

6. 李寬淳 / LEE, Gwan Sun
7. 鄭聖燁 / JUNG, Sung Youb
8. 崔仁榮 / CHOI, In Young

國 籍：(中文/英文)

1.2.3.4.5.6.7.8.韓國 / KR

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項 ☐ 第一款或 ☐ 第二款規定之事實，
其事實發生日期為： 年 月 日。

☒ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

韓國、2008.01.04.、10-2008-0001479

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☐ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於適用於促胰島素肽之長效調配物的促胰島素肽共軛物。明確地說，本發明係關於經修改之促胰島素肽共軛物，其具有明顯經改善之活體內效力持續時間，其係藉著共價連接促胰島素肽與非-肽基聚合物和免疫球蛋白 Fc 來產製，以及製備其之方法。

【先前技術】

肽因其低穩定性，被活體內的蛋白水解酵素降解，而有容易變性之傾向，因此喪失活性，並具有相對較小的尺寸，藉此容易通過腎臟。因此，為了維持包括肽(作為在藥學上有效成份)之醫藥品的血液水平和力價，必須經常對患者投予肽藥物，以維持想要的血中水平和力價。然而，肽藥物通常以注射用製劑之形式被投予，而該等頻繁的投藥引起患者嚴重的疼痛。欲解決這些問題，已經做了許多努力。如同該等努力之一，已經藉著增加肽藥物通過生物學膜的傳送，嘗試經由口咽或鼻咽吸入運送肽藥物。然而，該方法在維持肽藥物之活體內活性上仍是困難的，因為與注射相比較，其具有低的活體內轉移效率。

另一方面，已經對改善肽藥物之血液穩定性，以及在血液中以高水平維持藥物持續長時間做了許多努力，藉此使藥物的藥學效力達到最大。因此需要該等肽藥物的長效

製劑，以增加肽藥物的穩定性，並使力價維持在足夠高的水平，不會在患者中引起免疫反應。

作為使肽穩定並抑制被蛋白水解酵素降解的方法，已經進行一些試驗，以修改對蛋白水解酵素敏感的特定胺基酸序列。例如，GLP-1(7-37 或 7-36 醯胺)，其功能為降低血糖濃度以治療第 2 型糖尿病，具有短的生理學活性半衰期，大約 4 分鐘或更少(Kreymann 等人，1987)，歸因於經由在第 8 個胺基酸(Ala)和第 9 個胺基酸(Asp)之間被二肽基肽酶 IV(dipeptidyl peptidase, DPP IV)切開而喪失 GLP-1 力價。因此，已經對具有對 DPP IV 有抵抗力之 GLP-1 類似物進行各種調查，並已經進行以 Gly(Deacon 等人，1998；Burcelin 等人，1999)，或以 Leu 或 D-Ala(Xiao 等人，2001)取代 Ala8 的試驗，藉此增加對 DPP IV 的抵抗力，同時維持活性。N-端胺基酸，GLP-1 的 His7 是對 GLP-1 活性很重要的，並作為 DPP IV 的標靶。因此，美國專利第 5,545,618 號描述以烷基或醯基基團修改 N-端，且 Gallwitz 等人描述了使第 7 個 His 接受 N-甲基化，或 α -甲基化，或以咪唑取代整個 His，以增加對 DPP IV 的抵抗力，並維持生理學活性。

除了這些修改之外，exendin-4，其為純化自希拉毒蛇(Gila monster)之唾液腺的 GLP-1 類似物(美國專利第 5,424,686 號)，對 DPP IV 有抵抗力，並具有比 GLP-1 更高的生理學活性。因此，其具有比 GLP-1 更長而為 2 至 4 小時的活體內半衰期。然而，僅利用增加對 DPP IV 之抵抗

力的方法，不足以維持生理學活性，且例如在市售之 exendin-4(exenatide)的情況下，需要每天兩次注射至患者，這對患者仍是困難的。

這些促胰島素肽有一問題，通常是該肽的尺寸太小。因此，其不能在腎臟中被回收，然後以體外之方式排出。因此，已經使用以化學方式將具有高溶解度之聚合物質（如聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)）加在肽的表面上，以抑制在腎臟中流失的方法。

PEG 非-專一地與標靶肽的特定位置或各種位置結合以給予增加肽分子量的效果，並因此抑制由腎臟流失且防止水解而不會引起任何副作用。例如，國際專利公開案第 WO 2006/076471 號描述 PEG 與 B-型利尿鈉肽或 BNP 結合，該利尿鈉肽(或 BNP)與 NPR-A 結合以活化 cGMP 的產生，其導致動脈血壓的降低，因此用來作為鬱血性心衰竭的治療劑，藉此維持生理學活性。美國專利第 6,924,264 號描述 PEG 與 exendin-4 的離胺酸殘基結合，以增加其活體內停留時間。然而，該方法雖增加了 PEG 的分子量，藉此增加肽藥物的活體內停留時間，但隨著分子量的增加，肽藥物的力價明顯降低，且亦降低了與該肽的反應性。因此，不合意地降低了產量。

國際專利公開案第 WO 02/46227 號描述藉著使用遺傳重組技術，偶聯 GLP-1、exendin-4 或其類似物與人類血清白蛋白或免疫球蛋白區(Fc)而製備的融合蛋白。美國專利第 6,756,480 號描述藉著偶聯副甲狀腺激素(parathyroid

hormone, PTH)及其類似物和 Fc 區而製備的 Fc 融合蛋白。這些方法可解決諸如低聚乙二醇化產量和非-專一性之類的問題，但其等仍有增加血中半衰期之效果不如預期顯著而且有時力價還是很低的問題。為了使增加血液半衰期的效果達到最大，使用各種肽連接子，但很可能引起免疫反應。此外，若使用具有雙硫鍵的肽，例如 BNP 被使用，則有錯誤摺疊的高度可能。因此，該等肽難以被使用。

此外，GLP-1 衍生物，NN2211，係藉著 GLP-1 之胺基酸取代來製備，並與醯基側鏈結合以與白蛋白形成非-共價鍵，藉此增加其活體內停留時間。然而，它具有 11 到 15 小時的半衰期，與 exendin-4 相比較，不代表有明顯增加的半衰期。因此 GLP-1 衍生物仍需要每天注射一次(Nauck 等人，2004)。此外，CJC-1131 是 GLP-1 衍生物，其具有順丁烯二醯亞胺反應基，用以使 GLP-1 與血液中的白蛋白共價結合，並已經為了增加活體內半衰期而努力嘗試發展 CJC-1311，但該等努力現在已停止。後續提出的物質，CJC-1134，則是與重組白蛋白共價結合的 exendin-4，但沒有展現出增加血液穩定性的明顯效果，具有大約 17 小時的血液半衰期(大鼠)(Thibauoleau 等人，2006)。

【發明內容】

揭示

技術性問題

因此，本發明者以位置-專一性之方式，在 N-端以外的胺基酸殘基處，藉著共價鍵使免疫球蛋白 Fc 和非-肽基

根據本發明製備之肽共軛物可具有活性，其依據欲與促胰島素肽連接的位置而改變。例如，其可分別與 N-端，和 N-端以外的其他端，如 C-端偶聯，代表在試管內活性上的差異。在低 pH 值下，醛反應基選擇性地與 N-端結合，並可在高 pH 值-如 pH9.0 下與離胺酸殘基結合，形成共價鍵。允許聚乙二醇化反應在各種 pH 值下進行，然後可使用離子交換管柱，從反應混合物中分離位置異構物。

若欲在 N-端以外的位置(其為對活體內活性很重要的位置)偶聯促胰島素肽，則可將反應性硫醇基團導入在天然胺基酸序列中欲修改之胺基酸殘基的位置，使用在非-肽基聚合物處的順丁烯二醯亞胺連接子形成共價鍵。若欲在 N-端以外的位置(其為對活體內活性很重要的位置)偶聯促胰島素肽，則可將反應性胺基團導入在天然胺基酸序列中欲修改之胺基酸殘基的位置，使用在非-肽基聚合物處的醛連接子形成共價鍵。

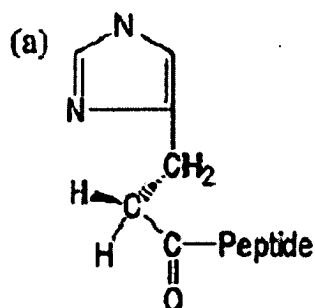
當在非-肽基聚合物處使用醛連接子時，其與在 N-端和離胺酸殘基處的胺基基團反應，並可使用促胰島素肽的經修改形式，選擇性地增加反應產量。例如，可使用 N-端阻斷法、離胺酸殘基取代法、在羧基端導入胺基團之方法，或類似者，將唯一一個欲反應的胺基團保持在想要的位置，藉此增加聚乙二醇化和偶聯反應的產量。保護 N-端的方法包括二甲基化，以及甲基化、脫胺、醯化等等，但不限於該等烷基化方法。

在一較佳的具體事實中，本發明之促胰島素肽共軛物

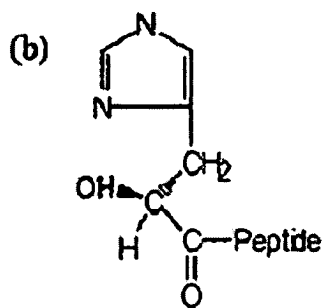
是免疫球蛋白 Fc 區與在該促胰島素肽之 N-端胺基團以外的胺基團專一性結合的促胰島素肽共軛物。

在一特定的具體事實中，本發明者在 pH9.0 下誘導天然 exendin-4 的聚乙二醇化，選擇性地使 PEG 與促胰島素肽之離胺酸殘基偶聯。或者，在 Lys 殘基處聚乙二醇化，在 pH7.5 下進行具有 N-端經刪除或經保護之 exendin-4 衍生物的聚乙二醇化。藉著刪除 N-端組胺酸的 α 胺基團、藉著以羥基基團取代 N-端胺基團、藉著以兩個甲基基團修改 N-端組胺酸的 α 胺基團，或藉著刪除第一個胺基酸(組胺酸)之 α 碳和與其連接的 N-端胺基團，留下咪唑-乙醯基基團及等等，阻斷在 N-端的 PEG 化。可以下列化學式代表該等衍生物：

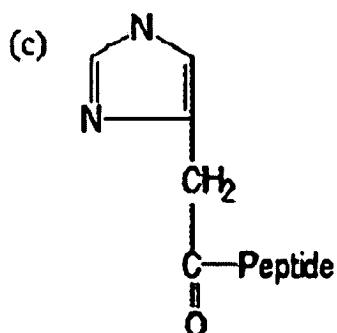
<化學式 1>



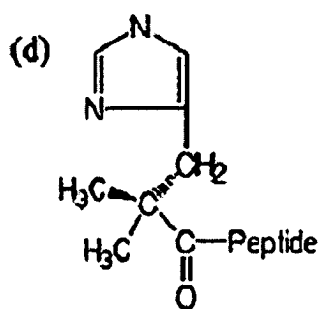
脫-胺基-組胺醯基(DA)
-Exendin-4



β -羥基-咪唑-丙基(HY)
-Exendin-4



咪唑-乙醯基(CA)-Exendin-4



二甲基-組胺醯基(DM)
-Exendin-4

及其序列衍生物(突變種)。胺基酸序列衍生物是起因於一或多個胺基酸殘基的刪除、插入、非-保留性或保留性取代或其組合，而與天然胺基酸序列有差異的序列。例如，在 IgG Fc 中，可使用已知在結合時很重要的胺基酸殘基，在位置 214 到 238、297 到 299、318 到 322 或 327 到 331，作為修改的適當目標。再者，其他的各種衍生物都是可能的，包括其中刪除能夠形成雙硫鍵之區域，或在天然 Fc 形式之 N-端排除某些胺基酸殘基，或在其上添加甲硫胺酸殘基的衍生物。此外，欲移除效應物功能，可在補體-結合位置，如 C1q-結合位置和 ADCC(antibody dependent cell mediated cytotoxicity，抗體依賴性細胞介導之胞毒性)位置發生刪除。在國際專利公開案第 WO 97/34631 號和 WO 96/32478 號中揭示了製備該等免疫球蛋白 Fc 區之序列衍生物的技術。

在蛋白質和肽中通常不改變分子活性的胺基酸交換，為在技術領域中被熟知的(H. Neurath, R. L. Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979)。最常發生的交換是以兩個方向的 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、和 Asp/Gly。

Fc 區，若需要可藉著磷酸化、硫酸化、丙烯酸化、糖基化、甲基化、法呢基化(farnesylation)、乙醯基化、醯胺化以及類似者修改。

如 CDC(complement dependent cytotoxicity, 補體依賴性之胞毒性)。

也就是說，作為本發明之藥物載劑，最佳的免疫球蛋白 Fc 區是人類 IgG4-衍生之未經糖基化的 Fc 區。人類-衍生之 Fc 區比非-人類衍生之 Fc 區更好，後者在人體內可能扮演抗原，並引起不受歡迎的免疫反應，如產生對抗該抗原的新抗體。

當在本文中使用的“非-肽基聚合物”一詞時，意指生物可相容的聚合物，包括二或多個重複單位，彼此藉著肽鍵以外的任何共價鍵連接。

可用在本發明中之非-肽基聚合物，可選自由聚乙二醇、聚丙二醇、乙二醇和丙二醇的共聚物、聚氧乙基化之多元醇、聚乙烯醇、多醣類、葡聚糖、聚乙烯基乙基醚、生物可降解之聚合物，如 PLA(poly-lactic acid, 聚乳酸)、和 PLGA(poly-lactic-glycolic acid, 聚乳酸-乙醇酸)、脂質聚合物、幾丁質、透明質酸、及其組合所組成之群組，而較佳的是聚乙二醇。亦將其在技術領域中已熟知的，且在技術領域中可輕易製備的衍生物，納入本發明之範圍內。

在藉著傳統符合讀框之融合 (inframe fusion) 方法獲得的融合蛋白中使用的肽連接子，具有在活體內容易被蛋白水解酵素切開的缺點，並因此不能如預期獲得藉著載劑增加活性藥物之血液半衰期的充分影響。然而，在本發明中，聚合物具有對蛋白水解酵素的抵抗力，可用以將肽的血液半衰期維持在類似載劑之血液半衰期的程度。因此，

可使用任何可用在本發明中之非-肽基聚合物，沒有任何限制，只要它是具有前述功能的聚合物，即該聚合物具有對活體內蛋白水解酵素的抵抗力即可。非-肽基聚合物較佳的是具有範圍在 1 到 100kDa 的分子量，而更佳的是 1 到 20kDa。再者，與免疫球蛋白 Fc 區連接的本發明之非-肽基聚合物，可以是一聚合物或不同類型之聚合物的組合。

在本發明中使用的非-肽基聚合物，具有能夠與免疫球蛋白 Fc 區和蛋白質藥物結合的反應基。

非-肽基聚合物在兩端具有反應基，其較佳的是選自由反應性醛基團、丙醛基團、丁醛基團、順丁烯二醯亞胺基團、和琥珀醯亞胺衍生物所組成之群組。琥珀醯亞胺衍生物可以是琥珀醯亞胺基丙酸基、羥基琥珀醯亞胺基、琥珀醯亞胺基羧甲基或琥珀醯亞胺基碳酸基。特別是在非-肽基聚合物在兩端具有反應性醛基團時，其有效地在兩端連接具有生理活性之多肽和免疫球蛋白，具有最低的非-專一性反應。藉著經由醛鍵結之還原烷基化產製的終產物，比藉著醯胺鍵結連接時更穩定得多。醛反應基在低 pH 值下選擇性地與 N-端結合，並可在高 pH 值，如 pH9.0 下，與離胺酸殘基結合，形成共價鍵。

在非-肽基聚合物兩端的反應基可以是相同或不同的。例如，非-肽基聚合物可在一端具有順丁烯二醯亞胺基團，並在另一端具有醛基團、丙醛基團或丁醛基團。當使用在其兩端具有反應性羥基基團的聚乙二醇作為非-肽基聚合物時，可藉著已知的化學反應使羥基基團活化成各種反應

基，或可使用具有市售之經修改反應基的聚乙二醇，而得以製備本發明之促胰島素肽共軛物。

本發明之促胰島素肽共軛物維持促胰島素肽的傳統活體內活性，如提升胰島素的合成和分泌、食慾控制、體重減輕、增加 β 細胞對血糖的敏感性、提升 β 細胞增殖、延遲胃排空，以及胰高血糖素抑制，且更顯著地增加促胰島素肽的血液半衰期，並因此維持該肽的活體內效力，其可用來治療糖尿病、肥胖、急性冠狀動脈徵候群或多囊性卵巢徵候群。

在另一具體事實中，本發明提供製備促胰島素肽共軛物的方法，包括下列步驟：(1)使在其兩端具有選自由醛、順丁烯二醯亞胺、和琥珀醯亞胺衍生物所組成之群組的反應基的非-肽基聚合物，其與促胰島素肽的胺基團或硫醇基團共價連接；(2)從(1)之反應混合物中分離包括該促胰島素肽的共軛物，其中該非-肽基聚合物與N-端以外的位置共價連接；並(3)使免疫球蛋白Fc區與該經分離共軛物之非-肽基聚合物的另一端共價連接，產生包括與該非-肽基聚合物每一端連接之免疫球蛋白Fc區和促胰島素肽的肽共軛物。當在本文中使用的“共軛物”一詞時，意指藉著共價連接非-肽基聚合物與促胰島素肽製備的中間物，且隨後將免疫球蛋白Fc區與該非-肽基聚合物的另一端連接。

在較佳的具體事實中，本發明提供製備促胰島素肽共軛物的方法，包括下列步驟：(1)使在其兩端具有醛反應基的非-肽基聚合物，與促胰島素肽的離胺酸殘基共價連接；

(2)從(1)之反應混合物中分離包括該促胰島素肽的共軛物，其中該非-肽基聚合物與離胺酸殘基共價連接；並(3)使免疫球蛋白 Fc 區與該經分離共軛物之非-肽基聚合物的另一端共價連接，產生包括與該非-肽基聚合物每一端連接之免疫球蛋白 Fc 區和促胰島素肽的蛋白質共軛物。更佳的是，在 pH7.5 或更高下，將(1)之非-肽基聚合物與促胰島素肽的離胺酸殘基連接。

在更進一步的具體事實中，本發明提供治療糖尿病的醫藥組合物，其包括本發明之促胰島素肽共軛物。包括本發明之共軛物的醫藥組合物，更可包括在藥學上可接受之載劑。為了口服投藥，在藥學上可接受之載劑可包含黏合劑、潤滑劑、崩解劑、賦形劑、促溶劑、分散劑、穩定劑、懸浮劑、著色劑、和香料。為了注射用製劑，在藥學上可接受之載劑可包含緩衝劑、防腐劑、止痛藥、促溶劑、等張劑、和穩定劑。至於局部投藥之製劑，在藥學上可接受之載劑可包含基底、賦形劑、潤滑劑、和防腐劑。可將本發明之醫藥組合物與前述在藥學上可接受的載劑一起調配成各種劑型。例如，為了口服，可將醫藥組合物調配成錠劑、口含錠、膠囊、酏劑、懸浮液、糖漿或糯米紙囊劑。為了注射用製劑，可將醫藥組合物調配成呈單一劑劑型或單位劑型形式的安瓿，如多劑量容器。亦可將醫藥組合物調配成溶液、懸浮液、錠劑、藥丸、膠囊、和長效製劑。

另一方面，載劑的實例，適合藥學調配物的賦形劑和稀釋劑包含乳糖、右旋糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露糖醇、

木糖醇、赤蘚糖醇、麥芽糖醇、澱粉、阿拉伯膠、藻酸鹽、明膠、磷酸鈣、矽酸鈣、纖維素、甲基纖維素、微晶纖維素、聚乙烯吡咯烷酮、水、羥基苯甲酸甲酯、羥基苯甲酸丙酯、滑石、硬脂酸鎂、和礦物油。此外，藥學調配物亦可進一步含有填料、抗-凝固劑、潤滑劑、濕潤劑、香料、和防腐劑。

根據本發明之共軛物，可用來治療糖尿病、肥胖、急性冠狀動脈徵候群或多囊性卵巢徵候群。因此，可投予包含該共軛物之醫藥組合物以治療該疾病。

當在本文中使用的“投藥”一詞時，意指藉著某些適當的方法，將預定量的物質導入患者內。可經由任何常用的途徑投予本發明之共軛物，只要能夠達到想要的組織即可。考慮到各種投藥模式，包括腹腔內、靜脈內、肌肉內、皮下、皮內、口服、局部、鼻內、肺臟內、和直腸內，但本發明不限於這些舉例的投藥模式。然而，因為肽在口服投藥後被消化，故應該將口服投藥之組合物的活性成分塗膜，或調配以保護對抗在胃中的降解。較佳的是，以注射用形式投予本發明之組合物，此外，亦可使用某些能夠將活性成分運送至標靶細胞內的裝置以投予本發明之醫藥組合物。

可藉著數個相關因素決定本發明之醫藥組合物的投藥頻率和劑量，該因素包括待治療之疾病的類型、投藥路徑、患者的年齡、性別、體重、和疾病的嚴重性，以及作為活性成份之藥物的類型。因為本發明之醫藥組合物具有優異

的活體內效力持續時間和力價，故可明顯降低本發明之藥學藥物的投藥頻率和劑量。

經由下列的實施例，可獲得對本發明更佳的了解，所陳述之實施例僅為了說明，不可解釋為本發明之限制。

實施例

實施例 1. exendin-4 的 PEG 化和位置異構物的分離

藉著在 4°C 下使 exendin-4(AP, USA)與 3.4K 丙醛(2)PEG(具有兩個丙醛基團的 PEG, IDB Inc., South Korea)以 1:15 之莫耳比例反應 90 分鐘，其中肽濃度為 3mg/ml，使 PEG 和肽之 N-端接受 PEG 化。在此時，在 pH4.0 濃度 100mM 的 NaOAc 緩衝溶液中進行反應，並在其中加入作為還原劑的 20mM SCB(NaCNBH_3)，以完成反應。藉著在 4°C 下使 exendin-4 與 3.4K 丙醛(2)PEG 以 1:30 之莫耳比例反應 3 小時，其中肽濃度為 3mg/ml，使 PEG 和肽之離胺酸(Lys)殘基接受 PEG 化。在此時，在 pH9.0 濃度 100mM 的 Na-磷酸緩衝溶液中進行反應，並在其中加入作為還原劑的 20mM SCB，以完成反應。使用 SOURCE Q(XK 16ml, Amersham Biosciences)從每個反應溶液中純化經單-PEG 化的肽，並使用 SOURCE S(XK 16ml, Amersham Biosciences)分離異構物。發現較早發現經 PEG 化之 N-端的高峰，然後轉而發現經 PEG 化之離胺酸殘基的兩個高峰。藉著肽作圖法證實所沖提之高峰的經 PEG 化區域。較早沖提出 Lys12-經 PEG 化之共軛物，在最後部分沖提出 Lys27-經 PEG 化之共軛物，並從彼此完全分離出 N-端的位置異構物和

Lys12 的位置異構物。

管柱：SOURCE Q(XK 16ml, Amersham Biosciences)

流速：2.0ml/ min

梯度：A 0->40% 80 min B(A：20mM Tris pH8.5, B：
A+0.5M NaCl)

管柱：SOURCE S(XK 16ml, Amersham Biosciences)

流速：2.0ml/ min

梯度：A 0->100% 50 min B(A：20mM 檸檬酸 pH3.0,
B：A+0.5M KCl)

實施例 2. 製備 exendin-4(N)-PEG-免疫球蛋白 Fc 共軛物

使用與在實施例 1 中之描述相同的方法，使 3.4K 丙醛 (2)PEG 與 exendin-4 的 N-端反應，並僅純化 N-端異構物，然後與免疫球蛋白 Fc 偶聯。該反應在 4°C 下，以 1:8 的肽：免疫球蛋白 Fc 之比例，和 50mg/ml 之總蛋白質濃度，進行 17 小時。在 100mM K-P(pH6.0)的溶液中進行反應，並在其中加入作為還原劑的 20mM SCB。使用兩個純化管柱純化偶聯反應溶液。首先，使用 SOURCE Q(XK 16ml, Amersham Biosciences)，以移除大量未曾參與偶聯反應的免疫球蛋白 Fc。使用 20mM Tris(pH7.5)和 1M NaCl 作為鹽梯度，較早沖提出具有相對較弱結合力的免疫球蛋白 Fc，然後沖提出 exendin-4-免疫球蛋白 Fc。經由這第一次純化程序，移除免疫球蛋白 Fc 至某種程度，但因為免疫球蛋

白 Fc 和 exendin-4-免疫球蛋白 Fc 在離子交換管柱中具有彼此類似的結合力，故不能將它們彼此完全分開。因此，使用兩個材料各自的疏水性，進行第二次純化。在 SOURCE ISO(HR 16ml, Amersham Biosciences) 中使用 20mM Tris(pH7.5) 1.5M 硫酸銨，偶聯第一個經純化的試樣，並利用逐漸降低的硫酸銨濃度沖提該試樣。在 HIC 管柱中，較早沖提出具有弱結合力的免疫球蛋白 Fc，然後沖提出具有強結合力的 exendin-4-免疫球蛋白 Fc 試樣。因為它們有顯著不同的疏水性，故比在離子交換管柱中更容易將其等彼此分開。然而，因為使用過量的免疫球蛋白 Fc-歸因於莫耳比例的差異，故僅使用 HIC 管柱不能獲得高純度。藉著逆相 HPLC 測得之純度為 91.6%(圖 1)。

管柱：SOURCE Q(XK 16ml, Amersham Biosciences)

流速：2.0ml/ min

梯度：A 0->25% 70 min B(A：20mM Tris pH7.5, B：A+1M NaCl)

管柱：SOURCE ISO(HR 16ml, Amersham Biosciences)

流速：7.0ml/ min

梯度：B 100->0% 60 min B(A：20mM Tris pH7.5, B：A+1.5M 硫酸銨)

實施例 3. 製備 exendin-4(Lys27)-免疫球蛋白 Fc 共軛物

使用與在實施例 1 中之描述相同的方法，使 3.4K 丙醛

(2)PEG 與 exendin-4 的離胺酸(Lys)反應，僅純化 Lys 異構物，然後與免疫球蛋白 Fc 偶聯。在兩個異構物高峰中，使用最後的異構物高峰(Lys27 的位置異構物)來進行偶聯反應，其有較大的反應並很容易與 N-端異構物高峰區別。該反應在 4℃ 下，以 1:8 的肽：免疫球蛋白 Fc 之比例，和 50mg/ml 之總蛋白質濃度，進行 16 小時。在 100mM K-P(pH6.0)的溶液中進行反應，並加入作為還原劑的 20mM SCB。在偶聯反應之後，使用 SOURCE Q 16ml 和 SOURCE ISO 16ml 的兩-步驟純化過程，其與在實施例 2 中的相同。藉著逆相 HPLC 測得之純度為 91.7%(圖 2)。

實施例 4. 製備脫-胺基-組胺鹽基 exendin-4(Lys27)-免疫球蛋白 Fc 共軛物

欲 PEG 化 3.4K 丙醛(2)PEG 對脫-胺基-組胺鹽基 exendin-4(DA-exendin-4, AP, USA)的離胺酸(Lys)殘基，藉著在 4℃ 下以 1:30 之莫耳比例，其中肽濃度為 3mg/ml，使肽與 3.4K 丙醛(2)反應 12 小時，進行 PEG 化。反應溶液是在 100mM Na-磷酸緩衝溶液，pH7.5 中，並加入作為還原劑的 20mM SCB。藉著兩-步驟純化過程純化經 PEG 化的肽，使用 SOURCE Q(XK 16ml, Amersham Biosciences)和 SOURCE S(XK 16ml, Amersham Biosciences)。在兩個異構物高峰中，使用最後的異構物高峰(Lys27 的位置異構物)進行偶聯反應，其有較大的反應並很容易與 N-端異構物高峰區別。該反應在 4℃ 下，以 1:8 的肽：免疫球蛋白 Fc

之比例，在 60mg/ml 之總蛋白質濃度下，進行 20 小時。在 100mM K-P(pH6.0)中進行反應，並加入作為還原劑的 20mM SCB。在偶聯之後，使用 SOURCE Q 16ml 和 SOURCE ISO 16ml 的兩-步驟純化過程，與在實施例 2 中描述的相同。藉著逆相 HPLC 測得之純度為 95.8%(圖 3)。

管柱：SOURCE Q(XK 16ml, Amersham Biosciences)

流速：2.0ml/ min

梯度：A 0->20% 70 min B(A：20mM Tris pH9.0，B：A+1M NaCl)

管柱：SOURCE S(XK 16ml, Amersham Biosciences)

流速：2.0ml/ min

梯度：A 0->50% 50 min B(A：20mM 檸檬酸 pH3.0，B：A+1M KCl)

實施例 5. 製備羥基-咪唑-丙醯基 exendin-4(Lys27)-免疫球蛋白 Fc 共軛物

使用與在實施例 4 中之描述相同的方法，使 3.4K 丙醛 (2)PEG 與 β -羥基-咪唑-丙基 exendin-4(HY-exendin-4, AP, USA)的離胺酸(Lys)殘基反應。在兩個異構物高峰中，使用最後的異構物高峰(Lys27 的位置異構物)進行偶聯反應，其有較大的反應並很容易與 N-端異構物高峰區別。該反應在 4℃ 下，以 1:8 的肽：免疫球蛋白 Fc 之比例，和 60mg/ml 之總蛋白質濃度，進行 20 小時。在 100mM K-P(pH6.0)中進行反應，並加入作為還原劑的 20mM SCB。

在偶聯反應之後，使用 SOURCE Q 16ml 和 SOURCE ISO 16ml 以進行兩-步驟純化過程 mlml，其如同在實施例 2 中所描述。藉著逆相 HPLC 測得之純度為 93.9%(圖 4)。

實施例 6. 製備咪唑-乙醯基 exendin-4(Lys27)-免疫球蛋白 Fc 共軛物

使用與在實施例 4 中之描述相同的方法，使 3.4K 丙醛(2)PEG 與咪唑-乙醯基 exendin-4(CA-exendin-4, AP, USA) 的離胺酸(Lys)殘基反應。在兩個異構物高峰中，使用最後的異構物高峰(Lys27 的位置異構物)進行偶聯反應，其有較大的反應並很容易與 N-端異構物高峰區別。該反應在 4℃ 下，以 1:8 的肽：免疫球蛋白 Fc 之比例，和 60mg/ml 之總蛋白質濃度，進行 20 小時。在 100mM K-P(pH6.0)中進行反應，並加入作為還原劑的 20mM SCB。在偶聯反應之後，使用 SOURCE Q 16ml 和 SOURCE ISO 16ml 的兩-步驟純化過程，如同在實施例 2 中描述的。藉著逆相 HPLC 測得之純度為 95.8%(圖 5)。

實施例 7. 製備 Ser 經突變之 DAexendin-4(Lys27)-免疫球蛋白 Fc 共軛物

藉著在 25℃ 下以 1:30 之莫耳比例，其中肽濃度為 3mg/ml，使 Ser 經突變之 DAexendin-4 與 3.4K 丙醛(2)PEG 反應 3 小時，使 3.4K 丙醛(2)PEG 與肽的離胺酸(Lys)殘基接受 PEG 化。在此時，在 pH7.5 濃度 100mM 的 Na-磷酸

緩衝溶液中進行反應，並在其中加入作為還原劑的 20mM SCB，以完成反應。如同在實施例 4 中的描述，使用 SOURCE Q(XK 16ml， Amersham Biosciences)而不使用 SOURCE S(XK 16ml， Amersham Biosciences)，進行經單-PEG 化肽的純化過程。該反應在 4°C 下，以 1:8 的肽：免疫球蛋白 Fc 之比例，和 60mg/ml 之總蛋白質濃度，進行 20 小時。在 100mM K-P(pH6.0)之溶液中進行反應，並加入作為還原劑的 20mM SCB。因為 Ser 經突變之 DAexendin-4 具有強很多的陰離子特性，故僅藉著使用 SOURCE Q 的純化過程，便有效排除了未參與該反應的過量免疫球蛋白 Fc。因此，省略使用 SOURCE ISO 的純化過程，而使用 SOURCE Q 之純化過程的條件與在實施例 2 中的相同。藉著逆相 HPLC 測得之純度為 92.5%(圖 6)。

實施例 8. 製備 Arg12 經突變之 DAexendin-4(Lys27)-免疫球蛋白 Fc 共軛物

使用與在實施例 7 中之描述相同的方法，使 3.4K 丙醛(2)PEG 與 Arg12 經突變之 DAexendin-4(AP， USA)的離胺酸(Lys)殘基反應，並純化之。然後進行偶聯過程。該反應在 4°C 下，以 1:8 的肽：免疫球蛋白 Fc 之比例，和 60mg/ml 之總蛋白質濃度，進行 20 小時。在 100mM K-P(pH6.0)之溶液中進行反應，並加入作為還原劑的 20mM SCB。在偶聯反應之後，使用 SOURCE Q 16ml 和 SOURCE ISO 16ml 的兩-步驟純化過程，其與在實施例 2 中的相同。藉著逆相

HPLC 測得之純度為 99.2%(圖 7)。

實施例 9. 製備脫胺基-組胺醯基 exendin-4(Lys27)-白蛋白共軛物

使用與在實施例 4 中之描述相同的方法，使 3.4K 丙醛 (2)PEG 與脫-胺基-組胺醯基 exendin-4(AP, USA)的離胺酸 (Lys)殘基反應，並純化之。該反應在 4℃ 下，以 1:7 的肽：作為載劑物質的人類血液-衍生之白蛋白 (Green cross, South Korea)之比例，和 50mg/ml 之總蛋白質濃度，進行 24 小時。在 100mM K-P(pH6.0)之溶液中進行反應，並加入作為還原劑的 20mM SCB。在偶聯反應之後，使用 SOURCE Q 16ml 和 SOURCE ISO 16ml 的兩-步驟純化過程，其與在實施例 2 中的相同。藉著逆相 HPLC 測得之純度為 90.3%(圖 8)。

實施例 10. 製備二甲基-組胺醯基 exendin-4(Lys27)-免疫球蛋白 Fc 共軛物

使用二甲基-組胺醯基 exendin-4(DMexendin, AP, USA)，以與在實施例 4 中之描述相同的方法，製備二甲基-組胺醯基 exendin-4(Lys27)-免疫球蛋白 Fc 共軛物。藉著逆相 HPLC 測得之純度為 96.4%(圖 9)。

實施例 11. 製備 GLP-1(N)-免疫球蛋白 Fc 共軛物

藉著在 4℃ 下，以 1:5 之莫耳比例，其中肽濃度為

應之後，使用 SOURCE Q 16ml 和 SOURCE ISO 16ml 的兩步驟純化過程，其與在實施例 2 中的相同。然而，在 SOURCE ISO 16ml 中的解離降低，因為在 GLP-1 免疫球蛋白 Fc 共軛物與免疫球蛋白 Fc 之間的疏水性差異，比在 exendin-4 免疫球蛋白 Fc 與免疫球蛋白 Fc 之間的低。因此，對以上的純化過程，更進一步進行使用 SOURCE ISO 16ml 的純化過程。藉著逆相 HPLC 測得之純度為 91.9%(圖 11)。

實施例 13. 使用丁醛連接子 PEG 製備共軛物

以與在實施例 1 中之描述相同的方法，使用 3.4K 丁醛 (2)PEG(具有兩個丁醛基團的 PEG, Nektar, USA)，製備 3.4K-exendin-4。如在實施例 3 中之描述相同的方法，將其與免疫球蛋白 Fc 偶聯。藉著逆相 HPLC 測得之純度為 92.3%(圖 12)。

實施例 14. 測量持續釋放之 exendin-4 的試管內活性

欲測量 exendin-4 之長效製劑的效力，使用測量試管內細胞活性的方法。典型地，為了測量 GLP-1 的試管內活性，分離胰島瘤細胞或胰島，並判定在 GLP-1 處理之後，是否增加細胞中的 cAMP's。

關於在本測試中用來測量試管內活性的方法，使用 RIN-m5F(ATCC)細胞，已知其為大鼠胰島瘤細胞。這些細胞具有 GLP-1 受體，並因此經常在測量 GLP-1 家族之試管內活性的方法中使用它們。以各種濃度的 GLP-1、exendin-4 和受試材料處理 RIN-m5F。測量由受試材料引起 cAMP's

的出現，其為在細胞中發送信號的分子，並由此產生 EC50 值，然後互相比較。在表 1 中出示結果。

表 1

受試材料	血液半衰期 (小時)	試管內 力價(%)
exendin-4	0.7	100
exendin-4(N)-PEG-Fc	62	<0.2
exendin-4(Lys27)-PEG-Fc	61	13.2
DMexendin-4(Lys27)-PEG-Fc	69	2.6
DAexendin-4(Lys27)-PEG-Fc	54	13.2
HYexendin-4(Lys27)-PEG-Fc	52	7.6
CAexendin-4(Lys27)-PEG-Fc	52	8.5
Ser12 DAexendin-4(Lys27)-PEG-Fc	N.D.	2.6
DAexendin-4(Lys27)-白蛋白		2.0
DA GLP-1(Lys20, 28)-PEG-Fc	27	2.0

-DMexendin-4：二甲基-組胺鹽基 exendin-4

-DAexendin-4：脫-胺基-組胺鹽基 exendin-4

-HYexendin-4： β -羥基-咪唑-丙基 exendin-4

-CAexendin-4：咪唑-乙鹽基 exendin-4

-Ser12 DAexendin-4：DAexendin-4，其中以絲胺酸取代 exendin-4 的第 12 個離胺酸殘基

-DA GLP-1：脫-胺基-組胺鹽基-GLP-1

-exendin-4(N)-PEG-Fc：其中 exendin-4 之 N-端和 Fc 區與 PEG 連接的共軛物

-exendin-4(Lys27)-PEG-Fc：其中 exendin-4 的第 27 個離胺酸殘基和 Fc 區與 PEG 連接的共軛物

-DMexendin-4(Lys27)-PEG-Fc：其中二甲基組胺鹽基 exendin-4 的第 27 個離胺酸殘基和 Fc 區與 PEG 連接的共軛物

-DAexendin-4(Lys27)-PEG-Fc：其中脫-胺基-組胺鹽基 exendin-4 的第 27 個離胺酸殘基和 Fc 區與 PEG 連接的共軛物

-HYexendin-4(Lys27)-PEG-Fc：其中 β -羥基-咪唑-丙基 exendin-4 的第 27 個離胺酸殘基和 Fc 區與 PEG 連接的共軛物

-CAexendin-4(Lys27)-PEG-Fc：其中咪唑-乙鹽基 exendin-4 的第 27 個離胺酸殘基和 Fc 區與 PEG 連接的共軛物

-Ser12 DAexendin-4(Lys27)-PEG-Fc：其中 Ser12 脫-胺基-組胺鹽基 exendin-4(其中 exendin-4 的第 12 個離胺酸殘基被絲胺酸取代)的第 27 個離胺酸殘基和 Fc 區與 PEG 連接的共軛物

-DAexendin-4(Lys27)-PEG-白蛋白：其中脫-胺基-組胺鹽基 exendin-4 的第 27 個離胺酸殘基和白蛋白與 PEG 連接的共軛物

-DA GLP-1(Lys20, 28)-PEG-Fc：其中脫-胺基-組胺鹽基 GLP-1 的離胺酸殘基和 Fc 區與 PEG 連接的共軛物。

實施例 15. 測試長效 exendin-4 的活體內效力

欲測量 exendin-4 之長效製劑的活體內效力，使用作為糖尿病模式之在 db/db 老鼠中測量血糖濃度降低效果的方法。在 2 週的期間內，對大約 6-7 週齡的糖尿病模式老鼠投予 100 微克/公斤的長效 exendin-4 製劑一次，以及每天投予 100 微克/公斤之天然 exendin-4，不限制食物供應。在投予受試材料之後，每天收集血液，並測量血糖水平的改變。特別是在天然 exendin-4 的情況下，在投藥 1 小時後測量血糖濃度(圖 14)。exendin-4 衍生物的共軛物，維持血糖濃度降低持續 10 天或更久，甚至是在投藥一次時，而天然 exendin-4 之共軛物使葡萄糖降低的活性，在 8 天之後消失。

產業利用性

本發明之促胰島素肽共軛物具有維持相對上較高的活體內活性，且具有明顯增加的血液半衰期，並因此可能想要用以發展各種肽藥物的長效調配物。

【圖式簡單說明】

圖 1 顯示逆相 HPLC 測量天然 exendin-4(N)-PEG-免疫球蛋白 Fc 共軛物之純度的結果；

圖 2 顯示逆相 HPLC 測量天然 exendin-4(Lys)-PEG-免疫球蛋白 Fc 共軛物之純度的結果；

圖 3 顯示逆相 HPLC 測量脫-胺基-組胺鹽基 exendin-4(Lys)-PEG-免疫球蛋白 Fc 共軛物之純度的結果；

圖 4 顯示逆相 HPLC 測量(2-羥基-3-(1H-咪唑-4-基)丙鹽基)exendin-4(Lys)-PEG-免疫球蛋白 Fc 共軛物之純度的

結果；

圖 5 顯示逆相 HPLC 測量 (2-(1H-咪唑-4-基)乙醯基)exendin-4(Lys)-PEG-免疫球蛋白 Fc 共軛物之純度的結果；

圖 6 顯示逆相 HPLC 測量經 Ser12 突變之脫-胺基-組胺醯基 exendin-4(Lys)-PEG-免疫球蛋白 Fc 共軛物之純度的結果；

圖 7 顯示逆相 HPLC 測量 Arg12-經突變之脫-胺基-組胺醯基 exendin-4(Lys)-PEG-免疫球蛋白 Fc 共軛物之純度的結果；

圖 8 顯示逆相 HPLC 測量脫-胺基-組胺醯基 exendin-4(Lys)-PEG-人類血清白蛋白(HSA)共軛物之純度的結果；

圖 9 顯示逆相 HPLC 測量二甲基-組胺醯基 exendin-4(Lys)-PEG-免疫球蛋白 Fc 共軛物之純度的結果；

圖 10 顯示逆相 HPLC 測量 GLP-1(N)-PEG-免疫球蛋白 Fc 共軛物之純度的結果；

圖 11 顯示逆相 HPLC 測量脫-胺基-組胺醯基 GLP-1(Lys)-PEG-免疫球蛋白 Fc 共軛物之純度的結果；

圖 12 顯示逆相 HPLC 測量天然 exendin-4(Lys)-PEG-免疫球蛋白 Fc 共軛物之純度的結果；

圖 13 顯示藉著 12% SDS-PAGE 測量 (2-(1H-咪唑-4-基)乙醯基)exendin-4(Lys)-PEG-免疫球蛋白 Fc 共軛物之純度的結果；以及

圖 14 顯示測量脫-胺基-組胺醯基 exendin-4(Lys)-PEG-

免疫球蛋白 Fc 共軛物，在血液中降低葡萄糖濃度之效果的結果。

【主要元件符號說明】

無

五、中文發明摘要：

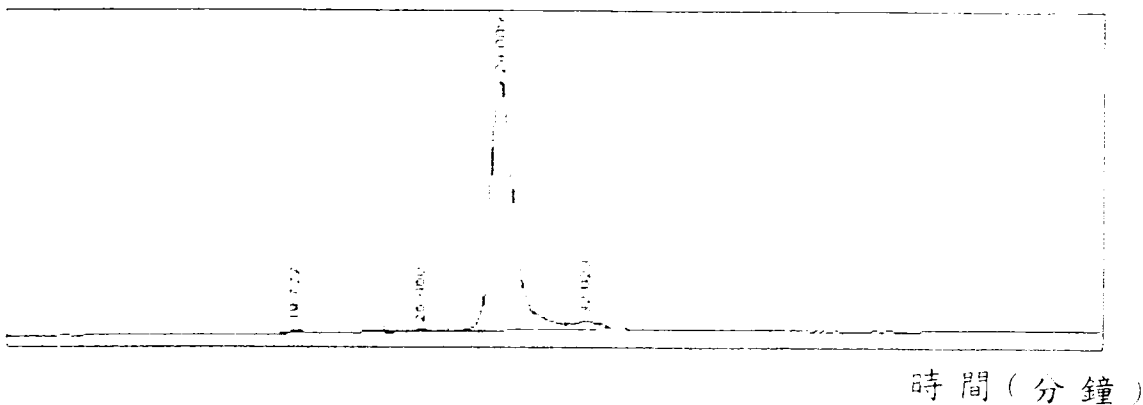
本發明係關於促胰島素肽共軛物，具有經改善之活體內效力和穩定性持續時間，包括促胰島素肽、非-肽聚合物和免疫球蛋白 Fc 區，其以共價方式彼此連接，及相同物的用途。本發明之促胰島素肽共軛物具有維持在相對較高的活體內活性，且具有明顯增加的血液半衰期，並因此可能想要在發展各種肽藥物之長效調配物時使用它。

六、英文發明摘要：

The present invention relates to an insulintropic peptide conjugate having improved in-vivo duration of efficacy and stability, comprising an insulintropic peptide, a non-peptide polymer and an immunoglobulin Fc region, which are covalently linked to each other, and a use of the same. The insulintropic peptide conjugate of the present invention has the in-vivo activity which is maintained relatively high, and has remarkably increased blood half-life, and thus it can be desirably employed in the development of long acting formulations of various peptide drugs.

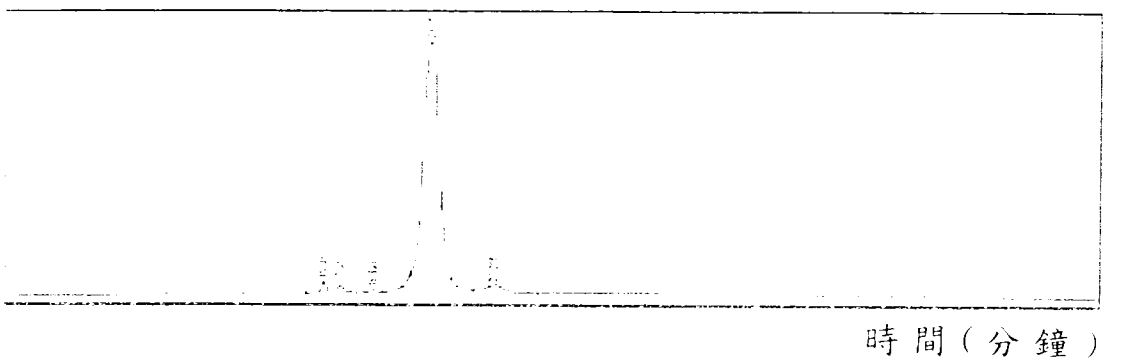
【圖 1】

215 nm



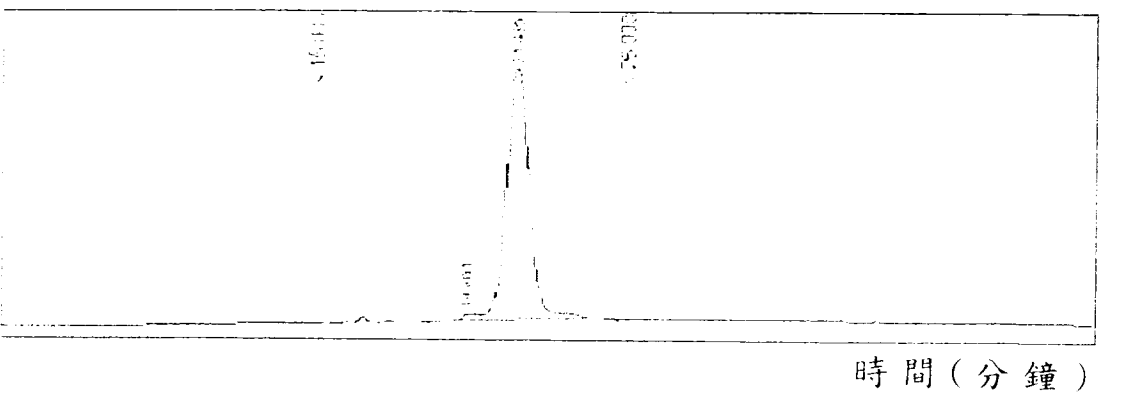
【圖 2】

215 nm



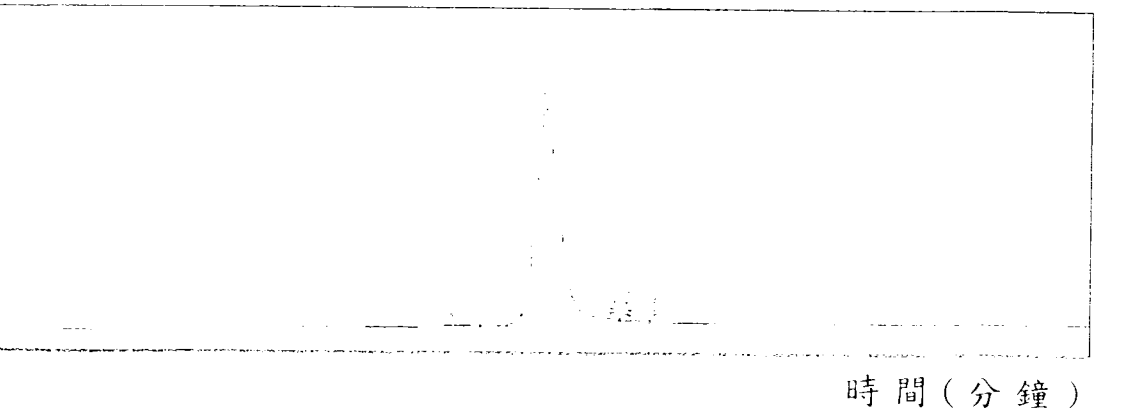
【圖 3】

215 nm



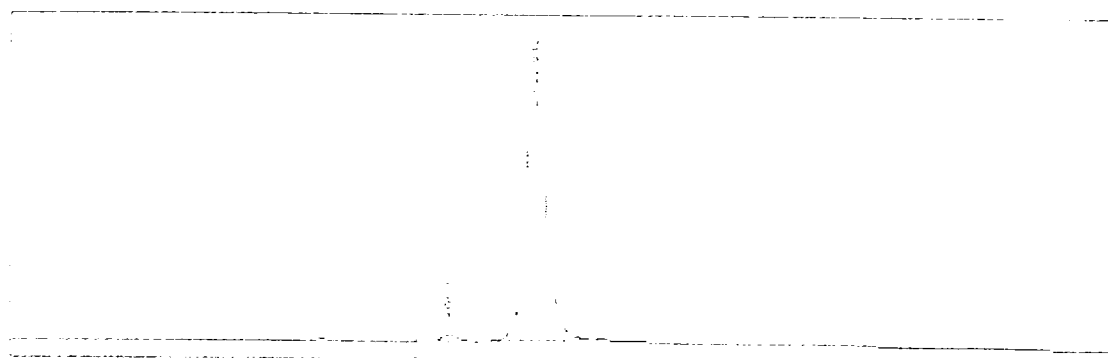
【圖 4】

215 nm



【圖 5】

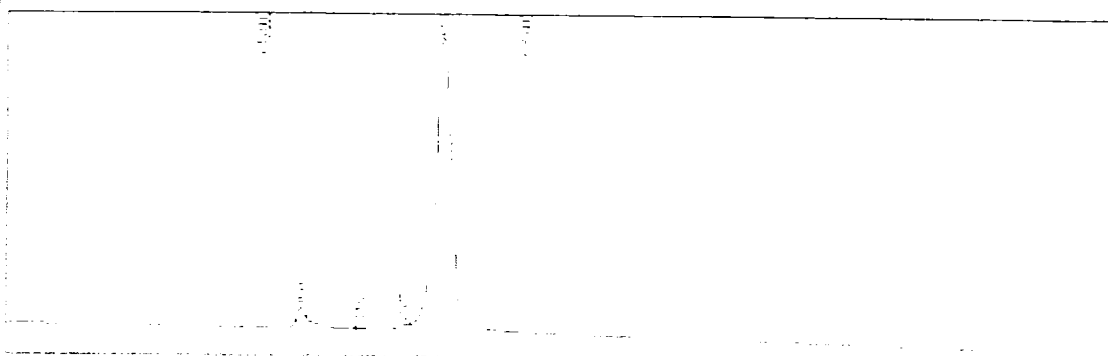
215 nm



時間 (分鐘)

【圖 6】

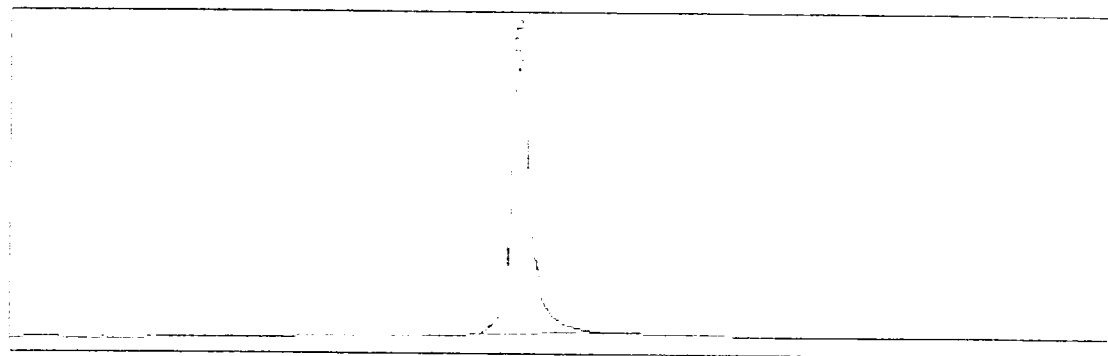
215 nm



時間 (分鐘)

【圖 7】

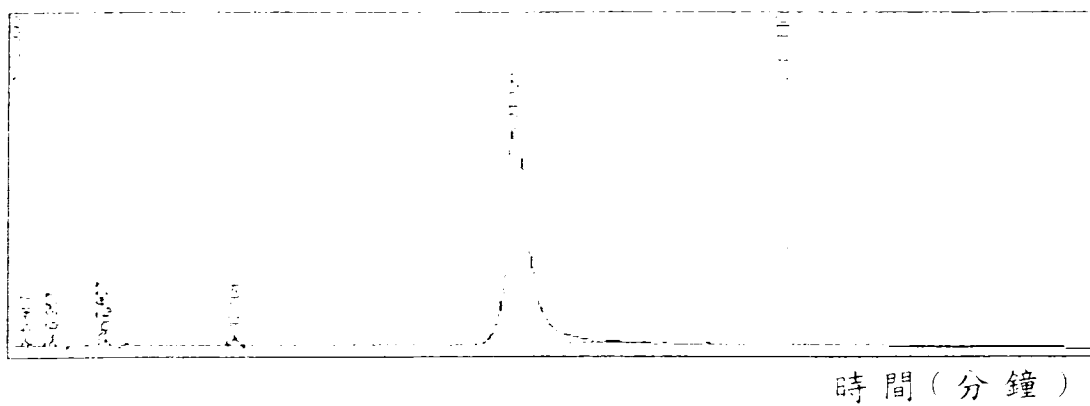
215 nm



時間 (分鐘)

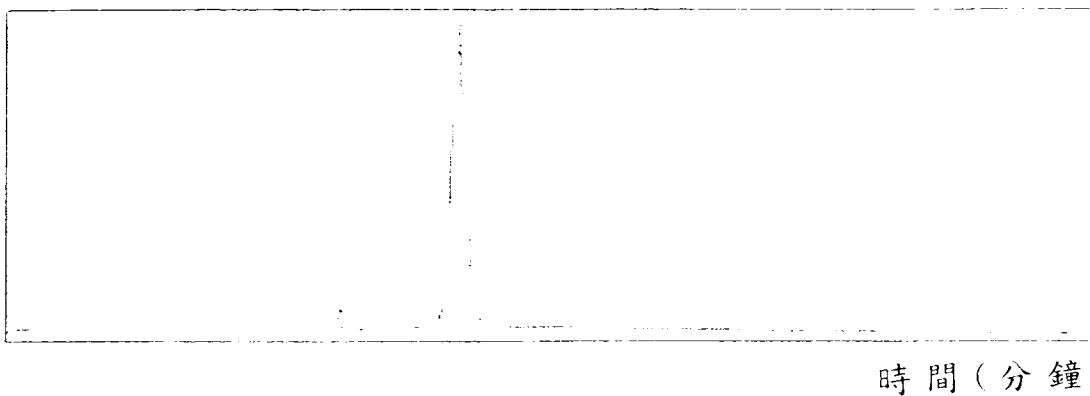
【圖 8】

215 nm



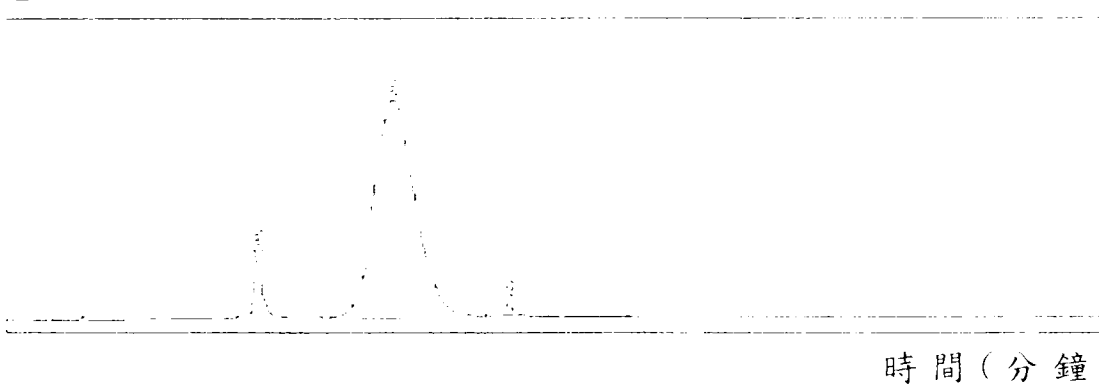
【圖 9】

215 nm



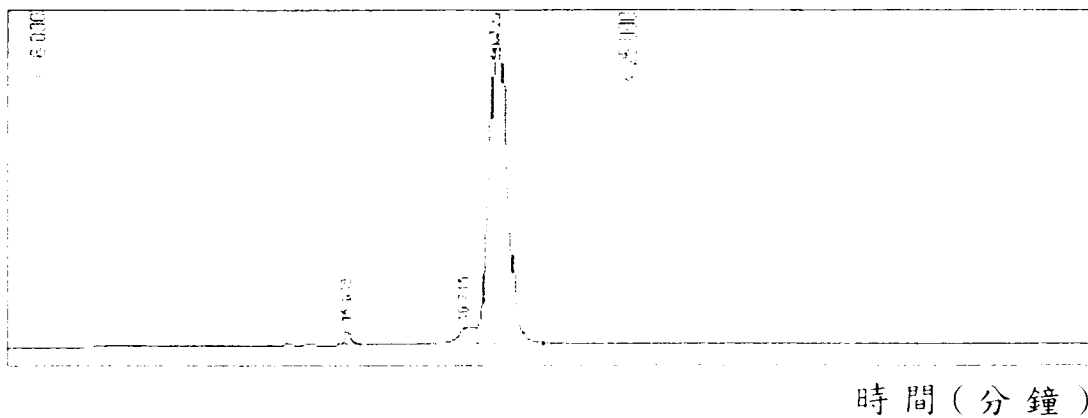
【圖 10】

215 nm

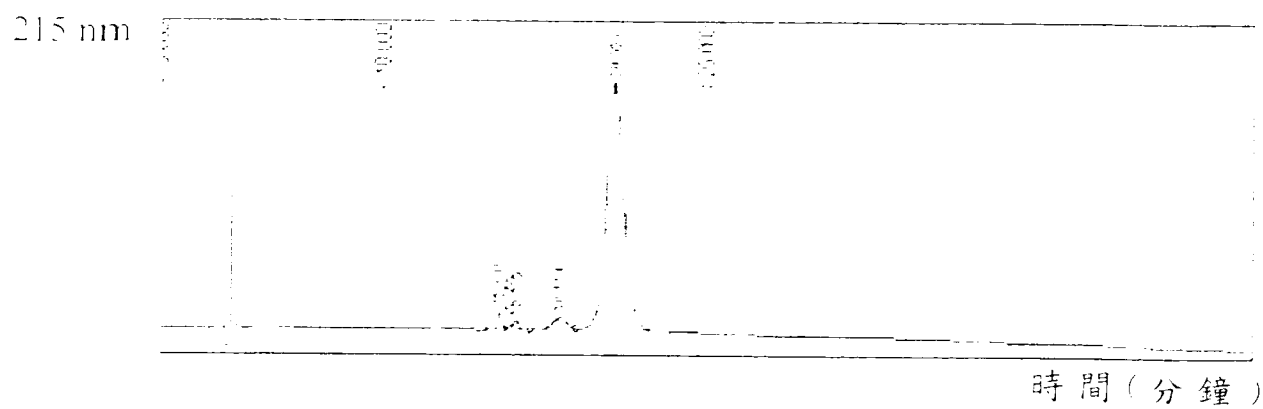


【圖 11】

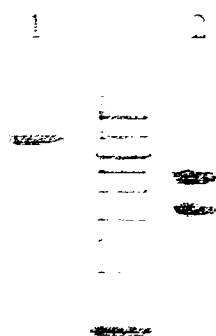
215 nm



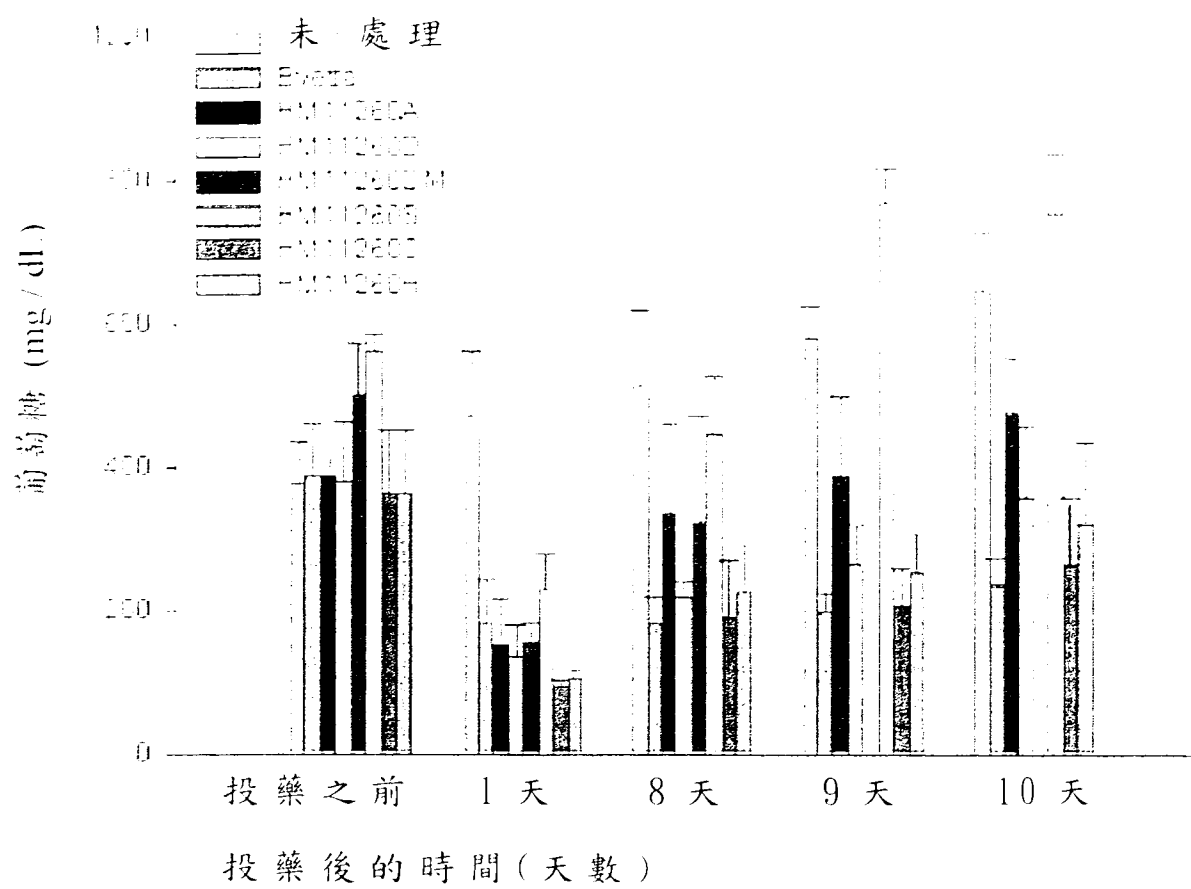
【圖 12】



【圖 13】



1: 非-還原條件
2: 還原條件



七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (14) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無

公告本

發明專利說明書

19年9月3日修正替換頁

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：97104631

※申請日期：97.3.5

※IPC 分類：A61K 47/48, 47/42, 38/2
C07K14/575

一、發明名稱：(中文/英文)

使用免疫球蛋白片段的促胰島素複合物

AN INSULINOTROPIC COMPLEX USING AN IMMUNOGLOBULIN
FRAGMENT

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

韓美科學有限公司 / HANMI SCIENCE CO., LTD.

代表人：(中文/英文)

林鍾潤 / LIM, CHONG YOON

住居所或營業所地址：(中文/英文)

韓國 445-813 京畿道 華城市 東灘面 東灘器興路 550

550, Dongtangiheung-ro, Dongtan-myeon, Hwaseong-si, Gyeonggi-do 445-
813, Republic of Korea

國 籍：(中文/英文)

韓國 / KR

三、發明人：(共 8 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 宋大海 / SONG, Dae Hae
2. 林昌基 / LIM, Chang Ki
3. 宋台憲 / SONG, Tae Hun
4. 金永勳 / KIM, Young Hoon
5. 權世昌 / KWON, Se Chang

聚合物與促胰島素肽連接，並發現本發明之共軛物發揮明顯增加的活體內效力和半衰期。尤其是他們發現，在促胰島素肽共軛物中，諸如 Exendin-4、脫-胺基-組胺鹽基 exendin-4(其中刪除 exendin-4 的 N-端胺基團)、 β -羥基-咪唑-丙鹽基 exendin-4(其中以羥基基團取代 exendin-4 的 N-端胺基團)、二甲基-組胺鹽基 exendin-4(其中以兩個甲基基團修改 exendin-4 的 N-端胺基團)，以及咪唑-乙鹽基-exendin-4(其中刪除第一個組胺酸的 α 碳和與其連接的 N-端胺基團)之肽的共軛物，發揮明顯增加的活體內效力和半衰期。

技術性解決方案

本發明的目標是提供促胰島素肽的長效製劑，其具有維持促胰島素肽之活體內活性的效果，並增加血液半衰期。

【實施方式】

最佳形式

在本發明之一具體事實中，提供長效的促胰島素肽共軛物，該促胰島素肽與在其兩端均具有反應基的非-肽基聚合物彼此共價連接。

本發明之促胰島素肽是具有促胰島素功能，為在胰臟 β 細胞中提升胰島素之合成和表現的肽。這些肽包括前驅物、激動劑、衍生物、片段和變體，且較佳的是 GLP(胰高血糖素樣多肽)-1、exendin-3 和 exendin-4。GLP-1 是由小腸分泌的激素，通常提升胰島素的生物合成和分泌，抑制

胰高血糖激素的分泌，並提升細胞中葡萄糖吸收。在小腸中，胰高血糖激素前驅物被分解成三個肽，即胰高血糖激素、GLP-1、和 GLP-2。在這裡，GLP-1 意指 GLP-1(1-37)，其本來是沒有促胰島素功能的形式。但然後將其加工並轉變為經活化之 GLP-1(7-37)形式。GLP-1(7-37)胺基酸的序列如下：

GLP-1(7-37)

HAEGT FTSDV SSYLE GQAAK EPIAW LVKGR G

GLP-1 衍生物意指胺基酸序列與 GLP-1 之胺基酸序列展現出至少為 80%同源性的肽，可能是經化學修改的形式，並展現出與 GLP-1 至少相等或更高的促胰島素功能。

GLP-1 片段意指為其中在天然 GLP-1 的 N-端或 C-端處添加或刪除一或多個胺基酸之形式的片段，其中經添加的胺基酸可能是非-天然存在的胺基酸(例如 D-型胺基酸)。

GLP-1 變體意指具有促胰島素功能的肽，其具有一或多個與該等天然 GLP-1 不同的胺基酸序列。

exendin3 和 exendin4 是由 39 個胺基酸構成的促胰島素肽，其與 GLP-1 具有 53%的胺基酸序列同源性。exendin-3 和 exendin-4 的胺基酸序列如下：

exendin-3

HSDGT FTSDL SKQME EEAVR LFIEW LKNNGG PSSGA
PPPS

exendin-4

HGEGT FTSDL SKQME EEAVR LFIEW LKNNGG PSSGA

PPPS

exendin 激動劑意指在活體內與受體反應的化合物，並具有與 exendin 相等的生物活性，其與 exendin 的結構無關。exendin 衍生物意指與天然的 exendin 具有胺基酸序列同源性至少為 80% 的肽，其可能在胺基酸殘基上有一些基團以化學方式被取代(例如 α -甲基化、 α -羥基化)、被刪除(例如脫胺基化)或被修改(例如 N-甲基化)，並具有促胰島素功能。

exendin 片段意指在天然 exendin 的 N-端或 C-端具有一或多個被添加或被刪除的胺基酸之片段，其中可添加非-天然存在的胺基酸(例如 D-型胺基酸)，並具有促胰島素功能。

exendin 變體意指具有至少一個與天然 exendin 之序列不同的胺基酸序列的肽，其具有促胰島素功能。

可分別或併用製備每個 exendin 激動劑、衍生物、片段和變體的方法。例如，本發明包括促胰島素肽，其具有與該等天然促胰島素肽的序列至少有一個不同胺基酸的胺基酸序列，並具有在 N-端經脫胺基的胺基酸殘基。

在一特定的具體事實中，在本發明中使用天然的促胰島素肽，並可使用固相合成法合成經修改的促胰島素肽，而大多數天然的肽都包含可藉著重組技術產生的天然促胰島素肽。

此外，在本發明中使用的促胰島素肽可在各種位置與非-肽基聚合物結合。

不像 N-端偶聯，當 PEG 與離胺酸殘基而不是 N-端偶聯時，將試管內活性維持在大約 8.5% (表 1)。此外，即使藉著刪除 exendin-4 的 N-端胺基團製備脫-胺基-組胺醯基 exendin-4 的 Fc 共軛物(在後文中稱為 DA-exendin-4)、藉著以羥基基團取代 exendin-4 的 N-端胺基團製備 β -羥基-咪唑丙基 exendin-4(在後文中稱為 HY-exendin-4)、藉著以兩個甲基基團修改 exendin-4 的 N-端胺基團製備二甲基組胺醯基 exendin-4(在後文中稱為 DM-exendin-4)，以及藉著刪除 exendin-4 之第一個組胺酸的 α 碳和與其連接之 N-端胺基團製備咪唑乙醯基-exendin-4(在後文中稱為 CA-exendin-4)，均顯示可與天然的 exendin-4 共軛物相比擬的試管內活性和血液半衰期(表 1)，這些共軛物顯示出意外高的活體內效力持續時間(圖 14)。根據本發明製備的 DM-exendin-4-免疫球蛋白 Fc 共軛物、DA-exendin-4-免疫球蛋白 Fc 共軛物、CA-exendin-4-免疫球蛋白 Fc 共軛物和 HY-exendin-4-免疫球蛋白 Fc 共軛物，顯示血液半衰期增加 50 小時或更多。亦藉著與 Lys 殘基偶聯-其不影響該肽之活性，將力價降低減至最少。此外，藉著在 N-端移除胺基團或 α 碳，觀察到意外高的葡萄糖降低活性。

免疫球蛋白 Fc 區，在用來當做藥物載劑方面是安全的，因為它是在活體內代謝之生物可降解的多肽。再者，當與整個免疫球蛋白分子相比時，免疫球蛋白 Fc 區具有相對較低的分子量，並因此其在共軛物之製備、純化、和產量上是有利的。因為免疫球蛋白 Fc 區不含 Fab 片段，

其的胺基酸序列根據抗體亞型有所不同而因此為高度非-均質的，可預期免疫球蛋白 Fc 區可大大地增加物質的均一性，並為較低抗原性的。

在本發明中使用的促胰島素肽與載劑物質和非-肽基聚合物連接。可用在本發明中之載劑物質，可選自由免疫球蛋白 Fc 區、白蛋白、運鐵蛋白、和 PEG 所組成之群組，而較佳的是免疫球蛋白 Fc 區。

當在本文中使用”免疫球蛋白 Fc 區”一詞時，意指免疫球蛋白的重-鏈恆定區 2(constant region 2, CH2)和重-鏈恆定區 3(CH3)，且沒有重和輕鏈的可變區、免疫球蛋白的重-鏈恆定區 1(CH1)、和輕-鏈恆定區 1(CL1)。更可含有在重-鏈恆定區的絞鏈區。再者，本發明之免疫球蛋白 Fc 區可含有一部分或全部的 Fc 區，其包含重-鏈恆定區 1(CH1)及/或輕-鏈恆定區 1(CL1)，除了重和輕鏈的可變區，只要其具有實質上類似或比天然蛋白質更好的生理學功能即可。再者 Ig Fc 區也可以是在 CH2 及/或 CH3 之胺基酸序列相對較長部分中具有一刪除的片段。也就是說，本發明之免疫球蛋白 Fc 區可包括 1)CH1 功能部位、CH2 功能部位、CH3 功能部位、和 CH4 功能部位，2)CH1 功能部位、和 CH2 功能部位，3)CH1 功能部位、和 CH3 功能部位，4)CH2 功能部位、和 CH3 功能部位，5)一或多個功能部位、和免疫球蛋白絞鏈區(或一部分絞鏈區)的組合，以及 6)重-鏈恆定區、和輕-鏈恆定區之每個功能部位的二聚體。

本發明之免疫球蛋白 Fc 區包含天然的胺基酸序列，以

前述的 Fc 衍生物是具有與本發明之 Fc 區相同之生物活性，或經改善之結構穩定性，例如對抗熱、pH 值或類似者的衍生物。

此外，這些 Fc 區可獲自分離自人類和其他動物，包括牛、山羊、豬、老鼠、兔子、倉鼠、大鼠、和天竺鼠的天然形式，或可以是其重組體或衍生物，獲自經轉型之動物細胞或微生物。在本文中，其等可獲自天然的免疫球蛋白，藉著從人類或動物生物中分離整個免疫球蛋白，並以蛋白水解酵素處理之。木瓜蛋白酶消化天然免疫球蛋白成為 Fab 和 Fc 區，而胃蛋白酶處理結果產生 pF'c 和 F(ab)2 片段。可使這些片段接受，例如尺寸排除層析法（size exclusion chromatography）以分離 Fc 和 pF'c。較佳的是，人類-衍生之 Fc 區是獲自微生物的重組免疫球蛋白 Fc 區。

此外，本發明之免疫球蛋白 Fc 區可以是具有天然糖鏈的形式、與天然形式相比較增加糖鏈或減少糖鏈的，或可以是經脫糖基化的形式。可藉著在技術領域中常用的方法，如化學方法、酵素方法、和使用微生物的基因工程方法，達成免疫球蛋白 Fc 糖鏈的增加、減少或移除。從 Fc 區中移除糖鏈，結果劇烈地降低了對第一個補體成份 C1 之 C1q 部分的結合親和力，並減少或喪失了抗體-依賴性細胞-介導之胞毒性或補體-依賴性之胞毒性，藉此不在活體內引起不必要的免疫反應。關於這一點，經脫糖基化或無糖基化形式的免疫球蛋白 Fc 區可能較適合作為本發明之藥物載劑的對象。

當在本文中使用时，"脫糖基化"一詞意指以酵素方式從 Fc 區中移除糖部分，而"無糖基化"一詞意指由原核生物，較佳的是大腸桿菌產生未經糖基化形式的 Fc 區。

另一方面，免疫球蛋白 Fc 區可衍生自人類或其他動物，包括牛、山羊、豬、老鼠、兔子、倉鼠、大鼠、和天竺鼠，且較佳的是人類。此外，免疫球蛋白 Fc 區可以是衍生自 IgG、IgA、IgD、IgE、和 IgM 的 Fc 區，或藉著其組合或其雜化物而構成。較佳的是，其衍生自 IgG 或 IgM-其為在人類血液中最豐富的蛋白質，而最佳的是衍生自 IgG-已知其提高配體-結合蛋白質的半衰期。

另一方面，當在本文中使用时"組合"一詞時，意指編碼相同來源之單-鏈免疫球蛋白 Fc 區的多肽與不同來源之單-鏈多肽連接，形成二聚體或多聚體。也就是說，二聚體或多聚體可由二或多個片段形成，其選自由 IgG Fc、IgA Fc、IgM Fc、IgD Fc、和 IgE Fc 片段所組成之群組。

當在本文中使用时"雜化物"一詞時，意指在單-鏈免疫球蛋白 Fc 區中出現編碼二或多個不同來源之免疫球蛋白 Fc 區的序列。在本發明中，各種類型之雜化物都是可能的。也就是，功能部位雜化物可由一到四個功能部位構成，其選自由 IgG Fc、IgM Fc、IgA Fc、IgE Fc、和 IgD Fc 的 CH1、CH2、CH3、和 CH4 所組成之群組，並可含有絞鏈區。

另一方面，將 IgG 分成 IgG1、IgG2、IgG3、和 IgG4 亞型，且本發明包含其組合和雜化物。較佳的是 IgG2 和 IgG4 亞型，而最佳的是 IgG4 的 Fc 區，罕見地具有效應物功能，

3mg/ml，使 GLP-1(AP, USA)與 3.4K 丁醛(2)PEG(具有兩個丁醛基團的 PEG, Nektar, USA)反應 90 分鐘，使 PEG 和肽之 N-端接受 PEG 化。在此時，在 100mM K-P(pH6.0)之溶液中進行反應，並在其中加入作為還原劑的 20mM SCB (NaCNBH₃)。然後，在 4°C 下以 1:10 的肽：免疫球蛋白 Fc 之莫耳比例，和 50mg/ml 之總蛋白質濃度，進行反應 16 小時。在 100mM K-P(pH6.0)之溶液中進行反應，並加入作為還原劑的 20mM SCB。在偶聯反應之後，使用 SOURCE Q 16ml 和 SOURCE ISO 16ml 的兩-步驟純化過程，其與在實施例 2 中的相同。藉著逆相 HPLC 測得之純度為 91% (圖 10)。

實施例 12. 製備脫-胺基-組胺鹽基 GLP-1(Lys20,28)-免疫球蛋白 Fc 共軛物

藉著在 4°C 下，以 1:30 之莫耳比例，其中肽濃度為 3mg/ml，使脫-胺基-組胺鹽基 GLP-1(AP, USA)與 3.4K 丙醛(2)PEG 反應 4 小時，使 PEG 和肽之離胺酸(Lys)殘基接受 PEG 化。在此時，該反應在 pH7.5 濃度 100mM 之 Na-磷酸緩衝溶液中進行，並在其中加入作為還原劑的 20mM SCB，以完成反應。使用 SOURCE Q(XK 16ml, Amersham Biosciences)進行經單-PEG 化肽的純化過程。該反應在 4°C 下，以 1:6 的肽：免疫球蛋白 Fc 之比例，和 60mg/ml 之總蛋白質濃度，進行 16 小時。在 100mM K-P (pH6.0)之溶液中進行反應，並加入作為還原劑的 20mM SCB。在偶聯反

101年7月24日修(更)正本

補充序列表

<110> 韓美控股股份有限公司(Hanmi Holdings Co., Ltd.)

<120> 使用免疫球蛋白片段的促胰島素複合物

<130>

<140> TW 097107631

<141> 2008-03-05

<150> KR 10-2008-0001479

<151> 2008-01-04

<160> 11

<170> PatentIn 3.4版

<210> 1

<211> 39

<212> PRT

<213> 美國毒蜥

<400> 1

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

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

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35

<210> 2

<211> 39

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Exendin-4(N)-PEG-Fc

<220>

<221> 雜項特徵

<222> (1), (1)

<223> His連接至-PEG-Fc

<400> 2

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

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

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35

<210> 3

<211> 39

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Exendin-4(Lys27)-PEG-Fc

<220>

<221> 雜項特徵

<222> (27)..(27)
<223> Lys連接至-PEG-Fc

<400> 3

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

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

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 4
<211> 39
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> DM Exendin-4(Lys27)-PEG-Fc

<220>
<221> 雜項特徵
<222> (1)..(1)
<223> Xaa是二甲基-組胺醯基

<220>
<221> 雜項特徵
<222> (27)..(27)
<223> Lys連接至-PEG-Fc

<400> 4

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

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

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 5
<211> 39
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> DA Exendin-4(Lys27)-PEG-Fc

<220>
<221> 雜項特徵
<222> (1)..(1)
<223> Xaa是脫-胺基-組胺醯基

<220>
<221> 雜項特徵
<222> (27)..(27)
<223> Lys連接至-PEG-Fc

<400> 5

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

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

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 6
<211> 39
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HY Exendin-4(Lys27)-PEG-Fc

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

<220>
<221> 雜項特徵
<222> (27)..(27)
<223> Lys連接至-PEG-Fc

<400> 6

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

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

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 7
<211> 39
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CA Exendin-4(Lys27)-PEG-Fc

<220>
<221> 雜項特徵
<222> (1)..(1)
<223> Xaa是咪唑-乙醯基

<220>
<221> 雜項特徵
<222> (27)..(27)
<223> Lys連接至-PEG-Fc

<400> 7

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

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

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 8
<211> 39
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Ser12 DA Exendin-4(Lys27)-PEG-Fc

<220>

<221> 雜項特徵

<222> (1)..(1)

<223> Xaa是脫-胺基-組胺醯基

<220>

<221> 雜項特徵

<222> (27)..(27)

<223> Lys連接至-PEG-Fc

<400> 8

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

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

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 9

<211> 39

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> DA Exendin-4(Lys27)-白蛋白

<220>

<221> 雜項特徵

<222> (1)..(1)

<223> Xaa是脫-胺基-組胺醯基

<220>

<221> 雜項特徵

<222> (27)..(27)

<223> Lys連接至白蛋白

<400> 9

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

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

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 10

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> DA GLP-1(Lys20,28)-PEG-Fc

<220>

<221> 雜項特徵

<222> (1)..(1)

<223> Xaa是脫-胺基-組胺醯基

<220>
<221> 雜項特徵
<222> (20)..(20)
<223> 位置20及28中的一個Lys連接至-PEG-Fc

<220>
<221> 雜項特徵
<222> (28)..(28)
<223> 位置20及28中的一個Lys連接至-PEG-Fc

<400> 10

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

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

<210> 11
<211> 31
<212> PRT
<213> 智人

<400> 11

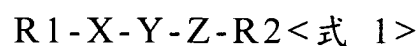
His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

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

十、申請專利範圍：

1. 一種促胰島素肽共軛物，其包括促胰島素肽和免疫球蛋白 Fc 區，其藉著非-肽基聚合物連接，其中該促胰島素肽係選自由以下者所組成之群組：脫-胺基-組胺醯基 exendin-4(藉由刪除 exendin-4 的 N-端胺基團製備)、 β -羥基-咪唑-丙醯基 exendin-4(藉由以羥基基團取代 exendin-4 的 N-端胺基團製備)、二甲基組胺醯基 exendin-4(藉由以兩個甲基基團修改 exendin-4 的 N-端胺基團製備)、以及咪唑乙醯基-exendin-4(藉由刪除 exendin-4 之第一個組胺酸的 α 碳和與其連接的 N-端胺基團製備)，其中該非-肽基聚合物係選自由聚乙二醇、聚丙二醇、乙二醇和丙二醇的共聚物、聚氧乙基化之多元醇、聚乙烯醇、多醣類、葡聚糖、聚乙烯基乙基醚、生物可降解之聚合物、脂質聚合物、幾丁質、透明質酸、及其組合所組成之群組，且其中該非-肽基聚合物的一端與該促胰島素肽的離胺酸殘基連接。

2. 如申請專利範圍第 1 項之促胰島素肽共軛物，其係以下化學式 1 代表，



其中 R1 係選自由脫-胺基-組胺醯基基團、N-二甲基-組胺醯基基團、 β -羥基咪唑丙基基團、和 4-咪唑乙醯基基團所組成之群組；R2 係選自由-NH、-OH 和-Lys 所組成之群組；

X 係 Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-R3-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Ph

e-Ile-Glu-Trp-Leu-R4-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-
 Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser 、 或
 Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-R3-Gln-Met-Glu
 -Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-R4-Asn-Gl
 y-Gly ;

R3 係選自由 Lys、Ser 和 Arg 所組成之群組；

R4 係選自由 Lys、Ser 和 Arg 所組成之群組；

Y 係選自由以下者組成之群組：聚乙二醇、聚丙二醇、
 乙二醇和丙二醇的共聚物、聚氧乙基化之多元醇、聚乙烯
 醇、多醣類、葡聚糖、聚乙烯基乙基醚、生物可降解之聚
 合物、脂質聚合物、幾丁質、透明質酸、及其組合；且

Z 為免疫球蛋白 Fc 區。

3.如申請專利範圍第 1 項之促胰島素肽共軛物，其中該
 非-肽基聚合物具有兩端，分別與免疫球蛋白 Fc 區的胺基團
 或硫醇基團和促胰島素肽結合。

4.如申請專利範圍第 1 項之促胰島素肽共軛物，其中該
 免疫球蛋白 Fc 區是經脫糖基化的。

5.如申請專利範圍第 1 項之促胰島素肽共軛物，其中該
 免疫球蛋白 Fc 區係由一到四個選自由 CH1、CH2、CH3、
 和 CH4 功能部位所組成之群組的功能部位構成。

6.如申請專利範圍第 5 項之促胰島素肽共軛物，其中該
 免疫球蛋白 Fc 區更包含絞鏈區。

7.如申請專利範圍第 1 項之促胰島素肽共軛物，其中該
 免疫球蛋白 Fc 區是衍生自選自由 IgG、IgA、IgD、IgE、和

IgM 所組成之群組的免疫球蛋白之 Fc 區。

8.如申請專利範圍第 7 項之促胰島素肽共軛物，其中該免疫球蛋白 Fc 區的每個功能部位是不同來源的功能部位雜化物，其衍生自選自由 IgG、IgA、IgD、IgE、和 IgM 所組成之群組的免疫球蛋白。

9.如申請專利範圍第 7 項之促胰島素肽共軛物，其中該免疫球蛋白 Fc 區是由相同來源之單-鏈免疫球蛋白構成的二聚體或多聚體(免疫球蛋白 Fc 之組合)。

10.如申請專利範圍第 7 項之促胰島素肽共軛物，其中該免疫球蛋白 Fc 區是 IgG4 Fc 區。

11.如申請專利範圍第 10 項之促胰島素肽共軛物，其中該免疫球蛋白 Fc 區是人類經脫糖基化的 IgG4 Fc 區。

12.如申請專利範圍第 1 項之促胰島素肽共軛物，其中該非-肽基聚合物的反應基係選自由醛基團、丙醛基團、丁醛基團、順丁烯二醯亞胺基團、和琥珀醯亞胺基團所組成之群組。

13.如申請專利範圍第 12 項之促胰島素肽共軛物，其中琥珀醯亞胺衍生物係選自由琥珀醯亞胺基丙酸基、琥珀醯亞胺基羧甲基、羥基琥珀醯亞胺基或琥珀醯亞胺基碳酸基所組成之群組。

14.如申請專利範圍第 12 項之促胰島素肽共軛物，其中該非-肽基聚合物在兩端都具有反應性醛基團。

15.如申請專利範圍第 14 項之促胰島素肽共軛物，其中該非-肽基聚合物為聚乙二醇。

16. 一種製備如申請專利範圍第 1 項之促胰島素肽共軛物的方法，包括下列步驟，

(1) 使在其兩端具有選自由醛、順丁烯二醯亞胺、和琥珀醯亞胺基團所組成之群組的反應基的非-肽基聚合物，與該促胰島素肽的胺基團共價連接；

(2) 從(1)之反應混合物中分離包括該促胰島素肽的共軛物，其中該非-肽基聚合物與該促胰島素肽之胺基團共價連接；並

(3) 使免疫球蛋白 Fc 區與該經分離的共軛物之非-肽基聚合物的另一端共價連接，以產生包括與該非-肽基聚合物各端連接之免疫球蛋白 Fc 區和促胰島素肽的肽共軛物；其中該促胰島素肽係選自由以下者所組成之群組：脫-胺基-組胺醯基 exendin-4(藉由刪除 exendin-4 的 N-端胺基團製備)、 β -羥基-咪唑-丙醯基 exendin-4(藉由以羥基基團取代 exendin-4 的 N-端胺基團製備)、二甲基組胺醯基 exendin-4(藉由以兩個甲基基團修改 exendin-4 的 N-端胺基團製備)、以及咪唑乙醯基-exendin-4(藉由刪除 exendin-4 之第一個組胺酸的 α 碳和與其連接的 N-端胺基團製備)。

17. 一種製備如申請專利範圍第 1 項之促胰島素肽共軛物的方法，其包括下列步驟，

(1) 使在其兩端具有醛反應基的非-肽基聚合物，在 pH7.5 或更高下，與促胰島素肽的離胺酸殘基共價連接；

(2) 從(1)之反應混合物中分離包括該促胰島素肽的共軛物，其中該非-肽基聚合物與離胺酸殘基共價連接；並

(3)使免疫球蛋白 Fc 區與該經分離的共軛物之非-肽基聚合物的另一端共價連接，以產生包括與該非-肽基聚合物各端連接之免疫球蛋白 Fc 區和促胰島素肽的蛋白質共軛物；其中該促胰島素肽係選自由以下者所組成之群組：脫-胺基-組胺醯基 exendin-4(藉由刪除 exendin-4 的 N-端胺基團製備)、 β -羥基-咪唑-丙醯基 exendin-4(藉由以羥基基團取代 exendin-4 的 N-端胺基團製備)、二甲基組胺醯基 exendin-4(藉由以兩個甲基基團修改 exendin-4 的 N-端胺基團製備)、以及咪唑乙醯基-exendin-4(藉由刪除 exendin-4 之第一個組胺酸的 α 碳和與其連接的 N-端胺基團製備)。

18.如申請專利範圍第 16 或 17 項之方法，其中該非-肽基聚合物是聚乙二醇。

19.一種醫藥組合物，其係用以治療糖尿病、肥胖、急性冠狀動脈徵候群、或多囊性卵巢徵候群，其包括如申請專利範圍第 1 項之肽共軛物。

十一、圖式：

如次頁