

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2012 年 11 月 15 日(15.11.2012)



(10) 国際公開番号
WO 2012/153620 A1

(51) 国際特許分類:

<i>C12N 15/09</i> (2006.01)	<i>A61P 29/00</i> (2006.01)
<i>A23L 1/305</i> (2006.01)	<i>A61P 35/00</i> (2006.01)
<i>A61K 38/22</i> (2006.01)	<i>A61P 43/00</i> (2006.01)
<i>A61K 38/26</i> (2006.01)	<i>C07K 14/605</i> (2006.01)
<i>A61K 39/395</i> (2006.01)	<i>C07K 14/775</i> (2006.01)
<i>A61K 47/48</i> (2006.01)	<i>C07K 19/00</i> (2006.01)
<i>A61P 1/16</i> (2006.01)	<i>C12N 1/15</i> (2006.01)
<i>A61P 1/18</i> (2006.01)	<i>C12N 1/19</i> (2006.01)
<i>A61P 3/08</i> (2006.01)	<i>C12N 1/21</i> (2006.01)
<i>A61P 3/10</i> (2006.01)	<i>C12N 5/10</i> (2006.01)
<i>A61P 7/06</i> (2006.01)	

(21) 国際出願番号: PCT/JP2012/060688

(22) 国際出願日: 2012 年 4 月 20 日(20.04.2012)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

特願 2011-105093	2011 年 5 月 10 日(10.05.2011)	JP
特願 2011-240593	2011 年 11 月 1 日(01.11.2011)	JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 積水化学工業株式会社 (SEKISUI CHEMICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒5308565 大阪府大阪市北区西天満 2 丁目 4 番 4 号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 古谷 昌弘 (FURUTANI Masahiro) [JP/JP]; 〒3004292 茨城県つくば市和台 3 2 積水化学工業株式会社内 Ibaraki (JP). 西口 直樹(NISHIGUCHI Naoki) [JP/JP]; 〒3004292 茨城県つくば市和台 3 2 積水化学工業株式会社内 Ibaraki (JP). 山本 一喜 (YAMAMOTO Kazuki) [JP/JP]; 〒6018105 京都府京都市南区上鳥羽上調子町 2-2 株式会社積水インテグレートリサーチ内 Kyoto (JP).

(74) 代理人: 藤田 隆, 外(FUJITA Takashi et al.); 〒5300044 大阪府大阪市北区東天満 2 丁目 1 0 番 1 9 号 マークベストビル 3 階 Osaka (JP).

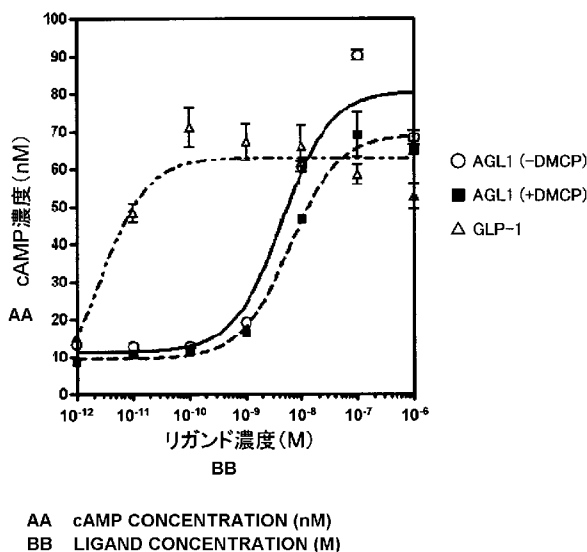
(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[続葉有]

(54) Title: DRUG, FUNCTIONAL FOOD, METHOD FOR STABILIZING TARGET PROTEIN, FUSED PROTEIN, NUCLEIC ACID, AND RECOMBINANT

(54) 発明の名称: 医薬、機能性食品、目的蛋白質の安定化方法、融合蛋白質、核酸、並びに、組換え体

[図3]



(57) Abstract: The present invention specifies a novel protein carrier for a peptide for therapeutic use and provides a series of techniques using the aforesaid carrier. Provided is a drug comprising a fused protein wherein apolipoprotein AI or a modification thereof is bonded via a peptide bond to a peptide for therapeutic use, said peptide for therapeutic use being the active ingredient. The drug according to the present invention has a long half-life in blood, shows little possibility of antibody production and can be orally or transmucosally administered. The aforesaid modification may be a partial fragment of apolipoprotein AI, a polypeptide containing 1 to 6 amphipathic sequences, an amino acid variant, a mimic peptide or the like. As an example of the peptide for therapeutic use, glucagon-like peptide-1 (GLP-1) can be cited. Also provided is a drug wherein a lipid is further bonded to the aforesaid fused protein to form a protein-lipid complex.

(57) 要約: 治療用ペプチドに対する新規の蛋白性キャリアを特定し、当該キャリアを用いた一連の技術を提供する。アポリポ蛋白質 A I 又はその改変体と、有効成分となる治療用ペプチドとが、ペプチド結合を介して連結してなる融合蛋白質、を含有する医薬が提供される。本発明の医薬は、血中半減期が長く、また抗体産生の可能性が低く、かつ経口投与や経粘膜投与が可能である。前記改変体は、アポリポ蛋白質 A I の部分断片、両親媒性配列を 1~6 個含むポリペプチド、アミノ

酸変異体、模倣ペプチド、等であり得る。治療用ペプチドの例として、グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) が挙げられる。当該融合蛋白質に脂質がさらに結合し、蛋白質・脂質複合体を形成している医薬も提供される。



(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

明 細 書

発明の名称：

医薬、機能性食品、目的蛋白質の安定化方法、融合蛋白質、核酸、並びに、組換え体

技術分野

[0001] 本発明は、アポリポ蛋白質AⅠ（A p o AⅠ）又はその改変体と治療用ペプチドとが連結されてなる融合蛋白質を含有する医薬等に関する。また本発明は、当該融合蛋白質の用途等に関する。

背景技術

[0002] グルカゴン様ペプチド-1（G L P-1）、エリスロポエチン（E p o）、ヒト成長ホルモン（h G H）、顆粒球コロニー刺激因子（G-C S F）、インターフェロン等の生理活性ペプチドは、一般的に、天然アミノ酸配列のままでは血中での安定性は低く、その半減期は数分～数時間以内である。また抗体工学の手法で作製できるs c F v（single chain Fv）やF a b断片も、その半減期は数分から数時間と、上記のような生理活性ペプチドと同様に短い。これらの血中安定化を行う目的で、アミノ酸置換、化学修飾、P E G（Polyethylene glycol）化、徐放性マイクロカプセル化、さらには遺伝子組換え技術による安定化ペプチドとの融合化、といった試みがなされてきた（非特許文献1）。

[0003] 安定化ペプチドとしてこれまでに、血漿蛋白である血清アルブミン、抗体重鎖定常領域（F c）、及びトランスフェリン（T f）が、幾つかのペプチド医薬に利用されてきた（非特許文献2，3，4）。これらは、その血中濃度が1～50mg/mLと血中に高濃度で存在し、また動物個体での免疫寛容が成立している（余分に投与してもこれらに対する抗体はできない）と考えられるので、安全かつ安定なキャリアとして期待されている。特に注目すべきは、遺伝子組換え血清アルブミンとグルカゴン様ペプチド-1（G L P-1）との融合蛋白質（r H S A/G L P-1）である。現在実用化されてい

るGLP-1アナログ薬は1日あたり1～2回の投薬が必要であるのに対し、rHSA/GLP-1は週に1回の投薬で血糖コントロールが可能とされている（非特許文献5）。

[0004] さらに、FcやTfに対する取込み受容体が腸粘膜や肺に存在することが知られており、これらとペプチド医薬との融合蛋白質を、経口投与用や経粘膜投与用の医薬として利用する試みもなされて来ている（非特許文献6，7）。現在のところ、ほとんど全ての治療用ペプチドは、注射による投与経路しか実用化されておらず、治療用ペプチドの経口投与や経肺等の経粘膜投与を実現することは、患者のQOL（Quality of Life）及び医療経済の面で極めて重要である。なお、血清アルブミンでは効率的な取込み受容体が粘膜に存在しないことから、経口投与や経粘膜投与への応用は困難と考えられる。

[0005] 一方、以上のような血漿蛋白と治療用ペプチドとの融合蛋白質を利用する上での安全面での重要な要素は、治療用ペプチドに対する抗体産生の問題である。すなわち、医薬として利用され得る天然由来の生理活性ペプチドは、天然では極めて微量で作用し、また半減期も短い。このことから、これらに対する動物個体の免疫寛容が成立していない可能性がある。そのため、生理活性ペプチドの完全な天然型のアミノ酸配列を利用したとしても、血中滞留時間の長い融合蛋白質がマクロファージ等の抗原提示細胞へ取り込まれた場合、生理活性ペプチド断片が抗原提示され、免疫が誘起される可能性がある。通常、ペプチド医薬は、長い年月に渡って繰り返し投与されるため、生理活性ペプチドに対する免疫誘起の可能性は、安全性、薬効の両面における重大な負の要素である。

[0006] FcやTfに対する取込み受容体は、マクロファージ、樹状細胞といった抗原提示細胞に存在する（非特許文献8，9）。抗体医薬の分野において、ヒト型モノクローナル抗体医薬の超可変領域に対する抗体産生が問題となっている（非特許文献10，11）。実際、モノクローナル抗体医薬のみならず、Fc融合蛋白質の免疫応答においても治療ペプチド部分に対する抗体産生（Human Anti-Drug Antibodies；HADA）の可能性が指摘されている（

非特許文献12)。これらのことから、従来技術であるFc融合蛋白質やTf融合蛋白質においても、治療用ペプチド部分に対する抗体産生の可能性は無視できない。また、粘膜近傍にも抗原提示細胞は多数存在するので、経口投与用医薬や経粘膜投与用医薬においても、この問題は安全上重要な課題である。

[0007] また、上記のように、ペプチド医薬は長い年月に渡って繰り返し投与されることが多いので、安価に製造できるものであることが好ましい。ここで、例えばFc融合蛋白質において、血中での安定化のためにはFc領域に糖鎖が必要である。しかし、生体に安全上問題のない糖鎖構造をFc領域に付加させるには、現在のところ、CHO細胞等の動物細胞を用いて製造する必要があり、これは高価である。

なおrHSA/GLP-1は、現在酵母で生産されており、動物細胞を用いる場合に比べて安価に製造が可能である。しかしながら、組換え蛋白質の生産効率には、蛋白質の分子サイズも影響する。ここで、血清アルブミンの分子量は約66000、Tfの分子量は約78000であり、いずれも分子サイズが大きく、これらの使用は遺伝子組換え技術による生産に有利とはいえない。

先行技術文献

非特許文献

- [0008] 非特許文献1: John M. et al., Drug discovery today (2006) 3(1), 87-94
非特許文献2: Rustgi VK, Curr. Med. Res. Opin. (2009) 25(4), 991-1002
非特許文献3: Sathyanarayana P. et al., Blood (2009) 113, 4955-4962
非特許文献4: Kim BJ et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. (2010) 334(3), 682-692
非特許文献5: Christensen M. et al., Curr. Diab. Rep. (2010) 10(2), 124-132
非特許文献6: Bitoni AJ et al., PNAS (2004) 101(26), 9763-9768
非特許文献7: Bay Y. et al., PNAS (2005) 102(20), 7292-7296

非特許文献8 : Pasquier B. et al., J. Leukocyte Biology (2004) 76, 1134-1141

非特許文献9 : Nishisato T. et al., Br. J. Haematol (1982) 52(4), 631-640

非特許文献10 : Harding FA et al., MAbs (2010) 2(3), 256-265

非特許文献11 : Gonzales NR et al., Tumour Biol. (2005) 26(1), 31-43

非特許文献12 : Niebecker R et al., Curr. Drug Saf. (2010) 5(4), 275-286

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 以上のように、医薬ペプチド（治療用ペプチド）の蛋白キャリアによる血中安定化、及び経口投与用医薬や経粘膜投与用医薬への応用において、

（１）免疫寛容が成立している、

（２）抗原提示細胞での取込受容体が存在しない、

（３）分子サイズが小さく大腸菌や酵母で生産可能、

さらには、

（４）粘膜上に効率的な取込み機構が存在し、経口投与や経粘膜投与に応用できる、

などの要素を満たす蛋白性キャリアの利用が期待される。しかしながら、上述した血清アルブミン、抗体Fc、トランスフェリン以外のキャリア分子の利用については、これまであまり検討されておらず、さらに優れたキャリア分子が求められている。

[0010] 上記した現状に鑑み、本発明は、治療用ペプチドに対する新規の蛋白性キャリアを特定し、当該キャリアを用いた一連の技術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

[0011] 本発明者らは上記課題を解決するために検討を重ねた結果、アポリポ蛋白質AⅠ（ApoAⅠ）をキャリア蛋白質として採用し、ApoAⅠと治療用

ペプチドとを連結した融合蛋白質を用いることにより、上記課題を解決できることを見出した。上記課題を解決するために提供される本発明は、以下のとおりである。

[0012] 本発明の1つの様相は、アポリポ蛋白質AⅠ又はその改変体と、有効成分となる治療用ペプチドとが、ペプチド結合を介して連結してなる融合蛋白質、を含有する医薬である。

[0013] ここで「治療用ペプチド」とは、医薬の有効成分として機能するペプチドを指す。したがって、治療用ペプチドには、投与後の組織指向性のみに関与するものや、有効成分の安定化のみに関与するものは含まれない。

[0014] ここでアポリポ蛋白質AⅠの「改変体」とは、アポリポ蛋白質AⅠに類似の蛋白質であり、アポリポ蛋白質AⅠとしての機能を保持しているものを指す。アポリポ蛋白質AⅠとしての機能を保持している限り、当該改変体には、少なくとも以下の蛋白質・ポリペプチドが含まれる。

- ・アポリポ蛋白質AⅠの部分断片、
- ・アポリポ蛋白質AⅠの機能ドメインを有する蛋白質・ポリペプチド、
- ・アポリポ蛋白質AⅠの1次構造において数個～十数個程度（例えば、1～20個）のアミノ酸残基が欠失、置換若しくは付加された蛋白質・ポリペプチド（アミノ酸変異体）。

[0015] 好ましくは、前記改変体は、アポリポ蛋白質AⅠの部分断片である。

[0016] 好ましくは、前記改変体は、アポリポ蛋白質AⅠの両親媒性配列を1～6個含むポリペプチドである。

[0017] 好ましくは、前記改変体は、アポリポ蛋白質AⅠの全長又は部分断片のアミノ酸変異体である。

[0018] 好ましくは、前記改変体は、アポリポ蛋白質AⅠの模倣ペプチドである。

[0019] 好ましくは、前記改変体は、キュービリン結合性が低下又は欠失したものである。

[0020] 好ましくは、前記アポリポ蛋白質AⅠは、ヒト由来のものである。

[0021] 好ましくは、前記治療用ペプチドは、細胞表層受容体に対するアゴニスト

である。

[0022] 好ましくは、前記治療用ペプチドは、血糖をコントロールする機能を有するものである。

[0023] 好ましくは、前記治療用ペプチドは、インスリン抵抗性改善機能を有するものである。

[0024] 好ましくは、前記治療用ペプチドは、グルカゴン様ペプチド-1 活性を有するポリペプチドである。

[0025] 好ましくは、前記治療用ペプチドは、エリスロポエチン活性を有するポリペプチドである。

[0026] 好ましくは、前記治療用ペプチドは、サイトカイン又はケモカインに対する可溶性受容体である。

[0027] 好ましくは、前記治療用ペプチドは、免疫グロブリンのVH領域とVL領域のいずれか一方又は両方を含むポリペプチドである。

[0028] 好ましくは、前記融合蛋白質には、前記治療用ペプチドに対する分解酵素の阻害剤がさらに連結されている。

[0029] 好ましくは、前記分解酵素は、ジペプチジルペプチダーゼI Vである。

[0030] 好ましくは、前記融合蛋白質には、第2の治療成分がさらに連結されている。

[0031] 好ましくは、前記治療用ペプチドが血糖をコントロールする機能を有するもの又はグルカゴン様ペプチド-1 受容体アゴニストであり、前記第2の治療成分が膵臓疾患治療薬又は肝臓疾患治療薬である。

[0032] 好ましくは、前記第2の治療成分は、炎症抑制剤、抗癌剤、又は肝硬変治療薬である。

[0033] 好ましくは、前記アポリポ蛋白質A I 又はその改変体と治療用ペプチドとの間に、リンカーが介在している。

[0034] 好ましくは、前記融合蛋白質に脂質がさらに結合し、蛋白質・脂質複合体を形成している。

[0035] 好ましくは、前記蛋白質・脂質複合体は、前記治療用ペプチドに対する分

解酵素の阻害剤をさらに含んでいる。

[0036] 好ましくは、前記蛋白質・脂質複合体は、第2の治療成分をさらに含んでいる。

[0037] 好ましくは、前記治療用ペプチドが血糖をコントロールする機能を有するもの又はグルカゴン様ペプチド-1受容体アゴニストであり、前記第2の治療成分が膵臓疾患治療薬又は肝臓疾患治療薬である。

[0038] 好ましくは、前記第2の治療成分は、炎症抑制剤、抗癌剤、又は肝硬変治療薬である。

[0039] 上記医薬は、経口投与用又は経粘膜投与用であることが好ましい。

[0040] 本発明の他の様相は、上記で定義された融合蛋白質又は上記で定義された蛋白質・脂質複合体、を含有する機能性食品である。

[0041] 本発明の他の様相は、上記で定義された融合蛋白質を発現する組換え体を有効成分として含有する医薬又は機能性食品である。

[0042] 好ましくは、前記組換え体は、前記融合蛋白質を表層に提示可能な微生物又は細胞である。

[0043] 好ましくは、前記微生物は、酵母である。

[0044] 本発明の他の様相は、目的蛋白質に対して、アポリポ蛋白質AⅠ又はその改変体を連結する目的蛋白質の安定化方法である。

[0045] 好ましくは、前記改変体は、アポリポ蛋白質AⅠの部分断片である。

[0046] 好ましくは、前記改変体は、アポリポ蛋白質AⅠの両親媒性配列を1～6個含むポリペプチドである。

[0047] 好ましくは、前記改変体は、アポリポ蛋白質AⅠの全長又は部分断片のアミノ酸変異体である。

[0048] 好ましくは、前記改変体は、アポリポ蛋白質AⅠの模倣ペプチドである。

[0049] 本発明の他の様相は、アポリポ蛋白質AⅠ又はその改変体と、グルカゴン様ペプチド-1活性を有するポリペプチドとが、ペプチド結合を介して連結してなる融合蛋白質である。

[0050] 本発明の他の様相は、前記融合蛋白質をコードする核酸である。

- [0051] 本発明の他の様相は、前記核酸を有する組換え体である。
- [0052] 好ましくは、前記組換え体が、細菌、酵母、カビ、藻類、植物細胞、昆虫細胞、動物細胞、植物、又は動物である。
- [0053] 好ましくは、組換え体が酵母であり、前記融合蛋白質を表層に提示可能である。
- [0054] 本発明の他の様相は、有効量の、上記で定義された融合蛋白質又は上記で定義された蛋白質・脂質複合体を投与する、疾病の治療方法である。
- [0055] 本発明の他の様相は、疾病治療用の、上記で定義された融合蛋白質又は上記で定義された蛋白質・脂質複合体である。
- [0056] 本発明の他の様相は、上記で定義された融合蛋白質又は上記で定義された蛋白質・脂質複合体の、疾病の治療薬製造のための使用である。
- [0057] 本発明の他の様相は、治療用ペプチドにペプチド結合を介して連結されたアポリポ蛋白質 A I 又はその改変体の、治療用ペプチドに対するキャリアとしての使用である。

発明の効果

- [0058] 本発明の医薬は、体内安定性が高く、かつ粘膜透過性に優れている。さらに、治療用ペプチドに対する抗体産生の可能性が低いので、生体に対する安全性が高い。さらに、有効成分である融合蛋白質の分子サイズが小さいので、遺伝子組換え技術による生産に有利である。さらに、経口投与が可能であるので、機能性食品としても利用できる。
- [0059] 本発明の目的蛋白質の安定化方法によれば、治療用ペプチド等の体内安定性を容易に高めることができる。
- [0060] 本発明の融合蛋白質によれば、体内安定性が高く、投与量及び投与頻度が少ない糖尿病治療薬を提供することができる。
- [0061] 本発明の核酸と組換え体によれば、本発明の融合蛋白質を容易に製造することができる。

図面の簡単な説明

- [0062] [図1] G L P - 1 / A p o A I 融合蛋白質の精製過程における S D S - P A G

Eの結果を表す写真である。

[図2] GLP-1 / ApoA I 融合蛋白質・脂質複合体の Native-PAGE の結果を表す写真である。

[図3] GLP-1 / ApoA I 融合蛋白質及び GLP-1 / ApoA I 融合蛋白質・脂質複合体の、GLP-1 受容体アゴニスト活性の測定結果を表すグラフである。

[図4] 既知の GLP-1 受容体アンタゴニストを用いた、GLP-1 受容体アゴニスト活性の測定結果を表すグラフである。

[図5] DDP IV で処理した天然型 GLP-1 の、GLP-1 受容体アゴニスト活性の測定結果を表すグラフである。

[図6] DDP IV で処理した GLP-1 / ApoA I 融合蛋白質の、GLP-1 受容体アゴニスト活性の測定結果を表すグラフである。

[図7] DDP IV で処理した GLP-1 / ApoA I 融合蛋白質・脂質複合体の、GLP-1 受容体アゴニスト活性の測定結果を表すグラフである。

[図8] マウスにおける血糖上昇抑制効果の試験結果を表すグラフである。

[図9] GLP-1 と ApoA I 部分断片との融合ペプチド (ACGL1) の精製過程における SDS-PAGE の結果を表す写真である。

[図10] GLP-1 と ApoA I 部分断片との融合ペプチド (ACGL1) の精製過程におけるウエスタンブロッティングの結果を表す写真である。

[図11] 脂質結合型 ACGL1 の Native-PAGE の結果を表す写真である。

[図12] 脂質非結合型 ACGL1 及び脂質結合型 ACGL1 の、GLP-1 受容体アゴニスト活性の測定結果を表すグラフである。

[図13] 既知の GLP-1 受容体アンタゴニストを用いた、GLP-1 受容体アゴニスト活性の測定結果を表すグラフである。

[図14] DDP IV で処理した天然型 GLP-1 と ACGL1 の、GLP-1 受容体アゴニスト活性の測定結果を表すグラフである。

[図15] DDP IV で処理した脂質結合型 ACGL1 の、GLP-1 受容体ア

ゴニスト活性の測定結果を表すグラフである。

発明を実施するための形態

[0063] 本発明は「アポリポ蛋白質AⅠ又はその改変体と、有効成分となる治療用ペプチドとが、ペプチド結合を介して連結してなる融合蛋白質」を主要な構成としている。以下、本発明の実施形態について、当該融合蛋白質の構成を中心として順次説明する。なお、本明細書においては特に断らない限り、蛋白質、ポリペプチド、及びペプチドという用語については厳密な区別をせず、同義の用語として用いる。

[0064] (アポリポ蛋白質AⅠ)

アポリポ蛋白質AⅠ (ApoAⅠ) は、小腸及び肝臓で合成され、通常、血中に1.2～1.7 mg/mLと高濃度で存在し、主に高比重リポ蛋白 (High Density Lipoprotein; HDL) 粒子の主要構成蛋白質として機能する。ヒト成熟型ApoAⅠは243アミノ酸残基 (配列番号1) から成り、その分子量は約28000である。また、その脂質複合体であるHDL粒子の直径は約7～10 nmである。最もコンパクトなHDL粒子は、脂質二重層にApoAⅠが二分子結合したディスク状構造を有する。

[0065] 血中でのHDLの主な機能は、末梢細胞の表層の受容体と結合することで、細胞内に蓄積したコレステロールを引き抜き、これを肝臓へ運び、コレステロール排出を行うことである。腎臓では、ApoAⅠは糸球体で濾過された後、キュビリン (Cubilin) と呼ばれる受容体との結合を介して腎臓近位曲尿細管 (Renal proximal convoluted tubule) の上皮細胞へ侵入し、代謝される。ApoAⅠの体内半減期は約4日である。ApoAⅠ及びHDLのキュビリンに対する親和性は極めて高い (Kozyraki R. et al., Nat. Med. (1999) 5(6), 656-661)。

[0066] また、HDL粒子の細胞透過には、その受容体であるSR-B1 (Scavenger receptor B1) やABCA1 (ATP-binding cassette transporter A1)、及びABCG1 (ATP-binding cassette transporter G1) が関与していると考えられている (Rohrer L. et al., Nat. Med. (2009) 104, 1142-1150)。

[0067] (アポリポ蛋白質 A I の改変体)

本発明における融合蛋白質は、「アポリポ蛋白質 A I 又はその改変体」を含んでいる。ここで、上述したように、アポリポ蛋白質 A I の「改変体」とは、アポリポ蛋白質 A I に類似の蛋白質であり、アポリポ蛋白質 A I としての機能を保持しているものを指す。アポリポ蛋白質 A I としての機能を保持している限り、当該改変体には、少なくとも以下の蛋白質・ポリペプチドが含まれる。

- ・アポリポ蛋白質 A I の部分断片、
- ・アポリポ蛋白質 A I の機能ドメインを有する蛋白質・ポリペプチド、
- ・アポリポ蛋白質 A I の 1 次構造において数個～十数個程度（例えば、1～20 個）のアミノ酸残基が欠失、置換若しくは付加された蛋白質・ポリペプチド（アミノ酸変異体）。

[0068] アポリポ蛋白質 A I の改変体は、融合蛋白質の血中安定性の向上、粘膜や脳関門の透過性の改善等、目的に応じて設計することができる。これらの例示した目的は、例えば、A p o A I や H D L における体内受容体との相互作用の欠損もしくは増強、融合蛋白質を含有する H D L 粒子径の制御、等により達成できる。

[0069] 例えば、キュビリン結合性が低下又は欠損した A p o A I の改変体の使用は、好ましい実施形態の 1 つである。すなわち、A p o A I 及び H D L はキュビリンとの結合を介して腎臓より排泄される (Kozyraki R. et al., Nat. Med. (1999) 5(6);656-661)。したがって、キュビリン結合性が低下又は欠損した A p o A I の改変体は、腎臓での濾過効率が低くなり、天然型 A p o A I よりも血中半減期が長くなる。

[0070] また、融合蛋白質に脂質を結合させた「蛋白質・脂質複合体」を用いる実施形態において、蛋白質・脂質複合体の粒径を大きくすることによって、腎臓での濾過効率を低下させ、その血中半減期を延ばすことが可能である。例えば、ヒト成熟型 A p o A I のアミノ酸配列（配列番号 1）における、173-243 番目の 71 残基のみで構成される部分断片の脂質複合体の直径は

平均12nmであり、天然型HDLのそれよりも1.5倍程度大きくなることが知られている (Sivashanmugam A et al., Methods Cell Biol. (2008) 90, 327-364)。また、173番目のアルギニンがシステインに置換したApoAⅠのアミノ酸変異体 (Apolipoprotein A-I_{milano}) は、システインを介してダイマー構造を形成し、その血中半減期は天然型ApoAⅠの約2倍に延びることが知られている (Roma P. et al., J. Clin. Invest. (1993) 91, 1445-1452; Chiesa G. et al., Circ. Res. (2002) 90, 974-980)。

このように、血中半減期を延ばすための技術は、ApoAⅠの改変体を設計する際に利用可能であり、本発明の医薬を注射剤として使用する場合、特に重要である。

[0071] アポリポ蛋白質AⅠの改変体には、アポリポ蛋白質AⅠの両親媒性配列を有するポリペプチドも含まれる。すなわち、ヒト成熟型ApoAⅠは、11～22個のアミノ酸からなる両親媒性ヘリックス構造のペプチド配列 (両親媒性配列) が10回繰り返された構造を有する (Segrest JP et al., FEBS Lett. (1974) 38, 247-253)。具体的には、配列番号1において、各両親媒性配列は、それぞれ、アミノ酸番号で44～65番目、66～87番目、88～98番目、99～120番目、121～142番目、143～164番目、165～186番目、187～208番目、209～219番目、及び220～241番目の配列に相当する。

[0072] 一方、ApoAⅠ様の両親媒性ヘリックス構造を含むペプチドは経口投与が可能であり、ApoAⅠと同様の動脈硬化抑制作用を示すことが知られている (国際公開02/15923号; Navab M. et al., Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. (2010) 30, 164-168)。このことは、ApoAⅠ由来両親媒性ヘリックス配列は、細胞膜 (脂質二重層) と親和性があり、さらに細胞膜を透過できることを示す。したがって、アポリポ蛋白質AⅠの両親媒性配列を有するポリペプチドと治療用ペプチドとの融合蛋白質は、経口投与が可能である。

[0073] 例えば、配列番号1のアミノ酸番号1～43番目の配列は脂質結合に関与

しない。したがって、この領域が削除された200アミノ酸のみから成るApoAⅠの部分断片は、脂質結合性を保持するため、本発明に適用可能である。また、上記10種類の両親媒性配列のいずれか1種又は2種以上、好ましくは1～6種の配列の組み合わせも、本発明に適用可能である。さらには1種類の両親媒性配列が複数回繰り返された配列を利用してもよい。

[0074] また、上記10種類の両親媒性配列のうち、44～65番目と220～241番目の配列は、他の8種に比べてリン脂質により強く結合し、リン脂質を可溶化することができる (Palgunachari NN et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (1996) 16(2), 328-338)。したがって、これらの配列を1回以上含む配列を用いることは有用である。

[0075] 隣接する2種類の両親媒性配列を利用する場合は、44～65番目と66～87番目の配列を組み合わせた44アミノ酸の配列や、209～219番目と220～241番目の配列を組み合わせた33アミノ酸の配列が、特に好ましい。これらの配列は、他の隣接する2種類の配列の組み合わせより強いリン脂質結合性と可溶化能を示す (Mishra VK et al., *Biochemistry* (1998) 37, 10313-10323)。

[0076] 上記ヒトApoAⅠ由来ペプチド配列以外にも、これらを模倣したクラスAの両親媒性ペプチドモチーフ (Segrest JP et al., *Proteins* (1990) 8, 103-117) である人工配列 (模倣ペプチド (mimetic peptide)) も、ヒトでの副作用が低く臨床応用が可能なものであれば使用可能である。当該模倣ペプチドの例としては、脂質結合性を有する両親媒性ペプチドであるAc-18A-NH₂、及びその関連ペプチド配列 (Datta G et al., *J. Lipid Res.* (2001) 42, 1096-1104; Navab M. et al., *Curr. Opin. Invest. Drugs* (2003) 4(9), 1100-1104) 等が挙げられる。具体的には、配列番号10～16に示すアミノ酸配列からなる各ペプチドが挙げられる。配列番号10は、Ac-18A-NH₂のアミノ酸配列である。配列番号11～16はAc-18A-NH₂の関連ペプチドのアミノ酸配列である。配列番号11は、Ac-18A-NH₂の3番目のアミノ酸をフェニルアラニン (Phe) に置換し

た配列に相当する。配列番号12は、Ac-18A-NH₂の14番目のアミノ酸をフェニルアラニン（Phe）に置換した配列に相当する。配列番号13は、Ac-18A-NH₂の3番目と14番目のアミノ酸をフェニルアラニン（Phe）に置換した配列に相当する。配列番号14は、Ac-18A-NH₂の11番目、14番目、17番目のアミノ酸をフェニルアラニン（Phe）に置換した配列に相当する。配列番号15は、Ac-18A-NH₂の10番目、11番目、14番目、17番目のアミノ酸をフェニルアラニン（Phe）に置換した配列に相当する。配列番号16は、Ac-18A-NH₂の3番目、10番目、11番目、14番目、17番目のアミノ酸をフェニルアラニン（Phe）に置換した配列に相当する。

[0077]（治療用ペプチド）

本発明における融合蛋白質は、治療用ペプチドを含んでいる。治療用ペプチドとしては特に限定はなく、医薬の有効成分となり得る全ての蛋白質やペプチドが対象となる。例えば、細胞表層受容体に対するアゴニスト、血糖をコントロールする機能を有する蛋白質・ペプチド、インスリン抵抗性改善機能を有する蛋白質・ペプチド、並びに、サイトカイン又はケモカインに対する可溶性受容体は、本発明における治療用ペプチドとして好適である。

具体例としては、グルカゴン様ペプチド-1（GLP-1）、グルカゴン、EXENDIN、エリスロポエチン、インターフェロン、可溶性サイトカイン受容体、可溶性ケモカイン受容体、卵胞刺激ホルモン（FSH）、甲状腺ホルモン、ヒト成長ホルモン（hGH）、ナトリウム利尿ペプチド、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、顆粒球マクロファージ・コロニー刺激因子（GM-CSF）、脂肪動員ホルモン阻害因子（AGIF）、成長ホルモン放出因子、神経成長因子（NGF）、毛様体神経栄養因子（CNTF）、血管形成阻害因子（Angiostatin）、アポリポ蛋白B可溶性受容体、ニューロペプチドB（NPB）、ペプチドチロシンチロシン（PYY）、ケマリン（Chemerin）、レプチン、アペリン（Apelin）、ネスファチン、オキシトシン、メラノコルチン、アミリン、オレキシン、アディポネクチン、グレリン、等

が挙げられる。さらに、これらの蛋白質・ペプチドと同一機能（同一活性）を有するアナログ、変異体、人工ペプチドが挙げられる。さらに、免疫グロブリンのVH領域とVL領域のいずれか一方又は両方を含むポリペプチドであって、前記した蛋白質・ペプチドと同一機能（同一活性）を有するものも、治療用ペプチドとなり得る。また、線維症治療薬の候補であるスーパーオキシドジスムターゼ（SOD）のような酵素蛋白も、治療用ペプチドとなり得る。

[0078]（他の構成要素：蛋白質分解酵素の阻害剤）

本発明で用いる融合蛋白質には、治療用ペプチドとは別に、治療用ペプチドに対する分解酵素の阻害剤がさらに連結されていてもよい。当該阻害剤を連結させることにより、治療用ペプチドの分解が抑えられ、血中半減期が長くなり、治療用ペプチドの生体内での効果をさらに高めることができる。これにより、投薬量と投薬頻度を減らすことも可能となる。例えば、ジペプチジルペプチダーゼⅠⅤ（DPPⅠⅤ）の阻害剤は、治療用ペプチドがGLP-1である場合に好適である。

[0079]（他の構成要素：第2の治療成分）

本発明で用いる融合蛋白質には、治療用ペプチドとは別に、第2の治療成分がさらに連結されていてもよい。1つの実施形態では、治療用ペプチドが血糖をコントロールする機能を有するもの又はGLP-1アゴニストであり、第2の治療成分が膵臓疾患治療薬又は肝臓疾患治療薬である。この場合、第2の治療成分は、炎症抑制剤、抗癌剤、又は肝硬変治療剤であってもよい。

例えば、GLP-1とApoAⅠとの融合蛋白質の場合、膵臓にはGLP-1受容体が存在し、肝臓にはApoAⅠ受容体が存在するので、この融合蛋白質は膵臓と肝臓に対して指向性を有する。そのため、この融合蛋白質によって膵臓や肝臓疾患に有効な治療薬を運ばせることも可能となる。一方、糖尿病患者の中には、膵炎、膵臓癌等の膵臓疾患を基礎疾患としていたり、肝硬変、肝線維症、肝臓癌、肝炎を併発するケースが多々ある。したがって

、GLP-1とAp o A Iとの融合蛋白質の場合、GLP-1が治療用ペプチド（糖尿病治療用）となるが、上記のような膵臓、肝臓の疾患治療薬を第2の治療成分としてこの融合蛋白質に結合させることは有用である。このように、糖尿病に併発する膵臓、肝臓疾患の治療薬も組織指向性を持たせて効率的に利用することは、糖尿病の治療には重要である。

[0080] （他の構成要素：リンカー）

本発明で用いる融合蛋白質において、Ap o A I又はその改変体と治療用ペプチドとの間に、リンカーを介在させてもよい。リンカーは、できるだけヒトでの免疫応答を誘発しないものが好ましい、人工配列であれば、例えば、グリシン及びセリンから成る5アミノ酸配列であるGGGGS（配列番号9）の1～4回繰り返し配列、もしくはこれに類似する配列が使用可能である。また、ヒト血中に、好ましくは1mg/mL以上の濃度で存在する蛋白質、例えば免疫グロブリンのヒンジ配列をリンカーとして使用することができる。ヒト血中に大量に存在する蛋白質由来の配列であれば、ヒトでの免疫応答を誘発させる可能性は低い。

[0081] （治療用ペプチドの連結様式等）

上記融合蛋白質においては、Ap o A Iの機能に影響を与えない限り、同種の治療用ペプチドを2回以上繰り返して連結してもよい。なお、この場合は、治療用ペプチド自身がリンカーの役割も兼ねることができる。

治療ペプチドの部分配列をリンカーとして用いてもよい。

[0082] 治療用ペプチドの連結位置は、Ap o A I又はその改変体のN末端、C末端のいずれでもよく、両末端でもよい。

[0083] （治療用ペプチドの例：グルカゴン様ペプチド-1）

グルカゴン様ペプチド-1（GLP-1）は小腸L細胞から分泌される30～31アミノ酸から成るペプチドホルモンである。GLP-1は、膵臓β細胞においてグルコース依存的なインスリン分泌の亢進作用を示す。このことから、GLP-1受容体アゴニストによる血糖コントロールは、インスリンによるそれに比べて、低血糖になるリスクが極めて少ないと考えられている。

る (Halimi S. et al., Diabetes and Metabolism (2003) 34, S91-S95) 。また、G L P - 1 は血糖コントロールのみならず、食欲低下、膵 β 細胞の分化・増殖促進及びアポトーシス抑制、さらには神経保護等の作用があり、G L P - 1 作用を示す治療薬は、I I 型糖尿病や肥満等の新しい機能の治療薬として期待されている。

[0084] しかしながら、G L P - 1 は、生体内でジペプチジルペプチダーゼ I V (D P P I V) によって速やかに分解されてしまうため、その半減期は 1 ~ 2 分であり (Kieffer TJ et al., Endocrinology (1995) 136(8), 3585-3596) 、そのまま治療薬として利用することは困難である。そのため、D P P I V 阻害剤の使用、及び、血中半減期が増大した G L P - 1 アナログの使用、の両方向から開発が進められてきた (Halimi S. et al., Diabetes and Metabolism (2003) 34, S91-S95) 。G L P - 1 アナログとして、現在、Exenatide 及びLiraglutideが実用化されている。ExenatideはG L P - 1 とのアミノ酸配列の相同性が 5 3 % と低い。一方、Liraglutideは、天然型 G L P - 1 に対して 1 アミノ酸の置換による変異、及び 1 アミノ酸の脂肪酸修飾が施されている。しかしながら、これらの体内安定性はまだ低く、1 日に 1 ~ 2 回の注射が必要である。

[0085] また、Exenatideの抗体産生率は 4 0 ~ 4 5 % 、Liraglutideの抗体産生率は 9 ~ 1 3 % であったと報告されている (De Block CE et al., Lancet (2009) 374, 4-6 ; Klonoff DC et al., Curr. Med. Res. Opin. (2008) 24, 275-286) 。これらの G L P - 1 アナログに対する抗体産生は、その薬効を低減させるのみならず、重篤な免疫疾患を誘発する可能性がある。

[0086] 本発明では、治療用ペプチドとして、天然型 G L P - 1 、並びに、G L P - 1 と同一機能 (同一活性) を有するアナログ、変異体、人工ペプチド、及び「免疫グロブリンの V H 領域と V L 領域のいずれか一方又は両方を含むポリペプチド」、等 (天然型 G L P - 1 を含めたこれらのポリペプチドを総称して、「G L P - 1 活性を有するポリペプチド」と称する) の全てが利用可能である。好ましくは、G L P - 1 に対するアミノ酸配列の相同性が 9 3 %

以上で、かつGLP-1活性を有するポリペプチドを利用する。GLP-1としては、配列番号2に示す31アミノ酸からなる配列のポリペプチド（天然型GLP-1のアミノ酸番号7～37に相当）の他、配列番号2のアミノ酸番号1～30、1～29、又は1～28に相当するポリペプチドを利用することができる。具体的には、例えば、GLP-1とアミノ酸相同性が100%の配列、配列番号2のアミノ酸番号2（天然型GLP-1の8番目）のアミノ酸であるアラニンがグリシン又はセリンに変換された配列、或いは、これらのN末端にメチオニン又はリジンが1残基付加された配列、等を有する治療ペプチドを使用する。

DPP-IVは、GLP-1アミノ酸配列の8番目のアラニンと9番目のグルタミン酸の間を切断する作用があり、また7番目のヒスチジン及び9番目のグルタミン酸はGLP-1機能に重要である。このことから、疎水性アミノ酸である8番目のアラニンをセリン等の親水性アミノ酸もしくは、最も分子サイズの小さいアミノ酸であるグリシンに変換することで、GLP-1機能を極端に低下させることなく、DPP-IVに対する感受性をある程度低下させることが可能である。

[0087] 治療用ペプチドがGLP-1活性を有するポリペプチドである場合も、上記融合蛋白質において、ApoAⅠ又はその改変体とGLP-1活性を有するポリペプチドとの間にリンカーを介在させてもよい。また、ApoAⅠの機能に影響を与えない限り、GLP-1活性を有するポリペプチドを2回以上繰り返して連結させてもよい。この場合は、GLP-1活性を有するポリペプチド自身が、リンカーの役割も兼ねることができる。

[0088] 配列番号7、8に、ApoAⅠとGLP-1活性を有するポリペプチドとの融合蛋白質の一例を示す。この融合蛋白質は、N末端から順に、GLP-1（アミノ酸番号2～31；30アミノ酸）、リンカー（アミノ酸番号32～46；15アミノ酸）、及びApoAⅠ（アミノ酸番号47～289；243アミノ酸）が連結された基本構造を有している。ApoAⅠの部分（243アミノ酸）のアミノ酸配列は、配列番号1に示したものと同一である。

[0089] (治療用ペプチドの例：エリスロポエチン)

エリスロポエチン (E p o) は、成熟赤血球細胞の生産に必要な天然に生じる造血成長因子である。成熟型 E p o は、165 アミノ酸から成る 18.4 k D のポリペプチドに糖鎖が付加された、約 35 k D の糖蛋白質である。E p o は、初期および後期の赤血球特異的前駆細胞の増殖ならびに前赤芽球のヘモグロビン化および成熟赤血球へのそれらの分化を刺激する (Roberts D. et al., J. Mol. J. Endocrinology (1994) 12(2), 131-148)。E p o 受容体は脳にも存在し、E p o は脳の機能、発達にも重要であることが知られている (Lappin T., The Oncologist (2003) 8 (suppl. 1), 15-18)。

[0090] 現在では、組換えヒト E p o (r E p o) は、腎不全患者の腎性貧血の治療に用いられており、確立された市場を有している。しかしながら、r E p o の血中半減期は 6 ～ 8 時間と短く、週に 2 ～ 3 回の注射が必要である (Macdougall IC, Clin. J. Am. Soc. Nephrol. (2008) 3, 200-207)。腎不全患者は年々増加しており、腎性貧血を治療・予防するための r E p o 注射の頻度をより低減することや、E p o 製剤の経口投与化や経粘膜投与化によって通院頻度を低減することは、患者の Q O L 及び医療経済の面から重要な課題である。

[0091] 一般に、免疫グロブリンは血中半減期が約 20 日と非常に安定している。そのため、r E p o の代替としての E p o 受容体アゴニスト抗体の開発も行われて来た (国際公開 00/61637 号；国際公開 2007/120766 号)。しかしながら、r E p o に匹敵するアゴニスト活性を有する抗体はまだ得られていない。

一方、近年、E p o 受容体アゴニストである人工ペプチド「H e m a t i d e」が開発されている。これはファージディスプレイペプチドライブラリーから、E p o 受容体アゴニストとして選抜された人工ペプチドが、P E G 化によって安定化されたものである。この薬剤は、4 週に 1 回の注射で貧血を抑制できる (Macdougall IC et al., N. Engl. J. Med. (2009) 361, 1848-1855)。しかしながら、腎性貧血患者にとっては、E p o 受容体アゴニスト

療法は、生涯必要とされる。長年に渡るPEG等の化学物質投与の安全性は、現時点で保証されているわけではない。また、「Hematide」は完全な人工アミノ酸配列を有するため、これに対する抗体産生も起こり得る。

[0092] そこで、Epoの新規キャリアとしてApoAⅠ又はその改変体を使用すれば、上記課題を解決することができる。すなわち、上記融合蛋白質において、治療用ペプチドとしてEpo活性を有するポリペプチドを採用することで、安全かつ有効な治療薬を提供することができる。Epo活性を有するポリペプチドとしては、天然型Epo、並びに、Epoと同一機能（同一活性）を有するアナログ、変異体、人工ペプチド、及び「免疫グロブリンのVH領域とVL領域のいずれか一方又は両方を含むポリペプチド」、等が挙げられる。

[0093] （治療用ペプチドの例：ヒト成長ホルモン）

ヒト成長ホルモン（hGH）は脳下垂体前葉の成長ホルモン分泌細胞（Somatotroph）から分泌される、191アミノ酸からなる22kDaのペプチドである。hGHは小児におけるhGH分泌不全症、ターナー症候群、及びブラダーウィリー症候群等の治療に用いられている。さらに近年では、成人における重症hGH分泌不全症に適用されている他、抗老化、美容医学における応用も期待されている。

本発明において、上記融合蛋白質の治療用ペプチドとして、hGH活性を有するポリペプチドを採用することができる。hGH活性を有するポリペプチドとしては、天然型hGH、並びに、hGHと同一機能（同一活性）を有するアナログ、変異体、人工ペプチド、及び「免疫グロブリンのVH領域とVL領域のいずれか一方又は両方を含むポリペプチド」、等が挙げられる。

[0094] （蛋白質・脂質複合体）

上記融合蛋白質は、脂質との複合体を形成させることなく、そのまま医薬等として使用することができる。すなわち、上記融合蛋白質をそのまま「脂質非結合型」として生体内に投与した場合、この融合蛋白質は、血流を循環する間に、細胞膜を形成するリン脂質やコレステロール（CO）と結合し、

HDL 様粒子を形成する。さらに、血中に存在する LCAT (Lecithin cholesterol acyltransferase) の作用によって CO はコレステロールエステル (CE) に変換され、融合蛋白質を含む HDL 粒子の内部に CE は蓄積する。CO や CE を保持した上記融合蛋白質を含有する HDL 様粒子は、肝臓で受容体を介して、CO 及び CE を排泄するが、この際、融合蛋白質は天然の ApoA I 同様、HDL 粒子として再利用されるか、もしくはエンドサイトーシスによって取り込まれ、分解を受ける。このような体内動態の過程で、上記融合蛋白質は、自身が有する治療用ペプチドの作用を標的組織で発揮する。

[0095] 一方、上記融合蛋白質は、脂質と結合させた「脂質結合型」として使用することもできる。すなわち本発明は、上記融合蛋白質に脂質がさらに結合し、蛋白質・脂質複合体を形成している態様、換言すれば、上記融合蛋白質に脂質が結合してなる蛋白質・脂質複合体を含有する医薬、も包含する。

この蛋白質・脂質複合体は、脂質二重層の安定構造をとる。二重層を形成する脂質としては、一般的にはリン脂質であるが、その他にスフィンゴ脂質、糖脂質、アルキルホスホリピド、エーテル脂質、及びプラズマローゲン等がある。これらの内の 1 種類を使用するか、もしくは 2 種類以上を混合して使用する。適当なリン脂質としては、例えば、DMPC (dimyristoyl phosphatidylcholine)、DMPG (dimyristoyl phosphatidylglycerol)、POPC (palmitoyl oleoyl phosphatidylcholine)、DPPC (dipalmitoyl phosphatidylcholine)、DPPS (dipalmitoyl phosphatidylserine)、カルジオリピン、DPPG (dipalmitoyl phosphatidylglycerol)、DSPG (distearoyl phosphatidylglycerol)、DSPC (distearoyl phosphatidylcholine)、卵黄ホスファチジルコリン、大豆ホスファチジルコリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジン酸、スフィンゴミエリンおよびカチオン性リン脂質、等が使用可能である。これらのリン脂質を用いて、例えば、「Reconstitution of High-Density Lipoproteins; Jonas A., Methods in Enzymology (1986) 128, 553-582」に記載の方法に従って、上記融合蛋白質とリ

ン脂質との複合体（蛋白質・脂質複合体）を調製することができる。上記融合蛋白質は単独で、二重層を形成しない脂質と会合させてもよく、また融合蛋白質と上記のような二重層を形成するリン脂質との複合体に、さらに、二重層を形成しない脂質を含ませてもよい。このような二重層を形成しない脂質として、例えば、コレステロール、トリグリセリド、カルジオリピン、ホスファチジルエタノールアミン、オキシステロール、植物ステロール、エルゴステロール、シトステロール、カチオン系脂質、セレブロシド、スフィンゴシン、セラミド、ジアシルグリセロール、モノアシルグリセロール、オリアシルグリセロール、ガングリオシド、エーテル脂質、アルキルリン脂質、プラズマローゲン、プロスタグランジン、リゾリン脂質、等がある。

[0096] 上記蛋白質・脂質複合体において、治療用ペプチドに対する分解酵素の阻害剤をさらに含ませてもよい。具体的には、脂質二重層の内部に当該阻害剤を封入することができる。なお、DPPⅣのような蛋白質分解酵素に対する阻害剤は脂溶性のものが多く、この場合には、上記蛋白質・脂質複合体は当該阻害剤の好適な溶解剤となり得る。

[0097] 同様に、上記蛋白質・脂質複合体において、第2の治療成分をさらに含ませてもよい。具体的には、脂質二重層の内部に当該第2の治療成分を封入することができる。

[0098] （投与方法、製剤化）

本発明の医薬の投与方法としては特に限定はなく、経口投与と非経口投与の両方が適用できる。非経口投与としては、静脈内、皮下、筋肉、局所、腹腔内、経皮、経鼻、経肺、等の各投与方法が挙げられる。好ましくは、経口投与と経粘膜投与（経肺投与等）が採用される。

[0099] ApoAⅠ（HDL）受容体は、腸管上皮細胞、肺胞上皮細胞や血液脳関門にも存在することが知られている（Kolleck K. et al., Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. (2002) 27, 57-63; Kozyraki R et al., J. Mol. Med. (2001) 79, 161-167; Goti D. et al., Eur. J. Neurochem. (2001) 76, 498-508)。また、腸管上皮細胞のモデル細胞であるCaco-2培養細胞におい

てクラスリン依存型エンドサイトーシスでHDLが細胞内へ侵入することが報告されている (Klinger A. et al., Biochim. Biophys. Acta. (1997) 1345, 65-70)。したがって、経口投与された上記融合蛋白質又は上記蛋白質・脂質複合体は、受容体を介して腸管上皮細胞へ侵入することが可能である。

[0100] 細胞内に侵入した上記融合蛋白質又は上記蛋白質・脂質複合体は、中性脂質、他のアポリポ蛋白質とともにカイロミクロン (Chylomicron) 様粒子、あるいは単独もしくは内在性 Apo A I とともに HDL 様粒子を形成する。上記融合蛋白質を含む、これらのカイロミクロン様もしくは HDL 様粒子は、基底膜側へ分泌され、リンパ管に移行し、その後、胸管リンパ、鎖骨下静脈を経て血液大循環に入る。血中では、上記融合蛋白質は酵素反応によってカイロミクロン様粒子から遊離し、HDL 様粒子として循環する。以上のように、上記融合蛋白質又は上記蛋白質・脂質複合体は、注射薬のみならず経口薬としても使用可能である。

[0101] 肺胞上皮細胞も、キュービリン依存的に HDL 粒子を取込むことが示唆されている (Kolleck I. et al., Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. (2002) 27, 57-63)。このことは、上記融合蛋白質又は上記蛋白質・脂質複合体が、経肺投与をもできる可能性を示す。

[0102] さらに、天然型 HDL は受容体 SR-B I を介して血液脳関門を透過することが知られている (Balazs Z. et al., J. Neurochemistry (2004) 89, 939-950)。このことから、上記融合蛋白質又は上記蛋白質・脂質複合体は脳内においても作用可能であることを示す。

[0103] 本発明の医薬の投与量は、有効成分となる治療用ペプチドの種類、投与経路、疾病の進行度や重篤度、投与対象者の年齢や体重、等により適宜設定することができる。

[0104] 本発明の医薬は、薬学的に許容される担体と組み合わせたものであり得る。当該担体としては、賦形剤、結合剤、崩壊剤、安定化剤、滑剤、懸濁剤、分散剤、希釈剤、等が挙げられる。これらの担体は、公知のものがそのまま適用できる。

[0105] 例えば、本発明の医薬を経口投与した場合、その大部分が胃内で容易にペプシンにより消化分解される可能性が高い。そのため、融合蛋白質の効果を十分に発揮させるには、胃での消化分解を免れるような製剤的な工夫、いわゆる腸溶化製剤により、融合蛋白質が腸まで届いて働くようにすることが好ましい。A p o A I 融合蛋白質を腸溶性にする製剤的な工夫としては、いくつかの方法が考えられる。例えば、錠剤、カプセル剤、マイクロカプセル或いは顆粒を腸溶性にするために被覆するコーティング剤としては、p H 4 以下の酸性条件では溶けにくく、p H 5 以上で溶解しやすいヒドロキシプロピルメチルセルローズフタレート、カルボキシメチルエチルセルローズ、酢酸フタル酸セルローズ、メタクリル酸コポリマーや、トウモロコシ由来の蛋白質であるツェイン（ゼイン）、や天然油脂由来のシェラックなどが適宜用いられる。或いは、単純に胃内のp Hを高くしてペプシンが作用しなくなるようにしても実質的に有効である。

[0106] （抗体産生）

動脈硬化の誘発、悪化の原因として、低密度リポ蛋白質（Low density lipoprotein; L D L）を取り込んでコレステロールを蓄積し、泡沫化したマクロファージが、血管内皮細胞に集積することが考えられている。H D Lは泡沫化マクロファージ（Macrophage foam cells）からコレステロールを引き抜く作用があり、組換えA p o A I、もしくはこれと同等機能を有する薬物を投与することで、動脈硬化を予防、治療できると考えられてきた（Scanu AM et al., FASEB J. (2008) 22, 4044-4054）。そのため、従来より、マクロファージとA p o A Iの相互作用が詳細に研究されてきた。上記融合蛋白質がマクロファージ内のエンドソームで分解されると、主要組織適合遺伝子複合体（M H C）に抗原提示される可能性があるが、A p o A IやH D Lがマクロファージに取り込まれてエンドソームで分解されるという事実はない。

A p o A Iは主として、その受容体であるA B C A 1、S R - B 1等を利用して泡沫化マクロファージから蓄積したコレステロールを引き抜き、最終的に成熟H D L粒子として肝臓へ運搬するコレステロール逆輸送（Reverse cho

lesterol transport) を担っている (Rothblat GH et al., Curr. Opin. Lipidol. (2010) 21(3), 229-238)。

以上のように、上記融合蛋白質がマクロファージで抗原提示される可能性はないので、上記融合蛋白質又は上記蛋白質・脂質複合体を投与した際に、治療用ペプチドに対する抗体が産生する可能性はない。このことから、本発明が提供する上記融合蛋白質又は上記蛋白質・脂質複合体は、安全に医薬品等として使用することが可能である。

[0107] (機能性食品)

経口投与可能な実施形態に係る本発明の医薬は、そのまま機能性食品として利用することができる。すなわち本発明は、上記した融合蛋白質又は蛋白質・脂質複合体を含有する機能性食品も包含する。

[0108] (融合蛋白質の組換え生産)

上記融合蛋白質は、A p o A I 又はその改変体をコードする遺伝子(核酸)と治療用ペプチドをコードする遺伝子(核酸)とが連結された融合遺伝子を発現させることにより、生産することができる。

A p o A I は肝臓及び小腸で産生されるため、ヒト A p o A I 遺伝子は、ヒト肝臓や小腸由来の RNA や c DNA ライブラリーより調製することができる。治療用ペプチドの遺伝子も、当該ペプチドが発現している組織由来の RNA もしくは c DNA ライブラリーより調製できる。治療用ペプチドが 40 アミノ酸程度である場合は、化学合成によっても、治療用ペプチドの遺伝子を調製することができる。

遺伝子同士の連結は、制限酵素、DNA リガーゼ、PCR 等を使用した一般的な遺伝子操作法によって行うことができる。

融合蛋白質の遺伝子のコドンとして、それを発現させようとする宿主に適したものを使用すれば、宿主での大量発現が可能となる。融合遺伝子を宿主内で発現させる際には、例えば、融合遺伝子を宿主に適したプラスミド等の発現ベクターに挿入する。そして、発現ベクターを宿主内に導入する。宿主内において、融合遺伝子はプラスミド等のベクター上に存在しても良く、相

同組み換え等によって染色体に組み込まれてもよい。

[0109] 一方、組換え蛋白質を生産する際に宿主プロテアーゼによって分解を受ける場合がしばしばある。このような場合は、分子シャペロンとの融合発現や共発現の手法を用いてもよい。特に、上記したApoAⅠの部分断片や模倣ペプチドは分子量が小さく、プロテアーゼによる分解を受けやすいので、分子シャペロンとの融合発現や共発現は有効である。分子シャペロンの例としては、ペプチジル・プロリル・シーストランス・イソメラーゼ (Peptidyl prolyl cis-trans isomerase; PPIase) (Maruyama et al., Front. Biosci. (2004) 9, 1680-1720) や、GroEL (バクテリアのⅠ型シャペロン) 等の各種ヒートショックプロテイン (heat shock protein; HSP) (Houry et al., Curr. Protein Pept. Sci. (2001) 2-3, 227-244) が挙げられる。

[0110] ApoAⅠは糖鎖付加等の翻訳後修飾がない蛋白質である。そのため、治療用ペプチドが翻訳後修飾を必要としないものである場合は、細菌や酵母を宿主として用いることができる。細菌で発現させた組換え蛋白質のN末端にはメチオニンが付加されるが、これが融合蛋白質の機能を阻害するのであれば、酵母等の真核細胞を用いることが好ましい。真核生物で融合蛋白質を発現させる場合には、融合蛋白質配列の上流に適当なシグナル配列を設置して、融合蛋白質を分泌発現させることが好ましい。

治療用ペプチドの機能発現に糖鎖修飾等の天然に近い翻訳後修飾が必要な場合は、宿主として動物細胞を用いることが好ましい。

宿主の具体例としては、大腸菌、枯草菌、乳酸菌等の細菌; Saccharomyces 属、Schizosaccharomyces 属、Pichia 属等の酵母; Drosophila S2、Spodoptera Sf9等の昆虫細胞; CHO、COS、NOS、HEK293、Bowes melanoma等の動物細胞が、それぞれ挙げられる。上記の他に、トウモロコシ、大豆等の組換え植物や、カイコ、ニワトリ、羊、牛等の組換え動物を宿主として使用してもよい。

[0111] (融合蛋白質の精製)

融合蛋白質の単離と精製は、融合蛋白質を発現させた細胞や生物組織を破碎し、その上清又は沈殿物から行うことができる。上清に発現した場合は、イオン交換クロマト、疎水クロマト、逆相クロマト、ゲル濾過等の一般的な担体を用いるクロマトグラフィーによって分離精製が可能である。なお、脂質非結合型のApoAⅠは、硫安等の塩が存在しなくとも、フェニル基固定化担体に強く結合する (McGuire KA et al., J. Lipid Res. (1996) 37, 1519-1528)。したがって、この工程を精製過程に組み込むことで、融合蛋白質を効率良く精製することができる。

[0112] 融合蛋白質の末端にヒスチジントグ等のアフィニティタグを付加して、アフィニティクロマトグラフィーによって精製してもよい。必要に応じて、アフィニティタグ配列の近隣に限定分解型プロテアーゼの切断配列を設置することで、アフィニティタグは、限定分解型のプロテアーゼによって切断できる。また、適当な2個程度のアミノ酸配列をアフィニティタグの近隣に付加することで、蟻酸等による化学的な分解によっても切断可能である。例えば、C末端方向にアスパラギン酸(D)、プロリン(P)が続く場合、これらのアミノ酸の間を蟻酸で効率良く切断することも可能である (Ryan RO et al., Protein Exp. Purif. (2003) 27, 98-103)。

[0113] 融合蛋白質が沈殿画分に生産された場合、適当な濃度のグアニジン塩酸や尿素等の蛋白変性剤に溶解した後、これらの変性剤の存在下で、イオン交換クロマト、ゲル濾過等によって精製することができる。またヒスチジントグが付与されている場合は、変性剤の存在下で金属キレートクロマトグラフィーを行うことが可能である。変性剤存在下である程度精製できた時点で適当な溶媒条件で、透析、希釈等の方法によってリフォールディングを行う。この時、100～500 mM程度のアルギニン塩酸塩を添加しておく、と、効率良くリフォールディングが進行する。リフォールディング終了後、適当な緩衝液に透析した後、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー及びゲル濾過等の手法によって、融合蛋白質を精製することができる。

- [0114] 精製された融合蛋白質は、透析等によって保存に適した緩衝液に溶解し、冷蔵保存又は冷凍保存できる。好ましくは、凍結乾燥後、冷蔵もしくは冷凍で保存する。
- [0115] 本発明は、目的蛋白質に対してアポリポ蛋白質 A I 又はその改変体を連結する目的蛋白質の安定化方法、も包含する。目的蛋白質としては特に限定はなく、例えば、上述した治療用ペプチドがそのまま採用され得る。アポリポ蛋白質 A I の改変体についても同様である。
- [0116] 本発明は、上記融合蛋白質を発現する組換え体を有効成分として含有する医薬又は機能性食品を包含する。すなわち、「融合蛋白質の組換え生産」の項で説明したように、本発明における融合蛋白質を発現する組換え体を作製することができる。この組換え体を、そのまま医薬や機能性食品の有効成分として利用することができる。好ましい実施形態において、前記組換え体は、前記融合蛋白質を表層に提示可能な微生物又は細胞であり、さらに好ましくは酵母である。
- [0117] 発現した目的蛋白質を細胞表層に提示させる方法は、例えば、Molecular display technology using yeast-arving technology; Shibasaki S. et al., Anal. Sci. (2009) 25-1, 41-49 に記載されている。すなわち、 α アグルチニン (Agglutinin) 等の細胞間接着因子の C 末端領域 (A g g - C) には G P I (glycosyl phosphatidyl inositol) アンカー付着シグナルが存在する。上記融合蛋白質の C 末端に、腸管プロテアーゼ切断配列、次いで A g g - C を付加し、N 末端に分泌シグナル配列を付加した組換え蛋白質を酵母に産生させると、トランスアミダーゼによる G P I アンカー付着シグナル配列の切断反応を経て、目的蛋白質は酵母の細胞膜上に G P I アンカーとの結合を介して蓄積する。その後、酵母の表層に存在する P I - P L C (Phosphatidyl inositol-specific-phospholipase C) により G P I アンカーとの結合は切断され、目的蛋白質は細胞壁の最外層に提示される。

このようにして作製された上記融合蛋白質を表層提示する酵母は、未破碎の状態でも服用しても、腸管プロテアーゼの作用によって融合蛋白質が酵母の

表層から遊離し、腸管上皮細胞から吸収され得る。

酵母以外の微生物・細胞としては、乳酸菌、枯草菌等の食品に使用されているものが好適に使用される。

[0118] 本発明の医薬又は機能性食品は、ヒト用に限定されず、ヒト以外の動物にも適用できる。

[0119] 本発明は、有効量の前記融合蛋白質又は前記蛋白質・脂質複合体を投与する疾病の治療方法、を包含する。疾病、融合蛋白質、及び蛋白質・脂質複合体の具体例は、前述のとおりである。例えば、本発明は、有効量の、A p o A I 若しくはその改変体と G L P - 1 活性を有するポリペプチドとがペプチド結合を介して連結してなる融合蛋白質、又は当該融合蛋白質に脂質が結合した蛋白質・脂質複合体、を投与する糖尿病の治療方法、を包含する。

[0120] 本発明は、疾病治療用の前記融合蛋白質又は前記蛋白質・脂質複合体、を包含する。疾病、融合蛋白質、及び蛋白質・脂質複合体の具体例は、前述のとおりである。例えば、本発明は、糖尿病治療用の、A p o A I 若しくはその改変体と G L P - 1 活性を有するポリペプチドとがペプチド結合を介して連結してなる融合蛋白質、又は当該融合蛋白質に脂質が結合した蛋白質・脂質複合体、を包含する。

[0121] 本発明は、前記融合蛋白質又は前記蛋白質・脂質複合体の疾病の治療薬製造のための使用、を包含する。疾病、融合蛋白質、及び蛋白質・脂質複合体の具体例は、前述のとおりである。例えば、本発明は、A p o A I 若しくはその改変体と G L P - 1 活性を有するポリペプチドとがペプチド結合を介して連結してなる融合蛋白質、又は当該融合蛋白質に脂質が結合した蛋白質・脂質複合体の、糖尿病の治療薬製造のための使用、を包含する。

[0122] 本発明は、治療用ペプチドにペプチド結合を介して連結された A p o A I 又はその改変体の、治療用ペプチドに対するキャリアとしての使用、を包含する。治療用ペプチド、及び A p o A I の改変体の具体例は、前述のとおりである。

[0123] 以下、実施例をもって本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれ

らの実施例のみに限定されるものではない。

実施例

[0124] (1) GLP-1/ApoAⅠ融合蛋白質 (AGL1) の発現と精製

ヒト肝臓RNA (クロンテック社)、オリゴdTプライマー、及び配列番号3と配列番号4に示す各プライマーを用いたRT-PCRにより、成熟型ApoAⅠ遺伝子を含むDNA断片を取得した。得られたDNA断片をBamHIとHindIIIで切断し、ApoAⅠ遺伝子を含むDNA断片を回収した。このDNA断片を、pET24a (Novagen社) のBamHI/HindIII切断部位に導入した。配列番号5と配列番号6で示す各合成DNAから得られる二本鎖DNAを、上記ベクターのNdeI/BamHI切断部位に導入した。以上の工程によって、ApoAⅠとGLP-1との融合蛋白質 (配列番号7, 8) をコードする遺伝子 (配列番号7) を有するプラスミドベクターpT24AGL1を構築した。

[0125] 上記pT24AGL1を大腸菌BL21 (DE3) (Invitrogen社) に導入し、組換え体を作製した。この組換え体をLB培地にて培養し、OD600が0.6の時点で1mM IPTGを添加し、C末端にヒスチジンタグが付加されたAGL1の発現を誘導し、さらに37℃で5時間培養し、菌体を回収した。

[0126] 回収した菌体を6M GdmHCl/50mM Tris-HCl (pH 7.5)/0.5M NaCl/25mM イミダゾール (以下、「緩衝液A」と称する。) に懸濁し、超音波破碎によって細胞を破碎した。細胞破碎後、4℃で一昼夜インキュベートした。得られた細胞破碎液に対して40000gで1時間超遠心分離を行い、上清を得た。この上清を、予め緩衝液Aで平衡化されたNi-Sephrose HP (GE社) と混合し、4℃で一昼夜インキュベートした。本混合液を2000rpmで5分間遠心分離を行い、Ni-Sephroseビーズを回収した。回収したビーズを、8M 尿素/50mM Tris-HCl (pH 7.5)/0.5M NaCl/25mM イミダゾール (以下、「緩衝液B」と称する。) で2回洗浄した後、

8 M 尿素／50 mM Tris-HCl (pH 7.5)／0.5 M NaCl／1 M イミダゾール（以下、「緩衝液C」と称する。）でAGL1を溶出した。溶出したAGL1画分を、0.45 M アルギニン塩酸塩／100 mM Tris（以下、「緩衝液D」と称する。）に対して4℃で一昼夜透析を行った。さらに50 mM Tris-HCl (pH 8.0)／0.15 M NaCl（以下、「緩衝液E」と称する。）、次いで10 mM 重炭酸アンモニウム溶液 (pH 7.4) に対して透析を行い、アルギニンを除去した。透析内液を凍結乾燥し、融合蛋白質AGL1の粉末を得た。

[0127] 得られたAGL1粉末とクロロホルム／メタノール（2／1）を30分間、4℃で混合した後、7倍量のメタノールを添加し、8000 gで30分間遠心分離を行い、上清を除去した後、真空乾燥を行った。乾燥物を3 M Gdm-HClで溶解した後、緩衝液D、次いで緩衝液Eで透析を行った。透析内液に1 mM EDTAを添加した後、予め50 mM Tris-HCl (pH 8.0)／1 mM EDTA／0.15 M NaCl（以下、「緩衝液F」と称する。）で平衡化されたPhenyl Sepharose FF (GE社)と混合し、AGL1をビーズへ吸着させた。ビーズを緩衝液Fで洗浄後、さらに20% エチレングリコール／1 mM EDTA／0.1 M NaCl／50 mM Tris-HCl (pH 8.0)で洗浄した。洗浄したビーズに75% プロピレングリコール／1 mM EDTA／0.1 M NaCl／50 mM Tris-HCl (pH 8.0)を加え、AGL1を溶出した。溶出されたAGL1溶液をPBS (pH 7.4)に対して透析し、精製AGL1標品を得た。以上の精製過程のSDS-PAGEの結果を図1に示す。

[0128] (2) 脂質結合型AGL1の調製と分散性の検定

クロロホルムに溶解させた10 mg/mLの1, 2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC; 日本油脂社 COATSOME MC-4040) 溶液500 µLを、ガラス管内で窒素ガスにより乾燥させた。その後、2 mLのPBS (pH 7.4)を添加し、超音波によってDMPCを分散させ、白色懸濁液を得た。

本DMPC懸濁液に、上記（１）で得られた1mg/mLの精製AGL1溶液2mLを加えて混合し、室温で3時間以上放置し、清澄なDMPC結合型AGL1（脂質結合型AGL1；蛋白質・脂質複合体）の溶液を得た。

[0129] 得られたDMPC結合型AGL1の分散性を、Native-PAGEによって調べた（図2）。図2に示すように、DMPC結合型AGL1（レーン4）は天然型HDL（Biomedical Technologies社 #BT-914）（レーン2）と同様の均一粒子であることがわかった。また移動度の相違から、DMPC結合型AGL1は、天然型HDLの1.5倍程度の粒径であると推測できた。また（１）で得られた脂質非結合型のAGL1（レーン3）も均一に分散しており、天然型ヒトApoA1（Biomedical Technologies社 #BT-927）（レーン1）とNative-PAGEにおいて同一の挙動を示すことも確認された。

図2中の数字は、分子量マーカー（中央のレーン）の各分子量（kDa）である。

[0130] （３）AGL1のGLP-1受容体（GLP-1R）アゴニスト活性

グルカゴン様ペプチド-1受容体（GLP-1R）遺伝子（Genbank No. NM002062）を、哺乳動物用発現ベクターpIRESneo3（クロンテック社）のNheI/EcoRIサイトに導入し、発現ベクターpIGLRを構築した。発現ベクターpIGLRをG418の存在下でLipofectamine 2000（Invitrogen社）を用いてCHO-K1株に導入した。受容体GLP-1Rの安定発現株は、600μg/mLのG418が含有された10%FBS/Ham's F-12培地で単離し、GLP-1R安定発現株GLP-1R/CHOを樹立した。

[0131] 上記GLP-1R/CHO及び「CatchPoint Cyclic-AMP Fluorescent Assay Kit」（Molecular Devices社：R8088）を用い、（１）で作製した脂質非結合型AGL1（融合蛋白質）と、（２）で作製した脂質結合型AGL1（蛋白質・脂質複合体）について、受容体アゴニスト活性を測定した（図3、図4）。実験操作は、Molecular Devices社のマニュアルに従って行った

。コントロール試験として、天然型GLP-1（ペプチド研究所社；4344-v）をリガンドとする実験も行った。また、作用特異性の検定のために、GLP-1RアンタゴニストであるExcendin（5-39）（ペプチド研究所：4345-v）による阻害実験も行った（図4）。

[0132] 図3に示すように、脂質結合型AGL1（■；+DMPC）のEC50値は6.1 nM、脂質非結合型AGL1（○；-DMPC）のEC50値は4.5 nMであった。シングルナノモルオーダーの濃度で機能することから、脂質結合型AGL1と脂質非結合型AGL1は、いずれも医薬として使用可能であることがわかった。

また、図4に示すように、AGL1のGLP-1Rアゴニスト活性は、GLP-1RアンタゴニストであるExcendin（5-39）によってほぼ完全に阻害されることがわかった。このことから上記アゴニスト活性は、天然型GLP-1と同様の、AGL1の特異的作用によることが証明された。

[0133] （4）AGL1のプロテアーゼ耐性

50 μ LのPBS溶液中で、天然型GLP-1（ペプチド研究所社；4344-v）又は（1）で作製した脂質非結合型AGL1に、3 mU（ 10^{-6} M濃度）のヒトジペプチジルペプチダーゼIV（DPP IV）を37℃で3時間反応させた。その後、（3）と同様の方法で、受容体アゴニスト活性を測定した（図5、図6）。

図5に示すように、天然型GLP-1は、DPP IV処理によってEC50値が 2.6×10^{-11} M（●；-DPP IV）から 9.7×10^{-10} M（○；+DPP IV）に明らかに上昇した。一方、図6に示すように、AGL1は、EC50値がDPP IV未処理（▲；-DPP IV）では 2.2×10^{-9} M（2.2 nM）、DPP IV処理後（△；+DPP IV）では 1.7×10^{-9} M（1.7 nM）であり、殆ど変化しなかった。このことは、天然型GLP-1はDPP IV感受性が極めて高いのに対し、AGL1はDPP IV感受性が殆どないことを示していた。以上より、GLP-1にApoA Iを融合させることによって、GLP-1にプロテアーゼ耐性を付与できることが示さ

れた。

[0134] (2) で調製したDMPC結合型AGL1 (脂質結合型AGL1) についても、同様にプロテアーゼ耐性を評価した (図7)。図7に示すように、EC50値がDPPIV未処理 (▲; -DPPIV) では 2.3×10^{-9} M (2.3 nM)、DPPIV処理後 (△; +DPPIV) では 3.9×10^{-9} M (3.9 nM) であり、DMPC結合型の場合でもEC50値は殆ど変化しなかった。これにより、脂質結合型AGL1も、脂質非結合型AGL1と同様に、プロテアーゼ耐性を獲得したことが判明した。

[0135] 以上より、GLP-1とApoA1との融合蛋白質であるAGL1が、*in vivo*において作用が長期間に渡って持続するGLP-1R作動薬として使用可能であることが示された。

[0136] (5) AGL1のマウスでの血糖上昇抑制効果の検証

7週齢のマウス (雄: C57BL/6J) を、被験物質投与前日より16時間以上絶食させた。被験物質を尾静脈から投与後 (1mg/kg) して30分後に、20%グルコース溶液 (大塚製薬) を経口投与 (10mL/kg) した。経口投与後10、30、60および120分の時点で尾静脈から約50μL採血した。グルコースCII-テストワコー (和光純薬) を用いて血漿中グルコース濃度を測定した。被験物質としては、

A: 1×PBS (インビトロジェン社)

B: 天然型ヒトApoA1 (Biomedical Technologies社; #BT-927)

C: 天然型ヒトHDL (Biomedical Technologies社; #BT-914)

D: DMPC非結合型AGL1

E: DMPC結合型AGL1

の5種類を用いた。被験物質B~Eは、全て1×PBS (インビトロジェン社) に対して透析したものを使用した。各試験群につきマウス8匹を用い、A投与群とその他の群との間で、それぞれstudentのt-検定により平均値の差の検定を行った。有意差の検定は、有意水準を両側5%として行った。統

計学的検定はE X S U S (Version 7.7.1, SAS Institute Japan Inc.) を用いて行った。結果を図8に示す。

[0137] 図8に示すように、天然型ヒトA p o A I投与群(○)と天然型ヒトH D L投与群(●)では全く血糖上昇抑制効果は見られなかったが、D M P C結合型A G L 1投与群(▲)とD M P C非結合型A G L 1投与群(△)の双方で、糖負荷30分以後に有意な血糖上昇抑制効果が見出された($P < 0.01$)。

[0138] 以上より、G L P - 1とA p o A Iとの融合蛋白質であるA G L 1が、in vivoで血糖上昇抑制効果を有し、糖尿病治療薬として使用可能であることが示された。

[0139] (6) G L P - 1とA p o A I部分断片の融合ペプチド(A C G L 1)の発現と精製

(1)で作製したp T 2 4 A G L 1を鋳型として、配列番号17と配列番号18に示す各プライマーを用いてP C Rを行い、A p o A IのC末端領域(配列番号1のアミノ酸番号209~241の部分)に相当する遺伝子を含むD N A断片を増幅させた。得られたD N A断片をpT7Blue-T vector(タカラバイオ社)にクローニングした後、B a m H I及びH i n d I I Iによって切り出した。切り出したD N A断片を、p T 2 4 A G L 1のB a m H I及びH i n d I I I切断部位に挿入し、G L P - 1とA p o A IのC末端部分との融合ペプチド(A C G L 1)をコードする発現ベクターp T 2 4 A C G L 1を作製した。

[0140] 一方、配列番号19に示したThermococcus sp KS-1株由来F K B P型P P I a s e (T c F K)遺伝子(GenBank No. AB012209)に相当する合成D N Aを鋳型とし、配列番号20及び配列番号21に示す各プライマーを用いてP C Rを行い、pT7Blue-T vectorへクローニングした。T c F K遺伝子をN d e I及びS a c Iで切り出し、p E T 2 4 a(ノバジェン社)のN d e I - S a c I部位へ挿入し、p T 2 4 T c F Kを構築した。

[0141] p T 2 4 A C G L 1を鋳型とし、配列番号22及び配列番号23に示す各

プライマーを用いてPCRを行ってACGL1遺伝子を増幅し、pT7Blue-T vectorに導入後、SacI及びHindIIIで切り出した。切り出したACGL1遺伝子を含むDNA断片を、pT24TcFKのSacI-HindIII部位に挿入し、TcFKとACGL1との融合蛋白質（FKACGL1）をコードするpT24FKACGL1を構築した。FKACGL1（27kDa）の遺伝子の塩基配列及び対応するアミノ酸配列を配列番号24に、アミノ酸配列のみを配列番号25に示す。なお配列番号24、25に示すように、FKACGL1のC末端には6残基からなるヒスチジントグが付加されている。

[0142] 上記pT24FKACGL1を大腸菌BL21（DE3）（Invitrogen社）に導入し、組換え体を作製した。この組換え体を2XY₉T培地にて26℃で40時間培養した。回収した菌体を「緩衝液A」に懸濁し、超音波破碎によって細胞を破碎した。細胞破碎後、4℃で一昼夜インキュベートした。得られた細胞破碎液に対して40000gで1時間超遠心分離を行い、上清を得た。この上清を、予め緩衝液Aで平衡化されたNi-Sephrose HP（GE社）と混合し、4℃で一昼夜インキュベートした。本混合液を2000rpmで5分間遠心分離を行い、Ni-Sephroseビーズを回収した。回収したビーズを「緩衝液B」で2回洗浄した後、「緩衝液C」でFKACGL1を溶出した。溶出したFKACGL1画分を、「緩衝液D」に対して4℃で一昼夜透析を行った。さらに「緩衝液E」、脱イオン水で透析を行った。

[0143] 6mLの透析内液に、臭化シアン100mgを溶解させた蟻酸を14mL添加し、窒素雰囲気下で室温・暗所で16時間インキュベートした。臭化シアンによる断片化処理したFKACGL1溶液を水酸化ナトリウムでpH2.8に調整した後、2Mトリス塩酸溶液に対して2回透析を行った。透析内液へ終濃度8Mになるように尿素を溶解させ、pH7.8に調整した。本溶液を「緩衝液A」で平衡化されたNi-Sephrose HP（GE社）と混合し、4℃で一昼夜インキュベートした。本混合液を2000rpm

で5分間遠心分離を行い、Ni-Sephroseビーズを回収した。回収したビーズを、「緩衝液B」で2回洗浄した後、「緩衝液C」でTcFKから遊離したACGL1を溶出した。ACGL1溶液を「緩衝液D」に対して、一昼夜4℃で透析した後、さらにPBSに対して5回透析を行った。

各精製工程における、SDS-PAGE及び抗GLP-1抗体（フナコシ社：ABB-2506-69）を用いたウエスタンブロッティングの結果を、それぞれ図9と図10に示す。

[0144] (7) 脂質結合型ACGL1の調製と分散性の検定

(6)で得られたACGL1と、その1倍、2.5倍、又は10倍重量のDMPCを混合し、ACGL1及びDMPCの複合体形成を調べた。具体的には、クロロホルムに溶解させた2mg/mL、5mg/mL、又は20mg/mLのDMPC溶液250μLを、ガラス管内で窒素ガスにより乾燥させた。その後、1mLのPBS(pH7.4)を添加し、超音波によってDMPCを分散させ、白色懸濁液を得た。本DMPC懸濁液に、上記(6)で得られた0.5mg/mLの精製ACGL1溶液1mLを加えて混合し、室温で3時間以上放置した。これにより、DMPC結合型ACGL1（脂質結合型ACGL1）が得られた。得られたDMPC結合型ACGL1の分散性を、Native-PAGEによって調べた（図11）。図11のレーン3に示されるように、2.5倍重量のDMPCと混合させたACGL1は、DMPC結合型AGL1（図2のレーン4参照）と同様の分子量250kDa程度の均一粒子を形成していることがわかった。

[0145] (8) ACGL1のGLP-1受容体（GLP-1R）アゴニスト活性

(6)で調製されたACGL1（脂質非結合型ACGL1）と(7)で調製された脂質結合型ACGL1について、(3)と同様の方法で、GLP-1Rアゴニスト活性を測定した（図12）。またExendin(5-39)を用いた阻害実験も同様にして行った（図13）。

図12に示すように、天然型GLP-1（●）のEC50値が 2.7×10^{-11} Mであったのに対し、脂質結合型ACGL1（◆；+DMPC）のEC50

0値は $1.4 \times 10^{-9} \text{M}$ (1.4 nM)、脂質非結合型ACGL1 (○; -DMPC) EC50値は $2.7 \times 10^{-9} \text{M}$ (2.7 nM)であった。いずれもシングルナノモルオーダーの濃度で機能することから、脂質結合型ACGL1と脂質非結合型ACGL1は、いずれも医薬として使用可能であることがわかった。

[0146] また図13に示すように、脂質非結合型ACGL1 (●)のGLP-1Rアゴニスト活性 (EC50 = 1.1 nM)は、GLP-1RアンタゴニストであるExendin (5-39)によって著しく抑制された (○)。このことから、上記アゴニスト活性は、天然型GLP-1と同様の、ACGL1の特異的作用によることが証明された。

[0147] (9) ACGL1のプロテアーゼ耐性

(6)で調製されたACGL1 (脂質非結合型ACGL1)と(7)で調製された脂質結合型ACGL1について、(4)と同様の方法で、DPP IV耐性を調べた (図14、図15)。図14に示すように、天然型GLP-1は、DPP IV処理によってEC50値は $2.2 \times 10^{-11} \text{M}$ (●: -DPP IV)から $1.1 \times 10^{-9} \text{M}$ (○: +DPP IV)に明らかに上昇した。一方、ACGL1は、EC50値がDPP IV未処理 (▲; -DPP IV)では $3.1 \times 10^{-9} \text{M}$ (3.1 nM)、DPP IV処理後 (△; +DPP IV)では $2.3 \times 10^{-9} \text{M}$ (2.3 nM)であり、殆ど変化しなかった。このことは、ApoA Iの部分断片配列と融合させたGLP-1も、AGL1と同様に、DPP IV耐性を獲得したことを示していた。以上より、GLP-1にApoA I部分断片を融合させることによって、GLP-1にプロテアーゼ耐性を付与できることが示された。

[0148] また図15に示すように、DMPC結合型ACGL1についても、EC50値がDPP IV未処理 (▲; -DPP IV)では $2.8 \times 10^{-9} \text{M}$ (2.8 nM)、DPP IV処理後 (△; +DPP IV)では $2.2 \times 10^{-9} \text{M}$ (2.2 nM)であり、DMPC結合型の場合でもEC50値は殆ど変化しなかった。このことは、DMPC結合型ACGL1も、DMPC非結合型ACGL

1と同様にDPP IV耐性を獲得したことを示していた。

[0149] 以上より、GLP-1とAp o A I部分断片との融合ペプチドであるACGL1が、in vivoにおいて作用が長期間に渡って持続するGLP-1 R作動薬として使用可能であることが示された。

請求の範囲

- [請求項1] アポリポ蛋白質 A I 又はその改変体と、有効成分となる治療用ペプチドとが、ペプチド結合を介して連結してなる融合蛋白質、を含有する医薬。
- [請求項2] 前記改変体は、アポリポ蛋白質 A I の部分断片である請求項 1 に記載の医薬。
- [請求項3] 前記改変体は、アポリポ蛋白質 A I の両親媒性配列を 1 ～ 6 個含むポリペプチドである請求項 1 に記載の医薬。
- [請求項4] 前記改変体は、アポリポ蛋白質 A I の全長又は部分断片のアミノ酸変異体である請求項 1 に記載の医薬。
- [請求項5] 前記改変体は、アポリポ蛋白質 A I の模倣ペプチドである請求項 1 に記載の医薬。
- [請求項6] 前記改変体は、キュービリン結合性が低下又は欠失したものである請求項 1 ～ 5 のいずれかに記載の医薬。
- [請求項7] 前記アポリポ蛋白質 A I は、ヒト由来のものである請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載の医薬。
- [請求項8] 前記治療用ペプチドは、細胞表層受容体に対するアゴニストである請求項 1 ～ 7 のいずれかに記載の医薬。
- [請求項9] 前記治療用ペプチドは、血糖をコントロールする機能を有するものである請求項 1 ～ 7 のいずれかに記載の医薬。
- [請求項10] 前記治療用ペプチドは、インスリン抵抗性改善機能を有するものである請求項 1 ～ 7 のいずれかに記載の医薬。
- [請求項11] 前記治療用ペプチドは、グルカゴン様ペプチド-1 活性を有するポリペプチドである請求項 1 ～ 7 のいずれかに記載の医薬。
- [請求項12] 前記治療用ペプチドは、エリスロポエチン活性を有するポリペプチドである請求項 1 ～ 7 のいずれかに記載の医薬。
- [請求項13] 前記治療用ペプチドは、サイトカイン又はケモカインに対する可溶性受容体である請求項 1 ～ 7 のいずれかに記載の医薬。

- [請求項14] 前記治療用ペプチドは、免疫グロブリンのVH領域とVL領域のいずれか一方又は両方を含むポリペプチドである請求項1～7のいずれかに記載の医薬。
- [請求項15] 前記融合蛋白質には、前記治療用ペプチドに対する分解酵素の阻害剤がさらに連結されている請求項1～14のいずれかに記載の医薬。
- [請求項16] 前記分解酵素は、ジペプチジルペプチダーゼI Vである請求項15に記載の医薬。
- [請求項17] 前記融合蛋白質には、第2の治療成分がさらに連結されている請求項1～16のいずれかに記載の医薬。
- [請求項18] 前記治療用ペプチドが血糖をコントロールする機能を有するもの又はグルカゴン様ペプチド-1受容体アゴニストであり、前記第2の治療成分が膵臓疾患治療薬又は肝臓疾患治療薬である請求項17に記載の医薬。
- [請求項19] 前記第2の治療成分は、炎症抑制剤、抗癌剤、又は肝硬変治療薬である請求項18に記載の医薬。
- [請求項20] 前記アポリポ蛋白質A I又はその改変体と治療用ペプチドとの間に、リンカーが介在している請求項1～19のいずれかに記載の医薬。
- [請求項21] 前記融合蛋白質に脂質がさらに結合し、蛋白質・脂質複合体を形成している請求項1～20のいずれかに記載の医薬。
- [請求項22] 前記蛋白質・脂質複合体は、前記治療用ペプチドに対する分解酵素の阻害剤をさらに含んでいる請求項21に記載の医薬。
- [請求項23] 前記蛋白質・脂質複合体は、第2の治療成分をさらに含んでいる請求項21又は22に記載の医薬。
- [請求項24] 前記治療用ペプチドが血糖をコントロールする機能を有するもの又はグルカゴン様ペプチド-1受容体アゴニストであり、前記第2の治療成分が膵臓疾患治療薬又は肝臓疾患治療薬である請求項23に記載の医薬。
- [請求項25] 前記第2の治療成分は、炎症抑制剤、抗癌剤、又は肝硬変治療薬で

ある請求項 24 に記載の医薬。

[請求項26] 経口投与用又は経粘膜投与用である請求項 1 ～ 25 のいずれかに記載の医薬。

[請求項27] 請求項 1 ～ 20 のいずれかで定義された融合蛋白質又は請求項 21 ～ 25 のいずれかで定義された蛋白質・脂質複合体、を含有する機能性食品。

[請求項28] 請求項 1 ～ 20 のいずれかで定義された融合蛋白質を発現する組換え体を有効成分として含有する医薬又は機能性食品。

[請求項29] 前記組換え体は、前記融合蛋白質を表層に提示可能な微生物又は細胞である請求項 28 に記載の医薬又は機能性食品。

[請求項30] 前記微生物は、酵母である請求項 29 に記載の医薬又は機能性食品。

[請求項31] 目的蛋白質に対して、アポリポ蛋白質 A I 又はその改変体を連結することを特徴とする目的蛋白質の安定化方法。

[請求項32] 前記改変体は、アポリポ蛋白質 A I の部分断片である請求項 31 に記載の目的蛋白質の安定化方法。

[請求項33] 前記改変体は、アポリポ蛋白質 A I の両親媒性配列を 1 ～ 6 個含むポリペプチドである請求項 31 に記載の目的蛋白質の安定化方法。

[請求項34] 前記改変体は、アポリポ蛋白質 A I の全長又は部分断片のアミノ酸変異体である請求項 31 に記載の目的蛋白質の安定化方法。

[請求項35] 前記改変体は、アポリポ蛋白質 A I の模倣ペプチドである請求項 31 に記載の目的蛋白質の安定化方法。

[請求項36] アポリポ蛋白質 A I 又はその改変体と、グルカゴン様ペプチド-1 活性を有するポリペプチドとが、ペプチド結合を介して連結してなる融合蛋白質。

[請求項37] 請求項 36 に記載の融合蛋白質をコードする核酸。

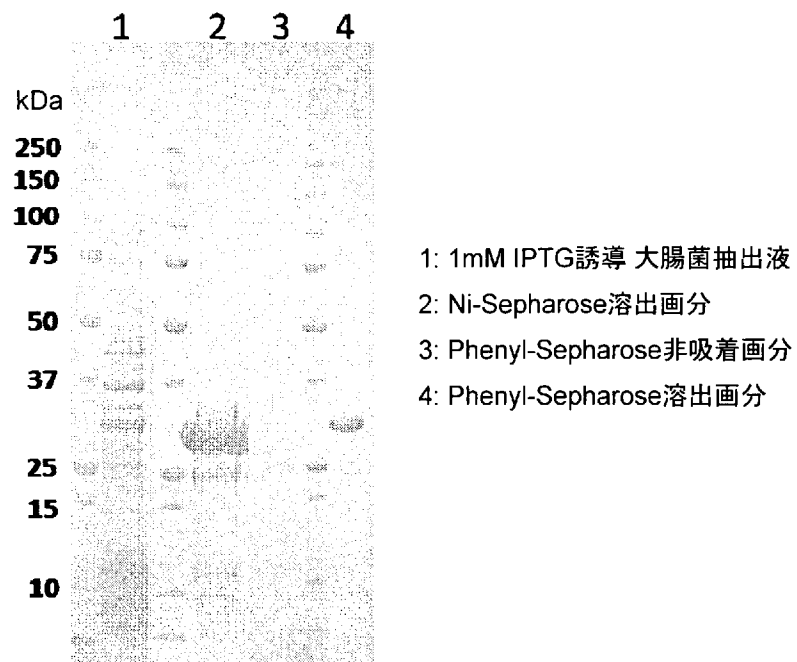
[請求項38] 請求項 37 に記載の核酸を有する組換え体。

[請求項39] 細菌、酵母、カビ、藻類、植物細胞、昆虫細胞、動物細胞、植物、

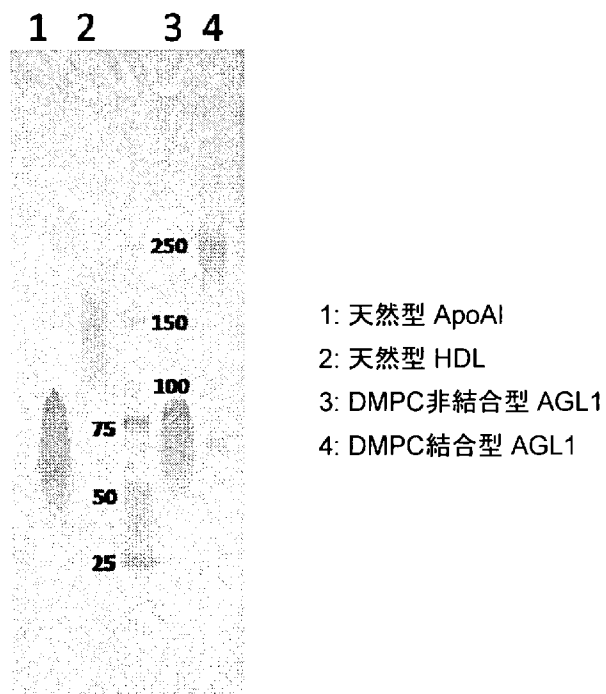
又は動物である請求項 3 8 に記載の組換え体。

[請求項40] 組換え体が酵母であり、前記融合蛋白質を表層に提示可能である請求項 3 9 に記載の組換え体。

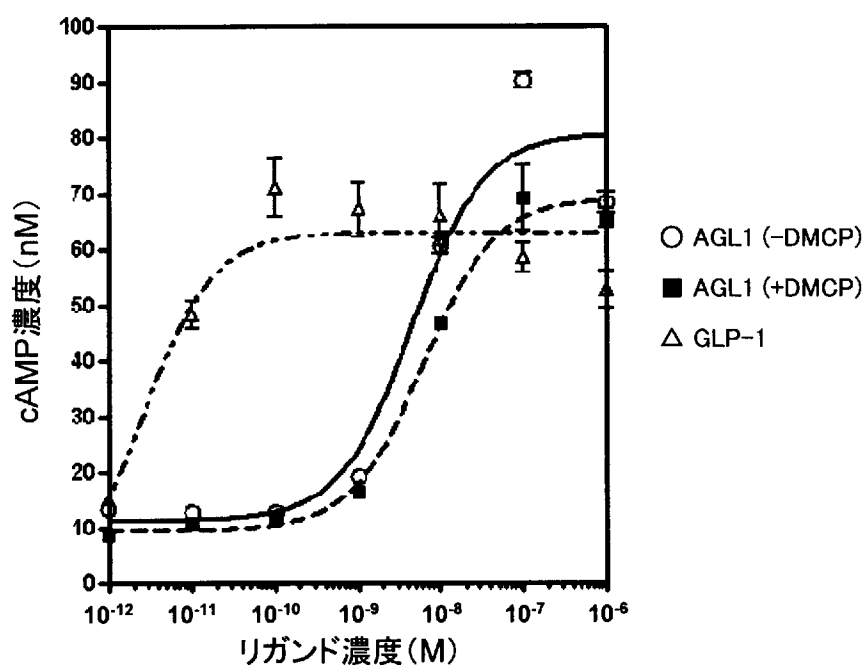
[図1]



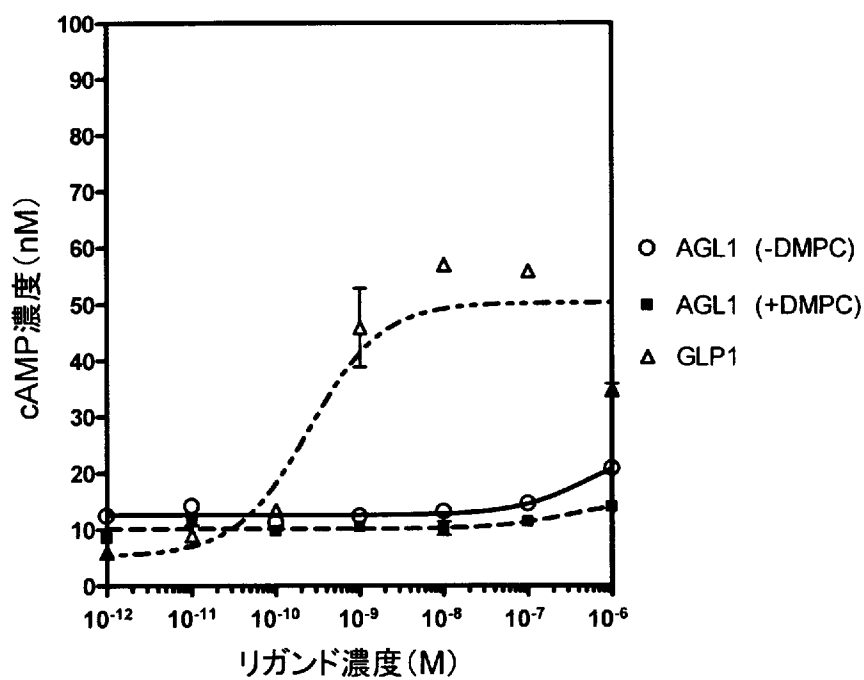
[図2]



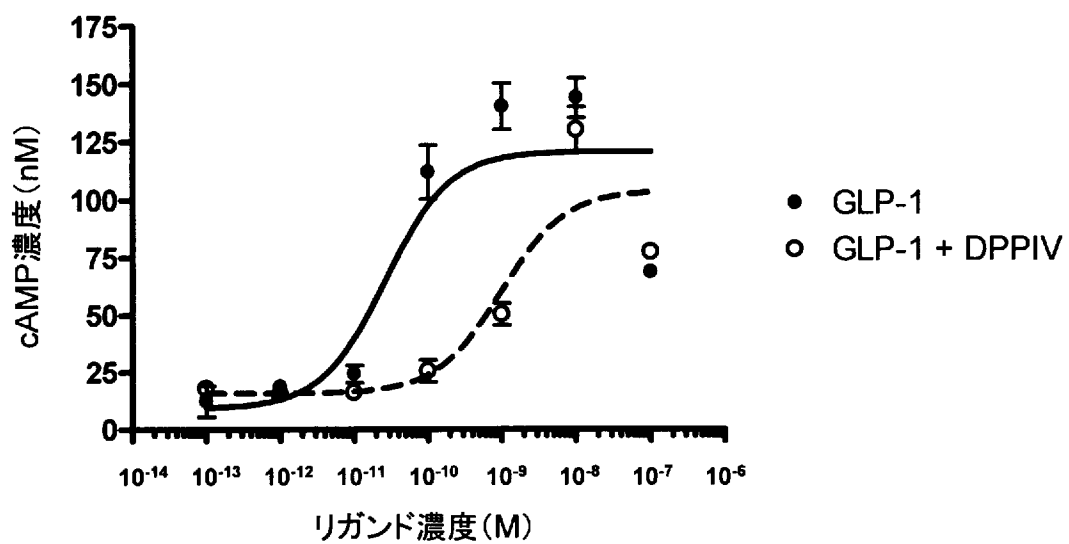
[図3]



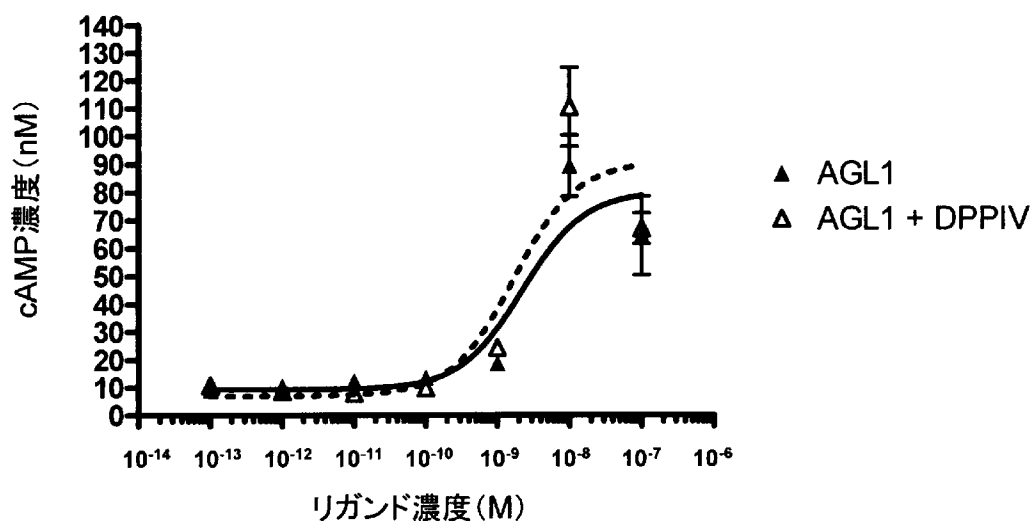
[図4]



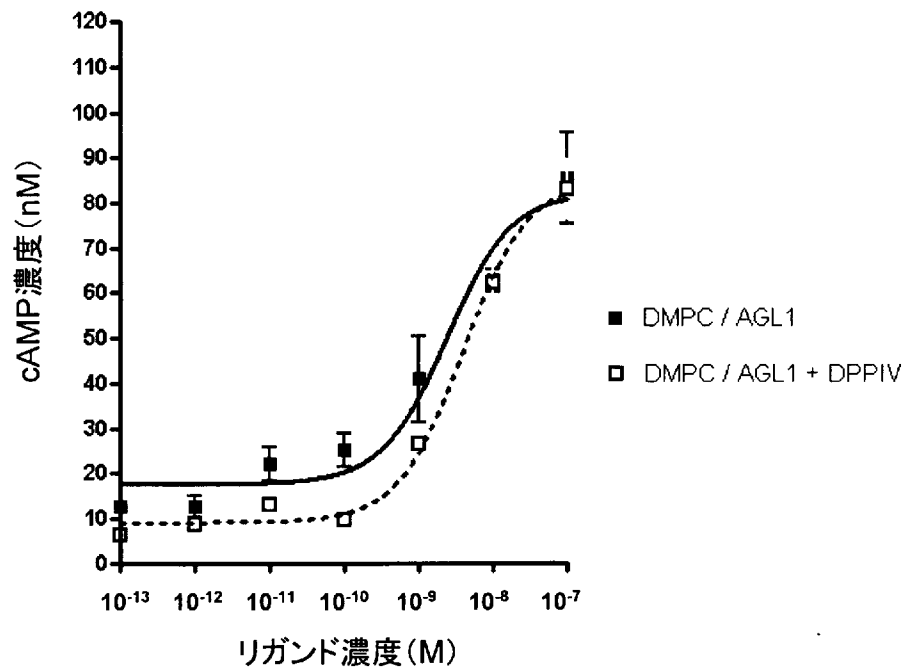
[図5]



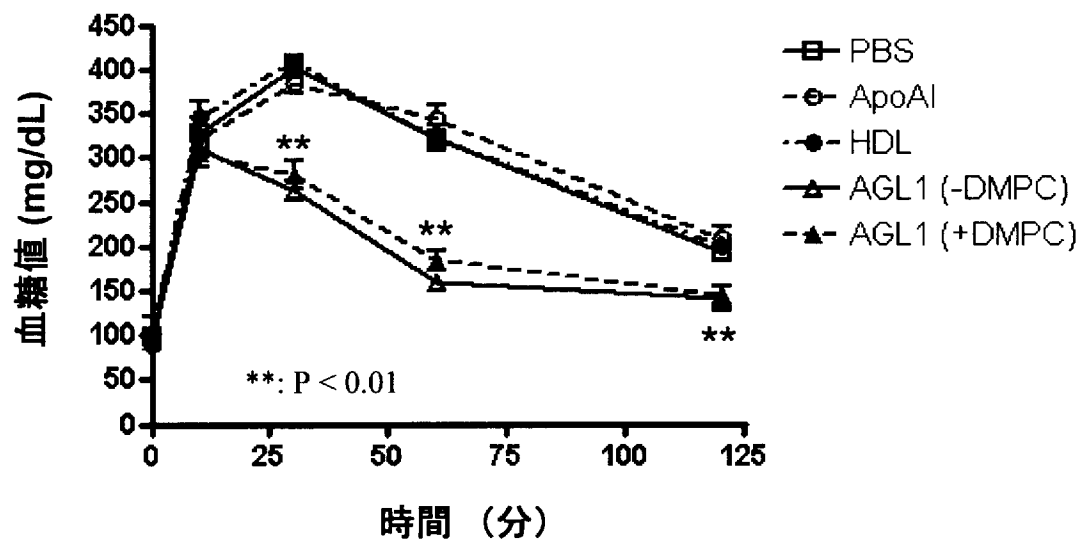
[図6]



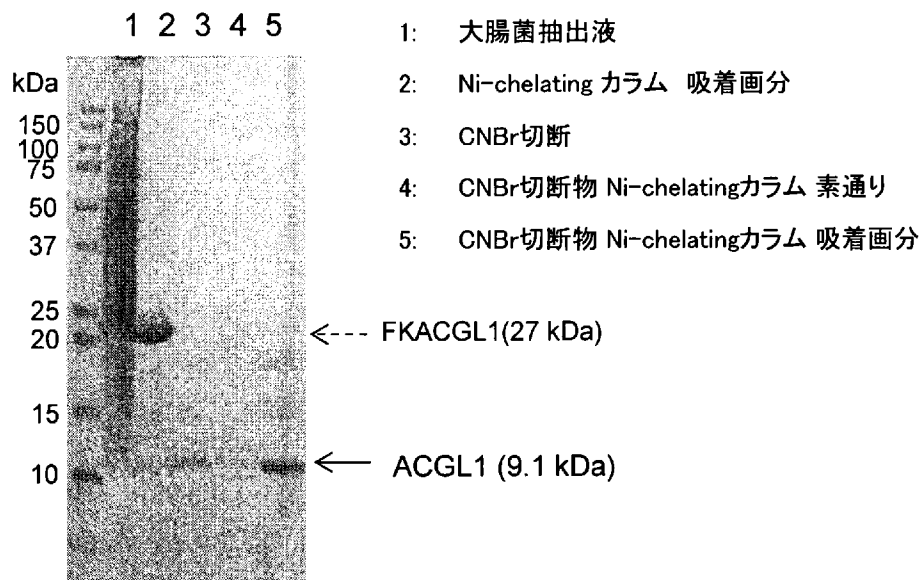
[図7]



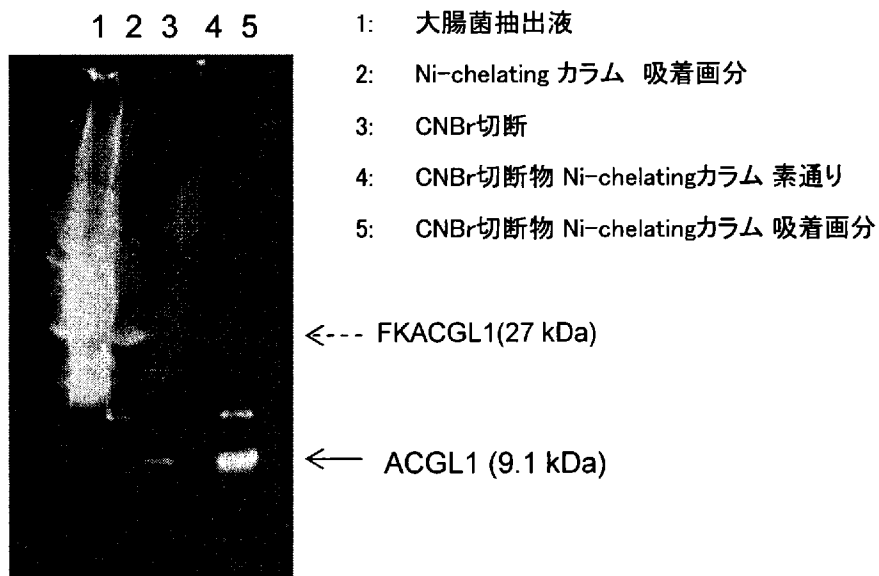
[図8]



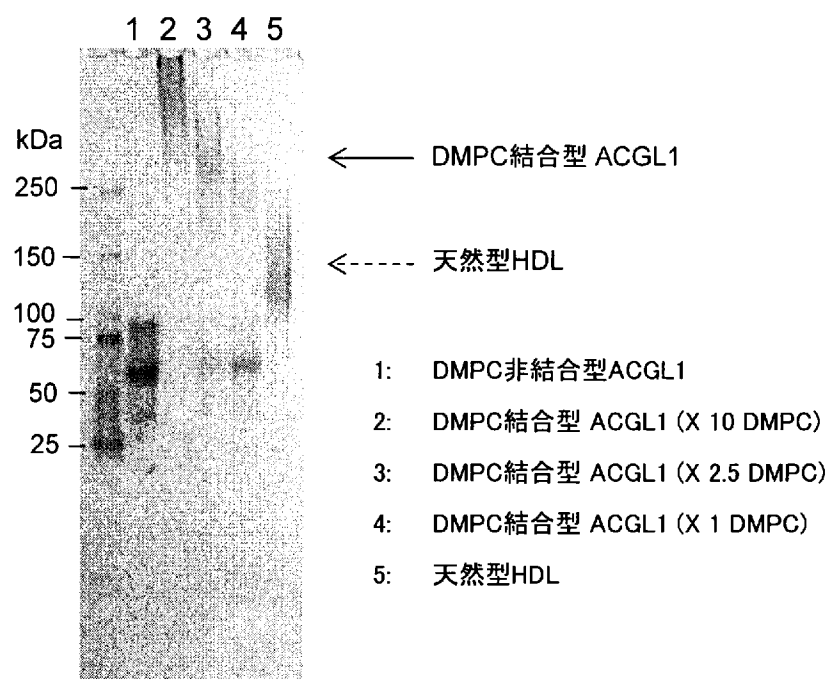
[図9]



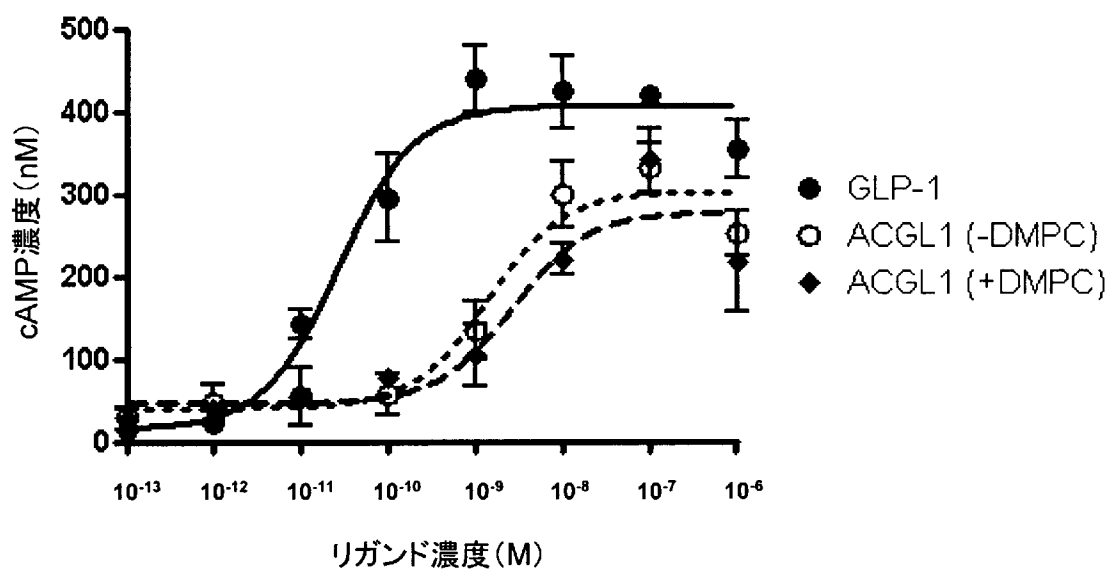
[図10]



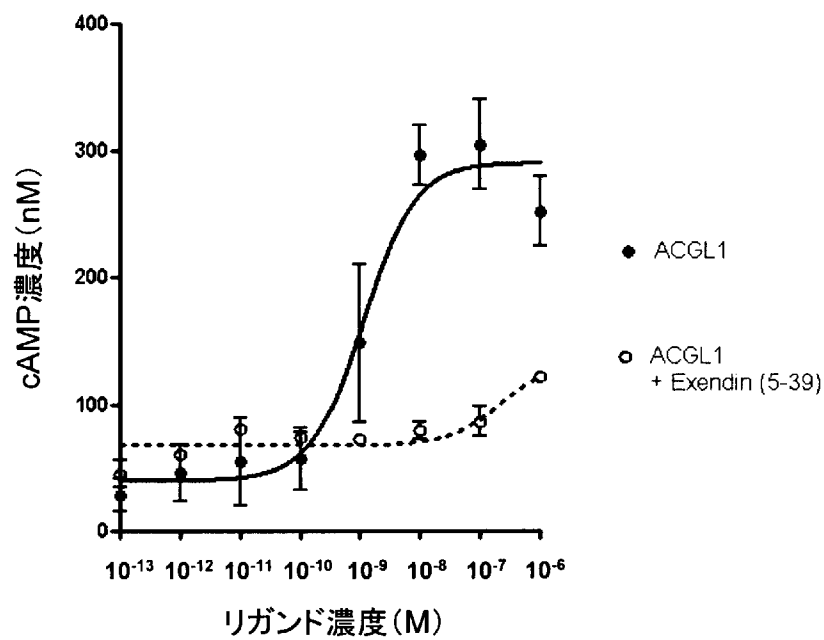
[図11]



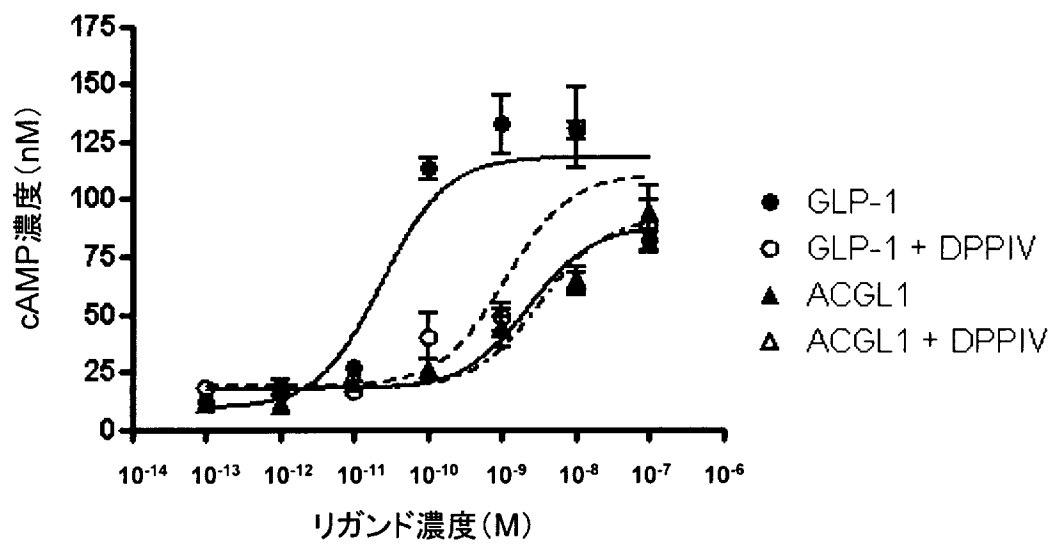
[図12]



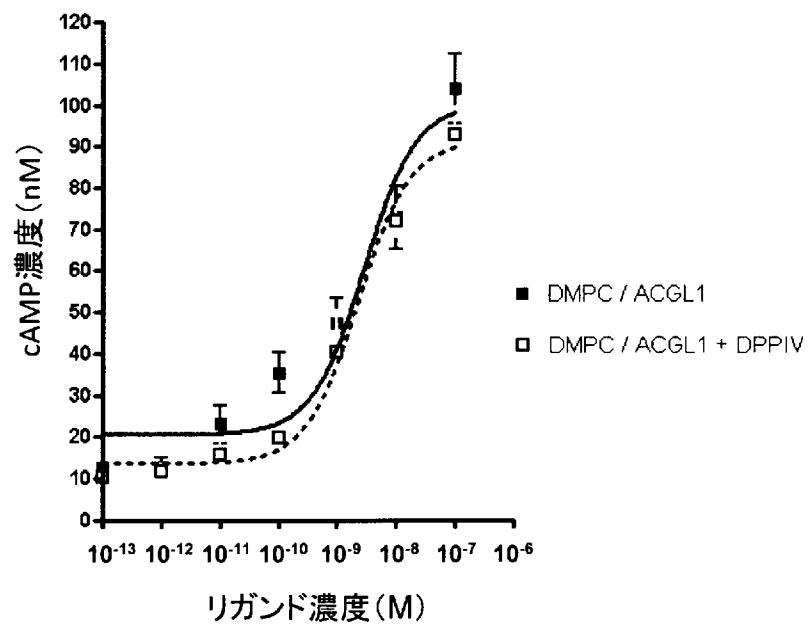
[図13]



[図14]



[図15]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/060688

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet.

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)

C12N15/09, A23L1/305, A61K38/22, A61K38/26, A61K39/395, A61K47/48, A61P1/16, A61P1/18, A61P3/08, A61P3/10, A61P7/06, A61P29/00, A61P35/00, A61P43/00, C07K14/605, C07K14/775, C07K19/00, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2012
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2012	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2012

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

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	EP 2305309 A2 (Proyecto de Biomedicina Cima, S.L.), 06 April 2011 (06.04.2011), claim 2 & JP 2011-523857 A & US 2011/0293557 A1 & WO 2009/150284 A2 & CN 102123737 A	1-10, 12-14, 17, 19-21, 23, 26-35/11, 15, 16, 18, 22, 24, 25, 36-40
Y	WO 2006/096515 A2 (BIOREXIS PHARMACEUTICAL CORP.), 14 September 2006 (14.09.2006), claims 1, 9 & US 2006/0205037 A1 & EP 1858546 A & JP 2008-531059 A	11, 15, 16, 18, 22, 24, 25, 36-40

☒ 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
05 June, 2012 (05.06.12)

Date of mailing of the international search report
12 June, 2012 (12.06.12)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/060688

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2005-529108 A (Amgen, Inc.), 29 September 2005 (29.09.2005), claim 11 & WO 2003/086444 A1 & US 2003/0191056 A1 & US 2003/0195154 A1 & US 2009/0191624 A1 & EP 1496926 A & EP 2298331 A2	11, 15, 16, 18, 22, 24, 25, 36-40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/060688

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

(International Patent Classification (IPC))

C12N15/09(2006.01)i, A23L1/305(2006.01)i, A61K38/22(2006.01)i,
A61K38/26(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61K47/48(2006.01)i,
A61P1/16(2006.01)i, A61P1/18(2006.01)i, A61P3/08(2006.01)i,
A61P3/10(2006.01)i, A61P7/06(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i,
A61P35/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C07K14/605(2006.01)i,
C07K14/775(2006.01)i, C07K19/00(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i,
C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national
classification and IPC)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/060688

The invention in claim 6 relates to a drug which comprises a modification having a desired characteristic of "reduction or deletion of cubilin-binding ability" and the description discloses such a modification as a preferred embodiment (paragraph [0069]).

However, the description of the present application discloses no specific method for reducing or deleting cubilin-binding ability. Meanwhile, it cannot be considered that the aforesaid method is a common technical feature in the art.

In conclusion, the invention of claim 6 is lack in the support within the meaning of PCT Article 6.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. 特別ページ参照

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/09, A23L1/305, A61K38/22, A61K38/26, A61K39/395, A61K47/48, A61P1/16, A61P1/18, A61P3/08, A61P3/10, A61P7/06, A61P29/00, A61P35/00, A61P43/00, C07K14/605, C07K14/775, C07K19/00, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 2 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 2 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 2 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/ Y Y	EP 2305309 A2 (Proyecto de Biomedicina Cima, S.L.) 2011.04.06, Claim 2 & JP 2011-523857 A & US 2011/0293557 A1 & WO 2009/150284 A2 & CN 102123737 A WO 2006/096515 A2 (BIOREXIS PHARMACEUTICAL CORPORATION) 2006.09.14, Claim 1,9 & US 2006/0205037 A1 & EP 1858546 A & JP 2008-531059 A	1-10, 12-14, 17, 19-21, 23, 26-35/ 11, 15, 16, 18, 22 , 24, 25, 36-40 11, 15, 16, 18, 22 , 24, 25, 36-40

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

0 5 . 0 6 . 2 0 1 2

国際調査報告の発送日

1 2 . 0 6 . 2 0 1 2

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

佐久 敬

4 B

3 0 3 7

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2005-529108 A (アムジエン・インコーポレーテッド) 2005. 09. 29, 請求項 11 & WO 2003/086444 A1 & US 2003/0191056 A1 & US 2003/0195154 A1 & US 2009/0191624 A1 & EP 1496926 A & EP 2298331 A2	11, 15, 16, 18, 22 , 24, 25, 36-40

発明の属する分野の分類

C12N15/09(2006.01)i, A23L1/305(2006.01)i, A61K38/22(2006.01)i, A61K38/26(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61K47/48(2006.01)i, A61P1/16(2006.01)i, A61P1/18(2006.01)i, A61P3/08(2006.01)i, A61P3/10(2006.01)i, A61P7/06(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C07K14/605(2006.01)i, C07K14/775(2006.01)i, C07K19/00(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列 (第 1 ページの 1. c の続き)

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、提出された以下の配列表に基づき国際調査を行った。

a. 提出手段

☐ 紙形式

☒ 電子形式

b. 提出時期

☒ 出願時の国際出願に含まれていたもの

☐ この国際出願と共に電子形式により提出されたもの

☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出されたもの

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しを提出した場合、出願後に提出した配列の写し若しくは追加して提出した配列の写しが、出願時に提出した配列と同一である旨又は出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：

請求項6は、「キュビリン結合性が低下又は欠失したもの」という所望の特性を有する改変体を含む医薬に係る発明であり、明細書の段落〔0069〕には、好ましい実施形態の一つとして記載されている。しかしながら、キュビリン結合性を低下又は欠失させる方法については本願明細書に具体的に開示されておらず、またそのことが当該技術分野において技術常識であったとも認められない。したがって、請求項6に係る発明はPCT第6条の意味での裏付けを欠いている。