(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2010-515677
(P2010-515677A)
(43)公表日　平成22年5月13日(2010.5.13)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C07K 14/47	(2006.01)	C07K	14/47	ZNA	4C084
A61K 38/04	(2006.01)	A61K	37/43		4H045
A61P 3/10	(2006.01)	A61P	3/10		
A61P 3/04	(2006.01)	A61P	3/04		
A61P 9/10	(2006.01)	A61P	9/10	103	

審査請求 有　予備審査請求 未請求　（全 28 頁）　最終頁に続く

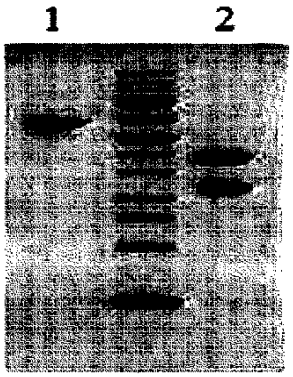
(21)出願番号　特願2009-544800 (P2009-544800)
(86)(22)出願日　平成20年1月4日 (2008.1.4)
(85)翻訳文提出日　平成21年8月18日 (2009.8.18)
(86)国際出願番号　PCT/KR2008/000061
(87)国際公開番号　WO2008/082274
(87)国際公開日　平成20年7月10日 (2008.7.10)
(31)優先権主張番号　10-2007-0001662
(32)優先日　平成19年1月5日 (2007.1.5)
(33)優先権主張国　韓国 (KR)

(71)出願人　508047691
ハンミ　ファーマシューティカル　カンパニー　リミテッド
HANMI PHARMACEUTICAL CO., LTD.
大韓民国　４４５－８１３　ギョンギド　ファソンシ　パルタンミョン　ハゾリ　８９３－５
８９３－５, Hajeo-ri, Paltan-myeon, Hwaseong-si, Gyeonggi-do, 445-813, Republic of Korea
(74)代理人　100104684
弁理士　関根　武

最終頁に続く

(54)【発明の名称】免疫グロブリン断片を用いたインスリン分泌結合体

(57)【要約】
本発明は、インスリン分泌ペプチド、非ペプチド性重合体および免疫グロブリンＦｃ領域が互いに共有結合によって連結されており、生体内持続性および安定性が向上したインスリン分泌ペプチド結合体およびその利用に関する。本発明のインスリン分泌ペプチド結合体は、比較的高く維持される生体内活性、および著しく増加した血中半減期を有するため、様々なペプチド薬物の持続型剤形の開発に有用に利用できる。



1: Non-reduction condition
2: Reduction condition

【特許請求の範囲】
【請求項１】
インスリン分泌ペプチドと免疫グロブリンＦｃ領域とが、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、エチレングリコール－プロピレングリコールの共重合体、ポリオキシエチル化ポリオール、ポリビニルアルコール、ポリサッカリド、デキストラン、ポリビニルエチルエーテル、生分解性高分子、脂質重合体、キチン類、ヒアルロン酸およびこれらの組み合わせよりなる群から選ばれる非ペプチド性重合体によって互いに連結され、前記インスリン分泌ペプチドのＮ末端以外のアミノ酸残基に前記非ペプチド性重合体が結合されたことを特徴とする、インスリン分泌ペプチド結合体。
【請求項２】
前記インスリン分泌ペプチドは、ＧＬＰ－１、エキセンディン－３、エキセンディン－４、これらのアゴニスト(agonist)、これらの誘導体(derivative)、これらの断片(fragment)、これらの変異体(variant)、およびこれらの組み合わせからよりなる群から選ばれることを特徴とする、請求項１に記載のインスリン分泌ペプチド結合体。
【請求項３】
前記誘導体は、天然型インスリン分泌ペプチドのＮ末端アミン基の置換、除去および変更の中から選ばれたいずれか一つの方法によって製造され、インスリン分泌機能を保有するペプチド、これらの断片およびこれらの変異体よりなる群から選ばれることを特徴とする、請求項２に記載のインスリン分泌ペプチド結合体。
【請求項４】
前記誘導体は、天然型インスリン分泌ペプチドのアルファカーボンおよびＮ末端アミン基が除去されたペプチド、これらの断片およびこれらの変異体よりなる群から選ばれることを特徴とする、請求項２に記載のインスリン分泌ペプチド結合体。
【請求項５】
Ｎ末端アミン基の置換、除去または変更によって製造されたエキセンディン－４誘導体と免疫グロブリンＦｃ領域とが、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、エチレングリコール－プロピレングリコールの共重合体、ポリオキシエチル化ポリオール、ポリビニルアルコール、ポリサッカリド、デキストラン、ポリビニルエチルエーテル、生分解性高分子、脂質重合体、キチン類、ヒアルロン酸およびこれらの組み合わせよりなる群から選ばれる非ペプチド性重合体によって互いに連結され、天然型エキセンディン－４結合体より血糖低下効果および生体内持続性が向上したことを特徴とする、インスリン分泌ペプチド結合体。
【請求項６】
前記エキセンディン－４誘導体は、エキセンディン－４のＮ末端アミン基が除去されたエキセンディン－４誘導体、エキセンディン－４のＮ末端アミン基がヒドロキシル基で置換されたエキセンディン－４誘導体、エキセンディン－４のＮ末端アミン基がジメチル基に変更されたエキセンディン－４誘導体、インスリン分泌ペプチドのうちエキセンディン－４の一番目のアミノ酸（ヒスチジン）のアルファ炭素を除去したエキセンディン－４誘導体、エキセンディン－４の１２番目のアミノ酸（リシン）がセリンで置換されたエキセンディン－４誘導体、およびエキセンディン－４の１２番目のアミノ酸（リシン）がアルギニンで置換されたエキセンディン－４誘導体よりなる群から選ばれることを特徴とする、請求項５に記載のインスリン分泌ペプチド結合体。
【請求項７】
エキセンディン－４のＮ末端アミン基が除去されたデス－アミノ－ヒスチジル(des-amino-histidyl)エキセンディン－４と免疫グロブリンＦｃ領域とが、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、エチレングリコール－プロピレングリコールの共重合体、ポリオキシエチル化ポリオール、ポリビニルアルコール、ポリサッカリド、デキストラン、ポリビニルエチルエーテル、生分解性高分子、脂質重合体、キチン類、ヒアルロン酸およびこれらの組み合わせよりなる群から選択される非ペプチド性重合体によって互いに連結され、天然型エキセンディン－４結合体より血糖低下効果および生体内持続性が向上

したことを特徴とする、インスリン分泌ペプチド結合体。
【請求項８】
エキセンディン－４のＮ末端アミン基が除去されたデス－アミノ－ヒスチジルエキセンディン－４とアルブミンとが、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、エチレングリコール－プロピレングリコールの共重合体、ポリオキシエチル化ポリオール、ポリビニルアルコール、ポリサッカリド、デキストラン、ポリビニルエチルエーテル、生分解性高分子、脂質重合体、キチン類、ヒアルロン酸およびこれらの組み合わせよりなる群から選択される非ペプチド性重合体によって互いに連結され、天然型エキセンディン－４結合体より血糖低下効果および生体内持続性が向上したことを特徴とする、インスリン分泌ペプチド結合体。
【請求項９】
エキセンディン－４のＮ末端アミン基がヒドロキシル基で置換されたエキセンディン－４と免疫グロブリンＦｃ領域とが、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、エチレングリコール－プロピレングリコールの共重合体、ポリオキシエチル化ポリオール、ポリビニルアルコール、ポリサッカリド、デキストラン、ポリビニルエチルエーテル、生分解性高分子、脂質重合体、キチン類、ヒアルロン酸およびこれらの組み合わせよりなる群から選択される非ペプチド性重合体によって互いに連結され、天然型エキセンディン－４結合体より血糖低下効果および生体内持続性が向上したことを特徴とする、インスリン分泌ペプチド結合体。
【請求項１０】
エキセンディン－４のＮ末端アミン基がヒドロキシル基で置換されたエキセンディン－４とアルブミンとが、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、エチレングリコール－プロピレングリコールの共重合体、ポリオキシエチル化ポリオール、ポリビニルアルコール、ポリサッカリド、デキストラン、ポリビニルエチルエーテル、生分解性高分子、脂質重合体、キチン類、ヒアルロン酸およびこれらの組み合わせよりなる群から選択される非ペプチド性重合体によって互いに連結され、天然型エキセンディン－４結合体より血糖低下効果および生体内持続性が向上したことを特徴とする、インスリン分泌ペプチド結合体。
【請求項１１】
エキセンディン－４のＮ末端ヒスチジン残基のアルファ炭素およびアルファ炭素に結合されたＮ末端アミン基が除去されたエキセンディン－４誘導体と免疫グロブリンＦｃ領域とが、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、エチレングリコール－プロピレングリコールの共重合体、ポリオキシエチル化ポリオール、ポリビニルアルコール、ポリサッカリド、デキストラン、ポリビニルエチルエーテル、生分解性高分子、脂質重合体、キチン類、ヒアルロン酸およびこれらの組み合わせよりなる群から選択される非ペプチド性重合体によって互いに連結され、天然型エキセンディン－４結合体より血糖低下効果および生体内持続性が向上したことを特徴とする、インスリン分泌ペプチド結合体。
【請求項１２】
エキセンディン－４のＮ末端ヒスチジン残基のアルファ炭素およびアルファ炭素に結合したＮ末端アミン基が除去されたエキセンディン－４誘導体とアルブミンとが、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、エチレングリコール－プロピレングリコールの共重合体、ポリオキシエチル化ポリオール、ポリビニルアルコール、ポリサッカリド、デキストラン、ポリビニルエチルエーテル、生分解性高分子、脂質重合体、キチン類、ヒアルロン酸およびこれらの組み合わせよりなる群から選択される非ペプチド性重合体によって互いに連結され、天然型エキセンディン－４結合体より血糖低下効果および生体内持続性が向上したことを特徴とする、インスリン分泌ペプチド結合体。
【請求項１３】
下記化学式１のアミノ酸配列を有する、インスリン分泌ペプチド誘導体。
$R_1－X－Y－Z－R_2$　　……<化学式１>
（式中、R_1はヒスチジン、デス－アミノ－ヒスチジル基、Ｎ－ジメチル－ヒスチジル

基、ベーターヒドロキシイミダゾプロピル基および４－イミダゾアセチル基よりなる群から選択され、
R_2は－NH_2、－ＯＨおｙび－Ｌｙｓよりなる群から選択され、
ＸはＧｌｙ－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ－Ｔｈｒ－Ｐｈｅ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ａｓｐ－Ｌｅｕ－Ｓｅｒ－R_3－Ｇｌｎ－Ｍｅｔ－Ｇｌｕ－Ｇｌｕ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｖａｌ－Ａｒｇ－Ｌｅｕ－Ｐｈｅ－Ｉｌｅ－Ｇｌｕ－Ｔｒｐ－Ｌｅｕ－R_4－Ａｓｎ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｐｒｏ－Ｓｅｒ－Ｓｅｒ－Ｇｌｙ－Ａｌａ－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－Ｓｅｒ、Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ－Ｔｈｒ－Ｐｈｅ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ａｓｐ－Ｌｅｕ－Ｓｅｒ－R_3－Ｇｌｎ－Ｍｅｔ－Ｇｌｕ－Ｇｌｕ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｖａｌ－Ａｒｇ－Ｌｅｕ－Ｐｈｅ－Ｉｌｅ－Ｇｌｕ－Ｔｒｐ－Ｌｅｕ－R_4－Ａｓｎ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ、およびＳｅｒ－Ａｓｐ－Ｇｌｙ－Ｔｈｒ－Ｐｈｅ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ａｓｐ－Ｌｅｕ－Ｓｅｒ－R_3－Ｇｌｎ－Ｍｅｔ－Ｇｌｕ－Ｇｌｕ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｖａｌ－Ａｒｇ－Ｌｅｕ－Ｐｈｅ－Ｉｌｅ－Ｇｌｕ－Ｔｒｐ－Ｌｅｕ－R_4－Ａｓｎ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｐｒｏ－Ｓｅｒ－Ｓｅｒ－Ｇｌｙ－Ａｌａ－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－Ｓｅｒよりなる群から選択され、
R_3はＬｙｓ、ＳｅｒおよびＡｒｇよりなる群から選択され、
R_4はＬｙｓ、ＳｅｒおよびＡｒｇよりなる群から選択され、
Ｙはポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、エチレングリコール－プロピレングリコールの共重合体、ポリオキシエチル化ポリオール、ポリビニルアルコール、ポリサッカリド、デキストラン、ポリビニルエチルエーテル、生分解性高分子、脂質重合体、キチン類、ヒアルロン酸およびこれらの組み合わせよりなる群から選択され、
Ｚは免疫グロブリンＦｃ領域である。）

【請求項１４】
非ペプチド性重合体の両末端がそれぞれ免疫グロブリンＦｃ領域およびインスリン分泌ペプチドのアミン基またはチオール基に結合されたことを特徴とする、請求項１に記載のインスリン分泌ペプチド結合体。

【請求項１５】
免疫グロブリンＦｃ領域が脱糖化(deglycosylated)されることを特徴とする、請求項１に記載のインスリン分泌ペプチド結合体。

【請求項１６】
免疫グロブリンＦｃ領域が、C_H1、C_H2、C-$_H$３およびC_H4ドメインよりなる群から選ばれる１つ～４つのドメインからなることを特徴とする、請求項１に記載のインスリン分泌ペプチド結合体。

【請求項１７】
免疫グロブリンＦｃ領域がヒンジ領域をさらに含むことを特徴とする、請求項１６に記載のインスリン分泌ペプチド結合体。

【請求項１８】
免疫グロブリンＦｃ領域が、ＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥおよびＩｇＭよりなる群から選ばれる免疫グロブリン由来のＦｃ領域であることを特徴とする、請求項１～５のいずれか１項に記載のインスリン分泌ペプチド結合体。

【請求項１９】
免疫グロブリンＦｃ領域のそれぞれのドメインが、ＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥおよびＩｇＭよりなる群から選ばれる免疫グロブリンに由来の相異なる起源を有するドメインハイブリッドであることを特徴とする、請求項１８に記載のインスリン分泌ペプチド結合体。

【請求項２０】
免疫グロブリンＦｃ領域が、同一起源の単鎖免疫グロブリンからなる二量体または多量体（免疫グロブリンＦｃの組み合わせ）である、請求項１８に記載のインスリン分泌ペプチド結合体。

【請求項２１】
免疫グロブリンＦｃ領域がＩｇＧ４　Ｆｃ領域であることを特徴とする、請求項１８に

記載のインスリン分泌ペプチド結合体。
【請求項２２】
免疫グロブリンＦｃ領域がヒト脱糖化ＩｇＧ４ Ｆｃ領域であることを特徴とする、請求項２１に記載のインスリン分泌ペプチド結合体。
【請求項２３】
非ペプチド性重合体の反応基がアルデヒド基、プロピオンアルデヒド基、ブチルアルデヒド基、マレイミド基およびスクシンイミド誘導体よりなる群から選ばれることを特徴とする、請求項１に記載のインスリン分泌ペプチド結合体。
【請求項２４】
スクシンイミド誘導体がスクシンイミジルプロピオネート、スクシンイミジルカルボキシメチル、ヒドロキシスクシンイミジルおよびスクシンイミジルカーボネートよりなる群から選ばれることを特徴とする、請求項２３に記載のインスリン分泌ペプチド結合体。
【請求項２５】
非ペプチド性重合体が両末端に反応性アルデヒド基を有することを特徴とする、請求項２３に記載のインスリン分泌ペプチド結合体。
【請求項２６】
非ペプチド性重合体がポリエチレングリコールであることを特徴とする、請求項２５に記載のインスリン分泌ペプチド結合体。
【請求項２７】
（１）両末端にアルデヒド、マレイミド、およびスクシンイミド誘導体の中から選ばれる反応基を有する非ペプチド性重合体をインスリン分泌ペプチドのアミン基またはチオール基に共有結合させる段階と、
（２）前記（１）の反応混合物から、Ｎ末端のアミノ酸以外のアミノ酸に非ペプチド性重合体が共有結合されたインスリン分泌ペプチドを含む結合体を分離する段階と、
（３）分離された結合体の非ペプチド性重合体の他方の末端に免疫グロブリンＦｃ領域を共有結合によって連結することにより、非ペプチド性重合体の両末端がそれぞれ免疫グロブリンＦｃ領域およびインスリン分泌ペプチドと結合されたタンパク質結合体を生成する段階とを含む、インスリン分泌ペプチド結合体の製造方法。
【請求項２８】
（１）両末端にアルデヒド反応基を有する非ペプチド性重合体をインスリン分泌ペプチドのリシン残基にｐＨ７．５以上で共有結合させる段階と、
（２）前記（１）の反応混合物から、リシン残基に非ペプチド性重合体が共有結合されたインスリン分泌ペプチドを含む結合体を分離する段階と、
（３）分離された結合体の非ペプチド性重合体の他方の末端に免疫グロブリンＦｃ領域を共有結合によって連結することにより、非ペプチド性重合体の両末端がそれぞれ免疫グロブリンＦｃ領域およびインスリン分泌ペプチドと結合ｓれたタンパク質結合体を生成する段階とを含む、インスリン分泌ペプチド結合体の製造方法。
【請求項２９】
前記インスリン分泌ペプチドは、エキセンディン－４のＮ末端アミン基が除去されたデス－アミノ－ヒスチジル(des-amino-histidyl)エキセンディン－４誘導体であることを特徴とする、請求項２７または２８に記載のインスリン分泌ペプチド結合体の製造方法。
【請求項３０】
前記インスリン分泌ペプチドは、エキセンディン－４のＮ末端アミン基がヒドロキシル基で置換されたエキセンディン－４誘導体であることを特徴とする、請求項２７または２８に記載のインスリン分泌ペプチド結合体の製造方法。
【請求項３１】
前記インスリン分泌ペプチドは、エキセンディン－４の一番目のアミン酸（ヒスチジン）のアルファカーボンが除去されたエキセンディン－４誘導体であることを特徴とする、請求項２７または２８に記載のインスリン分泌ペプチド結合体の製造方法。
【請求項３２】

前記非ペプチド性重合体がポリエチレングリコールであることを特徴とする、請求項２７または２８に記載のインスリン分泌ペプチド結合体の製造方法。

【請求項３３】

請求項１～３２のいずれか１項のタンパク質結合体を含む、糖尿、肥満、急性冠症候群または多嚢胞性卵巣症候群治療用薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、インスリン分泌ペプチドの持続型剤形のためのインスリン分泌ペプチド結合体に関する。具体的には、本発明は、インスリン分泌ペプチドを非ペプチド性重合体および免疫グロブリンＦｃ領域と共有結合によって相互連結させることにより、生体内持続効能をより画期的に増加させた、変形されたインスリン分泌ペプチド結合体およびその製造方法に関する。

【背景技術】

【０００２】

一般に、ペプチドは、安定性が低くて容易に変性されるうえ、体内タンパク質加水分解酵素によって分解されてその活性を失いし、相対的に大きさが小さくて腎臓を介して容易に除去される。そのため、薬理学的有効成分としてペプチドを含む医薬品の血中濃度および力価を維持するためには、ペプチド薬物を患者に頻繁に投与する必要がある。ところが、ペプチド薬物の大部分は注射剤の形態で患者に投与され、このような頻繁な注射投与は患者の夥しい苦痛を引き起こす。かかる問題点を克服するために様々な試みが行われてきた。このような試みの一つとして、ペプチド薬物の生体膜透過度を増加させて口腔または鼻腔による吸入によってペプチドの薬物を体内に伝達する試みがあった。ところが、このような方法は、注射剤に比べてペプチド薬物の体内伝達効率が著しく低いため、ペプチド薬物の体内活性を要求する条件に維持するには依然として難しさが多い。

【０００３】

一方、ペプチド薬物の血中安定性を増加させ、血中薬物濃度を長期間高く持続させて薬効を極大化しようとする努力が続けられてきた。このようなペプチド薬物の持続型製剤は、患者に免疫反応を誘発せず、ペプチド薬物の安定性を高めるうえ、薬物自体の力価が十分に高く維持されなければならない。

ペプチドを安定化させ且つタンパク質加水分解酵素による分解を抑制するための方法として、タンパク質加水分解酵素に敏感な特定のアミノ酸配列を変更する試みが行われてきた。例えば、血中グルコース濃度を減少させる作用をし、第２型糖尿病を治療するＧＬＰ－１（７－３７または７－３６アミド）は、生理活性半減期が約４分以下(Kreymann et al., 1987)と短いが、これはジペプチジルペプジダーゼＩＶ（Dipeptidyl pepdidase ＩＶ、ＤＰＰ ＩＶ）によるＧＬＰ－１の８番目のアミノ酸（Ａｌａ）と９番目のアミノ酸（Ａｓｐ）間の切断によるＧＬＰ－１の力価喪失に起因する。結果的に、ＤＰＰ ＩＶに抵抗性を有するＧＬＰ－１類似体に対する様々な研究が行われた。このような研究によってＡｌａ^{8}をＧｌｙで置換し(Deacon et al., 1998; Burcelin et al., 1999)、或いはＡｌａ^{8}をＬｅｕまたはＤ－Ａｌａで置換して(Xiao et al., 2001)ＤＰＰ ＩＶに対する抵抗性を増加させながら活性を維持することができた。ＧＬＰ－１のＮ末端アミノ酸Ｈｉｓ^{7}はＧＬＰ－１の活性に非常に重要であり、ＤＰＰ ＩＶのターゲットとして提供される。したがって、米国特許第５，５４５，６１８号では、Ｎ末端をアルキルまたアシル基に変形し、Ｇａｌｌｗｉｔｚなどは７番目のＨｉｓをＮ－メチル化(N-methylation)またはα－メチル化(alpha-methylation)させるか、あるいはＨｉｓ全体をイミダゾールで置換してＤＰＰ ＩＶ抵抗性を増加させ、生理活性を維持した。

【０００４】

これらの変形体以外に、アメリカドクトカゲ(glia monster)の唾液腺から精製されたＧＬＰ－１類似体エキセンディン(exendin)-４（ 米国特許第５，４２４，６８６号）は、ＤＰＰ ＩＶに対する抵抗性と共に、ＧＬＰ－１に比べて高い生理活性を有する。よって

、体内半減期が２～４時間であってＧＬＰ－１に比べて長くなった。ところが、ＤＰＰＩＶの抵抗性を増加させる方法のみでは、十分な生理活性の持続時間を期待することができない。例えば、現在市販されているエキセディン－４（exenatide）の場合、患者に１日２回注射によって投与されなければならないが、これは依然として患者に大きい負担となっている。

このようなインスリン分泌ペプチドの問題点は、ペプチドの大きさが小さいため、腎臓から回収されず、体外に消失されることである。よって、腎臓における消失を抑制するために、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）などの溶解度の高い高分子物質をペプチドの表面に化学的に付加させる方法が使用されてきた。

【０００５】

ＰＥＧは、目的ペプチドの特定の部位または様々な部位に非特異的に結合してペプチドの分子量を増加させることにより腎臓による消失を抑制し、加水分解を防止するには効果があり、特別な副作用も起さない。例えば、国際特許公開公報ＷＯ２００６／０７６４７１は、ＮＰＲ－Ａに結合してｃＧＭＰの生産を活性化して動脈内の血圧を減少させることにより、うっ血性心不全(congestive heart failure)治療剤として用いられるＢ型ナトリウム排泄増加ペプチド（B-type natriuretic peptide、ＢＮＰ）にＰＥＧを結合して生理活性を持続させることについて開示している。 米国特許第６，９２４，２６４号では、エキセディン－４のリジン残基にＰＥＧを結合させて生体内持続時間を増加させる方法について開示している。ところが、このような方法は、ＰＥＧ分子量を増加させてペプチド薬物の生体内持続時間を延長することができるが、分子量が増加するほどペプチド薬物の力価が著しく低くなりかつペプチドとの反応性が低くなって収率が減少するという問題がある。

【０００６】

国際特許公開公報ＷＯ０２／４６２２７は、組み換え遺伝子技術を用いたＧＬＰ－１、エキセディン－４またはその類似体と、ヒト血清アルブミンまたは免疫グロブリン断片（Ｆｃ）との融合タンパク質について開示している。 米国特許第６，７５６，４８０号は、副甲状腺ホルモン（ＰＴＨ）およびその類似体とＦｃ融合タンパク質について開示している。このような方法は、低いＰＥＧ化収率(pegylation yield)および非特異性問題を克服することができるが、血中半減期の増加効果が予想より画期的ではなく、場合に応じては力価が低いという問題点をもっている。血中半減期の増加効果を極大化するために様々な種類のペプチドリンカーが使用されたりもするが、免疫反応を誘発する可能性がある。また、ＢＮＰのようにジスルフィド結合を持っているペプチドを用いる場合、ミスフォールディング(misfolding)の確率が高いため、このようなペプチドを適用することが難しいという問題点がある。

【０００７】

この他に、ＧＬＰ－１誘導体であるＮＮ２２１１は、ＧＬＰ－１のアミノ酸を置換し、アシル側鎖を結合させてアルブミンと非共有結合をなすようにすることにより、体内持続時間を増加させた。ところが、半減期が１１～１５時間であってエキセンディン－４に比べて著しい増加がないため、ＧＬＰ－１誘導体は依然として１日１回注射による投与が必要である(Nauck et al., 2004)。また、ＣＪＣ－１１３１は、ＧＬＰ－１とアルブミンとが血液内で共有結合されるようにマレイミド反応基を有するＧＬＰ－１誘導体であって、生体内半減期の増加を目的として開発を試みたが、最近開発が中断した状態である。後続の物質であるＣＪＣ－１１３４は、組み換えアルブミンと共有結合によって連結されたエキセンディン－４であって、約１７時間（Ｒａｔ）の血中半減期を有するため、顕著な血中安定性の増加効果を示していない(Thibauoleau et.al., 2006)。

【先行技術文献】

【特許文献】

【０００８】

【特許文献１】米国特許第５，４２４，６８６号

【特許文献２】国際特許公開公報ＷＯ２００６／０７６４７１

【特許文献３】米国特許第６，９２４，２６４号
【特許文献４】国際特許公開公報ＷＯ０２／４６２２７
【特許文献５】米国特許第６，７５６，４８０号
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００９】
そこで、本発明者らは、インスリン分泌ペプチドの血中半減期の増加および生体内活性の維持を同時に極大化することが可能な方法として、免疫グロブリンＦｃ領域、非ペプチド性重合体およびインスリン分泌ペプチドを共有結合によってＮ－末端以外のアミノ酸残基に部位選択的に相互連結させることにより、生体内効力持続効果が画期的に増加することを確認した。特に、本発明者らはインスリン分泌ペプチド結合体のうち、たとえばエキセンディン－４、エキセンディン－４のＮ末端アミン基を除去したデス－アミノ－ヒスチジルエキセンディン－４(des-amino-histidyl exendin-4)、エキセンディン－４のＮ末端アミン基をヒドロキシル基で置換したベーター－ヒドロキシ－イミダゾ－プロピオニルエキセンディン－４(beta-hydroxyl-imidazo-propionyl exendin-4)のＮ末端アミン基を２つのメチル基に変更したジメチル－ヒスチジルエキセンディン－４(dimethyl-histidyl exendin-4)、およびエキセンディン－４の１番目のアミノ酸であるヒスチジンのアルファ炭素およびこれに結合したＮ末端アミン基を除去したイミダゾ－アセチル－エキセンディン－４(imidazo-acetyl-exendin-4)のようなペプチド結合体の生体内効力持続効果が画期的に増加することを見出し、本発明を完成した。
【課題を解決するための手段】
【００１０】
本発明の目的は、インスリン分泌ペプチドの生体内活性を維持しながら血中半減期を延長させたインスリン分泌ペプチド持続型製剤を提供することにある。
【図面の簡単な説明】
【００１１】
【図１】図１は天然型エキセンディン－４（Ｎ）－ＰＥＧ－免疫グロブリンＦｃ結合体の純度を逆相ＨＰＬＣで分析した結果である。
【図２】図２は天然型エキセンディン－４（Ｌｙｓ）－ＰＥＧ－免疫グロブリンＦｃ結合体の純度を逆相ＨＰＬＣで分析した結果である。
【図３】図３はデス－アミノ－ヒスチジルエキセンディン－４（Ｌｙｓ）－ＰＥＧ－免疫グロブリンＦｃ結合体の純度を逆相ＨＰＬＣで分析した結果である。
【図４】図４はベーター－ヒドロキシ－イミダゾ－プロピオニル、すなわち、（2-ヒドロキシ－３－（1H- イミダゾール-4- ｙｌ）プロピオニル） エキセンディン－４（Ｌｙｓ）－ＰＥＧ－免疫グロブリンＦｃ結合体の純度を逆相ＨＰＬＣで分析した結果である。
【図５】図５はイミダゾ－アセチル、すなわち、（2-（1H-イミダゾール-4- ｙｌ）アセチル）エキセンディン－４（Ｌｙｓ）－ＰＥＧ－免疫グロブリンＦｃ結合体の純度を逆相ＨＰＬＣで分析した結果である。
【図６】図６はＳｅｒ１２－変異された－デス－アミノ－ヒスチジルエキセンディン－４（Ｌｙｓ）－ＰＥＧ－免疫グロブリンＦｃ結合体の純度を逆相ＨＰＬＣで分析した結果である。
【図７】図７はＡｒｇ１２－変異された－デス－アミノ－ヒスチジルエキセンディン－４（Ｌｙｓ）－ＰＥＧ－免疫グロブリンＦｃ結合体の純度を逆相ＨＰＬＣで分析した結果である。
【図８】図８はデス－アミノ－ヒスチジルエキセンディン－４（Ｌｙｓ）－ＰＥＧ－ヒト血清アルブミン（ＨＳＡ）結合体の純度を逆相ＨＰＬＣで分析した結果である。
【図９】図９はジメチル－ヒスチジルエキセンディン－４（Ｌｙｓ）－ＰＥＧ－免疫グロブリンＦｃ結合体の純度を逆相ＨＰＬＣで分析した結果である。
【図１０】図１０はＧＬＰ－１（Ｎ）－ＰＥＧ－免疫グロブリンＦｃ結合体の純度を逆相ＨＰＬＣで分析した結果である。

【図１１】図１１はデス－アミノ－ヒスチジルＧＬＰ－１（Ｌｙｓ）－ＰＥＧ－免疫グロブリンＦｃ結合体の純度を逆相ＨＰＬＣで分析した結果である。
【図１２】図１２は天然型エキセンディン－４（Ｌｙｓ）－ＰＥＧ－免疫グロブリンＦｃ結合体の純度を逆相ＨＰＬＣで分析した結果である。
【図１３】図１３はイミダゾ－アセチル、すなわち、（2-（1H-イミダゾール-4- ｙｌ）アセチル）、エキセンディン－４（Ｌｙｓ）－ＰＥＧ－免疫グロブリンＦｃ結合体を１２％ＳＤＳ－ＰＡＧＥで分析した結果である。
【図１４】図１４はデス－アミノ－ヒスチジルエキセンディン－４（Ｌｙｓ）－ＰＥＧ－免疫グロブリンＦｃ結合体の血中グルコース濃度の減少効果を測定した結果である。
【発明を実施するための形態】
【００１２】
一様態において、本発明は、インスリン分泌ペプチドと両末端に反応基を有する非ペプチド性重合体とが相互共有結合によって連結されている持続型インスリン分泌ペプチド結合体に関する。
本発明で使用されるインスリン分泌ペプチドは、インスリン分泌機能を保有したペプチドであって、膵臓ベータ細胞のインスリンの合成および発現を刺激する。このようなペプチドは、前駆物質(precursors)、アゴニスト(agonist)、誘導体(derivatives)、断片(fragments)および変異体(variants)を含み、好ましくはＧＬＰ(Glucagon like peptide)－１、エキセンディン３(exendin 3)およびエキセンディン４(exendin 4)である。
ＧＬＰ－１は、小腸で分泌されるホルモンであって、一般に、インスリンの生合成および分泌を促進し、グルカゴン分泌を抑制し、細胞内のグルコース吸収を促進する。グルカゴン前駆体は小腸で３つのペプチド、すなわちグルカゴン、ＧＬＰ－１およびＧＬＰ－２に分解される。ここで、ＧＬＰ－１はＧＬＰ－１（１－３７）を意味し、元々インスリン分泌機能のない形態であるが、ＧＬＰ－１（７－３７）の形態でプロセスされて活性型ＧＬＰ－１（７－３７）になる。ＧＬＰ－１（７－３７）アミノ酸配列は、次のとおりである：
ＧＬＰ－１（７－３７）
ＨＡＥＧＴ ＦＴＳＤＶ ＳＳＹＬＥ ＧＱＡＡＫ ＥＰＩＡＷ ＬＶＫＧＲ Ｇ
【００１３】
ＧＬＰ－１誘導体は、ＧＬＰ－１と比較して少なくとも８０％アミノ酸配列で相同性を示し、化学的に変更された形態であってもよく、ＧＬＰ－１と比較してインスリン分泌機能も少なくとも同等またはそれ以上を示すペプチドを意味する。
ＧＬＰ－１断片は、天然型ＧＬＰ－１のＮ末端またはＣ末端に対して一つまたはそれ以上のアミノ酸が追加または削除された形態を意味し、追加されたアミノ酸は天然に存在しないアミノ酸（例えば、Ｄ型アミノ酸）も可能である。
ＧＬＰ－１変異体は、天然型ＧＬＰ－１とアミノ酸配列が少なくとも一つ異なるペプチドであって、インスリン分泌機能を保有したペプチドを意味する。
エキセンディン３とエキセンディン４は、ＧＬＰ－１と５３％のアミノ酸配列類似性を示す３９個のアミノ酸からなるインスリン分泌ペプチドであり、エキセンディン－３とエキセンディン－４のアミノ酸配列は、次のとおりである：
エキセンディン－３
ＨＳＤＧＴ ＦＴＳＤＬ ＳＫＱＭＥ ＥＥＡＶＲ ＬＦＩＥＷ ＬＫＮＧＧ ＰＳＳＧＡ ＰＰＰＳ
エキセンディン－４
ＨＧＥＧＴ ＦＴＳＤＬ ＳＫＱＭＥ ＥＥＡＶＲ ＬＦＩＥＷ ＬＫＮＧＧ ＰＳＳＧＡ ＰＰＰＳ
【００１４】
エキセンディンアゴニストは、エキセンディンの構造を問わずに、エキセンディンの生体内受容体に結合してエキセンディンと同一の生物学的活性を示す物質を意味する。エキセンディン誘導体は、天然型エキセンディンと比較して少なくとも８０％アミノ酸配列で

相同性を示し、アミノ酸残基の一部グループが化学的に置換（例えば、アルファーメチル化、アルファーヒドロキシル化）、除去（例えば、脱アミノ化）または変更（例えば、Ｎメチル化）された形態であってもよく、インスリン分泌機能を保有したペプチドを意味する。

エキセンディン断片は、天然型エキセンディンのＮ末端またはＣ末端に対して一つまたはそれ以上のアミノ酸が追加または削除された形態を意味し、天然に存在しないアミノ酸（例えば、Ｄ型アミノ酸）の追加も可能である。このようなエキセンディン断片はインスリン分泌機能を保有する。

エキセンディン変異体は、天然型エキセンディンとアミノ酸配列が少なくとも一つ異なるペプチドであって、インスリン分泌機能を保有したペプチドを意味する。

エキセンディンアゴニスト、誘導体、断片および変異体でそれぞれ使用された製造方法は、独立に使用でき、組み合わせも可能である。例えば、本発明は天然型インスリン分泌ペプチドとはアミノ酸配列が少なくとも一つ異なり、Ｎ末端アミノ酸残基に脱アミノ化アミノ酸配列を有するインスリン分泌ペプチドも含まれる。

【００１５】

具体的な一様態において、本発明で使用した天然型インスリン分泌ペプチドと変形されたインスリン分泌ペプチドは固相法によって合成でき、天然型インスリン分泌ペプチドを含む大部分の天然型ペプチドは組み換え方法によっても生産可能である。

また、本発明で使用されたインスリン分泌ペプチドは、様々な部位で非ペプチド性重合体と結合できる。本発明で製造したペプチド結合体は、インスリン分泌ペプチドの結合部位によって活性の差異があり得る。

たとえば、Ｎ末端部位およびＣ末端などのＮ末端以外の部位にそれぞれカップリングしてインビトロ(in vitro)活性の差異を確認することができる。アルデヒド反応基は、低いｐＨでＮ末端に選択的に反応し、高いｐＨ条件、例えばｐＨ９．０ではリジン残基とも共有結合を形成することができる。反応ｐＨを変えながらＰＥＧ化(Pegylation)反応を行った後、イオン交換カラムを用いて反応混合物から位置異性体を分離することができる。

【００１６】

インスリン分泌ペプチドが、生体内活性に重要な部位であるＮ末端以外の位置にカップリングする場合、天然型アミノ酸配列で変更しようとするアミノ酸残基位置に反応性チオール基を導入して非ペプチド性重合体のマレイミドリンカーを用いて共有結合を形成することができる。

インスリン分泌ペプチドが、生体内活性に重要な部位であるＮ末端以外の位置にカップリングする場合、天然型アミノ酸配列で変更しようとするアミノ酸残基位置に反応性のあるアミン基を導入して非ペプチド性重合体のアルデヒドリンカーを用いて共有結合を形成することができる。

非ペプチド性重合体にあるアルデヒドリンカーを使用すると、このようなアルデヒドリンカーは、Ｎ末端およびリシン残基にあるアミン基と反応し、選択的に反応収率を向上させるために、変形された形態のインスリン分泌ペプチドを使用することができる。たとえば、Ｎ末端をブロッキングする方法、リシン残基を置換する方法、カルボキシル末端にアミン基を導入する方法などを用いて反応することが可能なアミン基を所望の位置に一つのみ維持することができ、これによりＰＥＧ化およびカップリング収率を向上させることができる。Ｎ末端の保護方法は、ジメチル化(dimethylation)の他に、メチル化(methylation)、脱アミノ化(deamination)またはアセチる化(acetylation)方法も使用可能であり、このようなアルキル化(alkylation)方法に限定されない。

【００１７】

本発明の好適な様態において、本発明のインスリン分泌ペプチド結合体は、インスリン分泌ペプチドのＮ末端以外のアミン基に特異的に免疫グロブリンＦｃ領域が結合されたインスリン分泌ペプチド結合体である。

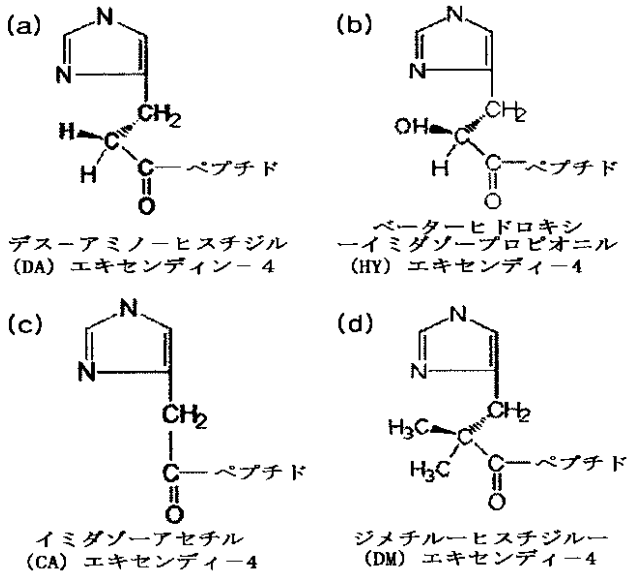
具体的な一実施例において、本発明者らは、インスリン分泌ペプチドのリシン残基に選択的にＰＥＧをカップリングするための方法として、ｐＨ９．０で天然型エキセンディン

－４のＰＥＧ化反応を誘導した。他の方法として、リシン残基でＰＥＧ化するために、ｐＨ７．５でＮ末端が除去または保護された形態のエキセンディン－４誘導体のＰＥＧ化反応を行った。Ｎ末端ヒスチジンのアルファアミン基を除去する方法、Ｎ末端アミノ基をヒドロキシル基で置換する方法、Ｎ末端ヒスチジンのアルファアミン基に２つのメチル基を付ける方法、一番目のアミノ酸（ヒスチジン）のアルファ炭素およびこれに結合されているＮ末端アミン基を除去してイミダゾ－アセチル基のみを残す方法などを用いて、Ｎ末端のＰＥＧ化を予め防止した。このような誘導体を下記化学式１に示した。

<化学式１>

【００１８】

【化１】



【００１９】

Ｎ末端カップリングの場合とは異なり、ＰＥＧがＮ末端を除いたリシン残基にカップリングされると、インビトロ活性が約８．５％程度維持されることを確認することができた（表１）。また、エキセンディン－４のＮ末端アミン基を除去したデス－アミノ－ヒスチジルエキセンディン－４（des-amino-histidyl exendin-4、以下「ＤＡ－エキセンディン－４」とも称する）、エキセンディン－４のＮ末端アミン基をヒドロキシルで置換したベーターヒドロキシ－イミダゾプロピオニルエキセンディン－４（beta-hydroxy-imidazopropionyl exendin-4、以下「ＨＹ－エキセンディン－４」とも称する）、エキセンディン－４のＮ末端アミン基を２つのメチル基に変更したジメチルヒスチジル－エキセンデイン－４（dimethyl histidyl-exendin-4、以下「ＤＭ－エキセンディン－４」とも称する）、そしてエキセンディン－４の１番目のアミノ酸であるヒスチジンのアルファ炭素およびこれに結合したＮ－末端アミン基を除去したイミダゾアセチル－エキセンディン－４（imidazoacetyl-exendin-4、以下「ＣＡ－エキセンディン－４」とも称する）の免疫グロブリンＦｃ結合体が、天然型エキセンディン－４結合体に比較的類似したインビトロ活性および血中半減期を示したが（表１）、このような免疫グロブリンＦｃ結合体は、インビボ効力試験では予測できなかった著しい持続性効果を示した（図１４）。したがって、本発明で製造したＤＭ－エキセンディン－４－免疫グロブリンＦｃ結合体、ＤＡ－エキセンディン－４－免疫グロブリンＦｃ結合体、ＣＡエキセンディン－４－免疫グロブリンＦｃ結合体、およびＨＹ－エキセンディン－４－免疫グロブリンＦｃ結合体の血中半減期は５０時間以上画期的に増加した。ペプチドの活性に影響を与えないリシン残基にカップリングさせて力価の減少を最小化した。また、Ｎ末端のアミン基およびアルファカーボンの除去により、予測できなかった血中グルコース濃度減少活性の向上を示すことを確認した。

【００２０】

免疫グロブリンＦｃ領域は、生体内で代謝される生分解性のポリペプチドなので、薬物のキャリアとして使用するには安全である。また、免疫グロブリンＦｃ領域は、免疫グロブリン全体分子に比べて相対的に分子量が少ないため、結合体の製造、精製および収率の面で有利である。それだけでなく、アミノ酸配列が抗体ごとに異なって高い非均質性を示すＦａｂ部分が除去されるため、免疫グロブリンＦｃ領域が物質の同質性を大きく増加させ、血中抗原性の誘発可能性も低くする効果を期待することができる。

本発明で使用されるインスリン分泌ペプチドは、キャリア物質と非ペプチド性重合体によって連結される。

本発明に使用可能なキャリア物質は、免疫グロブリンＦｃ領域、アルブミン、トランスフェリン(transferrin)およびＰＥＧよりなる群から選択でき、好ましくは免疫グロブリンＦｃ領域である。

【００２１】

本発明において、「免疫グロブリンＦｃ領域」は、免疫グロブリンの重鎖と軽鎖可変領域、重鎖不変領域１（C_H１）と軽鎖不変領域（C_L１）を除いた、重鎖不変領域２（C_H２）および重鎖不変領域３（C_H３）部分を意味し、重鎖不変領域にヒンジ部分を含んだりもする。また、本発明の免疫グロブリンＦｃ領域は、天然型と実質的に同等またはより向上した効果を有する限りは、免疫グロブリンの重鎖と軽鎖可変領域のみを除外し、一部または全体重鎖不変領域１（C_H１）および／または軽鎖不変領域１（C_L-１）を含む拡張されたＦｃ領域であり得る。また、C_H２および／またはC_H-３に該当する相当長い一部のアミノ酸配列が除去された領域であってもよい。すなわち、本発明の免疫グロブリンＦｃ領域は、１）C_H１ドメイン、C_H２ドメイン、C_H３ドメインおよびC_H４ドメイン、２）C_H１ドメインおよびC_H２ドメイン、３）C_H１ドメインおよびC_H３ドメイン、４）C_H２ドメインおよびC_H３ドメイン、５）１つまたは２つ以上のドメインと免疫グロブリンヒンジ領域（またはヒンジ領域の一部）との組み合わせ、６）重鎖不変領域の各ドメインと軽鎖不変領域の二量体であってもよい。

【００２２】

また、本発明の免疫グロブリンＦｃ領域は、天然型アミノ酸配列だけでなく、その配列誘導体（変異体）を含む。アミノ酸配列誘導体とは、天然アミノ酸配列の少なくとも一つのアミノ酸残基が欠失、挿入、非保全的または保全的置換、またはこれらの組み合わせによって相異なる配列を有することを意味する。たとえば、ＩｇＧ Ｆｃの場合、結合に重要であると知られている２１４～２３８、２９７～２９９、３１８～３２２、または３２７～３３１番ののアミノ酸残基が変形のために適当な部位として利用できる。また、ジスルフィド結合を形成することが可能な部位が除去されるか、あるいは天然型ＦｃからＮ末端の幾つかのアミノ酸が除去されるか、あるいは天然型ＦｃのＮ末端にメチオニン残基が付加され得るなど、様々な種類の誘導体が可能である。また、エフェクター(effector)機能を無くすために、Ｃ１ｑ結合部位およびＡＤＣＣ(antibody dependent cell mediated cytotoxicity)部位のような補体結合部位が除去されてもよい。このような免疫グロブリンＦｃ領域の配列誘導体を製造する技術は、国際特許公開ＷＯ９７／３４６３１および国際特許公開９６／３２４７８に開示されている。

【００２３】

分子の活性を全体的に変更させないタンパク質およびペプチドにおけるアミノ酸交換は、当該分野で公知のものである(H.Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, New York,197 9)。最も一般に起こる交換は、アミノ酸残基Ａｌａ／Ｓｅｒ、Ｖａｌ／Ｉｌｅ、Ａｓｐ／Ｇｌｕ、Ｔｈｒ／Ｓｅｒ、Ａｌａ／Ｇｌｙ、Ａｌａ／Ｔｈｒ、Ｓｅｒ／Ａｓｎ、Ａｌａ／Ｖａｌ、Ｓｅｒ／Ｇｌｙ、Ｔｈｙ／Ｐｈｅ、Ａｌａ／Ｐｒｏ、Ｌｙｓ／Ａｒｇ、Ａｓｐ／Ａｓｎ、Ｌｅｕ／Ｉｌｅ、Ｌｅｕ／Ｖａｌ、Ａｌａ／Ｇｌｕ、Ａｓｐ／Ｇｌｙ間の交換である。

場合に応じて、Ｆｃ領域はリン酸化(phosphorylation)、硫酸化(sulfation)、アクリル化(acrylation)、糖化(glycosylation)、メチル化(methylation)、ファルネシル化(farnesylation)、アセチル化(acetylation)、およびアミド化(amidation)などによって変更さ

れてもよい。

前述したＦｃ誘導体は、本発明のＦｃ領域と同一の生物学的活性を示す誘導体であり、あるいはいわゆるＦｃ領域の熱、ｐＨなどに対する構造的安定性を増大させた誘導体である。

【００２４】

また、このようなＦｃ領域は、ヒトおよび牛、ヤギ、豚、マウス、ウサギ、ハムスター、ラット、モルモットなどの動物の生体内で分離した天然型から得られてもよく、形質転換された動物細胞または微生物から得られた組み換え型またはその誘導体であってもよい。ここで、天然型から獲得する方法は、全体免疫グロブリンをヒトまたは動物の生体から分離した後、タンパク質分解酵素を処理して得ることができる。パパインを処理する場合にはＦａｂおよびＦｃに切断され、ペプシンを処理する場合にはｐＦ’ｃおよびＦ（ａｂ）２に切断される。これをサイズ排除クロマトグラフィー(size-exclusion chromatography)などを用いてＦｃまたはｐＦ’ｃに分離することができる。

好ましくは、ヒト由来のＦｃ領域は微生物から得た組み換え型免疫グロブリンＦｃ領域である。

また、本発明の免疫グロブリンＦｃ領域は、天然型糖鎖、天然型に比べて増加した糖鎖、天然型に比べて減少した糖鎖、または糖鎖が除去された形態であってもよい。このような免疫グロブリンＦｃ糖鎖の増減または除去には、通常の方法、例えば化学的方法、酵素学的方法、および微生物を用いた遺伝工学的方法などが利用できる。ここで、Ｆｃから糖鎖が除去された免疫グロブリンＦｃ領域は、補体（Ｃｌｑ）の結合力が著しく低下し、抗体－依存性細胞毒性または補体－依存性細胞毒性が減少または除去されるので、生体内における不要な免疫反応を誘発しない。このような点から、糖鎖が除去された、または脱糖化された免疫グロブリンＦｃ領域は、薬物のキャリアとしての本来の目的にさらに符合する形態であるといえる。

【００２５】

本発明において、「糖鎖の除去」はＦｃ領域から酵素で糖成分を除去することを意味し、「脱糖化」はＦｃ領域を、糖化されていない形態で原核動物、好ましくは大腸菌から生産することを意味する。

一方、免疫グロブリンＦｃ領域は、ヒトまたは牛、ヤギ、豚、マウス、ウサギ、ハムスター、ラット、モルモットなどの動物起源であってもよく、好ましくはヒト起源である。また、免疫グロブリンＦｃ領域は、ＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＭ由来またはこれらの組み合わせ(combination)またはこれらのハイブリッド(hybrid)によるＦｃ領域であってもよい。免疫グロブリンＦｃ領域は、好ましくはヒトの血液に最も豊かなタンパク質に該当するＩｇＧまたはＩｇＧＭ由来であり、最も好ましくはリガンド結合タンパク質の半減期を向上させるものと知られているＩｇＧ由来である。

一方、本発明において、「組み合わせ」とは、二量体または多量体を形成するとき、同一起源の単鎖免疫グロブリンＦｃ領域を暗号化するポリペプチドが相異なる起源の単鎖ポリペプチドと結合を形成することを意味する。すなわち、二量体または多量体は、ＩｇＧ Ｆｃ、ＩｇＡ Ｆｃ、ＩｇＭ Ｆｃ、ＩｇＤ ＦｃおよびＩｇＥ Ｆｃ断片よりなる群から選ばれた２つ以上の断片から製造可能である。

【００２６】

本発明において、「ハイブリッド」とは、単鎖の免疫グロブリンＦｃ領域内に２つ以上の相異なる起源の免疫グロブリンＦｃ断片に該当する配列が存在することを意味する。本発明の場合、様々な形態のハイブリッドが可能である。すなわち、ドメインハイブリッドはＩｇＧ Ｆｃ、ＩｇＭ Ｆｃ、ＩｇＡ Ｆｃ、ＩｇＥ ＦｃおよびＩｇＤ ＦｃのC_H1、C_H2、C_H3およびC_H4よりなる群から選ばれた１つ～４つのドメインからなってもよく、ヒンジを含んでもよい。

一方、ＩｇＧはＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３およびＩｇＧ４のサブクラスに分けることができ、本発明ではこれらの組み合わせまたはこれらのハイブリッドも可能である。好ましくはＩｇＧ２およびＩｇＧ４サブクラスであり、最も好ましくは補体依存的毒性（Ｃ

ＤＣ、Complementdependent cytotoxicity）などのエフェクター機能が殆どないＩｇＧ４のＦｃ領域である。

【００２７】

すなわち、最も好ましい本発明の薬物キャリア用免疫グロブリンＦｃ領域は、ヒトＩｇＧ４由来の脱糖化Ｆｃ領域である。ヒト由来のＦｃ領域はヒト生体内で抗原として作用し、これに対する新しい抗体を生成するなどの不適な免疫反応を引き起こすおそれのある非ヒト由来のＦｃ領域に比べて好ましい。

本発明において、「非ペプチド性重合体」は、繰返し単位が少なくとも２つ結合した生体適合性重合体を意味し、前記繰返し単位はペプチド結合ではなく任意の共有結合によって互いに連結される。

本発明に使用可能な非ペプチド性重合体は、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、エチレングリコールとプロピレングリコールとの共重合体、ポリオキシエチル化ポリオール、ポリビニルアルコール、ポリサッカリド、デキストラン、ポリビニルエチルエーテル、たとえばＰＬＡ（ポリ乳酸）やＰＬＧＡ（ポリ乳酸－グリコール酸）などの生分解性高分子、脂質重合体、キチン類、ヒアルロン酸、およびこれらの組み合わせよりなる群から選択でき、好ましくはポリエチレングリコールである。また、当該分野で公知になっているこれらの誘導体および当該分野の技術水準で容易に製造することが可能な誘導体も本発明の範囲に含まれる。

【００２８】

既存のｉｎｆｒａｍｅ　ｆｕｓｉｏｎ方法によって製造された融合タンパク質で使用されたペプチド性リンカーの欠点は、生体内でタンパク質分解酵素によって容易に切断され、期待しただけのキャリアによる活性薬物の血中半減期増加効果を得ることができないことである。ところが、本発明では、タンパク質分解酵素に抵抗性がある重合体を用いて、キャリアと同様にペプチドの血中半減期を維持することができる。したがって、本発明で使用できる非ペプチド性重合体は、前述したような役割、すなわち生体内タンパク質分解酵素に抵抗性がある重合体であればいずれでも使用できる。非ペプチド性重合体の分子量は１～１００ｋＤａの範囲、好ましくは１～２０ｋＤａの範囲である。また、前記免疫グロブリンＦｃ領域と結合する本発明の非ペプチド性重合体としては、１種の重合体だけでなく、相異なる種類の重合体の組み合わせも使用できる。

本発明に使用される非ペプチド性重合体は、免疫グロブリンＦｃ領域およびタンパク質薬物と結合できる反応基を有する。

【００２９】

前記非ペプチド性重合体の両末端の反応基は、反応アルデヒド基、プロピオンアルデヒド基、ブチルアルデヒド基、マレイミド基、およびスクシンイミド(succinimide)誘導体よりなる群から選択されることが好ましい。前記において、スクシンイミド誘導体としては、スクシンイミジルプロピオネート、ヒドロキシスクシンイミジル、スクシンイミジルカルボキシメチルまたはスクシンイミジルカーボネートが利用できる。特に、前記非ペプチド性重合体が両末端に反応性アルデヒド基を有する場合、非特異的反応を最小化し、非ペプチド性重合体の両末端で生理活性ポリペプチドおよび免疫グロブリンとそれぞれ結合するには効果的である。アルデヒド結合による還元性アルキル化により生成された最終産物は、アミド結合によって連結されたものより一層安定的である。アルデヒド反応基は、低いｐＨでＮ末端に選択的に反応し、ｐＨ９．０などの高いｐＨ条件でリシン残基との共有結合を形成することができる。

【００３０】

前記非ペプチド性重合体の両末端の反応基は互いに同じでも異なってもよい。たとえば、非ペプチド性重合体は、一方の末端にはマレイミド基を、他方の末端にはアルデヒド基、プロピオンアルデヒド基またはブチルアルデヒド基を持つことができる。両末端にヒドロキシ反応基を有するポリエチレングリコールを非ペプチド性重合体として用いる場合には、公知の化学反応によって前記ヒドロキシ基を前記様々な反応基に活性化し、あるいは商業的に入手可能な変形された反応基を有するポリエチレングリコールを用いて本発明の

インスリン分泌ペプチド結合体を製造することができる。

このような本発明のインスリン分泌ペプチド結合体は、インスリンの合成および分泌の促進、食欲抑制、体重減少、ベータ細胞の血中グルコース敏感度の増加、ベータ細胞増殖の促進、胃内容排出の遅延、グルカゴン抑制などといった既存のインスリン分泌ペプチドの生体内活性を維持させるうえ、インスリン分泌ペプチドの血中半減期およびこれによる前記ペプチドの生体内効力持続効果が画期的に増加するので、糖尿、肥満、急性冠症候群(Acute coronary syndrome)または多嚢胞性卵巣症候群(Polycystic ovary syndrome)の治療に有用である。

【００３１】

また、本発明の別の様態において、本発明は、

（１）両末端にアルデヒド、マレイミドまたはスクシンイミド誘導体反応基を有する非ペプチド性重合体をインスリン分泌ペプチドのアミン基またはチオール基に共有結合によって連結する段階と、

（２）前記（１）の反応混合物から、Ｎ－末端以外の位置に非ペプチド性重合体が共有結合されたインスリン分泌ペプチドを含む結合体を分離する段階と、

（３）分離された結合体の非ペプチド性重合体の他方の末端に免疫グロブリンＦｃ領域を共有結合によって連結することにより、非ペプチド性重合体の両末端がそれぞれ免疫グロブリンＦｃ領域およびインスリン分泌ペプチドと結合されたペプチド結合体を生成する段階とを含む、インスリン分泌ペプチド結合体の製造方法を提供する。

本発明において、用語「結合体」とは、非ペプチド性重合体とインスリン分泌ペプチドとが共有結合によって連結された中間体であって、後で、結合体にある非ペプチド性重合体の他方の末端に免疫グロブリンＦｃ領域を結合させる。

【００３２】

また、好ましい一様態において、本発明は、

（１）両末端にアルデヒド反応基を有する非ペプチド性重合体をインスリン分泌ペプチドのリシン残基に共有結合によって連結させる段階と、

（２）前記（１）の反応混合物から、リシン残基に非ペプチド性重合体が共有結合されたインスリン分泌ペプチドを含む結合体を分離する段階と、

（３）分離された結合体の非ペプチド性重合体の他方の末端に免疫グロブリンＦｃ領域を共有結合によって連結することにより、非ペプチド性重合体の両末端がそれぞれ免疫グロブリンＦｃ領域およびインスリン分泌ペプチドと結合されたタンパク質結合体を生成する段階とを含む製造方法を提供する。さらに好ましくは、前記（１）の非ペプチド性重合体とインスリン分泌ペプチドのリシン残基とはｐＨ７．５以上で連結される。

また、本発明の別の様態において、本発明は、本発明のインスリン分泌ペプチド結合体を含む糖尿病治療用薬学的組成物を提供する。

【００３３】

本発明の結合体を含む薬学的組成物は、薬学的に許容される担体を含むことができる。薬学的に許容される担体は、経口投与の際には結合剤、活滑剤、崩壊剤、賦形剤、可溶化剤、分散剤、安定化剤、懸濁化剤、色素および香料などを使用することができる。注射剤の場合には緩衝剤、保存剤、無痛化剤、可溶化剤、等張化剤および安定化剤などを混合して使用することができ、局所投与用の場合には基剤、賦形剤、潤滑剤および保存剤などを使用することができる。本発明の薬学的組成物の剤形は、上述したような薬学的に許容される担体と混合して様々に製造できる。たとえば、薬学的組成物は、経口投与の際には錠剤、チローキ、カプセル、エリキシル、サスペンション、シロップおよびウエハーなどの形態で製造することができ、注射剤の場合には単位投薬アンプルまたは多数回投薬の形態で製造することができ、その他に溶液、懸濁液、錠剤、丸薬、カプセルおよび徐放性製剤などに剤形化することができる。

一方、製剤学的剤形に適した担体、賦形剤および希釈剤の例としては、ラクトース、デキストロース、スクロース、ソルビトール、マンニトール、キシリトール、エリスリトール、マルチトール、澱粉、アカシア、アルギネート、ゼラチン、リン酸カルシウム、ケイ

酸カルシウム、セルロース、メチルセルロース、未晶質セルロース、ポリビニルピロリドン、水、メチルヒドロキシベンゾエート、プロピルヒドロキシベンゾエート、タルク、ステアリン酸マグネシウムまたは鉱物油などが使用できる。また、 製剤学的剤形は充填剤、抗凝集剤、潤滑剤、湿潤剤、香料および防腐剤などをさらに含むことができる。

【００３４】

本発明に係る結合体は、糖尿、肥満、急性冠症候群または多嚢胞性卵巣症候群の治療に有用である。したがって、これを含む薬学的組成物を投与することにより、前記疾患の治療を図ることができる。

本発明において、「投与」は、ある適切な方法で患者に所定の物質を導入することを意味する。前記結合体の投与経路は、薬物が目的の組織に到達することができる限りはいずれの一般な経路を通じても投与できる。投与方法としては、腹腔内投与、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、皮内投与、経口投与、局所投与、鼻内投与、肺内投与および直腸内投与など様々であるが、これに限定されない。ところが、経口投与の際に、ペプチドは消化されるため、経口用組成物は活性薬剤をコートし、あるいは胃における分解から保護されるように剤形化することが好ましい。好ましくは注射剤の形態で投与できる。また、薬学的組成物は、活性物質が標的細胞に移動することが可能な任意の装置によって投与できる。

また、本発明に係る薬学的組成物の投与回数および投与量は、治療する疾患、投与経路、患者の年齢、性別、体重および疾患の重症度などの様々な関連因子と共に、活性成分である薬物の種類に応じて決定される。本発明の薬学的組成物は、生体内持続性および力価に優れるので、本発明の薬学的製剤の投与回数および投与量を著しく減少させることができる。

【００３５】

以下、下記実施例によって本発明をより詳細に説明する。但し、下記実施例は本発明を例示するためのものに過ぎず、本発明の範囲を限定するものではない。

実施例１．エキセンディン－４のＰＥＧ化(peglylation)と位置異性体の分離

３．４Ｋ ＰｒｏｐｉｏｎＡＬＤ（２）ＰＥＧ（プロピオンアルデヒド基を２つ持っているＰＥＧ、ＩＤＢ Ｉｎｃ．，韓国）をエキセンディン－４（ＡＰ、米国）のＮ末端にＰＥＧ化させるために、ペプチドとＰＥＧのモル比を１：１５、ペプチドの濃度を３ｍｇ／ｍＬにして、４℃で９０分間反応させた。この際、反応はｐＨ４．０の１００ｍＭ濃度のＮａＯＡｃ緩衝液内で、還元剤としての２０ｍＭ ＳＣＢ（$NaCNBH_3$）を添加して行った。３．４Ｋ ＰｒｏｐｉｏｎＬＡＤ（２）ＰＥＧをエキセンディン－４のリシン（Ｌｙｓ）残基にＰＥＧ化させるために、ペプチドとＰＥＧのモル比を１：３０、ペプチドの濃度を３ｍｇ／ｍＬにして、４℃で３時間反応させた。この際、反応はｐＨ９．０の１００ｍＭ濃度のＮａ－Ｐｈｏｓｐｈａｔｅ緩衝液内で、還元剤としての２０ｍＭ ＳＣＢを添加して行った。各反応液はＳＯＵＲＣＥ Ｑ（ＸＫ１６ｍＬ、Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を通じて１次的にモノ－ＰＥＧ化ペプチドを精製し、ＳＯＵＲＣＥ Ｓ（ＸＫ１６ｍＬ、Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を通じて異性体を分離した。Ｎ末端がＰＥＧ化されたピークが最も前に、その後に順次２つのリシンがＰＥＧ化されたピークが出ることが分かった。ペプチドマッピング方法で溶出されたピークのＰＥＧ化位置を確認することができた。Ｌｙｓ１２ＰＥＧ化結合体がまず溶出され、Ｌｙｓ２７ＰＥＧ化結合体は最も後方に溶出され、Ｎ－末端位置異性体およびＬｙｓ１２位置異性体を完璧に分離することができた。

【００３６】

カラム：ＳＯＵＲＣＥ Ｑ（ＸＫ１６ｍＬ、Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）

流速：２．０ｍＬ／分

勾配：Ａ０→４０％８０分Ｂ（Ａ：２０ｍＭトリスｐＨ８．５、Ｂ：Ａ＋０．５Ｍ ＮａＣｌ）

カラム：ＳＯＵＲＣＥ Ｓ（ＸＫ１６ｍＬ、Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ

）
流速：２．０ｍＬ／分
勾配：Ａ０→１００％５０分Ｂ（Ａ：２０ｍＭクエン酸ｐＨ３．０、Ｂ：Ａ＋０．５Ｍ ＫＣｌ）
【００３７】
実施例２：エキセンディン－４（Ｎ）－ＰＥＧ－免疫グロブリンＦｃ結合体の製造
実施例１の方法を用いて３．４Ｋ ＰｒｏｐｉｏｎＡＬＤ（２）ＰＥＧをエキセンディン－４のＮ末端と反応させた後、Ｎ末端の異性体のみを精製して免疫グロブリンＦｃとカップリングさせた。ペプチドと免疫グロブリンＦｃのモル比を１：８、全体タンパク質濃度を５０ｍｇ／ｍＬにして４℃で１７時間反応させた。反応は１００ｍＭ Ｋ－Ｐ（ｐＨ６．０）で行った。ここに、還元剤としての２０ｍＭ ＳＣＢを添加した。カップリング反応液は、２つの精製カラムを経て精製される。まず、カップリング反応に参与していない多量の免疫グロブリンＦｃを除去するために、ＳＯＵＲＣＥ Ｑ（ＸＫ １６ｍＬ、Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を用いた。Ｓａｌｔ ｇｒａｄｉｅｎｔとして２０ｍＭトリス（ｐＨ７．５）および１Ｍ ＮａＣｌを使用すると、相対的に結合力の弱い免疫グロブリンＦｃがまず溶出され、相次いでエキセンディン－４－免疫グロブリンＦｃが溶出される。１次精製によってある程度免疫グロブリンＦｃが除去されるが、イオン交換カラムでは免疫グロブリンＦｃとエキセンディン－４－免疫グロブリンＦｃの結合力の差が大きくないため、完全には分離されない。したがって、２物質の疎水性を用いて２次精製を行った。ＳＯＵＲＣＥ ＩＳＯ（ＨＲ１６ｍＬ、Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）に２０ｍＭトリス（ｐＨ７．５）１．５Ｍ硫酸アンモニウムを用いて、１次精製された試料を結合させた後、益々硫酸アンモニウムの濃度を低めながら試料を溶出させる。ＨＩＣカラムで結合力の弱い免疫グロブリンＦｃがまず溶出され、結合力の強いエキセンディン－４－免疫グロブリンＦｃ試料が後で溶出される。これらは、疎水性の差異が大きいため、イオン交換カラムより一層分離が容易である。ところが、モル比の差による過量の免疫グロブリンＦｃが反応に投入されるため、ＨＩＣカラムのみを使用しては高純度の結合体を得ることができない。ＨＰＬＣ逆相分析の結果、純度は９１．６％を示した（図１）。
【００３８】
カラム：ＳＯＵＲＣＥ Ｑ（ＸＫ１６ｍＬ、Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）
流速：２．０ｍＬ／分
勾配：Ａ０→２５％７０分Ｂ（Ａ：２０ｍＭトリスｐＨ７．５、Ｂ：Ａ＋１Ｍ ＮａＣｌ）
カラム：ＳＯＵＲＣＥ ＩＳＯ（ＨＲ１６ｍＬ、Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）
流速：７．０ｍＬ／分
勾配：Ｂ１００→０％６０分Ｂ（Ａ：２０ｍＭトリスｐＨ７．５、Ｂ：Ａ＋１．５Ｍ硫酸アンモニウム）
【００３９】
実施例３．エキセンディン－４（Ｌｙｓ２７）－免疫グロブリンＦｃ結合体の製造
実施例１の方法を用いて３．４Ｋ ＰｒｏｐｉｏｎＡＬＤ（２）ＰＥＧをエキセンディン－４のＬｙｓと反応させた後、Ｌｙｓ異性体のみを精製して免疫グロブリンＦｃとカップリングさせた。２つのＬｙｓ異性体ピークのうち、反応が多くＮ末端の異性体とは確然に区分される最も後方の異性体ピーク（Ｌｙｓ－２７位置異性体）を用いてカップリングを行った。反応は、ペプチドと免疫グロブリンＦｃのモル比を１：８、全体タンパク質濃度を５０ｍｇ／ｍＬにして、４℃で１６時間行った。反応は１００ｍＭ Ｋ－Ｐ（ｐＨ６．０）で行い、還元剤として２０ｍＭ ＳＣＢを添加した。カップリング反応の後、１６ｍＬのＳＯＵＲＣＥ Ｑと１６ｍＬのＳＯＵＲＣＥ ＩＳＯを用いた２段階の精製方法は、実施例２と同様である。ＨＰＬＣ逆相分析の結果、純度は９１．７％を示した（図２）。

【００４０】

実施例４．デス－アミノ－ヒスチジル(des-amino-histidyl)エキセンディン－４（Ｌｙｓ２７）－免疫グロブリンＦｃ結合体の製造

３．４Ｋ ＰｒｏｐｉｏｎＡＬＤ（２）ＰＥＧをデス－アミノ－ヒスチジル－エキセンディン－４（ＤＡエキセンディン－４、ＡＰ、米国）のＬｙｓとＰＥＧ化するために、ペプチドと３．４Ｋ ＰｒｏｐｉｏｎＡＬＤ（２）のモル比を１：３０、ペプチドの濃度を３ｍｇ／ｍＬにして、４℃で１２時間反応させた。反応液はｐＨ７．５の１００ｍＭ Ｎａ－ｐｈｏｓｐｈａｔｅであり、還元剤として２０ｍＭ ＳＣＢを添加した。ＳＯＵＲＣＥ Ｑ（ＸＫ１６ｍＬ、Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）とＳＯＵＲＣＥ Ｓ（ＸＫ１６ｍＬ、Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を用いてＰＥＧ化ペプチドを２段階で精製した。異性体の精製過程で、２つのＬｙｓ異性体ピークのうち、反応が多くＮ末端の異性体とは確然に区分される最も後方の異性体ピーク（Ｌｙｓ－２７位置異性体）を用いてカップリングを行った。反応は、ペプチドと免疫グロブリンＦｃのモル比を１：８、全体タンパク質濃度を６０ｍｇ／ｍＬにして、４℃で２０時間行った。反応は１００ｍＭ Ｋ－Ｐ（ｐＨ６．０）で行い、還元剤として２０ｍＭ ＳＣＢを添加した。カップリング反応の後、１６ｍＬのＳＯＵＲＣＥ Ｑと１６ｍＬのＳＯＵＲＣＥ ＩＳＯを用いた２段階の精製方法は、実施例２と同様である。ＨＰＬＣ逆相分析の結果、純度は９５．８％を示した（図３）。

【００４１】

カラム：ＳＯＵＲＣＥ Ｑ（ＸＫ１６ｍＬ、Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）

流速：２．０ｍＬ／分

勾配：Ａ０→２０％７０分Ｂ（Ａ：２０ｍＭトリスｐＨ９．０、Ｂ：Ａ＋１Ｍ ＮａＣｌ）

カラム：ＳＯＵＲＣＥ Ｓ（ＸＫ１６ｍＬ、Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）

流速：２．０ｍＬ／分

勾配：Ａ０→５０％５０分Ｂ（Ａ：２０ｍＭクエン酸ｐＨ３．０、Ｂ：Ａ＋１．Ｍ ＫＣｌ）

【００４２】

実施例５．ベーターヒドロキシ－イミダゾ－プロピオニル(Hydroxy-imidazo-propionyl)エキセンディ－４（Ｌｙｓ２７）－免疫グロブリンＦｃ結合体の製造

ベーターヒドロキシ－イミダゾ－プロピオニルエキセンディン－４（ＨＹエキセンディン－４、ＡＰ、米国）を用いて、実施例４と同様の方法で、３．４Ｋ ＰｒｏｐｉｏｎＡＬＤ（２）ＰＥＧをＨＹエキセンディン－４のＬｙｓと反応させた後、２つのＬｙｓ異性体ピークのうち、反応が多くＮ末端の異性体とは確然に区分される最も後方の異性体ピーク（Ｌｙｓ－２７位置異性体）を用いてカップリングを行った。反応は、ペプチドと免疫グロブリンＦｃのモル比を１：８、全体タンパク質濃度を６０ｍｇ／ｍＬにして、４℃で２０時間行った。反応は１００ｍＭ Ｋ－Ｐ（ｐＨ６．０）で行い、還元剤として２０ｍＭ ＳＣＢを添加した。カップリング反応の後、１６ｍＬのＳＯＵＲＣＥ Ｑと１６ｍＬのＳＯＵＲＣＥ ＩＳＯを用いた２段階の精製方法は、実施例２と同様である。ＨＰＬＣ逆相分析の結果、純度は９３．９％を示した（図４）。

【００４３】

実施例６．イミダゾ－アセチルエキセンディン－４（Ｌｙｓ２７）－免疫グロブリンＦｃ結合体の製造

イミダゾ－アセチルエキセンディン－４（ＣＡエキセンディン－４、ＡＰ、米国）を用いて、実施例４と同一の方法で、３．４Ｋ ＰｒｏｐｉｏｎＡＬＤ（２）ＰＥＧをＣＡエキセンディン－４のＬｙｓと反応させた後、２つのＬｙｓ異性体ピークのうち、反応が多くＮ末端の異性体とは完全に区分される最も後方の 異性体ピーク（Ｌｙｓ２７位置異性体）を用いてカップリングを行った。反応はペプチドと免疫グロブリンＦｃのモル比を１

：８、全体タンパク質濃度を６０ｍｇ／ｍＬにして、４℃で２０時間行った。反応は１００ｍＭ Ｋ－Ｐ（ｐＨ６．０）内で行い、還元剤として２０ｍＭ ＳＣＢを添加した。カップリング反応の後、１６ｍＬのＳＯＵＲＣＥ Ｑと１６ｍＬのＳＯＵＲＣＥ ＩＳＯを用いた２段階の精製方法は、実施例２と同様である。ＨＰＬＣ逆相分析の結果、純度は９５．８％を示した（図５）。

【００４４】

実施例７．Ｓｅｒ１２変異されたＤＡエキセンディン－４（Ｌｙｓ２７）－免疫グロブリンＦｃ結合体の製造

３．４Ｋ ＰｒｏｐｉｏｎＡＬＤ（２）ＰＥＧをＳｅｒ１２変異されたＤＡエキセンディン－４（ＡＰ、米国）のＬｙｓとＰＥＧ化させるために、ペプチドと３．４Ｋ ＰｒｏｐｉｏｎＡＬＤ（２）のモル比を１：３０、ペプチドの濃度を３ｍｇ／ｍＬにして、２５℃で３時間反応させた。この際、反応はｐＨ７．５の１００ｍＭ Ｎａ－Ｐｈｏｓｐｈａｔｅで行い、還元剤として２０ｍＭ ＳＣＢを添加した。ＳＯＵＲＣＥ Ｓ（ＸＫ１６ｍＬ、Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を用いた異性体精製過程なしで、ＳＯＵＲＣＥ Ｑ（ＸＫ１６ｍＬ、Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を用いてモノ－ＰＥＧ化(Mono-pegylated)ペプチド精製過程のみを実施例４と同様に行った。反応はペプチドと免疫グロブリンＦｃのモル比を１：８、全体タンパク質濃度を６０ｍｇ／ｍＬにして、４℃で２０時間行った。反応は１００ｍＭ Ｋ－Ｐ（ｐＨ６．０）内で行い、還元剤として２０ｍＭ ＳＣＢを添加した。Ｓｅｒ１２変異されたＤＡエキセンディン－４は、他のペプチドに比べてさらに強い陰イオン性質を示すため、ＳＯＵＲＣＥ Ｑカラム精製過程のみでも、効果的に反応に参与していない過量の免疫グロブリンＦｃを除去することができた。したがって、ＳＯＵＲＣＥ ＩＳＯカラム精製は省略された。ＳＯＵＲＣＥ Ｑカラム精製条件は実施例２と同様である。ＨＰＬＣ逆相分析の結果、純度は９２．５％を示した（図６）。

【００４５】

実施例８．Ａｒｇ１２変異されたＤＡエキセンディン－４（Ｌｙｓ２７）－免疫グロブリンＦｃ結合体の製造

Ａｒｇ１２変異されたＤＡエキセンディン－４（ＡＰ、米国）を用いて、実施例７と同様の方法で、３．４Ｋ ＰｒｏｐｉｏｎＡＬＤ（２）ＰＥＧをＡｒｇ１２変異されたＤＡエキセンディン－４のＬｙｓと反応させ、精製した後、カップリングを行った。反応はペプチドと免疫グロブリンＦｃのモル比を１：８、全体タンパク質濃度を６０ｍｇ／ｍＬにして、４℃で２０時間行った。反応は１００ｍＭ Ｋ－Ｐ（ｐＨ６．０）内で行い、還元剤として２０ｍＭ ＳＣＢを添加した。カップリング反応の後、１６ｍＬのＳＯＵＲＣＥ Ｑと１６ｍＬのＳＯＵＲＣＥ ＩＳＯを用いた２段階の精製方法は、実施例２と同様である。ＨＰＬＣ逆相分析の結果、純度は９９．２％を示した（図７）。

【００４６】

実施例９．デス－アミノ－ヒスチジル(des-amino-histidyl)エキセンディン－４（Ｌｙｓ２７）－アルブミン結合体の製造

実施例４と同一の方法で、３．４Ｋ ＰｒｏｐｉｏｎＡＬＤ（２）ＰＥＧをデス－アミノ－ヒスチジル－エキセンディン－４（ＤＡ－エキセンディ－４、ＡＰ、米国）のＬｙｓ残基と反応させ、精製した。反応は、ペプチドとキャリアとしてのヒト血液由来アルブミン（緑十字、韓国）のモル比を１：７、全体タンパク質濃度を５０ｍｇ／ｍＬにして、４℃で２４時間行った。反応は１００ｍＭ Ｋａ－Ｐ（ｐＨ６．０）内で行い、還元剤として２０ｍＭ ＳＣＢを添加した。カップリング反応の後、１６ｍＬのＳＯＵＲＣＥ Ｑと１６ｍＬのＳＯＵＲＣＥ ＩＳＯを用いた２段階の精製方法は、実施例２と同様である。ＨＰＬＣ逆相分析の結果、純度は９０．３％を示した（図８）。

【００４７】

実施例１０：ジメチル－ヒスチジル－エキセンデン－４（Ｌｙｓ２７）－免疫グロブリンＦｃ結合体の製造

ジメチル－ヒスチジル－エキセンディン－４（ＤＭエキセンディン－４、ＡＰ、米国）

を用いて、実施例４と同様の方法で、ジメチル－ヒスチジル－エキセンジン－４（Ｌｓｙ２７）－免疫グロブリンＦｃ結合体を製造した。ＨＰＬＣ逆相分析の結果、純度は９６．４％を示した（図９）。

【００４８】

実施例１１．ＧＬＰ－１（Ｎ）－免疫グロブリンＦｃ結合体の製造

３．４Ｋ ＢｕｔｙｒＡＬＤ（２）ＰＥＧ（ブチルアルデヒド基を２つ持っているＰＥＧ、Ｎｅｋｔａｒ、米国）をＧＬＰ－１（ＡＰ、米国）のＮ末端にＰＥＧ化させるために、ペプチドとＰＥＧのモル比を１：５、ペプチドの濃度を３ｍｇ／ｍＬにして、４℃で９０分間反応させた。この際、反応はｐＨ６．０の１００ｍＭ濃度のＫ－Ｐ緩衝液内で行い、還元剤として２０Ｍｍ ＳＣＢ（$NaCNBH_3$）を添加して反応させた。反応はペプチドと免疫グロブリンＦｃのモル比を１：１０、全体タンパク質濃度を５０ｍｇ／ｍＬにして、４℃で１６時間行った。反応は１００ｍＭ Ｋ－Ｐ（ｐＨ６．０）内で行い、還元剤として２０ｍＭ ＳＣＢを添加した。カップリング反応の後、１６ｍＬのＳＯＵＲＣＥ Ｑと１６ｍＬのＳＯＵＲＣＥ ＩＳＯを用いた２段階の精製方法は実施例２と同様である。ＨＰＬＣ逆相分析の結果、純度は９１％を示した（図１０）。

【００４９】

実施例１２．デス－アミノ－ヒスチジル(Des-amino-histidyl)－ＧＬＰ－１（Ｌｙｓ）－免疫グロブリンＦｃ結合体の製造

３．４Ｋ ＰｒｏｐｉｏｎＡＬＤ（２）ＰＥＧをデス－アミノ－ヒスチジル－ＧＬＰ－１（Ａｐ．，米国）のＬｙｓとＰＥＧ化させるために、ペプチドと３．４Ｋ ＰｒｏｐｉｏｎＡＬＤ（２）のモル比を１：３０、ペプチドの濃度を３ｍｇ／ｍＬにして、４℃で４時間反応させた。この際、反応はｐＨ７．５の１００ｍＭ Ｎａ－ｐｈｏｓｐｈａｔｅ内で行い、還元剤として２０Ｍｍ ＳＣＢを添加した。ＳＯＵＲＣＥ Ｑ（ＸＫ１６ｍＬ、Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を用いてモノＰＥＧ化ペプチドのみを精製した。反応はペプチドと免疫グロブリンＦｃのモル比を１：６、全体タンパク質濃度を６０ｍｇ／ｍＬにして、４℃で１６時間行わせた。反応は１００ｍＭ Ｋ－Ｐ（ｐＨ６．０）内で行い、還元剤として２０ｍＭ ＳＣＢを添加した。カップリング反応の後、１６ｍＬのＳＯＵＲＣＥ Ｑと１６ｍＬのＳＯＵＲＣＥ ＩＳＯを用いた２段階の精製方法は実施例２と同様である。ところが、ＧＬＰ－１－免疫グロブリンＦｃ結合体は、エキセンディン－４－免疫グロブリンＦｃ結合体より免疫グロブリンＦｃとの疎水性差が少ないため、１６ｍＬのＳＯＵＲＣＥ ＩＳＯカラムにおける分離能が低下する。したがって、１６ｍＬのＳＯＵＲＣＥ ＩＳＯカラム精製をもう１回繰り返した。ＨＰＬＣ逆相分析の結果、純度は９１．９％を示した（図１１）。

【００５０】

実施例１３．ＢｕｔｙｒＡＬＤリンカーＰＥＧを使用した結合体の製造

３．４Ｋ ＢｕｔｙｒＡＬＤ（２）ＰＥＧ（ブチルアルデヒド基を２つ持っているＰＥＧ、Ｎｅｋｔａｒ、米国）を用いて、実施例１と同一の方法で３．４Ｋ－エキセンディン－４を製造した。その後、３．４Ｋ－エキセンディン－４を実施例３と同一の方法で免疫グロブリンＦｃとカップリングした。ＨＰＬＣ逆相分析の結果、純度は９２．３％を示した（図１２）。

【００５１】

実施例１４．持続型エキセンディン－４のインビトロ活性の測定

エキセンディン－４持続型製剤の効力を測定する方法として、インビトロ細胞の活性を測定する方法を用いた。通常、ＧＬＰ－１のインビトロ活性は、インスリノーマ細胞またはランゲルハンス島(islet of Langerhans)を分離してＧＬＰ－１処理による細胞内のｃＡＭＰ増加有無を確認することにより測定される。

本発明で使用されたインビトロ活性測定方法は、ＲＩＮ－ｍ５Ｆ（ＡＴＣＣ．）であり、この細胞はラットのインスリノーマ細胞として知られており、ＧＬＰ－１受容体を持っているため、ＧＬＰ－１系統のインビトロ活性を測定する方法として多く用いられている。ＲＩＮ－ｍ５ＦにＧＬＰ－１、エキセンディン－４および試験物質を濃度別に処理して

、試験物質による細胞内の信号伝達物質であるｃＡＭＰの発生度合いによるＥＣ５０値を測定し、比較する試験で行った。その結果は表１にまとめた。

【００５２】

【表１】

試験物質	血中半減期(時間)	インビトロ力価(%)
エキセンディン－４	０．７	１００
エキセンディン－４（Ｎ）　ＰＥＧ－Ｆｃ	６２	＜０．２
エキセンディン－４（Ｌｙｓ２７）－ＰＥＧ－Ｆｃ	６１	１３．２
ＤＭエキセンディン－４（Ｌｙｓ２７）－ＰＥＧ－Ｆｃ	６９	２．６
ＤＡエキセンディン－４（Ｌｙｓ２７）－ＰＥＧ－Ｆｃ	５４	１３．２
ＨＹエキセンディン－４（Ｌｙｓ２７）－ＰＥＧ－Ｆｃ	５２	７．６
ＣＡエキセンディン－４（Ｌｙｓ２７）－ＰＥＧ－Ｆｃ	５２	８．５
Ｓｅｒ１２ＤＡエキセンディン－４（Ｌｙｓ２７）－ＰＥＧ－Ｆｃ	Ｎ．Ｄ．	２．６
ＤＡエキセンディン－４（Ｌｙｓ２７）－アルブミン		２．０
ＤＡ ＧＬＰ－１（Ｌｙｓ２０，２８）－ＰＥＧ－Ｆｃ	２７	２．０

【００５３】

ＤＭエキセンディン－４：ジメチル－ヒスチジル(dimethyl-histidly)エキセンディン－４

ＤＡエキセンディン－４：デス－アミノ－ヒスチジル(des-amino-histidyl)エキセンディン－４

ＨＹエキセンディン－４：ベーター－ヒドロキシ－イミダゾ－プロピオニル(beta-Hydroxy-imidazo-propionyl)エキセンディン－４

ＣＡエキセンディン－４：イミダゾ－アセチルエキセンディン－４

Ｓｅｒ１２ ＤＡエキセンディン－４：１２番目のリシン残基がＳｅｒで置換されたＤＡエキセンディン－４

ＤＡ ＧＬＰ－１：デス－アミノ－ヒスチジル(des-amino-histidyl)－ＧＬＰ－１

エキセンディン－４（Ｎ）－ＰＥＧ－Ｆｃ：エキセンディン－４のＮ末端とＦｃ領域とがＰＥＧで連結された結合体

エキセンディン－４（Ｌｙｓ２７）－ＰＥＧ－Ｆｃ：エキセンディン－４の２７番目のリシン残基とＦｃ領域とがＰＥＧで連結された結合体

ＤＭエキセンディン－４（Ｌｙｓ２７）－ＰＥＧ－Ｆｃ：ジメチル－ヒスチジルエキセンディン－４の２７番目のリシン残基とＦｃ領域とがＰＥＧで連結された結合体

ＤＡエキセンディン－４（Ｌｙｓ２７）－ＰＥＧ－Ｆｃ：デス－アミノ－ヒスチジルエキセンディン－４の２７番目のリシン残基とＦｃ領域とがＰＥＧで連結された結合体

ＨＹエキセンディン－４（Ｌｙｓ２７）－ＰＥＧ－Ｆｃ：ベーター－ヒドロキシ－イミダゾ－プロピオニルエキセンディン－４の２７番目のリシン残基とＦｃ領域とがＰＥＧで連結された結合体

ＣＡエキセンディン－４（Ｌｙｓ２７）－ＰＥＧ－Ｆｃ：イミダゾ－アセチルエキセンディン－４の２７番目のリシン残基とＦｃ領域とがＰＥＧで連結された結合体

Ｓｅｒ１２ ＤＡエキセンディン－４（Ｌｙｓ２７）－ＰＥＧ－Ｆｃ：１２番目のリシン残基がＳｅｒで置換されたデス－アミノ－ヒスチジルエキセンディン－４の２７番目のリシン残基とＦｃ領域とがＰＥＧで連結された結合体

ＤＡエキセンディン－４（Ｌｙｓ２７）－ＰＥＧ－アルブミン：デス－アミノ－ヒスチジルエキセンディン－４の２７番目のリシン残基とアルブミンとがＰＥＧで連結された結合体

ＤＡ ＧＬＰ－１（Ｌｙｓ２０，２８）－ＰＥＧ－Ｆｃ：デス－アミノ－ヒスチジルＧＬＰ－１のリシン残基とＦｃ領域とがＰＥＧで連結された結合体

【００５４】

実施例１５．持続型エキセンディン－４のインビボ効力試験

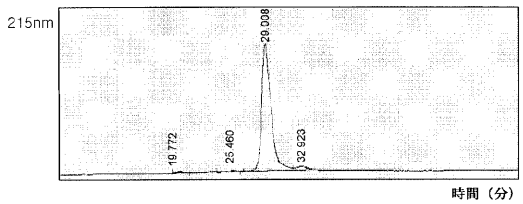
エキセンディン－４持続型製剤のインビボ効力を測定するために、糖尿モデルマウスとしてのｄｂ／ｄｂマウスを用いて血糖の減少を確認した。約６～７週齢の糖尿モデルマウスを試料制限していない状態で２週間持続型製剤を１００ｍｃｇ／ｋｇで１回投与し、天然型エキセンディン－４は毎日１００ｍｃｇ／ｋｇ用量を投与した。試験物質を投与した後、毎日採血して血糖の変化を測定し、特に天然型エキセンディン－４は毎日投与１時間後に血糖の濃度を測定した（図１４）。エキセンディン－４誘導体の結合体は１回投与により１０日以上血中グルコース濃度の減少効果が維持されたが、これに対し、天然型エキセンディン－４結合体は８日以後から血中グルコース濃度の減少効果が無くなることが確認された。

【産業上の利用可能性】

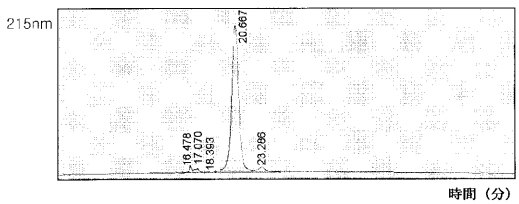
【００５５】

本発明のインスリン分泌ペプチド結合体は、比較的高く維持される生体内活性、および著しく増加した血中半減期を有するため、様々なペプチド薬物の持続型剤形の開発に有用に利用できる。

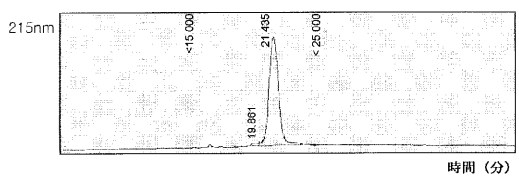
【図１】



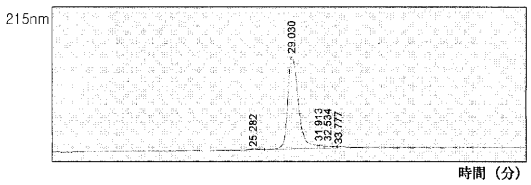
【図２】



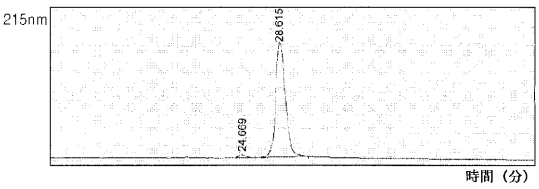
【図３】



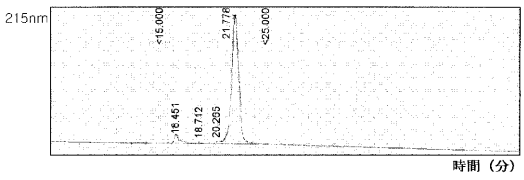
【図４】



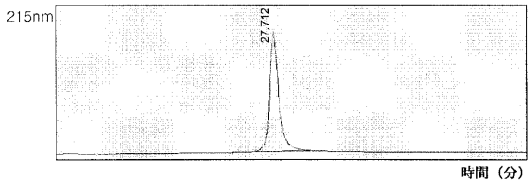
【図５】



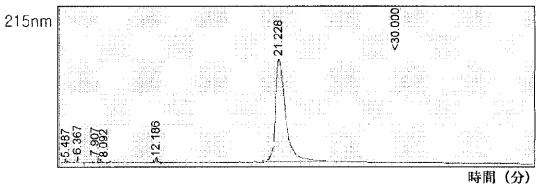
【図６】



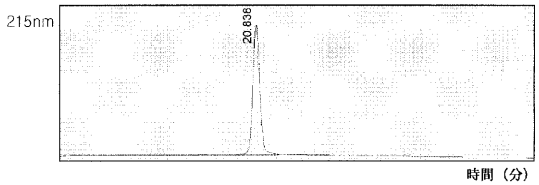
【図７】



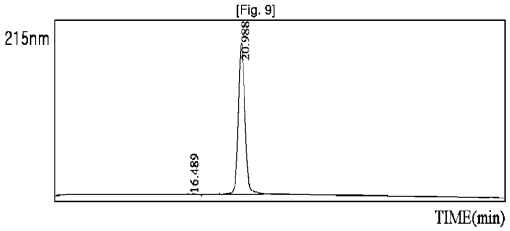
【図８】



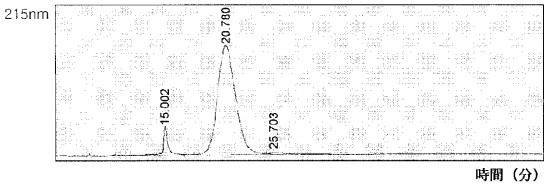
【図９】



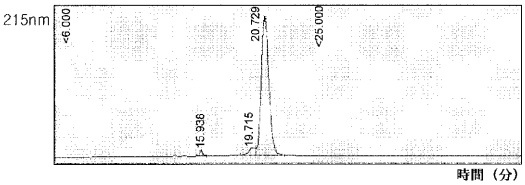
[Fig. 9]



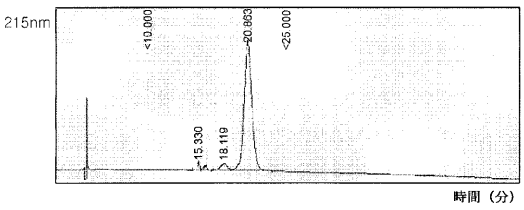
【図１０】



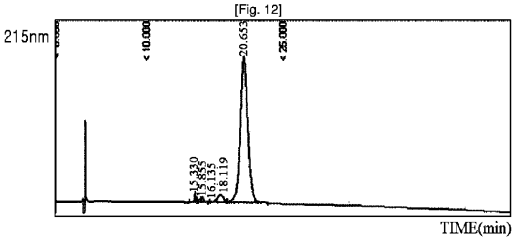
【図１１】



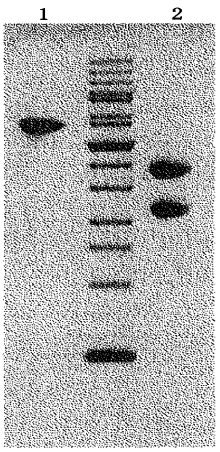
【図１２】



[Fig. 12]

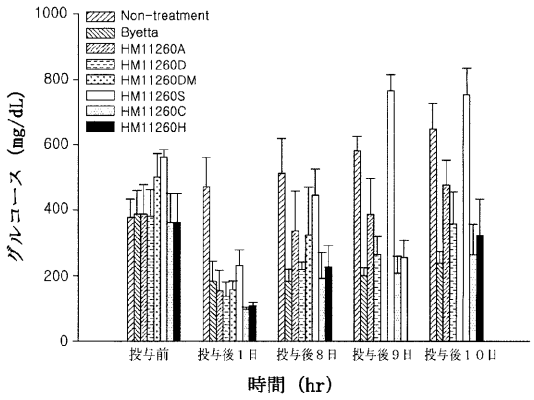


【図１３】



１．非還元条件
２．還元条件

【図１４】


Non-treatment
Byetta
HM11260A
HM11260D
HM11260DM
HM11260S
HM11260C
HM11260H
1000
800
600
400
200
0
グルコース（mg/dL）
投与前
投与後１日
投与後８日
投与後９日
投与後１０日
時間（hr）

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2008/000061

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 38/28(2006.01)i

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 8 as above

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 practicable, search terms used)
eKIPASS, DELPHION

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2006-068910 A1 (ELILILY AND COMPANY) 29 Jun. 2006 See the abstract.	1-32
A	WO 2005-000892 A2 (ELILILY AND COMPANY) 6 Jan. 2005 See the abstract.	1-32
A	WO 2004-093823 A2 (ELILILY AND COMPANY) 4 Nov. 2004 See the abstract.	1-32
A	WO 2006-124529 A1 (ELILILY AND COMPANY) 23 Nov. 2006 See the abstract.	1-32

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family 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 application or patent 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 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
28 APRIL 2008 (28.04.2008)	**28 APRIL 2008 (28.04.2008)**

Name and mailing address of the ISA/KR
Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea
Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer
YANG, In Soo
Telephone No. 82-42-481-5049

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2007)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2008/000061

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

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.: 33
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

1. ☐ As all required addtional 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 and, where applicable, the payment of a protest fee.
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2008/000061

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO2006068910A1	29.06.2006	AU2005319432A1	29.06.2006
		CA2589647AA	29.06.2006
		EP1831252A1	12.09.2007
		KR1020070089187	30.08.2007
		KR2007089187A	30.08.2007
WO2005000892A2	06.01.2005	AU2004247042A1	23.12.2004
		CA2526169A1	23.12.2004
		CA2528591A1	06.01.2005
		CN1802386A	12.07.2006
		EP1641483A2	05.04.2006
		JP19505643	15.03.2007
		JP19536902	20.12.2007
		JP2007505643T2	15.03.2007
		KR2006022262A	09.03.2006
		US2004241926A1	02.12.2004
		US20070036806A1	15.02.2007
		US2007253966A1	01.11.2007
		WO2004110472A2	23.12.2004
		WO2004110472A3	03.02.2005
		WO2005000892A2	06.01.2005
		WO2005000892A3	03.03.2005
WO2004093823A2	04.11.2004	AU2004231461A1	04.11.2004
		CA2518336A1	04.11.2004
		CN1832959A	13.09.2006
		EP1605897A2	21.12.2005
		JP2006520818T2	14.09.2006
		KR1020050111386	24.11.2005
		US6753446BA	22.06.2004
		WO2004093823A3	22.12.2005
WO2006124529A1	23.11.2006	AU2006247734A1	23.11.2006
		CA2608311A1	23.11.2006
		KR1020080025361	20.03.2008

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2007)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		テーマコード（参考）
A61P	*15/00*	*(2006.01)*	A61P	15/00	
C07K	*16/00*	*(2006.01)*	C07K	16/00	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,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,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,NO,PL,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,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100100413
弁理士 渡部 温
(72)発明者 ソン ダイ ハイ
大韓民国 １５１－７０４ ソウル グワナクーグ シリム １０－ドン サムスンサン アパート ３０７－２４０３
(72)発明者 リム チャン キー
大韓民国 ４４３－４７０ キョンキード スウォンーシ ヨントンーグ ヨントンードン チョンヨンマエウル サミク アパート ３２５－１７０６
(72)発明者 ソン テ フン
大韓民国 ４４６－７３１ キョンキード ヨンインーシ キフンーグ ゴメードン ドンソン アパート １０１－１５０４
(72)発明者 キム ヨン フン
大韓民国 １５０－７９７ ソウル ヨンドゥンポーグ ヨンドゥンポードン ダエウ ドリームタウン １０３－９０２
(72)発明者 クォン セ チャン
大韓民国 １４３－７５１ ソウル クァンジンーグ クァンジャンードン クッドン アパート １０－１２０４
(72)発明者 リー グワン スン
大韓民国 １３８－７３９ ソウル ソンパーグ オグンードン ウーチャン アパート ３－４０４
(72)発明者 ジュン スン ヨウ
大韓民国 ４４３－４７０ キョンキード スウォンーシ ヨントンーグ ヨントンードン シンナムシルミジュ アパート ６５１－１００３
(72)発明者 チョイ イン ヨン
大韓民国 ４４８－７５５ キョンキード ヨンジンーシ スジーグ ジュキョン ２－ドン ビョクサン １－チャ アパート １０５－１８０１

Fターム(参考) 4C084 AA02 AA07 BA02 BA23 BA37 BA41 BA44 CA59 NA12 NA13
NA14 ZA402 ZA702 ZA812 ZC352
4H045 AA10 AA20 AA30 BA53 BA55 BA56 BA57 CA40 DA37 EA28