

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4287153号  
(P4287153)

(45) 発行日 平成21年7月1日(2009.7.1)

(24) 登録日 平成21年4月3日(2009.4.3)

(51) Int.Cl.

F I

C 0 7 K 14/46 (2006.01)

C 0 7 K 14/46 Z N A

A 6 1 K 38/26 (2006.01)

A 6 1 K 37/28

A 6 1 P 3/10 (2006.01)

A 6 1 P 3/10

C 0 7 K 1/14 (2006.01)

C 0 7 K 1/14

C 1 2 P 21/02 (2006.01)

C 1 2 P 21/02

C

請求項の数 3 (全 14 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-587464 (P2002-587464)  
 (86) (22) 出願日 平成14年5月8日(2002.5.8)  
 (65) 公表番号 特表2005-502595 (P2005-502595A)  
 (43) 公表日 平成17年1月27日(2005.1.27)  
 (86) 国際出願番号 PCT/CN2002/000316  
 (87) 国際公開番号 W02002/090388  
 (87) 国際公開日 平成14年11月14日(2002.11.14)  
 審査請求日 平成17年4月7日(2005.4.7)  
 (31) 優先権主張番号 01112856.9  
 (32) 優先日 平成13年5月10日(2001.5.10)  
 (33) 優先権主張国 中国 (CN)

前置審査

(73) 特許権者 503411934  
 上海▲ふあ▼▲い▼生物技▲しゅう▼有限  
 公司  
 中華人民共和国 200233 シャンハ  
 イ、中国上海市漕宝路36号  
 (74) 代理人 230104019  
 弁護士 大野 聖二  
 (74) 代理人 100106840  
 弁理士 森田 耕司  
 (74) 代理人 100105991  
 弁理士 田中 玲子  
 (74) 代理人 100114465  
 弁理士 北野 健

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インスリン指向性ペプチド誘導体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記に示されるアミノ酸配列を有する、インスリンの分泌を刺激しうるペプチドまたはその医薬的に許容可能な塩：

H i s - G l y - G l u - G l y - T h r - P h e - T h r - S e r - A s p - L e u -  
 S e r - L y s - G l n - X - G l u - G l u - G l u - A l a - V a l - Y - L e u -  
 P h e - I l e - G l u - T r p - L e u - L y s - A s n - G l y - G l y - P r o -  
 S e r - S e r - G l y - A l a - P r o - P r o - P r o - S e r - Z

(ここで、XはLeuを、YはLysを、ZはArg-OHを示す)。

【請求項 2】

遺伝子組み換え技術による請求項1に記載のペプチドの製造方法であって、

a. インスリン指向性ペプチド誘導体のアミノ酸配列に従い遺伝子フラグメントを合成すること、

b. 遺伝子フラグメントのライゲーション、組み換えプラスミドの構築、細菌細胞の培養、および組み換えプラスミドの形質転換の後に、クローニングされた細菌株を得ること、

c. 細菌株の発酵および細胞壁の破壊後に、封入体を抽出すること、

d. 封入体の溶解、粗産物の分離、HPLCによる精製および凍結乾燥工程の後に、最終産物を得ること、

を含む、方法。

【請求項 3】

10

20

請求項 1 に記載のペプチドまたはその医薬的に許容可能な塩を含む、ⅠⅠ型糖尿病の処置剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ⅠⅠ型糖尿病の処置に有用な活性なペプチド化合物に関する。特に、本発明は、インスリン指向性ペプチドエクセンジン - 4 の誘導体に関する。

【背景技術】

【0002】

同じ量のグルコースの経口投与が、注射よりもインスリンの分泌を刺激しうることが明らかにされてきた。その理由を探求する多くの研究により、インクレチンがこの現象に重要な役割を果たすことが確認された。

【0003】

インクレチンはペプチド化合物群であり、これらの中で、強い阻害活性を有する胃抑制性ペプチド (GIP) およびグルカゴン様ペプチド (GLP - 1) が 1985 年に開示された。ここで 2 種類の GLP - 1 が存在し、1 つは 30 アミノ酸残基から構成される GLP - 1 (7 - 36) アミドであり、もう 1 つは 31 アミノ酸残基から構成される GLP - 1 (7 - 37) である。これら 2 つは、インスリンの分泌を刺激するという同様の活性を有している。in vitro において膵臓島細胞に作用するとき、 $1 \times 10^{-10} \sim 1 \times 10^{-11} \text{ mol/L}$  もの低い濃度の GLP - 1 でも、インスリンの分泌を刺激することができる。DNA およびアミノ酸配列の分析により、これらのインスリン指向性ペプチドが、腸のタンパク質分解酵素の作用の下でグルカゴン前駆体「プログルカゴン」のタンパク質分解に由来することが明らかとなり、それゆえこれらはグルカゴン様ペプチドと呼ばれる。

【0004】

GLP - 1 の 1 つの特徴は、膵臓ベータ細胞を刺激してプロインスリン mRNA およびプロインスリンを合成し、そしてインスリンを放出しうることである。膵臓ベータ細胞に対する GLP - 1 の作用は、グルコースの濃度に依存する。血液グルコース濃度が  $6 \text{ mmol/L}$  より高い場合、GLP - 1 は、インスリンの分泌を顕著に刺激し、その濃度が一旦正常濃度に回復すると、GLP - 1 の刺激活性はもはや観察されなくなる。このような特徴は、ⅠⅠ型糖尿病の処置に非常に有用である。近年のⅠⅠ型糖尿病患者に対する臨床試験により、インスリンの分泌を刺激し、グルコース濃度を低下させる GLP - 1 の作用も確認された。

【0005】

GLP - 1 (7 - 36) アミドの化学構造は、以下に示される：

【化 1】

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-NH<sub>2</sub>

ここで、His はヒスチジンを、Ala はアラニンを、Glu はグルタミン酸を、Gly はグリシンを、Thr はスレオニンを、Phe はフェニルアラニンを、Ser はセリンを、Asp はアスパラギン酸を、Val はバリンを、Tyr はチロシンを、Leu はロイシンを、Gln はグルタミンを、Lys はリジンを、Ile はイソロイシンを、そして Arg はアルギニンを示す。

【0006】

国際特許出願 WO 91 / 11457 は、GLP - 1 ペプチド 7 - 34、7 - 35、7 - 36 および 7 - 37 の類似体を開示しており、これらはⅠⅠ型糖尿病の処置に有用であった。

【0007】

メキシコドクトカゲ (Heloderma horridum) の毒液から分離された

10

20

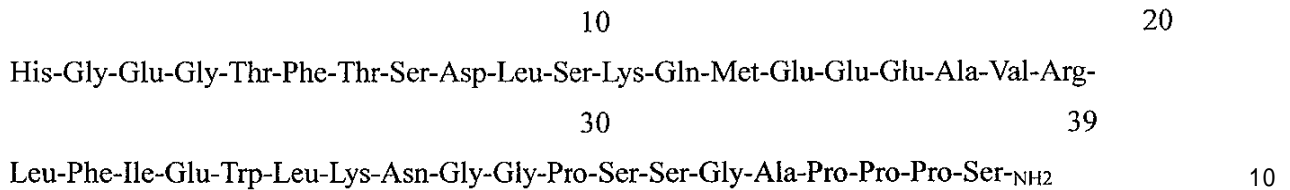
30

40

50

ペプチド化合物エクセンジン - 4 は、1996 年の *Regulatory Peptides* に Jean - Pierre Ranfman により開示された。エクセンジン - 4 は、カルボキシル末端がアミド化された 39 のアミノ酸残基から構成される。エクセンジン - 4 の化学構造は以下に示される：

【化 2】



ここで、Met はメチオニンを、Asn はアスパラギンを、そして Pro はプロリンを示す。

【0008】

エクセンジン - 4 は、そのアミノ酸配列において GLP - 1 と 53 % の相同性を共有する。さらに、エクセンジン - 4 は、GLP - 1 レセプターに結合して、インスリンの分泌を刺激する能力を有する。したがって、これは、インスリン指向性ペプチドと見なされる。

【0009】

米国特許番号 05424286 号は、インスリンの分泌の刺激作用について、エクセンジン - 4 と GLP - 1 との間で行ったいくつかの比較実験の結果を開示した。GLP - 1 と比較すると、エクセンジン - 4 は、インスリンの分泌を刺激する強い能力を有し、このような刺激活性を示すために低い濃度しか必要としないことが示された。さらに、エクセンジン - 4 は、GLP - 1 と比ベ *in vivo* において長い半減期を有した。これらの特徴に照らして、エクセンジン - 4 は、II 型糖尿病を処置するための望ましい治療薬となりうる。

【0010】

エクセンジン - 4 は、ペプチド合成装置により固相合成によるような、化学合成法により製造できるが、このような方法の高コストおよびそれによる販売価格により、エクセンジン - 4 は、市販に至っていない。それ故、市販のために、製造コストを削減するために遺伝子組み換え技術が試されてきた。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

本発明は、インスリン指向性ペプチドエクセンジン - 4 のいくつかの誘導体を提供することに向けられる。このような誘導体は、インスリンの分泌を刺激し、血液グルコース濃度を低下させるのに役立つ。したがって、これらは II 型糖尿病の処置に用いることができる。このような誘導体は、合成の化学手法により、およびより容易には、遺伝子組み換え技術により製造することができ、これは製造コストを削減することを可能とするものである。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明は、インスリン指向性ペプチドの誘導体およびこれらから製造される医薬的に許容可能な塩を提供する。前記インスリン指向性ペプチドは、以下のアミノ酸配列を有する：

【化 3】

10

14

20

His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-X-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Y-

30

39 40

Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Z

ここで、XはArg、Leu、IleまたはMetを、YはHis、ArgまたはLysを、ZはArg-OH、-OH、-NH<sub>2</sub>またはLys-OHを示し、そして、XがMetでYがArgの時、ZはNH<sub>2</sub>ではない。

10

【0013】

本発明のインスリン指向性ペプチド誘導体は、特に配列表の<210>1 - <210>4に表されるアミノ酸配列を有している。

【0014】

本発明のインスリン指向性ペプチド誘導体は、両性化合物であり、いずれかの多数の無機塩基、並びに無機および有機酸と反応して塩を形成するのに十分に酸性もしくは十分に塩基性でありうる。通常酸性付加塩を形成するために利用される酸は、塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硫酸、リン酸等のような無機酸；p-トルエンスルホン酸、メタンスルホン酸、シュウ酸、p-臭化フェニルスルホン酸、炭酸、コハク酸、クエン酸、安息香酸、酢酸等のような有機酸である。このような塩の例には、硫酸塩、ピロ硫酸塩、重硫酸塩、亜硫酸塩、亜硫酸水素塩、リン酸塩、一水素リン酸塩、二水素リン酸塩、メタリン酸塩、ピロリン酸塩、塩化物、臭化物、ヨウ化物、酢酸塩、プロピオン酸塩、デカン酸塩、カプリル酸塩、アクリル酸塩、ギ酸塩、イソブタン酸塩、カプロン酸塩、ヘプタン酸塩、プロピオル酸塩、シュウ酸塩、マロン酸塩、コハク酸塩、スベリン酸塩、セバシン酸塩、フマル酸塩、マレイン酸塩、ブチン-1, 4-ジオン酸塩、ヘキシン-1, 6-ジオン酸塩、安息香酸塩、塩化安息香酸塩、メチル安息香酸塩、ジニトロ安息香酸塩、ヒドロキシ安息香酸塩、メトキシ安息香酸塩、フタル酸塩、スルホン酸塩、キシレンスルホン酸塩、フェニル酢酸塩、フェニルプロピオン酸塩、フェニルブタン酸塩、クエン酸塩、乳酸塩、ガンマ-ヒドロキシブタン酸塩、グリコール酸塩、酒石酸塩、メタンスルホン酸塩、プロパンスルホン酸塩、ナフタレン-1-スルホン酸塩、ナフタレン-2-スルホン酸塩、マン

20

30

【0015】

本発明の誘導体と反応させて塩を形成するために、アルカリを用いてもよい。このようなアルカリの代表例には、アンモニウム、アルカリ金属、アルカリ金属水酸化物、炭酸、および重炭酸が含まれる。典型的には、このようなアルカリとしては、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウムおよび炭酸カルシウムが挙げられる。

【0016】

本発明の1つの見地は、固相合成によるインスリン指向性ペプチド誘導体の製造方法であって、固相担体としてHMP樹脂を用いること、アミノ酸のアルファアミンを9-フルオレニルメトキシカルボニル(Fmoc)で保護すること、インスリン指向性ペプチド誘導体のアミノ酸配列に従いペプチド合成装置で残基を合成すること、並びに分離、精製および凍結乾燥工程後に産物を得ること、を含む方法を提供する。

40

【0017】

他の見地として、本発明は、遺伝子組み換え技術によるインスリン指向性ペプチド誘導体の製造方法であって、

a. インスリン指向性ペプチド誘導体のアミノ酸配列に従い遺伝子フラグメントを合成すること、

b. 遺伝子フラグメントのライゲーション、組み換えプラスミドの構築、細菌細胞の培養、および組み換えプラスミドの形質転換の後に、クローニングされた細菌株を得ること、

50

c . 細菌株の発酵および細胞壁の破壊後に、封入体を抽出すること、  
d . 封入対の溶解、粗産物の分離、H P L Cによる精製および凍結乾燥工程の後に、最終産物を得ること、  
を含む、方法を提供する。

#### 【 0 0 1 8 】

また他の見地として、本発明は、インスリン指向性ペプチド誘導体およびそれから製造される医薬的に許容可能な塩の、I I型糖尿病の処置への使用を提供する。

#### 【 0 0 1 9 】

本発明は、ペプチド化合物エクセンジン - 4の新規な誘導体を提供し、これは、エクセンジン - 4誘導体の範囲を広げるものである。本発明の誘導体は、インスリンの分泌を刺激し、血液グルコース濃度を低下させる生物学的活性を有する。これらは、I I型真性糖尿病の処置に用いることができる。このような誘導体は、化学合成により、またより容易には、遺伝子組み換え技術により製造でき、これは製造コストを減少させることができる。さらに、このような誘導体の生物学的活性は、非肥満糖尿病(N O D)マウスによる薬力学研究により解明され、本発明の誘導体0 . 1 μ gをマウスの腹部に注射した場合、インスリン指向性ペプチド誘導体は、インスリンの分泌を増加させ、また血液グルコース濃度を低下させる明らかな作用を示した。

#### 【実施例】

#### 【 0 0 2 0 】

以下の実施例は、例示であり、いかなる手段においても本発明の範囲を限定するものではない。

<実施例1> XがA r g、YがL y s、Zが-O Hであるインスリン指向性ペプチド誘導体の、固相合成による製造

#### 【 0 0 2 1 】

( 1 ) アミノ酸モノマー :

#### 【表1】

Fmoc-L-Ala-OH	Fmoc-L-Lys(Boc)-OH
Fmoc-L-Asn(Trt)-OH	Fmoc-L-Met-OH
Fmoc-L-Asp(OtBu)-OH	Fmoc-L-Phe-OH
Fmoc-L-Gln(Trt)-OH	Fmoc-L-Pro-OH
Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH	Fmoc-L-Ser(tBu)-OH
Fmoc-L-Gly-OH	Fmoc-L-Thr(tBu)-OH
Fmoc-L-His(Trt)-OH	Fmoc-L-Trp-OH
Fmoc-L-Ile-OH	Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH
Fmoc-L-Leu-OH	Fmoc-L-Val-OH

ここで、F m o cは9 - フルオレニルメトキシカルボニルを、B O Cはt e r t - ブチルオキシカルボニルを、T r tはトリチルを、O t B uはt e r t - ブチルエステルを、t B uはt e r t - ブチルを示す。

#### 【 0 0 2 2 】

( 2 ) 装置および試薬 :

装置 : モデル4 3 3 Aペプチド合成装置 ( アプライドバイオシステム社、米国 )

試薬 : N - メチルケトピロリジン、塩化メチレン、ヘキサヒドロピリジン、メタノール、ジメチルアミノピリジン / D M F N , N - ジイソプロピルエチルアミン / N M P、1 0 0 m m o l e H B T U / D M F 中 0 . 5 M H O B T、N , N - ジシクロヘキシルカルボジイミド / N M P

ここで、D M FはN , N - ジメチルホルムアミドを、N M PはN - メチルピロリドン、H O B Tは1 - ヒドロキシベンゾトリアゾールを、H B T Uは2 - ( 1 H - ベンゾトリアゾール - イル - 1 , 1 , 3 , 3 - テトラメチル - ウロニウムヘキサフルオロホスフェート ) を示す。

## 【 0 0 2 3 】

## ( 3 ) 工程

## a . 合成

例として 0 . 2 5 スケールの合成を行い、以下に記載する合成工程とした。

0 . 2 5 g の H M P 樹脂を秤量し、合成装置の反応容器に入れた。1 m m o l の種々の残基を、各々保護基を結合させて秤量し、カルボキシル末端からアミノ末端方向にインスリン指向性ペプチド誘導体のアミノ酸配列に従い合成装置で配列させた。2 5 の室温で、F m o c 保護基を除去し、残基を活性化させ、活性化した残基を H M P 樹脂に結合させる反応を、コンピュータプログラムの制御下で自動的に行った。このような反応は、全ペプチドが合成されるまで繰り返された。合成の完了後、側鎖保護基が結合した各々の残基を有する残基結合樹脂を、ペプチド合成装置で空気乾燥させ、その後秤量した。

10

## b . 保護基の除去および樹脂の分離

保護基が結合したインスリン指向性ペプチド誘導体の各々の残基を有する残基結合樹脂を、栓をしたエルレンマイヤーフラスコに入れ、その後以下に示す切断試薬を添加した。

## 【 0 0 2 4 】

## 【表 2】

試薬	添加量
水	0 . 5 0 m l
メチルフェノール	0 . 5 0 m l
フェノール	0 . 7 5 g
メルカプトエタノール	0 . 2 0 m l
トリフロロ酢酸	1 0 . 0 m l

20

3 0 の一定温度で 6 時間電磁石による攪拌反応を行った。ろ過工程の後、水溶性のろ液を採取した。樹脂を少量のトリフロロ酢酸で洗浄した。採取した水溶性のろ液および洗浄溶液を混合し、エーテルを加えて沈殿させた。混合物をろ過し、得られた沈殿を少量のエーテルで洗浄した。除湿装置による蒸発の後、粗産物を得た。

## c . H P L C による精製および凍結乾燥

30

粗産物の分離および精製を予備 H P L C を用いて行った。最終産物を、凍結および凍結乾燥工程の後に得た。産物の分子量をクロマトグラム - 質量スペクトルの複合分析を用いて測定した。ペプチド誘導体は、理論分子量 4 3 0 0 . 6 に対して、4 3 1 6 . 7 の分子量を有することがわかった。

## 【 0 0 2 5 】

< 実施例 2 > X が L e u、Y が L y s、Z が A r g - O H であるインスリン指向性ペプチド誘導体の、遺伝子組み換え技術による製造

## 【 0 0 2 6 】

A . インスリン指向性ペプチド誘導体のアミノ酸配列に従った遺伝子フラグメントの合成  
【化 4】

40

(1) 5' AAT TCC ATG CAC GGC GAA GGC ACC TTC ACC AGC GAT CTG AGC AAA  
CAG CTG GAA GAA GAA GCG GTT AA

(2) 5' ACTG TTC ATC GAA TGG CTG AAA AAC GGC GGC CCG AGC AGC GGC  
GCG CCG CCG CCG AGC CGT TAG A

(3) 5' AGCTT CTA ACG GCT CGG CGG CGG CGC GCC GCT GCT CGG GCC GCC  
GTT TTT CAG CCA TTC GAT GA

(4) 5' ACAG TTT AAC CGC TTC TTC TTC CAG CTG TTT GCT CAG ATC GCT GGT  
GAA GGT GCC TTC GCC GTG CAT GG

50

## 【 0 0 2 7 】

## B . クローニング

## ライゲーション :

2つの試験管を用意し、 $A_{260nm} = 0.1$  (260 nmにおける光学密度)のフラグメント(1)およびフラグメント(4)を1つの試験管に入れ、一方、同じ光学密度のフラグメント(2)およびフラグメント(3)をもう一方の試験管に入れた。そして、ポリヌクレオチドキナーゼバッファー、ポリヌクレオチドキナーゼおよびATPを2つの試験管にそれぞれ添加した。反応混合物を37で60分間インキュベートし、遺伝子フラグメントの5'末端をリン酸化した。その後、2つの試験管を95の水浴に置き、10分間インキュベートした。加温のための水浴をやめて、室温にて自然に冷却し、その工程の間にアニーリング反応を行った。T4リガーゼおよびT4リガーゼバッファーを2つの試験管にそれぞれ添加し、遺伝子フラグメントのライゲーションのために、混合物を16にて一晩インキュベートした。

10

## プラスミド :

Lac、P<sub>L</sub>またはTacのようなプロモーターを含むプラスミドを試験管に入れ、制限エンドヌクレアーゼEcoRIおよびHindIIIにより消化した。消化したプラスミドをヒドロキシベンゼン：クロロホルム溶媒により抽出し、遠心分離により採取した。水相を残し、クロロホルム溶媒により3回洗浄した。遠心分離を続け、得られた水相をイソプロパノール溶媒で沈殿させ、その後遠心分離および空気乾燥工程を行った。

消化したプラスミドおよびライゲートしたフラグメントを混合した。T4リガーゼおよびリガーゼバッファーを混合物に添加した。ライゲーション反応を室温で3～4時間行った。

20

## 宿主細菌細胞の培養 :

E. coli JM103の細菌細胞をLB液体培地(10gのペプトン、5gの酵母抽出物および5gの塩化ナトリウムを含む1000mlのLB液体培地)中で37で4時間振盪しながらインキュベートした。細菌培養物を遠心分離した後、採取した細菌細胞を塩化カルシウム溶液で処理し、さらなる使用に備えて-4で保存した。

## 形質転換 :

クローニングしたプラスミドをE. coli JM103宿主細胞に形質転換した。形質転換された細菌細胞を、氷浴中で30分間インキュベートし、その後42で2分間インキュベートした。細菌細胞をアンピシリン抗生物質を含む寒天プレートに広げ、37で一晩インキュベートした。その後コロニー選択を行い、組み換えプラスミドを含むコロニーを陽性コロニーとして保持した。

30

## 【 0 0 2 8 】

## C . 発酵 :

誘導体遺伝子を保持した組み換えプラスミドを含む選択コロニーを、LB液体培地中で振盪しながらインキュベートした。0.5mMのイソプロピルベータ-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)をタンパク質誘導のために添加した。細菌細胞を一晩インキュベートし、遠心分離により採取した。発現したタンパク質を、12%のドデカンスルホン酸ナトリウムを含むポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)により同定した。

40

## 【 0 0 2 9 】

## D . 封入体

各々300mlの細菌培養物を含む10個のビンを、上述した条件下で振盪しながらインキュベートした。タンパク質誘導工程の後、溶解液(1%塩化ナトリウムを含む20mMのリン酸バッファー、pH7.5)およびリゾチームを添加した。細菌培養物を30で30分間インキュベートし、その後遠心分離した。採取した沈殿を封入体の抽出のために6Mグアニジン塩酸塩(Gu·HCl)で処理した。遠心分離を続け、得られた上清を透析し、グアニジン塩酸塩を除去した。透析物を20mMリン酸バッファー(1%塩化ナトリウムおよび0.1%Tween 80を含む、pH7.5)で3回洗浄し、そして封入体を得た。

50

## 【0030】

## E．溶解

封入体を8 Mカルバミド溶液に溶解した。塩酸を添加して50 mMの濃度とした。臭化シアンを添加後、溶液を光を避けて窒素保護下で撹拌した。溶解反応を2時間行い、その後HPLC分析を行った。

## 【0031】

## F．精製

溶解反応の完了後、粗産物をセファデックスG-25による分画クロマトグラフィーにより得、最終産物をHPLC精製により得た。固相合成の結果と同様に、測定されたペプチド誘導体の分子量は、理論分子量に一致することが、質量分析により示された。

10

## 【0032】

## &lt;実施例3&gt; 薬力学研究

2時間絶食させた体重 $17 \pm 2$  gの非肥満糖尿病マウス(NODマウス)を用いて実験を行った。対照群1のマウスは2  $\mu$ gのインスリンの腹部注射を受け、対照群2のマウスは4  $\mu$ gのインスリンの腹部注射を受け、一方、試験群のものは、実施例1に記載されたように得られたインスリン指向性ペプチド誘導体の0.1  $\mu$ gの腹部注射を受けた。

## 【0033】

血液サンプルを異なる時間において採取した。血漿グルコース濃度を、血漿グルコース試験キット(健康省生物学製品上海研究所)を用いて測定した。結果を図に示す。インスリン指向性ペプチド誘導体の血液グルコースに対する低下作用が、非常に明白であることが観察できる。

20

## 【0034】

<実施例4> NODマウスにおける血液グルコースに対するエクセンジン-4(Lys<sub>20</sub>, Arg<sub>20</sub>)およびエクセンジン-4(Leu<sub>14</sub>, Lys<sub>20</sub>, Arg<sub>40</sub>)の低下作用  
試料および方法:

NODマウスは、中国科学院動物センター上海研究所から提供された。0.9%塩化ナトリウム溶液、エクセンジン-4(Lys<sub>20</sub>, Arg<sub>40</sub>)およびエクセンジン-4(Leu<sub>14</sub>, Lys<sub>20</sub>, Arg<sub>40</sub>)ペプチドを、アッセイに用いた。血漿グルコース試験キットを健康省生物学製品上海研究所から購入した。

## 【0035】

一晩絶食させたNODマウスを3つの群に分けた。第1群のマウスには、40%グルコースおよび1  $\mu$ gのエクセンジン-4(Lys<sub>20</sub>, Arg<sub>40</sub>)を含む200  $\mu$ lの溶液を腹部に注射した。第2群のマウスには、40%グルコースおよび2  $\mu$ gのエクセンジン-4(Leu<sub>14</sub>, Lys<sub>20</sub>, Arg<sub>40</sub>)を含む200  $\mu$ lの溶液を腹部に注射した。一方、第3群では、対象群として、マウスにグルコース溶液を腹部に注射した。

30

## 【0036】

30  $\mu$ lの血液サンプルを、あらかじめヘパリンで処理されたメモリ付きキャピラリーを用いて後方眼窩腔から直ちに採取した。サンプルを300  $\mu$ lの生理食塩水に入れ、塩水と混合した。3000 rpmで遠心分離して赤血球を除去し、血清をグルコース測定のために保持した。異なる血液サンプルを30分後、60分後および120分後においてそれぞれ上述のように採取し、血清を分離した。3つの血漿サンプルのグルコース濃度を試験キットに記載された方法にしたがって測定し、血液グルコース濃度に対するGLP-1(7-36)の低下作用を検出した。

40

## 【0037】

図1に示すように、急激な増加の後、対照群の血液グルコース濃度は、徐々に正常濃度に戻る一方、試験群のグルコース濃度は、顕著な増加を示さずにすべての時間において正常濃度を維持していた。その理由は、エクセンジン-4誘導体の投与がインスリンの分泌を刺激し、それによりグルコース濃度の急激な変動を防止したものである。したがって、エクセンジン-4(Lys<sub>20</sub>, Arg<sub>40</sub>)およびエクセンジン-4(Leu<sub>14</sub>, Lys<sub>20</sub>, Arg<sub>40</sub>)の血液グルコースに対する低下作用は、この実験結果によって支持される。

50



## 【 0 0 3 8 】

<実施例 5> インスリン分泌に対するエクセンジン - 4 ( L y s <sub>20</sub> , A r g <sub>40</sub> ) の刺激作用

試料および方法：

N O D マウスは、中国科学院動物センター上海研究所から提供された。40%グルコース溶液、0.9%塩化ナトリウム溶液およびエクセンジン - 4 ( L y s <sub>20</sub> , A r g <sub>40</sub> ) を、実験に用いた。インスリンラジオイムノアッセイキットを健康省生物学製品上海研究所から購入した。

## 【 0 0 3 9 】

N O D マウスを2つの群に分けた。50  $\mu$  l の血液サンプルを、あらかじめ1 m g / m l ヘパリンで内壁をすすいで空気乾燥させたメモリ付きキャピラリーを用いて、眼の静脈叢から採取した。2つの群のマウスに、5  $\mu$  g のエクセンジン - 4 ( L y s <sub>20</sub> , A r g <sub>40</sub> ) を含む200  $\mu$  l の生理食塩水をそれぞれ腹部に注射し、この時を0分として記録した。異なる血液サンプルを、5分後、10分後、20分後および30分後にそれぞれ上述のように採取した。採取後、各々の血液サンプルを、50  $\mu$  l の生理食塩水を含む遠心管に直ちに投入し、塩水と混合した。3000 r p mでの遠心分離により赤血球を除去した。異なるサンプルのインスリン濃度をラジオイムノアッセイキットに記載された方法にしたがって測定し、インスリン分泌に対するエクセンジン - 4 ( L y s <sub>20</sub> , A r g <sub>40</sub> ) の刺激作用を検出した。

10

## 【 0 0 4 0 】

図2に示すように、エクセンジン - 4 ( L y s <sub>20</sub> , A r g <sub>40</sub> ) の腹部注射は、インスリンの分泌を顕著に刺激することができる。

20

## 【 0 0 4 1 】

<実施例 6> C - ペプチド分泌に対するエクセンジン - 4 ( L y s <sub>20</sub> , A r g <sub>40</sub> ) の刺激作用

試料および方法：

健康なC<sub>57</sub>/B L マウスは、中国科学院動物センター上海研究所から提供された。40%グルコース溶液、0.9%塩化ナトリウム溶液およびエクセンジン - 4 ( L y s <sub>20</sub> , A r g <sub>40</sub> ) を、実験に用いた。インスリンラジオイムノアッセイキットおよびC - ペプチドラジオイムノアッセイキットを健康省生物学製品上海研究所から購入した。

30

## 【 0 0 4 2 】

健康なC<sub>57</sub>/B L マウスを2つの群に分けた。50  $\mu$  l の血液サンプルをあらかじめ1 m g / m l ヘパリンで内壁をすすいで空気乾燥させたメモリ付きキャピラリーを用いて、眼の静脈叢から採取した。2つの群のマウスに、5  $\mu$  g のエクセンジン - 4 ( L y s <sub>20</sub> , A r g <sub>40</sub> ) を含む200  $\mu$  l の生理食塩水をそれぞれ腹部に注射し、この時を0分として記録した。異なる血液サンプルを、5分後、10分後、20分後および30分後にそれぞれ上述のように採取した。採取後、各々の血液サンプルを、50  $\mu$  l の生理食塩水を含む遠心管に直ちに投入し、塩水と混合した。3000 r p mでの遠心分離により赤血球を除去した。異なるサンプルのC - ペプチド濃度をラジオイムノアッセイキットに記載された方法にしたがって測定し、C - ペプチド分泌に対するエクセンジン - 4 ( L y s <sub>20</sub> , A r g <sub>40</sub> ) の刺激作用を検出した。

40

## 【 0 0 4 3 】

図3に示すように、エクセンジン - 4 ( L y s <sub>20</sub> , A r g <sub>40</sub> ) の腹部注射は、C - ペプチドの分泌を顕著に刺激することができる。

## 【図面の簡単な説明】

## 【 0 0 4 4 】

本発明は、以下の図面および実施例を参照することにより、さらに例示されることとなる。

【図1】図1は、本発明のインスリン指向性ペプチド誘導体についての薬力学研究の結果を示す。

50

【図 2】図 2 は、実施例 1 で製造された産物の質量分析結果を示し、理論的な分子量 4 3 0 0 . 6 および測定された分子量 4 3 1 6 . 7 を示す。

【図 3】図 3 は、エクセンジン - 4 ( L y s <sub>20</sub> , A r g <sub>20</sub> ) およびエクセンジン - 4 ( L e u <sub>14</sub> , L y s <sub>20</sub> , A r g <sub>40</sub> ) の血液グルコース低下作用の実験結果を模式的に示す。

【図 4】図 4 は、インスリン分泌に対するエクセンジン - 4 ( L y s <sub>20</sub> , A r g <sub>40</sub> ) の刺激作用の実験結果を模式的に示す。

【図 5】図 5 は、C - ペプチド分泌に対するエクセンジン - 4 ( L y s <sub>20</sub> , A r g <sub>40</sub> ) の刺激作用の実験結果を模式的に示す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

10

<110> 上海华谊生物技术有限公司

<120> 促胰岛素分泌肽衍生物

<130> USP 05424286

<150> CN 01112856.9

<151> 2001-05-10

<160> 4

<170> PatentIn version 3.1

20

<210> 1

<211> 40

<212> PRT

<213> Exendin 4 Analogue

<220>

<221> VARIANT

<222> (14).. (14)

<223> Leu or Ile or Met

<220>

<221> VARIANT

<222> (20).. (20)

<223> Arg or Lys

30

<220>

<221> VARIANT

<222> (40).. (40)

<223> Lys

<400> 1

40

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Arg Glu Glu  
1 5 10 15

Glu Ala Val His Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser  
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Arg  
 35 40

<210> 2  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Exendin 4 Analogue

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (14).. (14)  
 <223> Leu or Ile or Met

10

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (20).. (20)  
 <223> Arg or Lys

<400> 2

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Arg Glu Glu  
 1 5 10 15

20

Glu Ala Val His Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 35

<210> 3  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Exendin 4 Analogue

30

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (14).. (14)  
 <223> Leu or Ile

<220>  
 <221> VARIANT

<222> (20)..(20)  
 <223> Arg or Lys

<220>  
 <221> MOD-RES  
 <222> (39)..(39)  
 <223> AMIDATION

<400> 3

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Arg Glu Glu  
 1 5 10 15

10

Glu Ala Val His Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 35

<210> 4  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Exendin 4 Analogue

20

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Lys

<220>  
 <221> MOD-RES  
 <222> (39)..(39)  
 <223> AMIDATION

30

<400> 4

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu  
 1 5 10 15

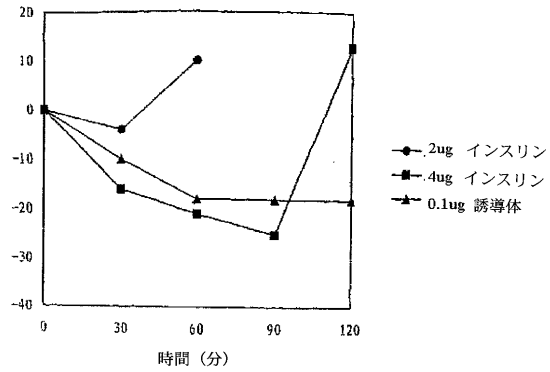
Glu Ala Val His Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

40

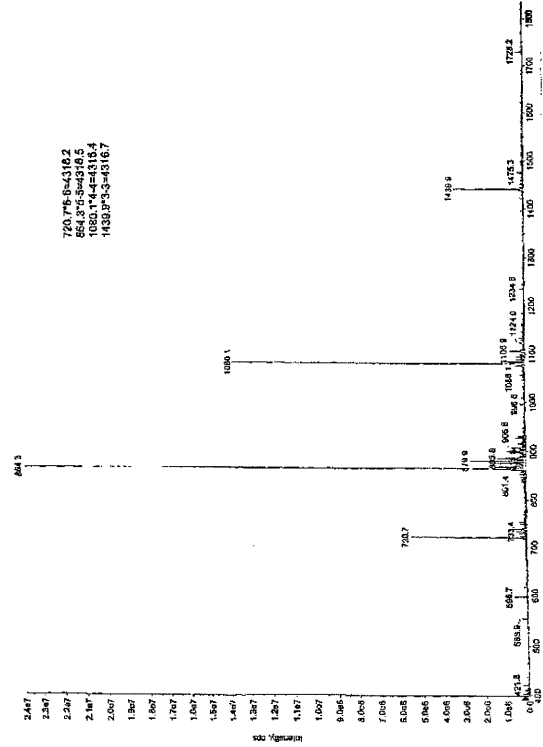
Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 35

【図 1】

血漿グルコースの変化 (%)

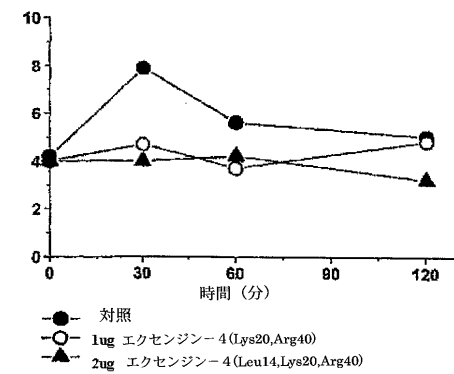


【図 2】



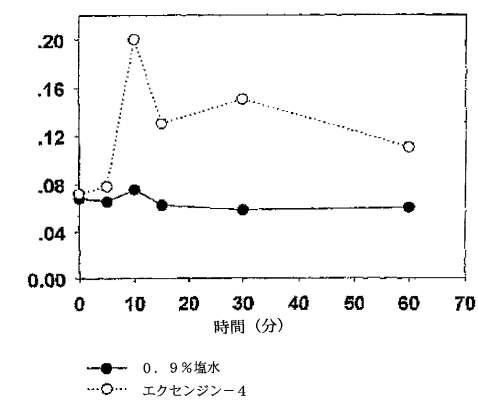
【図 3】

血漿グルコース (mmol/L)

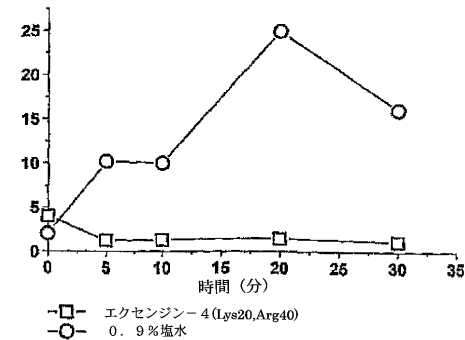


【図 5】

血漿C-ペプチド濃度 (pmol/mL)



【図 4】

血漿インスリン濃度 ( $10^{-6}$  IU)

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 A

(72)発明者 サン, ユークン  
中華人民共和国 2 0 0 2 3 3 シャンハイ, カオバオ ロード ナンバー 3 6  
(72)発明者 ウー, デンシー  
中華人民共和国 2 0 0 2 3 3 シャンハイ, カオバオ ロード ナンバー 3 6  
(72)発明者 ジュー, ジーヨン  
中華人民共和国 2 0 0 2 3 3 シャンハイ, カオバオ ロード ナンバー 3 6  
(72)発明者 ユー, ガン  
中華人民共和国 2 0 0 2 3 3 シャンハイ, カオバオ ロード ナンバー 3 6  
(72)発明者 シェン, チュンジュアン  
中華人民共和国 2 0 0 2 3 3 シャンハイ, カオバオ ロード ナンバー 3 6  
(72)発明者 ジャオ, シャオリン  
中華人民共和国 2 0 0 2 3 3 シャンハイ, カオバオ ロード ナンバー 3 6  
(72)発明者 ゴウ, ジーシャン  
中華人民共和国 2 0 0 2 3 3 シャンハイ, カオバオ ロード ナンバー 3 6

審査官 六笠 紀子

(56)参考文献 国際公開第01/004156(WO, A1)  
国際公開第98/005351(WO, A1)  
国際公開第98/030231(WO, A1)  
国際公開第99/043708(WO, A1)  
国際公開第00/069911(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 1/00-19/00

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

CA(STN)

REGISTRY(STN)

JSTPlus(JDreamII)

JMEDPlus(JDreamII)

JST7580(JDreamII)