

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-521491

(P2023-521491A)

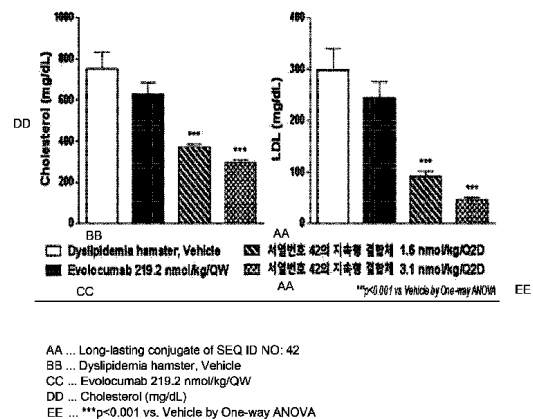
(43)公表日 令和5年5月24日(2023.5.24)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)			
A 6 1 K	38/16 (2006.01)	A 6 1 K	38/16		4 C 0 7 6		
A 6 1 K	47/60 (2017.01)	A 6 1 K	47/60		4 C 0 8 4		
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	V	4 C 0 8 5		
A 6 1 P	3/06 (2006.01)	A 6 1 P	3/06		4 H 0 4 5		
C 0 7 K	14/605 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	Y			
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全61頁)	最終頁に続く	
(21)出願番号	特願2022-562985(P2022-562985)	(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 1 8 5 3 6 キョンギード フ ァソン-シ パルタン-ミョン ムハ-ロ 2 1 4 (74)代理人 100094569 弁理士 田中 伸一郎 (74)代理人 100103610 弁理士 ▲吉▼田 和彦 (74)代理人 100109070 弁理士 須田 洋之 (74)代理人 100119013 弁理士 山崎 一夫 (74)代理人 100123777			
(86)(22)出願日	令和3年4月20日(2021.4.20)						
(85)翻訳文提出日	令和4年10月17日(2022.10.17)						
(86)国際出願番号	PCT/KR2021/004961						
(87)国際公開番号	WO2021/215801						
(87)国際公開日	令和3年10月28日(2021.10.28)						
(31)優先権主張番号	10-2020-0047733						
(32)優先日	令和2年4月20日(2020.4.20)						
(33)優先権主張国・地域又は機関	韓国(KR)						
(81)指定国・地域	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,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く				最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 グルカゴン、G L P - 1 及び G I P 受容体の全てに対して活性を有する三重活性体又はその結合体を含む高脂血症の予防又は治療用薬学的組成物及び予防又は治療方法

(57)【要約】

本発明は、グルカゴン、G L P - 1 及び G I P 受容体の全てに対して活性を有する三重活性体及び／又はその持続型結合体の高脂血症に対する予防又は治療的用途に関する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】

グルカゴン受容体、GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) 受容体及びGIP (Glucose-dependent insulionotropic polypeptide) 受容体に対して活性を有する分離されたペプチドを含み、

前記ペプチドは、下記一般式1で表されるアミノ酸配列を含む、高脂血症の予防又は治療のための薬学的組成物：

Xaa1-Xaa2-Xaa3-Gly-Thr-Phe-Xaa7-Ser-Asp-Xaa10-Ser-Xaa12-Xaa13-Xaa14-Xaa15-Xaa16-Xaa17-Xaa18-Xaa19-Xaa20-Xaa21-Phe-Xaa23-Xaa24-Trp-Leu-Xaa27-Xaa28-Xaa29-Xaa30-R1 (一般式1、配列番号103)

上記一般式1において、Xaa1はヒスチジン (His、H)、4-イミダゾアセチル (CA)、又はチロシン (Tyr、Y) であり、Xaa2はグリシン (Gly、G)、 α -メチルグルタミン酸、又はAib (aminoisobutyric acid) であり、Xaa3はグルタミン酸 (Glu、E) 又はグルタミン (Gln、Q) であり、Xaa7はトレオニン (Thr、T) 又はイソロイシン (Ile、I) であり、Xaa10はロイシン (Leu、L)、チロシン (Tyr、Y)、リシン (Lys、K)、システイン (Cys、C)、又はバリン (Val、V) であり、Xaa12はリシン (Lys、K)、セリン (Ser、S)、又はイソロイシン (Ile、I) であり、Xaa13はグルタミン (Gln、Q)、チロシン (Tyr、Y)、アラニン (Ala、A)、又はシステイン (Cys、C) であり、Xaa14はロイシン (Leu、L)、メチオニン (Met、M)、又はチロシン (Tyr、Y) であり、Xaa15はシステイン (Cys、C)、アスパラギン酸 (Asp、D)、グルタミン酸 (Glu、E)、又はロイシン (Leu、L) であり、Xaa16はグリシン (Gly、G)、グルタミン酸 (Glu、E)、又はセリン (Ser、S) であり、Xaa17はグルタミン (Gln、Q)、アルギニン (Arg、R)、イソロイシン (Ile、I)、グルタミン酸 (Glu、E)、システイン (Cys、C)、又はリシン (Lys、K) であり、Xaa18はアラニン (Ala、A)、グルタミン (Gln、Q)、アルギニン (Arg、R)、又はヒスチジン (His、H) であり、Xaa19はアラニン (Ala、A)、グルタミン (Gln、Q)、システイン (Cys、C)、又はバリン (Val、V) であり、Xaa20はリシン (Lys、K)、グルタミン (Gln、Q)、又はアルギニン (Arg、R) であり、Xaa21はグルタミン酸 (Glu、E)、グルタミン (Gln、Q)、ロイシン (Leu、L)、システイン (Cys、C)、又はアスパラギン酸 (Asp、D) であり、Xaa23はイソロイシン (Ile、I) 又はバリン (Val、V) であり、Xaa24はアラニン (Ala、A)、グルタミン (Gln、Q)、システイン (Cys、C)、アスパラギン (Asn、N)、アスパラギン酸 (Asp、D)、又はグルタミン酸 (Glu、E) であり、Xaa27はバリン (Val、V)、ロイシン (Leu、L)、リシン (Lys、K)、又はメチオニン (Met、M) であり、Xaa28はシステイン (Cys、C)、リシン (Lys、K)、アラニン (Ala、A)、アスパラギン (Asn、N)、又はアスパラギン酸 (Asp、D) であり、Xaa29はシステイン (Cys、C)、グリシン (Gly、G)、グルタミン (Gln、Q)、トレオニン (Thr、T)、グルタミン酸 (Glu、E)、又はヒスチジン (His、H) であり、Xaa30はシステイン (Cys、C)、グリシン (Gly、G)、リシン (Lys、K)、又はヒスチジン (His、H) であるか、又は存在せず、

R1はシステイン (Cys、C)、GKKNDWKHNIT (配列番号106)、m-SSGAPPPS-n (配列番号107)、又はm-SSGQPPPS-n (配列番号108) であるか、又は存在せず、

ここで、mは-Cys-、-Pro-、又は-Gly-Pro-であり、nは-Cys-、-Gly-、-Ser-、又は-His-Gly-であるか、又は存在しない。

【請求項 2】

上記一般式 1 において、X a a 1 4 はロイシン又はメチオニンであり、X a a 1 5 はシステイン、アスパラギン酸又はロイシンである、請求項 1 に記載の薬学的組成物。

【請求項 3】

上記一般式 1 において、X a a 2 はグリシン、 α -メチルグルタミン酸、又は A i b であり、X a a 7 はトレオニンであり、X a a 1 0 はチロシン、システイン、又はバリンであり、X a a 1 2 はリシン又はイソロイシンであり、X a a 1 3 はチロシン、アラニン、グルタミン、又はシステインであり、X a a 1 4 はロイシン、システイン、又はメチオニンであり、X a a 1 5 はシステイン、ロイシン、グルタミン酸、又はアスパラギン酸であり、X a a 1 7 はグルタミン、アルギニン、イソロイシン、システイン、グルタミン酸、又はリシンであり、X a a 1 8 はアラニン、グルタミン、アルギニン、又はヒスチジンであり、X a a 1 9 はアラニン、グルタミン、バリン、又はシステインであり、X a a 2 0 はリシン、アルギニン、又はグルタミンであり、X a a 2 1 はグルタミン酸、グルタミン、ロイシン、システイン、又はアスパラギン酸であり、X a a 2 3 はイソロイシン又はバリンであり、X a a 2 4 はシステイン、アラニン、グルタミン、アスパラギン、グルタミン酸、又はアスパラギン酸であり、X a a 2 7 はロイシン又はリシンである、請求項 1 に記載の薬学的組成物。

10

【請求項 4】

前記ペプチドは、下記一般式 2 で表されるアミノ酸配列を含むペプチドである、請求項 1 に記載の薬学的組成物：

20

X a a 1 - X a a 2 - G l n - G l y - T h r - P h e - T h r - S e r - A s p - X a a 1 0 - S e r - L y s - X a a 1 3 - X a a 1 4 - X a a 1 5 - X a a 1 6 - X a a 1 7 - X a a 1 8 - X a a 1 9 - X a a 2 0 - X a a 2 1 - P h e - X a a 2 3 - X a a 2 4 - T r p - L e u - L e u - X a a 2 8 - X a a 2 9 - X a a 3 0 - X a a 3 1 - S e r - S e r - G l y - G l n - P r o - P r o - P r o - S e r - X a a 4 0 (一般式 2、配列番号 1 0 4)

上記一般式 2 において、X a a 1 は 4-イミダゾアセチル、ヒスチジン、又はチロシンであり、X a a 2 はグリシン、 α -メチルグルタミン酸、又は A i b であり、X a a 1 0 はチロシン、又はシステインであり、X a a 1 3 はアラニン、グルタミン、チロシン、又はシステインであり、X a a 1 4 はロイシン、メチオニン、又はチロシンであり、X a a 1 5 はアスパラギン酸、グルタミン酸、又はロイシンであり、X a a 1 6 はグリシン、グルタミン酸、又はセリンであり、X a a 1 7 はグルタミン、アルギニン、イソロイシン、グルタミン酸、システイン、又はリシンであり、X a a 1 8 はアラニン、グルタミン、アルギニン、又はヒスチジンであり、X a a 1 9 はアラニン、グルタミン、システイン、又はバリンであり、X a a 2 0 はリシン、グルタミン、又はアルギニンであり、X a a 2 1 はシステイン、グルタミン酸、グルタミン、ロイシン、又はアスパラギン酸であり、X a a 2 3 はイソロイシン又はバリンであり、X a a 2 4 はシステイン、アラニン、グルタミン、アスパラギン、又はグルタミン酸であり、X a a 2 8 はリシン、システイン、アスパラギン、又はアスパラギン酸であり、X a a 2 9 はグリシン、グルタミン、システイン、又はヒスチジンであり、X a a 3 0 はシステイン、グリシン、リシン、又はヒスチジンであり、X a a 3 1 はプロリン又はシステインであり、X a a 4 0 はシステインであるか、又は存在しない。

30

40

【請求項 5】

上記一般式 1 において、X a a 2 はグリシン、 α -メチルグルタミン酸、又は A i b であり、X a a 7 はトレオニンであり、X a a 1 0 はチロシン、システイン、又はバリンであり、X a a 1 2 はリシン又はイソロイシンであり、X a a 1 3 はチロシン、アラニン、又はシステインであり、X a a 1 4 はロイシン又はメチオニンであり、X a a 1 5 はシステイン又はアスパラギン酸であり、X a a 1 7 はグルタミン、アルギニン、イソロイシン、システイン、又はリシンであり、X a a 1 8 はアラニン、アルギニン、又はヒスチジンであり、X a a 1 9 はアラニン、グルタミン、又はシステインであり、X a a 2 0 はリシ

50

ン又はグルタミンであり、X a a 2 1 はグルタミン酸、システイン、又はアスパラギン酸であり、X a a 2 3 はバリンであり、X a a 2 4 はアラニン、グルタミン、システイン、アスパラギン、又はアスパラギン酸であり、X a a 2 7 はロイシン又はリシンである、請求項 1 に記載の薬学的組成物。

【請求項 6】

上記一般式 2 において、X a a 1 3 はアラニン、チロシン、又はシステインであり、X a a 1 5 はアスパラギン酸又はグルタミン酸であり、X a a 1 7 はグルタミン、アルギニン、システイン、又はリシンであり、X a a 1 8 はアラニン、アルギニン、又はヒスチジンであり、X a a 2 1 はシステイン、グルタミン酸、グルタミン、又はアスパラギン酸であり、X a a 2 3 はイソロイシン又はバリンであり、X a a 2 4 はシステイン、グルタミン、又はアスパラギンであり、X a a 2 8 はシステイン、アスパラギン、又はアスパラギン酸であり、X a a 2 9 はグルタミン、システイン、又はヒスチジンであり、X a a 3 0 はシステイン、リシン、又はヒスチジンである、請求項 2 に記載の薬学的組成物。

10

【請求項 7】

上記一般式 1 において、X a a 2 は α -メチルグルタミン酸又は A i b であり、X a a 7 はトレオニンであり、X a a 1 0 はチロシン又はシステインであり、X a a 1 2 はリシン又はイソロイシンであり、X a a 1 3 はチロシン、アラニン、又はシステインであり、X a a 1 4 はロイシン又はメチオニンであり、X a a 1 5 はシステイン又はアスパラギン酸であり、X a a 1 6 はグルタミン酸であり、X a a 1 7 はアルギニン、イソロイシン、システイン、又はリシンであり、X a a 1 8 はアラニン、アルギニン、又はヒスチジンであり、X a a 1 9 はアラニン、グルタミン、又はシステインであり、X a a 2 0 はリシン又はグルタミンであり、X a a 2 1 はグルタミン酸又はアスパラギン酸であり、X a a 2 3 はバリンであり、X a a 2 4 はグルタミン、アスパラギン、又はアスパラギン酸であり、X a a 2 7 はロイシンであり、X a a 2 8 はシステイン、アラニン、アスパラギン、又はアスパラギン酸である、請求項 1 に記載の薬学的組成物。

20

【請求項 8】

上記一般式 1 において、X a a 1 はヒスチジン又は 4-イミダゾアセチルであり、X a a 2 は α -メチルグルタミン酸又は A i b であり、X a a 3 はグルタミンであり、X a a 7 はトレオニンであり、X a a 1 0 はチロシンであり、X a a 1 2 はイソロイシンであり、X a a 1 3 はアラニン又はシステインであり、X a a 1 4 はメチオニンであり、X a a 1 5 はアスパラギン酸であり、X a a 1 6 はグルタミン酸であり、X a a 1 7 はイソロイシン又はリシンであり、X a a 1 8 はアラニン又はヒスチジンであり、X a a 1 9 はグルタミン又はシステインであり、X a a 2 0 はリシンであり、X a a 2 1 はアスパラギン酸であり、X a a 2 3 はバリンであり、X a a 2 4 はアスパラギンであり、X a a 2 7 はロイシンであり、X a a 2 8 はアラニン又はアスパラギンであり、X a a 2 9 はグルタミン又はトレオニンであり、X a a 3 0 はシステイン又はリシンであるか、存在しない、請求項 1 に記載の薬学的組成物。

30

【請求項 9】

前記ペプチドは下記一般式 3 のアミノ酸配列を含むペプチドである、請求項 1 に記載の薬学的組成物：

40

X a a 1 - X a a 2 - G l n - G l y - T h r - P h e - T h r - S e r - A s p - T y r - S e r - L y s - X a a 1 3 - L e u - A s p - G l u - X a a 1 7 - X a a 1 8 - X a a 1 9 - L y s - X a a 2 1 - P h e - V a l - X a a 2 4 - T r p - L e u - L e u - X a a 2 8 - X a a 2 9 - X a a 3 0 - X a a 3 1 - S e r - S e r - G l y - G l n - P r o - P r o - P r o - S e r - X a a 4 0 (一般式 3、配列番号 105)

上記一般式 3 において、X a a 1 はヒスチジン又はチロシンであり、X a a 2 は α -メチルグルタミン酸又は A i b であり、X a a 1 3 はアラニン、チロシン又はシステインであり、X a a 1 7 はアルギニン、システイン、又はリシンであり、X a a 1 8 はアラニン又はアルギニンであり、X a a 1 9 はアラニン又はシステインであり、X a a 2 1 はグルタミン酸又はアスパラギン酸であり、X a a 2 4 はグルタミン又はアスパラギンであり、

50

X a a 2 8 はシステイン又はアスパラギン酸であり、X a a 2 9 はシステイン、ヒスチジン、又はグルタミンであり、X a a 3 0 はシステイン又はヒスチジンであり、X a a 3 1 はプロリン又はシステインであり、X a a 4 0 はシステイン又は存在しない。

【請求項 1 0】

前記 R 1 はシステイン、G K K N D W K H N I T（配列番号 1 0 6）、C S S G Q P P P S（配列番号 1 0 9）、G P S S G A P P P S（配列番号 1 1 0）、G P S S G A P P P S C（配列番号 1 1 1）、P S S G A P P P S（配列番号 1 1 2）、P S S G A P P P S G（配列番号 1 1 3）、P S S G A P P P S H G（配列番号 1 1 4）、P S S G A P P P S S（配列番号 1 1 5）、P S S G Q P P P S（配列番号 1 1 6）、又は P S S G Q P P P S C（配列番号 1 1 7）であるか、存在しない、請求項 1 に記載の薬学的組成物。

10

【請求項 1 1】

前記ペプチドは、配列番号 1 ～ 1 0 2 からなる群から選択されたアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の薬学的組成物。

【請求項 1 2】

前記一般式において、N 末端から 1 6 番アミノ酸と 2 0 番アミノ酸は互いに環を形成する、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【請求項 1 3】

前記ペプチドはその C 末端がアミド化された、請求項 1 ～ 1 1 のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

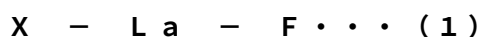
【請求項 1 4】

前記薬学的組成物は L D L 吸収増加、3-H y d r o x y-3-m e t h y l g l u t a r y l-CoA r e d u c t a s e（H M G C R）活性抑制、及び脂肪酸分解促進効果のいずれか一つ以上の効果を有するものである、請求項 1 ～ 1 1 のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

20

【請求項 1 5】

下記化学式（1）で表される結合体を含む高脂血症の予防又は治療のための薬学的組成物であって、



ここで、

X は、前記グルカゴン受容体、G L P-1 受容体および G I P 受容体に対して活性を有する、ペプチドであり、

30

L は、ポリエチレングリコールであり、

a は、0 又は自然数であり、ただし、a が 2 以上であるとき、それぞれの L は互いに独立しており、

F は、免疫グロブリン F c 領域であり；

前記ペプチドは、下記一般式 1 で表されるアミノ酸配列を含むペプチドである：

X a a 1-X a a 2-X a a 3-G l y-T h r-P h e-X a a 7-S e r-A s p
-X a a 1 0-S e r-X a a 1 2-X a a 1 3-X a a 1 4-X a a 1 5-X a a 1 6
-X a a 1 7-X a a 1 8-X a a 1 9-X a a 2 0-X a a 2 1-P h e-X a a 2 3
-X a a 2 4-T r p-L e u-X a a 2 7-X a a 2 8-X a a 2 9-X a a 3 0-R
1（一般式 1、配列番号 1 0 3）

40

前記一般式 1 において、

X a a 1 はヒスチジン（H i s、H）、4-イミダゾアセチル（C A）、又はチロシン（T y r、Y）であり、

X a a 2 はグリシン（G l y、G）、α-メチルグルタミン酸、又は A i b（a m i n o i s o b u t y r i c a c i d）であり、

X a a 3 はグルタミン酸（G l u、E）又はグルタミン（G l n、Q）であり、

X a a 7 はトレオニン（T h r、T）又はイソロイシン（I l e、I）であり、

X a a 1 0 はロイシン（L e u、L）、チロシン（T y r、Y）、リシン（L y s、K）、システイン（C y s、C）、又はバリン（V a l、V）であり、

50

X a a 1 2 はリシン (L y s、K)、セリン (S e r、S)、又はイソロイシン (I l e、I) であり、

X a a 1 3 はグルタミン (G l n、Q)、チロシン (T y r、Y)、アラニン (A l a、A)、又はシステイン (C y s、C) であり、

X a a 1 4 はロイシン (L e u、L)、メチオニン (M e t、M)、又はチロシン (T y r、Y) であり、

X a a 1 5 はシステイン (C y s、C)、アスパラギン酸 (A s p、D)、グルタミン酸 (G l u、E)、又はロイシン (L e u、L) であり、

X a a 1 6 はグリシン (G l y、G)、グルタミン酸 (G l u、E)、又はセリン (S e r、S) であり、

X a a 1 7 はグルタミン (G l n、Q)、アルギニン (A r g、R)、イソロイシン (I l e、I)、グルタミン酸 (G l u、E)、システイン (C y s、C)、又はリシン (L y s、K) であり、

X a a 1 8 はアラニン (A l a、A)、グルタミン (G l n、Q)、アルギニン (A r g、R)、又はヒスチジン (H i s、H) であり、

X a a 1 9 はアラニン (A l a、A)、グルタミン (G l n、Q)、システイン (C y s、C)、又はバリン (V a l、V) であり、

X a a 2 0 はリシン (L y s、K)、グルタミン (G l n、Q)、又はアルギニン (A r g、R) であり、

X a a 2 1 はグルタミン酸 (G l u、E)、グルタミン (G l n、Q)、ロイシン (L e u、L)、システイン (C y s、C)、又はアスパラギン酸 (A s p、D) であり、

X a a 2 3 はイソロイシン (I l e、I) 又はバリン (V a l、V) であり、

X a a 2 4 はアラニン (A l a、A)、グルタミン (G l n、Q)、システイン (C y s、C)、アスパラギン (A s n、N)、アスパラギン酸 (A s p、D)、又はグルタミン酸 (G l u、E) であり、

X a a 2 7 はバリン (V a l、V)、ロイシン (L e u、L)、リシン (L y s、K)、又はメチオニン (M e t、M) であり、

X a a 2 8 はシステイン (C y s、C)、リシン (L y s、K)、アラニン (A l a、A)、アスパラギン (A s n、N)、又はアスパラギン酸 (A s p、D) であり、

X a a 2 9 はシステイン (C y s、C)、グリシン (G l y、G)、グルタミン (G l n、Q)、トレオニン (T h r、T)、グルタミン酸 (G l u、E)、又はヒスチジン (H i s、H) であり、

X a a 3 0 はシステイン (C y s、C)、グリシン (G l y、G)、リシン (L y s、K)、又はヒスチジン (H i s、H) であるか、又は存在せず、

R 1 はシステイン (C y s、C)、G K K N D W K H N I T (配列番号 1 0 6)、m - S S G A P P P S - n (配列番号 1 0 7)、又は m - S S G Q P P P S - n (配列番号 1 0 8) であるか、又は存在せず、

ここで、

m は - C y s -、- P r o -、又は - G l y - P r o - であり、

n は - C y s -、- G l y -、- S e r -、又は - H i s - G l y - であるか、又は存在しない。

【請求項 1 6】

前記免疫グロブリン F c 領域は I g G F c 領域である、請求項 1 5 に記載の薬学的組成物。

【請求項 1 7】

前記薬学的組成物は L D L 吸収増加、3 - H y d r o x y - 3 - m e t h y l g l u t a r y l - C o A r e d u c t a s e (H M G C R) 活性抑制、及び脂肪酸分解促進効果のいずれか一つ以上の効果を有するものである、請求項 1 5 に記載の薬学的組成物。

【請求項 1 8】

前記薬学的組成物投与後 2 4 時間 ~ 4 8 時間後の 3 - H y d r o x y - 3 - m e t h y

10

20

30

40

50

l g l u t a r y l - C o A r e d u c t a s e (H M G C R) の活性が 5 0 % 未満のものである、請求項 1 に記載の薬学的組成物。

【請求項 1 9】

前記薬学的組成物は血中 L D L 濃度及び中性脂肪濃度を減少させるものである、請求項 1 に記載の薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明はグルカゴン、G L P - 1 及び G I P 受容体の全てに対して活性を有する三重活性体又はその結合体の高脂血症に対する治療的用途に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

脂肪質には、代表的にコレステロールと中性脂肪があり、このうちコレステロールは低密度リポタンパク (L D L) コレステロールと高密度リポタンパク (H D L) コレステロールに分けられる。これに関連し、血液内にコレステロールと中性脂肪の数値が正常範囲から外れている (増加及び減少の両方を含む) 状態である脂質異常症と血液内に総コレステロールが高い状態である高コレステロール血症とは異なり、高脂血症 (h y p e r l i p i d e m i a) は、血液内に低密度リポタンパクコレステロールや中性脂肪のうち、いずれかが高いか、両方とも高い場合を総称する疾患であり、脂質異常症及び高コレステロール血症と区分される疾患である。これにより、これらの疾患において発病メカニズム及び患者の状態が互いに異なり、互いに異なる治療及び食事調節方法が要求される。例えば、体内脂質水準の調節異常により発病する疾患であって、脂質異常症の場合、非正常に低いコレステロール数値が問題になることがあるが、高脂血症とは異なり、健康補助食品摂取のような食事療法を通じて生体活動に必須なコレステロールの数値を増加させることが重要である。

【0 0 0 3】

血液内に低密度リポタンパクコレステロール及び／又は中性脂肪が非正常に高い場合、血管壁にたまって炎症を起こし、その結果、心血管疾患 (c a r d i o v a s c u l a r d i s e a s e) 、脳血管疾患 (C e r e b r o v a s c u l a r d i s e a s e s) 、末梢動脈疾患 (p e r i p h e r a l a r t e r i a l d i s e a s e) を引き起こす原因となる。このうち、心血管疾患及び脳血管疾患は、癌と共に韓国の 3 大死亡原因である。高脂血症は西歐式食習慣による肥満人口が増加するにつれて増加している傾向であり、韓国内でも高脂血症患者が毎年約 1 0 % ずつ増加する傾向である。このような高脂血症の病因としては、肥満、飲酒などに起因することが知られている。その中で最大の病因として肥満を挙げる。

【0 0 0 4】

このような高脂血症を予防及び／又は治療するために血中脂質の改善に多くの努力をしている。例えば、H M G C R (H M G - C o A r e d u c t a s e) 抑制剤として作用し、コレステロールの合成を阻害する効果を有する s t a t i n と小腸で N P C 1 L 1 (N i e m a n n - P i c k C 1 - L i k e 1) を抑制してコレステロールの再吸収を抑制する効果を有する e z e t i m i b e 、そして L D L 吸収を妨害する P C S K 9 (P r o p r o t e i n c o n v e r t a s e s u b t i l i s i n / k e x i n t y p e 9) を抑制する e v o l o c u m a b の開発が完了して治療剤として使われている。(U S E n d o c r i n o l o g y , 2 0 1 1 ; 7 (1) : 2 3 - 9 , A m J P h a r m B e n e f i t s . 2 0 1 0 ; 2 (4) : 2 6 7 - 2 7 4 , N E n g l J M e d 2 0 1 4 ; 3 7 0 : 1 8 0 9 - 1 8 1 9)

【0 0 0 5】

しかし、s t a t i n 系列の薬物を利用した治療の場合、十分にコレステロールを調節できない時が多だけでなく、高用量又は長期間使用する場合、肝毒性及び筋肉病症を誘発する恐れがあるという短所がある。E z e t i m i b e は、臨床で血中脂質改善に対す

10

20

30

40

50

る効力が既存の薬物に比べて顕著に低いという短所を有している。Evolocumabの場合、LDLR (LDL receptor) 遺伝的変異のある患者には効力が足りないという報告がある。上述したように、現在商用化された薬物の場合、単一標的にのみ作用するため、遺伝的変異を有する患者や、超危険群高脂血症患者における血中脂質除去には効果的ではない。したがって、幅広い高脂血症患者に効能を示すことができる、多重標的を有する薬物の開発が依然として要求されている。

【0006】

一方、GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) 及びGIP (Glucose-dependent insulintropic polypeptide) は代表的な胃腸ホルモンであり、神経ホルモンとして食物摂取による血中糖濃度の調節に關与する物質である。グルカゴン (Glucagon) は、膵臓から分泌されるペプチドホルモンであり、前述した両物質とともに血中糖濃度調節作用及び脂質代謝に關与する。

10

【0007】

詳しくは、GLP-1は、食べ物の摂取に刺激を受けて小腸から分泌されるホルモンであり、血糖濃度依存的に膵臓におけるインスリン分泌を促進し、血糖濃度を下げる作用を助ける。また、満腹因子として作用して胃腸の消化作用を遅らせ、食べ物の消化物の胃腸通過時間を遅延させて食べ物の摂取を減らす役割を有する。さらに、ラットに投与すると、食べ物の摂取抑制と体重減少効果があることが報告され、このような効果は、正常と肥満状態の両方で同様に現れることが確認され、肥満治療剤としての可能性を示した。

20

【0008】

GLP-1と共に食べ物の摂取に刺激を受けて分泌される胃腸ホルモンの一つであるGIPは、小腸のK細胞から分泌される42個のアミノ酸で構成されたホルモンであり、小腸で吸収された脂質を小腸細胞 (enterocyte) でApoB48 (Apolipoprotein B 48) を抑制することにより、毛細血管への脂質放出を下げるのに役立つ機能を遂行し、GLP-1の活性増加効果、抗炎症効果などが報告された。

【0009】

グルカゴンは、薬物治療又は疾病、ホルモンや酵素欠乏などの原因により血糖値が下がり始めれば膵臓で生産される。グルカゴンは肝臓に信号してグリコーゲンを分解してグルコースを放出するよう誘導し、血糖水準を正常水準まで高める役割をする。また、グルカゴンは血糖上昇効果以外に動物とヒトにおいて食欲抑制、脂肪細胞の褐色化及びエネルギー代謝 (energy expenditure) が促進できることが報告された。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献1】国際特許公開第WO97/34631号

【特許文献2】国際特許公開第96/32478号

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献1】US Endocrinology, 2011; 7 (1): 23-9

40

【非特許文献2】Am J Pharm Benefits. 2010; 2 (4): 267-274

【非特許文献3】N Engl J Med 2014; 370: 1809-1819

【非特許文献4】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】

【0012】

本発明の一つの目的は、グルカゴン受容体、GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) 受容体、及びGIP (Glucose-dependent in

50

suliontropic polypeptide) 受容体に対して活性を有するペプチド又は結合体を含む高脂血症の予防又は治療用薬学的組成物を提供することにある。

【0013】

本発明の他の目的は、前記ペプチド、結合体又はこれを含む組成物を、これを必要とする個体に投与する段階を含む、高脂血症の予防又は治療方法を提供することにある。

本発明の他の目的は、高脂血症の予防又は治療のための薬剤の製造において、前記ペプチド、結合体又はこれを含む組成物の用途を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0014】

本発明を具現する一つの様態は、グルカゴン受容体、GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) 受容体、及びGIP (Glucose-dependent insuliontropic polypeptide) 受容体に対して活性を有するペプチドを含む高脂血症の予防又は治療用薬学的組成物である。

【0015】

一つの具体例として、前記ペプチドで追加されるアミノ酸配列は、天然GLP-1、天然GIP、又は天然エキセンジン-4アミノ酸配列に由来することの特徴とする。

他の具体例として、前記ペプチドは、下記一般式1で表されるアミノ酸配列を含むペプチドであることを特徴とする：

【0016】

Xaa1-Xaa2-Xaa3-Gly-Thr-Phe-Xaa7-Ser-Asp-Xaa10-Ser-Xaa12-Xaa13-Xaa14-Xaa15-Xaa16-Xaa17-Xaa18-Xaa19-Xaa20-Xaa21-Phe-Xaa23-Xaa24-Trp-Leu-Xaa27-Xaa28-Xaa29-Xaa30-R1 (一般式1、配列番号103)

【0017】

上記一般式1において、Xaa1はヒスチジン (His、H)、4-イミダゾアセチル (CA)、又はチロシン (Tyr、Y) であり、Xaa2はグリシン (Gly、G)、 α -メチルグルタミン酸、又はAib (aminoisobutyric acid) であり、Xaa3はグルタミン酸 (Glu、E) 又はグルタミン (Gln、Q) であり、Xaa7はトレオニン (Thr、T) 又はイソロイシン (Ile、I) であり、Xaa10はロイシン (Leu、L)、チロシン (Tyr、Y)、リシン (Lys、K)、システイン (Cys、C)、又はバリン (Val、V) であり、Xaa12はリシン (Lys、K)、セリン (Ser、S)、又はイソロイシン (Ile、I) であり、Xaa13はグルタミン (Gln、Q)、チロシン (Tyr、Y)、アラニン (Ala、A)、又はシステイン (Cys、C) であり、Xaa14はロイシン (Leu、L)、メチオニン (Met、M)、又はチロシン (Tyr、Y) であり、Xaa15はシステイン (Cys、C)、アスパラギン酸 (Asp、D)、グルタミン酸 (Glu、E)、又はロイシン (Leu、L) であり、Xaa16はグリシン (Gly、G)、グルタミン酸 (Glu、E)、又はセリン (Ser、S) であり、Xaa17はグルタミン (Gln、Q)、アルギニン (Arg、R)、イソロイシン (Ile、I)、グルタミン酸 (Glu、E)、システイン (Cys、C)、又はリシン (Lys、K) であり、Xaa18はアラニン (Ala、A)、グルタミン (Gln、Q)、アルギニン (Arg、R)、又はヒスチジン (His、H) であり、Xaa19はアラニン (Ala、A)、グルタミン (Gln、Q)、システイン (Cys、C)、又はバリン (Val、V) であり、Xaa20はリシン (Lys、K)、グルタミン (Gln、Q)、又はアルギニン (Arg、R) であり、Xaa21はグルタミン酸 (Glu、E)、グルタミン (Gln、Q)、ロイシン (Leu、L)、システイン (Cys、C)、又はアスパラギン酸 (Asp、D) であり、Xaa23はイソロイシン (Ile、I) 又はバリン (Val、V) であり、Xaa24はアラニン (Ala、A)、グルタミン (Gln、Q)、システイン (Cys、C)、アスパラギン (Asn、N)、アスパラギン酸 (Asp、D)、又はグルタミン酸 (Glu、E) であり、Xaa

10

20

30

40

50

27はバリン (Val、V)、ロイシン (Leu、L)、リシン (Lys、K)、又はメチオニン (Met、M) であり、Xaa28はシステイン (Cys、C)、リシン (Lys、K)、アラニン (Ala、A)、アスパラギン (Asn、N)、又はアスパラギン酸 (Asp、D) であり、Xaa29はシステイン (Cys、C)、グリシン (Gly、G)、グルタミン (Gln、Q)、トレオニン (Thr、T)、グルタミン酸 (Glu、E)、又はヒスチジン (His、H) であり、Xaa30はシステイン (Cys、C)、グリシン (Gly、G)、リシン (Lys、K)、又はヒスチジン (His、H) であるか、又は存在せず、

R1はシステイン (Cys、C)、GKKNDWKHNIT (配列番号106)、m-SSGAPPPS-n (配列番号107)、又はm-SSGQPPPS-n (配列番号108) であるか、又は存在せず、ここで、mは-Cys-、-Pro-、又は-Gly-Pro-であり、nは-Cys-、-Gly-、-Ser-、又は-His-Gly-であるか、又は存在しないことを特徴とする。

10

【0018】

前述した具体例のいずれか一つによる組成物において、前記ペプチドは、上記一般式1において、Xaa14はロイシン又はメチオニンであり、Xaa15はシステイン、アスパラギン酸又はロイシンであることを特徴とする。

【0019】

前述した具体例のいずれか一つによる組成物において、前記ペプチドは、上記一般式1において、Xaa2はグリシン、 α -メチルグルタミン酸、又はAibであり、Xaa7はトレオニンであり、Xaa10はチロシン、システイン、又はバリンであり、Xaa12はリシン又はイソロイシンであり、Xaa13はチロシン、アラニン、グルタミン、又はシステインであり、Xaa14はロイシン、システイン、又はメチオニンであり、Xaa15はシステイン、ロイシン、グルタミン酸、又はアスパラギン酸であり、Xaa17はグルタミン、アルギニン、イソロイシン、システイン、グルタミン酸、又はリシンであり、Xaa18はアラニン、グルタミン、アルギニン、又はヒスチジンであり、Xaa19はアラニン、グルタミン、バリン、又はシステインであり、Xaa20はリシン、アルギニン、又はグルタミンであり、Xaa21はグルタミン酸、グルタミン、ロイシン、システイン、又はアスパラギン酸であり、Xaa23はイソロイシン又はバリンであり、Xaa24はシステイン、アラニン、グルタミン、アスパラギン、グルタミン酸、又はアスパラギン酸であり、Xaa27はロイシン又はリシンであることを特徴とする。

20

30

【0020】

前述した具体例のいずれか一つによる組成物において、前記ペプチドは、下記一般式2で表されるアミノ酸配列を含むペプチドであることを特徴とする。

【0021】

Xaa1-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Xaa10-Ser-Lys-Xaa13-Xaa14-Xaa15-Xaa16-Xaa17-Xaa18-Xaa19-Xaa20-Xaa21-Phe-Xaa23-Xaa24-Trp-Leu-Leu-Xaa28-Xaa29-Xaa30-Xaa31-Ser-Ser-Gly-Gln-Pro-Pro-Pro-Ser-Xaa40 (一般式2、配列番号104)

40

【0022】

上記一般式2において、Xaa1は4-イミダゾアセチル、ヒスチジン、又はチロシンであり、Xaa2はグリシン、 α -メチルグルタミン酸、又はAibであり、Xaa10はチロシン、又はシステインであり、Xaa13はアラニン、グルタミン、チロシン、又はシステインであり、Xaa14はロイシン、メチオニン、又はチロシンであり、Xaa15はアスパラギン酸、グルタミン酸、又はロイシンであり、Xaa16はグリシン、グルタミン酸、又はセリンであり、Xaa17はグルタミン、アルギニン、イソロイシン、グルタミン酸、システイン、又はリシンであり、Xaa18はアラニン、グルタミン、アルギニン、又はヒスチジンであり、Xaa19はアラニン、グルタミン、システイン、又

50

はバリンであり、X a a 2 0 はリシン、グルタミン、又はアルギニンであり、X a a 2 1 はシステイン、グルタミン酸、グルタミン、ロイシン、又はアスパラギン酸であり、X a a 2 3 はイソロイシン又はバリンであり、X a a 2 4 はシステイン、アラニン、グルタミン、アスパラギン、又はグルタミン酸であり、X a a 2 8 はリシン、システイン、アスパラギン、又はアスパラギン酸であり、X a a 2 9 はグリシン、グルタミン、システイン、又はヒスチジンであり、X a a 3 0 はシステイン、グリシン、リシン、又はヒスチジンであり、X a a 3 1 はプロリン又はシステインであり、X a a 4 0 はシステインであるか、又は存在しないことを特徴とする。

【0023】

前述した具体例のいずれか一つによる組成物において、前記ペプチドは、上記一般式 1 において、X a a 2 はグリシン、 α -メチルグルタミン酸、又は A i b であり、X a a 7 はトレオニンであり、X a a 1 0 はチロシン、システイン、又はバリンであり、X a a 1 2 はリシン又はイソロイシンであり、X a a 1 3 はチロシン、アラニン、又はシステインであり、X a a 1 4 はロイシン又はメチオニンであり、X a a 1 5 はシステイン又はアスパラギン酸であり、X a a 1 7 はグルタミン、アルギニン、イソロイシン、システイン、又はリシンであり、X a a 1 8 はアラニン、アルギニン、又はヒスチジンであり、X a a 1 9 はアラニン、グルタミン、又はシステインであり、X a a 2 0 はリシン又はグルタミンであり、X a a 2 1 はグルタミン酸、システイン、又はアスパラギン酸であり、X a a 2 3 はバリンであり、X a a 2 4 はアラニン、グルタミン、システイン、アスパラギン、又はアスパラギン酸であり、X a a 2 7 はロイシン又はリシンであることを特徴とする。

【0024】

前述した具体例のいずれか一つによる組成物において、前記ペプチドは、上記一般式 2 において、X a a 1 3 はアラニン、チロシン、又はシステインであり、X a a 1 5 はアスパラギン酸又はグルタミン酸であり、X a a 1 7 はグルタミン、アルギニン、システイン、又はリシンであり、X a a 1 8 はアラニン、アルギニン、又はヒスチジンであり、X a a 2 1 はシステイン、グルタミン酸、グルタミン、又はアスパラギン酸であり、X a a 2 3 はイソロイシン又はバリンであり、X a a 2 4 はシステイン、グルタミン、又はアスパラギンであり、X a a 2 8 はシステイン、アスパラギン、又はアスパラギン酸であり、X a a 2 9 はグルタミン、システイン、又はヒスチジンであり、X a a 3 0 はシステイン、リシン、又はヒスチジンであることを特徴とする。

【0025】

前述した具体例のいずれか一つによる組成物において、前記ペプチドは、上記一般式 1 において、X a a 2 は α -メチルグルタミン酸又は A i b であり、X a a 7 はトレオニンであり、X a a 1 0 はチロシン又はシステインであり、X a a 1 2 はリシン又はイソロイシンであり、X a a 1 3 はチロシン、アラニン、又はシステインであり、X a a 1 4 はロイシン又はメチオニンであり、X a a 1 5 はシステイン又はアスパラギン酸であり、X a a 1 6 はグルタミン酸であり、X a a 1 7 はアルギニン、イソロイシン、システイン、又はリシンであり、X a a 1 8 はアラニン、アルギニン、又はヒスチジンであり、X a a 1 9 はアラニン、グルタミン、又はシステインであり、X a a 2 0 はリシン又はグルタミンであり、X a a 2 1 はグルタミン酸又はアスパラギン酸であり、X a a 2 3 はバリンであり、X a a 2 4 はグルタミン、アスパラギン、又はアスパラギン酸であり、X a a 2 7 はロイシンであり、X a a 2 8 はシステイン、アラニン、アスパラギン、又はアスパラギン酸であることを特徴とする。

【0026】

前述した具体例のいずれか一つによる組成物において、前記ペプチドは、上記一般式 1 において、X a a 1 はヒスチジン又は 4-イミダゾアセチルであり、X a a 2 は α -メチルグルタミン酸又は A i b であり、X a a 3 はグルタミンであり、X a a 7 はトレオニンであり、X a a 1 0 はチロシンであり、X a a 1 2 はイソロイシンであり、X a a 1 3 はアラニン又はシステインであり、X a a 1 4 はメチオニンであり、X a a 1 5 はアスパラギン酸であり、X a a 1 6 はグルタミン酸であり、X a a 1 7 はイソロイシン又はリシン

であり、X a a 1 8 はアラニン又はヒスチジンであり、X a a 1 9 はグルタミン又はシステインであり、X a a 2 0 はリシンであり、X a a 2 1 はアスパラギン酸であり、X a a 2 3 はバリンであり、X a a 2 4 はアスパラギンであり、X a a 2 7 はロイシンであり、X a a 2 8 はアラニン又はアスパラギンであり、X a a 2 9 はグルタミン又はトレオニンであり、X a a 3 0 はシステイン又はリシンであるか、又は存在しないことを特徴とする。

【0027】

前述した具体例のいずれか一つによる組成物において、前記ペプチドは、下記一般式3のアミノ酸配列を含むペプチドであることを特徴とする。

【0028】

X a a 1 - X a a 2 - G l n - G l y - T h r - P h e - T h r - S e r - A s p - T y r - S e r - L y s - X a a 1 3 - L e u - A s p - G l u - X a a 1 7 - X a a 1 8 - X a a 1 9 - L y s - X a a 2 1 - P h e - V a l - X a a 2 4 - T r p - L e u - L e u - X a a 2 8 - X a a 2 9 - X a a 3 0 - X a a 3 1 - S e r - S e r - G l y - G l n - P r o - P r o - P r o - S e r - X a a 4 0 (一般式3、配列番号105)

【0029】

前記一般式3において、X a a 1 はヒスチジン又はチロシンであり、X a a 2 は α -メチルグルタミン酸又はA i bであり、X a a 1 3 はアラニン、チロシン又はシステインであり、X a a 1 7 はアルギニン、システイン、又はリシンであり、X a a 1 8 はアラニン又はアルギニンであり、X a a 1 9 はアラニン又はシステインであり、X a a 2 1 はグルタミン酸又はアスパラギン酸であり、X a a 2 4 はグルタミン又はアスパラギンであり、X a a 2 8 はシステイン又はアスパラギン酸であり、X a a 2 9 はシステイン、ヒスチジン、又はグルタミンであり、X a a 3 0 はシステイン又はヒスチジンであり、X a a 3 1 はプロリン又はシステインであり、X a a 4 0 はシステイン又は存在しないことを特徴とする。

【0030】

前述した具体例のいずれか一つによる組成物において、前記ペプチドは、前記R1はシステイン、G K K N D W K H N I T (配列番号106)、C S S G Q P P P S (配列番号109)、G P S S G A P P P S (配列番号110)、G P S S G A P P P S C (配列番号111)、P S S G A P P P S (配列番号112)、P S S G A P P P S G (配列番号113)、P S S G A P P P S H G (配列番号114)、P S S G A P P P S S (配列番号115)、P S S G Q P P P S (配列番号116)、又はP S S G Q P P P S C (配列番号117)であるか、存在しないことを特徴とする。

【0031】

前述した具体例のいずれか一つによる組成物において、前記ペプチドは配列番号：1～102からなる群から選択されたアミノ酸配列を含むことを特徴とする。

【0032】

前述した具体例のいずれか一つによる組成物において、前記一般式においてN-末端から16番アミノ酸と20番アミノ酸は互いに環を形成することを特徴とする。

【0033】

前述した具体例のいずれか一つによる組成物において、前記ペプチドはそのC-末端がアミド化されたことを特徴とする。

【0034】

前述した具体例のいずれか一つによる組成物において、前記薬学的組成物はLDL吸収増加、3-H y d r o x y - 3 - m e t h y l g l u t a r y l - C o A r e d u c t a s e (H M G C R) 活性抑制、及び脂肪酸分解促進効果のいずれか一つ以上の効果を有することを特徴とする。

【0035】

前述した具体例のいずれか一つによる組成物において、前記薬学的組成物投与後24時間～48時間後の3-H y d r o x y - 3 - m e t h y l g l u t a r y l - C o A r

10

20

30

40

50

eductase (HMGCR) の活性が 50%未満であることを特徴とする。

【0036】

前述した具体例のいずれか一つによる組成物において、前記薬学的組成物は血中 LDL 濃度及び中性脂肪濃度を減少させることを特徴とする。

【0037】

本発明を具現するもう一つの様態は、前記ペプチドを含む結合体を含む高脂血症の予防又は治療のための薬学的組成物である。

【0038】

一つの具体例として、前記結合体は、下記化学式 (1) で示されることを特徴とすることができ：

【0039】

$X - L a - F \cdots (1)$

【0040】

ここで、

X は、前記グルカゴン受容体、GLP-1 受容体、及び GIP 受容体に対して活性を有する、ペプチドであり、

L は、ポリエチレングリコールであり、

a は、0 又は自然数であり、ただし、a が 2 以上であるとき、それぞれの L は互いに独立しており、

F は、免疫グロブリンFc 領域である。

【0041】

他の具体例として、前記ペプチドは、下記一般式 1 で表されるアミノ酸配列を含むペプチドであることを特徴とする：

【0042】

Xaa1-Xaa2-Xaa3-Gly-Thr-Phe-Xaa7-Ser-Asp-Xaa10-Ser-Xaa12-Xaa13-Xaa14-Xaa15-Xaa16-Xaa17-Xaa18-Xaa19-Xaa20-Xaa21-Phe-Xaa23-Xaa24-Trp-Leu-Xaa27-Xaa28-Xaa29-Xaa30-R
1 (一般式 1、配列番号 103)

【0043】

上記一般式 1 において、

Xaa1 はヒスチジン (His、H)、4-イミダゾアセチル (CA)、又はチロシン (Tyr、Y) であり、

Xaa2 はグリシン (Gly、G)、α-メチルグルタミン酸、又は Aib (amino isobutyric acid) であり、

Xaa3 はグルタミン酸 (Glu、E) 又はグルタミン (Gln、Q) であり、

Xaa7 はトレオニン (Thr、T) 又はイソロイシン (Ile、I) であり、

Xaa10 はロイシン (Leu、L)、チロシン (Tyr、Y)、リシン (Lys、K)、システイン (Cys、C)、又はバリン (Val、V) であり、

Xaa12 はリシン (Lys、K)、セリン (Ser、S)、又はイソロイシン (Ile、I) であり、

Xaa13 はグルタミン (Gln、Q)、チロシン (Tyr、Y)、アラニン (Ala、A)、又はシステイン (Cys、C) であり、

Xaa14 はロイシン (Leu、L)、メチオニン (Met、M)、又はチロシン (Tyr、Y) であり、

Xaa15 はシステイン (Cys、C)、アスパラギン酸 (Asp、D)、グルタミン酸 (Glu、E)、又はロイシン (Leu、L) であり、

Xaa16 はグリシン (Gly、G)、グルタミン酸 (Glu、E)、又はセリン (Ser、S) であり、

Xaa17 はグルタミン (Gln、Q)、アルギニン (Arg、R)、イソロイシン (

10

20

30

40

50

I l e、I)、グルタミン酸 (G l u、E)、システイン (C y s、C)、又はリシン (L y s、K) であり、

X a a 1 8 はアラニン (A l a、A)、グルタミン (G l n、Q)、アルギニン (A r g、R)、又はヒスチジン (H i s、H) であり、

X a a 1 9 はアラニン (A l a、A)、グルタミン (G l n、Q)、システイン (C y s、C)、又はバリン (V a l、V) であり、

X a a 2 0 はリシン (L y s、K)、グルタミン (G l n、Q)、又はアルギニン (A r g、R) であり、

X a a 2 1 はグルタミン酸 (G l u、E)、グルタミン (G l n、Q)、ロイシン (L e u、L)、システイン (C y s、C)、又はアスパラギン酸 (A s p、D) であり、

X a a 2 3 はイソロイシン (I l e、I) 又はバリン (V a l、V) であり、

X a a 2 4 はアラニン (A l a、A)、グルタミン (G l n、Q)、システイン (C y s、C)、アスパラギン (A s n、N)、アスパラギン酸 (A s p、D)、又はグルタミン酸 (G l u、E) であり、

X a a 2 7 はバリン (V a l、V)、ロイシン (L e u、L)、リシン (L y s、K)、又はメチオニン (M e t、M) であり、

X a a 2 8 はシステイン (C y s、C)、リシン (L y s、K)、アラニン (A l a、A)、アスパラギン (A s n、N)、又はアスパラギン酸 (A s p、D) であり、

X a a 2 9 はシステイン (C y s、C)、グリシン (G l y、G)、グルタミン (G l n、Q)、トレオニン (T h r、T)、グルタミン酸 (G l u、E)、又はヒスチジン (H i s、H) であり、

X a a 3 0 はシステイン (C y s、C)、グリシン (G l y、G)、リシン (L y s、K)、又はヒスチジン (H i s、H) であるか、又は存在せず、

R 1 はシステイン (C y s、C)、G K K N D W K H N I T (配列番号 1 0 6)、m - S S G A P P P S - n (配列番号 1 0 7)、又は m - S S G Q P P P S - n (配列番号 1 0 8) であるか、又は存在せず、

ここで、

m は - C y s -、- P r o -、又は - G l y - P r o - であり、

n は - C y s -、- G l y -、- S e r -、又は - H i s - G l y - であるか、又は存在しない。

【 0 0 4 4 】

前述した具体例のいずれか一つによる組成物において、前記薬学的組成物は、前記一般式 1 で表されるペプチドがポリエチレングリコールを通じて免疫グロブリン F c 領域と結合した結合体を含むことを特徴とする。

【 0 0 4 5 】

前述した具体例のいずれか一つによる組成物において、前記薬学的組成物は、LDL 吸収増加、3 - H y d r o x y - 3 - m e t h y l g l u t a r y l - C o A r e d u c t a s e (H M G C R) 活性抑制、及び脂肪酸分解促進効果のいずれか一つ以上の効果を有することを特徴とする。

【 0 0 4 6 】

前述した具体例のいずれか一つによる組成物において、前記薬学的組成物投与後 2 4 時間 ~ 4 8 時間後の 3 - H y d r o x y - 3 - m e t h y l g l u t a r y l - C o A r e d u c t a s e (H M G C R) の活性が 5 0 % 未満であることを特徴とする。

【 0 0 4 7 】

前述した具体例のいずれか一つによる組成物において、前記薬学的組成物は、血中 LDL 濃度及び中性脂肪濃度を減少させることを特徴とする。

【 0 0 4 8 】

本発明を具現するもう一つの様態は、前記ペプチド、結合体又はこれを含む組成物を、これを必要とする個体に投与する段階を含む、高脂血症の予防又は治療方法である。

【 0 0 4 9 】

本発明を具現するもう一つの態様は、高脂血症の予防又は治療のための薬剤の製造において、前記ペプチド、結合体又はこれを含む組成物の用途である。

【発明の効果】

【0050】

本発明による三重活性体持続型結合体は、グルカゴン受容体、GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) 受容体、及びGIP (Glucose-dependent insulintropic polypeptide) 受容体に対して活性を有し、高脂血症の治療に適用できる。

【図面の簡単な説明】

【0051】

【図1】本発明の三重活性体持続型結合体の高脂血症治療効果をin vivoで確認した図である。

【図2】本発明の三重活性体持続型結合体によりLDL吸収が増加したことを確認した図である。

【図3】本発明の三重活性体持続型結合体により3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR) 活性が抑制されたことを確認した図である。

【図4】本発明の三重活性体持続型結合体の脂肪酸分解促進効果を確認した図である。

【発明を実施するための形態】

【0052】

以下、本発明をより詳細に説明する。

【0053】

なお、本願で開示される各説明及び実施形態はそれぞれ他の説明及び実施形態にも適用される。すなわち、本願で開示される様々な要素のあらゆる組み合わせが本発明に含まれる。また、以下の具体的な記述に本発明が限定されるものではない。

【0054】

本明細書全体を通して、天然に存在するアミノ酸に対する通常の1文字及び3文字コードが用いられるだけでなく、Aib (α -アミノイソブチル酸)、Sar (N-methylglycine)、 α -メチルグルタミン酸 (α -methylglutamic acid) などの他のアミノ酸に対して一般に許容される3文字コードが用いられる。また、本明細書において略語で言及したアミノ酸は、IUPAC-IUB命名法に従って記載したものである。

アラニン Ala, A

アスパラギン Asn, N

システイン Cys, C

グルタミン Gln, Q

ヒスチジン His, H

ロイシン Leu, L

メチオニン Met, M

プロリン Pro, P

トレオニン Thr, T

チロシン Tyr, Y

アルギニン Arg, R

アスパラギン酸 Asp, D

グルタミン酸 Glu, E

グリシン Gly, G

イソロイシン Ile, I

リシン Lys, K

フェニルアラニン Phe, F

セリン Ser, S

トリプトファン Trp, W

バリン Val, V

【0055】

本発明の一実施態様は、グルカゴン受容体、GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) 受容体及びGIP (Glucose-dependent insulintropic polypeptide) 受容体に対して活性を有するペプチドを含む、高脂血症の予防又は治療用薬学的組成物である。

【0056】

本発明の三重活性体は、高脂血症に対する治療又は予防効果があることを特徴とする。本発明において、血液内にコレステロール (低密度リポタンパクコレステロール及び高密

10

20

30

40

50

度リポタンパクコレステロール）と中性脂肪（コレステロールではない脂質の一種）数値が正常範囲から外れている（増加及び減少の両方を含む）状態である脂質異常症と血液内に総コレステロールが高い状態である高コレステロール血症とは異なり、高脂血症は血液内に低密度リポタンパクコレステロールや中性脂肪のいずれかが高いか、両方とも高い場合を総称する疾患であり、脂質異常症及び高コレステロール血症と区分される疾患である。例えば、低密度リポタンパクコレステロールが 130 mg/dL を超過及び／又は中性脂肪が 200 mg/dL を超過する場合、高脂血症に該当する。

【0057】

【表1】

区分	コレステロール		中性脂肪
	低密度リポタンパク コレステロール	高密度リポタンパク コレステロール	
高脂血症	正常範囲超過	—	正常範囲超過
高コレステロール血症	正常範囲超過		—
脂質異常症	正常範囲超過または未満		

10

20

【0058】

ヒトの場合、低密度リポタンパクコレステロールの正常範囲は 130 mg/dL 以下、高密度リポタンパクコレステロールの正常範囲は 60 mg/dL 以上、具体的には、男性で 40 mg/dL 以上、女性で 50 mg/dL 以上、中性脂肪の正常範囲は 200 mg/dL 以下であり、これを外れる場合、前記の表1に記載されたような疾病を有すると理解できる。

【0059】

前記の表1に示すように、効果的な高脂血症の治療のためには、正常範囲を外れた低密度リポタンパクコレステロールと中性脂肪に対する減少効果が顕著に優れることが要求される点で、高コレステロール血症及び脂質異常症の治療のために要求される条件と区別される。

30

【0060】

このような側面で、本発明の三重活性体は、血液内の低密度リポタンパクコレステロール及び／又は中性脂肪を減少させることに特徴がある。

【0061】

前記「グルカゴン受容体、GLP-1受容体及びGIP受容体に対して活性を有するペプチド」は、本発明において三重活性体と混用され得る。

40

【0062】

このようなペプチドには、グルカゴン、GLP-1及びGIP受容体に対して有意なレベルの活性を有する様々な物質、例えば様々なペプチドが含まれる。

【0063】

特にこれに制限されるものではないが、前記グルカゴン、GLP-1及びGIP受容体に対して有意なレベルの活性を有する三重活性体は、グルカゴン、GLP-1及びGIP受容体のうち1つ又はそれ以上の受容体、具体的には2つ又はそれ以上の受容体、より具体的には3つの受容体の全てに対する *in vitro* 活性が、当該受容体の天然リガンド（天然グルカゴン、天然GLP-1及び天然GIP）に比べて、0.1%以上、1%以上、2%以上、3%以上、4%以上、5%以上、6%以上、7%以上、8%以上、9%以

50

上、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、又は100%以上を示すことができる。

【0064】

このような三重活性体の *in vitro* 活性を測定する方法を本願明細書の実験例1に示すが、特にこれに限定されるものではない。

【0065】

一方、前記ペプチドは、次の i) ~ iii) の1つ以上、2つ以上、特に3つの活性を有すること、具体的には有意な活性を有することを特徴とする。

i) GLP-1受容体の活性化；ii) グルカゴン受容体の活性化；iii) GIP受容体の活性化。

【0066】

ここで、受容体を活性化するとは、天然のものに比べて、受容体に対する *in vitro* 活性が0.1%以上、1%以上、2%以上、3%以上、4%以上、5%以上、6%以上、7%以上、8%以上、9%以上、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、又は100%以上にすることを意味する。しかし、これらに限定されるものではない。

【0067】

本発明による組成物は、グルカゴン受容体、GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) 受容体、及びGIP (Glucose-dependent insulintropic polypeptide) 受容体に対して活性を有する分離されたペプチドを含むことにより、LDL吸収増加、コレステロール合成抑制、及び脂肪酸分解促進効果のいずれか一つ以上の効果を示すことができ、それにより高脂血症に対して優れた治療効果を示すことができる。例えば、前記組成物投与後24時間~48時間後の3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR) の活性は50%未満であってもよい。

【0068】

具体的には、前記組成物が投与された個体において24時間以上の時間（例えば、24時間~48時間）が経過した後、3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR) の活性は50%、40%、又は30%未満を示すことができ、これは個体において体内コレステロール合成が本発明による組成物により抑制され、それにより高脂血症に対する効果を有することを示唆する。

【0069】

また、本発明による組成物は、血中LDL濃度及び中性脂肪濃度を減少させ、高脂血症に対して特に優れた治療効果を提供することができる。

【0070】

また、前記ペプチドは、天然GLP-1、天然グルカゴン及び天然GIPのいずれかに比べて、体内半減期が延長されたものであるが、特にこれらに限定されるものではない。

【0071】

このような前記ペプチドは、非自然発生の (non-naturally occurring) ものもであってもよいが、特にこれに限定されるものではない。

【0072】

具体的には、前記分離されたペプチドは、天然グルカゴンのアナログであってもよいが、特にこれに限定されるものではない。

【0073】

本発明による前記天然グルカゴンのアナログには、天然グルカゴンと比較してアミノ酸配列に少なくとも1つの差異のあるペプチド、天然グルカゴン配列を修飾 (modification) することにより改変されたペプチド、天然グルカゴンの模倣体が含まれる。

【0074】

一方、天然グルカゴンは、次のアミノ酸配列を有するが、特にこれに限定されるもので

10

20

30

40

50

はない。

【0075】

H i s - S e r - G l n - G l y - T h r - P h e - T h r - S e r - A s p - T y r
- S e r - L y s - T y r - L e u - A s p - S e r - A r g - A r g - A l a - G l n
- A s p - P h e - V a l - G l n - T r p - L e u - M e t - A s n - T h r (配列番
号：118)

【0076】

具体的には、前記ペプチドは、天然グルカゴン配列において少なくとも1つのアミノ酸の置換 (s u b s t i t u t i o n)、付加 (a d d i t i o n)、欠失 (d e l e t i o n)、修飾 (m o d i f i c a t i o n) 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行われた天然グルカゴンのアナログであってもよいが、特にこれらに限定されるものではない。

【0077】

また、前記アミノ酸の置換には、アミノ酸への置換や、非天然化合物への置換が全て含まれる。

【0078】

さらに、付加は、ペプチドのN末端及び／又はC末端において行われてもよい。なお、付加されるアミノ酸は、1以上、2以上、3以上、4以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上、10以上、11以上のアミノ酸であってもよいが、特にこれらに限定されるものではなく、広義にはポリペプチドの付加が含まれるが、特にこれに限定されるものではない。

【0079】

より具体的には、前記グルカゴンアナログは、天然グルカゴンのアミノ酸配列において、1番、2番、3番、7番、10番、12番、13番、14番、15番、16番、17番、18番、19番、20番、21番、23番、24番、27番、28番及び29番からなる群から選択される、1個以上、2個以上、3個以上、4個以上、5個以上、6個以上、7個以上、8個以上、9個以上、10個以上、11個以上、12個以上、13個以上、14個以上、15個以上、16個以上、17個以上、18個以上、19以上又は20個のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されたものであってもよく、また、独立して又は追加でそのC末端に1個以上、2個以上、3個以上、4個以上、5個以上、6個以上、7個以上、8個以上、9個以上、10個以上又は11個以上のアミノ酸が付加されたものであってもよいが、特にこれらに限定されるものではない。

【0080】

より具体的には、前記グルカゴンアナログは、天然グルカゴンのアミノ酸配列において、1番、2番、3番、10番、12番、13番、14番、15番、16番、17番、18番、19番、20番、21番、23番、24番、27番、28番及び29番からなる群から選択される、1個以上、2個以上、3個以上、4個以上、5個以上、6個以上、7個以上、8個以上、9個以上、10個以上、11個以上、12個以上、13個以上、14個以上、15個以上、16個以上、17個以上、18個以上又は19個のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されたものであってもよく、また、独立して又は追加でそのC末端に1個以上、2個以上、3個以上、4個以上、5個以上、6個以上、7個以上、8個以上、9個以上、10個以上又は11個以上のアミノ酸が付加されたものであってもよいが、特にこれらに限定されるものではない。

【0081】

より具体的には、前記グルカゴンアナログは、天然グルカゴンのアミノ酸配列において、1番、2番、3番、10番、13番、14番、15番、16番、17番、18番、19番、20番、21番、23番、24番、28番及び29番からなる群から選択される、1個以上、2個以上、3個以上、4個以上、5個以上、6個以上、7個以上、8個以上、9個以上、10個以上、11個以上、12個以上、13個以上、14個以上、15個以上、16個以上又は17個のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されたものであってもよく、また

、独立して又は追加でそのC末端に1個以上、2個以上、3個以上、4個以上、5個以上、6個以上、7個以上、8個以上、9個以上、10個以上又は11個以上のアミノ酸が付加されたものであってもよいが、特にこれらに限定されるものではない。

【0082】

より具体的には、前記グルカゴンアナログは、天然グルカゴンのアミノ酸配列において、1番、2番、13番、16番、17番、18番、19番、20番、21番、23番、24番、27番、28番及び29番からなる群から選択される、1個以上、2個以上、3個以上、4個以上、5個以上、6個以上、7個以上、8個以上、9個以上、10個以上、11個以上、12個以上、13個以上又は14個のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されたものであってもよく、また、独立して又は追加でそのC末端に1個以上、2個以上、3個以上、4個以上、5個以上、6個以上、7個以上、8個以上、9個以上、10個以上又は11個以上のアミノ酸が付加されたものであってもよいが、特にこれらに限定されるものではない。

10

【0083】

前記天然グルカゴンから導入されるアミノ酸は、チロシン、 α -メチルグルタミン酸、Aib、メチオニン、グルタミン酸、ヒスチジン、リシン、ロイシン、イソロイシン、グルタミン、バリン、グリシン、アラニン、システイン、セリン、アラニン、アスパラギン酸及びアルギニンからなる群から選択されてもよいが、特にこれらに限定されるものではない。

【0084】

例えば、前述したように付加されるアミノ酸配列は、天然GLP-1、天然GIP又は天然エキセンジン-4のアミノ酸配列に由来する1つ以上のアミノ酸配列であってもよい。

20

【0085】

このようなグルカゴンアナログ又は三重活性体は、分子内架橋 (intramolecular bridge) を含んでもよく (例えば、共有結合的架橋又は非共有結合的架橋)、具体的には環を含む形態であってもよい。例えば、グルカゴンアナログ又は三重活性体の16番目のアミノ酸と20番目のアミノ酸間に環が形成された形態であってもよいが、特にこれに限定されるものではない。

【0086】

前記環の非制限的な例として、ラクタム架橋 (又はラクタム環) が挙げられるが、特にこれに限定されるものではない。

30

【0087】

また、前記グルカゴンアナログ又は三重活性体は、目的とする位置に環を形成するアミノ酸を含むことにより環を含むように改変されたものが全て含まれる。

【0088】

例えば、グルカゴンアナログ又は三重活性体の16番目と20番目のアミノ酸対がそれぞれ環を形成するグルタミン酸又はリシンに置換されたものであってもよいが、これに限定されるものではない。

【0089】

このような環は、前記グルカゴンアナログ又は三重活性体内のアミノ酸側鎖間に形成され、例えばリシンの側鎖とグルタミン酸の側鎖間にラクタム環が形成される形態であってもよいが、特にこれらに限定されるものではない。

40

【0090】

前記方法の組み合わせにより作製されるグルカゴンのアナログの例として、天然グルカゴンと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の α 炭素が除去された、グルカゴン受容体、GLP-1受容体及びGIP受容体に対して活性を有するペプチドなどが挙げられるが、これらに限定されるものではなく、アナログ作製のための様々な方法の組み合わせにより、本発明に用いられる天然グルカゴンのアナログを作製することができる。

50

【0091】

また、本発明のペプチドは、活性体分解酵素の認識作用を回避して体内半減期を延長させるために、一部のアミノ酸を他のアミノ酸又は非天然化合物に置換するが、特にこれらに限定されるものではない。

【0092】

具体的には、前記三重活性体のアミノ酸配列のうち2番目のアミノ酸配列の置換により、分解酵素の認識作用を回避して体内半減期を延長させたペプチドであってもよいが、体内の分解酵素の認識作用を回避するためのアミノ酸の置換又は変更であればいかなるものでもよい。

【0093】

また、天然グルカゴンのアナログの作製のためのこのような改変には、L型もしくはD型アミノ酸及び／又は非天然アミノ酸を用いた改変、並びに／又は天然配列の修飾、例えば側鎖官能基の改変、分子内の共有結合、一例として側鎖間の環形成、メチル化、アシル化、ユビキチン化、リン酸化、アミノヘキサン化、ビオチン化などの修飾による改変が全て含まれる。

【0094】

さらに、天然グルカゴンのアミノ及び／又はカルボキシ末端に少なくとも1つのアミノ酸が付加されたものが全て含まれる。

【0095】

前記置換されるか、付加されるアミノ酸としては、ヒトタンパク質において通常観察される20種のアミノ酸だけでなく、異常又は非自然発生アミノ酸を用いることができる。異常アミノ酸の市販元には、Sigma-Aldrich、ChemPep、Genzyme pharmaceuticalsが含まれる。これらのアミノ酸が含まれるペプチドと定型的なペプチド配列は、民間のペプチド合成会社、例えば米国のAmerican peptide companyやBachem、又は韓国のAnygenにおいて合成及び購入することができる。

【0096】

アミノ酸誘導体も同じ方式で入手することができ、一例として4-イミダゾ酢酸(4-imidazoacetic acid)などが挙げられる。

【0097】

また、本発明によるペプチドは、生体内のタンパク質切断酵素から保護して安定性を向上させるために、そのN末端及び／又はC末端などが化学的に修飾された形態、有機基により保護された形態、又はペプチド末端などにアミノ酸が付加されて改変された形態であってもよい。

【0098】

特に、化学的に合成したペプチドの場合、N及びC末端が電荷を帯びているので、その電荷を除去するために、N末端のアセチル化(acetylation)及び／又はC末端のアミド化(amidation)を行ってもよいが、特にこれらに限定されるものではない。

【0099】

また、本発明によるペプチドには、ペプチド自体、その塩(例えば、前記ペプチドの薬学的に許容される塩)又はその溶媒和物の形態が全て含まれる。さらに、ペプチドは、薬学的に許容されるものであれば、いかなる形態であってもよい。

【0100】

前記塩の種類は、特に限定されるものではない。もっとも、個体、例えば哺乳類に安全かつ効果的な形態であることが好ましいが、特にこれらに限定されるものではない。

【0101】

前記「薬学的に許容される」とは、医薬学的判断の範囲内で、過度な毒性、刺激、アレルギー反応などを誘発することなく所望の用途に効果的に使用できる物質を意味する。

【0102】

本発明における「薬学的に許容される塩」には、薬学的に許容される無機酸、有機酸又は塩基から誘導された塩が含まれる。好適な酸の例としては、塩酸、臭素酸、硫酸、硝酸、過塩素酸、フマル酸、マレイン酸、リン酸、グリコール酸、乳酸、サリチル酸、コハク酸、トルエン-p-スルホン酸、酒石酸、酢酸、クエン酸、メタンスルホン酸、ギ酸、安息香酸、マロン酸、ナフタレン-2-スルホン酸、ベンゼンスルホン酸などが挙げられる。好適な塩基から誘導された塩には、ナトリウム、カリウムなどのアルカリ金属、マグネシウムなどのアルカリ土類金属、アンモニウムなどが含まれる。

【0103】

また、本発明における「溶媒和物」とは、本発明によるペプチド又はその塩が溶媒分子と複合体を形成したものを意味する。

【0104】

もう一つの具体的な様態として、前記ペプチドは、下記一般式1で表されるアミノ酸配列を含むことができる。

【0105】

Xaa1-Xaa2-Xaa3-Gly-Thr-Phe-Xaa7-Ser-Asp-Xaa10-Ser-Xaa12-Xaa13-Xaa14-Xaa15-Xaa16-Xaa17-Xaa18-Xaa19-Xaa20-Xaa21-Phe-Xaa23-Xaa24-Trp-Leu-Xaa27-Xaa28-Xaa29-Xaa30-R1 (一般式1、配列番号103)

【0106】

一般式1において、Xaa1はヒスチジン、4-イミダゾアセチル又はチロシンであり、Xaa2はグリシン、 α -メチルグルタミン酸又はAibであり、Xaa3はグルタミン酸又はグルタミンであり、Xaa7はトレオニン又はイソロイシンであり、Xaa10はロイシン、チロシン、リシン、システイン又はバリンであり、Xaa12はリシン、セリン又はイソロイシンであり、Xaa13はグルタミン、チロシン、アラニン又はシステインであり、Xaa14はロイシン、メチオニン又はチロシンであり、Xaa15はシステイン、アスパラギン酸、グルタミン酸又はロイシンであり、Xaa16はグリシン、グルタミン酸又はセリンであり、Xaa17はグルタミン、アルギニン、イソロイシン、グルタミン酸、システイン又はリシンであり、Xaa18はアラニン、グルタミン、アルギニン又はヒスチジンであり、Xaa19はアラニン、グルタミン、システイン又はバリンであり、Xaa20はリシン、グルタミン又はアルギニンであり、Xaa21はグルタミン酸、グルタミン、ロイシン、システイン又はアスパラギン酸であり、Xaa23はイソロイシン又はバリンであり、Xaa24はアラニン、グルタミン、システイン、アスパラギン、アスパラギン酸又はグルタミン酸であり、Xaa27はバリン、ロイシン、リシン、又はメチオニンであり、Xaa28はシステイン、リシン、アラニン、アスパラギン又はアスパラギン酸であり、Xaa29はシステイン、グリシン、グルタミン、トレオニン、グルタミン酸又はヒスチジンであり、Xaa30はシステイン、グリシン、リシンもしくはヒスチジンであるか、又は存在せず、

R1はシステイン、GKKNDWKHNIT (配列番号106)、m-SSGAPPPS-n (配列番号107) もしくはm-SSGQPPPS-n (配列番号108) であるか、又は存在せず、

ここで、mは-Cys-、-Pro-、又は-Gly-Pro-であり、nは-Cys-、-Gly-、-Ser-、もしくは-His-Gly-であるか、又は存在しなくてもよい。

【0107】

前記三重活性体の例として、配列番号：1～102からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むもの、配列番号1～102からなる群から選択されるアミノ酸配列（必須）からなるものが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0108】

また、本発明に「特定配列番号で表されるペプチド」と記載されていても、当該配列番

10

20

30

40

50

号のアミノ酸配列からなるペプチドと同一又は相当する活性を有するものであれば、当該配列番号のアミノ酸配列の前後の無意味な配列付加、自然発生する突然変異、又はその非表現突然変異 (silent mutation) を除外するものではなく、このような配列付加又は突然変異を有するものも本願に含まれることは言うまでもない。

【0109】

以上の内容は、本発明の他の具体例又は他の態様にも適用されるが、これらに限定されるものではない。

【0110】

具体的には、一般式1において、Xaa14はロイシン又はメチオニンであり、Xaa15はシステイン、アスパラギン酸又はロイシンである。

10

【0111】

このようなペプチドの例として、配列番号1~12、14~17及び21~102からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むペプチド、当該アミノ酸配列(必須)からなるペプチドが挙げられるが、特にこれらに限定されるものではない。

【0112】

このようなペプチドは、グルカゴン受容体、GLP-1受容体及びGIP受容体の少なくとも1つを有意に活性化させることができるが、特にこれらに限定されるものではない。具体的には、GLP-1を有意に活性化させるものであるか、さらにグルカゴン受容体及び／又はGIP受容体を有意に活性化させるものであるが、特にこれらに限定されるものではない。

20

【0113】

より具体的には、一般式1において、Xaa2はグリシン、 α -メチルグルタミン酸又はAibであり、Xaa7はトレオニンであり、Xaa10はチロシン、システイン又はバリンであり、Xaa12はリシン又はイソロイシンであり、Xaa13はチロシン、アラニン、グルタミン又はシステインであり、Xaa14はロイシン、システイン又はメチオニンであり、Xaa15はシステイン、ロイシン、グルタミン酸又はアスパラギン酸であり、Xaa17はグルタミン、アルギニン、イソロイシン、システイン、グルタミン酸又はリシンであり、Xaa18はアラニン、グルタミン、アルギニン又はヒスチジンであり、Xaa19はアラニン、グルタミン、バリン又はシステインであり、Xaa20はリシン、アルギニン又はグルタミンであり、Xaa21はグルタミン酸、グルタミン、ロイシン、システイン又はアスパラギン酸であり、Xaa23はイソロイシン又はバリンであり、Xaa24はシステイン、アラニン、グルタミン、アスパラギン、グルタミン酸又はアスパラギン酸であり、Xaa27はロイシン又はリシンであるペプチドであってもよいが、特にこれらに限定されるものではない。

30

【0114】

より具体的には、一般式1において、Xaa2はグリシン、 α -メチルグルタミン酸又はAibであり、Xaa7はトレオニンであり、Xaa10はチロシン、システイン又はバリンであり、Xaa12はリシン又はイソロイシンであり、Xaa13はチロシン、アラニン又はシステインであり、Xaa14はロイシン又はメチオニンであり、Xaa15はシステイン又はアスパラギン酸であり、Xaa17はグルタミン、アルギニン、イソロイシン、システイン又はリシンであり、Xaa18はアラニン、アルギニン又はヒスチジンであり、Xaa19はアラニン、グルタミン又はシステインであり、Xaa20はリシン又はグルタミンであり、Xaa21はグルタミン酸、システイン又はアスパラギン酸であり、Xaa23はバリンであり、Xaa24はアラニン、グルタミン、システイン、アスパラギン又はアスパラギン酸であり、Xaa27はロイシン又はリシンであってもよいが、特にこれらに限定されるものではない。

40

【0115】

より具体的には、一般式1において、Xaa2は α -メチルグルタミン酸又はAibであり、Xaa7はトレオニンであり、Xaa10はチロシン又はシステインであり、Xaa12はリシン又はイソロイシンであり、Xaa13はチロシン、アラニン又はシステイ

50

ンであり、X a a 1 4 はロイシン又はメチオニンであり、X a a 1 5 はシステイン又はアスパラギン酸であり、X a a 1 6 はグルタミン酸であり、X a a 1 7 はアルギニン、イソロイシン、システイン又はリシンであり、X a a 1 8 はアラニン、アルギニン又はヒスチジンであり、X a a 1 9 はアラニン、グルタミン又はシステインであり、X a a 2 0 はリシン又はグルタミンであり、X a a 2 1 はグルタミン酸又はアスパラギン酸であり、X a a 2 3 はバリンであり、X a a 2 4 はグルタミン、アスパラギン又はアスパラギン酸であり、X a a 2 7 はロイシンであり、X a a 2 8 はシステイン、アラニン、アスパラギン又はアスパラギン酸であってもよい。

【0116】

具体的には、一般式 1 において、X a a 1 はヒスチジン又は 4-イミダゾアセチルであり、X a a 2 は α -メチルグルタミン酸又は A i b であり、X a a 3 はグルタミンであり、X a a 7 はトレオニンであり、X a a 1 0 はチロシンであり、X a a 1 2 はイソロイシンであり、X a a 1 3 はアラニン又はシステインであり、X a a 1 4 はメチオニンであり、X a a 1 5 はアスパラギン酸であり、X a a 1 6 はグルタミン酸であり、X a a 1 7 はイソロイシン又はリシンであり、X a a 1 8 はアラニン又はヒスチジンであり、X a a 1 9 はグルタミン又はシステインであり、X a a 2 0 はリシンであり、X a a 2 1 はアスパラギン酸であり、X a a 2 3 はバリンであり、X a a 2 4 はアスパラギンであり、X a a 2 7 はロイシンであり、X a a 2 8 はアラニン又はアスパラギンであり、X a a 2 9 はグルタミン又はトレオニンであり、X a a 3 0 はシステインもしくはリシンであるか、又は存在しなくてもよい。

【0117】

より具体的には、一般式 1 において、X a a 2 はグリシン、 α -メチルグルタミン酸又は A i b であり、X a a 3 はグルタミンであり、X a a 7 はトレオニンであり、X a a 1 0 はチロシン、システイン又はバリンであり、X a a 1 2 はリシンであり、X a a 1 3 はチロシンであり、X a a 1 4 はロイシンであり、X a a 1 5 はアスパラギン酸であり、X a a 1 6 はグリシン、グルタミン酸又はセリンであり、X a a 1 7 はグルタミン、アルギニン、システイン又はリシンであり、X a a 1 8 はアラニン、アルギニン又はヒスチジンであり、X a a 1 9 はアラニン又はグルタミンであり、X a a 2 0 はリシン又はグルタミンであり、X a a 2 1 はグルタミン酸、システイン又はアスパラギン酸であり、X a a 2 3 はバリンであり、X a a 2 4 はアラニン、グルタミン又はシステインであり、X a a 2 7 はロイシン又はリシンであり、X a a 2 9 はグリシン、グルタミン、トレオニン又はヒスチジンであってもよいが、特にこれらに限定されるものではない。

【0118】

このようなペプチドは、G L P-1 受容体及びグルカゴン受容体の活性化の程度が有意に高く、G I P 受容体の活性化の程度に比べて高いか、G L P-1 受容体、グルカゴン受容体及び G I P 受容体の活性化の程度が全て有意に高いか、G L P-1 受容体及び G I P 受容体の活性化の程度が有意に高く、グルカゴン受容体の活性化の程度に比べて高いものであってもよいが、特にこれらに限定されるものではない。

【0119】

このようなペプチドの例として、配列番号 8、9、21~37、39、42、43、49~61、64~83、85、86、88、89、91~93、95~102 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むペプチド、当該アミノ酸配列（必須）からなるペプチドが挙げられるが、特にこれらに限定されるものではない。

【0120】

具体的な態様として、前記ペプチドは、一般式 2 で表されるアミノ酸配列を含むものであってもよい。

【0121】

X a a 1 - X a a 2 - G l n - G l y - T h r - P h e - T h r - S e r - A s p - X a a 1 0 - S e r - L y s - X a a 1 3 - X a a 1 4 - X a a 1 5 - X a a 1 6 - X a a 1 7 - X a a 1 8 - X a a 1 9 - X a a 2 0 - X a a 2 1 - P h e - X a a 2 3 - X a a

24-Trp-Leu-Leu-Xaa28-Xaa29-Xaa30-Xaa31-Ser-Ser-Gly-Gln-Pro-Pro-Pro-Ser-Xaa40 (一般式2、配列番号104)

【0122】

前記式において、Xaa1は4-イミダゾアセチル、ヒスチジン又はチロシンであり、Xaa2はグリシン、 α -メチルグルタミン酸又はAibであり、Xaa10はチロシン又はシステインであり、Xaa13はアラニン、グルタミン、チロシン又はシステインであり、Xaa14はロイシン、メチオニン又はチロシンであり、Xaa15はアスパラギン酸、グルタミン酸又はロイシンであり、Xaa16はグリシン、グルタミン酸又はセリンであり、Xaa17はグルタミン、アルギニン、イソロイシン、グルタミン酸、システイン又はリシンであり、Xaa18はアラニン、グルタミン、アルギニン又はヒスチジンであり、Xaa19はアラニン、グルタミン、システイン又はバリンであり、Xaa20はリシン、グルタミン又はアルギニンであり、Xaa21はシステイン、グルタミン酸、グルタミン、ロイシン又はアスパラギン酸であり、Xaa23はイソロイシン又はバリンであり、Xaa24はシステイン、アラニン、グルタミン、アスパラギン又はグルタミン酸であり、Xaa28はリシン、システイン、アスパラギン又はアスパラギン酸であり、Xaa29はグリシン、グルタミン、システイン又はヒスチジンであり、Xaa30はシステイン、グリシン、リシン又はヒスチジンであり、Xaa31はプロリン又はシステインであり、Xaa40はシステインであるか、又は存在しなくてもよい。

10

【0123】

より具体的には、一般式2において、Xaa13はアラニン、チロシン又はシステインであり、Xaa15はアスパラギン酸又はグルタミン酸であり、Xaa17はグルタミン、アルギニン、システイン又はリシンであり、Xaa18はアラニン、アルギニン又はヒスチジンであり、Xaa21はシステイン、グルタミン酸、グルタミン又はアスパラギン酸であり、Xaa23はイソロイシン又はバリンであり、Xaa24はシステイン、グルタミン又はアスパラギンであり、Xaa28はシステイン、アスパラギン又はアスパラギン酸であり、Xaa29はグルタミン、システイン又はヒスチジンであり、Xaa30はシステイン、リシン又はヒスチジンであってもよい。

20

【0124】

このようなペプチドの例として、配列番号21、22、42、43、50、64~77及び95~102からなる群から選択されるアミノ酸配列、より具体的には配列番号21、22、42、43、50、64~77及び96~102からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むペプチド、当該アミノ酸配列（必須）からなるペプチドが挙げられるが、特にこれらに限定されるものではない。

30

【0125】

具体的な態様として、前記ペプチドは、一般式3のアミノ酸配列を含むものであってもよい。

【0126】

Xaa1-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Xaa13-Leu-Asp-Glu-Xaa17-Xaa18-Xaa19-Lys-Xaa21-Phe-Val-Xaa24-Trp-Leu-Leu-Xaa28-Xaa29-Xaa30-Xaa31-Ser-Ser-Gly-Gln-Pro-Pro-Pro-Ser-Xaa40 (一般式3、配列番号105)

40

【0127】

一般式3において、Xaa1はヒスチジン又はチロシンであり、Xaa2は α -メチルグルタミン酸又はAibであり、Xaa13はアラニン、チロシン又はシステインであり、Xaa17はアルギニン、システイン又はリシンであり、Xaa18はアラニン又はアルギニンであり、Xaa19はアラニン又はシステインであり、Xaa21はグルタミン酸又はアスパラギン酸であり、Xaa24はグルタミン又はアスパラギンであり、Xaa28はシステイン又はアスパラギン酸であり、Xaa29はシステイン、ヒスチジン又は

50

グルタミンであり、X a a 3 0 はシステイン又はヒスチジンであり、X a a 3 1 はプロリン又はシステインであり、X a a 4 0 はシステインであるか、又は存在しなくてもよい。

【0128】

このようなペプチドの例として、配列番号21、22、42、43、50、64～71、75～77及び96～102からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むペプチド、当該アミノ酸配列（必須）からなるペプチドが挙げられるが、特にこれらに限定されるものではない。

【0129】

また、一般式1において、R1はシステイン、G K K N D W K H N I T（配列番号106）、C S S G Q P P P S（配列番号109）、G P S S G A P P P S（配列番号110）、G P S S G A P P P S C（配列番号111）、P S S G A P P P S（配列番号112）、P S S G A P P P S G（配列番号113）、P S S G A P P P S H G（配列番号114）、P S S G A P P P S S（配列番号115）、P S S G Q P P P S（配列番号116）又はP S S G Q P P P S C（配列番号117）であるか、又は存在しないが、特にこれらに限定されるものではない。

【0130】

また、本発明のペプチドは、その長さに応じてこの分野で周知の方法、例えば自動ペプチド合成機により合成することができ、遺伝子操作技術により産生することができる。

【0131】

具体的には、本発明のペプチドは、標準合成方法、組換え発現システム又は任意の他の当該分野の方法により作製することができる。よって、本発明によるペプチドは、例えば、下記を含む多くの方法で合成することができる：

【0132】

（a）ペプチドを固相もしくは液相法で段階的に又はフラグメント組立により合成し、最終ペプチド生成物を分離及び精製する方法；又は

（b）ペプチドをコードする核酸作製物を宿主細胞内で発現させ、発現生成物を宿主細胞培養物から回収する方法；又は

（c）ペプチドをコードする核酸作製物を無細胞試験管内で発現させ、発現生成物を回収する方法；又は

（a）、（b）及び（c）の任意の組み合わせによりペプチドのフラグメントを得て、次にフラグメントを連結してペプチドを得ることにより当該ペプチドを回収する方法。

【0133】

また、前記グルカゴン受容体、G L P - 1 受容体、及びG I P 受容体に対して活性を有するペプチドは、グルカゴン受容体、G L P - 1 受容体及びG I P 受容体に対して活性を有するペプチドに、その生体内半減期を延長させるための生体適合性物質が結合された結合体の形態であってもよい。本発明における前記生体適合性物質は、キャリアと混用される。

【0134】

本発明における前記ペプチドの結合体は、キャリアが結合されていない前記ペプチドより効力の持続性が向上したものであり、本発明においては、このような結合体を「持続型結合体」という。

【0135】

なお、このような結合体は、非自然発生の（non-naturally occurring）ものであってもよい。

【0136】

本発明を具現するためのもう一つの様態は、グルカゴン受容体、G L P - 1（G l u c a g o n - l i k e p e p t i d e - 1）受容体、及びG I P（G l u c o s e - d e p e n d e n t i n s u l i n o t r o p i c p o l y p e p t i d e）受容体に対して活性を有するペプチドを含む結合体を含む、高脂血症の予防又は治療用薬学的組成物である。

10

20

30

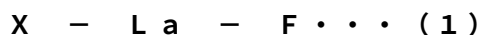
40

50

【0137】

本発明の一つの具体例において、前記結合体は下記化学式（1）で表される、結合体である：

【0138】



【0139】

ここで、Xは、前記グルカゴン受容体、GLP-1受容体、及びGIP受容体に対して活性を有する、ペプチドであり；Lは、ポリエチレングリコールであり；aは、0又は自然数であり、ただし、aが2以上であるとき、それぞれのLは互いに独立しており；Fは、免疫グロブリンFc領域である。

10

【0140】

前記結合体においてX、すなわちグルカゴン受容体、GLP-1受容体、及びGIP受容体に対して活性を有するペプチドについては、前述のとおりである。

【0141】

前記結合体において、FはX、すなわちグルカゴン受容体、GLP-1受容体及びGIP受容体に対して活性を有するペプチドの半減期を延長させることのできる物質であり、本発明の前記結合体の一部をなす一構成である。

【0142】

前記Fは、Xに共有化学結合又は非共有化学結合により互いに結合されたものであってもよく、共有化学結合、非共有化学結合、又はそれらの組み合わせとしてLを介して、FとXが互いに結合されたものであってもよい。

20

【0143】

前記免疫グロブリンFc領域は、具体的にIgGFc領域であってもよいが、特にこれに制限されない。

【0144】

本発明の一具体例として、前記F（免疫グロブリンFc領域）は、二つのポリペプチド鎖からなる二合体であり、Lの一方の末端が前記二つのポリペプチド鎖中の一つのポリペプチド鎖にのみ連結されている構造を有してもよいが、これに制限されない。

【0145】

本発明のペプチド内の一つ以上のアミノ酸の側鎖は、生体内で可溶性及び／又は半減期を増加させ／又は生体利用率を増加させるために、このような生体適合性物質に接合されてもよい。このような変形はまた、治療学的タンパク質及びペプチドの消去（clearance）を減少させることができる。

30

【0146】

上述した生体適合性物質は、水溶性（両親媒性又は親水性）及び／又は無毒性及び／又は薬学的に許容可能なものであってもよい。

【0147】

前記Fは、Xと直接的に連結されるか（すなわち、前記化学式（1）においてaが0であるか）、又はリンカー（L）を通じて連結されたものであってもよい。

【0148】

具体的には、前記Lは非ペプチド性リンカーであるポリエチレングリコリンカーであってもよい。本発明において、「ポリエチレングリコールリンカー」は、エチレングリコール繰り返し単位が2個以上結合した生体適合性重合体を含む。前記繰り返し単位は、ペプチド結合ではなく任意の共有結合を通じて互いに連結される。前記ポリエチレングリコリンカーは、本発明の結合体の一部をなす一構成であってもよく、前記化学式（1）においてLに該当する。

40

【0149】

前記Laにおいてaは1以上であってもよく、aが2以上である場合、それぞれのLは独立していてもよい。

【0150】

50

また、一つの具体的な実施形態において、前記結合体は、両方の末端に F、具体的には、免疫グロブリン F c 領域及び X、具体的には、ペプチド薬物と結合できる反応基を含む非ペプチド性リンカーを通じて F と X が互いに共有結合的に連結されたものであってもよい。

【0151】

具体的には、前記 L（ポリエチレングリコールリンカー）は、エチレングリコール繰り返し単位を含有するリンカー、例えば、ポリエチレングリコールであってもよいが、これに制限されない。本明細書において、前記ポリエチレングリコールはエチレングリコール同種重合体、PEG 共重合体、又はモノメチル置換された PEG 重合体（mPEG）の形態をすべて包括する用語であるが、特にこれに制限されるものではない。また、当該分野において既に知られているその誘導体及び当該分野の技術レベルで容易に製造できる誘導体も本発明の範囲に含まれる。

10

【0152】

前記ポリエチレングリコールリンカーは、エチレングリコール繰り返し単位を含みながら、結合体の製造に用いられる作用基を末端に含んでもよい。本発明による持続型結合体は前記作用基を通じて X と F が連結された形態であってもよいが、これに制限されない。本発明において、前記非ペプチド性リンカーは 2 個、又は 3 個以上の作用基を含んでもよく、各作用基は同一又は互いに異なってもよいが、これに制限されない。

【0153】

具体的には、前記リンカーは下記化学式（2）で表されるポリエチレングリコール（PEG）であってもよいが、これに制限されるものではない：

20

【0154】



・・・（2）

【0155】

ここで、 $n = 10 \sim 2400$ 、 $n = 10 \sim 480$ 、又は $n = 50 \sim 250$ であるが、これに制限されない。

30

【0156】

前記持続型結合体で PEG の一部は、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$ 構造だけでなく、連結要素と、この $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$ の間に介在する酸素原子も含み得るが、これに制限されるものではない。

【0157】

また、一つの具体的な実施形態において前記持続型結合体は、本発明のペプチド（X）と免疫グロブリン F c 領域（F）がエチレングリコール繰り返し単位を含むリンカー（L）により、共有結合で連結された構造であってもよいが、これに制限されるものではない。

【0158】

本発明で用いられるエチレングリコール繰り返し単位の分子量は 0 超 200 kDa の範囲、具体的に約 1～100 kDa の範囲、約 1～50 kDa の範囲、約 1～30 kDa の範囲、約 2～30 kDa の範囲、約 1～20 kDa の範囲、より具体的に約 3.4 kDa～10 kDa の範囲、より具体的に約 3.4 kDa であってもよいが、これに制限されない。

40

【0159】

本発明において用語、「約」は ± 0.5 、 ± 0.4 、 ± 0.3 、 ± 0.2 、 ± 0.1 などを含め、約という用語の後に来る数値と同等または類似の範囲の数値を含め、これに制限されない。

【0160】

50

前記ポリエチレングリコールだけでなく、当該分野に既に知られているこれらの誘導体及び当該分野の技術水準で簡単に製造できる誘導体も本発明の範囲に含まれる。

【0161】

また、前記Fに該当するポリペプチドと結合する本発明の非ペプチド性リンカーは、一種の重合体だけでなく相違する種類の重合体の組合わせが用いられることもできる。

【0162】

一つの具体的な実施形態において前記非ペプチド性リンカーの両末端は、それぞれF、例えば、免疫グロブリンFc領域のアミン基又はチオール基及びXのアミン基又はチオール基に結合できる。

【0163】

具体的には、前記非ペプチド性重合体は、両末端にそれぞれF（例えば、免疫グロブリンFc領域）及びXと結合され得る反応基、具体的には、X，あるいはF（例えば、免疫グロブリンFc領域）のN末端又はリシンに位置したアミン基、又はシステインのチオール基と結合される反応基を含んでもよいが、これに制限されない。

【0164】

また、F，例えば、免疫グロブリンFc領域及びXと結合される、前記非ペプチド性重合体の反応基はアルデヒド基、マレイミド基及びスクシンイミド誘導体で構成された群から選択されが、これに制限されない。

【0165】

前記において、アルデヒド基としてプロピオンアルデヒド基又はブチルアルデヒド基を例として挙げることができるが、これに制限されない。

【0166】

前記において、スクシンイミド誘導体としては、スクシンイミジルバレレート、スクシンイミジルメチルブタノエート、スクシンイミジルメチルプロピオネート、スクシンイミジルブタノエート、スクシンイミジルプロピオネート、N-ヒドロキシスクシンイミド、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てもよいが、これに制限されない。

【0167】

非ペプチド性リンカーは、このような反応基を通じてXとFに連結され得るが、特にこれに制限されるものではない。

【0168】

また、アルデヒド結合による還元性アミン化で生成された最終産物は、アミド結合で連結されたものより遥かに安定している。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、例えば、pH9.0の条件ではリシン残基と共有結合を形成できる。

【0169】

また、前記非ペプチド性リンカーの両末端の反応基は互いに同一又は互いに異なってもよく、例えば、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、又はブチルアルデヒド基を有することができる。しかし、非ペプチド性リンカーの各末端にF、具体的には、免疫グロブリンFc領域とXが結合され得れば、特にこれに制限されない。

【0170】

例えば、前記非ペプチド性リンカーの一方の末端には反応基としてマレイミド基を含み、他方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などを含んでもよい。

【0171】

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り前記ヒドロキシ基を前記多様な反応基で活性化したり、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持続型タンパク質結合体を製造できる。

10

20

30

40

50

【0172】

一つの具体的な実施形態において前記非ペプチド性重合体はXのシステイン残基、より具体的にはシステインの-SH基に連結されるものであってもよいが、これに制限されない。

【0173】

例えば、前記Xに該当するペプチドにおいて10番のシステイン残基、13番のシステイン残基、15番のシステイン残基、17番のシステイン残基、19番のシステイン残基、21番のシステイン残基、24番のシステイン残基、28番のシステイン残基、29番のシステイン残基、30番のシステイン残基、31番のシステイン残基、40番のシステイン残基、又は41番のシステイン残基に前記非ペプチド性重合体が連結されたものであってもよいが、特にこれに制限されない。

10

【0174】

具体的には、前記システイン残基の-SH基に非ペプチド性重合体の反応基が連結されてもよく、反応基に対しては前述した内容がいずれも適用される。もし、マレイミド-PEG-アルデヒドを用いる場合、マレイミド基はXの-SH基とチオエーテル(thioether)結合で連結し、アルデヒド基はF、具体的には免疫グロブリンFcの-NH₂基と還元的アミン化反応を通じて連結できるが、これに制限されず、これは一例に該当する。

【0175】

また、前記結合体において、非ペプチド性重合体の反応基が免疫グロブリンFc領域のN末端に位置した-NH₂と連結されたものであってもよいが、これは一例に該当する。

20

【0176】

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を除いたものであり、重鎖定常領域2(CH2)及び／又は重鎖定常領域3(CH3)部分を含む部位を意味する。前記免疫グロブリンFc領域は、本発明の結合体の一部をなす一構成であってもよい。

【0177】

本発明において、Fc領域と言え、そこには、全長免疫グロブリンをパパイニンで消化して得られるFc切片の天然配列だけでなく、Fc切片天然配列の誘導体、例えば、天然配列の少なくとも1つのアミノ酸残基が欠失(例えば、ヒンジ部位の一部残基が欠失)、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置換されて天然のものとは異なる配列も含まれる。本明細書において「生体適合性物質」又は「キャリア」は前記Fc領域を意味する。

30

【0178】

前記F(免疫グロブリンFc領域)は、2つのポリペプチド鎖がジスルフィド結合で連結されている構造であり、前記2つの鎖のうち1つの鎖の窒素原子を介してのみ連結されている構造であるが、これに限定されるものではない。前記窒素原子を介する連結は、リシンのεアミノ原子やN末端のアミノ基に還元的アミノ化により連結されるものであってもよい。

【0179】

還元的アミノ化反応とは、反応物のアミン基又はアミノ基が他の反応物のアルデヒド(すなわち、還元的アミノ化が可能な官能基)と反応してアミンを生成し、次いで還元反応によりアミン結合を形成する反応を意味し、当該技術分野で周知の有機合成反応である。

40

【0180】

本発明の持続型結合体の一つの具体例として、前記持続型結合体は前記免疫グロブリンFc領域がそのN末端窒素原子を通じてリンカーに連結されたものであってもよい。

【0181】

このような免疫グロブリンFc領域は、重鎖定常領域にヒンジ(hinge)部分を含んでもよいが、これに限定されるものではない。

【0182】

50

本発明における免疫グロブリンFc領域は、N末端に特定のヒンジ配列を含んでもよい。

【0183】

本発明における「ヒンジ配列」とは、重鎖に位置してジスルフィド結合（interdisulfide bond）により免疫グロブリンFc領域の二量体を形成する部位を意味する。

【0184】

本発明における前記ヒンジ配列は、次のアミノ酸配列を有するヒンジ配列中の一部が欠失して1つのシステイン残基のみ有するように変異したものであってもよいが、これに限定されるものではない。：

【0185】

Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Cys-Pro（配列番号119）。

【0186】

前記ヒンジ配列は、配列番号119のヒンジ配列中の8番目又は11番目のシステイン残基が欠失して1つのシステイン残基のみ含むものであってもよい。本発明のヒンジ配列は、1つのシステイン残基のみ含む、3～12個のアミノ酸からなるものであるが、これに限定されるものではない。より具体的には、本発明のヒンジ配列は、次の配列を有するものであってもよい。

【0187】

Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Pro-Ser-Cys-Pro（配列番号120）

Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Pro（配列番号121）

Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser（配列番号122）

Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Pro（配列番号123）

Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser（配列番号124）

Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys（配列番号125）

Glu-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys（配列番号126）

Glu-Ser-Pro-Ser-Cys-Pro（配列番号127）

Glu-Pro-Ser-Cys-Pro（配列番号128）

Pro-Ser-Cys-Pro（配列番号129）

Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Ser-Cys-Pro（配列番号130）

Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Pro-Ser-Cys-Pro（配列番号131）

Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Ser-Cys-Pro（配列番号132）

Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys（配列番号133）

Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro（配列番号134）

Glu-Ser-Lys-Pro-Ser-Cys-Pro（配列番号135）

Glu-Ser-Pro-Ser-Cys-Pro（配列番号136）

Glu-Pro-Ser-Cys（配列番号137）

Ser-Cys-Pro（配列番号138）

【0188】

10

20

30

40

50

より具体的には、前記ヒンジ配列は、配列番号129 (Pro-Ser-Cys-Pro) 又は配列番号138 (Ser-Cys-Pro) のアミノ酸配列を含むものであってもよいが、これらに限定されるものではない。

【0189】

本発明の持続型結合体のより具体的な形態において、前記結合体内の免疫グロブリンFc領域のN末端はプロリンであり、この結合体は、前記プロリンの窒素原子を通じてFc領域がリンカーに連結されたものである。

【0190】

本発明の持続型結合体の一つの実施形態において、前記免疫グロブリンFc領域はヒンジ配列が存在することにより、免疫グロブリンFc領域の鎖二つがホモ二量体 (homodimer) やヘテロ二量体 (heterodimer) を形成した二量体の形態であってもよい。本発明の化学式(1)の結合体は、リンカーの一末端が二量体の免疫グロブリンFc領域の1つの鎖に連結された形態であるが、これらに限定されるものではない。

【0191】

本発明における「N末端」とは、タンパク質又はポリペプチドのアミノ末端を意味し、アミノ末端の最末端、又は最末端から1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個もしくは10個以上のアミノ酸まで含むものであってもよい。本発明の免疫グロブリンFc領域は、ヒンジ配列をN末端に含んでもよいが、これに限定されるものではない。

【0192】

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CH3に相当する非常に長い一部のアミノ酸配列が欠失した領域であってもよい。

【0193】

例えば、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) CH1ドメイン、CH2ドメイン、CH3ドメイン及びCH4ドメインの少なくとも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る。しかし、これらに限定されるものではない。

【0194】

また、本発明の持続型結合体の一つの実施形態として、前記免疫グロブリンFc領域Fは2つのポリペプチド鎖からなる二量体dimerであり、この時、前記Fc領域二量体FとXはエチレングリコール繰り返し単位を含有する一つの同一のリンカーLを通じて共有結合的に連結されている。この実施形態の一具体例において、XはこのようなFc領域二量体Fの両ポリペプチド鎖中の一つのポリペプチド鎖にのみリンカーLを通じて共有結合で連結されている。この実施形態のさらに具体的な例示において、このようなFc領域二量体Fの両ポリペプチド鎖中、Xが連結された一つのポリペプチド鎖には一分子のXのみがLを通じて共有結合的に連結されている。この実施形態の最も具体的な例示において前記Fはホモ二量体である。

【0195】

本発明の持続型結合体の他の実施形態では、二量体形態の一つのFc領域にX2分子が対称に結合されたものであってもよい。ここで、前記免疫グロブリンFc領域とXはLにより互いに連結されてもよい。しかし、前記記述の例に限定されるものではない。

【0196】

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、その配列誘導体も含まれる。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1つのアミ

10

20

30

40

50

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。

【0197】

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てもよい。

【0198】

また、ジスルフィド結合を形成する部位が除去された誘導体、天然FcからN末端のいくつかのアミノ酸が欠失された誘導体、天然FcのN末端にメチオニン残基が付加された誘導体など、様々な誘導体を用いられる。さらに、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、ADCC (antibody dependent cell mediated cytotoxicity) 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、国際特許公開第WO97/34631号、国際特許公開第96/32478号などに開示されている。

【0199】

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、当該分野で公知である (H. Neurath, R. L. Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979)。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。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 (modification) されてもよい。

【0200】

前述したFc誘導体は、本発明のFc領域と同等の生物学的活性を示し、Fc領域の熱、pHなどに対する構造的安定性を向上させたものであってもよい。

【0201】

また、このようなFc領域は、ヒトや、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方法であってもよい。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。より具体的な実施形態においては、ヒト由来のFc領域を、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。

【0202】

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、微生物を用いた遺伝工学的手法などの通常の方法が用いられてもよい。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) と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

10

20

30

40

50

リンFcフラグメントは、薬物のキャリアとしての本来の目的に適する。

【0203】

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、より具体的な実施形態において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。

【0204】

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ってもよく、より具体的な実施形態においてはヒト起源である。

【0205】

また、免疫グロブリンFc領域は、IgG、IgA、IgD、IgE、IgM由来のものであってもよく、それらの組み合わせ (combination) 又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。より具体的な実施形態においては、ヒト血液に最も豊富なIgG又はIgM由来のものであり、さらに具体的な実施形態においては、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由来のものである。一層具体的な実施形態において、前記免疫グロブリンFc領域はIgG4 Fc領域であり、最も具体的な実施形態において、前記免疫グロブリンFc領域はヒトIgG4由来の非グリコシル化されたFc領域であるが、これらに限定されるものではない。

【0206】

また、一つの具体例として、免疫グロブリンFc領域はヒトIgG4 Fcフラグメントであり、各単量体の3番目のアミノ酸であるシステイン間のジスルフィド結合 (inter-chain形態) により2個の単量体が連結されたホモ二量体の形態であってもよく、このとき、ホモ二量体は各単量体で35番及び95番のシステイン間及び141番及び199番のシステイン間のジスルフィド結合、すなわち2つのジスルフィド結合 (intra-chain形態) を有するものである／有するものであってもよい。

【0207】

各単量体のアミノ酸は、221個のアミノ酸からなり、ホモ二量体を形成するアミノ酸は、全体で442個のアミノ酸からなるが、これらに限定されるものではない。具体的には、免疫グロブリンFc切片は、配列番号139のアミノ酸配列 (221個のアミノ酸からなる) を有する2個の単量体が各単量体の3番目のアミノ酸であるシステイン間のジスルフィド結合によりホモ二量体を形成し、前記ホモ二量体の単量体は、それぞれ独立して35番目と95番目のシステイン間の内部のジスルフィド結合、及び141番目と199番目のシステイン間の内部のジスルフィド結合を形成するものであるが、これに限定されるものではない。

【0208】

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。

【0209】

また、上述した結合体は、効力の持続性が天然GLP-1、GIP、もしくはグルカゴンに比べて、又はFが修飾されていないXに比べて増加したものであってもよく、このような結合体は上述した形態だけでなく、生分解性ナノパーティクルに封入された形態などを全て含む。

【0210】

前記ペプチド (例えば、前記ペプチド自体又はこれに生体適合性物質が結合した形態)

を含む組成物は高脂血症の予防又は治療用であってもよい。

【0211】

本発明において用語「予防」とは、前記ペプチド又はこれを含む組成物の投与により高脂血症の発病を抑制又は遅延させる全ての行為を意味し、「治療」とは、前記ペプチド又はこれを含む組成物の投与により高脂血症の症状が好転したり有益になる全ての行為を意味する。

【0212】

本発明において用語「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、前記組成物の投与経路は特にこれに制限されないが、前記組成物が生体内標的に到達できる任意の一般的な経路を通じて投与され、例えば、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、又は直腸内投与などが挙げられる。

【0213】

本発明の薬学的組成物は薬学的に許容可能な担体、賦形剤又は希釈剤をさらに含んでもよい。このような薬学的に許容可能な担体、賦形剤、又は希釈剤は非自然的に発生したものであり得る。

【0214】

本発明における「薬学的に許容される」とは、治療効果を発揮する程度の十分な量と副作用を起こさないことを意味し、疾患の種類、患者の年齢、体重、健康状態、性別、薬物に対する感受性、投与経路、投与方法、投与回数、治療期間、配合、同時用いられる薬物などの医学分野における公知の要素により当業者が容易に決定することができる。

【0215】

本発明のペプチド、又は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さらに含んでもよい。前記担体は特にこれに限定されないが、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、懸濁化剤、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、無痛化剤、可溶化剤、等張化剤、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が、特にこれらに限定されるものではない。

【0216】

本発明の組成物の剤形は、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、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、徐放性製剤などに剤形化することができる。

【0217】

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、デンプン、アカシア、アルギン酸塩、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、ヒドロキシ安息香酸メチル、ヒドロキシ安息香酸プロピル、タルク、ステアリン酸マグネシウム又は鉱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、防腐剤などをさらに含んでもよい。

【0218】

さらに、本発明の薬学的組成物は、錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、懸濁剤、内用液剤、乳剤、シロップ剤、滅菌水溶液剤、非水性溶剤、凍結乾燥剤及び坐剤からなる群から選択されるいずれかの剤形を有してもよい。

【0219】

さらに、前記組成物は、薬学的分野における通常の方法による患者の体内投与に適した単回投与型の製剤、具体的にはタンパク質医薬品の投与に有用な製剤形態に剤形化し、当該技術分野で通常用いる投与方法を用いて経口、又は皮膚、静脈内、筋肉内、動脈内、骨

10

20

30

40

50

髄内、髄膜腔内、心室内、肺、経皮、皮下、腹腔内、鼻腔内、消化管内、局所、舌下、膣内もしくは直腸経路が含まれる非経口投与経路で投与することができるが、これらに限定されるものではない。

【0220】

さらに、前記ペプチド又は結合体は、生理食塩水や有機溶媒のように薬剤に許容される様々な担体 (carrier) と混合して用いることができ、安定性や吸収性を向上させるために、グルコース、スクロース、デキストランなどの炭水化物、アスコルビン酸 (ascorbic acid)、グルタチオンなどの抗酸化剤 (antioxidants)、キレート剤、低分子タンパク質、他の安定化剤 (stabilizers) などを薬剤として用いることができる。

10

【0221】

本発明の薬学的組成物の投与量と回数は、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。

【0222】

本発明の組成物の総有効量は、単回投与量 (single dose) で患者に投与してもよく、複数回投与量 (multiple dose) で長期間投与する分割治療方法 (fractionated treatment protocol) により投与してもよい。本発明の薬学的組成物は、疾患の程度に応じて有効成分の含有量を変えてもよい。具体的には、結合体の総用量は、1日体重1kg当たり約0.0001mg~500mgであることが好ましい。しかし、前記結合体の用量は、薬学的組成物の投与経路及び治療回数だけでなく、患者の年齢、体重、健康状態、性別、疾患の重症度、食餌、排泄率などの様々な要因を考慮して患者に対する有効投与量が決定されるので、これらを考慮すると、当該分野における通常の知識を有する者であれば、前記本発明の組成物の特定の用途に応じた適切な有効投与量を決定することができるであろう。本発明による薬学的組成物は、本発明の効果を奏するものであれば、その剤形、投与経路及び投与方法が特に限定されるものではない。

20

【0223】

本発明の薬学的組成物は、生体内持続性及び力価に優れるので、本発明の薬学的製剤の投与回数及び頻度を大幅に減少させることができる。

30

【0224】

本発明の他の実施態様は、前記ペプチド、結合体又は結合体又はそれを含む組成物を必要とする個体に投与するステップを含む、高脂血症の予防又は治療方法を提供する。

【0225】

前記ペプチド、結合体又はそれを含む組成物、高脂血症、予防及び治療については前述した通りである。

【0226】

本発明における前記個体とは、高脂血症の疑いのある個体であり、前記高脂血症の疑いのある個体とは、該当する疾患が発症したか、発症するリスクのある、ヒトをはじめとしてマウス、家畜などが含まれる哺乳動物を意味するが、本発明の結合体又はそれを含む前記組成物で治療可能な個体であればいかなるものでもよい。

40

【0227】

本発明の方法は、前記ペプチド又は結合体を含む薬学的組成物を薬学的有効量で投与するステップを含んでもよい。好適な総1日使用量は正しい医学的判断の範囲内で担当医により決定され、1回又は数回に分けて投与することができる。しかし、本発明の目的上、特定の患者に対する具体的な治療の有効量は、達成しようとする反応の種類と程度、場合によっては他の製剤が用いられるか否か、具体的な組成物、患者の年齢、体重、一般的な健康状態、性別、食餌、投与時間、投与経路、組成物の分泌率、治療期間、具体的な組成物と共に又は同時に投与される薬物をはじめとする様々な因子や、医薬分野で周知の類似の因子に応じて異なる量であることが好ましい。

50

【0228】

本発明のさらに他の実施態様は、高脂血症の予防又は治療のための薬剤の製造における、前記ペプチド、結合体又はこれを含む組成物の用途である。

【0229】

前記ペプチド、結合体又はこれを含む組成物、高脂血症、予防及び治療については前述した通りである。

【0230】

以下、実施例を挙げて本発明をより詳細に説明する。しかし、これらの実施例は本発明を例示するものにすぎず、本発明がこれらに限定されるものではない。

【0231】

実施例 1： 三重活性体の製造

GLP-1、GIP及びグルカゴン受容体の全てに対して活性を有する三重活性体を製造し、下記表 2 にその配列を示す。

【0232】

10

20

30

40

50

【表 2】

配列番号	配列	情報
1	HXQGTFTSDVSSYLDGQAAKEFIAWLVEGC	
2	HXQGTFTSDVSSYLDGQAAKEFIAWLVEGC	
3	HXQGTFTSDVSSYLLGQAAKEFIAWLVEGGPSSGA PPPSG	
4	HXQGTFTSDVSSYLLGQAAKEFIAWLVEGC	
5	HXQGTFTSDVSSYLLGQAAKEFIAWLVEGGPSSGA PPPSG	
6	HXQGTFTSDVSSYLDGQAAKEFVAVLLKGC	
7	HXQGTFTSDVSKYLDGQAAKEFVAVLLKGC	
8	HXQGTFTSDVSKYLDGQAAKEFVAVLLKGC	
9	HXQGTFTSDVSKYLDGQAAKEFVAVLLKGC	
10	HXQGTFTSDVSKYLDGQAAKEFVAVLLAGGPSSGA PPPSG	
11	CAGGTFTSDLSKYLDSEERQQLFVQVLKAGGPSSGA PPPSHG	
12	CAGGTFTSDLSKYNDSEAVQLFVEVLKAGGPSSGA PPPSHG	
13	CAGGTFTSDYSIQLDSEIAVQDFVEVLAKGPSSGA PPPSHG	
14	CAGGTFTSDYSIQLDSEIAVRDFVEVLKNGGPSSGA PPPSHG	
15	CAGGTFTSDLSKQNDSEAVRLFIEVLKNGGPSSGA PPPSHG	
16	CAGGTFTSDLSKQNDSEAVQLFIEVLKNGGPSSGA PPPSHG	
17	CAGGTFTSDLSKQNDSEERAREFIEVLAKGPSSGA PPPSHG	
18	CAGGTFTSDLSKQNDSEERAREFIEVLKNTGPSSGA PPPSHG	
19	CAGGTFTSDLSIQYDSEHQRDFIEVLKDTGPSSGA PPPSHG	

10

20

30

40

50

20	CAQGTFTSDLSIQTEEEAQQDFVEVLXDTGPSSGA PPPSHG	
21	YXQGTFTSDYSXYLDECRAXEFVQWLLDHPSSGQF PPS	環形成
22	YXQGTFTSDYSXYLDEKRAAEFVQWLLDHPSSGQF PPS	環形成
23	YXQGTFTSDYSXYLDECRAXEFVQWLLAQKGKXNDW KHMIT	環形成
24	YXQGTFTSDYSXYLDECRAXEFVQWLKNGGPSSGAP PPS	環形成
25	HXQGTFTSDCSXYLDERAAQDFVQWLLDGGPSSGAP PPS	
26	HXQGTFTSDCSXYLDSRAAQDFVQWLLDGGPSSGAP PPS	
27	HXQGTFTSDYSXYLDERACQDFVQWLLDQGGPSSGA PPPS	
28	HXQGTFTSDYSXYLDEKRAQEFVCWLLAQKGKXNDW KHMIT	
29	HXQGTFTSDYSXYLDEKAAAEFVQWLLNTC	環形成
30	HXQGTFTSDYSXYLDEKAAQEFVQWLLDTC	環形成
31	HXQGTFTSDYSXYLDEKACKEFVQWLLAQ	環形成
32	HXQGTFTSDYSXYLDEKACXDFVQWLLDGGPSSGAP PPS	環形成
33	EXQGTFTSDYSIAMDEIHQXDFVNWLLAQXC	環形成
34	HXQGTFTSDYSXYLDEKROKEFVNWLLAQXC	環形成
35	HXQGTFTSDYSIAMDEIHQXDFVNWLLNTKC	環形成
36	HXQGTFTSDYSXYLCEXROKEFVQWLLNGGPSSGAP PPSG	環形成
37	HXQGTFTSDYSXYLDECRQKEFVQWLLNGGPSSGAP PPSG	環形成

10

20

30

40

50

38	CAXQGTFTSDXSSYLDERAAQDFVQVLLDGGPSSGA PPSS	
39	HXQGTFTSDYSKYLDGQHAQCFVAVLLAGGPPSSGA PPSS	
40	HXQGTFTSDXSKYLDERACQDFVQVLLDGGPSSGAP PPS	
41	HXQGTFTSDXSKYLDCAAQDFVQVLLDGGPSSGAP PPS	
42	YXQGTFTSDYSKYLDEKRAKEEFVQVLLDHHPPSSGQP PPSC	環形成
43	YXQGTFTSDYSKYLDEKRAKEEFVQVLLDHHCCSSGQP PPS	環形成
44	HGQGTFTSDCSKQLDGQAAQEFVAVLLAGGPPSSGAP PPS	
45	HGQGTFTSDCSKYNDGQAAQDFVAVLLAGGPPSSGAP PPS	
46	HGQGTFTSDCSKYLDGQHAQEFVAVLLAGGPPSSGAP PPS	
47	HGQGTFTSDCSKYLDGQRAQEFVAVLLAGGPPSSGAP PPS	
48	HGQGTFTSDCSKYLDGQRAQDFVAVLLAGGPPSSGAP PPS	
49	CAXQGTFTSDYSICHDEIHQKDFVNVLLNTK	環形成
50	HXQGTFTSDYSKYLDEKRAKEEFVQVLLDHHPPSSGQP PPSC	環形成
51	HXQGTFTSDYSKYLDEKRAKEEFVQVLLNTC	環形成
52	HXQGTFTSDYSKYLDEKRAKEEFVQVLLDTC	環形成
53	HXEGTFTSDYSIANDEIHQKDFVNVLLAQ	環形成
54	HXEGTFTSDYSIANDEIHQKDFVDVLLAEC	環形成
55	HXQGTFTSDYSIANDEIHQKDFVNVLLAQ	環形成

10

20

30

40

50

56	HXQGTFTSDYSXYLDEKIQKEFVNWLLAQC	環形成
57	HXQGTFTSDYSIAMDEIHQKDFVNWLLNTC	環形成
58	HXQGTFTSDYSXYLDEKIQKEFVQWLLNTKC	環形成
59	CAXQGTFTSDYSICMDEXHQKDFVNWLLNTK	環形成
60	CAXQGTFTSDYSIAMDEXHCKDFVNWLLNTK	環形成
61	CAXQGTFTSDYSIAMDEIACKDFVNWLLNTK	環形成
62	CAXQGTFTSDKSKYLDERAAQDFVQWLLDGGPSSGA PPPS	
63	CAXQGTFTSDCSKYLDERAAQDFVQWLLDGGPSSGA PPPS	
64	YXQGTFTSDYSXYLDECAAKKEFVQWLLDHPSSGQP PPS	環形成
65	HXQGTFTSDYSKCLDEKAAKEFVQWLLDHPSSGQP PPS	環形成
66	VXQGTFTSDYSXYLDECAKKEFVQWLLDHPSSGQP PPS	環形成
67	YXQGTFTSDYSXYLDECAAKKEFVQWLLDHPSSGQP PPS	環形成
68	YXQGTFTSDYSKCLDEKAAKEFVQWLLDHPSSGQP PPS	環形成
69	YXQGTFTSDYSKCLDERAAKEFVQWLLDHPSSGQP PPS	環形成
70	YXQGTFTSDYSKCLDEKAAKEFVQWLLDHPSSGQP PPS	環形成
71	YXQGTFTSDYSXYLDERACKKEFVQWLLDHPSSGQP PPS	環形成
72	YXQGTFTSDCSKYLDERAAKEFVQWLLDHPSSGQP PPS	環形成
73	CAXQGTFTSDYSXYLDECAKKEFVQWLLDHPSSGO PPPS	環形成

10

20

30

40

50

74	CAXQGTFTSDYSKCLDEKRAKEFVQVLLDHPSSGQ PPPS	環形成
75	YXQGTFTSDYSKYLDKXAAKEFVQVLLDHPSSGQF PPSC	環形成
76	YXQGTFTSDYSKYLDKXAAKDFVQVLLDHPSSGQF PPSC	環形成
77	YXQGTFTSDYSKYLDKXAAKDFVQVLLDHPSSGQF PPSC	環形成
78	HXQGTFTSDYSKYLDKROKEFVQVLLDTIC	環形成
79	HXEGTFTSDYSIAMDEIHQKDFVNVLLAQEC	環形成
80	HXEGTFTSDYSIAMDEIHQKDFVDVLLAEC	環形成
81	CAXQGTFTSDYSKYLDKROKEFVQVLLNTIC	環形成
82	CAXQGTFTSDYSKYLDKROKEFVQVLLDTIC	環形成
83	CAXEGTFTSDYSIAMDEIHQKDFVNVLLAQEC	環形成
84	CAXEGTFTSDYSIAMDEIHQKDFVDVLLAEC	環形成
85	CAXQGTFTSDYSIAMDEIHQKDFVNVLLAQEC	環形成
86	CAXQGTFTSDYSKYLDKROKEFVNVLLAQEC	環形成
87	CAXQGTFTSDYSIAMDEIHQKDFVNVLLNTIC	環形成
88	CAXQGTFTSDYSKYLDKROKEFVQVLLNTIC	環形成
89	CAXQGTFTSDYSKYLDKROKEFVQVLLDTIC	環形成
90	CAXEGTFTSDYSIAMDEIHQKDFVNVLLAQEC	環形成
91	CAXEGTFTSDYSIAMDEIHQKDFVDVLLAEC	環形成

10

20

30

40

50

92	CA X Q G T F T S D Y S I A N D E I H Q K D F V N W L L A Q K C	環形成
93	CA X Q G T F T S D Y S K Y L D E K R Q K E F V N W L L A Q K C	環形成
94	CA X Q G T F T S D Y S I A N D E I H Q K D F V N W L L N T K C	環形成
95	Y X Q G T F T S D Y S K Y L D E K R A K E F V Q W L L C H P S S G Q P P P S	環形成
96	Y X Q G T F T S D Y S K Y L D E K R A K E F V Q W L L D H C P S S G Q P P P S	環形成
97	Y X Q G T F T S D Y S K Y L D E K R A K E F V Q W L L D C H P S S G Q P P P S	環形成
98	Y X Q G T F T S D Y S K A L D E K A A K E F V N W L L D H P S S G Q P P P S C	環形成
99	Y X Q G T F T S D Y S K A L D E K A A K D F V N W L L D H P S S G Q P P P S C	環形成
100	Y X Q G T F T S D Y S K A L D E K A A K E F V Q W L L D Q H P S S G Q P P P S C	環形成
101	Y X Q G T F T S D Y S K A L D E K A A K E F V N W L L D Q H P S S G Q P P P S C	環形成
102	Y X Q G T F T S D Y S K A L D E K A A K D F V N W L L D Q H P S S G Q P P P S C	環形成

10

20

30

40

50

【0233】

前記表2に示す配列において、Xで表記したアミノ酸は非天然アミノ酸であるAib (amino isobutyric acid)であり、下線を引いたアミノ酸は下線を引いたアミノ酸が互いに環を形成することを意味する。また、表2において、CAは4-イミダゾアセチル(4-imidazoacetyl)を意味し、Yはチロシンを意味する。

【0234】

実施例2：三重活性体持続型結合体の製造

両末端にそれぞれマレイミド基及びアルデヒド基を有する10kDaのPEG、すなわちマレイミド-PEG-アルデヒド(10kDa、NOF、日本)を実施例1の三重活性体(配列番号21、22、42、43、50、77及び96)のシステイン残基にペグ化するために、三重活性体とマレイミド-PEG-アルデヒドのモル比を1:1~3とし、タンパク質の濃度を1~5mg/mlとし、低温で0.5~3時間反応させた。ここで、反応は、50mM Tris緩衝液(pH7.5)に20~60%イソプロパノールを添加した環境下で行った。反応終了後に、前記反応液をSPセファロースHP(GE healthcare、米国)に適用し、システインにモノペグ化された三重活性体を精製した。

【0235】

次に、前記精製したモノペグ化した三重活性体と免疫グロブリンFcをモル比 1 : 1 ~ 5、とし、タンパク質の濃度を10~50mg/mlとし、4~8℃で12~18時間反応させた。反応は、100mMリン酸カリウム緩衝液(pH6.0)に還元剤である10~50mMシアノ水素化ホウ素ナトリウムと10~30%イソプロパノールを添加した環境下で行った。反応終了後に、前記反応液をブチルセファロースFF精製カラム(GE healthcare、米国)とSource ISO精製カラム(GE healthcare、米国)に適用し、三重活性体と免疫グロブリンFcとを含む結合体を精製した。精製されたその持続型結合体は分子内で三重活性体ペプチド、ポリエチレングリコール(PEG)リンカーとFc二量体が1 : 1 : 1のモル比で共有結合連結された構造であり、PEGリンカーはFc二量体の両ポリペプチド鎖中の一本鎖だけに連結されている。

10

【0236】

一方、前記免疫グロブリンFcは配列番号139のアミノ酸配列(221個のアミノ酸で構成される)を有する単量体2つが各単量体の3番のアミノ酸であるシステイン間にジスルフィド結合を通じてホモ二量体を形成し、前記ホモ二量体の単量体は、それぞれ独立に35番及び95番のシステイン間の内部のジスルフィド結合及び141番及び199番のシステイン間の内部のジスルフィド結合が形成されたものである。

【0237】

製造後に逆相クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー及びイオン交換クロマトグラフィーで分析した純度は95%以上であった。

20

【0238】

本実施例で製造された三重活性体及び免疫グロブリンFcがPEGを通じて連結された結合体は、三重結合体及び免疫グロブリンFcを含む結合体又は持続型結合体と命名した。

【0239】

例えば、配列番号42の三重活性体及び免疫グロブリンFcがPEGを介して連結された結合体を、「配列番号42と免疫グロブリンFcとを含む結合体」又は「配列番号42の持続型結合体」と命名し、これらは、本発明において混用される。

【0240】

実験例1：三重活性体及びその持続型結合体のin vitro活性の測定

30

実施例1及び2で製造した三重活性体とその持続型結合体の活性を測定するために、GLP-1受容体、グルカゴン(GCG)受容体及びGIP受容体がそれぞれ形質転換された細胞株を用いて、in vitroで細胞活性を測定する方法を用いた。

【0241】

前記各細胞株は、CHO(chinese hamster ovary)にヒトGLP-1受容体、ヒトGCG受容体及びヒトGIP受容体遺伝子をそれぞれ発現するように形質転換されたものであり、GLP-1、GCG及びGIPの活性を測定するのに適している。よって、それぞれの形質転換細胞株を用いて各部分の活性を測定した。

【0242】

実施例1と2で製造した三重活性体とその持続型結合体のGLP-1活性の測定のために、ヒトGLP-1を50nMから0.000048nMまで4倍連続希釈し、実施例1及び2で製造した三重活性体とその持続型結合体を400nMから0.00038nMまで4倍連続希釈した。前記培養したヒトGLP-1受容体を発現するCHO細胞から培養液を除去し、連続希釈した各物質を5μlずつ前記細胞に添加し、次いでcAMP抗体を含む緩衝液を5μlずつ追加し、その後常温で15分間培養した。次に、細胞溶解緩衝液(cell lysis buffer)を含むdetection mixを10μlずつ加えて細胞を溶解させ、常温で90分間反応させた。前記反応が終了した細胞溶解物をLANCET cAMP kit(PerkinElmer、USA)に適用し、蓄積されたcAMPからEC₅₀値を算出し、相互比較した。ヒトGLP-1に対する相対力価を下記表3と表4に示す。

40

50

【0243】

前記実施例1と2で製造した三重活性体とその持続型結合体のGCG活性の測定のために、ヒトGCGを50nMから0.000048nMまで4倍連続希釈し、実施例1と2で製造した三重活性体とその持続型結合体を400nMから0.00038nMまで4倍連続希釈した。前記培養したヒトGCG受容体を発現するCHO細胞から培養液を除去し、連続希釈した各物質を5μlずつ前記細胞に添加し、次いでcAMP抗体を含む緩衝液を5μlずつ追加し、その後常温で15分間培養した。次に、細胞溶解緩衝液 (cell l y s i s b u f f e r) を含むd e t e c t i o n m i xを10μlずつ加えて細胞を溶解させ、常温で90分間反応させた。前記反応が終了した細胞溶解物をL A N C E c A M P k i t (P e r k i n E l m e r、U S A) に適用し、蓄積されたcAMPからEC₅₀値を算出し、相互比較した。ヒトGCGに対する相対力価を下記表3と表4に示す。

10

【0244】

前記実施例1と2で製造した三重活性体とその持続型結合体のGIP活性の測定のために、ヒトGIPを50nMから0.000048nMまで4倍連続希釈し、実施例1と2で製造した三重活性体とその持続型結合体を400nMから0.00038nMまで4倍連続希釈した。前記培養したヒトGIP受容体を発現するCHO細胞から培養液を除去し、連続希釈した各物質を5μlずつ前記細胞に添加し、次いでcAMP抗体を含む緩衝液を5μlずつ追加し、その後常温で15分間培養した。次に、細胞溶解緩衝液 (c e l l l y s i s b u f f e r) を含むd e t e c t i o n m i xを10μlずつ加えて細胞を溶解させ、常温で90分間反応させた。前記反応が終了した細胞溶解物をL A N C E c A M P k i t (P e r k i n E l m e r、U S A) に適用し、蓄積されたcAMPからEC₅₀値を算出し、相互比較した。ヒトGIPに対する相対力価を下記表3と表4に示す。

20

【0245】

30

40

50

【表 3】

三重活性体の相対力価比

	天然ペプチドと比較したin vitro活性(%)		
配列番号	vs GLP-1	vs Glucagon	vs GIP
1	3.2	<0.1	<0.1
2	5.9	<0.1	<0.1
3	1.8	<0.1	<0.1
4	8.5	<0.1	<0.1
5	42.1	<0.1	<0.1
6	17.0	<0.1	<0.1
7	13.7	<0.1	<0.1
8	14.2	0.10	<0.1
9	32.1	0.13	<0.1
10	46.0	<0.1	<0.1
11	1.4	<0.1	<0.1
12	0.4	<0.1	<0.1
13	< 0.1	< 0.1	< 0.1
14	28.0	< 0.1	< 0.1
15	79.2	<0.1	<0.1
16	2.1	< 0.1	< 0.1
17	0.2	< 0.1	< 0.1
18	<0.1	<0.1	<0.1
19	<0.1	<0.1	<0.1
20	<0.1	<0.1	<0.1
21	17.8	267	22.7
22	20.1	140	59.7
23	4.01	9.3	<0.1
24	41.2	9.3	< 0.1
25	82.6	0.1	<0.1
26	64.5	0.2	<0.1
27	83.1	0.8	0.9

10

20

30

40

50

28	17.2	1.6	<0.1
29	38.5	6.0	<0.1
30	142	0.7	0.8
31	135	2.2	2.4
32	151	1.7	8.8
33	24.5	<0.1	10.4
34	19.1	0.92	0.6
35	7.5	<0.1	1.3
36	37.4	0.39	0.2
37	236	6.21	2.2
38	2.3	-	-
39	13.9	0.53	<0.1
40	75.2	<0.1	<0.1
41	34.3	<0.1	<0.1
42	33.9	205.8	7.8
43	12.6	88.4	3.70
44	1.3	<0.1	<0.1
45	6.6	< 0.1	< 0.1
46	1.4	< 0.1	< 0.1
47	2.4	< 0.1	< 0.1
48	1.5	< 0.1	< 0.1
49	29.8	<0.1	3.3
50	67.4	50.5	2.7
51	14.4	2.0	0.1
52	44.1	7.5	0.3
53	161	8.4	1.3
54	30.6	1.4	0.1
55	27.1	0.7	2.4
56	57.9	4.9	0.8
57	11.7	<0.1	0.3
58	39.1	2.6	0.2
59	40.3	<0.1	4.0
60	106.2	<0.1	8.2
61	59.8	<0.1	2.8
62	5.2	<0.1	<0.1

10

20

30

40

50

63	15.3	<0.1	<0.1
64	64.6	60.1	92.9
65	95.4	25.2	11.6
66	15.8	172	17.2
67	28.5	46.2	39.8
68	27.9	8.8	107
69	24.3	9.6	62.8
70	15.1	71.3	64.4
71	90.1	12.7	94.7
72	11.5	1.0	1.6
73	22.6	5.4	3.0
74	12.9	0.9	1.0
75	35.1	8.5	18.0
76	10.3	47.6	11.7
77	38.7	12.2	35.5
78	51.0	14.0	0.12
79	41.5	4.9	1.4
80	8.1	0.0	0.1
81	7.8	0.3	<0.1
82	9.5	1.1	<0.1
83	47.3	1.3	0.4
84	4.2	<0.1	<0.1
85	4.3	<0.1	0.3
86	28.4	0.4	0.2
87	0.9	<0.1	<0.1
88	9.6	0.3	<0.1
89	7.1	0.7	<0.1
90	7.4	<0.1	<0.1
91	31.9	16.8	0.3
92	0.8	<0.1	0.4
93	5.7	0.3	0.7
94	0.5	<0.1	<0.1
95	2.1	0.4	<0.1
96	34.4	194.8	5.2
97	10.5	62.8	2.6

98	28.1	8.2	47.1
99	20.9	14.9	57.7
100	42.2	12.7	118.5
101	23.2	13.9	40.1
102	23.3	29.5	58.0

【0246】

【表4】

三重活性体持続型結合体の相対力価比

持続型結合体	天然ペプチドと比較したin vitro活性(%)		
	vs GLP-1	vs Glucagon	vs GIP
21	0.1	1.6	0.2
22	0.1	0.9	0.5
42	3.1	23.1	1.2
43	2.1	13.5	0.6
50	15.4	6.9	0.7
77	6.7	1.7	6.6
96	0.3	4.0	0.3

10

【0247】

前記表4は三重活性体持続型結合体の相対力価比を確認した表であり、前記で製造した新規な三重活性体持続型結合体は、GLP-1受容体、GIP受容体及びグルカゴン受容体を全て活性化することができる三重活性体として機能を有することを確認した。

20

【0248】

実験例2：三重活性体持続型結合体の高脂血症治療効果の確認(In vivo)

Golden syrian hamster (以下、高脂血症ハムスター)に2週間Fructose食餌摂取を行い、高脂血症モデルを誘導した。実施例1で製造された三重結合体から配列番号42を選定し、配列番号42の持続型結合体(1.6、3.1nmol/kg、Q2D)を、高脂血症を誘導したハムスターに3週間皮下を通じて反復投与した。比較群としては、市販中の高脂血症治療剤であるevolocumab(219.2nmol/kg、QW)を使用し、高脂血症治療効果を確認した。

30

【0249】

図1に示すように、配列番号42の持続型結合体を3週間反復投与した場合、血中総コレステロール(50~60%減少)及びLDL(70~85%減少)が有意に減少したことを確認した反面、evolocumab投与群においては不足な効能を示した。

【0250】

実験例3：三重活性体持続型結合体の高脂血症治療効果の確認(In vitro)

HepG2 cellを利用してLDL吸収増加、3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase(HMGCR)活性抑制、及び脂肪酸分解促進効果の確認実験により、実施例2の三重活性体持続型結合体の優れた高脂血症治療効能作用機序(Mode of action)をin vitroで確認した。

40

【0251】

(1) 三重活性体持続型結合体によるLDL吸収増加

HepG2 cellに配列番号42の持続型結合体を処理していない対照群(control)と比較し、配列番号42の持続型結合体(0.01、0.1、1、10μM)及びevolocumab(10μg/mL)を48時間処理した後、BODIPY標識されたLDLの細胞内吸収量を確認し、その結果を図2に示した。

【0252】

図2に示すように、LDL吸収量が配列番号42の持続型結合体により濃度依存的(control対比132.7~354%)に増加することを確認した。

【0253】

50

(2) 三重活性体持続型結合体による3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR) 活性抑制

コレステロール合成律速酵素 (rate limiting enzyme) である3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (以下、HMGCR) の活性を測定するために、HepG2 cellに配列番号42の持続型結合体を処理していない対照群 (control) と比較して配列番号42の持続型結合体 (10 μM)、及びスタチン (1 μM) を処理した後、HMG-CoAを処理条件でNADPHの減少程度を測定し (HMGCRはNADPHを用いてHMG-CoAをコレステロール前駆体であるmilonateに転換する)、その結果を図3に示した。

【0254】

図3に示すように、配列番号42の持続型結合体がHMGCRの活性を持続的に抑制する (control対比約80%減少) ことを確認した。

【0255】

(3) 三重活性体持続型結合体による脂肪酸分解促進

脂肪酸分解の副産物であるケトン体 (ketone body) を測定した。このため、脂肪酸 (palmitate) を処理したHepG2 cellに配列番号42の持続型結合体を処理していない対照群 (control) と比較し、配列番号42の持続型結合体 (0.01、0.1、1、10 μM) 及びグルカゴン (2.5 μM) を処理した後、購入可能なケトン体測定kit (Sigma #MAK041) を用いて生成されたケトン体量を測定した。

【0256】

測定の結果、図4に示すように、ケトン体生成が配列番号42の持続型結合体濃度依存的に増加したことを確認した。

【0257】

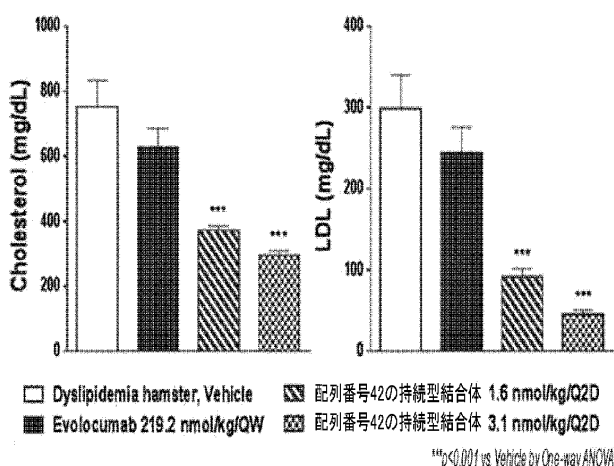
前記のような実験から本発明による三重活性体及びその持続型結合体は、LDL吸収増加、HMGCR活性抑制によるコレステロール合成阻害、及び脂肪酸分解促進を通じて血中中性脂肪及びLDLを減少させることにより、高脂血症に対する治療効果を示すことを確認した。

【0258】

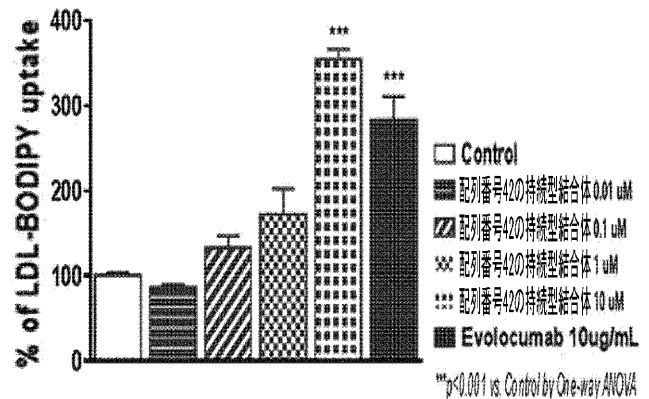
以上の説明から、本発明の属する技術分野の当業者であれば、本発明がその技術的思想や必須の特徴を変更することなく、他の具体的な形態で実施できることを理解するであろう。なお、前記実施例はあくまで例示的なものであり、限定的なものではないことを理解すべきである。本発明には、明細書ではなく請求の範囲の意味及び範囲とその等価概念から導かれるあらゆる変更や変形された形態が含まれるものと解釈すべきである。

【図面】

【図1】



【図2】



10

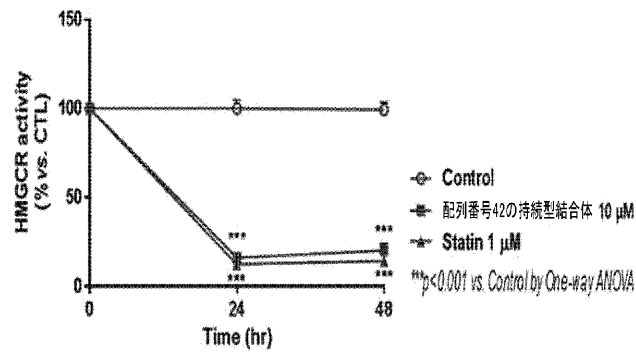
20

30

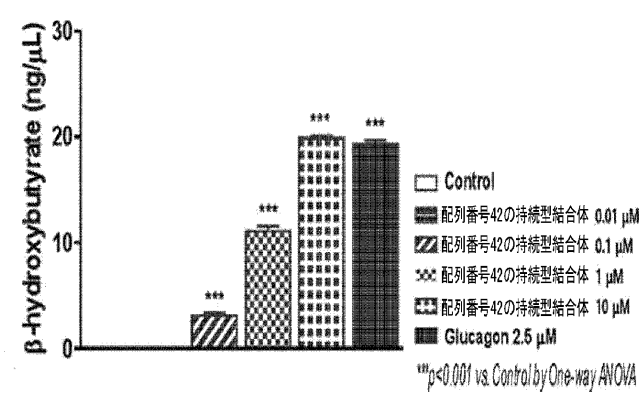
40

50

【 図 3 】



【 図 4 】



【 配列表 】

2023521491000001.app

10

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/004961

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K 38/17(2006.01); A61K 38/26(2006.01); A61K 38/22(2006.01); A61K 47/68(2017.01); A61P 3/06(2006.01); C07K 14/605(2006.01); C07K 14/575(2006.01); C07K 14/72(2006.01) 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 38/17(2006.01); A61K 38/00(2006.01); A61K 38/22(2006.01); A61K 38/26(2006.01); A61K 38/28(2006.01); C07C 317/44(2006.01); C07K 14/575(2006.01); C07K 14/605(2006.01) 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) 글루카곤(glucagon), GLP-1 수용체(glucagon-like peptide-1 receptor), GIP 수용체(glucose-dependent insulintropic peptide receptor), 삼중 활성체(triple agonist), 펩타이드(peptide), 결합체(conjugation), 고지혈증(hyperlipidemia), 예방(prevention), 치료(treatment)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2017-0080522 A (HANMI PHARM. CO., LTD.) 10 July 2017 (2017-07-10) See claims 1, 4-15 and 18-24, paragraphs [0224]-[0225], [0573]-[0574] and [0598]-[0602], SEQ ID NOs: 1 to 102, and table 1.	1-12,15-19
A	US 2013-0203659 A1 (MIRANDA, L. P. et al.) 08 August 2013 (2013-08-08) See entire document.	1-12,15-19
A	KR 10-2015-0096398 A (SANOFI) 24 August 2015 (2015-08-24) See entire document.	1-12,15-19
A	KR 10-2019-0019030 A (DONG-A ST CO., LTD.) 26 February 2019 (2019-02-26) See entire document.	1-12,15-19
A	US 2010-0184641 A1 (DORWALD, F. Z. et al.) 22 July 2010 (2010-07-22) See entire document.	1-12,15-19
☐ 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 "D" document cited by the applicant in the international application "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 03 August 2021		Date of mailing of the international search report 04 August 2021
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/004961

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. ☒ forming part of the international application as filed:

☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

☐ on paper or in the form of an image file.

b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/004961

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.: **13-14**
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

30

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2021/004961

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2017-0080522	A	10 July 2017	CN	108699125	A	23 October 2018
				CN	109071624	A	21 December 2018
				EP	3398961	A1	07 November 2018
				EP	3398962	A1	07 November 2018
				JP	2019-504055	A	14 February 2019
				JP	2019-504057	A	14 February 2019
				JP	2020-128428	A	27 August 2020
				JP	2020-171287	A	22 October 2020
				JP	6712322	B2	17 June 2020
				JP	6712323	B2	17 June 2020
				KR	10-2017-0080521	A	10 July 2017
				KR	10-2019-0060749	A	03 June 2019
				KR	10-2019-0062344	A	05 June 2019
				KR	10-2019-0104958	A	11 September 2019
				KR	10-2019-0105542	A	17 September 2019
				KR	10-2020-0095436	A	10 August 2020
				KR	10-2020-0096184	A	11 August 2020
				KR	10-2179391	B1	16 November 2020
				KR	10-2179392	B1	16 November 2020
				US	10370426	B2	06 August 2019
				US	10400020	B2	03 September 2019
				US	10981967	B2	20 April 2021
				US	2018-0311315	A1	01 November 2018
				US	2019-0002520	A1	03 January 2019
				US	2019-0153060	A1	23 May 2019
				US	2019-0218269	A1	18 July 2019
				US	2021-0188937	A1	24 June 2021
				WO	2017-116204	A1	06 July 2017
				WO	2017-116205	A1	06 July 2017
US	2013-0203659	A1	08 August 2013	EP	2007804	A2	31 December 2008
				EP	2007804	B1	18 June 2014
				EP	2573111	A1	27 March 2013
				EP	2574624	A1	03 April 2013
				JP	2009-534423	A	24 September 2009
				JP	2012-116864	A	21 June 2012
				US	2010-0048468	A1	25 February 2010
				US	8288339	B2	16 October 2012
				WO	2007-124461	A2	01 November 2007
				WO	2007-124461	A3	05 June 2008
KR	10-2015-0096398	A	24 August 2015	CN	104870009	A	26 August 2015
				CN	104870009	B	18 May 2021
				CN	104902918	A	09 September 2015
				CN	104902919	A	09 September 2015
				CN	104902919	B	20 November 2018
				CN	104902920	A	09 September 2015
				EP	2934566	A1	28 October 2015
				EP	2934566	B1	21 June 2017
				EP	2934567	A1	28 October 2015
				EP	2934567	B1	09 May 2018
				EP	2934568	A1	28 October 2015

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2021/004961

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		EP 2934568 B1	18 October 2017
		EP 2934569 A1	28 October 2015
		EP 3400957 A1	14 November 2018
		JP 2016-503770 A	08 February 2016
		JP 2016-503771 A	08 February 2016
		JP 2016-503772 A	08 February 2016
		JP 2016-506401 A	03 March 2016
		JP 6391589 B2	19 September 2018
		JP 6408998 B2	17 October 2018
		KR 10-2015-0096433 A	24 August 2015
		KR 10-2015-0096684 A	25 August 2015
		KR 10-2015-0099548 A	31 August 2015
		US 10253079 B2	09 April 2019
		US 2014-0206608 A1	24 July 2014
		US 2014-0206609 A1	24 July 2014
		US 2014-0213513 A1	31 July 2014
		US 2014-0221281 A1	07 August 2014
		US 2017-0216406 A1	03 August 2017
		US 9670261 B2	06 June 2017
		US 9745360 B2	29 August 2017
		WO 2014-096145 A1	26 June 2014
		WO 2014-096148 A1	26 June 2014
		WO 2014-096149 A1	26 June 2014
		WO 2014-096150 A1	26 June 2014
KR 10-2019-0019030 A	26 February 2019	CN 111094331 A	01 May 2020
		EP 3670529 A1	24 June 2020
		JP 2020-531442 A	05 November 2020
		KR 10-2020-0037186 A	08 April 2020
		KR 10-2230368 B1	22 March 2021
		US 2020-0354425 A1	12 November 2020
US 2010-0184641 A1	22 July 2010	WO 2019-035672 A1	21 February 2019
		EP 1667724 A2	14 June 2006
		JP 2007-537981 A	27 December 2007
		KR 10-2020-0037186 A	08 April 2020
		KR 10-2230363 B1	22 March 2021
		US 2007-0105750 A1	10 May 2007
		US 7897560 B2	01 March 2011
		WO 2005-028516 A2	31 March 2005
		WO 2005-028516 A3	29 September 2005

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2019)

국제조사보고서

국제출원번호

PCT/KR2021/004961

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 38/17(2006.01)i; A61K 38/26(2006.01)i; A61K 38/22(2006.01)i; A61K 47/68(2017.01)i; A61P 3/06(2006.01)i; C07K 14/605(2006.01)i; C07K 14/575(2006.01)i; C07K 14/72(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 38/17(2006.01); A61K 38/00(2006.01); A61K 38/22(2006.01); A61K 38/26(2006.01); A61K 38/28(2006.01); C07K 31/74(2006.01); C07K 14/575(2006.01); C07K 14/605(2006.01) 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)) 글루카곤(glucagon), GLP-1 수용체(glucagon-like peptide-1 receptor), GIP 수용체(glucose-dependent insulintropic peptide receptor), 삼중 활성제(triple agonist), 펩타이드(peptide), 결합체(conjugation), 고지혈증(hyperlipidemia), 예방(prevention), 치료(treatment)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2017-0080522 A (한미약품 주식회사) 2017.07.10 청구항 1, 4-15, 18-24, 단락 [0224]-[0225], [0573]-[0574], [0598]-[0602], 서열번호 1 내지 102, 표1	1-12,15-19
A	US 2013-0203659 A1 (MIRANDA, L. P. 등) 2013.08.08 전체 문헌	1-12,15-19
A	KR 10-2015-0096398 A (사노피) 2015.08.24 전체 문헌	1-12,15-19
A	KR 10-2019-0019030 A (동아에스티 주식회사) 2019.02.26 전체 문헌	1-12,15-19
A	US 2010-0184641 A1 (DORWALD, F. Z. 등) 2010.07.22 전체 문헌	1-12,15-19
☐ 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 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 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 2021년08월03일(03.08.2021)		국제조사보고서 발송일 2021년08월04일(04.08.2021)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (문산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 정다원 전화번호 +82-42-481-5373

서식 PCT/ISA/210 (두 번째 용지) (2019년 7월)

10

20

30

40

50

국제조사보고서

국제출원번호

PCT/KR2021/004961

제1기제관 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

a. ☒ 아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록

☒ 부록 C/ST.25 텍스트 파일

☐ 서면 혹은 이미지 파일

b. ☐ PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록

c. ☐ 국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록

☐ 부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))

☐ 서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713).

2. ☐ 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시 출원의 일부를 구성하는 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

국제조사보고서

국제출원번호

PCT/KR2021/004961

제2기제란 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:
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☒ 청구항: **13-14**
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

10

20

30

40

50

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호

PCT/KR2021/004961

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2017-0080522 A	2017/07/10	CN 108699125 A	2018/10/23
		CN 109071624 A	2018/12/21
		EP 3398961 A1	2018/11/07
		EP 3398962 A1	2018/11/07
		JP 2019-504055 A	2019/02/14
		JP 2019-504057 A	2019/02/14
		JP 2020-128428 A	2020/08/27
		JP 2020-171287 A	2020/10/22
		JP 6712322 B2	2020/06/17
		JP 6712323 B2	2020/06/17
		KR 10-2017-0080521 A	2017/07/10
		KR 10-2019-0060749 A	2019/06/03
		KR 10-2019-0062344 A	2019/06/05
		KR 10-2019-0104958 A	2019/09/11
		KR 10-2019-0105542 A	2019/09/17
		KR 10-2020-0095436 A	2020/08/10
		KR 10-2020-0096184 A	2020/08/11
		KR 10-2179391 B1	2020/11/16
		KR 10-2179392 B1	2020/11/16
		US 10370426 B2	2019/08/06
		US 10400020 B2	2019/09/03
		US 10981967 B2	2021/04/20
		US 2018-0311315 A1	2018/11/01
		US 2019-0002520 A1	2019/01/03
		US 2019-0153060 A1	2019/05/23
		US 2019-0218269 A1	2019/07/18
		US 2021-0188937 A1	2021/06/24
		WO 2017-116204 A1	2017/07/06
		WO 2017-116205 A1	2017/07/06
US 2013-0203659 A1	2013/08/08	EP 2007804 A2	2008/12/31
		EP 2007804 B1	2014/06/18
		EP 2573111 A1	2013/03/27
		EP 2574624 A1	2013/04/03
		JP 2009-534423 A	2009/09/24
		JP 2012-116864 A	2012/06/21
		US 2010-0048468 A1	2010/02/25
		US 8288339 B2	2012/10/16
		WO 2007-124461 A2	2007/11/01
		WO 2007-124461 A3	2008/06/05
KR 10-2015-0096398 A	2015/08/24	CN 104870009 A	2015/08/26
		CN 104870009 B	2021/05/18
		CN 104902918 A	2015/09/09
		CN 104902919 A	2015/09/09
		CN 104902919 B	2018/11/20
		CN 104902920 A	2015/09/09
		EP 2934566 A1	2015/10/28
		EP 2934566 B1	2017/06/21
		EP 2934567 A1	2015/10/28
		EP 2934567 B1	2018/05/09
		EP 2934568 A1	2015/10/28

서식 PCT/ISA/210 (대응특허 추가용지) (2019년 7월)

10

20

30

40

50

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호

PCT/KR2021/004961

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		EP 2934568 B1	2017/10/18
		EP 2934569 A1	2015/10/28
		EP 3400957 A1	2018/11/14
		JP 2016-503770 A	2016/02/08
		JP 2016-503771 A	2016/02/08
		JP 2016-503772 A	2016/02/08
		JP 2016-506401 A	2016/03/03
		JP 6391589 B2	2018/09/19
		JP 6408998 B2	2018/10/17
		KR 10-2015-0096433 A	2015/08/24
		KR 10-2015-0096684 A	2015/08/25
		KR 10-2015-0099548 A	2015/08/31
		US 10253079 B2	2019/04/09
		US 2014-0206608 A1	2014/07/24
		US 2014-0206609 A1	2014/07/24
		US 2014-0213513 A1	2014/07/31
		US 2014-0221281 A1	2014/08/07
		US 2017-0216406 A1	2017/08/03
		US 9670261 B2	2017/06/06
		US 9745360 B2	2017/08/29
		WO 2014-096145 A1	2014/06/26
		WO 2014-096148 A1	2014/06/26
		WO 2014-096149 A1	2014/06/26
		WO 2014-096150 A1	2014/06/26
KR 10-2019-0019030 A	2019/02/26	CN 111094331 A	2020/05/01
		EP 3670529 A1	2020/06/24
		JP 2020-531442 A	2020/11/05
		KR 10-2020-0037186 A	2020/04/08
		KR 10-2230368 B1	2021/03/22
		US 2020-0354425 A1	2020/11/12
		WO 2019-035672 A1	2019/02/21
US 2010-0184641 A1	2010/07/22	EP 1667724 A2	2006/06/14
		JP 2007-537981 A	2007/12/27
		KR 10-2020-0037186 A	2020/04/08
		KR 10-2230363 B1	2021/03/22
		US 2007-0105750 A1	2007/05/10
		US 7897560 B2	2011/03/01
		WO 2005-028516 A2	2005/03/31
		WO 2005-028516 A3	2005/09/29

서식 PCT/ISA/210 (대응특허 추가용지) (2019년 7월)

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 0 7 K 16/00 (2006.01)

F I

C 0 7 K 14/605
C 0 7 K 16/00

テーマコード (参考)

Z N A

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,N
E,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,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,K
E,KG,KH,KN,KP,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,N
I,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,
TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

弁理士 市川 さつき

(74)代理人 100111796

弁理士 服部 博信

(74)代理人 100123766

弁理士 松田 七重

(72)発明者 チョ ヒョ サン

大韓民国 1 8 4 6 9 キョンギード ファソナーシ ドンタンギフナー口 5 5 0

(72)発明者 キム ジュン クク

大韓民国 1 8 4 6 9 キョンギード ファソナーシ ドンタンギフナー口 5 5 0

(72)発明者 リ ア ラム

大韓民国 1 8 4 6 9 キョンギード ファソナーシ ドンタンギフナー口 5 5 0

(72)発明者 キム サン ユン

大韓民国 1 8 4 6 9 キョンギード ファソナーシ ドンタンギフナー口 5 5 0

F ターム (参考) 4C076 CC21 CC41 EE23 EE59 FF31

4C084 AA02 BA01 BA19 CA59 NA12 NA14 ZC33

4C085 AA25 BB11 CC22 EE01

4H045 AA10 AA11 AA30 BA18 BA19 BA40 BA57 CA40 DA30 DA76

EA20 FA10 GA45