(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2006-517908
(P2006-517908A)
(43)公表日　平成18年8月3日(2006.8.3)

| (51)Int.Cl. | | F I | | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|---|
| C07K 14/435 | (2006.01) | C07K | 14/435 | ZNA | 4C076 |
| C07K 1/04 | (2006.01) | C07K | 1/04 | | 4C084 |
| A61K 38/00 | (2006.01) | A61K | 37/02 | | 4C087 |
| A61K 35/56 | (2006.01) | A61K | 35/56 | | 4H045 |
| A61P 3/10 | (2006.01) | A61P | 3/10 | | |

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 47 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2004-543971 (P2004-543971)
(86)(22)出願日　平成15年10月2日 (2003.10.2)
(85)翻訳文提出日　平成17年5月31日 (2005.5.31)
(86)国際出願番号　PCT/DK2003/000651
(87)国際公開番号　WO2004/035623
(87)国際公開日　平成16年4月29日 (2004.4.29)
(31)優先権主張番号　60/415,626
(32)優先日　平成14年10月2日 (2002.10.2)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　501466189
ジーランド・ファーマ・ア／エス
デンマーク国、デ・コ－２６００・グロストラップ、スメデランド・２６・ベ
(74)代理人　100064908
弁理士　志賀　正武
(74)代理人　100089037
弁理士　渡邊　隆
(74)代理人　100108453
弁理士　村山　靖彦
(74)代理人　100110364
弁理士　実広　信哉
(72)発明者　クルスタイン・エベホフ
デンマーク・デーカー－２８５０・ネルム・スカイテグジェルク・６５
最終頁に続く

(54)【発明の名称】安定化したエキセンディン－４化合物

(57)【要約】
本発明は、安定化したエキセンディン-4(1-39)及び関連した化合物を含む組成物を開示する。本発明は、少なくとも1つの修飾アミノ酸残基、具体的には、エキセンディン-4(1-39)のGln13、Met14、Trp25又はAsn28部位での少なくとも1つの修飾アミノ酸残基を含む安定化したエキセンディン-4アゴニストを記す。エキセンディン-4分子の前記同じ部位に相当する特異的なアミノ酸残基の脱アミノ、加水分解、酸化又は異性体化反応性生物の好ましい修飾を開示する。本発明は、また、安定化したエキセンディン化合物の調製方法及び使用方法（例えば、糖尿病の治療）に関する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
a)エキセンディン-4の部位34-38に対応する部位における0から5アミノ酸の欠失を含み、
b)前記化合物に共有結合した4-20アミノ酸ユニットを含む、少なくとも1つのペプチド配列Zを含み、又は、含まず；及び
少なくとも1つの以下の：
i) 脱アミノ側鎖を有するAsn残基、加水分解側鎖を有するAsn残基、又は、Asp残基の構造異性体である、エキセンディン-4の部位28に相当するAsn又はAsp残基；
ii)エキセンディン-4の部位14に相当する酸化メチオニン残基；
iii)エキセンディン-4の部位25に相当する酸化トリプトファン残基；
iv)エキセンディン-4の部位13に相当する脱アミノ又は加水分解Gln；
を含む、並びに、これらの医薬的に許容可能な塩又は溶媒和物を含む安定化したエキセンディン-4(1-39)を含む組成物。
【請求項２】
前記Asn残基が、α-アスパラギン酸(Asp)又はβ-アスパラギン酸（イソアスパルチル）残基である、請求項１に記載の組成物。
【請求項３】
前記Asn残基が、アスパルチミド又はグルチミドのような環状イミドである、請求項１に記載の組成物。
【請求項４】
前記酸化メチオニン残基が、メチオニンスルホキシド又はメチオニンスルホンである、請求項１に記載の組成物。
【請求項５】
前記酸化トリプトファン残基が、酸化3H-インドール-3-イル基を含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項６】
前記酸化トリプトファン残基が、N-ホルミルキヌレニン(NFK)、3-ヒドロキシキヌレニン(3-OH-KYN)、ヒドロキシトリプトファン(HTRP)又はキヌレニン(KYN)である、請求項１に記載の組成物。
【請求項７】
Zが、少なくとも1つのLysアミノ酸ユニットを含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項８】
Zが、約4から約20の間のLysアミノ酸ユニットを含む、請求項７に記載の組成物。
【請求項９】
Zが、約6のLysアミノ酸ユニットを含む、請求項８に記載の組成物。
【請求項１０】
前記安定化したエキセンディン-4(1-39)化合物及びZが、ペプチド結合によって共有結合している、請求項１に記載の組成物。
【請求項１１】
Zが、前記安定化したエキセンディン-4(1-39)化合物に、C末端カルボニル基で共有結合している、請求項１に記載の組成物。
【請求項１２】
前記安定化したエキセンディン-4(1-39)化合物が、以下の配列：
des $Pro^{36}$[$Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
des $Pro^{36}$[$IsoAsp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
des $Pro^{36}$[環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
des $Pro^{36}$[$Met(O)^{14}$]エキセンディン-4(1-39)、又は
des $Pro^{36}$[$Trp(O_2)^{25}$]エキセンディン-4(1-39)
の1つを含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項１３】

前記化合物のC末端に結合している以下の基：-$Lys_6$-$NH_2$を更に含む、請求項１２に記載の組成物。

【請求項１４】

前記安定化したエキセンディン-4(1-39)化合物が、以下の配列：
des $Pro^{36}$[$Met(O)^{14}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
des $Pro^{36}$[$Met(O)^{14}$, $IsoAsp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
des $Pro^{36}$[$Met(O)^{14}$, 環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、又は
des $Pro^{36}$[$Met(O)^{14}$, $Trp(O_2)^{25}$]エキセンディン-4(1-39)
の1つを含む、請求項１に記載の組成物。

【請求項１５】

前記化合物のC末端に結合している以下の基：-$Lys_6$-$NH_2$を更に含む、請求項１４に記載の組成物。

【請求項１６】

前記安定化したエキセンディン-4(1-39)化合物が、以下の配列：
des $Pro^{36}$[$Trp(O_2)^{25}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
des $Pro^{36}$[$Trp(O_2)^{25}$, $IsoAsp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、又は
des $Pro^{36}$[$Trp(O_2)^{25}$, 環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)
の1つを含む、請求項１に記載の組成物。

【請求項１７】

前記化合物のC末端に結合している以下の基：-$Lys_6$-$NH_2$を更に含む、請求項１６に記載の組成物。

【請求項１８】

前記安定化したエキセンディン-4(1-39)化合物が、以下の配列：
des $Pro^{36}$[$Met(O)^{14}$, $Trp(O_2)^{25}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
des $Pro^{36}$[$Met(O)^{14}$, $Trp(O_2)^{25}$, $IsoAsp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、又は
des $Pro^{36}$[$Met(O)^{14}$, $Trp(O_2)^{25}$, 環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)
の1つを含む、請求項１に記載の組成物。

【請求項１９】

前記化合物のC末端に結合している以下の基：-$Lys_6$-$NH_2$を更に含む、請求項１８に記載の組成物。

【請求項２０】

前記安定化したエキセンディン-4(1-39)化合物が、以下の配列：
H-$(Lys)_6$-des $Pro^{36}$[$Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$Lys_6$-$NH_2$、
des $Asp^{28}$, $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$エキセンディン-4(1-39)-$NH_2$、
H-$(Lys)_6$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$NH_2$、
H-Asn-$(Glu)_5$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$NH_2$、
des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$(Lys)_6$-$NH_2$、
H-$(Lys)_6$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$(Lys)_6$-$NH_2$、
H-Asn-$(Glu)_5$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$(Lys)_6$-$NH_2$、
H-$(Lys)_6$-des $Pro^{36}$[環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$Lys_6$-$NH_2$、
des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$NH_2$、
H-$(Lys)_6$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$NH_2$、
H-Asn-$(Glu)_5$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$NH_2$、
des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$(Lys)_6$-$NH_2$、
H-$(Lys)_6$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$(Lys)_6$-$NH_2$、
H-Asn-$(Glu)_5$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$(Lys)_6$-$NH_2$、

H-$(Lys)_6$-des $Pro^{36}$[$Trp(O_2)^{25}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$Lys_6$-$NH_2$、
H-des $Asp^{28}$, $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Trp(O_2)^{25}$]エキセンディン-4(1-39)-$NH_2$、
H-$(Lys)_6$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Trp(O_2)^{25}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$NH_2$、
H-Asn-$(Glu)_5$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Trp(O_2)^{25}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$NH_2$、
des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Trp(O_2)^{25}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$(Lys)_6$-$NH_2$、
H-$(Lys)_6$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Trp(O_2)^{25}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$(Lys)_6$-$NH_2$、
H-Asn-$(Glu)_5$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Trp(O_2)^{25}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$(Lys)_6$-$NH_2$、

H-$(Lys)_6$-des $Pro^{36}$[$Trp(O_2)^{25}$,環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$Lys_6$-$NH_2$、
des 環状イミド$^{28}$, $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Trp(O_2)^{25}$]エキセンディン-4(1-39)-$NH_2$、
H-$(Lys)_6$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Trp(O_2)^{25}$,環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$NH_2$、
H-Asn-$(Glu)_5$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Trp(O_2)^{25}$,環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$NH_2$、
des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Trp(O_2)^{25}$,環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$(Lys)_6$-$NH_2$、
H-$(Lys)_6$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Trp(O_2)^{25}$,環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$(Lys)_6$-$NH_2$、
H-Asn-$(Glu)_5$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Trp(O_2)^{25}$,環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$(Lys)_6$-$NH_2$、

H-$(Lys)_6$-des $Pro^{36}$[$Met(O)^{14}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$Lys_6$-$NH_2$、
des $Met(O)^{14}$, $Asp^{28}$, $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$エキセンディン-4(1-39)-$NH_2$、
H-$(Lys)_6$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Met(O)^{14}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$NH_2$、
H-Asn-$(Glu)_5$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Met(O)^{14}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$NH_2$、
des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Met(O)^{14}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$(Lys)_6$-$NH_2$、
H-$(Lys)_6$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Met(O)^{14}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$(Lys)_6$-$NH_2$、
H-Asn-$(Glu)_5$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Met(O)^{14}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$(Lys)_6$-$NH_2$、

H-$Lys_6$-des $Pro^{36}$[$Met(O)^{14}$, 環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$Lys_6$-$NH_2$、
des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Met(O)^{14}$, 環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$NH_2$、
H-$(Lys)_6$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Met(O)^{14}$, 環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$NH_2$、
H-Asn-$(Glu)_5$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Met(O)^{14}$, 環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$NH_2$、
des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Met(O)^{14}$, 環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$(Lys)_6$-$NH_2$、
H-$(Lys)_6$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Met(O)^{14}$, 環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$(Lys)_6$-$NH_2$、
H-Asn-$(Glu)_5$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Met(O)^{14}$, 環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$(Lys)_6$-$NH_2$、

H-$Lys_6$-des $Pro^{36}$[$Met(O)^{14}$, $Trp(O_2)^{25}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$Lys_6$-$NH_2$、
H-des $Asp^{28}$, $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Met(O)^{14}$, $Trp(O_2)^{25}$]エキセンディン-4(1-39)-$NH_2$

、
H-$(Lys)_6$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Met(0)^{14}$, $Trp(O_2)^{25}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$NH_2$、
H-Asn-$(Glu)_5$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Met(0)^{14}$, $Trp(O_2)^{25}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$NH_2$、
des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Met(0)^{14}$, $Trp(O_2)^{25}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$(Lys)_6$-$NH_2$、
H-$(Lys)_6$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Met(0)^{14}$, $Trp(O_2)^{25}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$(Lys)_6$-$NH_2$、
H-Asn-$(Glu)_5$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Met(0)^{14}$, $Trp(O_2)^{25}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$(Lys)_6$-$NH_2$、

H-$Lys_6$-des $Pro^{36}$[$Met(0)^{14}$, $Trp(O_2)^{25}$, 環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$Lys_6$-$NH_2$、
des 環状イミド$^{28}$, $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Met(0)^{14}$, $Trp(O_2)^{25}$]エキセンディン-4(1-39)-$NH_2$、
H-$(Lys)_6$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Met(0)^{14}$, $Trp(O_2)^{25}$, 環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$NH_2$、
H-Asn-$(Glu)_5$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Met(0)^{14}$, $Trp(O_2)^{25}$, 環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$NH_2$、
des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Met(0)^{14}$, $Trp(O_2)^{25}$, 環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$(Lys)_6$-$NH_2$、
H-$(Lys)_6$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Met(0)^{14}$, $Trp(O_2)^{25}$, 環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$(Lys)_6$-$NH_2$、
H-Asn-$(Glu)_5$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Met(0)^{14}$, $Trp(O_2)^{25}$, 環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$(Lys)_6$-$NH_2$、
のいずれか1つを含む、又は、これらの医薬的に許容可能な塩又は溶媒和物を含む請求項１に記載の組成物。

【請求項２１】

少なくとも1つの以下の：
i) 脱アミノ側鎖を有するAsn残基、加水分解側鎖を有するAsn残基、又は、Asp残基の構造異性体である、エキセンディン-4の部位28に相当するAsn又はAsp残基；
ii)エキセンディン-4の部位14に相当する酸化メチオニン残基；
iii)エキセンディン-4の部位25に相当する酸化トリプトファン残基；
iv)エキセンディン-4の部位13に相当する脱アミノ又は加水分解Gln；
を含む、並びに、これらの医薬的に許容可能な塩又は溶媒和物を含む安定化したエキセンディン-4(1-39)含む組成物。

【請求項２２】

前記安定化したエキセンディン-4(1-39)化合物が、以下の配列：
[$Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
[IsoAsp$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
[環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
[$Met(0)^{14}$]エキセンディン-4(1-39)、又は
[$Trp(O_2)^{25}$]エキセンディン-4(1-39)
の1つを含む、請求項２１に記載の組成物。

【請求項２３】

前記安定化したエキセンディン-4(1-39)化合物が、以下の配列：
[$Met(0)^{14}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
[$Met(0)^{14}$, IsoAsp$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
[$Met(0)^{14}$, 環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、又は

[Met(O)$^{14}$, Trp($O_2$)$^{25}$]エキセンディン-4(1-39)
の1つを含む、請求項２１に記載の組成物。
【請求項２４】
前記化合物が、以下の配列：
[Trp($O_2$)$^{25}$, Asp$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
[Trp($O_2$)$^{25}$, IsoAsp$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、又は
[Trp($O_2$)$^{25}$, 環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)
の1つを含む、請求項２１に記載の組成物。
【請求項２５】
前記化合物が、以下の配列：
[Met(O)$^{14}$, Trp($O_2$)$^{25}$, Asp$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
[Met(O)$^{14}$, Trp($O_2$)$^{25}$, IsoAsp$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、又は
[Met(O)$^{14}$, Trp($O_2$)$^{25}$, 環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)
の1つを含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項２６】
前記アミノ酸残基が、L-配置、D-配置である、又は、前記組成物がL-及びD-アミノ酸残基の混合物を含む、請求項１又は２１に記載の組成物。
【請求項２７】
請求項１から２６のいずれか一項に記載の安定化したエキセンディン-4(1-39)化合物を少なくとも1つ含む医薬的に許容可能な組成物。
【請求項２８】
前記組成物が、徐放性製剤、ミクロスフィア、リポソームを含む、又は、前記組成物が安定化液体製剤を含む、請求項２７に記載の医薬的に許容可能な組成物。
【請求項２９】
前記組成物が、少なくとも1つの以下の化合物：
des Pro$^{36}$[Asp$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
des Pro$^{36}$[IsoAsp$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
des Pro$^{36}$[環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
des Pro$^{36}$[Met(O)$^{14}$]エキセンディン-4(1-39)、
des Pro$^{36}$[Trp($O_2$)$^{25}$]エキセンディン-4(1-39)、
des Pro$^{36}$[Met(O)$^{14}$, Asp$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
des Pro$^{36}$[Met(O)$^{14}$, IsoAsp$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
des Pro$^{36}$[Met(O)$^{14}$, 環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
des Pro$^{36}$[Met(O)$^{14}$, Trp($O_2$)$^{25}$]エキセンディン-4(1-39)、
des Pro$^{36}$[Trp($O_2$)$^{25}$, Asp$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
des Pro$^{36}$[Trp($O_2$)$^{25}$, IsoAsp$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
des Pro$^{36}$[Trp($O_2$)$^{25}$, 環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
des Pro$^{36}$[Met(O)$^{14}$, Trp($O_2$)$^{25}$]エキセンディン-4(1-39)、
des Pro$^{36}$[Met(O)$^{14}$, Trp($O_2$)$^{25}$, Asp$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
des Pro$^{36}$[Met(O)$^{14}$, Trp($O_2$)$^{25}$, IsoAsp$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、及び
des Pro$^{36}$[Met(O)$^{14}$, Trp($O_2$)$^{25}$, 環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
を含む、請求項２７に記載の医薬的に許容可能な組成物。
【請求項３０】
前記化合物のC末端に結合している以下の基：-Lys$_6$-$NH_2$を更に含む、請求項２９に記載の医薬的に許容可能な組成物。
【請求項３１】
前記組成物が、少なくとも1つの以下の化合物：
[Asp$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
[IsoAsp$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
[環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、

[$Met(O)^{14}$]エキセンディン-4(1-39)、
[$Trp(O_2)^{25}$]エキセンディン-4(1-39)、
[$Met(O)^{14}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
[$Met(O)^{14}$, $IsoAsp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
[$Met(O)^{14}$, 環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
[$Met(O)^{14}$, $Trp(O_2)^{25}$]エキセンディン-4(1-39)、
[$Trp(O_2)^{25}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
[$Trp(O_2)^{25}$, $IsoAsp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
[$Trp(O_2)^{25}$, 環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
[$Met(O)^{14}$, $Trp(O_2)^{25}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
[$Met(O)^{14}$, $Trp(O_2)^{25}$, $IsoAsp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、及び
[$Met(O)^{14}$, $Trp(O_2)^{25}$, 環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
を含む、請求項２７に記載の医薬的に許容可能な組成物。

【請求項３２】

エキセンディン-4(1-39)又はそのバリアント、アナログ又は誘導体を含む医薬的に許容可能な組成物であって、更に、少なくとも1つの以下の安定化したエキセンディン-4化合物：
[$Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
[$IsoAsp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
[環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
[$Met(O)^{14}$]エキセンディン-4(1-39)、
[$Trp(O_2)^{25}$]エキセンディン-4(1-39)、
[$Met(O)^{14}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
[$Met(O)^{14}$, $IsoAsp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
[$Met(O)^{14}$, 環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
[$Met(O)^{14}$, $Trp(O_2)^{25}$]エキセンディン-4(1-39)、
[$Trp(O_2)^{25}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
[$Trp(O_2)^{25}$, $IsoAsp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
[$Trp(O_2)^{25}$, 環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
[$Met(O)^{14}$, $Trp(O_2)^{25}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
[$Met(O)^{14}$, $Trp(O_2)^{25}$, $IsoAsp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、及び
[$Met(O)^{14}$, $Trp(O_2)^{25}$, 環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
を含む組成物。

【請求項３３】

前記エキセンディン-4(1-39)又はそのバリアント、アナログ又は誘導体に対する、前記安定化したエキセンディン-4(1-39)の重量比が約50%(w/w)よりも少ない、請求項３２に記載の医薬的に許容可能な組成物。

【請求項３４】

前記エキセンディン-4(1-39)又はそのバリアント、アナログ又は誘導体に対する、前記安定化したエキセンディン-4(1-39)の重量比が約10%(w/w)よりも少ない、請求項３３に記載の医薬的に許容可能な組成物。

【請求項３５】

前記エキセンディン-4(1-39)又はそのバリアント、アナログ又は誘導体に対する、前記安定化したエキセンディン-4(1-39)の重量比が約1%(w/w)よりも少ない、請求項３４に記載の医薬的に許容可能な組成物。

【請求項３６】

少なくとも1つの以下の工程：
a)エキセンディン-4(1-39)、又は、そのバリアント、アナログ又は誘導体を得る工程；及び
b)前記エキセンディン-4(1-39)、又は、そのバリアント、アナログ又は誘導体を、少なく

とも1つの以下のアミノ酸：
i) 脱アミノ側鎖を有するAsn残基、加水分解側鎖を有するAsn残基、又は、Asp残基の構造異性体である、エキセンディン-4の部位28に相当するAsn又はAsp残基；
ii)エキセンディン-4の部位14に相当する酸化メチオニン残基；
iii)エキセンディン-4の部位25に相当する酸化トリプトファン残基；
iv)エキセンディン-4の部位13に相当する脱アミノ又は加水分解Gln；
を導入するのに十分な条件下で反応させる工程；
を含む、請求項１に記載の組成物の調製方法。
【請求項３７】
アミノ酸(i)-(iv)の少なくとも1つが存在するか、又は、存在しないかを検出する工程を更に含む、請求項３６に記載の方法。
【請求項３８】
前記組成物中のアミノ酸(i)-(iv)の少なくとも1つを同定する工程を更に含む、請求項３７に記載の方法。
【請求項３９】
少なくとも1つの以下の工程：
a)エキセンディン-4(1-39)、又は、そのバリアント、アナログ又は誘導体を得る工程；
b) 前記エキセンディン-4(1-39)、又は、そのバリアント、アナログ又は誘導体を、少なくとも1つの医薬的に許容可能な担体又はベヒクルと接触させて、混合物を得る工程；
c)前記混合物を、少なくとも1つの以下のアミノ酸：
i) 脱アミノ側鎖を有するAsn残基、加水分解側鎖を有するAsn残基、又は、Asp残基の構造異性体である、エキセンディン-4の部位28に相当するAsn又はAsp残基；
ii)エキセンディン-4の部位14に相当する酸化メチオニン残基；
iii)エキセンディン-4の部位25に相当する酸化トリプトファン残基；
iv)エキセンディン-4の部位13に相当する脱アミノ又は加水分解Gln；
を導入するのに十分な条件下で反応させる工程；
を含む、請求項２７に記載の組成物の調製方法。
【請求項４０】
アミノ酸(i)-(iv)の少なくとも1つが存在するか、又は、存在しないかを検出する工程を更に含む、請求項３９に記載の方法。
【請求項４１】
前記組成物中のアミノ酸(i)-(iv)の少なくとも1つを同定する工程を更に含む、請求項４０に記載の方法。
【請求項４２】
前記条件が、少なくとも1つの水、熱、光、金属、金属イオン、水蒸気又は酸素との接触を含む、請求項４０に記載の方法。
【請求項４３】
前記条件が、約室温（25℃）での接触を更に含む、請求項４２に記載の方法。
【請求項４４】
前記条件が、空気との接触を更に含む、請求項４３に記載の方法。
【請求項４５】
意図した使用前、使用中又は使用後において、エキセンディン-4(1-39)、又は、そのバリアント、アナログ又は誘導体を分解から安定化させる方法であって、前記方法が、少なくとも1つの以下の工程：
a)エキセンディン-4(1-39)、又は、そのバリアント、誘導体又はアナログを得る工程；及び
b)前記エキセンディン-4(1-39)、又は、そのバリアント、誘導体又はアナログを、少なくとも1つの以下のアミノ酸残基：
i) 脱アミノ側鎖を有するAsn残基、加水分解側鎖を有するAsn残基、又は、Asn残基の構造異性体である、エキセンディン-4の部位28に相当するAsn残基；

ii)エキセンディン-4の部位14に相当する酸化メチオニン残基；
iii)エキセンディン-4の部位25に相当する酸化トリプトファン残基；
iv)エキセンディン-4の部位13に相当する脱アミノ又は加水分解Gln；
を導入するのに十分な条件下で反応させる工程；
を含む、安定化させる方法。
【請求項４６】
前記条件が、少なくとも1つの水、熱、光、金属、金属イオン、水蒸気又は酸素との接触を含む、請求項４５に記載の方法。
【請求項４７】
前記条件が、約室温（25℃）での接触を含む、請求項４６に記載の方法。
【請求項４８】
前記条件が、空気との接触を更に含む、請求項４６に記載の方法。
【請求項４９】
アミノ酸(i)-(iv)の少なくとも1つが存在するか、又は、存在しないかを検出する工程を更に含む、請求項４５に記載の方法。
【請求項５０】
前記安定化したエキセンディン-4(1-39)、又は、これらのバリアント、アナログ又は誘導体中のアミノ酸(i)-(iii)のうちの少なくとも1つを同定する工程を更に含む、請求項４９に記載の方法。
【請求項５１】
前記安定化したエキセンディン-4(1-39)、又は、これらのバリアント、誘導体又はアナログを、少なくとも1つの医薬的に許容可能な担体又はベヒクルと接触させる工程を更に含む、請求項４５に記載の方法。
【請求項５２】
請求項１から５１のいずれか一項に記載の組成物の少なくとも1つを、治療に有効な量で投与する工程を含む、
1型又は2型糖尿病、インスリン抵抗症候群、耐糖能異常（IGT）、肥満、摂食障害、高血糖、代謝異常及び胃腸疾患の治療方法。
【請求項５３】
請求項１から５１のいずれか一項に記載の組成物の少なくとも1つを、治療に有効な量で投与する工程を含む、上昇した血中グルコースレベルに関連した病状の治療方法。
【請求項５４】
請求項１から５１のいずれか一項に記載の組成物の少なくとも1つを、治療に有効な量で投与する工程を含む、血中グルコースレベルの調節方法。
【請求項５５】
請求項１から５１のいずれか一項に記載の組成物の少なくとも1つを、治療に有効な量で投与する工程を含む、胃内容排出の調節方法。
【請求項５６】
請求項１から５１のいずれか一項に記載の組成物の少なくとも1つを、インシュリン分泌に有効な量で投与する工程を含む、哺乳類におけるインシュリン分泌を刺激する方法。
【請求項５７】
請求項１から５１のいずれか一項に記載の組成物の少なくとも1つを、哺乳類の血中グルコースレベルを下げるのに効果的な量で投与する工程を含む、哺乳類の血中グルコースレベルを下げる方法。
【請求項５８】
請求項１から５１のいずれか一項に記載の組成物の少なくとも1つを、哺乳類の血漿中脂質レベルを下げるのに効果的な量で投与する工程を含む、哺乳類の血漿中脂質レベルを下げる方法。
【請求項５９】
請求項１から５１のいずれか一項に記載の組成物の少なくとも1つを、心筋梗塞後の死

亡及び病的状態を減少させるのに効果的な量で投与する工程を含む、哺乳類の心筋梗塞後の死亡及び病的状態を減少させる方法。
【請求項６０】
請求項１から５１のいずれか一項に記載の組成物の少なくとも1つを、インシュリン分泌に有効な量で投与する工程を含む、哺乳類におけるインシュリン分泌を刺激する方法。
【請求項６１】
請求項１から５１のいずれか一項に記載の組成物の少なくとも1つを、哺乳類の血中グルコースレベルを下げるのに効果的な量で投与する工程を含む、哺乳類の血中グルコースレベルを下げる方法。
【請求項６２】
請求項１から５１のいずれか一項に記載の組成物の少なくとも1つを、哺乳類の血漿中脂質レベルを下げるのに効果的な量で投与する工程を含む、哺乳類の血漿中脂質レベルを下げる方法。
【請求項６３】
前記哺乳類がヒトの患者である、請求項５２から６２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６４】
オートフォーメーション形式又はセミオートフォーメーション形式で本発明の安定化したエキセンディン-4(1-39)を合成する工程を含む、本発明の安定化したエキセンディン-4(1-39)の調製方法。
【請求項６５】
前記合成が、メリフィールド方法を含む、請求項６４に記載の方法。
【請求項６６】
請求項６４又は６５の方法によって調製された安定化したエキセンディン(1-39)。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、安定化したエキセンディン-4(Exendin-4)化合物及び関連する分子に関する。1つの態様においては、本発明は、少なくとも1つの修飾したアミノ酸残基を含む（具体的には、エキセンディン-4（1-39）分子の部位Gln13、Met14、Trp25又はAsn28）安定化したエキセンディン-4アゴニストを提供する。好ましい修飾は、エキセンディン-4（1-39）分子の前記同じ部位に対応する特異的なアミノ酸残基の脱アミノ、加水分解、酸化又は異性化反応生成物である。安定化したエキセンディン化合物の調製方法及び使用方法も提供する。本発明は、使用の広い範囲を有し、従来のエキセンディン-4組成物と比較した場合に、優れた安定性を有するエキセンディン-4を提供する。
【背景技術】
【０００２】
血液中のグルコースレベルを下げる多くのホルモンは、消化管での栄養素の存在及び吸収に応答して、胃腸粘膜から遊離する。これらには、ガストリン、セクレチン、グルコース依存性インシュリン分泌性ポリペプチド（GIP）及びグルカゴン様ペプチド-1（GLP-1）が含まれる。既知の最も有効な物質は、GLP-1である(Orskov, 1992, Diabetologia 35:701-711)。グルカゴン様ペプチド-1（GLP-1）は、180アミノ酸のペプチドであるプログルカゴンからの生成物である（Drucker, 1998, Diabetes 47:159-169）。プログルカゴンの全配列には、グルカゴンの29アミノ酸配列、GLP-1の36又は37アミノ酸配列及びグルカゴン様ペプチド-2（GLP-2）の34アミノ酸配列（腸に存在するペプチド）を含む。GLP-1は、多くの機能を有する。GLP-1は、通常のヒトにおけるインスリン分泌効果を増大する生理学的なホルモンであり、それ故、インクレチンホルモンである。更に、GLP-1は、また、グルカゴン濃度を下げ、食べ物の胃からの流出を遅くし、（プロ）インスリンの生合成を刺

激し、インスリン感受性を増大する(Nauck, 1997, Horm. Metab. Res. 47:1253-1258)。このペプチドは、また、耐糖能異常を有する患者において、β-細胞がグルコースを感知して応答する能力も増大させる(Byrne, 1998, Eur. J. Clin. Invest. 28:72-78)。ヒトにおけるGLP-1のインシュリン分泌効果により、一つにはインスリンレベルが増すために、もう一つにはインシュリン感受性が増すために、グルコース消失速度が増す(D'Alession, 1994, Eur. J. Clin. Invest. 28:72-78)。このことにより、GLP-1を、タイプII型糖尿病の治療のための有用な薬剤としてとらえることができる。GLP-1の活性フラグメントは、GLP-1(7-36)及びGLP-1(7-37)であることがわかっている。しかしながら、天然のGLP-1が有する大きな薬理的な問題は、生物学的半減期が短いことである。ヒト及びラットにおいては、GLP-1は、ジペプチジルペプチダーゼIV（DPP-IV）によって、内在性GLP-1受容体アンタゴニストして機能するGLP-1(9-36)アミドに迅速に分解される。この問題を防ぐ複数の方法が提案されており、いくつかは、DPP-IVの阻害剤を使用するものであり、他のものとしては、GLP-(7-36)のDPP-IV耐性アナログの使用がある。

【０００３】

血中のグルコースレベルを下げる他のペプチドグループであるエキセンディン類は、GLP-1[7-36]$NH_2$と幾らかの配列類似性を有している(Goke et al., 1993, J. Biol. Chem. 268:19650-55)。エキセンディン類は、ドクトカゲすなわちHelodermatidaeの毒液において見出されている。エキセンディン-3は、Heloderma horridum（メキシコドクトカゲ）の毒液に存在し、エキセンディン-4は、Heloderma suspectum（アメリカドクトカゲ）に存在している。エキセンディン-4は、2及び3部位においてのみエキセンディン-3と異なっている。エキセンディン-4前駆体タンパク質（エキセンディン-4のアミノ末端に結合した47アミノ酸ペプチド）をコードするcDNAは、クローン化され、配列が求められている(Pohl et al., 1998, J. Biol. Chem. 273:9778-9784及びWO98/35033)。

【０００４】

エキセンディン-4は、単離したラット膵島腫瘍細胞において、強力なGLP-1受容体アゴニストである(Goke et al., 1993, J. Biol. Chem. 268:19650-55)。エキセンディン-4は、糖尿病db/dbマウスでは、全身で40%まで血中グルコースレベルを下げる(WO99/07404)。最近、Griegらが、エキセンディン-4を、糖尿病db/dbマウスへ一日一回の腹腔内注入することにより、長時間持続する血中グルコースを減少する効果を見出した(1999, Diabetologia 42:45-50)。米国特許第5424286には、N末端配列の大部分が、インシュリン分泌を保持するのに必須であり（エキセンディン-4(1-31)及び$Y^{31}$-エキセンディン4(1-31)）、それに対して、N末端切断エキセンディン（エキセンディン-4(9-39)）は阻害特性を有していることが開示されている。

【０００５】

エキセンディン-3、エキセンディン-4及びエキセンディンアゴニストの用途として、糖尿病の治療、胃運動性を減らすこと、胃が空になるのを遅らせること、及び、高血糖を防ぐこととともに（米国特許第5424286、WO98/05351）、食物の摂取を減らすこと（WO98/30231）が考えられている。天然のエキセンディンを修飾することによって新規の化合物を得る方法が提案されている。1つの方法は、疎水性の置換基を分子に付けることである。これは、例えばWO99/43708に示されており、WO99/43708には、1つの疎水性の置換基をC末端のアミノ酸残基に結合したエキセンディンの誘導体が開示されている。

【０００６】

主要なアプローチとしては、天然のエキセンディン-4配列のアミノ酸置換及び/又はC末端切断によって特徴付けられるエキセンディンアナログを得ることがある。このアプローチは、WO99/07404、WO99/25727及びWO99/25728の化合物によって代表される。

【０００７】

WO99/07404には、一般式I（部位4-5にはGly Thr、部位11-13にはSer Lys Gln、部位15-21にはGlu Glu Glu Ala Val Arg Leu、部位26-30にはLeu Lys Asn Gly Gly、部位32-35にはSer Ser Gly Alaを有し、残りの部位は野生型のエキセンディンアミノ酸残基によって占められるか、又は、特異的なアミノ酸置換によって占められている39アミノ酸残基のペ

プチド配列を定義する）を有するエキセンディンアゴニストが開示されている。式Iは、本出願で示すような（例えば、新規の化合物des $Pro^{36}$-エキセンディン-4(1-39)、エキセンディン-4-$K_6$又はdes $Pro^{36}$-エキセンディン-4(1-39)-$K_6$）、特異的なアミノ酸が欠失している及び/又はコンジュゲートである任意のエキセンディンアゴニスト又はアナログをカバーしていない。

【０００８】

WO99/25727には、一般式I（部位4にはGly及び部位18にはAlaを有し、残りの部位は野生型のエキセンディンアミノ酸残基によって占められるか、又は、特異的なアミノ酸置換によって占められている28から38アミノ酸残基のペプチド配列を定義する）を有するエキセンディンアゴニストが開示されている。式Iは、C末端アミノ酸としてSerを有するペプチド配列、及び、本出願で示すような（例えば、新規の化合物des $Pro^{36}$-エキセンディン-4(1-39)、エキセンディン-4-$K_6$又はdes $Pro^{36}$-エキセンディン-4(1-39)-$K_6$）、特異的なアミノ酸が欠失している及び/又はコンジュゲートである任意のエキセンディンアゴニスト又はアナログを含まない。更に、WO99/25727の式IIは、式Iに類似しているが、部位27又は28のリジンにC(1-10)アルカノイル又はシクロアルキルアルカノイル置換基を有するエキセンディン誘導体を含むペプチド配列を定義する。

【０００９】

不適切な食後の血中グルコースレベルを治療する際には、前記化合物を高い頻度で、例えば、一日に一回、二回又は三回投与する。

【００１０】

WO99/25728には、一般式I（部位18のAlaは固定され、残りの部位は野生型のエキセンディンアミノ酸残基によって占められるか、又は、特異的なアミノ酸置換によって占められている28から39アミノ酸残基のペプチド配列を定義する）を有するエキセンディンアゴニストが開示されている。前記エキセンディンアゴニストは、全て、異なった程度のアミノ酸置換を有する切断されたエキセンディンアナログに対応する。34から38アミノ酸残基のペプチド配列は、C末端Serを有しない。39アミノ酸残基のペプチド配列は、C末端Ser又はTyrのいずれかを有することができるが、更なる残基を有しない。本出願で示す本発明による、特異的なアミノ酸が欠失している及び/又はコンジュゲートであるエキセンディンアゴニスト又はアナログは、式Iに含まれていない。更に、式IIは、式Iに類似しているが、部位27又は28のリジンにC(1-10)アルカノイル又はシクロアルキルアルカノイル置換基を有するエキセンディン誘導体を含むペプチド配列を定義する。

【００１１】

WO99/46283（1999年9月15日発行）には、薬理学的に活性なペプチドX、及び、Xに共有結合した4-20アミノ酸残基の安定ペプチド配列を含むペプチドコンジュゲートが開示されており、前記コンジュゲートは、Xの生物学的半減期に比べて生物学的半減期を増加させる特徴を有する。Xは、エキセンディン-4又はエキセンディン-3であろう。

【００１２】

従来の化合物よりも良好な安定性を付与することができるエキセンディン組成物を得ることが望ましいであろう。更には、分解に対して耐性を示すことができるエキセンディン組成物を得ることが望ましい。このような組成物は、著しく長い保存時間が予期される状況及び/又は望ましくない酸化、加水分解又は脱アミノ反応の危険がある状況において、特に有用である。

【非特許文献１】Orskov, 1992, Diabetologia 35:701-711
【非特許文献２】Drucker, 1998, Diabetes 47:159-169
【非特許文献３】Nauck, 1997, Horm. Metab. Res. 47:1253-1258
【非特許文献４】Byrne, 1998, Eur. J. Clin. Invest. 28:72-78
【非特許文献５】D'Alession, 1994, Eur. J. Clin. Invest. 28:72-78
【非特許文献６】Goke et al., 1993, J. Biol. Chem. 268:19650-55
【非特許文献７】Pohl et al., 1998, J. Biol. Chem. 273:9778-9784
【非特許文献８】Grieg et al., 1999, Diabetologia 42:45-50

【非特許文献９】“Remington’s Pharmaceutical Sciences”, 17. Ed. Alfons R. Gennaro (Ed.), Mark Publishing Company, Easton, PA, U.S.A., 1985
【非特許文献１０】“Drugs and the Pharmaceutical Sciences” series, Marcel Dekker
【非特許文献１１】Merrifield, Bi (1985), Science 232:341
【非特許文献１２】Chen & Drucker in The Journal of Biological Chemistry, Vol. 272, No. 7, pp.4108-15
【非特許文献１３】Alberts, B. et al. in Molecular Biology of the Cell 2nd Ed. Garland Publishing, Inc. (New York) (1989)
【特許文献１】WO98/35033
【特許文献２】WO99/07404
【特許文献３】米国特許第5424286
【特許文献４】WO98/05351
【特許文献５】WO98/30231
【特許文献６】WO99/43708
【特許文献７】WO99/25727
【特許文献８】WO99/25728
【特許文献９】WO01/04156
【特許文献１０】欧州出願99610043.4
【特許文献１１】米国仮出願60/143591
【特許文献１２】WO99/40788
【特許文献１３】WO98/39022
【特許文献１４】WO93/18786
【特許文献１５】WO98/19698
【特許文献１６】WO98/08531
【特許文献１７】WO98/08873
【特許文献１８】米国特許第5407609
【特許文献１９】米国特許第5654008
【特許文献２０】米国特許第6358924
【特許文献２１】米国特許第6344180
【特許文献２２】米国特許第6284725
【特許文献２３】米国特許第6277819
【特許文献２４】米国特許第6271241
【特許文献２５】米国特許第6268343
【特許文献２６】米国特許第6191102
【特許文献２７】米国特許第6051689
【特許文献２８】米国特許第6006753
【特許文献２９】米国特許第5846937
【特許文献３０】米国特許第5670360
【特許文献３１】米国特許第5614492
【特許文献３２】米国特許第5846937
【特許文献３３】米国特許第5545618
【特許文献３４】米国特許第6410508
【特許文献３５】米国特許第6388053
【特許文献３６】米国特許第6348016
【特許文献３７】米国特許第6329336
【特許文献３８】米国特許第6110703
【特許文献３９】米国特許第5846747
【特許文献４０】米国特許第5631224
【特許文献４１】WO99/46283

【発明の開示】
【発明が解決しようとする課題】
【００１３】
本発明は、一般的に、安定化したエキセンディン-4化合物及び関連する化合物に関する。1つの態様においては、本発明は、安定化したエキセンディン化合物、具体的には、エキセンディン-4（1-39）分子の部位Gln13、Met14、Trp25又はAsn28で修飾したアミノ酸残基を少なくとも1つ含むエキセンディン-4アゴニストを提供する。安定化したエキセンディン化合物の調製方法及び使用方法も提供する。本発明は、従来のエキセンディン-4化合物及び関連する化合物と比較した場合に、より良好な安定性及び保存特性を有するエキセンディン-4化合物を提供することを含む、用途の広い範囲を有する。
【００１４】
我々は、特定のエキセンディンアミノ酸を修飾することによって、エキセンディン-4化合物及び関連する化合物を安定化することができることを見出した。本発明による好ましい修飾は、エキセンディン-4（1-39）分子の特異的なアミノ酸残基の脱アミノ、加水分解、酸化又は異性化反応生成物である。このような化合物は、エキセンディン-4(1-39)を薬理学的に許容可能な調製方法に供すること、前記分子を有用な反応条件（例えば、水、酸素、光、熱等との接触）に供すること、又は、その代わりにエキセンディン-4（1-39）分子の部位Gln13、Met14、Trp25又はAsn28の少なくとも1つに対応するアミノ酸の自発的又は半自発的分解をもたらす条件を供給することを含む、1つの標準的な方法で又はそられらの組み合わせで容易に調製することができる。
【００１５】
本発明の好ましい実施態様の実施により、実質的な有用性が供給される。例えば、本発明の使用により、より信頼性のある活性、具体的には保存期間が延びても活性を有する安定なエキセンディン-4化合物を提供することができる。このような安定化したエキセンディン-4分子及び関連する化合物は、臨床試験を含む医学的な使用、及び、より再生可能であり一貫したアゴニスト活性を提供することによる他の使用を補助することができる。本発明のこの特徴は、特に、複数のエキセンディン-4調製物（多ロット）が必要である場合に重要である。すなわち、本発明によるエキセンディン-4化合物及び関連する分子を安定化することにより、ロット間の一貫性を改良することができる。
【００１６】
加えて、本発明の使用により、エキセンディン-4組成物及び関連する分子のより一致した投与が可能になる。すなわち、本発明の安定化した化合物は、より分解しにくい傾向にあり、それゆえ、より信頼性のある治療活性を供給することができる。本発明のこの特徴は、特に、中程度のスケール又は大きなスケールにおける、比較的に一致した活性又は良好な安定性を有するエキセンディン-4及び関連する分子の産生が望まれる場合に重要である。
【００１７】
複数の形態を含む「エキセンディン-4化合物又は関連する分子」という語句については、エキセンディン-4(1-39)、又は本出願で定義するそのバリアント、アナログ又は誘導体を意味する。実例としては、エキセンディン-4(1-39)、及び、エキセンディン-4の部位34、35、36、37又は38に相当する約1から約5アミノ酸の間の欠失を含むその誘導体がある。任意に、このような誘導体は、更に、本出願で定義する、少なくとも1つのペプチドZを含む。このような化合物又は分子は、少なくとも1つのアミノ酸残基（エキセンディン-4（1-39）分子の部位Gln13、Met14、Trp25又はAsn28）の修飾によって、本発明に従い「安定化」されている（例えば、安定化したエキセンディン-4(1-39)化合物）。好ましくは、述べるように、このようなアミノ酸の1つ又は2つが修飾されているが、意図する用途に合わせてより修飾することができる。
【課題を解決するための手段】
【００１８】
従って、1つの実施態様においては、本発明は、安定化したエキセンディン-4(1-39)を

少なくとも1つ、好ましくは、同じ化合物類を1つ、2つ又は3つ、より好ましくは、そのような安定化したエキセンディン-4(1-39)を1つ含む化合物を供給する。1つの実施態様においては、化合物は；
a)エキセンディン-4(1-39)の部位34-38に対応する部位での0から5アミノ酸の欠失
b)任意に、前記化合物に共有結合した4-20アミノ酸ユニットを含む、少なくとも1つのペプチド配列Z；及び
以下の：
i) 脱アミノ側鎖を有するAsn残基、加水分解側鎖を有するAsn残基、又は、Asp残基の構造異性体である、エキセンディン-4の部位28に相当するAsn又はAsp残基；
ii)エキセンディン-4の部位14に相当する酸化メチオニン残基；
iii)エキセンディン-4の部位25に相当する酸化トリプトファン残基；
iv)エキセンディン-4の部位13に相当する脱アミノ又は加水分解Gln；
を少なくとも1つ含み、並びに、それらの医薬的に許容できる塩又は溶媒和物を含む。

【００１９】

化合物の1つの実施態様においては、安定化したエキセンディン-4(1-39)は、少なくとも1つのL-アミノ酸残基又は少なくとも1つのD-アミノ酸残基を含む。その代わりに、前記化合物は、L-及びD-アミノ酸残基の組み合わせを含む。

【００２０】

他の態様においては、本発明は、安定化したエキセンディン-4(1-39)を少なくとも1つ、好ましくは、同じ化合物類を1つ、2つ又は3つ、より好ましくは、そのような安定化したエキセンディン-4(1-39)分子を1つ含む化合物を供給する。1つの実施態様においては、化合物は；
i) 脱アミノ側鎖を有するAsn残基、加水分解側鎖を有するAsn残基、又は、Asp残基の構造異性体である、エキセンディン-4の部位28に相当するAsn又はAsp残基；
ii)エキセンディン-4の部位14に相当する酸化メチオニン残基；
iii)エキセンディン-4の部位25に相当する酸化トリプトファン残基；
iv)エキセンディン-4の部位13に相当する脱アミノ又は加水分解Gln；
を少なくとも1つ含み、並びに、それらの医薬的に許容できる塩又は溶媒和物を含む。

【００２１】

更には、安定化したエキセンディン-4(1-39)分子を少なくとも1つ、好ましくは、2つ、3つ又は4つ、より好ましくは、そのような化合物類を1つ含む医薬的に許容できる組成物を供給する。このような組成物の例は、以下に示す。

【００２２】

他の態様においては、本発明は、本出願で開示する安定化したエキセンディン-4組成物又は関連する分子を調製する方法を供給する。1つの実施態様においては、前記方法は、少なくとも1つの以下の工程：
a)エキセンディン-4(1-39)、又は、そのバリアント、アナログ又は誘導体を得る工程；及び
b)前記エキセンディン-4(1-39)、又は、そのバリアント、アナログ又は誘導体を、少なくとも1つの：
i) 脱アミノ側鎖を有するAsn残基、加水分解側鎖を有するAsn残基、又は、Asp残基の構造異性体である、エキセンディン-4の部位28に相当するAsn又はAsp残基；
ii)エキセンディン-4の部位14に相当する酸化メチオニン残基；
iii)エキセンディン-4の部位25に相当する酸化トリプトファン残基；
iv)エキセンディン-4の部位13に相当する脱アミノ又は加水分解Gln；
を導入するのに十分な条件下で反応させる工程；
を含む。

【００２３】

本発明の安定化したエキセンディン-4分子を合成で又は半合成で調製することが、しばしば好ましいであろう。このような方法の例は以下に示し、メリフィールド（Merrifield

）ペプチド合成方法を含む。
【００２４】
具体的な実施態様においては、前記方法は、更に、少なくとも1つのアミノ酸(i)-(iv)が存在するか又は存在しないかを検出する工程を含む。その代わりに、又は、加えて、前記方法は、組成物中の少なくとも1つのアミノ酸(i)-(iv)を同定する工程を含むことができる。修飾アミノ酸の検出及び同定方法は、以下に示す。
【００２５】
他の実施態様においては、本出願で開示する安定化したエキセンディン-4化合物及び関連する分子を調製する方法を特色とする。このような方法は典型的には、少なくとも1つの以下の工程：
a)エキセンディン-4(1-39)、又は、そのバリアント、アナログ又は誘導体を得る工程；
b)前記エキセンディン-4(1-39)、又は、そのバリアント、アナログ又は誘導体を、少なくとも1つの医薬的に許容できる担体又はベヒクルと接触させて混合物を調製する工程；及び
c)前記混合物を、少なくとも1つの以下のアミノ酸残基：
i) 脱アミノ側鎖を有するAsn残基、加水分解側鎖を有するAsn残基、又は、Asp残基の構造異性体である、エキセンディン-4の部位28に相当するAsn又はAsp残基；
ii)エキセンディン-4の部位14に相当する酸化メチオニン残基；
iii)エキセンディン-4の部位25に相当する酸化トリプトファン残基；
iv)エキセンディン-4の部位13に相当する脱アミノ又は加水分解Gln；
を導入するのに十分な条件下で反応させる工程；
を含む。
【００２６】
このような方法は、更に、少なくとも1つのアミノ酸(i)-(iv)が存在するか又は存在しないかを検出する工程を含む。その代わりに、又は、加えて、前記方法は、組成物中の少なくとも1つのアミノ酸(i)-(iv)を同定する工程を含むことができる。
【００２７】
他の態様においては、本発明は、エキセンディン-4(1-39)、又は、そのバリアント、アナログ又は誘導体を安定化する方法を供給する。1つの実施態様においては、前記方法は、少なくとも1つの以下の工程：
a)エキセンディン-4(1-39)、又は、そのバリアント、アナログ又は誘導体を得る工程；及び
b)前記エキセンディン-4(1-39)、又は、そのバリアント、アナログ又は誘導体を、少なくとも1つの以下のアミノ酸残基：
i) 脱アミノ側鎖を有するAsn残基、加水分解側鎖を有するAsn残基、又は、Asp残基の構造異性体である、エキセンディン-4の部位28に相当するAsn又はAsp残基；
ii)エキセンディン-4の部位14に相当する酸化メチオニン残基；
iii)エキセンディン-4の部位25に相当する酸化トリプトファン残基；
iv)エキセンディン-4の部位13に相当する脱アミノ又は加水分解Gln；
を導入するのに十分な条件下で反応させる工程；
を含む。
【００２８】
他の態様においては、本発明は、1型又は2型糖尿病、インスリン抵抗症候群、耐糖能異常（IGT）、肥満、摂食障害、高血糖、代謝異常及び胃腸疾患の治療方法を供給する。1つの実施態様においては、前記方法は、治療上効果的な量で、本出願で開示する、少なくとも1つの安定化したエキセンディン-4化合物又は関連する分子を投与する工程を含む。
【００２９】
本発明は、また、血中グルコースレベルの上昇に関連した疾患の治療方法も供給する。1つの実施態様においては、前記方法は、治療上効果的な量で、本出願で開示する、少なくとも1つの安定化したエキセンディン-4化合物又は関連する分子を投与する工程を含む

。
【００３０】
血中のグルコースレベルを調節する方法も供給する。1つの実施態様においては、前記方法は、治療上効果的な量で、本出願で開示する、少なくとも1つの安定化したエキセンディン-4化合物又は関連する分子を投与する工程を含む。
【００３１】
本発明は、また、胃内容排出の調節方法も供給する。1つの実施態様においては、前記方法は、治療上効果的な量で、本出願で開示する、少なくとも1つの安定化したエキセンディン-4化合物又は関連する分子を投与する工程を含む。
【００３２】
本発明は、また、哺乳類におけるインスリン分泌の刺激方法も供給する。1つの実施態様においては、前記方法は、インスリン分泌に効果的な量で、本出願で開示する、少なくとも1つの安定化したエキセンディン-4化合物を投与する工程を含む。
【００３３】
代わりに、哺乳類における血中グルコースレベルを下げる方法を供給する。1つの実施態様においては、前記方法は、前記哺乳類における血中グルコースレベルを下げるのに効果的な量で、本出願で開示する、少なくとも1つの安定化したエキセンディン-4化合物又は関連する分子を投与する工程を含む。
【００３４】
本発明は、また、哺乳類における血漿中脂質レベルを下げる方法も供給する。1つの例としては、前記方法は、前記哺乳類における血漿中脂質レベルを下げるのに効果的な量で、本出願で開示する、少なくとも1つの安定化したエキセンディン-4化合物を投与する工程を含む。
【００３５】
哺乳類における、心筋梗塞後の死亡及び病的状態を減少させる方法も提供する。1つの実施態様においては、前記方法は、心筋梗塞後の死亡及び病的状態を減少させるのに効果的な量で、本出願で開示する、少なくとも1つの安定化したエキセンディン-4化合物を投与する工程を含む。
【００３６】
哺乳類におけるインスリン分泌を刺激する方法も供給する。1つの実施態様においては、前記方法は、インスリン分泌に効果的な量で、本出願で供給する、少なくとも1つの安定化したエキセンディン-4化合物を投与する工程を含む。
【００３７】
好ましくは、前記方法それぞれで特徴付けられている哺乳類は、霊長類、好ましくは、治療を必要としているヒト患者である。
【発明を実施するための最良の形態】
【００３８】
記載したように、本発明は、特に、エキセンディン-4（1-39）分子の部位Gln13、Met14、Trp25又はAsn28で修飾した少なくとも1つのアミノ酸残基を含む、安定化したエキセンディン-4アゴニストを提供する。好ましい修飾は、エキセンディン-4(1-39)分子の特異的なアミノ酸残基の脱アミノ、加水分解、酸化又は異性化反応生成物である。安定化したエキセンディン化合物の調製方法及び使用方法も提供する。
【００３９】
好ましい安定化したエキセンディン-4(1-39)化合物及びその医薬的に許容可能な塩は：
a)エキセンディン-4(1-39)の部位34-38に対応する部位での0から5アミノ酸の欠失、
b)任意に、前記バリアントに共有結合した4-20アミノ酸ユニットを含む、少なくとも1つのペプチド配列Z；及び
以下の：
i) 脱アミノ側鎖を有するAsn残基、加水分解側鎖を有するAsn残基、又は、Asp残基の構造異性体である、エキセンディン-4の部位28に相当するAsn又はAsp残基、

ii)エキセンディン-4の部位14に相当する酸化メチオニン残基、
iii)エキセンディンの部位25に相当する酸化トリプトファン残基、
iv)エキセンディン-4の部位13に相当する脱アミノ又は加水分解Gln；
を少なくとも1つ含み、並びに、それらの医薬的に許容できる塩又は溶媒和物を含む。

【００４０】

1つの実施態様においては、前記Asn残基は、α-アスパラギン酸（Asp）又はβ-アスパラギン酸（イソアスパルチル）残基であり、又は、Asn残基は環状イミドである。他の実施態様においては、酸化メチオニン残基は、メチオニンスルホキシド又はメチオニンスルホンである。環状イミドがAsp又はGln残基に由来する実施態様においては、環化生成物は、時には、本出願において、それぞれ、アスパルチミド(aspartimide)又はグルチミド(glutimide)を指す。

【００４１】

その代わりに、又は、加えて、酸化トリプトファン残基は、酸化3H-インドール-3-イル基を含む。他の例には、N-ホルミルキヌレニン(NFK)、3-ヒドロキシキヌレニン(3-OH-KYN)、ヒドロキシトリプトファン(HTRP)又はキヌレニン(KYN)を含む。

【００４２】

安定化したエキセンディン-4化合物又は関連する組成物が、少なくとも1つのZペプチドを、好ましくは1つ又は2つのZペプチドを含む実施態様においては、Zは、少なくとも1つのLysアミノ酸ユニットを、典型的には、約4から約20のLysアミノ酸ユニットを、好ましくは、約6のLysアミノ酸ユニットを含む。

【００４３】

安定化したエキセンディン-4化合物がZペプチドを含む実施態様においては、そのペプチドは、ペプチド結合により、共有結合する。例えば、Zは、C末端のカルボニル基で、安定化したエキセンディン-4(1-39)化合物に共有結合する。

【００４４】

本発明のより具体的な安定化したエキセンディン-4(1-39)化合物は、以下の配列：
des $Pro^{36}$[$Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
des $Pro^{36}$[$IsoAsp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
des $Pro^{36}$[環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
des $Pro^{36}$[$Met(O)^{14}$]エキセンディン-4(1-39)、
des $Pro^{36}$[$Trp(O_2)^{25}$]エキセンディン-4(1-39)、
des $Pro^{36}$[$Met(O)^{14}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
des $Pro^{36}$[$Met(O)^{14}$, $IsoAsp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
des $Pro^{36}$[$Met(O)^{14}$, 環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
des $Pro^{36}$[$Met(O)^{14}$, $Trp(O_2)^{25}$]エキセンディン-4(1-39)、
des $Pro^{36}$[$Met(O)^{14}$, $Trp(O_2)^{25}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
des $Pro^{36}$[$Met(O)^{14}$, $Trp(O_2)^{25}$, $IsoAsp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
des $Pro^{36}$[$Met(O)^{14}$, $Trp(O_2)^{25}$, 環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、又は
これらの医薬的に許容できる塩又は溶媒和物によって代表される。

【００４５】

任意の前記の安定化したエキセンディン-4(1-39)化合物については、化合物は、更に、エキセンディン-4の部位13に相当する脱アミノ又は加水分解Glnを含みうる。

【００４６】

前記化合物の1つの実施態様においては、それぞれの配列を、以下の基：$-Lys_6-NH_2$へと、N末端又はC末端で結合させる。好ましくは、前記基を、前記配列のC末端に結合させる。

【００４７】

加えて、特異的な安定化したエキセンディン-4(1-39)化合物は、以下の配列：
$H-(Lys)_6$-des $Pro^{36}$[$Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$Lys_6-NH_2$、
des $Asp^{28}$, $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$エキセンディン-4(1-39)-$NH_2$、

H-$(Lys)_6$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$NH_2$、
H-Asn-$(Glu)_5$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$NH_2$、
des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$(Lys)_6$-$NH_2$、
H-$(Lys)_6$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$(Lys)_6$-$NH_2$、
H-Asn-$(Glu)_5$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$(Lys)_6$-$NH_2$、

H-$(Lys)_6$-des $Pro^{36}$[環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$Lys_6$-$NH_2$、
des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$NH_2$、
H-$(Lys)_6$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$NH_2$、
H-Asn-$(Glu)_5$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$NH_2$、
des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$(Lys)_6$-$NH_2$、
H-$(Lys)_6$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$(Lys)_6$-$NH_2$
、
H-Asn-$(Glu)_5$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$(Lys)_6$-$NH_2$、

H-$(Lys)_6$-des $Pro^{36}$[$Trp(O_2)^{25}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$Lys_6$-$NH_2$、
H-des $Asp^{28}$, $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Trp(O_2)^{25}$]エキセンディン-4(1-39)-$NH_2$、
H-$(Lys)_6$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Trp(O_2)^{25}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$NH_2$、
H-Asn-$(Glu)_5$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Trp(O_2)^{25}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$NH_2$
、
des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Trp(O_2)^{25}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$(Lys)_6$-$NH_2$、
H-$(Lys)_6$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Trp(O_2)^{25}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$(Lys)_6$-$NH_2$、
H-Asn-$(Glu)_5$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Trp(O_2)^{25}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$(Lys)_6$-$NH_2$、

H-$(Lys)_6$-des $Pro^{36}$[$Trp(O_2)^{25}$,環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$Lys_6$-$NH_2$、
des 環状イミド$^{28}$, $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Trp(O_2)^{25}$]エキセンディン-4(1-39)-$NH_2$、
H-$(Lys)_6$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Trp(O_2)^{25}$,環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$NH_2$、
H-Asn-$(Glu)_5$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Trp(O_2)^{25}$,環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$NH_2$、
des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Trp(O_2)^{25}$,環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$(Lys)_6$-$NH_2$
、
H-$(Lys)_6$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Trp(O_2)^{25}$,環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$(Lys)_6$-$NH_2$、
H-Asn-$(Glu)_5$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Trp(O_2)^{25}$,環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$(Lys)_6$-$NH_2$、

H-$(Lys)_6$-des $Pro^{36}$[$Met(O)^{14}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$Lys_6$-$NH_2$、
des $Met(O)^{14}$, $Asp^{28}$, $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$エキセンディン-4(1-39)-$NH_2$、
H-$(Lys)_6$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Met(O)^{14}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$NH_2$、
H-Asn-$(Glu)_5$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Met(O)^{14}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$NH_2$
、
des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Met(O)^{14}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$(Lys)_6$-$NH_2$、
H-$(Lys)_6$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Met(O)^{14}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$(Lys)_6$-$NH_2$、
H-Asn-$(Glu)_5$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Met(O)^{14}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$(Lys)_6$-$NH_2$、

H-Lys$_6$-des Pro$^{36}$[Met(O)$^{14}$, 環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-Lys$_6$-NH$_2$、
des Pro$^{36}$, Pro$^{37}$, Pro$^{38}$[Met(O)$^{14}$, 環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-NH$_2$、
H-(Lys)$_6$-des Pro$^{36}$, Pro$^{37}$, Pro$^{38}$[Met(O)$^{14}$, 環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-NH$_2$、
H-Asn-(Glu)$_5$-des Pro$^{36}$, Pro$^{37}$, Pro$^{38}$[Met(O)$^{14}$, 環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-NH$_2$、
des Pro$^{36}$, Pro$^{37}$, Pro$^{38}$[Met(O)$^{14}$, 環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-(Lys)$_6$-NH$_2$、
H-(Lys)$_6$-des Pro$^{36}$, Pro$^{37}$, Pro$^{38}$[Met(O)$^{14}$, 環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-(Lys)$_6$-NH$_2$、
H-Asn-(Glu)$_5$-des Pro$^{36}$, Pro$^{37}$, Pro$^{38}$[Met(O)$^{14}$, 環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-(Lys)$_6$-NH$_2$、

H-Lys$_6$-des Pro$^{36}$[Met(O)$^{14}$, Trp(O$_2$)$^{25}$, Asp$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-Lys$_6$-NH$_2$、
H-des Asp$^{28}$, Pro$^{36}$, Pro$^{37}$, Pro$^{38}$[Met(O)$^{14}$, Trp(O$_2$)$^{25}$]エキセンディン-4(1-39)-NH$_2$、
H-(Lys)$_6$-des Pro$^{36}$, Pro$^{37}$, Pro$^{38}$[Met(O)$^{14}$, Trp(O$_2$)$^{25}$, Asp$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-NH$_2$、
H-Asn-(Glu)$_5$-des Pro$^{36}$, Pro$^{37}$, Pro$^{38}$[Met(O)$^{14}$, Trp(O$_2$)$^{25}$, Asp$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-NH$_2$、
des Pro$^{36}$, Pro$^{37}$, Pro$^{38}$[Met(O)$^{14}$, Trp(O$_2$)$^{25}$, Asp$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-(Lys)$_6$-NH$_2$、
H-(Lys)$_6$-des Pro$^{36}$, Pro$^{37}$, Pro$^{38}$[Met(O)$^{14}$, Trp(O$_2$)$^{25}$, Asp$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-(Lys)$_6$-NH$_2$、
H-Asn-(Glu)$_5$-des Pro$^{36}$, Pro$^{37}$, Pro$^{38}$[Met(O)$^{14}$, Trp(O$_2$)$^{25}$, Asp$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-(Lys)$_6$-NH$_2$、

H-Lys$_6$-des Pro$^{36}$[Met(O)$^{14}$, Trp(O$_2$)$^{25}$, 環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-Lys$_6$-NH$_2$、
des 環状イミド$^{28}$, Pro$^{36}$, Pro$^{37}$, Pro$^{38}$[Met(O)$^{14}$, Trp(O$_2$)$^{25}$]エキセンディン-4(1-39)-NH$_2$、
H-(Lys)$_6$-des Pro$^{36}$, Pro$^{37}$, Pro$^{38}$[Met(O)$^{14}$, Trp(O$_2$)$^{25}$, 環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-NH$_2$、
H-Asn-(Glu)$_5$-des Pro$^{36}$, Pro$^{37}$, Pro$^{38}$[Met(O)$^{14}$, Trp(O$_2$)$^{25}$, 環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-NH$_2$、
des Pro$^{36}$, Pro$^{37}$, Pro$^{38}$[Met(O)$^{14}$, Trp(O$_2$)$^{25}$, 環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-(Lys)$_6$-NH$_2$、
H-(Lys)$_6$-des Pro$^{36}$, Pro$^{37}$, Pro$^{38}$[Met(O)$^{14}$, Trp(O$_2$)$^{25}$, 環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-(Lys)$_6$-NH$_2$、
H-Asn-(Glu)$_5$-des Pro$^{36}$, Pro$^{37}$, Pro$^{38}$[Met(O)$^{14}$, Trp(O$_2$)$^{25}$, 環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-(Lys)$_6$-NH$_2$、
又はこれらの医薬的に今日できる塩又は溶媒和物を含む。

【００４８】

任意の前記の安定化したエキセンディン-4(1-39)化合物については、化合物は、更に、エキセンディン-4の部位13に相当する脱アミノ又は加水分解Glnを含みうる。

【００４９】

既に述べたように、本発明は、少なくとも1つの：

i) 脱アミノ側鎖を有するAsn残基、加水分解側鎖を有するAsn残基、又は、Asp残基の構造異性体である、エキセンディン-4の部位28に相当するAsn又はAsp残基；

ii)エキセンディン-4の部位14に相当する酸化メチオニン残基；
iii)エキセンディン-4の部位25に相当する酸化トリプトファン残基；
iv)エキセンディン-4の部位13に相当する脱アミノ又は加水分解Gln；
を含む安定化したエキセンディン-4(1-39)化合物、並びに、その医薬的に許容できる塩又は溶媒和物を特徴とする。

【００５０】

〈塩及び溶媒和物〉

このような化合物の医薬的に許容できる塩又は溶媒和物も想定される。このようなエキセンディン-4(1-39)化合物の例には、以下の配列：
[$Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
[$IsoAsp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
[環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
[$Met(O)^{14}$]エキセンディン-4(1-39)、
[$Trp(O_2)^{25}$]エキセンディン-4(1-39)、
[$Met(O)^{14}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
[$Met(O)^{14}$, $IsoAsp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
[$Met(O)^{14}$, 環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
[$Met(O)^{14}$, $Trp(O_2)^{25}$]エキセンディン-4(1-39)、
[$Trp(O_2)^{25}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
[$Trp(O_2)^{25}$, $IsoAsp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
[$Trp(O_2)^{25}$, 環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
[$Met(O)^{14}$, $Trp(O_2)^{25}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
[$Met(O)^{14}$, $Trp(O_2)^{25}$, $IsoAsp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
[$Met(O)^{14}$, $Trp(O_2)^{25}$, 環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
及び、これらの医薬的に許容可能な塩又は溶媒和物を含む。

【００５１】

任意の前記の安定化したエキセンディン-4(1-39)化合物については、化合物は、更に、エキセンディン-4の部位13に相当する脱アミノ又は加水分解Glnを含みうる。

【００５２】

〈L及びDバリアント〉

本出願で開示する、安定化したエキセンディン-4(1-39)化合物（これらのバリアント、アナログ及び誘導体を含む）は、L-配置又はD-配置の少なくとも1つのアミノ酸（又はD-体及びL-体の両方）を特徴付けることができる。少なくとも1つのアミノ酸残基が脱アミノされている実施態様においては、安定化したエキセンディン-4(1-39)化合物は、L-体の少なくとも1つのアミノ酸残基を、D-体の少なくとも1つのアミノ酸を、又は、これらの組み合わせを有することができる。

【００５３】

加えて、本発明による好ましい安定化したエキセンディン-4(1-39)及び関連する分子は、良好な生物学的活性を特徴とする。より好ましくは、非安定化のエキセンディン-4(1-39)化合物又は関連する分子の生物学的活性の少なくとも70%を、より好ましくは、少なくとも80%、90%又は約100%までのより高い活性を示す化合物である。様々なエキセンディン-4(1-39)化合物及び関連する分子の生物学的活性を評価する方法は、WO01/04156（以下「PCT/DK00/00393」とする）、欧州出願99610043.4及び米国仮出願60/143591に開示されている。これらは、リファレンスとして本出願に取り込まれる。

【００５４】

例えば、エキセンディン-4(1-39)の生物学的活性の可能な試験は、PCT/DK00/00393出願に記載されている、糖尿病ob/obマウスでの血中グルコースアッセイがある。

【００５５】

本出願で開示されている、安定化されたエキセンディン-4(1-39)化合物又は関連する分子を少なくとも1つ含む医薬的に許容できる組成物を提供することも、本発明の対象であ

る。好ましくは、このような組成物は、約5より少ない化合物、例えば2つの同一化合物を含むであろう。

【００５６】

様々な医薬的に許容可能な調剤は、この業界において知られており、PCT/DK00/00393、欧州出願99610043.4及び米国仮出願60/143591に開示されている。

【００５７】

〈製剤〉

例えば、PCT/DK00/00393において提供されているように、本出願によるエキセンディン-4(1-39)化合物又は関連する分子は、1つ以上の生理学的に許容可能な担体と組み合わせることができる。このような組成物は、経口、非経口（皮下(s.c.)、静脈内(i.v.)、筋肉内(i.m.)、硬膜外、脳へ直接、腹腔内(i.p.)を含む）、直腸、気管内、鼻腔内、経皮、経膣、頬側、両眼、又は肺への投与に適した形態、好ましくは、皮下又は経口投与に適した形態とすることができ、このような組成物は、この業界の既知の方法で調製することができる。一般的には、“Remington’s Pharmaceutical Sciences”, 17. Ed. Alfons R. Gennaro (Ed.), Mark Publishing Company, Easton, PA, U.S.A., 1985、及び、より最近の版の記載、並びに、“Drugs and the Pharmaceutical Sciences” series, Marcel Dekkerのモノグラフの記載を参照せよ。前記組成物は、一般的な形態、例えば、カプセル、タブレット、エアロゾル、局所的適用形態、液体又は半液体形態（例えば、溶液、懸濁液、分散液、エマルジョン、ミセル又はリポソーム）とすることができる。好ましくは、s.c.投与に適する液体組成物である。好ましい実施態様においては、本発明の組成物を経皮で投与する。代わりの好ましい実施態様においては、本発明の組成物は、経口で投与され、このような場合において好ましい投与形態はタブレット又はカプセルである。

【００５８】

医薬担体又は希釈剤は、一般的には固体又は液体とすることができる。固体担体の例は、ラクトース、石膏、スクロース、シクロデキストリン、タルク、ゼラチン、寒天、ペクチン、アカシア、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸又はセルロースの低級アルキルエーテルである。液体担体の例は、シロップ、ピーナッツオイル、オリーブオイル、ホスホリピド、ステロール、脂肪酸、脂肪酸アミン、ポリオキシエチレン、等張性バッファー溶液及び水である。同じように、担体又は希釈剤は、この業界で知られている放出を保持する任意の物質（例えば、モノステアリン酸グリセリル又はジステアリン酸グリセリルを単独で、又はワックスとの混合物で）を含むことができる。固体担体を経口投与に用いる場合、調製物は、粉末又はペレットのハードゼラチンカプセル内に入れたタブレットの形態、又は、トローチ又は薬用キャンディーの形態とすることができる。固体担体の量は、広い範囲で変化するが、通常は約25mgから約1gであろう。

【００５９】

一般的なタブレット製造方法によって調製される典型的なタブレットには：

・コア：活性化合物（本発明の遊離型化合物又はこれらの塩）100mg；コロイド状二酸化ケイ素（Aerosil）1.5mg；セルロース、微結晶（Avicel）70mg；修飾セルロースガム（Ac-Di-Sol）7.5mg；ステアリン酸マグネシウム

・コーティング：HPMC 約9mg；*Mywacett 9-40T 約0.9mg；フィルムコーティングのための可塑剤として使用した*アシル化モノグリセリド

を含むことができる。

【００６０】

液体担体を使用する場合、調製物は、シロップ、エマルジョン、ソフトゼラチンカプセル又は滅菌注入液体（例えば、水溶性又は非水溶性液体懸濁液又は溶液）の形態とすることができる。

【００６１】

経鼻投与用には、調製物は、エアロゾル適用のための液体担体（特に水溶性担体）に溶けた又は懸濁した本発明の化合物、好ましくはコンジュゲートを含むことができる。前記担体は、可溶化剤（例えばプロピレングリコール）、界面活性剤（例えば、胆汁酸塩又は

ポリオキシエチレン高級アルコールエーテル）、吸収増幅剤（例えば、レシチン（ホスファチジルコリン）又はシクロデキストリン）又は防腐剤（例えばパラビン）のような添加剤を含むことができる。

【００６２】

本発明の安定化したエキセンディン-4(1-39)化合物又は関連する分子は、局所的な又は全身への注入又は投与に適した形態とすることができ、例えば、滅菌水又は等張性生理食塩水又はグルコース溶液で調剤することができる。前記組成物は、この業界でよく知られている一般的な滅菌方法で滅菌することができる。得られた水溶性の溶液を、使用のためにパッケージし、又は、滅菌条件下で濾過して凍結乾燥することができる（凍結乾燥物は、投与前に滅菌水溶性溶液と組み合わせる）。好ましくは、静脈内、経皮及び経口投与に使用する製剤は、バッファー内の活性化合物の溶液であろう。前記調製物を、使用前直前に、活性薬物質及び滅菌バッファー溶液から調製することができる。滅菌の1つの好ましい方法は、使用直前に調製した溶液の滅菌濾過がある。前記化合物又は関連する分子は、緩衝化剤、等張化剤等（例えば、酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム等）のような、医薬的に許容可能な、生理的条件を求めるのに必要な補助物質を含むことができる。

【００６３】

本発明の安定化したエキセンディン-4(1-39)化合物及び関連する分子は、広い適用範囲での用途を見出す。いくつかは、WO99/40788（エキセンディン及びGLP-1の筋収縮性効果及び利尿効果に関する）；及びWO98/39022（エキセンディン又はGLP-1、又は、エキセンディン又はGLP-1のアゴニストを、中枢又は末端神経系の活性化が増した哺乳類の患者に投与して、患者に鎮静効果又は抗不安効果を与えることを含む、患者を落ち着かせる方法に関する）；及びWO93/18786（強力な相乗効果を生み出す、経口血糖降下薬（例えばスルホニルウレア）での治療を更に含む治療における、GLP-1(7-37)又はGLP-1(7-36)アミドを用いた糖尿病の治療に関する）；及びWO98/19698（肥満の調節のためのGLP-1アナログの使用に関する）；WO98/08531（心筋梗塞後の死亡及び病的状態を減少させる方法における、GLP-1又はアナログの使用）；WO98/08873（手術後の代謝の変化及びストレスに対するホルモン応答を緩和する方法における、GLP-1又はアナログの使用に関する）に記載されている。加えて、本発明の化合物は、他の抗糖尿病薬（例えば、インスリン、メトホルミン、スルホニルウレア及びチアゾリジンジオン）との組み合わせ療法、または、他の抗肥満薬（例えば、レプチン、デキシフェンフゥラミン、アンフェタミン等）との組み合わせ療法に適している。

【００６４】

他の製剤も本発明に範囲である。このような製剤は、制限されるわけではないが、リポソーム、ミクロスフィア及び液体安定化剤と組み合わせた、本出願で開示する安定化したエキセンディン-4(1-39)を少なくとも1つ含む製剤を含む。少なくとも1つの安定化したエキセンディン-4(1-39)化合物を含む徐放性製剤も想定される。更なる情報のために、米国特許第5407609及び5654008を参照せよ。

【００６５】

本発明の安定化したエキセンディン-4(1-39)化合物での使用に適した特定の液体製剤は、約5.3のpHで、約50mMヒスチジン、約100から200mMスクロース、マンニトール又は他の許容可能な糖、20mMメチオニン、20mMアスパラギン-グルタミン又はAspを含む。前記化合物は、約50マイクログラム/mlから約2.5mg/mlまでを含む、ほとんど任意の適した量で溶けることができる。

【００６６】

1つの実施態様においては、本出願で開示されている医薬的に許容可能な組成物は、少なくとも1つの以下の配列：

des Pro$^{36}$[Asp$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、

des Pro$^{36}$[IsoAsp$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、

des Pro$^{36}$[環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、

des $Pro^{36}$[$Met(O)^{14}$]エキセンディン-4(1-39)、
des $Pro^{36}$[$Trp(O_2)^{25}$]エキセンディン-4(1-39)、
des $Pro^{36}$[$Met(O)^{14}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
des $Pro^{36}$[$Met(O)^{14}$, $IsoAsp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
des $Pro^{36}$[$Met(O)^{14}$, 環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
des $Pro^{36}$[$Met(O)^{14}$, $Trp(O_2)^{25}$]エキセンディン-4(1-39)、
des $Pro^{36}$[$Trp(O_2)^{25}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
des $Pro^{36}$[$Trp(O_2)^{25}$, $IsoAsp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
des $Pro^{36}$[$Trp(O_2)^{25}$, 環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
des $Pro^{36}$[$Met(O)^{14}$, $Trp(O_2)^{25}$]エキセンディン-4(1-39)、
des $Pro^{36}$[$Met(O)^{14}$, $Trp(O_2)^{25}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
des $Pro^{36}$[$Met(O)^{14}$, $Trp(O_2)^{25}$, $IsoAsp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
des $Pro^{36}$[$Met(O)^{14}$, $Trp(O_2)^{25}$, 環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、又は
これらの医薬的に許容可能な塩又は溶媒和物を含むことができる。

【００６７】

前記具体的な化合物のそれぞれは、任意に、N-又はC-末端に結合した以下の基、好ましくは、C-末端：$-Lys_6-NH_2$を含むことができる。

【００６８】

加えて、本発明による、具体的な医薬的に許容可能な組成物は、少なくとも1つの以下の化合物：
[$Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
[$IsoAsp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
[環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
[$Met(O)^{14}$]エキセンディン-4(1-39)、
[$Trp(O_2)^{25}$]エキセンディン-4(1-39)、
[$Met(O)^{14}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
[$Met(O)^{14}$, $IsoAsp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
[$Met(O)^{14}$, 環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
[$Met(O)^{14}$, $Trp(O_2)^{25}$]エキセンディン-4(1-39)、
[$Trp(O_2)^{25}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
[$Trp(O_2)^{25}$, $IsoAsp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
[$Trp(O_2)^{25}$, 環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
[$Met(O)^{14}$, $Trp(O_2)^{25}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
[$Met(O)^{14}$, $Trp(O_2)^{25}$, $IsoAsp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
[$Met(O)^{14}$, $Trp(O_2)^{25}$, 環状イミド$^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、又は
これらの医薬的に許容可能な塩又は溶媒和物を含む。

【００６９】

1つの実施態様においては、医薬的に許容可能な組成物は、エキセンディン-4(1-39)又はそのバリアント、アナログ又は誘導体に対する、本出願で開示する任意の安定化したエキセンディン-4(1-39)化合物又は関連する分子の重量比は、約50%(w/w)より少ない、約10%(w/w)より少ない、又は幾つかの例においては約1%(w/w)より少ないことを特徴とする。適切な重量比は、前記組成物の意図する用途、及び、必要な安定性の程度のような他のパラメーターに依存するであろう。

【００７０】

本発明のエキセンディン-4(1-39)組成物は、1つの標準的な方法で又はこれらを組み合わせて容易に調製することができる。1つのこのようなアプローチにおいては、前記方法は、エキセンディン-4(1-39)又はそのバリアント、アナログ又は誘導体を調製/入手する工程、及び、その後の、エキセンディン-4(1-39)又はそのバリアント、アナログ又は誘導体を、少なくとも1つの以下のアミノ酸：
i) 脱アミノ側鎖を有するAsn残基、加水分解側鎖を有するAsn残基、又は、Asp残基の構造

異性体である、エキセンディン-4の部位28に相当するAsn又はAsp残基、
ii)エキセンディン-4の部位14に相当する酸化メチオニン残基、
iii)エキセンディン-4の部位25に相当する酸化トリプトファン残基、
iv)エキセンディン-4の部位13に相当する脱アミノ又は加水分解Gln、
を導入するのに十分な条件下で曝露又は反応させる工程を含む。

【００７１】

その代わりに、本発明の安定化したエキセンディン-4(1-39)化合物を、メリフィールド合成の使用を含む、一般的なペプチド合成方法によって調製することができる。本発明による修飾したアミノ酸残基を、市販業者から購入することができ（例えば、修飾したGln及びAsp）、又は、一般的な方法を用いて容易に調製することができる（例えば、Met及びTrpの酸化）。Merrifield, Bi (1985), Science 232:341を参照せよ。

【００７２】

好ましい前記方法の実施には、更に、少なくとも1つのアミノ酸(i)-(iv)が存在するか又は存在しないかを検出する工程を含む。好ましくは、このような方法は、また、組成物中の少なくとも1つのアミノ酸(i)-(iv)を同定する工程を含む。

【００７３】

本出願で開示する安定化したエキセンディン-4(1-39)組成物及び関連する分子を検出するのに適した方法は、この業界で知られており、これに制限するものではないが、逆相高速液体クロマトグラフィー（RT-HPLC）、及び、液体クロマトグラフィー/マススペクトロメトリー(LC-MS)を含む。

【００７４】

他の態様においては、本発明は、安定化したエキセンディン4組成物又は関連する分子を含む医薬的に許容可能な組成物の調製方法を供給する。1つの実施態様においては、前記方法は、少なくとも1つの以下の工程：
a)エキセンディン-4(1-39)、又は、そのバリアント、アナログ又は誘導体を得る工程、
b)前記エキセンディン-4(1-39)、又は、そのバリアント、アナログ又は誘導体を、少なくとも1つの医薬的に許容可能な担体又はベヒクルと接触させて混合物を調製する工程；及び
c)前記混合物を、少なくとも1つの以下のアミノ酸：
i) 脱アミノ側鎖を有するAsn残基、加水分解側鎖を有するAsn残基、又は、Asp残基の構造異性体である、エキセンディン-4の部位28に相当するAsn又はAsp残基；
ii)エキセンディン-4の部位14に相当する酸化メチオニン残基；
iii)エキセンディン-4の部位25に相当する酸化トリプトファン残基；
iv)エキセンディン-4の部位13に相当する脱アミノ又は加水分解Gln；
を導入するのに十分な条件下で反応させる工程；
を含む。

【００７５】

好ましい前記方法の実施には、更に、少なくとも1つのアミノ酸(i)-(iv)が存在するか又は存在しないかを検出する工程を含む。好ましくは、このような方法は、また、組成物中の少なくとも1つのアミノ酸(i)-(iv)を同定する工程を含む。

【００７６】

安定化したエキセンディン-4(1-39)化合物及び関連する分子を調製するための一般的な条件は、一般的には、前記したように、少なくとも1つの前記アミノ酸修飾(i)-(iii)を導入するのに十分であろう。このような条件は、好ましくは、エキセンディン4分子の部位13のグルタミンも修飾することができる。このような条件の例は、これに制限するものではないが、水、バッファー、熱、水蒸気、酸素、光、金属及び金属イオンへの曝露を含む。このような条件は、約1℃から約80℃、好ましくは5℃から約40℃での接触を含む、様々な温度での接触を含むことができる。室温（25℃）は、一般的に、いくつかの適用において好ましい。空気は、エキセンディン4分子のアミノ酸残基を修飾するのに特に良好であることがわかっている。

【００７７】
しかしながら、論じたように、一般的に、合成方法又は半合成方法によって、安定化したエキセンディン-4(1-39)分子を調製することが、しばしば好ましい。このような方法の好ましい例は、オートフォーメーション化したメリフィールドペプチド合成の使用である。

【００７８】
論じたように、本発明は、更に、意図する使用の前、使用の間、使用後の分解を防ぐために、エキセンディン-4(1-39)又はそのバリアント、アナログ又は誘導体を安定化する方法を供給する。一般的な方法は、少なくとも1つの以下の工程：
a)エキセンディン-4(1-39)、又は、そのバリアント、アナログ又は誘導体を得る工程；及び
b)前記エキセンディン-4(1-39)、又は、そのバリアント、アナログ又は誘導体を、少なくとも1つのアミノ酸残基：
i) 脱アミノ側鎖を有するAsn残基、加水分解側鎖を有するAsn残基、又は、Asp残基の構造異性体である、エキセンディン-4の部位28に相当するAsn又はAsp残基；
ii)エキセンディン-4の部位14に相当する酸化メチオニン残基；
iii)エキセンディン-4の部位25に相当する酸化トリプトファン残基；
iv)エキセンディン-4の部位13に相当する脱アミノ又は加水分解Gln；
を導入するのに十分な条件下で反応させる工程；
を含む。

【００７９】
例えば、前記方法の条件は、少なくとも1つの水、熱、水蒸気、軽金属、金属イオン及び酸素との接触を含む。このような条件は、約1℃から約80℃、好ましくは5℃から約40℃での接触を含む、様々な温度での接触を含むことができる。室温（25℃）は、一般的に、いくつかの適用において好ましい。

【００８０】
好ましくは、前記方法は、安定化したエキセンディン-4(1-39)又はこれらのバリアント、アナログ又は誘導体中の少なくとも1つのアミノ酸(i)-(iv)を同定する工程も含む。任意に、前記方法は、更に、安定化したエキセンディン-4(1-39)又はこれらのバリアント、誘導体又はアナログを、少なくとも1つの医薬的に許容可能な担体又はベヒクルと接触させる工程を含むことができる。

【００８１】
論じたように、多くの適したエキセンディン4及び関連する化合物は、PCT/DK00/00393、欧州出願99610043.4及び米国仮出願60/143591に開示されている。

【００８２】
PCT/DK00/00393出願で開示されているように、エキセンディン4化合物の1つのタイプは：
(a)エキセンディン4と少なくとも90%相同性を有するエキセンディン；
(b)部位34-39で0から5の欠失からなる群から選択される修飾を含み、疎水性置換基を有する部位40のLysを含む前記エキセンディンのバリアント；又は
(c)(i)部位8のアラニンをD-アラニン、グリシン又はアルファ-アミノイソブチル酸で置換、及び、(ii)疎水性置換からなる群から選択される少なくとも1つの修飾を有するGLP-1(7-36)又はGLP-1(7-37)；
からなる群から選択される、ペプチドX：
[Xがエキセンディン4又はエキセンディン3でないことを条件として、Xは、前記バリアントに共有結合した4-20アミノ酸ユニットのペプチド配列であり、ペプチド配列における各アミノ酸ユニットは、Ala、Leu、Ser、Thr、Tyr、Asn、Gln、Asp、Glu、Lys、Arg、His、Met、Orn、及び、一般式I：

$-NH-C(R^1)(R^2)-C(=O)-$ (I)

{式中、$R^1$及び$R^2$は、水素、$C_{1-6}$-アルキル（式中、$C_{1-6}$-アルキルは、任意に、ハロゲン

、水素、アミノ、シアノ、ニトロ、スルホン及びカルボキシから選択される、0から3つの置換基で置換されている）、フェニル及びフェニル-メチル（式中、フェニル及びフェニル-メチルは、任意に、$C_{1-6}$-アルキル、$C_{2-6}$-アルケニル、ハロゲン、水素、アミノ、シアノ、ニトロ、スルホン及びカルボキシから選択される0から3つの置換基で置換されている）からなる群から選択され、又は、$R^1$及び$R^2$は、それらが結合している炭素原子とともに、シクロペンチル、シクロヘキシル又はシクロヘプチル環を形成する（例えば2,4-ジアミノブタン酸及び2,3-ジアミノプロパン酸）}からなる群から選択される]
を含むペプチドコンジュゲートを対象にする。

【００８３】

ペプチドXは、更に、糖尿病の哺乳類のグルコース負荷を向上させるのに効果的である。

【００８４】

更に、PCT/DK00/00393出願は、元のエキセンディンの新規のバリアントを特徴としており、前記エキセンディンは、エキセンディン-4と少なくとも90%の相同性を有するアミノ酸配列を有し、前記バリアントは、哺乳類における血中グルコースレベルを下げ、GLP-1受容体に結合し、(a)部位34-38での0から5の欠失からなる群から選択される少なくとも1つの修飾を有し、(b)リジンのイプシロン-アミノ基に結合した疎水性置換基を有する部位40のLysを含む。

【００８５】

語句「エキセンディンバリアント」は、エキセンディン-4と少なくとも90%の相同性を、より好ましくは、少なくとも95%の相同性を有し、エキセンディン活性（例えば、哺乳類における血中グルコースレベルの低下、及び、GLP-1受容体への結合）を有する、本発明のエキセンディンペプチドのバリアントを意味する。好ましい実施態様においては、本発明のエキセンディンペプチドは、エキセンディン-4(1-39)のアミノ酸配列と、5つのアミノ酸が、好ましくは4つのアミノ酸が、より好ましくは3つのアミノ酸が、更に好ましくは2つのアミノ酸が、より更に好ましくは1つのアミノ酸が異なるアミノ酸配列を有する。更なる情報のためには、PCT/DK00/00393出願を参照せよ。

【００８６】

加えて、適したエキセンディン-4バリアント、アナログ及び誘導体は、以下のリファレンス：米国特許第6358924；6344180；6284725；6277819；6271241；6268343；6191102；6051689；6006753；5846937；5670360；5614492；5846937；5545618；6410508；6388053；6348016；6329336；6110703；5846747；5631224；5424286；WO98/05351；WO98/30231；WO99/07404；WO99/25727；WO99/25728又はWO99/46283に開示されている（それぞれは、独立してリファレンスとして組み込む）。前記化合物のそれぞれは、この発明により安定化することができる（例えば、化合物を本出願で開示する安定化条件に曝露することによって）。その代わりに、このような安定化したエキセンディン-4(1-39)化合物を、メリフィールド合成、及び、購入又は容易に調製できる開始物質を用いて、合成することができる。

【００８７】

本発明の組成物及び化合物が、好ましいアミド($NH_2$)又は遊離酸(OH)の形態、又は、それらの塩の形態ともすることができることは理解されるであろう。

【００８８】

1つ以上の安定化したエキセンディン-4(1-39)化合物及び関連する分子を治療に使用する実施態様においては、このような使用には、典型的に、本出願で開示された1つ以上の医薬的に許容可能な組成物の投与を含む。このような組成物は、適切な量のベヒクル及び/又は安定化剤とともに、少なくとも1つのエキセンディン-4、エキセンディン-3又はこれらの誘導体、アナログ又はバリアントと組み合わせることができる。1つの実施態様においては、このような方法は、組成物（例えば、徐放性製剤、液体製剤、ミクロスフィア又はリポソームを含む、静脈内への）を投与し、約0.1pg/体重kgから1.000mg/体重kgの投与量を与える工程を含む。使用する前記組成物の量は、年齢、病気の重篤度、全体重、性別及び他の要因を含む認識されるパラメーターに依存するであろう。

【００８９】
本出願で使用する「ペプチド」は、アミノ酸のカルボキシル基と他のアミノ酸のアミノ基との間でのアミド形成によって得られる任意の化合物を指す。ペプチド中のアミド結合は、ペプチド結合と呼ぶことができる。単語ペプチドは、通常、アミド結合がアミノ酸のC-1と他のアミノ酸のN-2との間で形成された（時には、真正ペプチド結合(eupeptide bonds)と呼ばれる）化合物に当てはまるが、他のアミド結合（時には、イソペプチド結合と呼ばれる）によって結合した残基を有する化合物も含む。約10-20よりも少ない残基を有するペプチドは、オリゴペプチドと呼ぶことができ、20よりも多い残基を有するペプチドをポリペプチドと呼ぶ。残基が約50より多い特異的な配列のポリペプチドは、通常タンパク質として知られている。本出願で用いられる「天然ポリペプチド配列」とは、天然のL-アミノ酸からなるポリペプチド配列、及び、リコンビナント宿主細胞によって発現することができるポリペプチド配列を指す。本出願のX化合物は、40アミノ酸残基より少ない全てのペプチド配列である。
【００９０】
本出願で用いられる「GLP-1」は、GLP-1(7-37)-OH、GLP-1(7-37)-$NH_2$、GLP-1(7-36)－OH及びGLP-1(7-36)-$NH_2$を含む。
【００９１】
分子類が本出願で示された、並びに、PCT/DK00/00393、欧州出願99610043.4及び米国仮出願60/143591におけるエキセンディン-4のアナログ、誘導体又はバリアントであると認められる場合は、分子類はエキセンディン-4に「関連する」。他のこのような分子類は、例えば、米国特許第6358924；6344180；6284725；6277819；6271241；6268343；6191102；6051689；6006753；5846937；5670360；5614492；5846937；5545618；6410508；6388053；6348016；6329336；6110703；5846747；5631224；5424286；WO98/05351；WO98/30231；WO99/07404；WO99/25727；WO99/25728又はWO99/46283に開示されている。
【００９２】
「アゴニスト」は、受容体と相互作用して、受容体の生理学的な又は薬理学的な応答特性（収縮、弛緩、分泌、酵素活性化等）を開始することができる内因性物質又は薬剤を指す。
【００９３】
「アゴニスト」は、他の生理学的効果を抑制する薬剤又は化合物を指す。受容体レベルでは、他の生物的活性剤によって通常誘導される受容体関連応答を抑制する化学物質である。
【００９４】
「部分アゴニスト」は、用いた薬剤の量にかかわらず、受容体の活性を最大にすることができないアゴニストを指す。「部分アゴニスト」は、投与した組織における「中間的な固有の効能を有するアゴニスト」と呼ぶことができる。更に、部分アゴニストは、同じ受容体に機能する完全なアゴニストの効果を拮抗することができる。
【００９５】
「受容体」は、分子のメッセンジャー（神経伝達物質、ホルモン、リンホカイン、レクチン、薬剤等）として機能する化合物を特異的に認識して結合する、細胞内の又は細胞上の分子又は重合構造を指す。
【００９６】
本発明の「エキセンディンバリアント」については、エキセンディン-4と少なくとも約90%相同性を、最も好ましくはエキセンディン-4(1-39)と少なくとも約95%の相同性を有し、エキセンディン活性（例えば、哺乳類の血中グルコースレベルの低下、及び、GLP-1受容体への結合）を有する、元のエキセンディンペプチドのバリアントであると理解される。本出願で用いられる「エキセンディン-4」は、アミノ酸配列が米国特許第5424286、配列番号で開示ささされているエキセンディン-4(1-39)、及び、C末端アミノ酸残基の部位40にグリシンを有していることのみが異なっている、Chen & Drucker in The Journal of Biological Chemistry, Vol. 272, No. 7, pp.4108-15に開示されているエキセンディン-

4(1-40)を指す。元のエキセンディンの相同性は、2つのタンパク質の間の一致性の程度として求め、第二の配列からの第一の配列の由来を示す。相同性は、GCGプログラムパッケージにより供給されるGAP(Program Manual for the Wisconsin Package, Version 8, August 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711)(Needleman, S.B. and Wunsch, C.D., (1970) J. Mol. Biol. 48:443-453)のような、この業界で知られているコンピュータープログラムによって適切に求めることができる。ポリペプチド配列比較のための以下のセッティングを使用することができる：GAP creation penalty of 3.0 and GAP extension penalty of 0.1。

【００９７】

本発明の「Met(O)」については、メチオニンスルホキシド又はメチオニンスルホンを意味することを意図する。

【００９８】

本発明の「Trp($O_2$)」については、N-フォルミルキヌレニン、二酸化されたトリプトファン残基を意味することを意図する。

【００９９】

「塩」は、酸付加塩及び塩基性塩のような、医薬的に許容可能な塩を含む。酸付加塩の例は、塩酸塩、ナトリウム塩、塩化臭素塩等がある。塩基性塩の例は、カチオンが、ナトリウム及びカリウムのようなアルカリ金属、カルシウムのようなアルカリ土類金属、並びに、アンモニウムイオン$^{+}N(R^3)_3(R^4)$（式中、$R^3$及び$R^4$は、独立して、任意に置換された$C_{1-6}$アルキル、任意に置換された$C_{2-6}$アルケニル、任意に置換されたアリール、又は任意に置換されたヘテロアリールである）から選択される塩である。医薬的に許容可能な塩の他の例は、例えば、「Remington's Pharmaceutical Sciences」17.Ed. Alfonso R. Gennaro (Ed.), Mark Publishing Company, Easton, PA, U.S.A., 1985及びより最近の版、並びに、Encyclopedia of Pharmaceutical Technologyに記載されている塩である。

【０１００】

アミノ酸の一文字表記及び三文字表記は、交換して使用することができる。例えば、Lys及びKはリジンを、Asp及びDはアスパラギン酸を、Glu及びEはグルタミン酸を指す。アミノ酸の完全な記載は、Alberts, B. et al. in Molecular Biology of the Cell 2nd Ed. Garland Publishing, Inc. (New York) (1989)において見出すことができる。

【０１０１】

以下の実施例は例示するものであり、本発明の範囲として制限されるものではない。

【実施例】

【０１０２】

（実施例１：構造異性体化及び/又は酸化によるエキセンディン-4及び関連する分子の安定化）

エキセンディン-4(1-39)又はこれらのバリアント、アナログ又は誘導体、又は、エキセンディン-4(1-39)の水溶性溶液又はこれらのバリアント、アナログ又は誘導体は、エキセンディン-4(1-39)配列の様々な部位での官能基の異性化又は酸化によって安定化することができる。

【０１０３】

エキセンディン-4(1-39)又はそのバリアント、アナログ又は誘導体の、約0℃から約50℃の間で、より具体的には約4℃から室温の間での水溶性溶液における保存により、エキセンディン-4(1-39)ペプチドの28-L-アスパラギン残基での構造転移が誘導される。適した水溶性溶液は特に制限されず、患者への投与を容易にする1つ又は複数の付加的な添加物、又は、エキセンディン-4(1-39)又はそのバリアント、アナログ又は誘導体を安定化又は可溶化する1つ又は複数の付加的な添加物を有する水溶性の医薬組成物を含むことができる。

【０１０４】

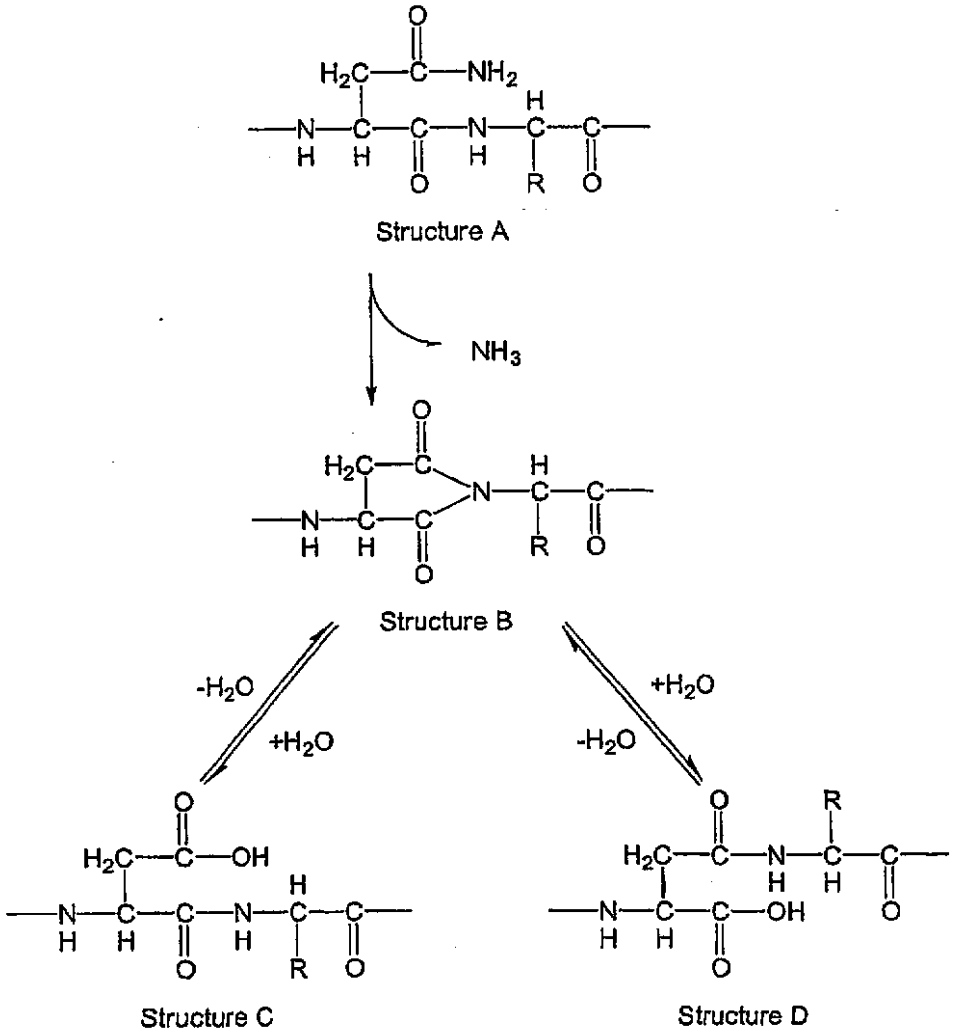
理論によって拘束されるわけではないが、28-L-アスパラギン残基（Structure A）の構造転移を生じることができる1つの合成経路を、合成スキーム1に示す。Structure Bで示

されるように、28-L-アスパラギン残基は、水溶性媒体中脱アミノ化されて環状イミド残基を形成する。環状イミドの可逆的な加水分解によって、L-アスパラギン酸残基（Structure C）又はL-イソアスパラギン酸残基(Structure D)の両方の形成が導かれる。それぞれの加水分解反応は可逆的であり、1つ又は複数の安定化した28-環状イミド残基、28-L-アスパラギン酸残基又は28-L-イソアスパラギン酸残基を有するエキセンディン化合物が、水溶性溶液に存在することができる。

【０１０５】

【化１】

合成スキーム１




【０１０６】

酸化生成物は、酸素分子のようなオキシダントの存在下で、エキセンディン-4(1-39)又はエキセンディン-4(1-39)化合物の水溶性溶液を反応させることによって形成させる。

【０１０７】

加工又は保存中に酸素分子に曝された本発明の典型的な医薬的組成物は、14-メチオニン又は25-トリプトファン残基の酸化を受けやすくなる。

【０１０８】

14-メチオニン残基の1つの非制限的な酸化経路は、酸素分子の存在下での酸化によって生じる。14-メチオニンスルホキシドは、当量の酸素分子の半分と、水溶性溶液中のエキセンディン-4(1-39)との反応によって生じる。14-メチオニンスルホキシドを有する安定化エキセンディン化合物の更なる曝露によって、14-メチオニン残基が当量の酸素分子によって酸化された14-メチオニンスルホンが形成される。

【０１０９】

エキセンディン-4(1-39)の25-トリプトファン残基又はエキセンディン-4(1-39)バリアント、アナログ又は誘導体は、0.5、1、1.5、2又はそれより多い当量の酸素分子によって酸化されることができる。一般的な酸化されたトリプトファン生成物は、ヒドロキシトリプトファン、N-ホルミルキヌレニン、キヌレニン及び3-ヒドロキシキヌレニンを含む。通常の保存下又は約0℃から約25℃の反応条件下で、当量の酸素分子によって、エキセンディン-4(1-39)又はエキセンディン-4(1-39)バリアントの25-トリプトファンが酸化され、25-N-ホルミルキヌレニン残基を有するエキセンディン-4(1-39)が形成される。

【０１１０】

（実施例２：化合物５、６及び１４（化合物１の安定化した誘導体）の合成）

化合物１（des $Pro^{36}$エキセンディン4(1-39)-$K_6$）は図１に示す構造を有し、メリフィールド方法によって調製された。より多くの情報のためには、例えば、PCT/DK00/00393出願を参照せよ。

【０１１１】

約458mgの化合物１を、100mM $NH_4HCO_3$ pH7.9に、10mg/mlの濃度で溶かした。溶液を40℃で6日間反応させ、約20%の化合物５、10%の化合物１４及び50%の化合物６を生成した。

【０１１２】

安定化した生成化合物５及び化合物６は、分取用RP-HPLC（それぞれ、イソクラティック法又はグラジエン法）によって精製することができる。アミノ酸配列及びLC-MS（$ESI^+$/TOF）と組み合わせた、相対的リテンションタイムによって同定される。

【０１１３】

（実施例３：化合物７（化合物１の安定化した誘導体）の合成）

約424mgの化合物１を、100mM $NH_4HCO_3$ pH7.9に、10mg/mlの濃度で溶かした。溶液を40℃で5日間反応させ、約20%の化合物５、60%の化合物６を生成した。化合物６を分取用RP-HPLCによって精製した。約100mgの化合物６が得られ、凍結乾燥した。約100mgの化合物６を100mM $NaH_2PO_4$バッファーで再懸濁し、NaOHでpH5.3に調整して、濃度を5mg/mlとした。溶液を40℃で5日間反応させ、約40%の化合物７を生成した。

【０１１４】

安定化した生成化合物７は、分取用RP-HPLCでグラジエント法によって精製することができる。LC-MS（$ESI^+$/TOF）と組み合わせた、相対的リテンションタイムによって同定される。

【０１１５】

（実施例４：化合物３及び４（化合物１の安定化した誘導体）の合成）

化合物１は記載したように調製される。化合物１(10mg)を3%(w/v)のD-マンニトールを含む50mMクエン酸バッファー中に、100μg/mlの濃度で溶かした。溶液を25℃で少なくとも6日間反応させ、平均波長350nmの光に曝した。

【０１１６】

安定化した生成化合物３及び４は、分取用RP-HPLCでグラジエント法によって精製することができる。蛍光検出を加えたMS/MS及びトリプシン分解物のLC-MS（$ESI^+$/TOF）によるペプチドマッピングと組み合わせた、相対的リテンションタイムによって同定される。

【０１１７】

（実施例５：化合物２（化合物１の安定化した誘導体）の合成）

化合物１は記載したように調製される。化合物１(100mg)を10mlの純粋な水に、10mg/mlの濃度で溶かし、2.3mlの3.5%$H_2O_2$を加えることによって$H_2O_2$に曝した。溶液を25℃で1日間反応させ、約100%の化合物２を生成した。

【０１１８】

安定化した生成化合物２は、分取用RP-HPLCによって精製することができる。蛍光検出を加えたMS/MS及びトリプシン分解物のLC-MS（$ESI^+$/TOF）によるペプチドマッピングと組み合わせた、相対的リテンションタイムによって同定される。

【０１１９】

（実施例６：ペプチド合成）
[化合物８のペプチド合成、H-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Glu-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-$NH_2$]
TentaGel S-RAM上の[$Glu^{13}$]エキセンディン-4-$NH_2$)
乾燥したTentaGel S-RAM樹脂(0.23mmol/g, 1.0g)を、濾過用のポリプロピレンフィルターを備えたポリエチレン容器に入れ、2時間DMF(5ml)中で膨潤させた。Fmoc基を、前記方法により取り除き、「Batchwise peptide sysnthesis on TentaGel S-RAM resins」 [Due Larsen, B. and Holm, A. (1998) J. Pept. Res. 52, 470]の記載により、前記のペプチドを構築した。合成終了後、ペプチド樹脂をDMF(3×5ml, それぞれ1分間)、DCM(3×5ml, それぞれ1分間)、ジエチルエーテル(3×5ml, それぞれ1分間)で洗い、真空下で乾燥させた。室温で2時間、95%トリフルオロ酢酸及び5%エタンジチオールv/vで処理することによって、ペプチドを樹脂から切断した。濾過した樹脂を95%TFA-水で洗浄し、濾液及び洗液を、水を加えて希釈した。得られた混合物をエーテルで3回抽出し、最後に凍結乾燥した。クルードなペプチドを分取用HPLCで精製した。精製した生成物は均一であることがわかり、純度が95%より高いことがわかった。ペプチドが一致しているかどうかは、ES-MSによって確認した(Mwは4185.17であり、計算では4185.01であった)。
【０１２０】
[化合物９のペプチド合成、H-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Glu-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asp-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-$NH_2$]
TentaGel S-RAM上の[$Glu^{13}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4-$NH_2$)
乾燥したTentaGel S-RAM樹脂(0.23mmol/g, 1.0g)を、濾過用のポリプロピレンフィルターを備えたポリエチレン容器に入れ、2時間DMF(5ml)中で膨潤させた。Fmoc基を、前記方法により取り除き、「Batchwise peptide sysnthesis on TentaGel S-RAM resins」[Due Larsen, B. and Holm, A. (1998) J. Pept. Res. 52, 470]の記載により、前記のペプチドを構築した。合成終了後、ペプチド樹脂をDMF(3×5ml, それぞれ1分間)、DCM(3×5ml, それぞれ1分間)、ジエチルエーテル(3×5ml, それぞれ1分間)で洗い、真空下で乾燥させた。室温で2時間、95%トリフルオロ酢酸及び5%エタンジチオールv/vで処理することによって、ペプチドを樹脂から切断した。濾過した樹脂を95%TFA-水で洗浄し、濾液及び洗液を、水を加えて希釈した。得られた混合物をエーテルで3回抽出し、最後に凍結乾燥した。クルードなペプチドを分取用HPLCで精製した。精製した生成物は均一であることがわかり、純度が95%より高いことがわかった。ペプチドが一致しているかどうかは、ES-MSによって確認した(Mwは4186.25であり、計算では4186.15であった)。
【０１２１】
[化合物１０のペプチド合成、H-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asp-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-$NH_2$]
TentaGel S-RAM上の[$Asp^{28}$]エキセンディン-4-$NH_2$)
乾燥したTentaGel S-RAM樹脂(0.23mmol/g, 1.0g)を、濾過用のポリプロピレンフィルターを備えたポリエチレン容器に入れ、2時間DMF(5ml)中で膨潤させた。Fmoc基を、前記方法により取り除き、「Batchwise peptide sysnthesis on TentaGel S-RAM resins」[Due Larsen, B. and Holm, A. (1998) J. Pept. Res. 52, 470]の記載により、前記のペプチドを構築した。合成終了後、ペプチド樹脂をDMF(3×5ml, それぞれ1分間)、DCM(3×5ml, それぞれ1分間)、ジエチルエーテル(3×5ml, それぞれ1分間)で洗い、真空下で乾燥させた。室温で2時間、95%トリフルオロ酢酸及び5%エタンジチオールv/vで処理することによって、ペプチドを樹脂から切断した。濾過した樹脂を95%TFA-水で洗浄し、濾液及び洗液を、水を加えて希釈した。得られた混合物をエーテルで3回抽出し、最後に凍結乾燥した。クルードなペプチドを分取用HPLCで精製した。精製した生成物は均一であることがわかり、純度が95%より高いことがわかった。ペプチドが一致しているかどうかは、ES-MS

によって確認した(Mwは4185.38であり、計算では4185.01であった)。

【０１２２】

[化合物１１のペプチド合成、H-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Glu-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-$NH_2$]

TentaGel S-RAM上のdes $Pro^{36}$-[$Glu^{13}$]エキセンディン-4-$(Lys)_6$-$NH_2$)

乾燥したTentaGel S-RAM樹脂(0.23mmol/g, 1.0g)を、濾過用のポリプロピレンフィルターを備えたポリエチレン容器に入れ、2時間DMF(5ml)中で膨潤させた。Fmoc基を、前記方法により取り除き、「Batchwise peptide sysnthesis on TentaGel S-RAM resins」[Due Larsen, B. and Holm, A. (1998) J. Pept. Res. 52, 470]の記載により、前記のペプチドを構築した。合成終了後、ペプチド樹脂をDMF(3×5ml, それぞれ1分間)、DCM(3×5ml, それぞれ1分間)、ジエチルエーテル(3×5ml, それぞれ1分間)で洗い、真空下で乾燥させた。室温で2時間、95%トリフルオロ酢酸及び5%エタンジチオールv/vで処理することによって、ペプチドを樹脂から切断した。濾過した樹脂を95%TFA-水で洗浄し、濾液及び洗液を、水を加えて希釈した。得られた混合物をエーテルで3回抽出し、最後に凍結乾燥した。クルードなペプチドを分取用HPLCで精製した。精製した生成物は均一であることがわかり、純度が95%より高いことがわかった。ペプチドが一致しているかどうかは、ES-MSによって確認した(Mwは4855.72であり、計算では4855.52であった)。

【０１２３】

[化合物１２のペプチド合成、H-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met(O)-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-$NH_2$]

TentaGel S-RAM上のdes $Pro^{36}$-[$Met(O)^{14}$]エキセンディン-4-$(Lys)_6$-$NH_2$)

乾燥したTentaGel S-RAM樹脂(0.23mmol/g, 1.0g)を、濾過用のポリプロピレンフィルターを備えたポリエチレン容器に入れ、2時間DMF(5ml)中で膨潤させた。Fmoc基を、前記方法により取り除き、「Batchwise peptide sysnthesis on TentaGel S-RAM resins」[Due Larsen, B. and Holm, A. (1998) J. Pept. Res. 52, 470]の記載により、前記のペプチドを構築した。メチオニンスルホキシドは、記載されているカップリング方法[Due Larsen, B. and Holm, A. (1998) J. Pept. Res. 52, 470]に従って、Fmoc-Met(O)-OH(Bachemから購入した)として導入した。合成終了後、ペプチド樹脂をDMF(3×5ml, それぞれ1分間)、DCM(3×5ml, それぞれ1分間)、ジエチルエーテル(3×5ml, それぞれ1分間)で洗い、真空下で乾燥させた。室温で2時間、95%トリフルオロ酢酸及び5%エタンジチオールv/vで処理することによって、ペプチドを樹脂から切断した。濾過した樹脂を95%TFA-水で洗浄し、濾液及び洗液を、水を加えて希釈した。得られた混合物をエーテルで3回抽出し、最後に凍結乾燥した。クルードなペプチドを分取用HPLCで精製した。精製した生成物は均一であることがわかり、純度が95%より高いことがわかった。ペプチドが一致しているかどうかは、ES-MSによって確認した(Mwは4870.88であり、計算では4870.53であった)。

【０１２４】

[化合物１３のペプチド合成、H-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-$Met(O_2)$-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-$NH_2$]

TentaGel S-RAM上のdes $Pro^{36}$-[$Met(O_2)^{14}$]エキセンディン-4-$(Lys)_6$-$NH_2$)

乾燥したTentaGel S-RAM樹脂(0.23mmol/g, 1.0g)を、濾過用のポリプロピレンフィルターを備えたポリエチレン容器に入れ、2時間DMF(5ml)中で膨潤させた。Fmoc基を、前記方法により取り除き、「Batchwise peptide sysnthesis on TentaGel S-RAM resins」[Due Larsen, B. and Holm, A. (1998) J. Pept. Res. 52, 470]の記載により、前記のペプチドを構築した。メチオニンスルホキシドは、記載されているカップリング方法[Due Larsen, B. and Holm, A. (1998) J. Pept. Res. 52, 470]に従って、Fmoc-Met(O)-OH(Bachemから購入した)として導入した。合成終了後、ペプチド樹脂をDMF(3×5ml, それぞれ1分間)、DCM(3×5ml, それぞれ1分間)、ジエチルエーテル(3×5ml, それぞれ1分間)で洗い、真

空下で乾燥させた。室温で2時間、95%トリフルオロ酢酸及び5%エタンジチオールv/vで処理することによって、ペプチドを樹脂から切断した。濾過した樹脂を95%TFA-水で洗浄し、濾液及び洗液を、水を加えて希釈した。得られた混合物をエーテルで3回抽出し、最後に凍結乾燥した。クルードなペプチドを分取用HPLCで精製した。精製した生成物は均一であることがわかり、純度が95%より高いことがわかった。ペプチドが一致しているかどうかは、ES-MSによって確認した(Mwは4886.68であり、計算では4886.53であった)。

【０１２５】

（経口グルコース負荷試験（OGTT））

本発明の抗糖尿病効果を、経口グルコース負荷試験（OGTT）によってテストした。簡潔に述べると、動物に餌を一晩与えず、血液サンプルを尻尾の先から取り、血中グルコースを測定した。全血中グルコース濃度(mM)を、製品の取扱説明書に従って、一滴の血液を用いる固定化グルコースオキシダーゼ方法によって分析した（<5μl；Autoanalyser, Bayer, Denmark）。動物は、テストの間にわたり、餌を与えなかった。最初の血液サンプル（空腹時血中グルコースレベル）を採取した後すぐに、テスト化合物又はベヒクルをi.p.で投与した。15分後、リン酸バッファー(pH=7.40)に溶かしたグルコース((1g/kg) Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.)を経口投与で与え、動物をホームケージに戻した(時間=0)。血中グルコース（BG）レベルを、化合物１、８、９、１０および１１では、時間=30分、時間=60分および時間=120分で測定し、更には、化合物１、２、５、６、７及び１４では時間=240分で測定した。テスト化合物の経口グルコース負荷効果を分析するために、ベースライン（空腹時BG）からのBGの絶対誤差を、それぞれの時間において計算した。台形法を用いて、曲線下面積(AUC)（全実験（$AUC_{0-120分}$）又は（$AUC_{0-240分}$））を求めた(図１から８)。一連の実験を開始する前に、全てのグループにおいて、類似のグルコース負荷を示す9-10の動物からなるグループへと階層化するために、OGTTを行った。グルコース負荷(BG>33 mmol/l)後に極度のグルコース偏位を示した動物を研究から除外した。

【０１２６】

（グルコース負荷試験の結果）

グルコース負荷試験の結果を図１から４に示す。計算した$ED_{50}$値を表１に示す。

【０１２７】

【表１】

| テスト溶液中の主な化合物 | $ED_{50}$ (nmol/kg) | $SD_r$ |
|---|---|---|
| 化合物１ | 0.049 | 3.8 |
| 化合物１４ | 0.55 | 1.3 |
| 化合物６ | 0.013 | 19 |
| 化合物７ | 0.21 | 2.1 |

表１：カーブフィットに基づく$ED_{50}$及び標準偏差($SD_r$)を示す。

【０１２８】

化合物１での処理後に得られたデータを曲線にフィットさせた結果を図１に示す。計算した$ED_{50}$及び$SD_r$を表１に示す。

【０１２９】

化合物１４での処理後に得られたデータを曲線にフィットさせた結果を図２に示す。計算した$ED_{50}$及び$SD_r$を表１に示す。

【０１３０】

化合物６での処理後に得られたデータを曲線にフィットさせた結果を図３に示す。計算した$ED_{50}$及び$SD_r$を表１に示す。

【０１３１】

化合物７での処理後に得られたデータを曲線にフィットさせた結果を図４に示す。計算した$ED_{50}$及び$SD_r$を表１に示す。

【０１３２】
他の実験のセットにおいては、化合物１、化合物２及び化合物５を前記の方法で試験した。結果を図５、６及び７に示す。$ED_{50}$値を表２にまとめる。
【０１３３】
【表２】

| テスト溶液中の主な化合物 | $ED_{50}$ (nmol/kg) | $SD_r$ |
|---|---|---|
| 化合物１ | 0.073 | 4.1 |
| 化合物５ | 0.043 | 4.1 |
| 化合物２ | 0.011 | 36 |

表２：カーブフィットに基づく$ED_{50}$、標準偏差($SD_r$)を上に示す。

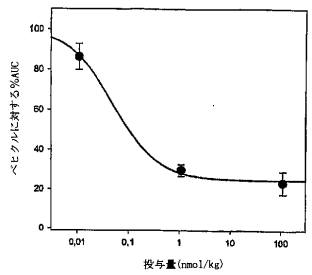
【０１３４】
化合物１での処理後に得られたデータを曲線にフィットさせた結果を図５に示す。計算した$ED_{50}$及び$SD_r$を表２に示す。
【０１３５】
化合物５での処理後に得られたデータを曲線にフィットさせた結果を図６に示す。計算した$ED_{50}$及び$SD_r$を表２に示す。
【０１３６】
化合物２での処理後に得られたデータを曲線にフィットさせた結果を図７に示す。計算した$ED_{50}$及び$SD_r$を表２に示す。
【０１３７】
結論として、全ての前記化合物について、$AUC_{0-120分}$又は$AUC_{0-240分}$における減少が示すように、db/dbマウスにおいてグルコース負荷が顕著に増すことによって、抗糖尿病効果が示された。テストした全ての溶液が、約0.01nmol/kgの投与において、グルコース負荷に対する陽性効果を有していた。それゆえ、テスト化合物の投与により、グルコース負荷後の容量依存的な血中グルコースの減少がもたらされた。
【０１３８】
本出願で記載した及び請求項に記載した発明は、本出願で開示した具体的な実施態様によって範囲が制限されない。なぜならば、これらの実施態様は、本発明の複数の態様の例を意図したものだからである。任意の同等の実施態様は、本発明の範囲に含まることを意図する。実際に、本出願で示された及び記載された事項に加えて、本発明の様々な修飾は、前記記載から、この業界の当業者には明らかであろう。このような修飾は、また、現在の請求項の範囲に含まれることを意図する。様々なリファレンスが本出願で引用されているが、それらの開示は、完全にリファレンスによって挿入される。
【図面の簡単な説明】
【０１３９】
【図１】図１は、マウスにおけるグルコース負荷に対する化合物１の効果を示す。
【図２】図２は、マウスにおけるグルコース負荷に対する化合物１４の効果を示す。
【図３】図３は、マウスにおけるグルコース負荷に対する化合物６の効果を示す。
【図４】図４は、マウスにおけるグルコース負荷に対する化合物７の効果を示す。
【図５】図５は、マウスにおけるグルコース負荷に対する化合物１の効果を示す。
【図６】図６は、マウスにおけるグルコース負荷に対する化合物５の効果を示す。
【図７】図７は、マウスにおけるグルコース負荷に対する化合物２の効果を示す。
【図８】図８は、マウスにおける血中グルコースレベルに対する、化合物１、８、９、１０及び１１の影響を示す。
【図９－１】図９－１は、化合物１(des $Pro^{36}$-エキセンディン-4(1-39)-$K_6$)及び化合物１の安定化した化合物、すなわち、化合物２、３、４、５、６及び７だけでなく、エキセンディン-4(1-39)の安定化化合物、すなわち化合物８の配列を示す。

【図９－２】図９－２は、化合物１の安定化した化合物、すなわち、化合物１１、１２、１３及び１４だけでなく、エキセンディン-4(1-39)の安定化化合物、すなわち化合物９及び１０の配列を示す。

【図１】

Figure 1

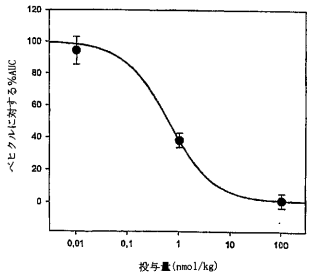
db/db マウスのグルコース負荷に対する化合物１の効果




【図２】

Figure 2

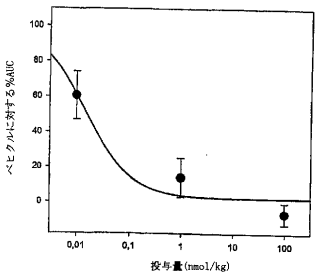
db/db マウスのグルコース負荷に対する化合物１４の効果




【図３】

Figure 3

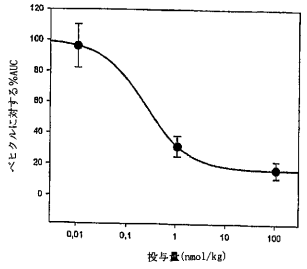
db/db マウスのグルコース負荷に対する化合物６の効果




【図４】

Figure 4

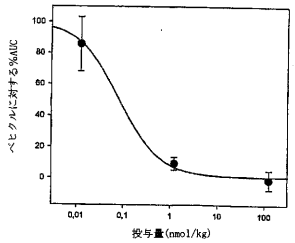
db/db マウスのグルコース負荷に対する化合物７の効果



【図５】

Figure 5

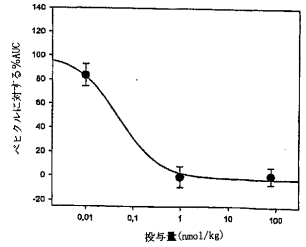
db/db マウスのグルコース負荷に対する化合物１の効果




【図６】

Figure 6

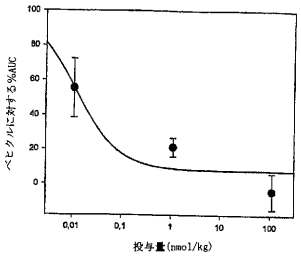
db/db マウスのグルコース負荷に対する化合物５の効果




【図７】

Figure 7

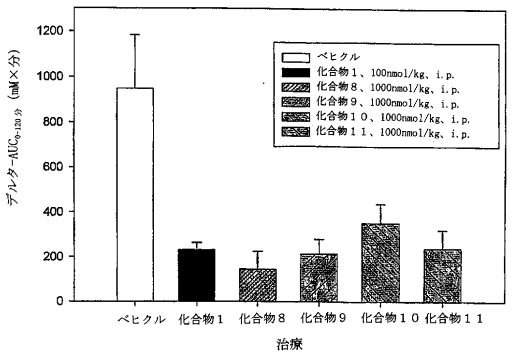
db/db マウスのグルコース負荷に対する化合物２の効果




【図８】

Figure 8

db/db マウスの経口グルコース負荷に対する化合物１－５の効果




【図９－１】

**Figure 9**

化合物１

H-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-$NH_2$

化合物２

H-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met(O)-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-αAsp-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-$NH_2$

化合物３

H-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met(O)-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp($O_2$)-Leu-Lys-IsoAsp-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-$NH_2$

化合物４

H-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp($O_2$)-Leu-Lys-Cyclic-Imide-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-$NH_2$

化合物５

H-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asp-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-$NH_2$

化合物６

H-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-IsoAsp-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-$NH_2$

化合物７

H-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Cyclic-Imide-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-$NH_2$

化合物８

H-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Glu-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-$NH_2$

【図９－２】

化合物９

H-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Glu-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asp-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-$NH_2$

化合物１０

H-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asp-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-$NH_2$

化合物１１

H-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Glu-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-$NH_2$

化合物１２

H-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met(O)-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-$NH_2$

化合物１３

H-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met($O_2$)-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-$NH_2$

化合物１４

H-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-D-IsoAsp-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-$NH_2$

【手続補正書】
【提出日】平成17年6月2日(2005.6.2)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
(a)エキセンディン-4の部位34-38に対応する部位における0から5アミノ酸の欠失を含み、
(b)エキセンディン-4の部位28のAsn残基に対応する部位におけるアルファ-アスパラギン酸(Asp)又はベータ-アスパラギン酸（イソアスパルチル）残基を含み、
(c) i)エキセンディン-4の部位14に相当する部位における酸化メチオニン残基；及び/又は
ii)エキセンディン-4の部位25に相当する部位における酸化トリプトファン残基；及び/又は
iii)エキセンディン-4の部位13に相当する部位における脱アミノ又は加水分解Gln；
を含み、又は、含まず、
(d)前記安定化したエキセンディンに共有結合した4-20アミノ酸残基の、少なくとも1つのペプチド配列Zを含む、又は、含まない、
安定化したエキセンディン-4(1-39)、又は、これらの医薬的に許容可能な塩又は溶媒和物を含む組成物。
【請求項２】
(a)前記酸化メチオニン残基がメチオニンスルホキシド又はメチオニンスルホンである；及び/又は、
(b)前記酸化トリプトファン残基が酸化した3H-インドール-3-イル基である；及び/又は、
(c)前記酸化トリプトファン残基が、N-ホルミルキヌレニン(NFK)、3-ヒドロキシキヌレニン(3-OH-KYN)、ヒドロキシトリプトファン(HTRP)又はキヌレニン(KYN)である、
請求項１に記載の組成物。
【請求項３】
Zが、約4から約20の間のLysアミノ酸ユニットを含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項４】
Zが、6のLysアミノ酸ユニットを含む、請求項３に記載の組成物。
【請求項５】
前記安定化したエキセンディン-4(1-39)化合物及びZが、ペプチド結合によって結合している、請求項１に記載の組成物。
【請求項６】
Zが、前記安定化したエキセンディン-4(1-39)化合物に、C末端カルボニル基で共有結合している、請求項１に記載の組成物。
【請求項７】
前記安定化したエキセンディン-4(1-39)化合物が、以下の配列：
des $Pro^{36}$[$Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
des $Pro^{36}$[$IsoAsp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
des $Pro^{36}$[$Met(O)^{14}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
des $Pro^{36}$[$Met(O)^{14}$, $IsoAsp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
des $Pro^{36}$[$Trp(O_2)^{25}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
des $Pro^{36}$[$Trp(O_2)^{25}$, $IsoAsp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
des $Pro^{36}$[$Met(O)^{14}$, $Trp(O_2)^{25}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、又は
des $Pro^{36}$[$Met(O)^{14}$, $Trp(O_2)^{25}$, $IsoAsp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
の1つを含む、請求項１に記載の組成物。

【請求項８】
前記化合物のC末端に結合している以下の基：-$Lys_6$-$NH_2$を更に含む、請求項７に記載の組成物。
【請求項９】
前記安定化したエキセンディン-4(1-39)化合物が、以下の配列：
H-$(Lys)_6$-des $Pro^{36}$[$Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$Lys_6$-$NH_2$、
des $Asp^{28}$, $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$エキセンディン-4(1-39)-$NH_2$、
H-$(Lys)_6$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$NH_2$、
H-Asn-$(Glu)_5$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$NH_2$、
des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$(Lys)_6$-$NH_2$、
H-$(Lys)_6$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$(Lys)_6$-$NH_2$、
H-Asn-$(Glu)_5$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$(Lys)_6$-$NH_2$、

H-$(Lys)_6$-des $Pro^{36}$[$Trp(O_2)^{25}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$Lys_6$-$NH_2$、
H-des $Asp^{28}$, $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Trp(O_2)^{25}$]エキセンディン-4(1-39)-$NH_2$、
H-$(Lys)_6$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Trp(O_2)^{25}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$NH_2$、
H-Asn-$(Glu)_5$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Trp(O_2)^{25}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$NH_2$、
des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Trp(O_2)^{25}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$(Lys)_6$-$NH_2$、
H-$(Lys)_6$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Trp(O_2)^{25}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$(Lys)_6$-$NH_2$、
H-Asn-$(Glu)_5$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Trp(O_2)^{25}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$(Lys)_6$-$NH_2$、

H-$(Lys)_6$-des $Pro^{36}$[$Met(O)^{14}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$Lys_6$-$NH_2$、
des $Met(O)^{14}$, $Asp^{28}$, $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$エキセンディン-4(1-39)-$NH_2$、
H-$(Lys)_6$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Met(O)^{14}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$NH_2$、
H-Asn-$(Glu)_5$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Met(O)^{14}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$NH_2$、
des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Met(O)^{14}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$(Lys)_6$-$NH_2$、
H-$(Lys)_6$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Met(O)^{14}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$(Lys)_6$-$NH_2$、
H-Asn-$(Glu)_5$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Met(O)^{14}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$(Lys)_6$-$NH_2$、

H-$Lys_6$-des $Pro^{36}$[$Met(O)^{14}$, $Trp(O_2)^{25}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$Lys_6$-$NH_2$、
H-des $Asp^{28}$, $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Met(O)^{14}$, $Trp(O_2)^{25}$]エキセンディン-4(1-39)-$NH_2$、
H-$(Lys)_6$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Met(O)^{14}$, $Trp(O_2)^{25}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$NH_2$、
H-Asn-$(Glu)_5$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Met(O)^{14}$, $Trp(O_2)^{25}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$NH_2$、
des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Met(O)^{14}$, $Trp(O_2)^{25}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$(Lys)_6$-$NH_2$、
H-$(Lys)_6$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Met(O)^{14}$, $Trp(O_2)^{25}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$(Lys)_6$-$NH_2$、
H-Asn-$(Glu)_5$-des $Pro^{36}$, $Pro^{37}$, $Pro^{38}$[$Met(O)^{14}$, $Trp(O_2)^{25}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)-$(Lys)_6$-$NH_2$、
のいずれか1つを含む、又は、これらの医薬的に許容可能な塩又は溶媒和物を含む請求項１に記載の組成物。

【請求項１０】
前記アミノ酸残基が、L-配置、D-配置である、又は、前記組成物がL-及びD-アミノ酸残基の混合物を含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項１１】
医薬的に許容可能な担体を更に含む、請求項１から１０のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１２】
前記組成物が、徐放性製剤、ミクロスフィア、リポソームを含む、又は、前記組成物が安定化液体製剤を含む、請求項１１に記載の組成物。
【請求項１３】
前記組成物が、少なくとも1つの以下の化合物：
des $Pro^{36}$[$Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
des $Pro^{36}$[$IsoAsp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
des $Pro^{36}$[$Met(O)^{14}$]エキセンディン-4(1-39)、
des $Pro^{36}$[$Trp(O_2)^{25}$]エキセンディン-4(1-39)、
des $Pro^{36}$[$Met(O)^{14}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
des $Pro^{36}$[$Met(O)^{14}$, $IsoAsp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
des $Pro^{36}$[$Met(O)^{14}$, $Trp(O_2)^{25}$]エキセンディン-4(1-39)、
des $Pro^{36}$[$Trp(O_2)^{25}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
des $Pro^{36}$[$Trp(O_2)^{25}$, $IsoAsp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
des $Pro^{36}$[$Met(O)^{14}$, $Trp(O_2)^{25}$]エキセンディン-4(1-39)、
des $Pro^{36}$[$Met(O)^{14}$, $Trp(O_2)^{25}$, $Asp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、及び
des $Pro^{36}$[$Met(O)^{14}$, $Trp(O_2)^{25}$, $IsoAsp^{28}$]エキセンディン-4(1-39)、
を含む、請求項１１に記載の医薬的に許容可能な組成物。
【請求項１４】
前記化合物のC末端に結合している以下の基：-$Lys_6$-$NH_2$を更に含む、請求項１３に記載の組成物。
【請求項１５】
少なくとも1つの以下の工程：
a)エキセンディン-4(1-39)、又は、そのバリアント、アナログ又は誘導体を得る工程；及び
b)前記エキセンディン-4(1-39)、又は、そのバリアント、アナログ又は誘導体を、少なくとも1つの：
i) 脱アミノ側鎖を有するAsn残基、加水分解側鎖を有するAsn残基、又は、Asp残基の構造異性体である、エキセンディン-4の部位28に相当するAsn又はAsp残基の導入；及び
ii)エキセンディン-4の部位14に相当する酸化メチオニン残基の導入又は非導入；及び/又は
iii)エキセンディン-4の部位25に相当する酸化トリプトファン残基の導入又は非導入；及び/又は
iv)エキセンディン-4の部位13に相当する脱アミノ又は加水分解Glnの導入又は非導入；
に十分な条件下で反応させる工程；
を含む、請求項１から１４のいずれか一項に記載の組成物の調製方法。
【請求項１６】
アミノ酸(i)-(iv)の少なくとも1つが存在するか、又は、存在しないかを検出する工程を更に含む、請求項１５に記載の方法。
【請求項１７】
前記組成物中のアミノ酸(i)-(iv)の少なくとも1つを同定する工程を更に含む、請求項１６に記載の方法。
【請求項１８】
前記条件が、少なくとも1つの水、熱、光、金属、金属イオン、水蒸気又は酸素との接

触を含む、請求項１５に記載の方法。
【請求項１９】
前記条件が、約室温（25℃）での接触を更に含む、請求項１８に記載の方法。
【請求項２０】
前記条件が、空気との接触を更に含む、請求項１９に記載の方法。
【請求項２１】
請求項１から１４のいずれか一項に記載の組成物の少なくとも1つを、治療に有効な量で投与する工程を含む、
1型又は2型糖尿病、インスリン抵抗症候群、耐糖能異常（IGT）、肥満、摂食障害、高血糖、代謝異常及び胃腸疾患の治療方法。
【請求項２２】
請求項１から１４のいずれか一項に記載の組成物の少なくとも1つを、治療に有効な量で投与する工程を含む、上昇した血中グルコースレベルに関連した病状の治療方法。
【請求項２３】
請求項１から１４のいずれか一項に記載の組成物の少なくとも1つを、治療に有効な量で投与する工程を含む、血中グルコースレベルの調節方法。
【請求項２４】
請求項１から１４のいずれか一項に記載の組成物の少なくとも1つを、治療に有効な量で投与する工程を含む、胃内容排出の調節方法。
【請求項２５】
請求項１から１４のいずれか一項に記載の組成物の少なくとも1つを、インシュリン分泌に有効な量で投与する工程を含む、哺乳類におけるインシュリン分泌を刺激する方法。
【請求項２６】
治療に使用するための請求項１から１４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２７】
1型又は2型糖尿病、インスリン抵抗症候群、耐糖能異常（IGT）、肥満、摂食障害、高血糖、代謝異常及び胃腸疾患、上昇した血中グルコースレベルに関連した病状の治療のための、血中グルコースレベルの調節、胃内容排出の調節、インシュリン分泌の刺激のための医薬の製造のための、請求項１から１４のいずれか一項に記載の組成物の使用。

【国際調査報告】

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DK 03/00651

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C07K14/575

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

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, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category ° | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| X | WO 01 04156 A (LARSEN BJARNE DUE ;NEVE SOEREN (DK); MIKKELSEN JENS DAMSGAARD (DK)) 18 January 2001 (2001-01-18)<br>claims 1-3,6,10,29-33,40-48 | 1,7-11, 26-28, 36,39, 45,51-66 |
| A | | 2-6, 12-25, 29-35, 37,38, 40-44, 46-50 |
| | --- | |
| A | DE 196 37 230 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 19 March 1998 (1998-03-19)<br>page 2, line 59 - line 63<br>page 3, line 43 -page 4, line 16 | 1-66 |
| | --- | |
| | -/-- | |

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] 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
"E" earlier document 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 | Date of mailing of the international search report |
|---|---|
| 12 March 2004 | 25. 03. 2004 |

| Name and mailing address of the ISA | Authorized officer |
|---|---|
| European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,<br>Fax: (+31-70) 340-3016 | IDA CHRISTENSEN / ELY |

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DK 03/00651

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category ° | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| A | WO 00 66629 A (AMYLIN PHARMACEUTICALS INC) 9 November 2000 (2000-11-09) page 9, line 29 -page 10, line 2 abstract --- | 1-66 |
| A | WO 99 43708 A (MADSEN KJELD ;NOVONORDISK AS (DK); HUUSFELDT PER OLAF (DK); KNUDSE) 2 September 1999 (1999-09-02) page 32, line 1 - line 19 ----- | 1-66 |

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DK 03/00651

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---|---|---|
| WO 0104156 A | 18-01-2001 | EP 1076066 A1 | 14-02-2001 |
| | | AT 242267 T | 15-06-2003 |
| | | AU 5966000 A | 30-01-2001 |
| | | CA 2378431 A1 | 18-01-2001 |
| | | CN 1376166 T | 23-10-2002 |
| | | DE 60003182 D1 | 10-07-2003 |
| | | WO 0104156 A1 | 18-01-2001 |
| | | DK 1196444 T3 | 29-09-2003 |
| | | EP 1196444 A1 | 17-04-2002 |
| | | EP 1329458 A2 | 23-07-2003 |
| | | JP 2003505347 T | 12-02-2003 |
| | | NZ 517012 A | 28-02-2003 |
| | | PT 1196444 T | 31-10-2003 |
| | | US 6528486 B1 | 04-03-2003 |
| | | ZA 200200156 A | 19-05-2003 |
| DE 19637230 A | 19-03-1998 | DE 19637230 A1 | 19-03-1998 |
| | | AU 723694 B2 | 31-08-2000 |
| | | AU 3173297 A | 05-01-1998 |
| | | BR 9710452 A | 17-08-1999 |
| | | CA 2257119 A1 | 11-12-1997 |
| | | CN 1227567 A | 01-09-1999 |
| | | WO 9746584 A1 | 11-12-1997 |
| | | EP 0915910 A1 | 19-05-1999 |
| | | JP 2000516912 T | 19-12-2000 |
| | | KR 2000016389 A | 25-03-2000 |
| | | TR 9802789 T2 | 22-03-1999 |
| WO 0066629 A | 09-11-2000 | AU 4688300 A | 17-11-2000 |
| | | BR 0010705 A | 05-02-2002 |
| | | CA 2372214 A1 | 09-11-2000 |
| | | CN 1372570 T | 02-10-2002 |
| | | EP 1175443 A1 | 30-01-2002 |
| | | JP 2002544127 T | 24-12-2002 |
| | | WO 0066629 A1 | 09-11-2000 |
| WO 9943708 A | 02-09-1999 | AU 3247799 A | 15-09-1999 |
| | | WO 9943708 A1 | 02-09-1999 |
| | | EP 1056775 A1 | 06-12-2000 |
| | | JP 2003522099 T | 22-07-2003 |
| | | US 6268343 B1 | 31-07-2001 |
| | | US 2003199672 A1 | 23-10-2003 |
| | | US 2001011071 A1 | 02-08-2001 |
| | | US 2001047084 A1 | 29-11-2001 |
| | | ZA 9901571 A | 02-09-1999 |

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/DK 03/00651

**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. [X] Claims Nos.: 52-63
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

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:

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [ ] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/DK 03/00651

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Claims Nos.: 52-63

Claims 52-63 relate to methods of treatment of the human or animal body by surgery or by therapy or diagnostic methods practised on the human or animal body (PCT Rule 39.1(iv)). Nevertheless, a search has been executed for these claims. The search has been based on the alleged effects of the compounds or compositions.

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. | | | FI | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|---|
| ***Ａ６１Ｐ*** | ***3/04*** | ***(2006.01)*** | Ａ６１Ｐ | 3/04 | |
| ***Ａ６１Ｐ*** | ***25/18*** | ***(2006.01)*** | Ａ６１Ｐ | 25/18 | |
| ***Ａ６１Ｐ*** | ***3/00*** | ***(2006.01)*** | Ａ６１Ｐ | 3/00 | |
| ***Ａ６１Ｐ*** | ***1/00*** | ***(2006.01)*** | Ａ６１Ｐ | 1/00 | |
| ***Ａ６１Ｋ*** | ***9/16*** | ***(2006.01)*** | Ａ６１Ｋ | 9/16 | |
| ***Ａ６１Ｋ*** | ***9/127*** | ***(2006.01)*** | Ａ６１Ｋ | 9/127 | |
| ***Ａ６１Ｋ*** | ***9/08*** | ***(2006.01)*** | Ａ６１Ｋ | 9/08 | |
| ***Ａ６１Ｋ*** | ***9/52*** | ***(2006.01)*** | Ａ６１Ｋ | 9/52 | |
| ***Ａ６１Ｐ*** | ***9/10*** | ***(2006.01)*** | Ａ６１Ｐ | 9/10 | |
| ***Ａ６１Ｐ*** | ***3/06*** | ***(2006.01)*** | Ａ６１Ｐ | 3/06 | |

(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,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 トリネ・ジェプセン
デンマーク・デーカー－２４００・ケーベンヘブン・エヌヴェー・ティーエイチ・ハンドフェルケブヘブン・８・ストリート
(72)発明者 カースタイン・ボエ・クヌーゼン
デンマーク・デーカー－２６７０・グレーブ・マグノリアベジェ・１０
(72)発明者 ブジャルネ・デュー・ラーセン
デンマーク・デーカー－２７００・ブロンシェージェ・ティーエイチ・１・アリスガード・５
(72)発明者 デイビット・ノット
デンマーク・デーカー－２９００・ヘルエルプ・エヴァルスバッケン・２６

Ｆターム(参考) 4C076 AA11 AA19 AA30 AA94 CC01 CC16 CC21
4C084 AA02 BA01 BA23 DC50 NA14 ZA181 ZA661 ZA701 ZC211 ZC351
4C087 AA01 AA02 BB32 CA16 NA14 ZA18 ZA66 ZA70 ZC21 ZC35
4H045 AA10 AA20 AA30 BA19 CA53 DA83 EA23 EA27 FA33