(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2017-521377
(P2017-521377A)
(43)公表日　平成29年8月3日(2017.8.3)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
A61K 38/28	(2006.01)	A61K	38/28	ZNA	4C076
A61P 1/18	(2006.01)	A61P	1/18		4C084
A61P 3/06	(2006.01)	A61P	3/06		4H045
A61P 3/10	(2006.01)	A61P	3/10		
A61P 43/00	(2006.01)	A61P	43/00	121	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 41 頁）　最終頁に続く

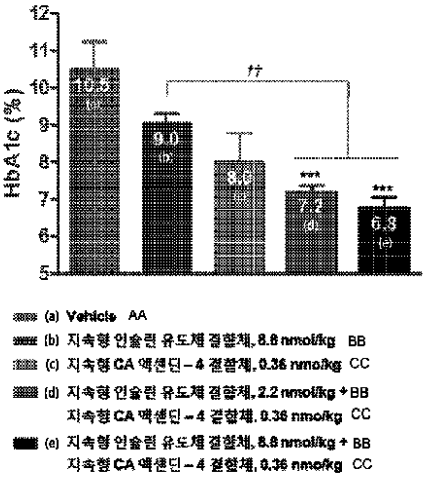
(21)出願番号　特願2016-569949 (P2016-569949)
(86)(22)出願日　平成27年5月29日 (2015.5.29)
(85)翻訳文提出日　平成28年12月2日 (2016.12.2)
(86)国際出願番号　PCT/KR2015/005424
(87)国際公開番号　WO2015/183038
(87)国際公開日　平成27年12月3日 (2015.12.3)
(31)優先権主張番号　10-2014-0065072
(32)優先日　平成26年5月29日 (2014.5.29)
(33)優先権主張国　韓国(KR)

(71)出願人　515022445
ハンミ　ファーマシューティカル　カンパニー　リミテッド
大韓民国　４４５－９５８　キョンギ－ド　ファソン－シ　パルタン－ミョン　ムハ－ロ　２１４
(74)代理人　100127926
弁理士　結田　純次
(74)代理人　100140132
弁理士　竹林　則幸
(72)発明者　キム　チョンクク
大韓民国４４５－３２０キョンギ－ド．ファンソン－シ．ドンタンウォンチョン－ロ　３５０．１００２

最終頁に続く

(54)【発明の名称】持続型インスリンアナログ結合体及び持続型インスリン分泌ペプチド結合体を含む糖尿病治療用組成物

(57)【要約】
本発明は、持続型インスリンアナログ及び持続型インスリン分泌ペプチド結合体を含む糖尿病予防又は治療用薬学的組成物、並びに糖尿病治療方法に関するものであり、より具体的には、前記薬学的組成物は、持続型アナログ結合体及び持続型インスリン分泌ペプチド結合体の併用投与によりインスリン投与に伴う体重増加を抑制し、インスリン分泌ペプチド投与に伴う吐き気や嘔吐を抑制し、インスリン投与量を低くし、服薬順応度を大幅に改善することができる。また、本発明は、持続型インスリンアナログ結合体及び持続型インスリン分泌ペプチド結合体を含む、糖尿病患者の膵臓β細胞副作用を改善するための薬学的組成物、並びに前記薬学的組成物を投与するステップを含む、糖尿病患者の膵臓β細胞副作用を改善する方法に関し、具体的には、糖尿病の進行による膵臓β細胞機能異常、膵臓β細胞減少、脂質毒性（lipotoxicity）、糖毒性（glucotocity）などの副作用を改善することを特徴とする。
【選択図】図１



【特許請求の範囲】
【請求項１】
インスリンアナログ及びその活性持続時間を延長できる生体適合性物質がリンカー又は共有結合により連結された持続型インスリンアナログ結合体と、
インスリン分泌ペプチド及びその活性持続時間を延長できる生体適合性物質がリンカー又は共有結合により連結された持続型インスリン分泌ペプチド結合体とを含む、糖尿病予防又は治療用薬学的組成物。
【請求項２】
インスリンアナログ及びその活性持続時間を延長できる生体適合性物質がリンカー又は共有結合により連結された持続型インスリンアナログ結合体と、
インスリン分泌ペプチド及びその活性持続時間を延長できる生体適合性物質がリンカー又は共有結合により連結された持続型インスリン分泌ペプチド結合体とを含む、糖尿病患者の脂質毒性、糖毒性、膵臓β細胞機能異常及び膵臓β細胞量減少からなる群から選択される少なくとも１つの膵臓β細胞副作用を改善するための薬学的組成物。
【請求項３】
前記インスリンアナログは、天然インスリンにおいて少なくとも１つのアミノ酸に置換（substitution）、付加（addition）、欠失（deletion）、修飾（modification）及びそれらの組み合わせからなる群から選択される改変が起こった物質であることを特徴とする、請求項１又は２に記載の薬学的組成物。
【請求項４】
前記インスリンアナログは、少なくとも１つのアミノ酸が変異又は欠失したものであることを特徴とする、請求項１又は２に記載の薬学的組成物。
【請求項５】
前記インスリンアナログは、Ｂ鎖の１番目のアミノ酸、２番目のアミノ酸、３番目のアミノ酸、５番目のアミノ酸、８番目のアミノ酸、１０番目のアミノ酸、１２番目のアミノ酸、１６番目のアミノ酸、２３番目のアミノ酸、２４番目のアミノ酸、２５番目のアミノ酸、２６番目のアミノ酸、２７番目のアミノ酸、２８番目のアミノ酸、２９番目のアミノ酸、３０番目のアミノ酸、Ａ鎖の１番目のアミノ酸、２番目のアミノ酸、５番目のアミノ酸、８番目のアミノ酸、１０番目のアミノ酸、１２番目のアミノ酸１４番目のアミノ酸、１６番目のアミノ酸、１７番目のアミノ酸、１８番目のアミノ酸、１９番目のアミノ酸及び２１番目のアミノ酸からなる群から選択される少なくとも１つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換されたもの、欠失したものからなる群から選択されることを特徴とする、請求項４に記載の薬学的組成物。
【請求項６】
前記インスリン分泌ペプチドは、ＧＬＰ－１、エキセンジン－３、エキセンジン－４、それらのアゴニスト（agonist）、誘導体（derivative）、フラグメント（fragment）、変異体（variant）及びそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項１又は２に記載の薬学的組成物。
【請求項７】
前記インスリン分泌ペプチドは、インスリン分泌ペプチドのＮ末端のヒスチジン残基がデスアミノ－ヒスチジル、ジメチル－ヒスチジル、β－ヒドロキシイミダゾプロピオニル、４－イミダゾアセチル及びβ－カルボキシイミダゾプロピオニルからなる群から選択される物質に置換されたインスリン分泌ペプチド誘導体である、請求項６に記載の薬学的組成物。
【請求項８】
前記インスリン分泌ペプチドは、天然エキセンジン－４、エキセンジン－４のＮ末端のアミン基が除去されたエキセンジン－４誘導体、エキセンジン－４のＮ末端のアミン基がヒドロキシ基に置換されたエキセンジン－４誘導体、エキセンジン－４のＮ末端のアミン基がジメチル基で修飾されたエキセンジン－４誘導体、エキセンジン－４の１番目のアミノ酸（ヒスチジン）のα炭素が欠失（deletion）したエキセンジン－４誘導体、エキセン

ジン－４の１２番目のアミノ酸（リシン）がセリンに置換されたエキセンジン－４誘導体、及びエキセンジン－４の１２番目のアミノ酸（リシン）がアルギニンに置換されたエキセンジン－４誘導体からなる群から選択される、請求項７に記載の薬学的組成物。

【請求項９】

前記持続型インスリンアナログ結合体は、インスリンのＡ鎖の１４番目のアミノ酸がグルタミン酸に置換されたインスリンアナログ及び免疫グロブリンＦｃ領域が、リンカーである非ペプチド性重合体により連結されたものであり、前記持続型インスリン分泌ペプチド結合体は、イミダゾ－アセチルエキセンジン－４であるインスリン分泌ペプチド及び免疫グロブリンＦｃ領域が、リンカーである非ペプチド性重合体により連結されたものである、請求項１又は２に記載の薬学的組成物。

【請求項１０】

前記生体適合性物質は、ポリエチレングリコール、脂肪酸、コレステロール、アルブミン及びそのフラグメント、アルブミン結合物質、特定アミノ酸配列の繰り返し単位の重合体、抗体、抗体フラグメント、ＦｃＲｎ結合物質、生体内結合組織又はその誘導体、ヌクレオチド、フィブロネクチン、トランスフェリン（Transferrin）、サッカライド（saccharide）、高分子重合体からなる群から選択されることを特徴とする持続型インスリンアナログ結合体及び持続型インスリン分泌ペプチド結合体を含む、請求項１又は２に記載の薬学的組成物。

【請求項１１】

前記インスリンアナログとインスリン分泌ペプチドは、ポリエチレングリコール、脂肪酸、サッカライド、高分子重合体、低分子化合物、ヌクレオチド及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるリンカーを介して生体適合性物質に連結されることを特徴とする持続型インスリンアナログ結合体及び持続型インスリン分泌ペプチド結合体を含む、請求項１０に記載の薬学的組成物。

【請求項１２】

前記インスリンアナログ及びインスリン分泌ペプチドと生体適合性物質はリンカーを介して連結されており、前記生体適合性物質はＦｃＲｎ結合物質であり、

前記リンカーは、ペプチドリンカー、又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、ポリサッカライド、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、ヒアルロン酸及びそれらの組み合わせからなる群から選択される非ペプチド性リンカーを介して連結されることを特徴とする持続型インスリンアナログ結合体及び持続型インスリン分泌ペプチド結合体を含む、請求項１又は２に記載の薬学的組成物。

【請求項１３】

前記ＦｃＲｎ結合物質は、免疫グロブリンＦｃ領域を含むことを特徴とする、請求項１２に記載の薬学的組成物。

【請求項１４】

前記非ペプチド性リンカーの各末端が、それぞれ前記生体適合性物質とインスリンアナログ又はインスリン分泌ペプチドのアミン基又はチオール基とに結合されたことを特徴とする持続型インスリンアナログ結合体及び持続型インスリン分泌ペプチド結合体を含む、請求項１２に記載の薬学的組成物。

【請求項１５】

前記免疫グロブリンＦｃ領域が非グリコシル化されたことを特徴とする持続型インスリンアナログ結合体及び持続型インスリン分泌ペプチド結合体を含む、請求項１３に記載の薬学的組成物。

【請求項１６】

前記免疫グロブリンＦｃ領域が、ＣＨ１、ＣＨ２、ＣＨ３及びＣＨ４ドメインからなる群から選択される１つ～４つのドメインからなることを特徴とする持続型インスリンアナログ結合体及び持続型インスリン分泌ペプチド結合体を含む、請求項１３に記載の薬学的

組成物。
【請求項１７】
前記免疫グロブリンＦｃ領域がヒンジ領域をさらに含むことを特徴とする 持続型インスリンアナログ結合体及び持続型インスリン分泌ペプチド結合体を含む、請求項１３に記載の薬学的組成物。
【請求項１８】
前記免疫グロブリンＦｃ領域は、ＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ又はＩｇＭに由来するＦｃ領域である、請求項１３に記載の薬学的組成物。
【請求項１９】
前記免疫グロブリンＦｃ領域の各ドメインは、ＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ及びＩｇＭからなる群から選択される異なる起源を有するドメインのハイブリッドである、請求項１３に記載の薬学的組成物。
【請求項２０】
前記免疫グロブリンＦｃ領域は、同一起源のドメインからなる単鎖免疫グロブリンで構成された二量体又は多量体である、請求項１３に記載の薬学的組成物。
【請求項２１】
前記組成物は、薬学的に許容される担体をさらに含む、請求項１又は２に記載の薬学的組成物。
【請求項２２】
前記組成物は、持続型インスリン結合体及び持続型インスリン分泌ペプチド結合体が同時、順次又は逆順に併用投与されることを特徴とする、請求項１又は２に記載の薬学的組成物。
【請求項２３】
前記組成物は、糖尿病の進行を抑制することを特徴とする、請求項２に記載の薬学的組成物。
【請求項２４】
前記組成物は、投与された糖尿病個体の糖尿病の予後を改善することを特徴とする、請求項２に記載の薬学的組成物。
【請求項２５】
糖尿病が発症するリスクのある個体又は発症した個体又は発症に、請求項１に記載の薬学的組成物を投与するステップを含む、糖尿病の予防又は治療方法。
【請求項２６】
ヒト以外の糖尿病が発症した個体に、請求項２に記載のの薬学的組成物を投与するステップを含む、糖尿病個体の脂質毒性、糖毒性、膵臓β細胞機能異常及び膵臓β細胞量減少からなる群から選択される少なくとも１つの膵臓β細胞への副作用を改善する方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、持続型インスリンアナログ結合体及び持続型インスリン分泌ペプチド結合体を含む糖尿病予防又は治療用組成物、並びに前記組成物を投与するステップを含む糖尿病治療方法に関する。また、本発明は、持続型インスリンアナログ結合体及び持続型インスリン分泌ペプチド結合体を含む、糖尿病患者の膵臓β細胞への副作用を改善するための薬学的組成物、並びに前記薬学的組成物を投与するステップを含む、糖尿病患者の膵臓β細胞への副作用を改善する方法に関し、具体的には、糖尿病の進行による膵臓β細胞機能異常、膵臓β細胞減少、脂質毒性（lipotoxicity）、糖毒性（glucotoxicity）などの副作用を改善することを特徴とする。
【背景技術】
【０００２】
インスリンは、膵臓のβ細胞から分泌されるペプチドであり、体内の血糖を調節する上で非常に重要な役割を果たす物質である。このようなインスリンの分泌量が不足したり、

正常な機能が損なわれて血中ブドウ糖の濃度が高くなる代謝疾患を糖尿病という。インスリンが正常に分泌されないか、分泌されたインスリンが体内で正常に作用しないことにより体内の血糖が調節されずに上昇する場合を２型糖尿病といい、膵臓でインスリンを産生できずに血糖が上昇する場合を１型糖尿病という。２型糖尿病の場合、化学物質を主成分とする経口用血糖降下剤を用いて治療し、一部の患者にはインスリンを用いて治療することもある。それに対して、１型糖尿病の場合はインスリンの投与が必須である。

【０００３】

現在多用されているインスリン治療法は、食事の前後に注射でインスリンを投与する方法である。インスリンは、現在注射剤として市販されており、皮下注射で投与することを原則とし、作用時間により投与方法が異なる。インスリンの注射投与は経口投与に比べて血糖降下効果がより速く現れ、経口投与を用いることができない環境でも安全に用いることができ、用量の制限もないが、１日に３回ずつ継続して投与しなければならないので、注射針に対する抵抗感、投与方法の難しさ、低血糖症状、長期的なインスリン投与により発生する体重増加現象などが欠点として挙げられる。体重増加現象は、心臓血管疾患のリスクを高め、血糖調節機能を低下させるという副作用をもたらすことがある。一方、インスリンペプチド薬物が体内に吸収されてからの薬物の血中濃度を長時間にわたって高く持続することにより薬効を最大化しようとする努力が続けられており、その例としてランタス（Lantus, Insulin glargine; Sanofi Aventis）やレベミル（Levemir, Insulin detemir; Novo Nordisk）などの持続性インスリンが開発、市販されている。前記持続性薬物は、インスリンＮＰＨ（Neutral Protamine Hagedorn）とは異なり、睡眠時の低血糖のリスクを低くし、特にレビミルの場合は体重増加現象を緩和している。しかし、依然として１日１回～２回の投与法が欠点とされている。

【０００４】

一方、インスリン分泌ペプチドの一種であるグルカゴン様ペプチド－１（Glucagon like peptide 1, GLP-1）は、回腸と大腸のＬ細胞から分泌されるインクレチン（incretin）ホルモンである。グルカゴン様ペプチド－１の主な作用はインスリン分泌を増加させることであり、ブドウ糖の濃度に応じたインスリン分泌（Glucose dependent secretion）が行われるので、低血糖が発生しない。これらの特徴から２型糖尿病の治療方法に適用されるが、血中半減期が約２分と非常に短いので、薬剤として開発する上で大きな制約がある。よって、開発されて市販されているグルカゴン様ペプチド－１（Glucagon like peptide-1）作用剤（アゴニスト）としては、アメリカドクトカゲ（glia monster）の唾液腺から精製されたグルカゴン様ペプチド－１アナログであるエキセンジン（Exendin）－４が挙げられる。これは、ジペプチジルペプチダーゼＩＶ（Dipeptidyl peptidase-4、DPP-IV）に対する抵抗性と共に、グルカゴン様ペプチド－１より高い生理活性を有する。よって、体内半減期が２～４時間とグルカゴン様ペプチド－１に比べて延長された体内半減期を有する（特許文献１）。しかし、ＤＰＰ－ＩＶの抵抗性を向上させる方法のみでは十分な生理活性の持続期間を期待できず、例えば現在市販されているエキセンジン－４（エキセナチド, exenatide）の場合、患者に１日２回注射で投与しなければならず、投与による吐き気や嘔吐の誘発が患者に大きな負担になるという欠点が依然として残っている。

【０００５】

このような糖尿病疾患においては、時期的な差異はあるが、共通して膵臓β細胞の機能喪失及び死滅による膵臓β細胞量（mass）の減少が誘発される。

【０００６】

持続的な血糖上昇が起こると、膵臓β細胞は体内の血糖を正常なレベルに維持するために、β細胞の機能強化及び細胞量増加に基づいてインスリン分泌を増加させるが、このような分泌増加作用には限界がある。すなわち、膵臓のβ細胞が産生できるインスリンよりも、体内の血糖を正常に維持するために必要なインスリンの要求量が多ければ、結局は血糖が上昇することにより２型糖尿病が進行する。

【０００７】

臨床学的には、２型糖尿病は、インスリン抵抗性、インスリン分泌の減少、そして膵臓

β細胞の機能障害及び細胞量減少の順に疾患が進行する。特に、β細胞の機能障害及び細胞量減少は、血中で増加した脂質及び糖により促進される。このような血中の脂質及び糖の濃度は脂質毒性（lipotoxicity）及び／又は糖毒性（glucotoxicity）を誘発するので、β細胞の機能だけでなくインスリンの作用までも弱くし、究極的には２型糖尿病の予後を悪化させる。よって、脂質毒性と糖毒性の抑制は、β細胞の機能及び細胞量を維持するだけでなく、インスリン抵抗性の改善により２型糖尿病の進行を画期的に緩和することができる。

【０００８】

インスリンとは、膵臓のβ細胞から分泌されるペプチドであり、体内の血糖を調節する役割を果たす物質である。よって、β細胞の機能異常及び細胞量減少は、体内のインスリン量の減少による血糖の増加と密接な関係がある。このようにインスリンの分泌が低下した糖尿病患者に対しては、外因性のインスリンを用いて治療することもある。先行研究によれば、外因性インスリンの投与は、血糖改善に卓越した効能を示すだけでなく、膵臓β細胞の過度なインスリン分泌によるストレス発生を抑制することが知られている。しかし、外因性インスリンの投与には体重増加を誘発するという大きな欠点があり、その体重増加は血中の脂質濃度の上昇を伴うので、潜在的に糖尿病の予後を悪化させる可能性がある。

【０００９】

一方、エキセンジン－４をはじめとするインスリン分泌ペプチドの一種であるグルカゴン様ペプチド－１（Glucagon like peptide 1, GLP-1）受容体アゴニスト（agonist）は、２型糖尿病患者において優れた血糖調節及び体重減少効果を有することが知られている。また、ＧＬＰ－１受容体アゴニストは、β細胞の新生、増殖及び分化だけでなく、β細胞の死滅を調節することにより、β細胞量を増加させることができる。実際に、２型糖尿病を誘導した齧歯類モデルにおいて、ＧＬＰ－１又はエキセンジン－４の投与によりβ細胞の成長及び分化が刺激されてβ細胞量が増加することが確認されている。しかし、ＧＬＰ－１受容体アゴニストは、血糖調節のために膵臓β細胞のインスリン分泌を持続的に刺激するので、潜在的にβ細胞ストレスの増加による機能低下の可能性も内包している。

【００１０】

よって、本発明者らは、上記問題を解決するために、タンパク質薬物の活性を維持しつつ安定性の向上を同時に達成する技術として、非ペプチド性重合体をリンカーとして用いて、従来の生理活性ポリペプチドと免疫グロブリンＦｃ領域を互いに共有結合により連結させた持続型タンパク質結合体を提案した（特許文献２）。特に、持続型インスリン結合体と持続型エキセンジン－４結合体のそれぞれの生体内効力持続効果が画期的に向上したことが確認された（特許文献３及び４）。

【００１１】

しかし、依然として安定した血糖変化をもたらす量のインスリン又はエキセンジン－４を投与すると、体重増加現象が現れたり、吐き気や嘔吐が現れるという問題がある。よって、薬物の投与量と回数を減らすと共に、糖尿病治療効果に優れた治療方法の開発が求められている。また、それらの研究は生体内の前記生理活性ポリペプチドの半減期の延長に焦点が合わせられており、糖尿病患者において予後を悪化させる副作用である膵臓β細胞の機能喪失及び／又は死滅による膵臓β細胞量の減少を同時に改善する方法に関する研究は十分でない。

【００１２】

こうした背景の下、本発明者らは、糖尿病治療の持続効果が向上すると共に吐き気や嘔吐の誘発を低減し得る糖尿病治療剤、並びにβ細胞の機能及び細胞量の維持及び増加と共に潜在的なβ細胞ストレスに対して安全な糖尿病治療剤を開発すべく鋭意努力した結果、グルカゴン様ペプチド－１受容体とインスリン受容体を同時に刺激する持続型エキセンジン－４結合体と持続型インスリンアナログ結合体の併用投与を試み、これら持続型インスリンアナログ結合体と持続型エキセンジン－４結合体の薬物を共に用いると、生体内持続性及び安定性が向上し、両薬物の投与用量を画期的に減らすことができ、安定した血糖変

化をもたらすことを確認した。また、グルカゴン様ペプチド－１アゴニスト及びエキセンジン－４、又はその誘導体の特徴である吐き気や嘔吐を改善し、インスリン投与による体重増加現象を持続型エキセンジン－４結合体により緩和することができることを確認した。さらに、β細胞の機能と細胞量を減少させる主な原因である脂質毒性と糖毒性を画期的に減少させ、それに基づいて糖尿病の進行を緩和することを確認し、本発明を完成するに至った。

【先行技術文献】

【特許文献】

【００１３】

【特許文献１】米国特許第５４２４２８６号明細書

【特許文献２】韓国登録特許第１０－０７２５３１５号公報

【特許文献３】韓国登録特許第１０－１０５８２０９号公報

【特許文献４】韓国登録特許第１０－１３３０８６８号公報

【特許文献５】韓国特許第２０１４－００２２９０９号公報

【特許文献６】韓国特許第２０１４－０００６９３８号公報

【特許文献７】国際公開第９７／０３４６３１号

【特許文献８】国際公開第９６／０３２４７８号

【特許文献９】韓国登録特許第１０－１２３１４３１号公報

【特許文献１０】韓国登録特許第１０－１０５８３１５号公報

【非特許文献】

【００１４】

【非特許文献１】H.Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【００１５】

本発明は、持続型インスリンアナログ結合体及び持続型インスリン分泌ペプチド結合体を含む、糖尿病の予防又は治療用薬学的組成物を提供することを目的とする。

【００１６】

また、本発明は、糖尿病が発症するリスクのある個体又は発症した個体に前記薬学的組成物を投与するステップを含む、糖尿病の予防又は治療方法を提供することを目的とする。

【００１７】

さらに、本発明は、持続型インスリンアナログ結合体及び持続型インスリン分泌ペプチド結合体を含む、糖尿病患者の脂質毒性（lipotoxicity）、糖毒性（glucotoxicity）、膵臓β細胞機能異常及び膵臓β細胞量減少からなる群から選択される少なくとも１つの膵臓β細胞副作用を改善するための薬学的組成物を提供することを目的とする。

【００１８】

さらに、本発明は、糖尿病が発症するリスクのある個体又は発症した個体に前記薬学的組成物を投与するステップを含む、糖尿病患者の脂質毒性、糖毒性、膵臓β細胞機能異常及び膵臓β細胞量減少からなる群から選択される少なくとも１つの膵臓β細胞への副作用を改善する方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【００１９】

本発明の一態様は、生体内半減期が同程度である持続型インスリンアナログ結合体及び持続型インスリン分泌ペプチド結合体を含む、糖尿病の予防又は治療用薬学的組成物を提供する。本発明の薬学的組成物は、持続型インスリンアナログ結合体及び持続型インスリン分泌ペプチド結合体が併用投与されることを特徴とする。

【００２０】

具体的には、前記薬学的組成物は、インスリンアナログ及びその活性持続時間を延長で

きる生体適合性物質がリンカー又は共有結合により連結された持続型インスリンアナログ結合体と、インスリン分泌ペプチド及びその活性持続時間を延長できる生体適合性物質がリンカー又は共有結合により連結された持続型インスリン分泌ペプチド結合体とを含む糖尿病予防又は治療用薬学的組成物であってもよい。

【００２１】

本発明の他の態様は、生体内半減期が同程度である持続型インスリンアナログ結合体及び持続型インスリン分泌ペプチド結合体を含む、糖尿病患者の脂質毒性、糖毒性、膵臓β細胞機能異常及び膵臓β細胞量減少からなる群から選択される少なくとも１つの膵臓β細胞副作用を改善するための薬学的組成物を提供する。本発明の薬学的組成物は、持続型インスリンアナログ結合体及び持続型インスリン分泌ペプチド結合体が併用投与されることを特徴とする。

【００２２】

具体的には、前記薬学的組成物は、インスリンアナログ及びその活性持続時間を延長できる生体適合性物質がリンカー又は共有結合により連結された持続型インスリンアナログ結合体と、インスリン分泌ペプチド及びその活性持続時間を延長できる生体適合性物質がリンカー又は共有結合により連結された持続型インスリン分泌ペプチド結合体とを含む、糖尿病患者の脂質毒性、糖毒性、膵臓β細胞機能異常及び膵臓β細胞量減少からなる群から選択される少なくとも１つの膵臓β細胞副作用を改善するための薬学的組成物であってもよい。

【００２３】

前記薬学的組成物は、脂質毒性、糖毒性、膵臓β細胞機能異常及び膵臓β細胞量減少を同時に改善することができる。

【００２４】

インスリンアナログやグルカゴン様ペプチド－１などのインスリン分泌ペプチドは異なる作用機序により血糖を調節するので、併用投与するとその効能が最大化できるという研究結果などから、血糖調節治療剤として用いるための研究のみ継続して行われてきた。しかし、併用投与時に脂質毒性及び糖毒性の改善及び相補作用によりβ細胞の機能及び細胞量を改善することにより、糖尿病患者においてインスリン又はインスリン分泌ペプチドの単独投与時に発生し得る副作用である膵臓β細胞への副作用を改善する研究は行われておらず、このような新しい用途は本発明者らにより最初に開発されたものである。

【００２５】

前記薬学的組成物は、膵臓β細胞副作用を改善できるだけでなく、血液中の中性脂肪の濃度を低下させることにより脂質毒性を減少させ、血糖機能を調節することにより糖毒性を減少させることができ、膵臓β細胞量を維持及び／又は増加させることにより糖尿病の進行を抑制することを特徴とする。よって、本願発明の薬学的組成物は糖尿病の進行を緩和することができる。

【００２６】

前記薬学的組成物は、投与された糖尿病個体の糖尿病の予後を改善することを特徴とする。

【００２７】

前記薬学的組成物は、持続型インスリン分泌ペプチド結合体：インスリンアナログ結合体がモル比で１：０．０１～１：５０の範囲であってもよい。インスリン分泌ペプチド結合体は、例えばエキセンジン結合体であるが、これに限定されるものではない。

【発明の効果】

【００２８】

本発明の持続型インスリンアナログ結合体と持続型エキセンジン－４結合体は、優れた糖尿病治療効能を示し、特に併用投与すると、インスリン受容体とグルカゴン様ペプチド－１受容体を同時に刺激することにより、生体内持続性及び安定性が向上し、投与用量を画期的に減らすことができ、血糖の安定した調節により低血糖及び体重増加の様相を緩和し、吐き気や嘔吐を抑制するので、服薬順応度が改善された糖尿病治療剤としての効果が

あり、特に画期的に改善された血中安定性及び効力の持続性により、投与頻度を減少させ、患者の利便性を最大化することができる。

【００２９】

また、本発明の持続型インスリンアナログ結合体と持続型インスリン分泌ペプチド結合体は、優れた糖尿病治療効能を示し、特に併用投与すると、インスリン受容体とグルカゴン様ペプチド－１受容体を同時に刺激することにより、生体内持続性及び安定性が向上し、糖尿病の進行に伴って発生する副作用である脂質毒性と糖毒性を改善することにより、β細胞の機能を改善し、細胞量を増加させる。また、血糖の安定した調節により低血糖及び体重増加の様相を緩和し、従来のインスリン製剤の欠点を改善した薬学的組成物を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【００３０】

【図１】ｄｂ／ｄｂマウスにおける持続型インスリンアナログ結合体と持続型エキセンジン－４結合体の併用投与による血糖調節効果をグリコヘモグロビン（ＨｂＡ１ｃ）数値で示すグラフである。(* P<0.05, ** P< 0.01, *** P<0.001 by Dunnet's MC test, vehicle群対比）（†P<0.05, †† P< 0.01, ††† P<0.001 by Dunnet's MC test, 持続型インスリンアナログ結合体単独投与群対比）

【図２】ｄｂ／ｄｂマウスにおける持続型インスリンアナログ結合体と持続型エキセンジン－４結合体の併用投与による体重変化値（ＢＷ）の変化を示すグラフである。（* P<0.05, ** P< 0.01, *** P<0.001 by Dunnet's MC test）（†P<0.05, †† P< 0.01, ††† P<0.001 by Dunnet's MC test, 持続型インスリンアナログ結合体単独投与群対比）

【図３】ｄｂ／ｄｂマウスにおける持続型インスリンアナログ結合体（持続型インスリン誘導体結合体）と持続型エキセンジン－４結合体の併用投与によるβ細胞量の増加効果を数値で示すグラフである。（* P<0.05, ** P< 0.01, *** P<0.001 by ANOVA test, vehicle群対比）

【図４】ｄｂ／ｄｂマウスにおける持続型インスリンアナログ結合体と持続型エキセンジン－４結合体の１２週間併用投与による血清中の中性脂肪の数値を示すグラフである。（* P<0.05, ** P< 0.01, *** P<0.001 by ANOVA test, Vehicle群対比）

【図５】ｄｂ／ｄｂマウスにおける持続型インスリンアナログ結合体と持続型エキセンジン－４結合体の併用投与による血糖調節効果をグリコヘモグロビン（ＨｂＡ１ｃ）数値で示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【００３１】

本発明における「持続型インスリンアナログ結合体」及び「持続型インスリン分泌ペプチド結合体」とは、インスリンアナログやインスリン分泌ペプチドが生体適合性物質又はキャリアと共有結合又は非共有結合により連結されて形成された結合体を意味し、このように結合体を形成することにより、当該インスリンアナログやインスリン分泌ペプチドが結合体を形成しない場合に比べて、活性を示す時間がさらに延長される。

【００３２】

前記持続型インスリンアナログ結合体を投与すると、天然インスリンに比べて薬物投与量を減少させることができると共に、体重の増加、吐き気や嘔吐を緩和できるという効果がある。

【００３３】

本発明における、インスリンアナログやインスリン分泌ペプチドの半減期を延長し、かつ生体利用率を増加させるか、又は持続的に活性を維持する製剤とは、インスリンアナログやインスリン分泌ペプチドに直接共有結合するキャリアであってもよく、直接共有結合しなくともインスリンアナログの生体内活性の維持を向上させる製剤を意味する。

【００３４】

本発明における「生体適合性物質又はキャリア」とは、インスリンアナログやインスリン分泌ペプチドに共有又は非共有結合により連結されて結合体を形成すると当該アナログ

又はペプチドの活性持続時間を延長できる物質である。例えば、結合体を形成すると当該アナログやペプチドの生体内半減期を延長できる物質は、本発明による生体適合性物質又はキャリアとなり得る。インスリンアナログやインスリン分泌ペプチドに結合されるものには、様々な生体適合性物質、例えばポリエチレングリコール、脂肪酸、コレステロール、アルブミン及びそのフラグメント、アルブミン結合物質、特定アミノ酸配列の繰り返し単位の重合体、抗体、抗体フラグメント、ＦｃＲｎ結合物質、生体内結合組織、ヌクレオチド、フィブロネクチン、トランスフェリン（Transferrin）、サッカライド（saccharide）、高分子重合体などに共有又は非共有結合して生体内半減期を延長する生体適合性物質が含まれる。また、インスリンアナログやインスリン分泌ペプチドと生体内半減期を延長できる生体適合性物質の連結には、遺伝子組換え法や高分子又は低分子化学物質を用いたｉｎ ｖｉｔｒｏ結合などが含まれるが、特定の結合方式に限定されるものではない。前記ＦｃＲｎ結合物質は免疫グロブリンＦｃ領域であってもよい。

【００３５】

本発明における「インスリンアナログ」とは、天然配列において少なくとも１つのアミノ酸が改変されたものを意味する。

【００３６】

前記インスリンアナログは、天然のものに比べてインスリン力価が減少し、かつ／又はインスリン受容体結合力が減少した、インスリンのＢ鎖又はＡ鎖のアミノ酸が変異したインスリンアナログであってもよい。天然インスリンのアミノ酸配列は下記の通りである。

Ａ鎖：Ｇｌｙ－Ｉｌｅ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｇｌｎ－Ｃｙｓ－Ｃｙｓ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ｉｌｅ－Ｃｙｓ－Ｓｅｒ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｇｌｎ－Ｌｅｕ－Ｇｌｕ－Ａｓｎ－Ｔｙｒ－Ｃｙｓ－Ａｓｎ（配列番号３７）

Ｂ鎖：Ｐｈｅ－Ｖａｌ－Ａｓｎ－Ｇｌｎ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ｐｈｅ－Ｐｈｅ－Ｔｙｒ－Ｔｈｒ－Ｐｒｏ－Ｌｙｓ－Ｔｈｒ（配列番号３８）

【００３７】

本発明の実施例で用いられたインスリンは遺伝子組換え技術により作製したインスリンアナログであるが、本発明はこれに限定されるものではなく、ｉｎ－ｖｉｔｒｏ力価が減少し、及び／又はインスリン受容体結合力が減少したあらゆるインスリンが含まれる。逆インスリン（inverted insulin）、インスリン変異体（variants）、インスリンフラグメント（fragments）などが含まれることが好ましく、作製法としては、遺伝子組換えだけでなく、ｓｏｌｉｄ ｐｈａｓｅ法でも作製することができるが、これらに限定されるものではない。

【００３８】

インスリンアナログはインスリンと同じ生体内血糖調節機能を有するペプチドであり、このようなペプチドにはインスリンアゴニスト（agonist）、誘導体（derivatives）、フラグメント（fragments）、変異体（variants）などが含まれる。

【００３９】

本発明におけるインスリンアゴニストとは、インスリンの構造に関係なく、インスリンの生体内受容体に結合してインスリンと同じ生物学的活性を示す物質を意味する。

【００４０】

本発明におけるインスリンアナログとは、天然インスリンのＡ鎖、Ｂ鎖とそれぞれアミノ酸配列において相同性を示し、少なくとも１つのアミノ酸残基が置換（例えば、alpha-methylation、alpha-hydroxylation）、除去（例えば、deamination）又は修飾（例えば、N-methylation）された形態、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される改変された形態であり、体内で血糖調節機能を有するペプチドを意味する。

【００４１】

本発明におけるインスリンアナログとは、天然インスリンとアミノ酸配列における相同性がない場合もインスリン受容体に結合して血糖を調節できるペプチドミミック及び低分

子もしくは高分子化合物を意味する。

【００４２】

本発明におけるインスリンフラグメントとは、インスリンに少なくとも１つのアミノ酸が付加又は欠失された形態を意味し、付加される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）であってもよく、このようなインスリンフラグメントは体内で血糖調節機能を有する。

【００４３】

本発明におけるインスリン変異体とは、インスリンとアミノ酸配列が少なくとも１つ異なるペプチドであり、体内で血糖調節機能を有するペプチドを意味する。

【００４４】

本発明のインスリンアゴニスト、誘導体、フラグメント及び変異体において用いる各作製方法は、単独で用いてもよく、組み合わせて用いてもよい。例えば、アミノ酸配列が少なくとも１つ異なり、Ｎ末端のアミノ酸残基に脱アミノ化（deamination）された体内で血糖調節機能を有するペプチドが挙げられる。

【００４５】

具体的には、前記インスリンアナログは、Ｂ鎖の１番目のアミノ酸、２番目のアミノ酸、３番目のアミノ酸、５番目のアミノ酸、８番目のアミノ酸、１０番目のアミノ酸、１２番目のアミノ酸、１６番目のアミノ酸、２３番目のアミノ酸、２４番目のアミノ酸、２５番目のアミノ酸、２６番目のアミノ酸、２７番目のアミノ酸、２８番目のアミノ酸、２９番目のアミノ酸、３０番目のアミノ酸、Ａ鎖の１番目のアミノ酸、２番目のアミノ酸、５番目のアミノ酸、８番目のアミノ酸、１０番目のアミノ酸、１２番目のアミノ酸、１４番目のアミノ酸、１６番目のアミノ酸、１７番目のアミノ酸、１８番目のアミノ酸、１９番目のアミノ酸及び２１番目のアミノ酸からなる群から選択される少なくとも１つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換されものであり、アラニン、グルタミン酸、アスパラギン、イソロイシン、バリン、グルタミン、グリシン、リシン、ヒスチジン、システイン、フェニルアラニン、トリプトファン、プロリン、セリン、トレオニン、アスパラギン酸に置換されたものであることが好ましい。また、少なくとも１つのアミノ酸が欠失（deletion）したインスリンアナログも本発明に含まれるが、あらゆるインスリンアナログが制限なく含まれる。

【００４６】

好ましいインスリンアナログは、生体適合性物質又はキャリアに結合されると天然インスリンに比べて半減期が延長されたインスリンアナログであり、これらは特許文献５及び６に開示されているインスリンアナログであるが、これらに限定されるものではない。

【００４７】

本発明における「持続型インスリン分泌ペプチド結合体」とは、インスリン分泌ペプチドが免疫グロブリンＦｃ領域に非ペプチド性リンカーを介して連結されたものを意味する。

【００４８】

本発明における「インスリン分泌ペプチド」とは、インスリン分泌機能を有するペプチドを意味し、膵臓β細胞のインスリンの合成又は発現を刺激することができる。前記インスリン分泌ペプチドは、グルカゴン様ペプチド－１（Glucagon like peptide 1, GLP-1）、エキセンジン－３（exendin-3）、又はエキセンジン－４（exendin-4）であることが好ましいが、これらに限定されるものではない。前記インスリン分泌ペプチドには、天然インスリン分泌ペプチドだけでなく、その前駆物質（precursors）、アゴニスト（agonist）、誘導体（derivatives）、フラグメント（fragments）及び変異体（variants）などが含まれる。

【００４９】

本発明のインスリン分泌ペプチド誘導体には、インスリン分泌ペプチドのＮ末端のアミノ基を除去した誘導体（Desamino-histidyl誘導体）、アミノ基がヒドロキシ基に置換された誘導体（beta-hydroxy imidazopropionyl誘導体）、アミノ基が２つのメチル（methy

l）残基で修飾された誘導体（Dimethyl-histidyl誘導体）、Ｎ末端のアミノ基をカルボキシ基に置換した誘導体（beta-carboxyimidazopropionyl誘導体）又はＮ末端のヒスチジン残基のα炭素を除去してイミダゾアセチル（imidazoacetyl）基のみ残し、アミノ基の正電荷（positive charge）を除去した誘導体（Imidazoacetyl誘導体）などが含まれ、他の形態にＮ末端のアミノ基が変異した誘導体も本発明に含まれる。

【００５０】

本発明におけるインスリン分泌ペプチド誘導体は、エキセンジン－４のＮ末端のアミノ基又はアミノ酸残基を化学的に変異させた誘導体であることが好ましく、エキセンジン－４のＮ末端の１番目のアミノ酸であるヒスチジン残基のα炭素に存在するαアミノ基又はα炭素を置換又は除去したエキセンジン－４誘導体であることがより好ましく、Ｎ末端のアミノ基を除去したデスアミノ－ヒスチジル－エキセンジン－４（Desamino-histidylexendin-4，ＤＡ－エキセンジン－４）、ヒドロキシ基又はカルボキシ基に置換したβ－ヒドロキシイミダゾプロピオニル－エキセンジン－４（beta-hydroxy imidazopropionyl-exendin-4，ＨＹ－エキセンジン－４）、β－カルボキシイミダゾプロピオニル－エキセンジン－４（beta-carboxyimidazopropionyl-exendin-4，ＣＸ－エキセンジン－４）、２つのメチル残基で修飾したジメチル－ヒスチジル－エキセンジン－４（Dimethyl-histidyl-exendin-4，ＤＭ－エキセンジン－４）、又はＮ末端のヒスチジン残基のα炭素を除去したイミダゾアセチル－エキセンジン－４（Imidazoacetyl-exendin-4，ＣＡ－エキセンジン－４）であることがさらに好ましいが、これらに限定されるものではない。

【００５１】

ＧＬＰ－１は小腸から分泌されるホルモンであり、一般にインスリン生合成及び分泌を促進し、グルカゴン分泌を抑制し、細胞内へのグルコース取り込みを促進する。小腸において、グルカゴン前駆体はグルカゴン、ＧＬＰ－１、ＧＬＰ－２の３つのペプチドに分解される。ここで、ＧＬＰ－１とは、ＧＬＰ－１（１－３７）を意味し、インスリン分泌機能のない形態であり、ＧＬＰ－１（７－３７）の形態にプロセシングされて活性型ＧＬＰ－１（７－３７）となる。ＧＬＰ－１（７－３７）アミノ酸配列は下の通りである。

ＧＬＰ－１（７－３７）：ＨＡＥＧＴ ＦＴＳＤＶ ＳＳＹＬＥ ＧＱＡＡＫ ＥＦＩＡＷ ＬＶＫＧＲ Ｇ（配列番号３９）

【００５２】

ＧＬＰ－１誘導体とは、ＧＬＰ－１と比較して、少なくとも８０％のアミノ酸配列相同性を有するものであり、化学的に修飾された形態であってもよく、インスリン分泌機能が少なくとも同等又はそれ以上であるペプチドを意味する。

【００５３】

ＧＬＰ－１フラグメントとは、天然ＧＬＰ－１のＮ末端又はＣ末端に少なくとも１つのアミノ酸が付加又は欠失された形態を意味し、付加される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）であってもよい。

【００５４】

ＧＬＰ－１変異体とは、天然ＧＬＰ－１とアミノ酸配列が少なくとも１つ異なるペプチドであり、インスリン分泌機能を有するペプチドを意味する。

【００５５】

エキセンジン－３とエキセンジン－４は、ＧＬＰ－１と５３％のアミノ酸配列類似性を有する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、エキセンジン－３とエキセンジン－４のアミノ酸配列は次の通りである。

エキセンジン－３：ＨＳＤＧＴ ＦＴＳＤＬ ＳＫＱＭＥ ＥＥＡＶＲ ＬＦＩＥＷ ＬＫＮＧＧ ＰＳＳＧＡ ＰＰＰＳ（配列番号４０）

エキセンジン－４：ＨＧＥＧＴ ＦＴＳＤＬ ＳＫＱＭＥ ＥＥＡＶＲ ＬＦＩＥＷ ＬＫＮＧＧ ＰＳＳＧＡ ＰＰＰＳ（配列番号４１）

【００５６】

エキセンジンアゴニストとは、エキセンジンの構造に関係なく、エキセンジンの生体内受容体に結合してエキセンジンと同一の生物学的活性を示す物質を意味し、エキセンジン

誘導体とは、天然エキセンジンと比較して、少なくとも８０％のアミノ酸配列相同性を有し、アミノ酸残基の一部のグループが化学的に置換（例えば、alpha-methylation、alpha-hydroxylation）、除去（例えば、deamination）、又は修飾（例えば、N-methylation）された形態であり、インスリン分泌機能を有するペプチドを意味する。

【００５７】

エキセンジンフラグメントとは、天然エキセンジンのＮ末端又はＣ末端に少なくとも１つのアミノ酸が付加又は欠失された形態を意味し、付加される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）であってもよく、このようなエキセンジンフラグメントはインスリン分泌機能を有する。

【００５８】

エキセンジン変異体とは、天然エキセンジンとアミノ酸配列が少なくとも１つ異なるペプチドであり、インスリン分泌機能を有するペプチドを意味し、前記エキセンジン変異体には、エキセンジン－４の１２番目のアミノ酸であるリシンがセリン（serine）又はアルギニン（arginine）に置換されたペプチドが含まれる。

【００５９】

エキセンジンアゴニスト、誘導体、フラグメント及び変異体において用いる各作製方法は、単独で用いてもよく、組み合わせて用いてもよい。例えば、アミノ酸配列が少なくとも１つ異なり、Ｎ末端のアミノ酸残基が脱アミノ化されたインスリン分泌ペプチドが挙げられる。

【００６０】

本発明の一実施例に用いられる天然インスリン分泌ペプチドと修飾されたインスリン分泌ペプチドは、固相（Solid phase）合成法で合成したものであってもよく、天然インスリン分泌ペプチドを含むほとんどの天然ペプチドは組換え方法でも生産することができる。

【００６１】

前記インスリンアナログ結合体とインスリン分泌ペプチド結合体は下記化学式で表すことができる。

Ｘ－Ｌａ－Ｆ

【００６２】

上記化学式において、Ｘはインスリンアナログであるかインスリン分泌ペプチドであって、インスリンのＢ鎖又はＡ鎖の少なくとも１つのアミノ酸が変異したインスリンアナログであり、Ｌはリンカーであり、ａは０又は自然数であるが、ａが２以上である場合はそれぞれのＬが互いに独立しており、Ｆはポリエチレングリコール、脂肪酸、コレステロール、アルブミン及びそのフラグメント、特定アミノ酸配列、抗体、抗体フラグメント、ＦｃＲｎ結合物質、フィブロネクチン、サッカライドなどから選択されるものである。

【００６３】

免疫グロブリンＦｃ領域は、生体内で代謝される生分解性ポリペプチドであるので、薬物のキャリアとして安全に使用できる。また、免疫グロブリンＦｃ領域は、免疫グロブリン分子全体に比べて相対的に分子量が小さいので、結合体の作製、精製及び収率の面で有利であるだけでなく、アミノ酸配列が抗体毎に異なるため、高い非均質性を示すＦａｂ部分を除去することにより、物質の同質性が非常に高くなり、血中抗原性を誘発する可能性が低くなるという効果も期待することができる。

【００６４】

本発明における「免疫グロブリンＦｃ領域」とは、免疫グロブリンの重鎖と軽鎖の可変領域、重鎖定常領域１（ＣＨ１）及び軽鎖定常領域１（ＣＬ１）を除いたものであり、重鎖定常領域２（ＣＨ２）及び重鎖定常領域３（ＣＨ３）部分を意味し、重鎖定常領域にヒンジ（hinge）部分を含むこともある。また、本発明の免疫グロブリンＦｃ領域は、天然のものと実質的に同等又は向上した効果を有するものであれば、免疫グロブリンの重鎖と軽鎖の可変領域を除き、一部又は全部の重鎖定常領域１（ＣＨ１）及び／又は軽鎖定常領域１（ＣＬ１）を含む拡張されたＦｃ領域であってもよい。さらに、ＣＨ２及び／又はＣ

Ｈ３に相当する非常に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。
【００６５】
すなわち、本発明の免疫グロブリンＦｃ領域は、１）ＣＨ１ドメイン、ＣＨ２ドメイン、ＣＨ３ドメイン及びＣＨ４ドメイン、２）ＣＨ１ドメイン及びＣＨ２ドメイン、３）ＣＨ１ドメイン及びＣＨ３ドメイン、４）ＣＨ２ドメイン及びＣＨ３ドメイン、５）少なくとも１つのドメインと免疫グロブリンヒンジ領域（又はヒンジ領域の一部）との組み合わせ、６）重鎖定常領域の各ドメインと軽鎖定常領域の二量体であってもよい。
【００６６】
また、本発明の免疫グロブリンＦｃ領域には、天然アミノ酸配列だけでなく、その配列変異体（mutant）も含まれる。アミノ酸配列変異体とは、天然アミノ酸配列中の少なくとも１つのアミノ酸残基が欠失、挿入、非保存的もしくは保存的置換、又はそれらの組み合わせにより異なる配列を有するものを意味する。例えば、ＩｇＧ Ｆｃの場合、結合に重要であることが知られている２１４～２３８、２９７～２９９、３１８～３２２又は３２７～３３１番目のアミノ酸残基が修飾に適した部位として用いられる。
【００６７】
また、ジスルフィド結合を形成する部位が除去された変異体、天然ＦｃからＮ末端のいくつかアミノ酸が除去された変異体、天然ＦｃのＮ末端にメチオニン残基が付加された変異体など、様々な種類の変異体が用いられる。また、エフェクター機能をなくすために、補体結合部位、例えばＣ１ｑ結合部位が除去されてもよく、抗体依存性細胞傷害（antibody dependent cell mediated cytotoxicity、ADCC）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作製する技術は、特許文献７、８などに開示されている。
【００６８】
分子の活性を全体的に変化させないタンパク質及びペプチドにおけるアミノ酸交換は当該分野において公知である（非特許文献１）。最も一般的な交換は、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。
【００６９】
場合によっては、リン酸化（phosphorylation）、硫酸化（sulfation）、アクリル化（acrylation）、グリコシル化（glycosylation）、メチル化（methylation）、ファルネシル化（farnesylation）、アセチル化（acetylation）、アミド化（amidation）などにより修飾されてもよい。
【００７０】
前述したＦｃ変異体は、本発明のＦｃ領域と同じ生物学的活性を示すが、Ｆｃ領域の熱、ｐＨなどに対する構造的安定性を向上させた変異体である。
【００７１】
また、このようなＦｃ領域は、ヒト、及びウシ、ヤギ、ブタ、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から分離した天然のものから得てもよく、形質転換された動物細胞もしくは微生物から得られた組換えたもの又はその誘導体であってもよい。ここで、天然のものから得る方法においては、全免疫グロブリンをヒト又は動物の生体から分離し、その後タンパク質分解酵素で処理することにより得ることができる。パパインで処理するとＦａｂ及びＦｃに切断され、ペプシンで処理するとｐＦ’ｃ及びＦ（ａｂ）２に切断される。これらは、サイズ排除クロマトグラフィー（size-exclusion chromatography）などを用いてＦｃ又はｐＦ’ｃを分離することができる。
【００７２】
ヒト由来のＦｃ領域は、微生物から得られた組換え免疫グロブリンＦｃ領域であることが好ましい。
【００７３】

また、免疫グロブリンＦｃ領域は、天然糖鎖、天然のものに比べて増加した糖鎖、天然のものに比べて減少した糖鎖、又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糖鎖の増減又は除去には、化学的方法、酵素学的方法及び微生物を用いた遺伝工学的方法などの通常の方法が用いられる。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（ｃ１ｑ）の結合力が著しく低下し、抗体依存性細胞傷害又は補体依存性細胞傷害が低減又は除去されるので、生体内で不要な免疫反応を誘発しない。このようなことから、糖鎖が除去されるか、非グリコシル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発明の目的に適する。

【００７４】

本発明における糖鎖の除去（Deglycosylation）とは、酵素で糖を除去したＦｃ領域を意味し、非グリコシル化（Aglycosylation）とは、原核生物、好ましくは大腸菌で産生されてグリコシル化されていないＦｃ領域を意味する。

【００７５】

一方、免疫グロブリンＦｃ領域は、ヒト起源、又はウシ、ヤギ、ブタ、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り、ヒト起源であることが好ましい。また、免疫グロブリンＦｃ領域は、ＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＭ由来であるか、又はそれらの組み合わせ（combination）もしくはそれらのハイブリッド（hybrid）によるＦｃ領域であってもよい。ヒト血液に最も豊富なＩｇＧ又はＩｇＭ由来であることが好ましく、リガンド結合タンパク質の半減期を延長させることが知られているＩｇＧ由来であることが最も好ましい。

【００７６】

一方、本発明における組み合わせ（combination）とは、二量体又は多量体を形成する際に、同一起源の単鎖免疫グロブリンＦｃ領域をコードするポリペプチドが異なる起源の単鎖ポリペプチドに結合することを意味する。すなわち、ＩｇＧ Ｆｃ、ＩｇＡ Ｆｃ、ＩｇＭ Ｆｃ、ＩｇＤ Ｆｃ及びＩｇＥ Ｆｃフラグメントからなる群から選択される少なくとも２つのフラグメントから二量体又は多量体を作製することができる。

【００７７】

本発明における「ハイブリッド（hybrid）」とは、単鎖の免疫グロブリンＦｃ領域内に、少なくとも２つの異なる起源の免疫グロブリンＦｃフラグメントに相当する配列が存在することを意味する。本発明においては、様々な形態のハイブリッドが可能である。すなわち、ＩｇＧ Ｆｃ、ＩｇＭ Ｆｃ、ＩｇＡ Ｆｃ、ＩｇＥ Ｆｃ及びＩｇＤ ＦｃのＣＨ１、ＣＨ２、ＣＨ３及びＣＨ４からなる群から選択される１つ～４つのドメインのハイブリッドが可能であり、ヒンジを含んでもよい。

【００７８】

一方、ＩｇＧもＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３及びＩｇＧ４のサブクラスに分けられ、本発明においては、それらの組み合わせ又はそれらのハイブリダイゼーションも可能である。ＩｇＧ２及びＩｇＧ４サブクラスであることが好ましく、補体依存性細胞傷害（complementdependent cytotoxicity、 CDC）などのエフェクター機能（effector function）のほとんどないＩｇＧ４のＦｃ領域であることが最も好ましい。すなわち、本発明の薬物のキャリアとして最も好ましい免疫グロブリンＦｃ領域は、ヒトＩｇＧ４由来の非グリコシル化されたＦｃ領域である。ヒト由来のＦｃ領域は、ヒト生体において抗原として作用し、それに対する新規な抗体を生成するなどの好ましくない免疫反応を起こす非ヒト由来のＦｃ領域に比べて好ましい。

【００７９】

本発明における非ペプチド性重合体とは、繰り返し単位が少なくとも２つ結合された生体適合性重合体を意味し、前記繰り返し単位はペプチド結合を除く任意の共有結合により互いに連結される。このような非ペプチド性重合体は両末端又は三末端を有する。

【００８０】

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、ポリサッカライド、デキストラン、ポリビニルエチルエーテル、ポリ乳酸（polylactic acid、PLA）やポリ乳酸－グリコール酸（polylactic-glycolic acid、PLGA）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、オリゴヌクレオチド及びそれらの組み合わせからなる群から選択され、ポリエチレングリコールであることが好ましい。当該分野で公知のこれらの誘導体や当該分野の技術水準で容易に作製できる誘導体も本発明に含まれる。

【００８１】

従来のインフレームフュージョン（inframe fusion）方法で作製された融合タンパク質に用いられていたペプチド性リンカーにおいては、生体内でタンパク質分解酵素により容易に切断され、キャリアによる活性薬物の血中半減期の延長効果を期待したほど得られないこともあるが、本発明においては、ペプチドリンカーだけでなく、非ペプチドリンカーを用いることにより結合体を作製することができる。非ペプチドリンカーは、タンパク質分解酵素に抵抗性のある重合体を用いることにより、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。よって、本発明に用いられる非ペプチド性重合体は、このような役割を果たすもの、すなわち生体内タンパク質分解酵素に抵抗性のある重合体であれば制限なく用いられる。非ペプチド性重合体は、分子量が１～１００ｋＤａの範囲、好ましくは１～２０ｋＤａの範囲である。

【００８２】

また、前記免疫グロブリンＦｃ領域に結合される本発明の非ペプチド性重合体は、１種類の重合体だけでなく、異なる種類の重合体の組み合わせが用いられてもよい。

【００８３】

本発明に用いられる非ペプチド性重合体は、免疫グロブリンＦｃ領域及びタンパク質薬物に結合される反応基を有する。

【００８４】

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（maleimide）基及びスクシンイミド（succinimide）誘導体からなる群から選択されることが好ましい。前記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又はスクシンイミジルカーボネートが用いられる。特に、前記非ペプチド性重合体が両末端に反応アルデヒド基の反応基を有する場合、非特異的反応を最小限に抑え、非ペプチド性重合体の両末端に生理活性ポリペプチド及び免疫グロブリンがそれぞれ結合するのに効果的である。アルデヒド結合による還元性アルキル化で生成された最終産物は、アミド結合により連結されたものよりはるかに安定している。アルデヒド反応基は、低いｐＨではＮ末端に選択的に反応し、高いｐＨ、例えばｐＨ９．０の条件ではリシン残基と共有結合を形成することができる。

【００８５】

前記非ペプチド性重合体の両末端の反応基は、同じものであってもよく、異なるものであってもよい。例えば、一末端にはマレイミド基、他の末端にはアルデヒド基、プロピオンアルデヒド基又はブチルアルデヒド基を有してもよい。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、公知の化学反応により前記ヒドロキシ基を前述した様々な反応基として活性化するか、商業的に入手可能な修飾された反応基を有するポリエチレングリコールを用いることにより、本発明の結合体を作製することができる。

【００８６】

持続型分泌ペプチド結合体の種類及び作製方法は、特許文献３、９、１０に詳細に記載されている。

【００８７】

本発明の一実施例においては、イミダゾ－アセチルエキセンジン－４（ＣＡ－エキセンジン－４）のリシン（lysine, Lys）をＰＥＧで修飾し、ＰＥＧ修飾されたエキセンジン－４を免疫グロブリンＦｃに連結して持続型エキセンジン－４結合体を作製した（実施例

９）。

【００８８】

このような本発明の持続型インスリンアナログ結合体と持続型インスリン分泌ペプチドは、生体内効力持続効果が画期的に向上し、また生体内半減期が同程度であるので併用投与すると糖尿病（Diabetes）の治療に有用である。

【００８９】

また、このような本発明の持続型インスリンアナログ結合体と持続型インスリン分泌ペプチド結合体は、単独投与に比べて、優れた血糖調節及び血中脂質の改善効果を示す。本発明の一実施例においては、持続型インスリンアナログ結合体と持続型インスリン分泌ペプチドであるエキセンジン－４結合体を併用投与すると、脂質毒性と糖毒性の改善に基づいて、β細胞量を維持しつつ糖尿病の進行を抑制できることが確認された。これらの結果は、本発明の持続型インスリンアナログ結合体及び持続型インスリン分泌ペプチド結合体の複合組成物、又は各結合体の併用投与が、インスリン又はインスリン分泌ペプチドの単独投与時に発生し得る、糖尿病患者に起こる副作用の一種である血中脂質濃度の上昇に伴う脂質毒性、血糖調節の不具合による血中糖濃度の上昇に伴う糖毒性を画期的に改善し、膵臓β細胞の機能障害の防止及び／又は膵臓β細胞量の増加により糖尿病の進行を画期的に緩和し、糖尿病の改善、治療、予防及び／又は糖尿病の予後の改善をもたらすことを示唆するものである。

【００９０】

本発明の前記薬学的組成物は、持続型インスリンアナログ結合体及び持続型インスリン分泌ペプチド結合体を併用投与することを特徴とする。

【００９１】

このような本発明の前記持続型インスリンアナログ結合体及び持続型インスリン分泌ペプチド結合体を併用投与すると、前記持続型インスリンアナログ結合体はインスリン受容体に、前記持続型インスリン分泌ペプチド結合体はグルカゴン様ペプチド－１受容体に同時に作用し、それぞれ別に投与する場合より血中糖濃度を下げ、安定した変化推移を示す。また、前記結合体を併用投与すると、インスリン単独投与において生じ得る低血糖のリスクを軽減することができ、体重を減少させる効果があり、インスリン分泌ペプチドにより総インスリン投与量を低減することができる。さらに、エキセンジン－４などのインスリン分泌ペプチドの用量を低減することができるので、エキセンジン－４の単独治療において生じ得る吐き気、嘔吐などの副作用を低減できるという利点がある。持続型インスリン結合体及び持続型インスリン分泌ペプチド結合体の使用は、血中半減期及び生体内効力持続効果の画期的な向上により、毎日投与しなければならない慢性患者への投与回数を減少させることができるので、患者の生活の質を向上させることができるという大きな利点があり、糖尿病の治療に非常に有用である。さらに、本発明の薬学的組成物は、生体内持続性及び力価に優れ、併用投与法を用いるので用量を大幅に減少させることができる。

【００９２】

さらに、従来の製剤とは異なり、糖尿病患者において発生する膵臓β細胞の機能喪失及び／又は死滅による膵臓β細胞量の減少を緩和できるという特徴があり、これは脂質毒性及び糖毒性の改善及び相補作用によりβ細胞の機能及び細胞量の減少を改善して糖尿病の進行を抑制するなど、糖尿病患者の膵臓細胞への副作用を緩和することができる。

【００９３】

持続型インスリンアナログ結合体及び持続型インスリン分泌ペプチド結合体は、それぞれ同時、順次又は逆順に投与してもよく、適切な有効量の組み合わせで同時に投与してもよい。また、持続型インスリンアナログ結合体及び持続型インスリン分泌ペプチド結合体をそれぞれ別の容器に保管し、その後同時、順次又は逆順に併用投与することが好ましい。

【００９４】

また、本発明の併用投与用組成物である持続型インスリンアナログ結合体及び持続型インスリン分泌ペプチド結合体は、１つの容器に含まれる糖尿病治療用キットの形態であっ

てもよく、それぞれ別の容器に保管された糖尿病治療用キットの形態であってもよい。これらのキットは、薬学的に許容される担体、及びキットの使用のための説明書を含んでもよい。

【００９５】

さらに、持続型インスリンアナログ結合体と持続型インスリン分泌ペプチド結合体は、それぞれインスリン分泌ペプチド、インスリンと併用投与してもよい。持続型インスリンアナログ結合体はインスリン分泌ペプチドであるＧＬＰ－１アゴニスト（agonist）(例えば、Exenatide、Liraglutide、lixisenatide）と併用投与してもよく、持続型インスリン分泌ペプチド結合体はインスリン及びインスリンアナログ、基礎インスリン（basal insulin）と併用投与してもよい。

【００９６】

本発明における「糖尿病（Diabetes）」とは、インスリンの分泌量が不足したり、正常な機能が行われないなどの代謝疾患（metabolic disease）を意味する。本発明の薬学的組成物を個体に併用投与することにより、血糖を調節して糖尿病を治療することができるだけでなく、膵臓β細胞の機能、細胞量の維持及び増加と共に潜在的なβ細胞ストレスなどの副作用から安全な糖尿病治療剤として提供される。また、膵臓β細胞の機能と細胞量を減少させる主な原因である脂質毒性と糖毒性を画期的に減少させ、またそれにより糖尿病の進行を緩和するなど、従来の製剤の副作用を画期的に改善することができる。

【００９７】

本発明における「予防」とは、本発明の薬学的組成物の併用投与により糖尿病を防止したり、遅延させるあらゆる行為、又は膵臓細胞への副作用を防止したり、遅延させるあらゆる行為を意味し、「治療」とは、本発明の薬学的組成物の併用投与により糖尿病による症状が好転又は有利に変化するあらゆる行為、及び膵臓細胞副作用を改善するあらゆる行為を意味する。前記糖尿病の治療及び膵臓β細胞副作用の治療又は予防は、糖尿病が発生し得る任意の哺乳動物に適用することができ、その例としてヒト及び霊長類だけでなく、ウシ、ブタ、ヒツジ、ウマ、イヌ、ネコなどの家畜が制限なく含まれるが、ヒトであることが好ましい。

【００９８】

本発明における「投与」とは、任意の適切な方法で患者に所定の物質を導入することを意味し、前記薬学的組成物の投与経路は、薬物を標的組織に送達できるものであればいかなる一般的な経路で投与してもよい。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、鼻腔内投与、肺内投与、直腸内投与などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。しかし、経口投与の場合はペプチドが消化されるので、経口用組成物は、活性薬剤をコーティングしたり、胃での分解から保護されるように剤形化することが好ましい。注射剤形態に投与することが好ましい。また、持続性製剤は、活性物質を標的細胞に送達することのできる任意の装置により投与することができる。

【００９９】

また、本発明の薬学的組成物は、治療する疾患、投与経路、患者の年齢、性別及び体重、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より決定される。

【０１００】

さらに、本発明の薬学的組成物は、薬学的に許容される担体を含んでもよい。本発明における「薬学的に許容される担体」とは、生物体を刺激せず、投与化合物の生物学的活性及び特性を損なわない担体又は希釈剤を意味する。経口投与の場合は、結合剤、滑沢剤、崩壊剤、賦形剤、可溶化剤、分散剤、安定化剤、懸濁剤、色素、香料などを用いることができ、注射剤の場合は、緩衝剤、保存剤、鎮痛剤、可溶化剤、等張化剤及び安定化剤などを混合して用いることができ、局所投与用の場合は、基剤、賦形剤、滑沢剤、保存剤などを用いることができる。本発明の薬学的組成物の剤形は、前述したような薬学的に許容される担体と混合して様々な形態に製造することができる。例えば、経口投与の場合は、錠剤、トローチ剤、カプセル剤、エリキシル剤、懸濁剤、シロップ剤及びウエハー剤などの

形態に製造することができ、注射剤の場合は、使い捨てアンプル又は複数回投薬形態に製造することができる。その他、溶液、懸濁液、錠剤、丸薬、カプセル剤及び徐放性製剤などに剤形化することができる。

【０１０１】

なお、製剤化に適した担体、賦形剤及び希釈剤の例としては、ラクトース、グルコース、スクロース、ソルビトール、マンニトール、キシリトール、エリトリトール、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、微晶質セルロース、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又は鉱物油などが挙げられる。また、充填剤、抗凝集剤、滑沢剤、湿潤剤、香料及び防腐剤などをさらに含んでもよい。

【０１０２】

本発明のさらに他の態様は、糖尿病を発症するリスクのある個体又は発症した個体に、前記持続型インスリン結合体及び持続型インスリン分泌ペプチド結合体を含む薬学的組成物を投与するステップを含む、糖尿病の予防又は治療方法を提供する。

【０１０３】

本発明のさらに他の態様は、糖尿病を発症した個体に、前記持続型インスリン結合体及び持続型インスリン分泌ペプチド結合体を含む薬学的組成物を投与するステップを含む、糖尿病個体の脂質毒性（lipotoxicity）、糖毒性（glucotocity）、膵臓β細胞機能異常及び膵臓β細胞量（mass）減少からなる群から選択される少なくとも１つの膵臓β細胞副への作用改善方法を提供する。前記投与するステップは、持続型インスリンアナログ結合体及び持続型インスリン分泌ペプチド結合体を併用投与することにより行われてもよいが、これに限定されるものではなく、それぞれ同時、順次又は逆順に投与してもよく、適切な有効量の組み合わせで同時に投与してもよい。

【０１０４】

持続型インスリンアナログ結合体及び持続型インスリン分泌ペプチドの両方を含む本発明の薬学的組成物は、週１回の投与でも血糖を著しく低くし、体重増加の副作用をもたらさないので、糖尿病の予防又は治療に用いることができる。

【０１０５】

本発明のさらに他の態様は、糖尿病を発症した個体に、前記持続型インスリン結合体及び持続型インスリン分泌ペプチド結合体を含む薬学的組成物を投与するステップを含む、糖尿病患者の脂質毒性及び／又は糖毒性を改善及び／又は減少させる方法を提供する。

【０１０６】

本発明のさらに他の態様は、糖尿病を発症した個体に、前記持続型インスリン結合体及び持続型インスリン分泌ペプチド結合体を含む薬学的組成物を投与するステップを含む、糖尿病患者の膵臓β細胞機能を改善し、及び／又は膵臓β細胞量を維持並びに／もしくは増加させる方法を提供する。

【実施例】

【０１０７】

以下、実施例を挙げて本発明をより詳細に説明する。これらの実施例は単に本発明を例示するためのものであり、本発明の範囲がこれらの実施例に限定されるものではない。

【実施例１】

【０１０８】

単鎖インスリンアナログ発現ベクターの作製

保有中の天然インスリン発現ベクターを鋳型とし、Ａ鎖又はＢ鎖のアミノ酸を１つずつ修飾したインスリンアナログを作製するために、順方向及び逆方向オリゴヌクレオチドを合成し（表２）、その後ＰＣＲを行って各アナログ遺伝子を増幅した。

【０１０９】

表１に、それぞれのＡ鎖又はＢ鎖のアミノ酸の修飾配列及びアナログ名を示す。すなわち、アナログ１はＡ鎖の１番目のグリシンがアラニンに置換された形態であり、アナログ

４はＢ鎖の８番目のグリシンがアラニンに置換された形態である。
【０１１０】
【表１】

表１

アナログ	修飾配列 (Modified sequence)
アナログ１	$A^{1}G \rightarrow A$
アナログ２	$A^{2}I \rightarrow A$
アナログ３	$A^{19}Y \rightarrow A$
アナログ４	$B^{8}G \rightarrow A$
アナログ５	$B^{23}G \rightarrow A$
アナログ６	$B^{24}F \rightarrow A$
アナログ７	$B^{25}F \rightarrow A$
アナログ８	$A^{14}Y \rightarrow E$
アナログ９	$A^{14}Y \rightarrow N$

【０１１１】
インスリンアナログ増幅のためのプライマーを表２に示す。
【０１１２】

【表２】

表２

アナログ	配列	配列番号 (SEQ ID NO)
アナログ１	5′ GGGTCCCTGCAGAAGCGTGCGATTGTGGAACAATGCTGT 3′ 5′ ACAGCATTGTTCCACAATCGCACGCTTCTGCAGGGACCC 3′	SEQ ID NO 1 SEQ ID NO 2
アナログ２	5′ TCCCTGCAGAAGCGTGGCGCGGTGGAACAATGCTGTACC 3′ 5′ GGTACAGCATTGTTCCACCGCGCCACGCTTCTGCAGGGA 3′	SEQ ID NO 3 SEQ ID NO 4
アナログ３	5′ CTCTACCAGCTGGAAAACGCGTGTAACTGAGGATCC 3′ 5′ GGATCCTCAGTTACACGCGTTTTCCAGCTGGTAGAG 3′	SEQ ID NO 5 SEQ ID NO 6
アナログ４	5′ GTTAACCAACACTTGTGTGCGTCACACCTGGTGGAAGCT 3′ 5′ AGCTTCCACCAGGTGTGACGCACACAAGTGTTGGTTAAC 3′	SEQ ID NO 7 SEQ ID NO 8
アナログ５	5′ CTAGTGTGCGGGGAACGAGCGTTCTTCTACACACCCAAG 3′ 5′ CTTGGGTGTGTAGAAGAACGCTCGTTCCCCGCACACTAG 3′	SEQ ID NO 9 SEQ ID NO 10
アナログ６	5′ GTGTGCGGGGAACGAGGCGCGTTCTACACACCCAAGACC 3′ 5′ GGTCTTGGGTGTGTAGAACGCGCCTCGTTCCCCGCACAC 3′	SEQ ID NO 11 SEQ ID NO 12
アナログ７	5′ TGCGGGGAACGAGGCTTCGCGTACACACCCAAGACCCGC 3′ 5′ GCGGGTCTTGGGTGTGTACGCGAAGCCTCGTTCCCCGCA 3′	SEQ ID NO 13 SEQ ID NO 14
アナログ８	5′-CCAGCATCTGCTCCCTCGAACAGCTGGAGAACTACTG-3′ 5′-Cagtagttctccagctgttcgagggagcagatgctgg-3′	SEQ ID NO 15 SEQ ID NO 16
アナログ９	5′-CAGCATCTGCTCCCTCAACCAGCTGGAGAACTAC-3′ 5′-Gtagttctccagctggttgagggagcagatgctg-3′	SEQ ID NO 17 SEQ ID NO 18

【０１１３】

インスリンアナログ増幅のためのＰＣＲ条件は、９５℃で３０秒間、５５℃で３０秒間、６８℃で６分間とし、この過程を１８回繰り返した。このような条件で得られたインスリンアナログフラグメントは、細胞内の封入体の形態で発現させるためにｐＥＴ２２ｂベクターに挿入されており、このようにして得られた発現ベクターをｐＥＴ２２ｂ－インスリンアナログ１～９と命名した。前記発現ベクターは、Ｔ７プロモーターの制御下でインスリンアナログ１～９のアミノ酸配列番号 をコードする核酸を含み、宿主内でインスリンアナログタンパク質を封入体の形態で発現させた。

【０１１４】

表３に各インスリンアナログ１～９のＤＮＡ配列及びタンパク質配列を示す。

【０１１５】

【表３】

表３

アナログ		配列	配列番号
アナログ１	DNA	TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GCG ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC	19
	タンパク質	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg **Ala** Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	20
アナログ２	DNA	TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC GCG GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC	21
	タンパク質	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly **Ala** Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	22
アナログ３	DNA	TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC GCG TGC AAC	23
	タンパク質	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn **Ala** Cys Asn	24

【０１１６】

【表４】

アナログ４	DNA	TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GCG TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC	25
	タンパク質	Phe Val Asn Gln His Leu Cys **Ala** Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	26
アナログ５	DNA	TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GCG TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC	27
	タンパク質	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg **Ala** Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	28
アナログ６	DNA	TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC GCG TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC	29
	タンパク質	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly **Ala** Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	30

【０１１７】

【表５】

アナログ７	DNA	TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC GCG TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC	31
	タンパク質	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe **Ala** Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	32
アナログ８	DNA	TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC GAA CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC TGA	33
	タンパク質	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu **Glu** Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	34
アナログ９	DNA	TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC AAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC TGA	35
	タンパク質	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu **Asn** Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	36

【実施例２】

【０１１８】

組換えインスリンアナログ融合ペプチドの発現

Ｔ７プロモーター制御下で組換えインスリンアナログ発現を行った。それぞれの組換えインスリンアナログ発現ベクターにＥ．ｃｏｌｉ ＢＬ２１－ＤＥ３（E. coli B F-dcm ompT hsdS(rB-mB-)gal DE3); ノバジェン）を形質転換した。形質転換方法は、ノバジェン社が推奨する方法に従った。各組換え発現ベクターが形質転換されたそれぞれの単一コロニーを得て、アンピシリン（５０／ｍｌ）を含む２Ｘルリア（Luria Broth, LB）培地に

接種し、３７℃で１５時間培養した。組換え菌株培養液と３０％グリセリンとを含む２ＸＬＢ培地を１：１（ｖ／ｖ）の割合で混合して各１ｍｌずつクライオチューブに分注し、－１４０℃で保管した。これを組換え融合タンパク質の作製のための細胞ストック（cell stock）として用いた。

【０１１９】

組換えインスリンアナログの発現のために、各細胞ストック１バイアルを溶解して５００ｍｌの２Ｘルリア培地に接種し、３７℃で１４～１６時間振盪培養した。ＯＤ６００の値が５．０以上になったら培養を終了し、これを種培養液として用いた。５０Ｌ発酵槽（MSJ-U2, B.E.MARUBISHI, 日本）を用いて、種培養液を１７Ｌの発酵培地に接種して初期バス（bath）発酵を始めた。培養条件は、温度３７℃、空気量２０Ｌ／分（１ｖｖｍ）、攪拌速度５００ｒｐｍとし、３０％アンモニア水を用いてｐＨ６．７０を維持した。発酵は、培養液中の栄養素が枯渇したら追加培地（feeding solution）を添加することにより、流加培養を行った。菌株の成長はＯＤ値によりモニタし、ＯＤ値が１００以上になったら最終濃度５００ＭのＩＰＴＧを導入した。培養は導入後約２３～２５時間まで続け、培養終了後、遠心分離器を用いて組換え菌株を得て、使用するまで－８０℃で保管した。

【実施例３】

【０１２０】

組換えインスリンアナログの回収及びリフォールディング（refolding）

実施例２で発現させた組換えインスリンアナログを可溶性形態に変えるために、細胞を破砕してリフォールディングした。細胞ペレット１００ｇ（wet weight）を１Ｌ溶解緩衝液（５０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ９．０）、１ｍＭ ＥＤＴＡ（ｐＨ８．０）、０．２Ｍ ＮａＣｌ及び０．５％トリトンＸ－１００）に再浮遊させた。マイクロフルイダイザー（microfluidizer）プロセッサＭ－１１０ＥＨ（AC Technology Corp. Model M1475C）を用いて、１５，０００ｐｓｉの圧力で細胞を破砕した。破砕された細胞溶解物を７，０００ｒｐｍで４℃にて２０分間遠心分離して上清を捨て、３Ｌ洗浄緩衝液（０．５％トリトンＸ－１００、５０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．０）、０．２Ｍ ＮａＣｌ及び１ｍＭ ＥＤＴＡ）に再浮遊させた。７，０００ｒｐｍで４℃にて２０分間遠心分離してペレットを蒸留水に再浮遊させ、その後同様に遠心分離した。ペレットを得て、４００ｍｌの緩衝液（１Ｍ Ｇｌｙｃｉｎｅ，３．７８ｇ Ｃｙｓｔｅｉｎｅ－ＨＣｌ，ｐＨ１０．６）に再浮遊させて常温で１時間攪拌した。再浮遊させた組換えインスリンアナログの回収のために、４００ｍＬの８Ｍウレアを追加し、その後４０℃で１時間攪拌した。可溶化した組換えインスリンアナログのリフォールディング（refolding）のために、７，０００ｒｐｍで４℃にて３０分間遠心分離して上清を得て、その後これに２Ｌの蒸留水を蠕動ポンプ（peristaltic pump）にて１０００ｍｌ／ｈｒの流速で加えて４℃で１６時間攪拌した。

【実施例４】

【０１２１】

陽イオン結合クロマトグラフィーの精製

４５％エタノールを含む２０ｍＭクエン酸ナトリウム（ｐＨ２．０）緩衝液で平衡化したＳｏｕｒｃｅ Ｓ（GE healthcare社）カラムにリフォールディングした試料を結合させ、その後塩化カリウム０．５Ｍと４５％エタノールとを含む２０ｍＭクエン酸ナトリウム（ｐＨ２．０）緩衝液を用いて、濃度が０％から１００％になるように１０カラム容量の線形濃度勾配でインスリンアナログタンパク質を溶出した。

【実施例５】

【０１２２】

トリプシン（Trypsin）とカルボキシペプチダーゼＢ（Carboxypeptidase B）処理

脱塩カラム（Desalting column）を用いて、溶出した試料から塩を除去し、緩衝液（１０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ８．０）に交換した。得られた試料のタンパク量のモル比１０００に相当するトリプシンとモル比２０００に相当するカルボキシペプチダーゼＢを添加し、その後１６℃で１６時間攪拌した。反応を終了させるために、１Ｍクエン酸ナ

トリウム（ｐＨ２．０）を用いてｐＨを３．５に下げた。
【実施例６】
【０１２３】
陽イオン結合クロマトグラフィーの精製
反応が終了した試料を４５％エタノールを含む２０ｍＭクエン酸ナトリウム（ｐＨ２．０）緩衝液で平衡化したＳｏｕｒｃｅ Ｓ（GE healthcare社）カラムに再び結合させ、その後塩化カリウム０．５Ｍと４５％エタノールとを含む２０ｍＭクエン酸ナトリウム（ｐＨ２．０）緩衝液を用いて、濃度が０％から１００％になるように１０カラム容量の線形濃度勾配でインスリンアナログタンパク質を溶出した。
【実施例７】
【０１２４】
陰イオン結合クロマトグラフィーの精製
脱塩カラムを用いて、溶出した試料から塩を除去し、緩衝液（１０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５）に交換した。実施例６で得られた試料から純粋なインスリンアナログを純粋に分離するために、１０ｍＭトリス（ｐＨ７．５）緩衝液で平衡化した陰イオン交換カラム（Ｓｏｕｒｃｅ Ｑ：GE healthcare社）に結合させ、その後０．５Ｍ塩化ナトリウムを含む１０ｍＭトリス（ｐＨ７．５）緩衝液を用いて、濃度が０％から１００％になるように１０カラム容量の線形濃度勾配でインスリンアナログタンパク質を溶出した。
【０１２５】
精製されたインスリンアナログの純度はタンパク質電気泳動（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）及び高圧クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）を用いて分析し、アミノ酸の修飾はペプチドマッピングと各ピークの分子量分析により確認した。
【０１２６】
その結果、それぞれのインスリンアナログにおいて目的とするアミノ酸配列の修飾が行われたことが確認された。
【実施例８】
【０１２７】
持続型インスリンアナログの作製
本実施例においては、代表的なインスリンアナログである天然インスリンの配列アナログ（Ａ鎖の１４番目にＧｌｕ）の持続型結合体を作製した。
【０１２８】
インスリンアナログβ鎖のＮ末端を３．４Ｋ ＡＬＤ２ ＰＥＧ（NOF，日本）でペグ化するために、インスリンアナログ：ＰＥＧのモル比を１：４とし、インスリンアナログ濃度を５ｍｇ／ｍｌとして４～８℃で約２時間反応させた。ここで、反応はｐＨ６．０の５０ｍＭクエン酸ナトリウム（Sodium Citrate）、４０～６０％イソプロパノールで行われ、３．０～２０．０ｍＭの濃度のシアノ水素化ホウ素ナトリウム還元剤を添加して反応させた。反応液はクエン酸ナトリウム（ｐＨ３．０）、エタノールを含む緩衝液とＫＣｌ濃度勾配を用いたＳＰ－ＨＰ（GE Healthcare，米国）カラムを用いて精製した。
【０１２９】
インスリンアナログ－免疫グロブリンＦｃフラグメント結合体を作製するために、上で精製されたモノペグ化された（mono-PEGylated）インスリンアナログと免疫グロブリンＦｃフラグメントのモル比が１：１～１：２になるようにし、総タンパク質濃度を約２０ｍｇ／ｍｌとして２５℃で約１２～１６時間反応させた。ここで、反応緩衝液条件は１００ｍＭ ＨＥＰＥＳ、ｐＨ８．２であり、還元剤として２０ｍＭシアノ水素化ホウ素ナトリウムを添加した。こうすることにより、ＦｃフラグメントのＮ末端をペグ化したインスリンアナログ結合体を作製した。
【０１３０】
反応終了後、Ｑ ＨＰ（GE Healthcare，米国）カラムにおいてＴｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．５）緩衝液とＮａＣｌ濃度勾配を用いて、反応液からインスリンアナログ－免疫グロブリンＦｃフラグメント結合体を一次精製した。

【０１３１】
その後、Ｓｏｕｒｃｅ １５ＩＳＯ（GE Healthcare, 米国）を２次カラムとして用いてインスリンアナログ－免疫グロブリンＦｃフラグメント結合体を得た。ここで、Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．５）を含む硫酸アンモニウム（Ammonium sulfate）の濃度勾配を用いてインスリンアナログ－免疫グロブリンＦｃフラグメント結合体を溶出した。

【実施例９】

【０１３２】
持続型エキセンジン－４結合体の作製
イミダゾ－アセチルエキセンジン－４（ＣＡエキセンジン－４，ＡＰ，米国）を用いて、３．４ｋのＰｒｏｐｉｏｎＡＬＤ（２）ＰＥＧをＣＡエキセンジン－４のＬｙｓと反応させ、その後２つのＬｙｓ異性体ピークのうち反応が進んでＮ末端異性体と明確に区分される最後の異性体ピーク（Ｌｙｓ２７位の異性体）を用いてカップリング反応を行った。

【０１３３】
ペプチドと免疫グロブリンＦｃのモル比を１：８とし、総タンパク質濃度を６０／として、４℃で２０時間反応させた。反応は１００ｍＭ Ｋ－Ｐ（ｐＨ６．０）で行い、還元剤である２０ｍＭ ＳＣＢを添加した。カップリング反応液を２つの精製カラムで精製した。まず、カップリング反応に関与しない多量の免疫グロブリンＦｃを除去するために、ＳＯＵＲＣＥ Ｑ（ＸＫ１６ｍＬ，アマシャムバイオサイエンス）を用いた。２０ｍＭ Ｔｒｉｓ（ｐＨ７．５）において、１Ｍ ＮａＣｌを用いて塩勾配（Salt gradient）を与えると、相対的に結合力が弱い免疫グロブリンＦｃが先に溶出し、次いでエキセンジン－４－免疫グロブリンＦｃが溶出する。一次精製によりある程度の免疫グロブリンＦｃが除去されるが、イオン交換カラムにおける免疫グロブリンＦｃとエキセンジン－４－免疫グロブリンＦｃの結合力の差が大きくないので、完全には分離しなかった。よって、両物質の疎水性（Hydrophobicity）を利用して二次精製した。ＳＯＵＲＣＥ ＩＳＯ（ＨＲ１６ｍＬ，アマシャムバイオサイエンス）に２０ｍＭ Ｔｒｉｓ（ｐＨ７．５）及び１．５Ｍ硫酸アンモニウムを用いて一次精製した試料を結合させ、徐々に硫酸アンモニウム濃度を低くして試料を溶出させた。ＨＩＣカラムに結合力が弱い免疫グロブリンＦｃが先に溶出し、結合力が強いエキセンジン－４－免疫グロブリンＦｃ試料が後で溶出した。これらの疎水性の差が大きいので、イオン交換カラムよりはるかに分離が容易であった。
カラム：ＳＯＵＲＣＥ Ｑ（ＸＫ１６，アマシャムバイオサイエンス）
流速：２．０／分
勾配：Ａ０→２５％７０分Ｂ（Ａ：２０ｍＭトリス（ｐＨ７．５），Ｂ：Ａ＋１Ｍ ＮａＣｌ）
カラム：ＳＯＵＲＣＥ ＩＳＯ（ＨＲ１６，アマシャムバイオサイエンス）
流速：７．０／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）

【実施例１０】

【０１３４】
持続型インスリンアナログ結合体及び持続型エキセンジン－４結合体の併用投与による２型糖尿病モデルマウスにおける血糖調節効果及び体重変化（ΔBody weight）の確認
実施例８及び９で作製した持続型インスリンアナログ結合体と持続型エキセンジン－４結合体とを含む薬学的組成物の投与、又は持続型インスリンアナログ結合体と持続型エキセンジン－４結合体の併用投与による生体内（in vivo）効力を測定するために、２型糖尿病モデルであるｄｂ／ｄｂマウスを用いた。ｄｂ／ｄｂマウス（BKS.Cg-+Leprdb/+ Leprdb/OlaHsd mouse）は、ｌｅｐｔｉｎ受容体の除去によりヒトに類似した糖尿病症状を示すので本実施例に用いた。

【０１３５】
８週齢のｄｂ／ｄｂマウスの尾静脈から２６Ｇ注射器で得た１～２滴の血液を用いて血糖分析器（OneTouch Ultra, LifeScan, Inc., USA）で血糖を測定した。測定された血糖

に基づいて糖尿病が誘発されたか否かを判断した（３５０～６００／の間）。糖尿病が誘導されたマウスを血糖に応じて１群当たり５匹又は６匹ずつ、Ｇ１、Ｇ２、Ｇ３、Ｇ４及びＧ５の５つの群に分けた。

【０１３６】

上記群を、何も投与しない対照群（Vehicle）、持続型インスリンアナログ結合体（８．８ｎｍｏｌ／ｋｇ）を投与した群、持続型エキセンジン－４結合体（０．３６ｎｍｏｌ／ｋｇ）を投与した群、持続型インスリンアナログ結合体（２．２ｎｍｏｌ／ｋｇ）及び持続型エキセンジン－４結合体（０．３６ｎｍｏｌ／ｋｇ）を投与した群、持続型インスリンアナログ結合体（８．８ｎｍｏｌ／ｋｇ）及び持続型エキセンジン－４結合体（０．３６ｎｍｏｌ／ｋｇ）を投与した群に分けた。そして、上記試験物質を５週間にわたって繰り返し投与し、その後上記各群に対してグリコヘモグロビン（ＨｂＡ１ｃ）を測定した。グリコヘモグロビンは赤血球に正常に存在する血色素に糖が結合した形態であり、血糖が高く維持されるとグリコヘモグロビン数値も高くなる。マウスのグリコヘモグロビンは４～５週間の平均血糖値を反映するので、上記試験物質に対する血糖調節の程度を測定するのに有用である。また、薬物投与前と最終試験日に試験動物の体重変化値（ΔBody weight）を計算した。

【０１３７】

その結果、持続型インスリンアナログ結合体と持続型エキセンジン－４結合体の併用投与群でグリコヘモグロビン数値が低いことが確認された（図１）。これは、持続型インスリンアナログ結合体又は持続型エキセンジン－４結合体をそれぞれ投与した群に比べて大幅に改善された結果であった。また、インスリンアナログ結合体の投与用量が１／４に減少したにもかかわらず前述した併用投与の効果が維持されることが確認された。

【０１３８】

ΔＢｏｄｙ　ｗｅｉｇｈｔを測定した結果、持続型インスリンアナログ結合体と持続型エキセンジン－４結合体を併用投与した群は、持続型インスリンアナログ結合体の単独投与群に比べて、体重増加が緩和されることが確認された（図２）。また、持続型インスリンアナログ結合体の投与用量を１／４に減少させると、このような体重増加緩和効果が著しく増加することが確認された。

【０１３９】

これらの結果は、本発明の持続型インスリンアナログ結合体と持続型エキセンジン－４結合体を併用投与すると、単独投与に比べて優れた血糖調節効果を示すことを意味する。また、前述した併用投与による血糖調節効果は、インスリンアナログ結合体の投与用量減少にもかかわらず継続して維持されることが確認された。体重変化については、持続型インスリンアナログ結合体の投与用量が１／４に減少することにより、体重増加が著しく低下することが確認された。これは、持続型インスリンアナログ結合体と持続型エキセンジン－４結合体を併用投与すると、インスリン用量の減少により、体重増加の副作用だけでなく、低血糖のリスクまでも大幅に減少させることを示唆する。

【実施例１１】

【０１４０】

持続型インスリンアナログ結合体及び持続型エキセンジン－４結合体の併用投与による２型糖尿病モデルマウスにおけるβ細胞量維持の効果

持続型インスリンアナログ結合体（持続型インスリン誘導体結合体）と持続型インスリン分泌ペプチドの例である持続型エキセンジン－４結合体とを含む薬学的組成物の投与、又は持続型インスリンアナログ結合体と持続型エキセンジン－４結合体の併用投与による生体内（in vivo）効力を測定するために、２型糖尿病モデルであるｄｂ／ｄｂマウスを用いた。

【０１４１】

本実施例においては、持続型インスリン誘導体結合体のインスリンアナログとして表１のアナログ８（Ａ１４Ｙ→Ｅ）を用い、持続型インスリン分泌ペプチドとしてイミダゾ－アセチルエキセンジン－４（ＣＡエキセンジン－４）を含む持続型エキセンジン－４結合

体を用いた。エキセンジン－４のリシンをＰＥＧで修飾し、ＰＥＧ修飾したエキセンジン－４を免疫グロブリンＦｃに連結することにより持続型エキセンジン－４結合体を作製した。特に、ＣＡエキセンジン－４とインスリンアナログ８の結合体はモル比が１．０１～１：５０の範囲であってもよい。

【０１４２】

ｄｂ／ｄｂマウス（BKS.Cg-+Leprdb/+ Leprdb/OlaHsdmouse）は、レプチン（leptin）受容体の除去によりヒトに類似した糖尿病症状を示すので本実施例に用いた。

【０１４３】

１２週齢のｄｂ／ｄｂマウスの尾静脈から２６Ｇ注射器で得た１～２滴の血液を用いて血糖分析器（OneTouch Ultra, LifeScan, Inc., USA）で血糖を測定した。測定された血糖量に基づいて糖尿病が誘発されたか否かを判断した（非糖尿病の正常範囲は約１００～１５０ｍｇ／ｄｌであり、実施例の正確性のために血糖が３５０ｍｇ／ｄｌ以上のマウスを選択して用いた）。糖尿病が誘導されたマウスを血糖に応じて１群当たり７匹又は８匹ずつ、Ｇ１、Ｇ２、Ｇ３、Ｇ４、Ｇ５、Ｇ６及びＧ７の７つの群に分けた。

【０１４４】

上記群を、何も投与しない対照群（Vehicle）、持続型インスリンアナログ結合体を各濃度で投与した２つの群（４．２ｎｍｏｌ／ｋｇ，８．４ｎｍｏｌ／ｋｇ）、持続型エキセンジン－４結合体（０．３６ｎｍｏｌ／ｋｇ）を投与した群、持続型インスリンアナログ結合体（４．２ｎｍｏｌ／ｋｇ）及び持続型エキセンジン－４結合体（０．３６ｎｍｏｌ／ｋｇ）を併用投与した群、持続型インスリンアナログ結合体（８．４ｎｍｏｌ／ｋｇ）及び持続型エキセンジン－４結合体（０．３６ｎｍｏｌ／ｋｇ）を併用投与した群に分けた。そして、上記試験物質を前述した用量で１２週間にわたって２日間隔で繰り返し投与し、その後上記各群に対してグリコヘモグロビン（ＨｂＡ１ｃ）の量を測定した。グリコヘモグロビンは赤血球に正常に存在する血色素に糖が結合した形態であり、血糖が高く維持されるとグリコヘモグロビン数値も高くなる。マウスのグリコヘモグロビンは４～５週間の平均血糖値を反映するので、上記試験物質に対する血糖調節の程度を測定するのに有用である。１２週間にわたって繰り返し薬物を投与し、その後マウスの眼窩静脈から採血して得た血清における中性脂肪の濃度を測定した。また、各個体を解剖し、膵臓を取り出してβ細胞量を測定した。

【０１４５】

その結果、持続型インスリンアナログ結合体と持続型エキセンジン－４結合体の併用投与群でグリコヘモグロビン数値が低いことが確認された（図５）。これは、持続型インスリンアナログ結合体又は持続型エキセンジン－４結合体をそれぞれ投与した群に比べて大幅に改善された結果であった。

【０１４６】

血清中の中性脂肪の濃度を測定した結果、持続型インスリンアナログ結合体と持続型エキセンジン－４結合体の併用投与群で中性脂肪の濃度が投与濃度依存的に低下することが確認された（図４）。

【０１４７】

各薬物投与群のβ細胞量を比較した結果、持続型インスリンアナログ結合体の単独投与群、持続型エキセンジン－４結合体の単独投与群、及び両結合体の併用投与群の全てにおいて、対照群に比べてβ細胞量が増加することが確認された（図３）。

【０１４８】

また、持続型インスリンアナログ結合体及び持続型エキセンジン－４結合体の単独投与群と比較して、両薬物の併用による相乗効果が確認された。これらの結果から、持続型インスリンアナログ結合体と持続型エキセンジン－４結合体の併用投与により脂質毒性と糖毒性が改善されることが確認された。

【０１４９】

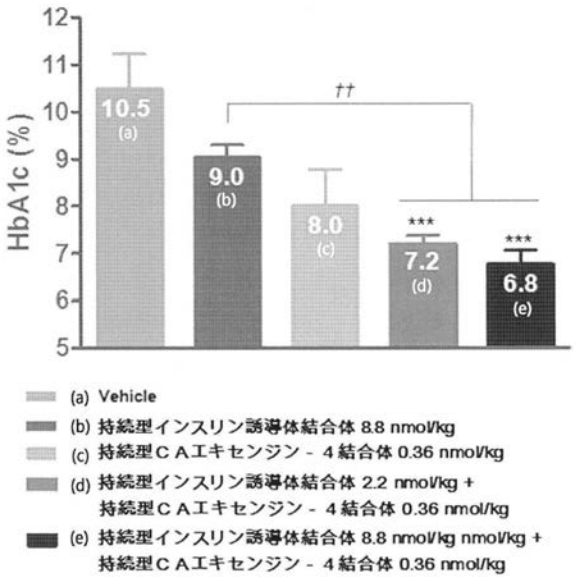
これらの結果は、本発明の持続型インスリンアナログ結合体と持続型エキセンジン－４結合体を併用投与すると、単独投与に比べて、優れた血糖調節及び血中脂質の改善効果を

示すことを意味する。これは、持続型インスリンアナログ結合体と持続型インスリン分泌ペプチドであるエキセンジン－４結合体を併用投与すると、脂質毒性と糖毒性の改善によりβ細胞量を維持し、さらに糖尿病の進行を抑制することを示唆するものであり、本発明の持続型インスリンアナログ結合体及び持続型インスリン分泌ペプチド結合体の複合組成物、又は各結合体の併用投与が、インスリン又はインスリン分泌ペプチドの単独投与時に発生し得る、糖尿病患者に起こる副作用の一種である血中脂質濃度の上昇に伴う脂質毒性、血糖調節の不具合による血中糖濃度の上昇に伴う糖毒性を画期的に改善し、膵臓β細胞の機能障害の防止及び／又は膵臓β細胞量の増加により糖尿病の進行を画期的に緩和し、糖尿病の改善、治療、予防及び／又は糖尿病の予後の改善をもたらすことを示唆するものである。

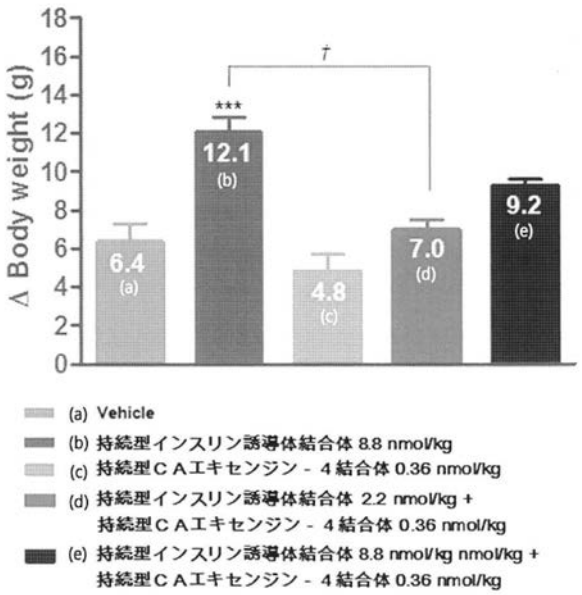
【０１５０】

以上の説明から、本発明の属する技術分野の当業者であれば、本発明がその技術的思想や必須の特徴を変更することなく、他の具体的な形態で実施できることを理解するであろう。なお、上記実施例はあくまで例示的なものであり、限定的なものでないことを理解すべきである。本発明の範囲は、明細書ではなく特許請求の範囲の意味及び範囲とその等価概念から導かれるあらゆる変更や変形された形態を含むものであると解釈すべきである。

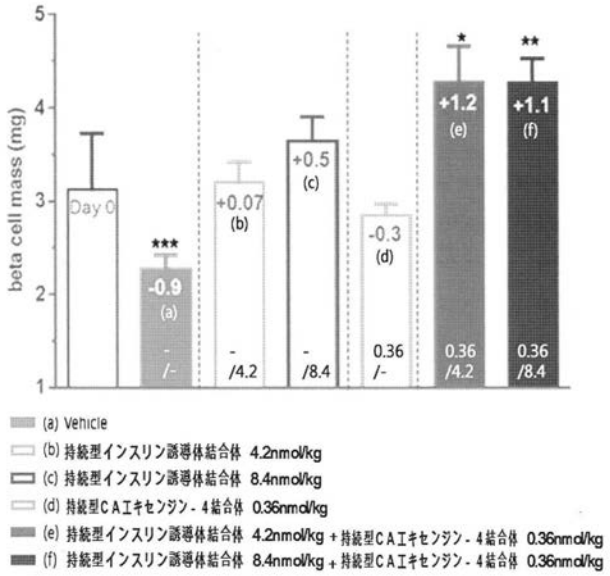
【図１】



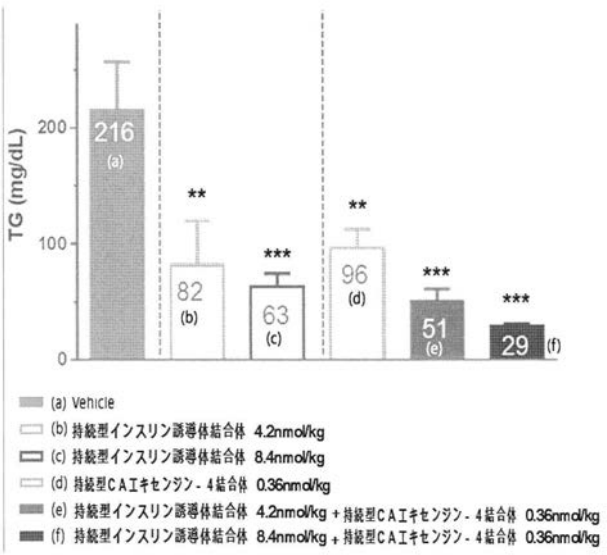
【図２】



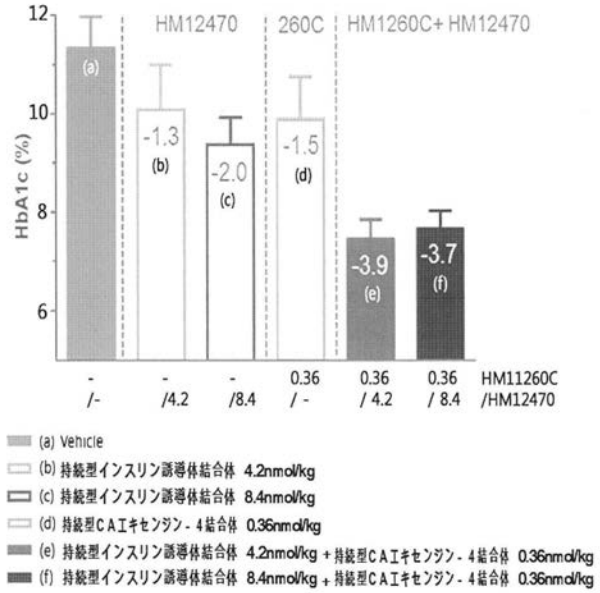
【図３】


beta cell mass (mg)
5
4
3
2
1
Day 0
***
-0.9
(a)
-
/-
+0.07
(b)
-
/4.2
+0.5
(c)
-
/8.4
-0.3
(d)
0.36
/-
*
+1.2
(e)
0.36
/4.2
**
+1.1
(f)
0.36
/8.4
(a) Vehicle
(b) 持続型インスリン誘導体結合体 4.2nmol/kg
(c) 持続型インスリン誘導体結合体 8.4nmol/kg
(d) 持続型CAエキセンジン-4結合体 0.36nmol/kg
(e) 持続型インスリン誘導体結合体 4.2nmol/kg + 持続型CAエキセンジン-4結合体 0.36nmol/kg
(f) 持続型インスリン誘導体結合体 8.4nmol/kg + 持続型CAエキセンジン-4結合体 0.36nmol/kg

【図４】


TG (mg/dL)
200
100
0
216
(a)
**
82
(b)
***
63
(c)
**
96
(d)
***
51
(e)
***
29
(f)
(a) Vehicle
(b) 持続型インスリン誘導体結合体 4.2nmol/kg
(c) 持続型インスリン誘導体結合体 8.4nmol/kg
(d) 持続型CAエキセンジン-4結合体 0.36nmol/kg
(e) 持続型インスリン誘導体結合体 4.2nmol/kg + 持続型CAエキセンジン-4結合体 0.36nmol/kg
(f) 持続型インスリン誘導体結合体 8.4nmol/kg + 持続型CAエキセンジン-4結合体 0.36nmol/kg

【図５】


HbA1c (%)
12
10
8
6
HM12470
260C
HM1260C+ HM12470
(a)
-1.3
(b)
-2.0
(c)
-1.5
(d)
-3.9
(e)
-3.7
(f)
-
/-
-
/4.2
-
/8.4
0.36
/ -
0.36
/ 4.2
0.36
/ 8.4
HM11260C
/HM12470
(a) Vehicle
(b) 持続型インスリン誘導体結合体 4.2nmol/kg
(c) 持続型インスリン誘導体結合体 8.4nmol/kg
(d) 持続型CAエキセンジン-4結合体 0.36nmol/kg
(e) 持続型インスリン誘導体結合体 4.2nmol/kg + 持続型CAエキセンジン-4結合体 0.36nmol/kg
(f) 持続型インスリン誘導体結合体 8.4nmol/kg + 持続型CAエキセンジン-4結合体 0.36nmol/kg

【配列表】
2017521377000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2015/005424

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 38/28(2006.01)i, A61K 38/26(2006.01)i, A61K 47/48(2006.01)i, A61K 47/30(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)

A61K 38/28; A61K 39/395; A61K 38/00; A61K 47/30; A61K 38/26; A61K 38/16; A61K 47/48

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: sustained-insulin analogue conjugate, sustained-insulinotropic peptide conjugate, Exendin-4, Immunoglobulin Fc domain, non-peptide linker, pancretic β-cell side effect improvement

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2012-0135123 A (HANMI SCIENCE CO., LTD.) 12 December 2012 See abstract; claims 1-19; paragraph [0047]; and figures 1-3.	1,3-22
Y		2,23-24,26
Y	KR 10-2011-0084956 A (SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH.) 26 July 2011 See abstract; claims 1-32.	2,23-24,26
A	JP 2012-229214 A (NOVO NORDISK AS) 22 November 2012 See the entire document.	1-24,26
A	KR 10-2011-0092253 A (HANMI HOLDINGS CO., LTD.) 17 August 2011 See the entire document.	1-24,26
A	KR 10-2011-0137819 A (GLAXO GROUP LIMITED) 23 December 2011 See the entire document.	1-24,26

☐ 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 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
04 AUGUST 2015 (04.08.2015)	**04 AUGUST 2015 (04.08.2015)**
Name and mailing address of the ISA/**KR** Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2015/005424

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.: **25**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 25 pertains to a method for treatment of the human body, and thus pertains to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17 (2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).

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 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 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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

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/KR2015/005424

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2012-0135123 A	12/12/2012	CA 2837856 A1	06/12/2012
		CN 103596595 A	19/02/2014
		EP 2717918 A2	16/04/2014
		JP 2014-516984 A	17/07/2014
		US 2014-0120120 A1	01/05/2014
		WO 2012-165915 A2	06/12/2012
		WO 2012-165915 A3	28/03/2013
KR 10-2011-0084956 A	26/07/2011	AU 2009-305472 A1	22/04/2010
		CA 2740685 A1	22/04/2010
		CN 102256618 A	23/11/2011
		CN 103736082 A	23/04/2014
		EP 2349324 A2	03/08/2011
		JP 2012-255040 A	27/12/2012
		JP 2012-505852 A	08/03/2012
		JP 5731981 B2	10/06/2015
		JP 5732016 B2	10/06/2015
		TW 201026321 A	16/07/2010
		US 2012-0021978 A1	26/01/2012
		WO 2010-043566 A2	22/04/2010
		WO 2010-043566 A3	17/06/2010
JP 2012-229214 A	22/11/2012	CA 2705821 A1	22/05/2009
		CN 101861333 A	13/10/2010
		EP 2209800 A2	28/07/2010
		EP 2209800 B1	24/07/2013
		EP 2597103 A1	29/05/2013
		ES 2430042 T3	18/11/2013
		JP 2011-503152 A	27/01/2011
		JP 5241849 B2	17/07/2013
		MX 2010005245 A	01/06/2010
		US 2011-0152185 A1	23/06/2011
		US 8937042 B2	20/01/2015
		WO 2009-063072 A2	22/05/2009
		WO 2009-063072 A3	07/01/2010
KR 10-2011-0092253 A	17/08/2011	AU 2008-203574 A1	10/07/2008
		CA 2674538 A1	10/07/2008
		CA 2674538 C	17/12/2013
		CN 101646451 A	10/02/2010
		CN 101646451 B	26/03/2014
		CN 103435699 A	11/12/2013
		CN 103435699 B	15/04/2015
		CN 103435700 A	11/12/2013
		EP 2114438 A1	11/11/2009
		EP 2114438 B1	29/08/2012
		EP 2114438 B8	03/10/2012
		JP 2008-169195 A	24/07/2008
		JP 2010-515677 A	13/05/2010

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2015/005424

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		JP 5399265 B2	29/01/2014
		KR 10-1058290 B1	22/08/2011
		KR 10-1058315 B1	22/08/2011
		TW 200930408 A	16/07/2009
		TW I413528 B	01/11/2013
		US 2010-0105877 A1	29/04/2010
		US 8476230 B2	02/07/2013
		WO 2008-082274 A1	10/07/2008
KR 10-2011-0137819 A	23/12/2011	AU 2010-227552 A1	30/09/2010
		CA 2756853 A1	30/09/2010
		CN 102481373 A	30/05/2012
		CN 104127880 A	05/11/2014
		EP 2411054 A2	01/02/2012
		JP 2012-521971 A	20/09/2012
		TW 201100104 A	01/01/2011
		US 2012-0100141 A1	26/04/2012
		US 8779103 B2	15/07/2014
		WO 2010-108937 A2	30/09/2010
		WO 2010-108937 A3	25/11/2010

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2015/005424

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 38/28(2006.01)i, A61K 38/26(2006.01)i, A61K 47/48(2006.01)i, A61K 47/30(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
A61K 38/28; A61K 39/395; A61K 38/00; A61K 47/30; A61K 38/26; A61K 38/16; A61K 47/48

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 지속형 인슐린 아날로그 결합체, 지속형 인슐린 분비 펩타이드 결합체, 엑센딘-4, 면역글로불린 Fc 영역, 비펩타이드성 링커, 췌장 베타세포 부작용 개선

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2012-0135123 A (한미사이언스 주식회사) 2012.12.12 요약; 청구항 1-19; 문단 [0047]; 및 도면 1-3 참조.	1,3-22
Y		2,23-24,26
Y	KR 10-2011-0084956 A (사노피-아벤티스 도이칠란트 게엠베하) 2011.07.26 요약; 청구항 1-32 참조.	2,23-24,26
A	JP 2012-229214 A (NOVO NORDISK AS) 2012.11.22 전체 문헌 참조.	1-24,26
A	KR 10-2011-0092253 A (한미홀딩스 주식회사) 2011.08.17 전체 문헌 참조.	1-24,26
A	KR 10-2011-0137819 A (글락소 그룹 리미티드) 2011.12.23 전체 문헌 참조.	1-24,26

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2015년 08월 04일 (04.08.2015)	2015년 08월 04일 (04.08.2015)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관
김승범
전화번호 +82-42-481-3371

서식 PCT/ISA/210 (두 번째 용지) (2015년 1월)

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2015/005424

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 25
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 25는 사람의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.

2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,

3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.

2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.

3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.

4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에 관한 기재

☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.

☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.

☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2015/005424

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2012-0135123 A	2012/12/12	CA 2837856 A1	2012/12/06
		CN 103596595 A	2014/02/19
		EP 2717918 A2	2014/04/16
		JP 2014-516984 A	2014/07/17
		US 2014-0120120 A1	2014/05/01
		WO 2012-165915 A2	2012/12/06
		WO 2012-165915 A3	2013/03/28
KR 10-2011-0084956 A	2011/07/26	AU 2009-305472 A1	2010/04/22
		CA 2740685 A1	2010/04/22
		CN 102256618 A	2011/11/23
		CN 103736082 A	2014/04/23
		EP 2349324 A2	2011/08/03
		JP 2012-255040 A	2012/12/27
		JP 2012-505852 A	2012/03/08
		JP 5731981 B2	2015/06/10
		JP 5732016 B2	2015/06/10
		TW 201026321 A	2010/07/16
		US 2012-0021978 A1	2012/01/26
		WO 2010-043566 A2	2010/04/22
		WO 2010-043566 A3	2010/06/17
JP 2012-229214 A	2012/11/22	CA 2705821 A1	2009/05/22
		CN 101861333 A	2010/10/13
		EP 2209800 A2	2010/07/28
		EP 2209800 B1	2013/07/24
		EP 2597103 A1	2013/05/29
		ES 2430042 T3	2013/11/18
		JP 2011-503152 A	2011/01/27
		JP 5241849 B2	2013/07/17
		MX 2010005245 A	2010/06/01
		US 2011-0152185 A1	2011/06/23
		US 8937042 B2	2015/01/20
		WO 2009-063072 A2	2009/05/22
		WO 2009-063072 A3	2010/01/07
KR 10-2011-0092253 A	2011/08/17	AU 2008-203574 A1	2008/07/10
		CA 2674538 A1	2008/07/10
		CA 2674538 C	2013/12/17
		CN 101646451 A	2010/02/10
		CN 101646451 B	2014/03/26
		CN 103435699 A	2013/12/11
		CN 103435699 B	2015/04/15
		CN 103435700 A	2013/12/11
		EP 2114438 A1	2009/11/11
		EP 2114438 B1	2012/08/29
		EP 2114438 B8	2012/10/03
		JP 2008-169195 A	2008/07/24
		JP 2010-515677 A	2010/05/13

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2015/005424

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		JP 5399265 B2	2014/01/29
		KR 10-1058290 B1	2011/08/22
		KR 10-1058315 B1	2011/08/22
		TW 200930408 A	2009/07/16
		TW I413528 B	2013/11/01
		US 2010-0105877 A1	2010/04/29
		US 8476230 B2	2013/07/02
		WO 2008-082274 A1	2008/07/10
KR 10-2011-0137819 A	2011/12/23	AU 2010-227552 A1	2010/09/30
		CA 2756853 A1	2010/09/30
		CN 102481373 A	2012/05/30
		CN 104127880 A	2014/11/05
		EP 2411054 A2	2012/02/01
		JP 2012-521971 A	2012/09/20
		TW 201100104 A	2011/01/01
		US 2012-0100141 A1	2012/04/26
		US 8779103 B2	2014/07/15
		WO 2010-108937 A2	2010/09/30
		WO 2010-108937 A3	2010/11/25

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		テーマコード（参考）
A61K	*47/60*	*(2017.01)*	A61K	47/60	
C07K	*14/62*	*(2006.01)*	C07K	14/62	
C07K	*19/00*	*(2006.01)*	C07K	19/00	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,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,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ

(72)発明者 キム デジン
大韓民国４４５－７６４キョンギード．ファンソン－シ．ピョンジョム２－ロ１０３．５０６－１９０１
(72)発明者 ホ ヨンホ
大韓民国４６３－９１７キョンギード．ソンナム－シ．プンダン－グ．ヤンヒョン－ロ５０７．３０２－５０６
(72)発明者 チェ インヨン
大韓民国４４８－７５５キョンギード．ヨンイン－シ．スジ－グ．ヨングー－デロ２２７１ボン－ギル７０．１０５－１８０１
(72)発明者 チョン ソンヨプ
大韓民国４４８－１３０キョンギード．ヨンイン－シ．スジ－グ．マンヒョン－ロ１０７．７０９－１０４
(72)発明者 クウォン セチャン
大韓民国１３５－５０６ソウル．カンナム－グ．ソルルン－ロ２２１．４０８－１８０４

Ｆターム(参考) 4C076 EE41Q FF31 FF65
4C084 AA02 AA03 BA01 BA08 BA18 BA19 BA23 BA41 BA44 DB34
MA05 MA66 NA12 ZC331 ZC332 ZC351 ZC352 ZC751 ZC752
4H045 BA17 BA18 BA19 BA21 DA37 EA20 FA74 GA23