



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I524896 B

(45)公告日：中華民國 105 (2016) 年 03 月 11 日

(21)申請案號：101140652

(22)申請日：中華民國 97 (2008) 年 07 月 16 日

(51)Int. Cl. : A61K38/26 (2006.01)

C07K14/065 (2006.01)

A61P3/10 (2006.01)

(30)優先權：2007/07/16 南韓

10-2007-0071071

2007/11/29 美國

60/991,155

(71)申請人：韓美科學有限公司 (南韓) HANMI SCIENCE CO., LTD. (KR)

南韓

(72)發明人：鄭聖燁 JUNG, SUNG YOUB (KR)；林昌基 LIM, CHANG KI (KR)；宋大海 SONG,

DAE HAE (KR)；裴城敏 BAE, SUNG MIN (KR)；金永勳 KIM, YOUNG HOON

(KR)；權世昌 KWON, SE CHANG (KR)；李寬淳 LEE, GWAN SUN (KR)

(74)代理人：閻啟泰；林景郁

(56)參考文獻：

WO 2006/097538A1

Gallwitz B. et al. GLP-1-analogues resistant to degradation by dipeptidyl peptidase IV in vitro. Regulatory Peptides 2000, 86, 103-111.

審查人員：顏逸瑜

申請專利範圍項數：3 項 圖式數：3 共 27 頁

(54)名稱

經修飾N末端胺基酸的促胰島素胜肽衍生物

INSULINOTROPIC PEPTIDE DERIVATIVE WHEREIN ITS N-TERMINAL AMINO ACID IS MODIFIED

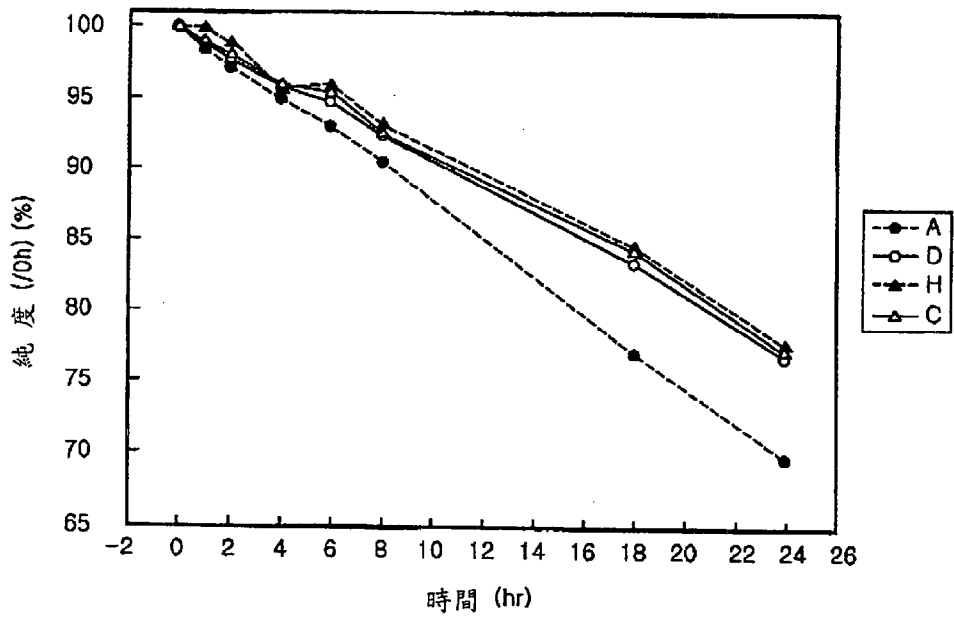
(57)摘要

本發明係關於一種具有改良促胰島素活性及血液穩定性之促胰島素胜肽衍生物，及一種包含該等促胰島素胜肽衍生物之用於治療糖尿病之醫藥組合物。詳言之，本發明之特徵在於N-末端胺基酸經修飾之促胰島素胜肽。根據本發明之該等促胰島素胜肽衍生物顯示在天然及其他促胰島素胜肽類似物中觀察不到之治療效應。因此，可有效提供根據本發明之該等促胰島素胜肽衍生物及包含其之醫藥組合物用於治療疾病。

The present invention relates to an insulintropic peptide derivative having an improved insulintropic activity and blood stability, and a pharmaceutical composition for the treatment of diabetes, comprising the insulintropic peptide derivatives. In particular, the present invention is characterized in N-terminal amino acid-modified insulintropic peptide. The insulintropic peptide derivatives according to the present invention exhibit therapeutic effects, which are not observed in native and other insulintropic peptide analogs. Therefore, the insulintropic peptide derivatives and the pharmaceutical composition comprising the same according to the present invention can be effectively provided for the treatment of the diseases.

指定代表圖：

圖1



公告本 發明專利說明書

分割案

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫；惟已有申請案號者請填寫)

※申請案號：

101140652

※申請日期：

97.7.16

※IPC 分類：

A61K	38/26	(2006.1)
C07K	14/065	(2006.1)
A61P	3/10	(2006.1)

原申請案號：097126905

一、發明名稱：(中文/英文)

經修飾 N 末端胺基酸的促胰島素胜肽衍生物

INSULINOTROPIC PEPTIDE DERIVATIVE WHEREIN

ITS N-TERMINAL AMINO ACID IS MODIFIED

二、中文發明摘要：

本發明係關於一種具有改良促胰島素活性及血液穩定性之促胰島素胜肽衍生物，及一種包含該等促胰島素胜肽衍生物之用於治療糖尿病之醫藥組合物。詳言之，本發明之特徵在於 N-末端胺基酸經修飾之促胰島素胜肽。根據本發明之該等促胰島素胜肽衍生物顯示在天然及其他促胰島素胜肽類似物中觀察不到之治療效應。因此，可有效提供根據本發明之該等促胰島素胜肽衍生物及包含其之醫藥組合物用於治療疾病。

三、英文發明摘要：

The present invention relates to an insulinotropic peptide derivative having an improved insulinotropic activity and blood stability, and a pharmaceutical composition for the treatment of diabetes, comprising the insulinotropic peptide derivatives. In

particular, the present invention is characterized in N-terminal amino acid-modified insulintropic peptide. The insulintropic peptide derivatives according to the present invention exhibit therapeutic effects, which are not observed in native and other insulintropic peptide analogs. Therefore, the insulintropic peptide derivatives and the pharmaceutical composition comprising the same according to the present invention can be effectively provided for the treatment of the diseases.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：圖 1。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無

六、發明說明：

發明背景

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於具有改良促胰島素活性及血液穩定性之促胰島素胜肽衍生物，及包含促胰島素胜肽衍生物之用於治療糖尿病之醫藥組合物。詳言之，本發明之特徵在於 N-末端胺基酸經修飾之促胰島素胜肽。

【先前技術】

因為胜肽歸因於其低穩定性而趨向於容易變性，由活體內蛋白水解酶降解，因此喪失活性，且具有相對小的尺寸，從而易通過腎。因此，為維持包含作為醫藥有效組分之胜肽之藥物的血液含量及效價，須頻繁向患者投與胜肽藥物以維持所要血液含量及效價。然而，胜肽藥物通常以可注射製劑形式投與且用於維持生理活性胜肽之血液含量之該頻繁投藥對患者而言引起嚴重疼痛。為解決該等問題，已進行許多努力。作為該等努力之一，已建議一種增加胜肽藥物穿過生物膜之透過率，且隨後藉由口服或鼻吸入使胜肽藥物傳遞至體內之方法。然而，與可注射製劑相比，由於顯著較低之活體內傳遞效率，該方法在維持胜肽藥物之活體內活性方面仍具有困難。

另一方面，已進行許多努力以改良胜肽藥物之血液穩定性，且維持血液中之藥物濃度處於高含量歷時延長時期，從而最大化藥物之醫藥功效。因此需要該胜肽藥物之長期作用製劑以增加胜肽藥物之穩定性，且維持效價處於

足夠高之水準而不引起患者之免疫反應。

作為用於穩定胜肽且抑制蛋白水解酶降解之方法，已進行一些試驗來修飾對蛋白水解酶敏感之特定胺基酸序列。舉例而言，起降低血液中葡萄糖濃度之作用以用於治療 2 型糖尿病之 GLP-1 (7-37 或 7-36 醯胺)，具有約 4 分鐘或 4 分鐘以下之短的生理活性半衰期 (Kreymann 等人, 1987)，其歸因於 GLP-1 之效價經由在第 8 胺基酸 (Ala) 與第 9 胺基酸 (Asp) 之間藉由二肽基肽酶 IV (DPP IV) 裂解而損失。因此，已對具有針對 DPP IV 之抵抗力之 GLP-1 類似物進行各種研究，且已關於用 Gly (Deacon 等人, 1998; Burcelin 等人, 1999) 或 Leu 或 D-Ala (Xiao 等人, 2001) 取代 Ala8，從而增強對 DPP IV 之抵抗力，同時維持其活性進行試驗。GLP-1 之 N-末端胺基酸 His7 為 GLP-1 活性之關鍵且充當 DPP IV 之標靶。因此，美國專利第 5,545,618 號描述將 N-末端用烷基或醯基修飾，且 Gallwitz 等人描述使 His7 經受 N-甲基化，或 α -甲基化，或將整個 His 用咪唑取代以增加對 DPP IV 之抵抗力，且維持生理活性。雖然增強對二肽基肽酶之抵抗力以改良其穩定性，但發現 His7 經修飾之衍生物在相同濃度下，具有顯著降低之受體親和力及較低之 cAMP 刺激 (Gallwitz 等人, Regulatory Peptide 79:93-102 (1999), Regulatory Peptide 86:103-111 (2000))。

除 GLP-1 外，艾塞那肽 (exendins) 為在希拉毒蜥 (glia monster) (一種亞利桑那州及北墨西哥常見之蜥蜴) 之毒液中發現之胜肽。艾塞那肽-3 存在於珠狀毒蜥 (Heloderma

horridum) 之毒液中，且艾塞那肽-4 存在於鈍尾毒蜥 (Heloderma suspectum) 之毒液中。艾塞那肽與 GLP-1 具有 53% 的高同源性 (Goke 等人, J. Bio. Chem., 268:19650-55 (1993))。據報導艾塞那肽-4 對特定分泌胰島素之細胞上之 GLP-1 受體，對來自天竺鼠 (guinea pig) 胰腺之分散腺泡細胞及來自胃之腔壁細胞起作用，且據稱胜肽亦刺激生長抑素釋放且抑制分離胃中之胃泌素釋放。另外，據報導發現艾塞那肽-3 及艾塞那肽-4 刺激胰腺腺泡細胞中之 cAMP 產生且刺激澱粉酶自胰腺腺泡細胞釋放。因為艾塞那肽-4 (美國專利第 5,424,686 號) 具有 His-Gly 而非在 GLP-1 中充當二肽基肽酶之底物的 His-Ala 之序列，所以其具有對 DPP IV 之抵抗力及比 GLP-1 高的生理活性。因此，其具有比 GLP-1 長的 2 至 4 小時之活體內半衰期。儘管天然艾塞那肽具有相比於 GLP-1 增加之活體內半衰期，但其生理活性並非得到足夠保持。舉例而言，在市售艾塞那肽-4 (艾塞那肽 (exenatide)) 之狀況下，需要向患者每天注射兩次，其對患者而言仍存在困難。

為改良天然艾塞那肽之治療功效，已進行許多試驗來製備其衍生物。如本文中所使用之術語“衍生物”係指藉由自天然胜肽取代及/或缺失一或多個胺基酸及/或將一或多個胺基酸插入天然胜肽中所製備之胜肽。該衍生物亦指藉由烷基化、醃化、酯化或醃胺化天然胜肽中之一或多個胺基酸而製備之經化學修飾的胜肽。

新穎艾塞那肽促效劑化合物描述於 PCT 申請案第

PCT/US98/16387 號中，且之後，對其主張優先權，一種使用艾塞那肽降低食物攝入之方法揭示於 US6956026 及 EP0996459 中。另外，艾塞那肽促效劑化合物揭示於美國專利第 7157555 號中。然而，其中僅揭示艾塞那肽類似物之一些胺基酸序列。此外，並未提及關於所主張類似物之活性及性質，其亦未由實施方式支持。

因此，本發明者發現 His1 經修飾艾塞那肽衍生物顯示比天然艾塞那肽高之血液穩定性及促胰島素活性，從而完成本發明。

【發明內容】

發明概要

本發明之一目標為提供具有改良血液穩定性及促胰島素活性之促胰島素胜肽衍生物。

本發明之另一目標為提供包含具有改良血液穩定性及促胰島素活性之促胰島素胜肽衍生物之用於治療糖尿病的醫藥組合物。

【實施方式】

較佳具體實例之描述

根據一態樣，本發明係關於具有改良血液穩定性及促胰島素活性之促胰島素胜肽衍生物。

本發明之促胰島素胜肽衍生物為其 N-末端組胺酸 (His) 殘基或 N-末端組胺酸殘基之胺基經化學修飾之衍生物。

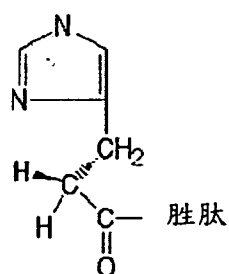
較佳地，促胰島素胜肽可為艾塞那肽-4、艾塞那肽-3

或其衍生物。艾塞那肽-4 或艾塞那肽-3 之衍生物係指藉由自天然胜肽取代及/或缺失一或多個胺基酸及/或將一或多個胺基酸插入天然胜肽中所製備之胜肽。該等衍生物亦係指藉由烷基化、醃化、酯化或醃胺化天然胜肽中之一或多個胺基酸而製備之經化學修飾的胜肽。該等衍生物具有與天然胜肽相同之活性。WO97/46584 揭示艾塞那肽變異體，其缺失艾塞那肽-4 之 C 末端之部分，或取代成非天然胺基酸正白胺酸，且 WO99/07404 揭示藉由取代艾塞那肽之胺基酸而製備之艾塞那肽變異體，其包括非天然胺基酸（諸如戊基甘胺酸、高脯胺酸（homoproline）、第三丁基甘胺酸）。US2008/0119390 亦揭示艾塞那肽變異體，其為藉由缺失 C 末端胺基酸之部分而製備之長度比天然艾塞那肽短的變異體及藉由取代成其他胺基酸而製備之變異體。關於艾塞那肽-3 或艾塞那肽-4 衍生物，該等公開案完全以引用之方式併入本文中，包括其中所引用之所有參考文獻。本發明之促胰島素胜肽更佳為艾塞那肽-4 或其衍生物。

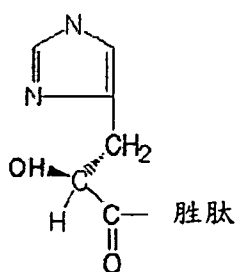
特定言之，促胰島素胜肽為其藉由缺失 N-末端胺基而製備之衍生物（去胺基-組胺醃基衍生物）、其藉由用羥基取代胺基而製備之衍生物（ β -羥基咪唑丙醃基衍生物）、其藉由用 2 個甲基殘基修飾胺基而製備之衍生物（二甲基-組胺醃基衍生物）、其藉由用羧基取代胺基而製備之衍生物（ β -羧基咪唑丙醃基衍生物）或其胺基之正電荷經移除之衍生物，其中移除 N-末端組胺酸殘基之 α 碳以僅保留咪唑乙醃基（咪唑乙醃基衍生物）及其他 N-末端胺基經修飾之衍

生物。

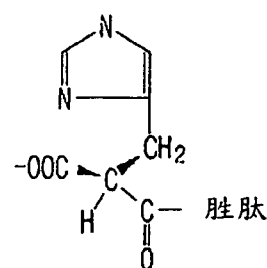
較佳地，本發明提供具有經化學修飾 N-末端胺基及胺基酸殘基之艾塞那肽 4 衍生物，且其更佳藉由移除或取代艾塞那肽-4 之 His1 殘基之 α 碳中存在之 α 胺基或 α 碳來製備，且尤其較佳為 N-末端胺基經移除之去胺基-組胺醯基-艾塞那肽-4 (DA-艾塞那肽-4)、藉由用羥基取代胺基而製備之 β -羥基咪唑丙醯基-艾塞那肽-4 (HY-艾塞那肽-4)、藉由用羧基取代胺基而製備之 β -羧基咪唑丙醯基-艾塞那肽-4 (CX-艾塞那肽-4)、藉由用 2 個甲基殘基修飾胺基而製備之二甲基-組胺醯基-艾塞那肽-4 (DM-艾塞那肽-4) 及 N-末端組胺酸殘基之 α 碳經移除之咪唑乙醯基-艾塞那肽-4 (CA-艾塞那肽-4)。



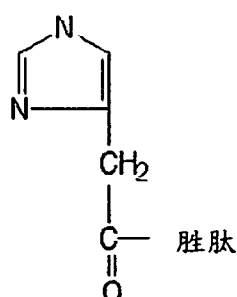
去胺基-組胺醯基
(DA)-艾塞那肽-4



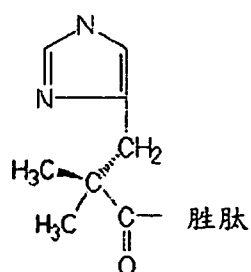
β -羥基咪唑丙醯基
(HY)-艾塞那肽-4



β -羧基咪唑丙醯基
(CX)-艾塞那肽-4

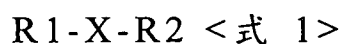


咪唑乙醯基
(CA)-艾塞那肽



二甲基-組胺醯基
(DM)-艾塞那肽-4

根據一特定態樣，本發明係關於包含下式 1 之胺基酸之促胰島素胜肽衍生物。



其中 R1 係選自由去胺基-組胺醯基、二甲基-組胺醯基、 β -羥基咪唑丙醯基、4-咪唑乙醯基及 β -羧基咪唑丙醯基組成之群，

R2 係選自由 $-NH_2$ 、 $-OH$ 及 $-Lys$ 組成之群，

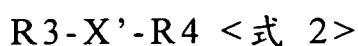
X 係選自由 Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Y-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Z-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser、Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Y-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Z-Asn-Gly-Gly 及 Ser-Asp-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Y-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Z-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser 組成之群，

Y 係選自由 Lys、Ser 及 Arg 組成之群，且

Z 係選自由 Lys、Ser 及 Arg 組成之群。

較佳促胰島素胜肽衍生物具有式 1，其中 R1 係選自由去胺基-組胺醯基、二甲基-組胺醯基、 β -羥基咪唑丙醯基、4-咪唑乙醯基及 β -羧基咪唑丙醯基組成之群，Y 為 Lys 或 Ser，Z 為 Lys 且 R2 為 $-NH_2$ 。

根據另一特定態樣，本發明係關於包含下式 2 之胺基酸之促胰島素胜肽衍生物：



其中 R3 為 4-咪唑乙醯基，

X' 為 Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Y-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Z-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser 或 Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Y-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Z-Asn-Gly-Gly，

R4 為 -NH₂，

Y 係選自由 Lys、Ser 及 Arg 組成之群，且

Z 係選自由 Lys、Ser 及 Arg 組成之群。

就其活性而言，艾塞那肽-4 之 N-末端組胺酸殘基中之化學修飾具有與其他促胰島素胜肽 GLP-1 中之彼化學修飾不同的效應。可預期 GLP-1 之 N-末端組胺酸殘基中之化學修飾（例如 α -甲基-GLP-1、n-甲基-GLP-1 或 imi-GLP-1）抑制二肽基肽酶之降解，從而增加穩定性，且報導降解速率之實際降低。然而，亦報導與天然 GLP-1 相比，其具有相對降低之受體親和力及較低之 cAMP 刺激。相反，因為艾塞那肽-4 不受二肽基肽酶裂解，所以難以預測 N-末端組胺酸殘基中之化學修飾對其活性之效應，尤其為其對受體親和力及血液中葡萄糖濃度之效應。

因此，本發明提供具有經化學修飾 N-末端組胺酸殘基或具有 N-末端組胺酸殘基之經化學修飾胺基之艾塞那肽-4 衍生物，其顯示出乎意料極佳之血液穩定性及促胰島素活性。該等衍生物顯示極佳試管內促胰島素活性（圖 2）且實際上，在糖尿病 db/db 小鼠中發現，與天然艾塞那肽 4 相比，

其顯示極佳的降低血液中葡萄糖濃度之效應（圖3）。

據認為，由於 N-末端組胺酸殘基之胺基中之修飾引起的淨電荷改變或組胺酸殘基之尺寸改變引起對血液中之蛋白水解攻擊之敏感性的差異或影響受體親和力。然而，仍需要對其進行更廣泛的分子研究。預期該性質最大化艾塞那肽-4 之固有促胰島素活性，亦即，對 2 型糖尿病之治療效應，且誘導食物攝入降低，延遲胃排空或其類似情形。

艾塞那肽-4 衍生物係選自由本發明之去胺基-組胺醯基-艾塞那肽-4（DA-艾塞那肽-4）、 β -羥基咪唑丙醯基-艾塞那肽-4（HY-艾塞那肽-4）、 β -羧基丙醯基-艾塞那肽-4（CX-艾塞那肽-4）、二甲基-組胺醯基-艾塞那肽-4（DM-艾塞那肽-4）及咪唑乙醯基-艾塞那肽-4（CA-艾塞那肽-4）組成之群，其藉由移除及取代 N-末端組胺酸殘基之 α 胺基或藉由移除 N-末端組胺酸殘基之 α 碳來製備。因此，其他胺基酸序列不受限制，只要維持其活性即可。另外，對熟習此項技術者而言明顯的為，艾塞那肽-4 衍生物藉由典型方法來修飾，該方法包括修飾諸如 PEG 之聚合物及糖鏈及與白蛋白或運鐵蛋白融合，以便增強其治療效應，使其優於天然艾塞那肽-4。

根據另一態樣，本發明提供包含促胰島素胜肽衍生物之用於治療糖尿病之醫藥組合物。

如本文中所使用之術語“投藥”意謂藉由某種適合方法將預定量之物質引入患者中。本發明之組合物可經由任何常見路線投與，只要其能夠到達所要組織即可。涵蓋多

種投藥模式，包括腹膜內、靜脈內、肌肉內、皮下、皮內、經口、局部、鼻內、肺內及直腸內，但本發明不限於該等所例示之投藥模式。然而，因為胜肽在經口投藥後被消化，所以用於經口投藥之組合物之活性成分應經包衣或調配以保護免於在胃內降解。較佳地，當前組合物可以可注射形式投與。另外，本發明之醫藥組合物可使用某種能夠將活性成分傳輸至標靶細胞中之設備投與。

包含本發明之衍生物之醫藥組合物可另外包含醫藥學上可接受之載劑。對經口投藥而言，醫藥學上可接受之載劑可包括黏合劑、潤滑劑、崩解劑、賦形劑、增溶劑、分散劑、穩定劑、懸浮劑、著色劑及香料。對可注射製劑而言，醫藥學上可接受之載劑可包括緩衝劑、防腐劑、止痛劑、增溶劑、等張劑及穩定劑。對用於局部投藥之製劑而言，醫藥學上可接受之載劑可包括基質、賦形劑、潤滑劑及防腐劑。本發明之醫藥組合物可與上述醫藥學上可接受之載劑組合調配成多種劑型。舉例而言，對經口投藥而言，醫藥組合物可調配成錠劑、片劑、膠囊、酏劑、懸浮液、糖漿劑或糯米紙囊劑。對可注射製劑而言，醫藥組合物可調配成單位劑型，諸如多劑量容器或呈單劑量劑型之安瓿。醫藥組合物亦可調配成溶液、懸浮液、錠劑、丸劑、膠囊及持續釋放型製劑。

另一方面，適於醫藥調配物之載劑、賦形劑及稀釋劑之實例包括乳糖、右旋糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露醇、木糖醇、赤藻糖醇、麥芽糖醇、澱粉、阿拉伯膠、海藻酸鹽、

明膠、磷酸鈣、矽酸鈣、纖維素、甲基纖維素、微晶纖維素、聚乙烯吡咯啉酮、水、甲基羥基苯甲酸酯、丙基羥基苯甲酸酯、滑石、硬脂酸鎂及礦物油。另外，醫藥調配物可另外包括填充劑、抗凝結劑、潤滑劑、保濕劑、香料及防腐劑。

本發明之醫藥組合物之投藥頻率及劑量可藉由若干相關因素確定，該等因素包括欲治療疾病之類型、投藥路線、患者之年齡、性別、體重及疾病嚴重性以及作為活性組分之藥物之類型。因為本發明之醫藥組合物具有極佳活體內功效及效價持續時間，所以其可顯著降低本發明之醫藥藥物之投藥頻率及劑量。

與促胰島素胜肽衍生物有關之本發明尚未由其他先前發明者以艾塞那肽-4 衍生物形式揭示，且其序列尚未明確指定。又，未報導將其活性與天然艾塞那肽-4、其他衍生物或其變異體之活性相比較。此外，不可預期與天然艾塞那肽-4 相比，N-末端 α 胺基或 α 碳經移除或取代之艾塞那肽-4 衍生物具有顯著極佳之活性。因此，最大化根據本發明之促胰島素胜肽衍生物之極佳血液穩定性及促胰島素活性，亦即，對 2 型糖尿病之治療效應為適用的。

本發明之模式

在下文中，對本發明之更好理解可經由以下實施例獲得，陳述該等實施例以說明本發明，而不欲解釋為限制本發明。

實施例 1. 艾塞那肽-4 衍生物之血漿穩定性

為量測艾塞那肽-4 衍生物之血漿穩定性，使天然艾塞那肽-4 及艾塞那肽-4 衍生物中之每一者暴露於血漿，且藉由逆相 HPLC 量測剩餘未變性蛋白質之量以執行對依據暴露時間之變性之測試。

在當前實驗中，為分析暴露於血漿之樣本，使血漿混合樣本脫除蛋白質且隨後分析。

分別以 1 mg/ml 之濃度製備天然艾塞那肽-4、去胺基-組胺鹽基-艾塞那肽-4 (DA-艾塞那肽-4)、 β -羥基咪唑丙基-艾塞那肽-4 (HY-艾塞那肽-4) 及咪唑乙鹽基-艾塞那肽-4 (CA-艾塞那肽-4)。將 200 μ l 各艾塞那肽-4 衍生物樣本與 200 μ l 大鼠血清混合，且在 37°C 下及在各取樣時間執行反應。在 0 hr、1 hr、2 hr、4 hr、6 hr、8 hr、18 hr 及 24 hr 之各時間點取 100 μ l 各樣本。將 400 μ l 冰冷甲醇添加至 100 μ l 樣本中以終止反應，接著渦旋 20 秒。在 15,000 rpm 下將各混合物離心 30 min，且取上清液用於分析。

使用 TFA 於 ACN 中之梯度作為移動相且使用 C18 管柱執行逆相 HPLC。

自艾塞那肽-4 之主峰面積與總峰面積之比率 (%) 計算結果，且將在 0 hr 時間點時之各衍生物之結果視為 100%，得到繪示主峰面積之比率隨暴露時間增加而降低之圖案之圖。

達到 24 hr 之時間點時，天然艾塞那肽-4 之純度降低約 70%，而 3 種衍生物 DA-艾塞那肽-4、HY-艾塞那肽-4 及 CA-艾塞那肽-4 之純度分別降低約 77%、78%、77% (圖 1)。

實施例 2. 艾塞那肽-4 衍生物之試管內活性之量測

為量測艾塞那肽-4 衍生物之功效，檢測其試管內細胞活性。天然艾塞那肽-4 及艾塞那肽-4 衍生物係由 American Peptide Corporation 合成。將通常用於量測 GLP-1 之試管內活性之胰島瘤細胞或郎格罕氏島（islets of Langerhans）分離，且在 GLP-1 處理後分析 cAMP 產生之改變。

在當前實驗中，使用 RIN-m5F（ATCC CRL-11605）量測試管內活性，該 RIN-m5F 稱為大鼠胰島瘤細胞且具有 GLP-1 受體，從而通常用於量測 GLP-1 之試管內活性。用天然艾塞那肽-4 及艾塞那肽-4 衍生物（包括 DA-艾塞那肽-4（去胺基-組胺鹽基-艾塞那肽-4）、DM-艾塞那肽-4（二甲基-組胺鹽基-艾塞那肽-4）、CA-艾塞那肽-4（4-咪唑乙鹽基-艾塞那肽-4）及 HY-艾塞那肽-4（ β -羥基咪唑丙鹽基-艾塞那肽-4）），以變化濃度處理 RIN-m5F 細胞，且隨後檢測歸因於測試物質之 cAMP 產生以確定 EC₅₀ 值。

[表 1]

測試物質	EC ₅₀ (nM)	對艾塞那肽-4 之比率
艾塞那肽-4	1.21	100
去胺基-組胺鹽基 (DA) -艾塞那肽-4	0.95	127.4
二甲基-組胺鹽基 ((DM)) -艾塞那肽-4	1.31	92.4
4-咪唑乙鹽基 (CA) -艾塞那肽-4	1.2	100
β -羥基咪唑丙鹽基 (HY) -艾塞那肽-4	1.3	92.4

實施例 3. 艾塞那肽-4 衍生物之促胰島素活性之量測

在 RINm5F 細胞中比較艾塞那肽-4 衍生物之促胰島素活性。將 RINm5F 細胞解凍，且次培養至少一次，接著以 1×10^5 個細胞/孔之密度用含有 FBS 之培養基 (Gibco, #11082) 接種至 96 孔培養板中。隨後，在 5% CO_2 恆溫箱中，在 37°C 下將細胞培養 48 hr。將培養基用含有 0.5% FBS 之新鮮培養基置換，且隨後培養 1 hr。用含有 0.5% FBS 及葡萄糖之培養基稀釋 CA-艾塞那肽-4 及艾塞那肽-4 (byetta, Amylin) 中之每一者以產生 10 nM 至 0.001 nM 之濃度。除艾塞那肽樣本外，製備稀釋溶液且用作對照組。移除 RINm5F 細胞之培養基，且向其中添加所製備之樣本，接著在 5% CO_2 恆溫箱中，在 37°C 下培養 1 hr。隨後，自各孔回收培養基。使用大鼠胰島素 ELISA 套組 (Mercodia) 來測定所回收培養基之胰島素濃度，且結果展示於圖 2 及表 2 中。

[表 2]

樣本	最大胰島素分泌與對照組之比率
CA 艾塞那肽-4	83.6%
艾塞那肽-4	43.3%

如圖 2 及表 2 中所示，發現艾塞那肽-4 衍生物中之一者 CA 艾塞那肽-4 在相同濃度下，顯示比天然艾塞那肽-4 高約 2 倍之促胰島素活性。

實施例 4. 艾塞那肽-4 衍生物之活體內功效之比較

為量測艾塞那肽-4 衍生物之活體內功效，在糖尿病動物模型中，量測其與天然艾塞那肽-4 相比之降血糖效應。將 db/db 小鼠（Jackson Lab，10-12 週齡）禁食 2 hr，且隨後分別以 0.01-1000 mcg/kg 之量投與艾塞那肽-4 及 CA 艾塞那肽-4。1hr 後，自尾部血管收集血液樣本以使用糖度計量測血糖含量。經由皮下路線投與艾塞那肽-4、CA 艾塞那肽-4 及媒劑，且計算在各濃度下之血糖相對媒劑之變化百分比。在各濃度下，使用 Prism 程式計算降血糖效應之 ED_{50} （圖 3 及表 3）。

[表 3]

樣本	ED_{50} (mcg/kg)	R^2
CA 艾塞那肽-4	2.30	0.99
艾塞那肽-4	9.92	0.98

如圖 3 及表 3 中所示，發現在糖尿病動物模型中，CA 艾塞那肽-4 顯示比天然艾塞那肽-4 高約 5 倍之降血糖效應。

本發明之效應

根據本發明之促胰島素胜肽衍生物最大化艾塞那肽之固有促胰島素活性，亦即，對 2 型糖尿病之治療效應，且誘導食物攝入降低，延遲胃排空或其類似方面，其優於天然及其他促胰島素胜肽類似物。因此，可有效提供根據本發明之促胰島素胜肽衍生物及包含其之醫藥組合物以用於治療疾病。

【圖式簡單說明】

圖 1.表示艾塞那肽-4 衍生物及天然艾塞那肽-4 依據暴露時間之血漿穩定性。(A：艾塞那肽-4，D：DA-艾塞那肽-4，H：HY-艾塞那肽-4，C：CA-艾塞那肽-4)

圖 2.表示艾塞那肽-4 衍生物中之一者 CA-艾塞那肽-4 及艾塞那肽-4 之促胰島素活性。

圖 3.表示艾塞那肽-4 衍生物中之一者 CA-艾塞那肽-4 及艾塞那肽-4 在糖尿病動物模型中之降血糖功效。

【主要元件符號說明】

無

序列表

<110> 韓美科學有限公司 (HANMI SCIENCE CO., LTD.)

<120> 經修飾N末端胺基酸的促胰島素胜肽衍生物

<130> TW 097126905

<150> KR 10-2007-0071071

<151> 2007-07-16

<150> US 60/991,155

<151> 2007-11-29

<160> 6

<170> PatentIn 3.4版

<210> 1

<211> 39

<212> PRT

<213> 鈍尾毒蜥

<400> 1

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

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

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 2

<211> 39

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> DM 艾塞那肽-4

<220>

<221> 雜項特徵

<222> (1)..(1)

<223> Xaa是二甲基-組胺鹽基

<400> 2

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

Glu Ala Val Arg 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> 人工序列

<220>
 <223> DA 艾塞那肽-4

<220>
 <221> 雜項特徵
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa是去-胺基-組胺鹽基

<400> 3

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

Glu	Ala	Val	Arg	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> 人工序列

<220>
 <223> HY 艾塞那肽-4

<220>
 <221> 雜項特徵
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa是β-羥基-咪唑-丙鹽基

<400> 4

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

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

Ser	Gly	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser
			35			

<210> 5
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CA 艾塞那肽-4

<220>

<221> 雜項特徵

<222> (1) .. (1)

<223> Xaa是咪唑-乙醯基

<400> 5

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

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

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 6

<211> 31

<212> PRT

<213> 智人

<400> 6

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
20 25 30

七、申請專利範圍：

1. 一種艾塞那肽 (exendin) -4 胜肽，其由以下式 1 組成：



其中 R1 係 β -羥基咪唑丙醯基；

R2 係選自由 $-NH_2$ 或 $-OH$ 組成之群；

X 係選自由 Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Y-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Z-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser 或 Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Y-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Z-Asn-Gly-Gly 組成之群，

Y 係選自由 Lys、Ser 及 Arg 組成之群，且

Z 係選自由 Lys、Ser 及 Arg 組成之群。

2. 如申請專利範圍第 1 項之艾塞那肽 -4 胜肽，其中 R1 為 β -羥基咪唑丙醯基，Y 為 Lys 或 Ser，Z 為 Lys 且 R2 為 $-NH_2$ 。

3. 一種用於治療糖尿病之醫藥組合物，其包含如申請專利範圍第 1 或 2 項之艾塞那肽 -4 胜肽。

八、圖式：

(如次頁)

公告本

圖1

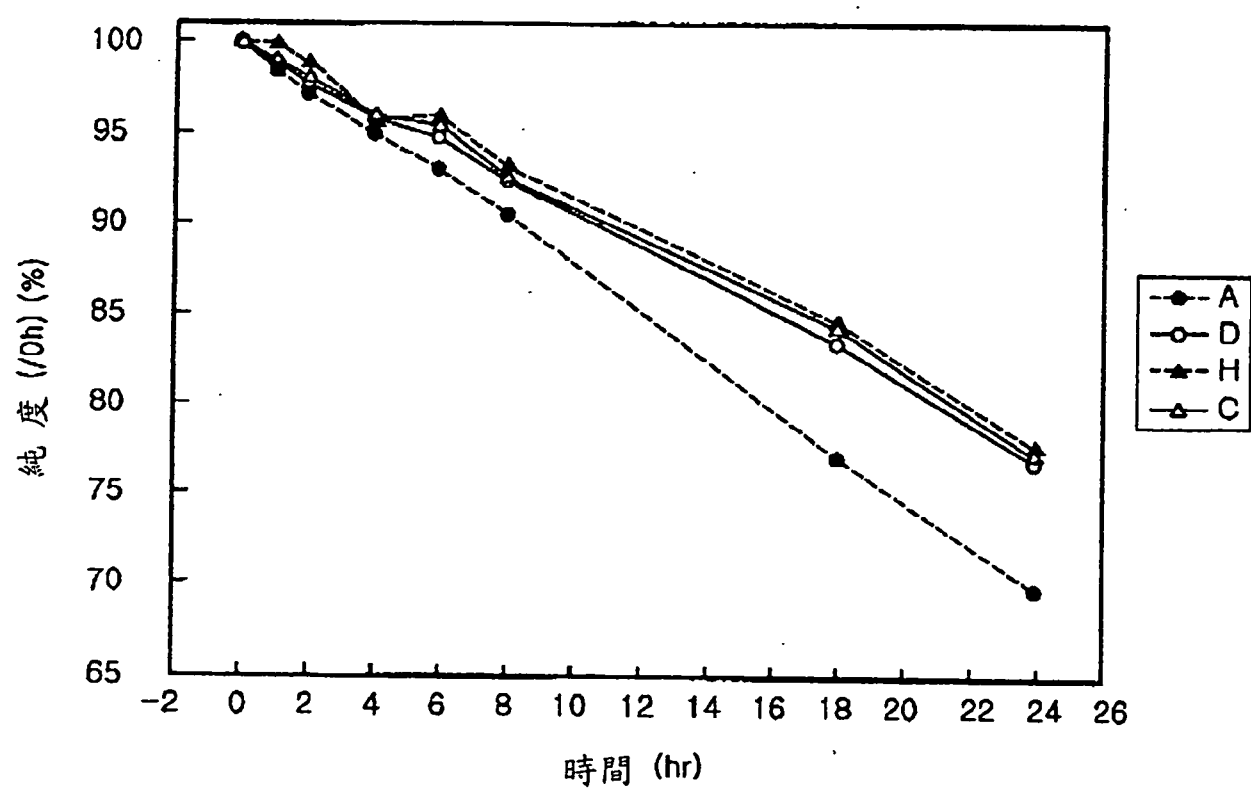


圖2

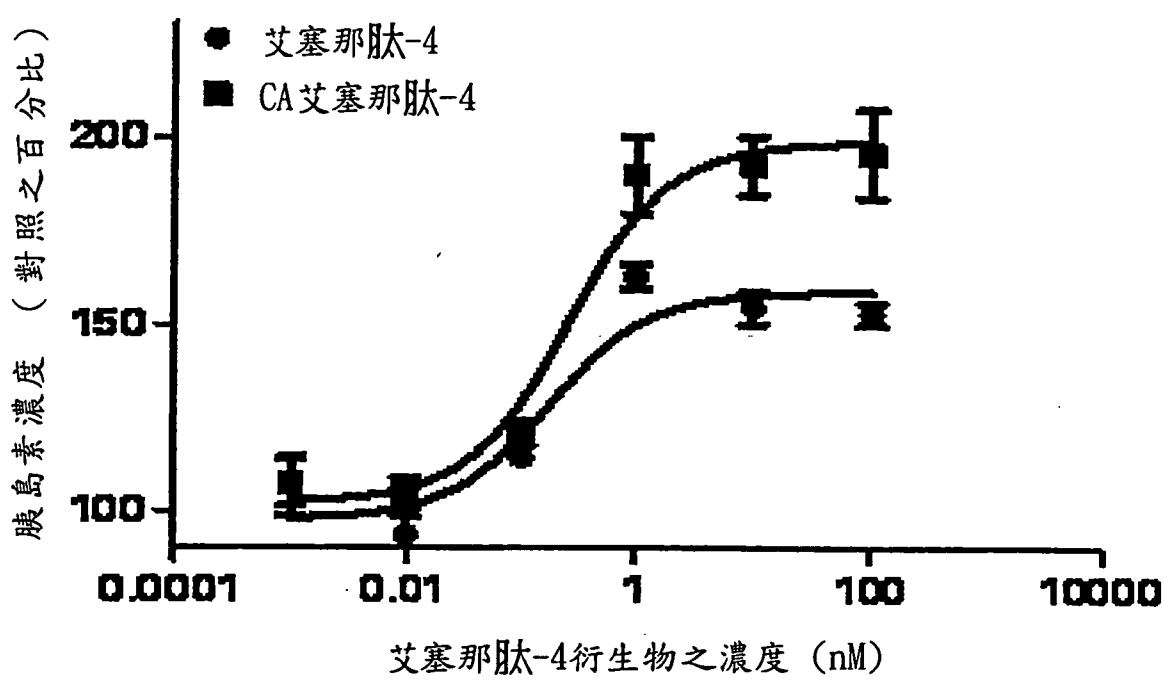


圖3

