に導入されたエキセンジン-4、およびポリエチレングリコールまたはその誘導体をリン酸緩衝食塩溶液に添加し、これらの成分を溶解させ、反応温度は特に限定されないが、室温で1~3時間反応を実施し、反応が完了した後、カラムクロマトグラフィーを実施することによって調製することができる。

【0024】

上記リン酸緩衝食塩水が上記pH範囲内でない場合、上記収率が低下し得る。

【0025】

本発明では、ポリエチレングリコールまたはその誘導体でPEG化されたエキセンジン-4類似体を調製した後、該エキセンジン-4類似体の分子構造を、質量分析装置、液体クロマトグラフィー、X線回折分析、偏光分析法、および該エキセンジン-4類似体を構成する代表的な元素の計算値と測定値との比較によって確認することができる。

【0026】

また、本発明は、活性成分として上記エキセンジン-4類似体を含有する、インスリン過分泌により引き起こされる疾患を予防または処置するための薬学的組成物を提供する。

【0027】

さらに、本発明は、インスリン過分泌により引き起こされる疾患を処置する必要のある患者への、ポリエチレングリコールまたはその誘導体でPEG化されたエキセンジン-4類似体の投与を特徴とする処置法を提供する。

【0028】

インスリン過分泌により引き起こされる疾患として、1型糖尿病、2型糖尿病、および糖尿病合併症を挙げることができる。

【0029】

本発明によるポリエチレングリコールまたはその誘導体でPEG化されたエキセンジン-4類似体のGLP-1受容体への親和性を測定した結果として、IC50値は1.04 nMであり、これは、実施例1の化合物(Nter-PEG-Ex4)(IC50=121.78 nM)より120倍大きい活性を示すことが確認された(実験例1、表3、および図10を参照)。

【0030】

また、より良好に理解するために、C40部位で三量体PEGと結合した本発明のエキセンジン-4の模式図を図11に示す。

【0031】

上記結合したPEGの分子量が23Kであるとき、3KDのPEGがPEGスパーサーとして使用され、10KDの分子量を有するPEGが該3KDの末端に結合している(実施例4)。また、これと同様に、上記結合したPEGの分子量が50であるとき、10KDのPEGがPEGスパーサーとして使用され、20KDの分子量を有するPEGが該10KDの末端に結合している(実施例5)。この時、実施例4(C40-PEG23K-Ex4)および実施例5(C40-PEG50K-Ex4)のエキセンジン-4を注射した後、血糖値が8.35 mmol/Lに上昇して戻するのに必要とされる時間を測定した結果として、低血糖値は、その薬物を投与した後、45.5~56.1時間維持し(実験例2、表4、および図12を参照)、これは、C40-PEG20K-Ex4(23.2時間)および対照群(7.3時間)の2倍超であり、血糖値を7~8倍より安定に維持することを可能にすることが確認された。

【0032】

したがって、本発明によるC40部位特異的PEG結合エキセンジン-4化合物は、既存のエキセンジン-4の低分子量に起因する薬物の急速排泄という欠点を解決することが

10

20

30

40

50

でき、上記 G L P - 1 受容体への優れた親和性を有し、上記薬物を投与した後最大 3 ~ 4 日血糖値を維持することができる、強い低血糖維持能力を有し、したがって、これは、インスリン過分泌関連 1 型糖尿病、2 型糖尿病、および糖尿病合併症に関係した疾患を予防または処置するのに有利に使用することができる。

#### 【 0 0 3 3 】

本発明の組成物が薬物として使用される場合、ポリエチレングリコールまたはその誘導体で P E G 化されたエキセンジン - 4 類似体を含有する薬学的組成物は、臨床投与の場合では、以下のような様々な経口または非経口投与形態に製剤化した後、投与することができるが、それに限定されない。

#### 【 0 0 3 4 】

経口投与目的の製剤については、例えば、錠剤、ペレット剤、硬 / 軟カプセル剤、液剤、懸濁剤、乳剤、シロップ剤、顆粒剤、エリキシル剤、トローチ剤などがあり、これらの製剤は、活性成分に加えて、賦形剤（例：ラクトース、デキストロース、スクロース、マンニトール、ソルビトール、セルロース、および / またはグリシン）、滑沢剤（*slip modifier*）（例：シリカ、タルク、ステアリン酸およびそのマグネシウムもしくはカルシウム塩、ならびに / またはポリエチレングリコール）を含む。錠剤は、結合剤、例えば、ケイ酸アルミニウムマグネシウム、デンプンペースト、ゼラチン、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、および / またはポリビニルピロリジンを含んでもよく、必要な場合、崩壊剤、例えば、デンプン、寒天、アルギン酸もしくはそのナトリウム塩、または沸騰混合物（*boiling mixture*）および / または吸収剤、着色剤、香味剤、および甘味剤を含むことができる。

#### 【 0 0 3 5 】

ポリエチレングリコールまたはその誘導体で P E G 化されたエキセンジン - 4 類似体を含有する薬学的組成物は、非経口投与してもよく、その投与は、皮下注射、静脈内注射、筋肉内注射、または胸腔内注射によって行われる。

#### 【 0 0 3 6 】

この時、ポリエチレングリコールまたはその誘導体で P E G 化されたエキセンジン - 4 類似体は、これを水中で安定剤または緩衝剤と混合することによって調製して液体または懸濁液にして、これを製剤化して（*formulize*）非経口的投与目的の製剤にすることができ、これは、アンプルまたはバイアル単位投与形態に調製することができる。その組成物は、滅菌され、かつ / または、補助剤、例えば、防腐剤、安定剤、ハイドレーターもしくは乳化刺激物質（*emulsify stimulator*）、浸透圧制御目的の塩および / もしくは緩衝剤、ならびに処置に有益な他の物質を含むことができ、混合、造粒、もしくは被覆の従来の方法によって製剤化することができる。

#### 【 0 0 3 7 】

本発明によるポリエチレングリコールまたはその誘導体で P E G 化されたエキセンジン - 4 類似体を含有する薬学的組成物の人体用量は、患者の年齢、体重、性別、投与形態、健康状態、および疾患のレベルに応じて変更することができ、好ましくは 0 . 0 1 ~ 2 0 0 m g / k g / 日の用量で、医師または薬剤師が決定した後、経口または非経口経路を介して投与することができる。

発明を実施するための形態

本発明を、以下の実施例および実験例によって詳細に説明する。

#### 【 0 0 3 8 】

実施例および実験例は、本発明を実証しているだけであり、本発明の内容はこれらに限定されない。

#### 【実施例】

#### 【 0 0 3 9 】

（実施例 1 ~ 5）

C 4 0 部位特異的 P E G 結合エキセンジン - 4 の生成

C 4 0 部位特異的 P E G 結合エキセンジン - 4 を調製するために、システインが C 末端

10

20

30

40

50



部位（＃４０部位）に導入されたエキセンジン - ４ - C y s を使用し（エキセンジン - C y s、分子量：４２９０．７、配列：H G E G T F T S D L S K Q M E E E A V R L F I E W L K N G G P S S G A P P P S C）、マレイミド活性化モノメトキシ P E G（m P E G - M A L、MW：５、２０ k D a（直鎖型）、２０ k D a（分枝型）、２３、５０ k D a（三量体型））を、日本油脂（N i p p o n O i l a n d F a t s）、日油（N O F）、東京から購入し、使用した。

#### 【００４０】

C末端＃４０部位特異的 P E G 結合エキセンジン - ４ を調製するために、エキセンジン - ４ - C y s および m P E G - M A L（MW：５、２０（直鎖型）、２０（分枝型）、２３、５０ k D a）を、２０ m M のリン酸緩衝食塩水（p H ７．５）で１：２のモル比で完全に溶解させ、室温で２時間反応させた（図１を参照）。反応後、５．０ m l / 分の流速で、C a p c e l l - p a k R P - １８カラム（２５０×１０ m m、５ μ m、資生堂（S h i s e i d o）、日本）を用いて逆相クロマトグラフィーによって反応した溶液を分離した。その分離は、２１５ n m の波長の紫外線でモニターした。０．１％の T F A 蒸留水（移動相 A）および０．１％の T F A アセトニトリル（移動相 B）に対して直線濃度勾配法（３０分にわたって３６～４２％の B）を使用して移動相を分離した（図４を参照）。

#### 【００４１】

この方法によって分離されたピークを別個に収集し、窒素ガスを使用してアセトニトリルを取り出し、C e n t r i c o n - １０（M w カットオフ３０００、M i l l i p o r e C o r p .、B i l l e r i c a、M A）を使用して、その取り出した溶液を濃縮した。調製した物質を４℃で貯蔵し、試料 - マトリックス試料溶液 １ μ l とマトリックス溶液 ２ μ l を混合することによって調製し、該マトリックス溶液は、０．１％（v / v）の T F A を含有する水 / C A N（５０：５０）溶液を用いて、シアノヒドロキシケイ皮酸（- C H C A）を溶解させることによって調製した。調製した試料 - マトリックス溶液 １ μ l を試料プレート上に置き、真空状態で乾燥させ、サイズ排除クロマトグラフィー（S E C）および M A L D I - T O F 質量分析計で分析し、C ４０部位特異的 P E G 結合反応物（C ４０ - P E G - E x ４）を、０、２０、４０、６０、および８０分において分析し、エキセンジン - ４ および C ４０ - P E G - E x ４ の初期状態と比較したクロマトグラム面積比を用いて示した。結果を表１および図７に例示する。

#### 【００４２】

##### 【表１】

	反応時間	収率(%)
実施例 1 C40-PEG <sub>5K</sub> -Ex4(直鎖)	80 分	93%
実施例 2 C40-PEG <sub>20K</sub> -Ex4(直鎖)	80 分	89%
実施例 3 C40-PEG <sub>20K</sub> -Ex4(分枝)	80 分	91%
実施例 4 C40-PEG <sub>23K</sub> -Ex4(三量体)	80 分	90%
実施例 5 C40-PEG <sub>50K</sub> -Ex4(三量体)	80 分	85%

表１に示したように、反応時間は、平均で８０分であり、９０％超の平均の収率で生成が行われた（図７を参照）。

#### 【００４３】

## (比較実施例 1)

非特異的 PEG 結合エキセンジン - 4 の生成

システインが導入されたエキセンジン - 4 - C y s およびマレイミド活性化モノメトキシ PEG を使用する代わりに、エキセンジン - 4 (分子量: 4186.6、配列: H G E G T F T S D L S K Q M E E E A V R L F I E W L K N G G P S S G A P P P S) およびスクシンイミジル活性化モノメトキシ PEG (mPEG - SPA、MW: 5、20 kDa (直鎖型)) を使用することを除いて、上記実施例 1 と等価な方法を実施して、非特異的 PEG 結合エキセンジン - 4 を調製した (図 2 および図 5 を参照)。

## 【0044】

スクシンイミジル活性化モノメトキシ PEG (mPEG - SPA) を、日本油脂、日油、東京から購入し、使用した。

## 【0045】

## 【表 2】

比較実施例 1	反応時間	収率(%)
比較実施例 1a Lys <sup>12</sup> -PEG <sub>20K</sub> -Ex4	80 分	20%
比較実施例 1b Lys <sup>27</sup> -PEG <sub>20K</sub> -Ex4	80 分	31%
比較実施例 1c Lys <sup>12,27</sup> -PEG <sub>20K</sub> -Ex4	80 分	25%

表 2 に示したように、非特異的な第一級アミン PEG 結合反応の反応時間は、平均で 80 分であり、平均収率は、比較実施例 1 a (L y s<sup>12</sup> - P E G<sub>20K</sub> - E x 4) で 20 % であり、比較実施例 1 b (L y s<sup>27</sup> - P E G<sub>20K</sub> - E x 4) で 31 % であった (図 8 を参照)。

## 【0046】

## (比較実施例 2)

N 末端特異的 PEG 結合エキセンジン - 4 の生成

システインが導入されたエキセンジン - 4 - C y s およびマレイミド活性化モノメトキシ PEG を使用する代わりに、エキセンジン - 4 (分子量: 4186.6、配列: H G E G T F T S D L S K Q M E E E A V R L F I E W L K N G G P S S G A P P P S) およびモノメトキシ PEG - アルデヒド (mPEG - ALD、MW: 5 kDa (直鎖)) を使用することを除いて、上記実施例 1 と等価な方法を実施して、非特異的 PEG 結合エキセンジン - 4 を調製した (図 3 および図 6 を参照)。

## 【0047】

上記モノメトキシ PEG - アルデヒドを、日本油脂、日油、東京から購入し、使用した。

## 【0048】

結果として、N 末端特異的 PEG 結合反応物 (N<sub>t e r</sub> - P E G<sub>5K</sub> - E x 4) の反応時間は、720 分であり、平均収率は、72 % であった (図 9 を参照)。

## 【0049】

## (実験例 1)

PEG 結合エキセンジン - 4 類似体の R I N - m 5 F 細胞受容体結合親和性の分析

以下の実験を実施して、実施例 1、比較実施例 1 および 2 で調製した実施例 1 (C 4 0 - P E G<sub>5K</sub> - E x 4)、比較実施例 1 a (L y s<sup>12</sup> - P E G<sub>5K</sub> - E x 4)、比較実施例 1 b (L y s<sup>27</sup> - P E G<sub>5K</sub> - E x 4)、および比較実施例 2 (N<sub>t e r</sub> - P E G<sub>5K</sub> - E x 4) の PEG 結合エキセンジン - 4 類似体の G L P - 1 受容体 (G L P - 1 R) 親和性を実施した。

## 【 0 0 5 0 】

非常に多量の G L P - 1 受容体 ( G L P - 1 R ) を発現する島細胞 ( R I N - m 5 F 、 A T C C 、 M a n a s s a s 、 V A ) を、12 ウェルプレートに接種した。48 時間後に、結合緩衝液 ( 120 m M の N a C l 、 1 . 2 m M の M g S O <sub>4</sub> 、 13 m M の酢酸ナトリウム、5 m M の K C l 、 1 . 2 g / l の T r i s 、 2 g / l のウシ血清アルブミン、1 . 8 g / l のグルコース、p H 7 . 6 ) でこれを2回洗浄し、未標識 P E G 結合エキセンジン - 4 類似体 ( 最終濃度範囲 : 0 . 001 ~ 1000 n M ) および 30 p M の濃度の I - 125 で標識したエキセンジン - 4 ( 9 - 39 、 P e r k i n E l m e r 、 B o s t o n 、 M A ) を同時に処理した。2 時間後に、1 m g / m l のウシ血清アルブミンを含む P B S で完全な洗浄を行った。最後に、細胞溶解緩衝液 ( 1 % の S D S を含む 0 . 5 N の N a O H ) を使用して 15 分間上記細胞を徹底的に分解し、I - 125 の放射線レベルを、ガンマカウンター ( G M I , I n c . 、 R a m s e y 、 M N ) を使用して測定した。結果を表 3 および図 10 に例示する。

## 【 0 0 5 1 】

【表 3】

	IC <sub>50</sub> (nM)
実施例 1 (C40-PEG <sub>5K</sub> -Ex4)	1.04 nM
比較実施例 1a (Lys <sup>12</sup> -PEG <sub>5K</sub> -Ex4)	6.45 nM
比較実施例 1b (Lys <sup>27</sup> -PEG <sub>5K</sub> -Ex4)	2.42 nM
比較実施例 2 (N <sub>ter</sub> -PEG <sub>5K</sub> -Ex4)	121.78 nM
対照群 (エキセンジン-4)	0.23 nM

表 3 に示したように、本発明による実施例 1 ( C 40 - P E G <sub>5 K</sub> - E x 4 ) の I C <sub>50</sub> は、G L P - 1 受容体に対する親和性を測定した後、1 . 04 n M であることが確認された。これは、比較実施例 1 b ( L y s <sup>27</sup> - P E G <sub>5 K</sub> - E x 4 ) ( I C <sub>50</sub> 値 = 2 . 42 n M ) より 2 倍良好で、比較実施例 1 a ( L y s <sup>12</sup> - P E G <sub>5 K</sub> - E x 4 ) ( I C <sub>50</sub> 値 = 6 . 45 n M ) より 6 倍良好な活性を示すことが確認された。また、本発明による実施例 1 ( C 40 - P E G <sub>5 K</sub> - E x 4 ) は、比較実施例 2 ( N <sub>t e r</sub> - P E G <sub>5 K</sub> - E x 4 ) ( I C <sub>50</sub> 値 = 121 . 78 n M ) より 120 倍良好な活性を示すことが確認された。

## 【 0 0 5 2 】

したがって、本発明による C 40 部位特異的 P E G 結合エキセンジン - 4 組成物は、エキセンジン - 4 の低分子量に起因する薬物の急速排泄という欠点を解決することができるだけでなく、糖尿病薬として有利に使用することもでき、その理由は、G L P - 1 受容体親和性により、エキセンジン - 4 と同様の生物活性が示されるためである ( 図 10 を参照 ) 。

## 【 0 0 5 3 】

( 実験例 2 )

非空腹の 2 型糖尿病マウスにおける低血糖持続可能性の評価

以下の実験を実施して、2 型糖尿病マウスにおける、本発明による C 40 部位特異的 P E G 結合エキセンジン - 4 組成物の低血糖持続可能性を評価した。

## 【 0 0 5 4 】

2 型糖尿病の C 5 7 B L / 6 d b / d b マウス ( 雄、4 ~ 5 週齢、C e n t r a l L a b . A n i m a l I n c . ) を使用し、上記動物を、食物および水を自由に摂取させることによって 2 週間安定させた後、12 時間サイクルで光に曝露し、成長させた。実験動物は、国立衛生研究所 ( N I H ) の指針に従って管理し、S u n g k y u n k w a n 大学の所内動物実験委員会 ( I n s t i t u t i o n a l A n i m a l C a r e a n d U s e C o m m i t t e e ) によって承認された。実験を人道的に実施した。

【 0 0 5 5 】

実施例 1 ~ 5 から調製した C 4 0 - P E G <sub>5K</sub> - E x 4 ( 直鎖 )、C 4 0 - P E G <sub>20K</sub> - E x 4 ( 直鎖 )、C 4 0 - P E G <sub>20K</sub> - E x 4 ( 分枝 )、C 4 0 - P E G <sub>23K</sub> - E x 4 ( 三量体 )、および C 4 0 - P E G <sub>50K</sub> - E x 4 ( 三量体 )、ならびに比較実施例 1 b で調製した L y s <sup>27</sup> - P E G <sub>20K</sub> - E x 4 を、雄の d b / d b マウス ( 6 ~ 7 週齢 ) に 25 n m o l / k g の用量で腹腔内注射し、フロート時間 ( f l o a t t i m e ) : 0、0.5、1、2、3、4、6、8、12、24、36、48、60、72、96 時間の後に、マウスの尾静脈から血液を収集し、血糖濃度を A C C U - C H E K S e n s o r ( R o c h e D i a g n o s t i c s C o r p . , U S A ) で測定した。その後、低血糖持続時間 ( 血糖値 < 8.35 m m o l / l ( 150 m g / d L ) ) をさらに測定し、表 4 および図 12 に示した。本実験では、エキセンジン - 4 を対照群として使用した。

【 0 0 5 6 】

【 表 4 】

時間 (時間)	血糖値(mmol/l)(平均)							
	C40-PEG-Ex4					比較実施例 1b (Lys <sup>27</sup> - PEG <sub>20K</sub> -Ex4)	対照群 (Ex-4)	未処置群
	実施例 1 (PEG <sub>5K</sub> )	実施例 2 (PEG <sub>20K</sub> )	実施例 3 (PEG <sub>20K</sub> )	実施例 4 (PEG <sub>23K</sub> )	実施例 5 (PEG <sub>50K</sub> )			
0	23.38	24.28	24.44	24.22	24.56	24.13	22.61	24.23
0.5	7.62	7.96	7.86	7.97	7.63	7.97	6.95	24.21
1	7.36	6.13	6.89	6.99	6.25	6.56	6.41	23.44
2	5.09	5.29	5.04	4.96	5.45	5.24	5.80	24.58
3	4.46	4.18	4.15	4.11	4.64	4.22	5.85	22.96
4	4.93	4.34	4.66	4.54	4.23	4.29	8.02	24.54
6	5.73	4.9	4.67	4.87	4.26	4.85	10.69	23.43
8	9.04	4.57	5.11	4.66	4.69	5.13	16.01	24.94
12	16.2	5.86	7.89	4.9	4.87	5.40	23.89	22.47
24	21.1	8.54	15.09	5.52	5.11	12.98	-	24.42
36	-	11.47	20.14	8.08	6.31	17.34	-	23.92
48	-	15.34	24.21	8.66	7.26	20.45	-	22.66
60	-	20.45	23.76	11.34	8.87	23.02	-	23.41
72	-	23.02	-	14.12	13.49	-	-	22.26
96	-	-	-	18.79	17.07	-	-	24.51
120	-	-	-	24.53	23.02	-	-	23.75

表 4 に示したように、本発明による実施例 1 ~ 5 の C 4 0 部位特異的 P E G 結合エキセンジン - 4 の血糖値が 8.35 m m o l / l に上昇して戻るのに必要とされる時間は、エキセンジン - 4 ( 7.3 時間 ) より長いことが確認され、特に、三量体 P E G が導入され

た実施例 4 ( C 4 0 - P E G <sub>23</sub> K - E x 4 ) および実施例 5 ( C 4 0 - P E G <sub>50</sub> K - E x 4 ) については、低血糖値は、それぞれ 4 5 . 5 時間および 5 6 . 1 時間持続した ( 図 1 2 を参照 ) 。

【 0 0 5 7 】

したがって、本発明による C 4 0 部位特異的 P E G 結合エキセンジン - 4 組成物は、エキセンジン - 4 の低分子量に起因する薬物の急速排泄という欠点を解決し、したがって、比較実施例より 7 ~ 8 倍安定な血糖値を維持することによって、糖尿病薬として有利に使用することができる。

【 0 0 5 8 】

その一方で、本発明による C 4 0 部位特異的 P E G 結合エキセンジン - 4 類似体は、目的に従って様々な形態に製剤化することができる。以下は、活性成分として本発明による C 4 0 部位特異的 P E G 結合エキセンジン - 4 類似体を含む、いくつかの製剤方法の実例であり、本発明は、これらに限定されない。

【 0 0 5 9 】

( 製剤化実施例 1 )

散剤の生成

C 4 0 部位特異的 P E G 結合エキセンジン - 4 類似体 2 g

ラクトース 1 g。

【 0 0 6 0 】

上記成分を混合し、密封パッケージに詰めて散剤を調製した。

【 0 0 6 1 】

( 製剤化実施例 2 )

錠剤の生成

C 4 0 部位特異的 P E G 結合エキセンジン - 4 類似体 1 0 0 m g

コーンスターチ 1 0 0 m g

ラクトース 1 0 0 m g

ステアリン酸マグネシウム 2 m g。

【 0 0 6 2 】

錠剤についての一般的な調製法に従って上記成分を混合し、圧縮して、錠剤を調製した。

【 0 0 6 3 】

( 製剤化実施例 3 )

カプセル剤の生成

C 4 0 部位特異的 P E G 結合エキセンジン - 4 類似体 1 0 0 m g

コーンスターチ 1 0 0 m g

ラクトース 1 0 0 m g

ステアリン酸マグネシウム 2 m g。

【 0 0 6 4 】

カプセル剤についての一般的な調製法に従って上記成分を混合し、ゼラチンカプセルに詰めて、カプセル剤を調製した。

【 0 0 6 5 】

( 製剤化実施例 4 )

注射剤の生成

C 4 0 部位特異的 P E G 結合エキセンジン - 4 類似体 1 0 0 m g

マンニトール 1 8 0 m g

N a <sub>2</sub> H P O <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O 2 6 m g

蒸留水 2 9 7 4 m g。

【 0 0 6 6 】

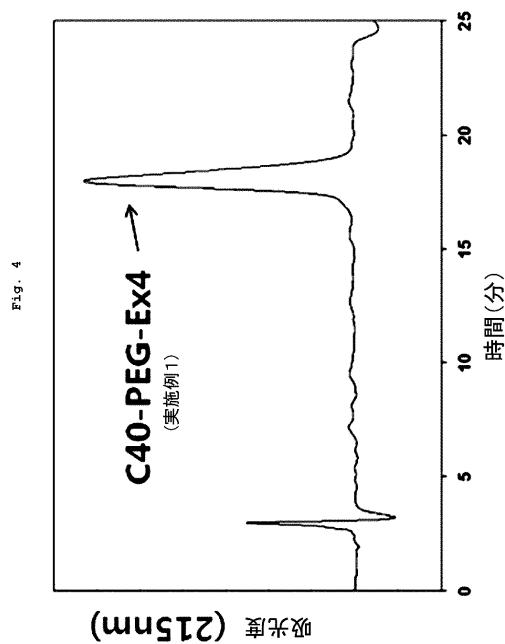
注射剤についての一般的な調製法に従って、上記成分を所与の量を含めて、注射剤を調製した。

## 【 0 0 6 7 】

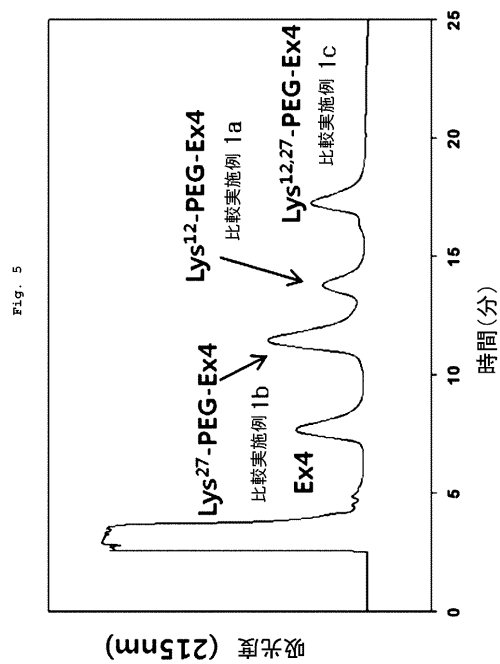
## 産業上の利用可能性

本発明によれば、選択的 P E G 化を実施することによって、システイン ( C y s ) が C 末端の # 4 0 部位に導入され、ポリエチレングリコール ( P E G ) またはその誘導体で P E G 化されたエキセンジン - 4 類似体の収率を上げることができ、薬物の治療効果を増大させることができ、したがって、該エキセンジン - 4 類似体は、インスリン過分泌により引き起こされる疾患を予防または処置するための組成物として有利に使用することができる。

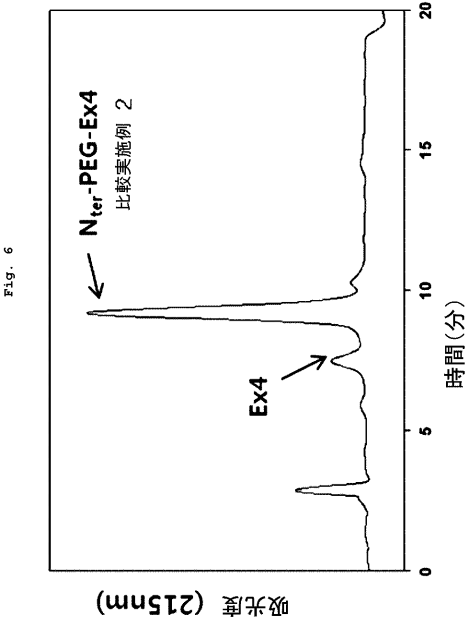
【 図 4 】



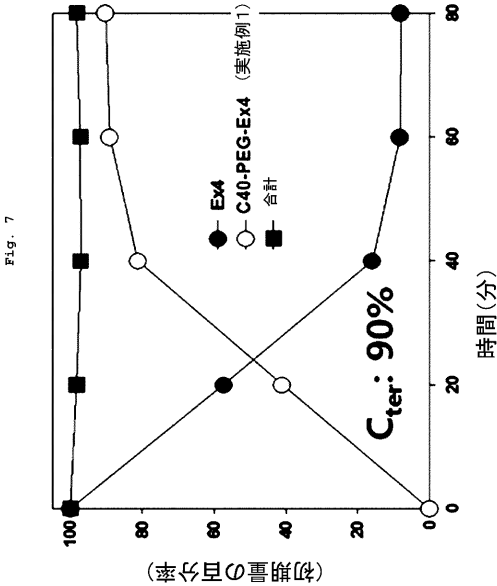
【 図 5 】



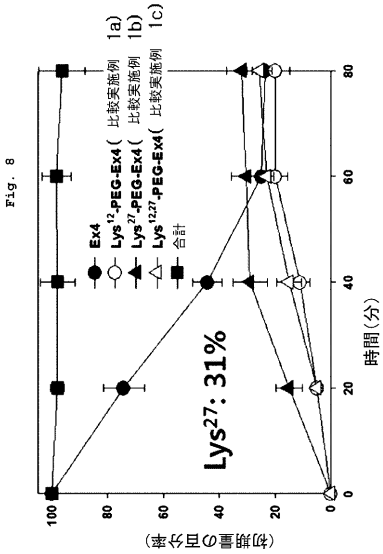
【図 6】



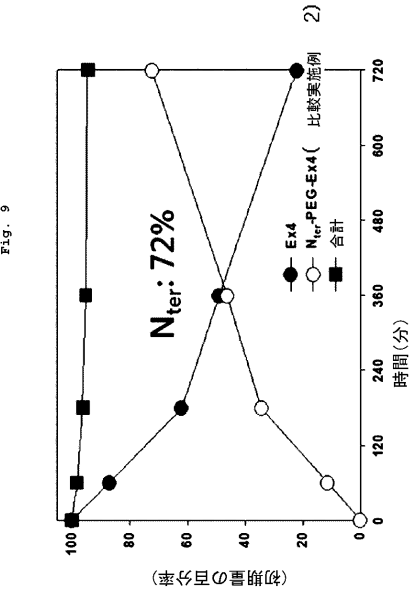
【図 7】



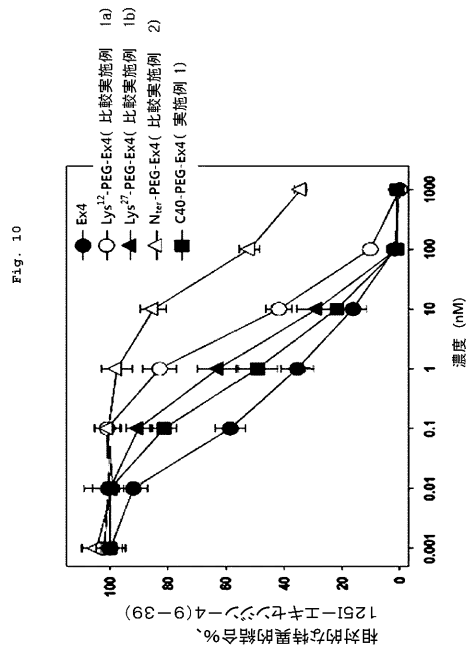
【図 8】



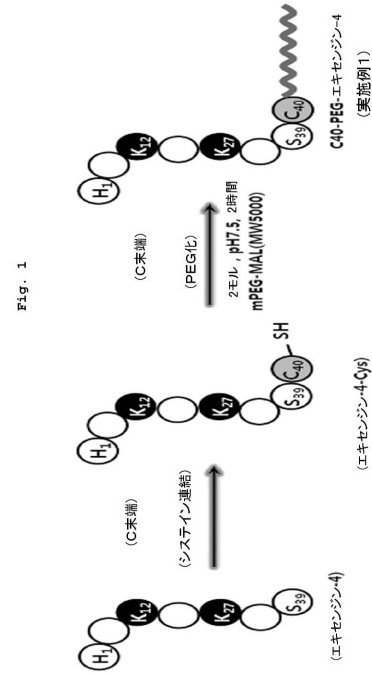
【図 9】



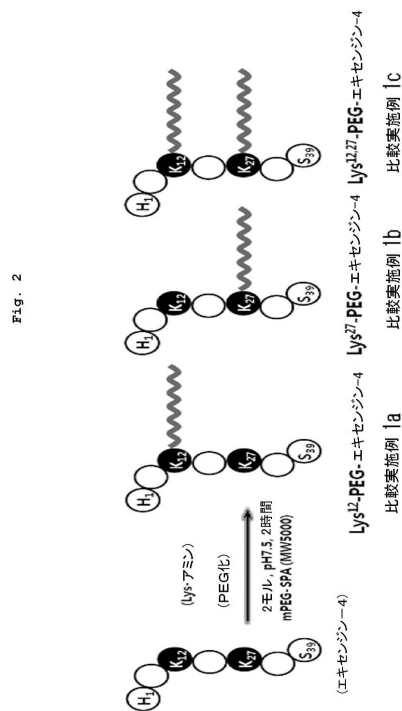
【図 10】



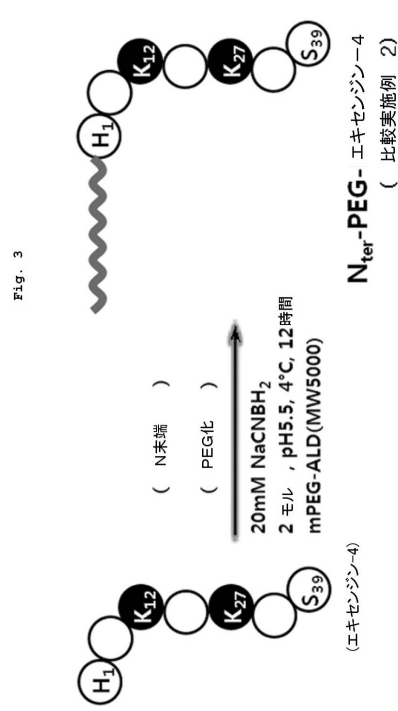
【図 1】



【図 2】



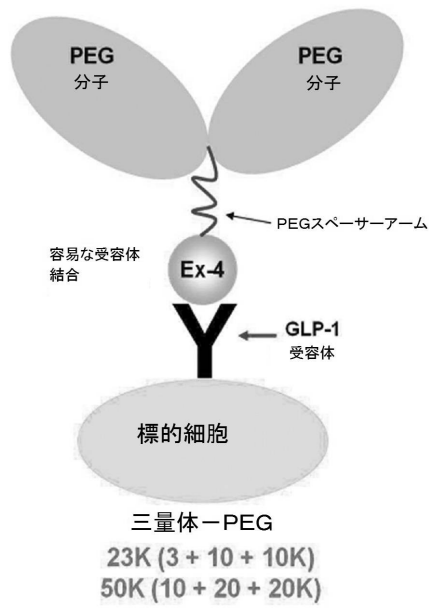
【図 3】





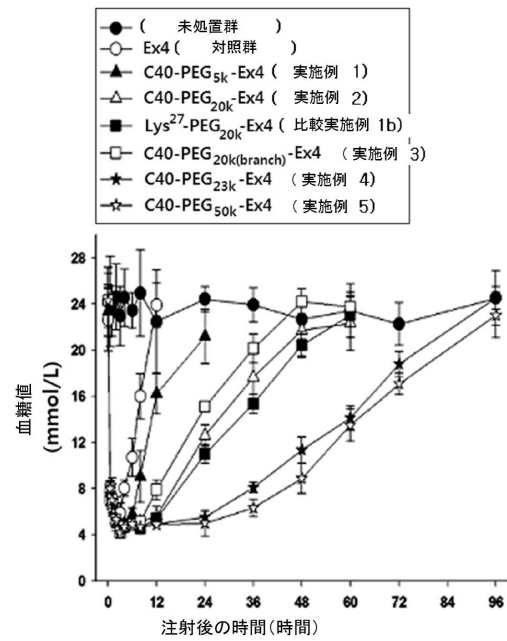
【図 1 1】

Fig. 11



【図 1 2】

Fig. 12



## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
 C 1 2 P 21/02 (2006.01) C 1 2 P 21/02 C

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 イ, ソン グウォン

大韓民国 1 2 1 - 2 5 0 ソウル, マホ - グ, ソンサン - ドン 5 7 2 - 5 6 4

(72)発明者 キム, ウォン ベ

大韓民国 1 3 5 - 2 7 0 ソウル, カンナム - グ, ドゴック - ドン, デリム アクロビル  
 ナンバーエー / 1 8 0 1

(72)発明者 イ, スルギ

大韓民国 1 3 6 - 1 3 0 ソウル, ソンブック - ク, ハウォルゴック - ドン, 1 3 - 7,  
 ナンバー 3 0 1

(72)発明者 キム, テ ヒョン

大韓民国 4 1 1 - 7 3 6 キョンギ - ド, コヤン - シ, イルサンソ - グ, イルサン 3 (サム) - ドン, フゴンマウル 1 5 - ダンジ アpartment 1 0 7 7, ナンバー 1 5 0 2  
 - 1 5 0 3

審査官 伊藤 基章

(56)参考文献 国際公開第 2 0 0 8 / 1 3 0 0 6 6 (WO, A 1)

国際公開第 2 0 1 0 / 1 2 1 5 5 9 (WO, A 1)

KIM, T.H. et al, Bioconjug Chem, 2 0 1 1 年 4 月, Vol.22, No.4, p.625-32

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 3 8 / 0 0

A 6 1 K 4 7 / 0 0

C 0 7 K 1 4 / 0 0

C 1 2 P 2 1 / 0 0

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )