

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-514949
(P2019-514949A)

(43) 公表日 令和1年6月6日(2019.6.6)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 47/64 (2017.01)	A 6 1 K 47/64	4 B 0 5 0
A 6 1 K 47/02 (2006.01)	A 6 1 K 47/02	4 C 0 7 6
A 6 1 K 47/26 (2006.01)	A 6 1 K 47/26	4 C 0 8 4
A 6 1 K 47/22 (2006.01)	A 6 1 K 47/22	4 H 0 4 5
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 73 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-557415 (P2018-557415)
 (86) (22) 出願日 平成29年5月1日 (2017.5.1)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年12月27日 (2018.12.27)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2017/030403
 (87) 国際公開番号 W02017/192449
 (87) 国際公開日 平成29年11月9日 (2017.11.9)
 (31) 優先権主張番号 62/332, 803
 (32) 優先日 平成28年5月6日 (2016.5.6)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/442, 057
 (32) 優先日 平成29年1月4日 (2017.1.4)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 509066019
 フェーズバイオ ファーマシューティカルズ、インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国、ペンシルベニア州 19355、マルベルン、ワン グレート パレー パークウェイ、スイート 30
 (74) 代理人 100099623
 弁理士 奥山 尚一
 (74) 代理人 100107319
 弁理士 松島 鉄男
 (74) 代理人 100125380
 弁理士 中村 綾子
 (74) 代理人 100142996
 弁理士 森本 聡二

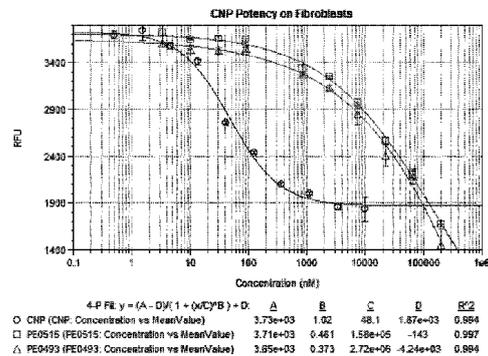
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 制御された持続放出用のE L P融合タンパク質

(57) 【要約】

本開示は、持続放出用の医薬製剤、及び持続放出型の製剤と長期半減期製剤を組み合わせた治療計画を送達する方法を提供する。本開示は、ペプチド及び小分子薬物について改善した薬物動態を提供する。

FIG. 1A Potency of CNP constructs



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

全身投与用の治療剤を含む持続放出型の医薬製剤であって、
前記治療剤が、タンパク質活性薬剤と、配列番号 1 ~ 13 の 1 つから選択される少なくとも 60 個のエラスチン様ペプチド (ELP) 構造単位とを含み、

前記タンパク質活性薬剤が、アペリン、アルギナーゼ、C 型ナトリウム利尿ペプチド (CNP)、グルカゴン様ペプチド (GLP) - 1 受容体拮抗薬、グルカゴン様ペプチド (GLP) - 2 受容体作動薬、ヘプシジン、インスリン様増殖因子 - 1 (IGF - 1)、ウロジラチン、サイモシン 4、TNF 関連アポトーシス誘導リガンド (TRAIL)、FGF 21、又はその断片若しくは誘導体からなる群から選択される、医薬製剤。

10

【請求項 2】

投与後に、注射部位からの低速吸収を提供する、請求項 1 に記載の医薬製剤。

【請求項 3】

可逆性マトリックスを形成するアミノ酸配列が存在しない活性薬剤の PK プロファイルと比較して、投与後に、平坦な PK プロファイルを提供する、請求項 2 に記載の医薬製剤。

【請求項 4】

前記 PK プロファイルにおいて、トラフに対するピーク (C_{min} に対する C_{max}) が小さく、 T_{max} に達するのが遅い又は遅延している、請求項 3 に記載の医薬製剤。

【請求項 5】

体温で形成された可逆性マトリックスが、タンパク質濃度が減少するに従って逆転する、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の医薬製剤。

20

【請求項 6】

前記 ELP が、配列番号 3 を含み、式中、X が Val、Gly、及び Ala から選択される、請求項 1 に記載の医薬製剤。

【請求項 7】

式中、各 X が、V、G、及び A から選択され、並びに

V : G : A の比が、

a) 5 : 3 : 2、

b) 7 : 2 : 0、

c) 7 : 0 : 2、

d) 6 : 0 : 3、

e) 5 : 2 : 2、及び

f) 10 : 0 : 0

30

からなる群から選択される、請求項 6 に記載の医薬製剤。

【請求項 8】

前記 ELP が、配列番号 13 を含み、式中、X が、Val、Gly、及び Ala から選択される、請求項 1 に記載の医薬製剤。

【請求項 9】

式中、各 X が、V、G、及び A から選択され、並びに V : G : A の比が、約 5 : 0 : 4

40

であり得る、請求項 8 に記載の医薬製剤。

【請求項 10】

前記 ELP が、VPGXG (配列番号 3) からなる 40 ~ 180 個の反復単位を含み、式中、各 X が、V、G、及び A から選択され、並びに V : G : A の比が、

a) 5 : 3 : 2、

b) 7 : 2 : 0、

c) 7 : 0 : 2、

d) 6 : 0 : 3、及び

e) 5 : 2 : 2

からなる群から選択される、請求項 6 に記載の医薬製剤。

50

【請求項 1 1】

X が、約 6 : 0 : 3 の比で V a l、G l y、及び A l a から選択される、請求項 1 0 に記載の医薬製剤。

【請求項 1 2】

前記 E L P が、X P G V G (配列番号 1 3) からなる 4 0 ~ 1 8 0 個の反復単位を含み、式中、各 X が、V、G、及び A から選択され、並びに V : G : A の比が、約 5 : 0 : 4 であり得る、請求項 8 に記載の医薬製剤。

【請求項 1 3】

対象が、ヒトである、請求項 1 から 1 2 のいずれか 1 項に記載の医薬製剤。

【請求項 1 4】

対象が、ヒト以外の哺乳動物である、請求項 1 から 1 2 のいずれか 1 項に記載の医薬製剤。

10

【請求項 1 5】

前記治療剤が、前記タンパク質活性薬剤と E L P の間の組換え融合タンパク質である、請求項 1 に記載の医薬製剤。

【請求項 1 6】

前記タンパク質活性薬剤が、約 3 0 秒 ~ 約 1 0 時間、又は約 3 0 秒 ~ 約 1 時間の範囲の循環半減期を有する、請求項 1 に記載の医薬製剤。

【請求項 1 7】

アペリン、アルギナーゼ、C N P、G L P - 1 受容体拮抗薬、G L P - 2 受容体作動薬、ヘプシジン、I G F - 1、ウロジラチン、サイモシン 4、及び T R A I L、F G F 2 1、又はその断片若しくは誘導体のうちの少なくとも 2 つを含む共製剤である、請求項 1 6 に記載の医薬製剤。

20

【請求項 1 8】

前記治療剤が、前記タンパク質活性薬剤と E L P の間の化学的コンジュゲートである、請求項 1 から 1 4、及び 1 6 から 1 7 のいずれか 1 項に記載の医薬製剤。

【請求項 1 9】

前記治療剤が、約 0 . 5 m g / m L ~ 約 2 0 0 m g / m L の範囲で存在する、請求項 1 から 1 8 のいずれか 1 項に記載の医薬製剤。

【請求項 2 0】

前記治療剤が、約 3 0 m g / m L ~ 約 1 5 0 m g / m L の範囲で存在する、請求項 1 9 に記載の医薬製剤。

30

【請求項 2 1】

前記治療剤が、約 5 0 m g / m L ~ 約 1 2 5 m g / m L、又は約 7 5 m g / m L ~ 約 1 1 0 m g / m L の範囲で存在する、請求項 2 0 に記載の医薬製剤。

【請求項 2 2】

前記治療剤が、約 1 0 0 m g / m L の量で存在する、請求項 2 1 に記載の医薬製剤。

【請求項 2 3】

前記治療剤が、保管条件において相転移したマトリックスを形成しない、請求項 1 から 2 2 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

40

【請求項 2 4】

前記保管条件が、約 4 0 未満、又は約 3 7 未満、約 3 0 未満、約 2 7 未満、約 2 5 未満、約 0 未満、約 - 1 5 未満、又は約 - 6 0 未満である、請求項 2 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 5】

前記保管条件において 1 ヶ月を超えて安定である、請求項 2 4 に記載の医薬製剤。

【請求項 2 6】

- a . 約 2 5 、
- b . 約 2 、
- c . 約 8 、

50

d . 約 - 1 5 、 及び

e . 約 - 8 0

からなる群から選択される温度において約 1 ヶ月を超えて安定である、請求項 2 5 に記載の医薬製剤。

【請求項 2 7】

塩化カルシウム、塩化マグネシウム、塩化カリウム、塩基性リン酸カリウム、塩化ナトリウム、ポリソルベート 2 0、ポリソルベート 8 0、リン酸ナトリウム、塩基性リン酸ナトリウム、ヒスチジン、及び二塩基性リン酸ナトリウムのうちの 2 つ以上を含む、請求項 1 から 2 6 のいずれか 1 項に記載の医薬製剤。

【請求項 2 8】

リン酸ナトリウム、塩化ナトリウム、及びポリソルベート 2 0 を含む、請求項 2 7 に記載の医薬製剤。

【請求項 2 9】

塩化ナトリウム及びヒスチジンを含む、請求項 2 7 に記載の医薬製剤。

【請求項 3 0】

1 0 m M のリン酸ナトリウム、1 1 0 m M の塩化ナトリウム、及び 0 . 1 % のポリソルベート 2 0 を含む、請求項 2 8 に記載の医薬製剤。

【請求項 3 1】

1 週間当たり約 1 回、1 週間当たり約 2 回、又は 1 ヶ月当たり 1 ~ 8 回投与するために事前用量化されたペン又はシリンジの形態で包装されている、請求項 1 から 3 0 のいずれか 1 項に記載の医薬製剤。

【請求項 3 2】

治療剤を含む持続放出型の医薬製剤であって、

前記治療剤が、タンパク質活性薬剤、及び V P G X G (配列番号 3) 又は X P G V G (配列番号 1 3) からなる 6 0 ~ 1 8 0 個の反復単位を含む E L P アミノ酸配列を含み、式中、各 X が、V、G、及び A から選択され、及び前記 E L P が、2 6 ~ 3 7 の転移温度を示し、

前記タンパク質活性薬剤が、アペリン、アルギナーゼ、C 型ナトリウム利尿ペプチド (C N P)、グルカゴン様ペプチド (G L P) - 1 受容体拮抗薬、グルカゴン様ペプチド (G L P) - 2 受容体作動薬、ヘプシジン、インスリン様増殖因子 - 1 (I G F - 1)、ウロジラチン、サイモシン 4、T N F 関連アポトーシス誘導リガンド (T R A I L)、F G F 2 1、又はその断片若しくは誘導体である、医薬製剤。

【請求項 3 3】

投与後に、注射部位からの低速吸収を提供する、請求項 3 2 に記載の医薬製剤。

【請求項 3 4】

前記アミノ酸配列が存在しない活性薬剤の P K プロファイルと比較して、投与後に、平坦な P K プロファイルを提供する、請求項 3 3 に記載の医薬製剤。

【請求項 3 5】

前記 P K プロファイルにおいて、トラフに対するピーク ($C_{m i n}$ に対する $C_{m a x}$) が小さく、 $T_{m a x}$ に達するのが遅い又は遅延している、請求項 3 3 に記載の医薬製剤。

【請求項 3 6】

体温で形成された可逆性マトリックスが、タンパク質濃度が減少するに従って逆転する、請求項 3 2 から 3 5 のいずれか 1 項に記載の医薬製剤。

【請求項 3 7】

V、G、及び A が、

a) 5 : 3 : 2、

b) 7 : 2 : 0、

c) 7 : 0 : 2、

d) 6 : 0 : 3、

e) 5 : 2 : 2、及び

10

20

30

40

50

f) 5 : 0 : 4

からなる群から選択される比にある、請求項 3 2 から 3 6 のいずれか 1 項に記載の医薬製剤。

【請求項 3 8】

前記 E L P が、V P G X G (配列番号 3) からなる少なくとも 6 0 個の反復単位を含む E L P 単位を含み、式中、各 X が V である、請求項 3 2 に記載の医薬製剤。

【請求項 3 9】

前記治療剤が、前記タンパク質活性薬剤と前記アミノ酸配列の間の組換え融合タンパク質である、請求項 3 2 に記載の医薬製剤。

【請求項 4 0】

前記タンパク質活性薬剤が、約 3 0 秒 ~ 約 1 0 時間、又は約 3 0 秒 ~ 約 1 時間の範囲の循環半減期を有する、請求項 3 2 に記載の医薬製剤。

【請求項 4 1】

前記タンパク質活性薬剤が、アペリン、アルギナーゼ、C N P、G L P - 1 受容体拮抗薬、G L P - 2 受容体作動薬、ヘプシジン、I G F - 1、ウロジラチン、サイモシン 4、T R A I L、F G F 2 1、又はその断片若しくは誘導体からなる群から選択される、請求項 3 2 に記載の医薬製剤。

【請求項 4 2】

アペリン、アルギナーゼ、C N P、G L P - 1 受容体拮抗薬、G L P - 2 受容体作動薬、ヘプシジン、I G F - 1、ウロジラチン、サイモシン 4、T R A I L、F G F 2 1、又はその断片若しくは誘導体のうちの少なくとも 2 つを含む共製剤である、請求項 3 2 に記載の医薬製剤。

【請求項 4 3】

前記治療剤が、前記タンパク質活性薬剤と前記 E L P アミノ酸配列の間の化学的コンジュゲートである、請求項 3 2 から 3 8 及び 4 0 から 4 2 のいずれか 1 項に記載の医薬製剤。

【請求項 4 4】

前記治療剤が、約 0 . 5 m g / m L ~ 約 2 0 0 m g / m L の範囲で存在する、請求項 3 2 から 4 3 のいずれか 1 項に記載の医薬製剤。

【請求項 4 5】

前記治療剤が、約 3 0 m g / m L ~ 約 1 5 0 m g / m L の範囲で存在する、請求項 4 4 に記載の医薬製剤。

【請求項 4 6】

前記治療剤が、約 5 0 m g / m L ~ 約 1 2 5 m g / m L の範囲、又は約 7 5 m g / m L ~ 約 1 1 0 m g / m L の範囲で存在する、請求項 4 5 に記載の医薬製剤。

【請求項 4 7】

前記治療剤が、約 1 0 0 m g / m L の範囲で存在する、請求項 4 6 に記載の医薬製剤。

【請求項 4 8】

前記治療剤が、保管条件においてマトリックスを形成しない、請求項 3 2 から 4 7 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 4 9】

前記保管条件が、約 4 0 未満、又は約 3 7 未満、又は約 3 0 未満、約 2 7 未満、又は約 2 5 未満、約 0 未満、約 - 1 5 未満、又は約 - 6 0 未満である、請求項 4 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 5 0】

塩化カルシウム、塩化マグネシウム、塩化カリウム、塩基性リン酸カリウム、塩化ナトリウム、塩化ナトリウム、ポリソルベート 2 0、ポリソルベート 8 0、リン酸ナトリウム、塩基性リン酸ナトリウム、ヒスチジン、及び二塩基性リン酸ナトリウムのうちの 2 つ又はそれ超を含む、請求項 3 2 から 4 9 のいずれか 1 項に記載の医薬製剤。

【請求項 5 1】

10

20

30

40

50

リン酸ナトリウム、塩化ナトリウム、及びポリソルベート 20 を含む、請求項 50 に記載の医薬製剤。

【請求項 52】

塩化ナトリウム及びヒスチジンを含む、請求項 50 に記載の医薬製剤。

【請求項 53】

10 mM のリン酸ナトリウム、110 mM の塩化ナトリウム、及び 0.1% のポリソルベート 20 を含む、請求項 51 に記載の医薬製剤。

【請求項 54】

1 週間当たり 1 回、1 週間当たり 2 回、又は 1 ヶ月当たり 1 ~ 8 回投与するために事前用量化されたペン又はシリンジの形態で包装されている、請求項 32 から 53 のいずれか 1 項に記載の医薬製剤。

10

【請求項 55】

請求項 1 から 54 のいずれか 1 項に記載の製剤を、必要としている対象に投与することを含む、治療剤の持続放出型投薬計画を送達する方法。

【請求項 56】

前記治療剤が、1 ヶ月当たり約 1 ~ 約 8 回投与される、請求項 55 に記載の方法。

【請求項 57】

前記製剤が、1 週間に約 1 回投与される、請求項 55 又は 56 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 58】

前記製剤が、皮下又は筋肉内に投与される、請求項 55 から 57 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 59】

投与部位が、病理学的部位ではない、請求項 55 から 58 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 60】

前記タンパク質活性薬剤が、ヒトアペリンであり、及び前記 ELP が、VPGXG (配列番号 3) からなる少なくとも 60 個の反復単位を含む、請求項 1 に記載の医薬製剤。

【請求項 61】

前記 ELP が、ヒトアペリンの C 末端に融合している、請求項 60 に記載の医薬製剤。

30

【請求項 62】

前記 ELP が、ヒトアペリンの N 末端に融合している、請求項 60 に記載の医薬製剤。

【請求項 63】

前記ヒトアペリンが、配列番号 39 である、請求項 60 に記載の医薬製剤。

【請求項 64】

前記ヒトアペリンが、配列番号 41 である、請求項 60 に記載の医薬製剤。

【請求項 65】

前記ヒトアペリンが、配列番号 42 である、請求項 60 に記載の医薬製剤。

【請求項 66】

前記ヒトアペリンが、配列番号 43 である、請求項 60 に記載の医薬製剤。

40

【請求項 67】

前記ヒトアペリンが、配列番号 44 である、請求項 60 に記載の医薬製剤。

【請求項 68】

前記治療剤が、配列番号 40 である、請求項 1 に記載の医薬製剤。

【請求項 69】

前記タンパク質活性薬剤が、ヒトアルギナーゼであり、及び前記 ELP が、VPGXG (配列番号 3) からなる少なくとも 60 個の反復単位を含む、請求項 1 に記載の医薬製剤。

【請求項 70】

前記 ELP が、ヒトアルギナーゼの C 末端に融合している、請求項 69 に記載の医薬製

50

剤。

【請求項 7 1】

前記 E L P が、ヒトアルギナーゼの N 末端に融合している、請求項 6 9 に記載の医薬製剤。

【請求項 7 2】

前記ヒトアルギナーゼが、配列番号 4 5 である、請求項 6 9 に記載の医薬製剤。

【請求項 7 3】

前記治療剤が、配列番号 4 6 である、請求項 1 に記載の医薬製剤。

【請求項 7 4】

前記タンパク質活性薬剤が、ヒト CNP であり、及び前記 E L P が、V P G X G (配列番号 3) からなる少なくとも 6 0 個の反復単位を含む、請求項 1 に記載の医薬製剤。 10

【請求項 7 5】

前記 E L P が、ヒト CNP の C 末端に融合している、請求項 7 4 に記載の医薬製剤。

【請求項 7 6】

前記 E L P が、ヒト CNP の N 末端に融合している、請求項 7 4 に記載の医薬製剤。

【請求項 7 7】

前記ヒト CNP が、配列番号 4 7 である、請求項 7 4 に記載の医薬製剤。

【請求項 7 8】

前記ヒト CNP が、配列番号 4 9 である、請求項 7 4 に記載の医薬製剤。

【請求項 7 9】

前記ヒト CNP が、配列番号 5 1 である、請求項 7 4 に記載の医薬製剤。 20

【請求項 8 0】

前記ヒト CNP が、配列番号 5 2 である、請求項 7 4 に記載の医薬製剤。

【請求項 8 1】

前記 CNP 及び前記 E L P が、プロテアーゼ切断部位を含有するリンカーにより分離されている、請求項 7 4 から 8 0 のいずれか 1 項に記載の医薬製剤。

【請求項 8 2】

前記プロテアーゼ切断部位における切断が、i n v i v o での前記 CNP の放出を可能にする、請求項 8 1 に記載の医薬製剤。

【請求項 8 3】

前記治療剤が、配列番号 4 8 である、請求項 1 に記載の医薬製剤。 30

【請求項 8 4】

前記治療剤が、配列番号 8 3 である、請求項 1 に記載の医薬製剤。

【請求項 8 5】

前記タンパク質活性薬剤が、ヒト G L P - 1 受容体拮抗薬であり、及び前記 E L P が、配列番号 1 4 である、請求項 1 に記載の医薬製剤。

【請求項 8 6】

前記 E L P が、ヒト G L P - 1 受容体拮抗薬の C 末端に融合している、請求項 8 5 に記載の医薬製剤。

【請求項 8 7】

前記ヒト G L P - 1 受容体拮抗薬が、配列番号 5 4 である、請求項 8 5 に記載の医薬製剤。 40

【請求項 8 8】

前記ヒト G L P - 1 受容体拮抗薬が、配列番号 6 4 である、請求項 8 5 に記載の医薬製剤。

【請求項 8 9】

前記ヒト G L P - 1 受容体拮抗薬が、配列番号 6 5 である、請求項 8 5 に記載の医薬製剤。

【請求項 9 0】

前記ヒト G L P - 1 受容体拮抗薬が、配列番号 2 7 である、請求項 8 5 に記載の医薬製 50

剤。

【請求項 9 1】

前記ヒト G L P - 1 受容体拮抗薬が、配列番号 2 8 である、請求項 8 5 に記載の医薬製剤。

【請求項 9 2】

前記ヒト G L P - 1 受容体拮抗薬が、配列番号 6 0 である、請求項 8 5 に記載の医薬製剤。

【請求項 9 3】

前記ヒト G L P - 1 受容体拮抗薬が、配列番号 6 1 である、請求項 8 5 に記載の医薬製剤。

10

【請求項 9 4】

前記ヒト G L P - 1 受容体拮抗薬が、配列番号 6 2 である、請求項 8 5 に記載の医薬製剤。

【請求項 9 5】

前記ヒト G L P - 1 受容体拮抗薬が、配列番号 6 3 である、請求項 8 5 に記載の医薬製剤。

【請求項 9 6】

前記ヒト G L P - 1 受容体拮抗薬が、配列番号 6 6 である、請求項 8 5 に記載の医薬製剤。

【請求項 9 7】

前記ヒト G L P - 1 受容体拮抗薬が、配列番号 6 7 である、請求項 8 5 に記載の医薬製剤。

20

【請求項 9 8】

前記治療剤が、配列番号 5 7 である、請求項 1 に記載の医薬製剤。

【請求項 9 9】

前記治療剤が、配列番号 5 8 である、請求項 1 に記載の医薬製剤。

【請求項 1 0 0】

前記治療剤が、配列番号 5 9 である、請求項 1 から 3 0 のいずれか 1 項に記載の医薬製剤。

【請求項 1 0 1】

前記タンパク質活性薬剤が、ヒト G L P - 2 受容体作動薬であり、及び前記 E L P が、V P G X G (配列番号 3) からなる少なくとも 6 0 個の反復単位を含む、請求項 1 に記載の医薬製剤。

30

【請求項 1 0 2】

前記 E L P が、ヒト G L P - 2 受容体作動薬の C 末端に融合している、請求項 1 0 1 に記載の医薬製剤。

【請求項 1 0 3】

前記 E L P が、ヒト G L P - 2 受容体作動薬の N 末端に融合している、請求項 1 0 1 に記載の医薬製剤。

【請求項 1 0 4】

前記ヒト G L P - 2 受容体作動薬が、配列番号 6 8 である、請求項 1 0 1 に記載の医薬製剤。

40

【請求項 1 0 5】

前記ヒト G L P - 2 受容体作動薬が、配列番号 7 0 である、請求項 1 0 1 に記載の医薬製剤。

【請求項 1 0 6】

前記ヒト G L P - 2 受容体作動薬が、配列番号 7 4 であり、式中、X が、G、L、I、又は V である、請求項 1 0 1 に記載の医薬製剤。

【請求項 1 0 7】

前記治療剤が、配列番号 6 9 である、請求項 1 に記載の医薬製剤。

50

- 【請求項 108】
前記治療剤が、配列番号 71 である、請求項 1 に記載の医薬製剤。
- 【請求項 109】
前記治療剤が、配列番号 73 である、請求項 1 に記載の医薬製剤。
- 【請求項 110】
前記タンパク質活性薬剤が、ヒトヘプシジンであり、及び前記 ELP が、VPGXG (配列番号 3) からなる少なくとも 60 個の反復単位を含む、請求項 1 に記載の医薬製剤。
- 【請求項 111】
前記 ELP が、ヒトヘプシジンの C 末端に融合している、請求項 110 に記載の医薬製剤。 10
- 【請求項 112】
前記 ELP が、ヒトヘプシジンの N 末端に融合している、請求項 110 に記載の医薬製剤。
- 【請求項 113】
前記ヒトヘプシジンが、配列番号 75 である、請求項 110 に記載の医薬製剤。
- 【請求項 114】
前記治療剤が、配列番号 76 である、請求項 1 に記載の医薬製剤。
- 【請求項 115】
前記治療剤が、配列番号 77 である、請求項 1 に記載の医薬製剤。
- 【請求項 116】
前記タンパク質活性薬剤が、IGF - 1 であり、及び前記 ELP が、VPGXG (配列番号 3) からなる少なくとも 60 個の反復単位を含む、請求項 1 に記載の医薬製剤。 20
- 【請求項 117】
前記タンパク質活性薬剤が、ヒト IGF - 1 であり、及び前記 ELP が、XPGVG (配列番号 13) からなる少なくとも 60 個の反復単位を含む、請求項 1 に記載の医薬製剤。
- 【請求項 118】
前記 ELP が、ヒト IGF - 1 の C 末端に融合している、請求項 116 又は請求項 117 に記載の医薬製剤。
- 【請求項 119】
前記 ELP が、ヒト IGF - 1 の N 末端に融合している、請求項 116 又は請求項 117 に記載の医薬製剤。 30
- 【請求項 120】
ヒト IGF - 1 が、配列番号 78 である、請求項 116 又は請求項 117 に記載の医薬製剤。
- 【請求項 121】
前記治療剤が、配列番号 79 である、請求項 1 に記載の医薬製剤。
- 【請求項 122】
前記治療剤が、配列番号 80 である、請求項 1 に記載の医薬製剤。
- 【請求項 123】
前記タンパク質活性薬剤が、ヒトウロジラチンであり、及び前記 ELP が、VPGXG (配列番号 3) からなる少なくとも 60 個の反復単位を含む、請求項 1 に記載の医薬製剤。 40
- 【請求項 124】
前記 ELP が、ヒトウロジラチンの C 末端に融合している、請求項 124 に記載の医薬製剤。
- 【請求項 125】
前記 ELP が、ヒトウロジラチンの N 末端に融合している、請求項 124 に記載の医薬製剤。
- 【請求項 126】 50

前記ヒトウロジラチンが、配列番号 84 である、請求項 124 に記載の医薬製剤。

【請求項 127】

前記治療剤が、配列番号 85 である、請求項 1 に記載の医薬製剤。

【請求項 128】

前記治療剤が、配列番号 86 である、請求項 1 に記載の医薬製剤。

【請求項 129】

前記タンパク質活性薬剤が、ヒトサイモシン 4 であり、及び前記 ELP が、VPGXG (配列番号 3) からなる少なくとも 60 個の反復単位を含む、請求項 1 に記載の医薬製剤。

【請求項 130】

前記 ELP が、ヒトサイモシン 4 の C 末端に融合している、請求項 129 に記載の医薬製剤。

【請求項 131】

前記 ELP が、ヒトサイモシン 4 の N 末端に融合している、請求項 129 に記載の医薬製剤。

【請求項 132】

前記ヒトサイモシン 4 が、配列番号 89 である、請求項 129 に記載の医薬製剤。

【請求項 133】

前記治療剤が、配列番号 90 である、請求項 1 に記載の医薬製剤。

【請求項 134】

前記タンパク質活性薬剤が、ヒト TRAIL であり、及び前記 ELP が、VPGXG (配列番号 3) からなる少なくとも 60 個の反復単位を含む、請求項 1 に記載の医薬製剤。

【請求項 135】

前記 ELP が、ヒト TRAIL の C 末端に融合している、請求項 134 に記載の医薬製剤。

【請求項 136】

前記 ELP が、ヒト TRAIL の N 末端に融合している、請求項 134 に記載の医薬製剤。

【請求項 137】

前記ヒト TRAIL が、配列番号 89 である、請求項 134 に記載の医薬製剤。

【請求項 138】

前記治療剤が、配列番号 92 である、請求項 1 に記載の医薬製剤。

【請求項 139】

前記治療剤が、配列番号 98 である、請求項 1 に記載の医薬製剤。

【請求項 140】

タンパク質活性薬剤と、配列番号 1 ~ 13 のいずれか 1 つから選択される少なくとも 60 個のエラスチン様ペプチド (ELP) 構造単位とを含む治療用タンパク質であって、前記タンパク質活性薬剤が、アペリン、アルギナーゼ、C 型ナトリウム利尿ペプチド (CNP)、グルカゴン様ペプチド (GLP) - 1 受容体拮抗薬、グルカゴン様ペプチド (GLP) - 2 受容体作動薬、ヘプシジン、インスリン様増殖因子 - 1 (IGF - 1)、ウロジラチン、サイモシン 4、TNF 関連アポトーシス誘導リガンド (TRAIL)、FGF 21、又はその断片若しくは誘導体からなる群から選択される、治療用タンパク質。

【請求項 141】

治療剤を含む治療用タンパク質であって、

前記治療剤が、タンパク質活性薬剤と、VPGXG (配列番号 3) 又は XPGVG (配列番号 13) からなる 60 ~ 180 個の反復単位を含む ELP アミノ酸配列であって、式中、各 X が、V、G、及び A から選択される ELP アミノ酸配列とを含み、並びに前記 ELP が、26 ~ 37 の転移温度を示し、

前記タンパク質活性薬剤が、アペリン、アルギナーゼ、C 型ナトリウム利尿ペプチド (CNP)、グルカゴン様ペプチド (GLP) - 1 受容体拮抗薬、グルカゴン様ペプチド (G

10

20

30

40

50

LP) - 2 受容体作動薬、ヘブシジン、インスリン様増殖因子 - 1 (IGF - 1)、ウロジラチン、サイモシン 4、TNF 関連アポトーシス誘導リガンド (TRAIL)、FGF 21、又はその断片若しくは誘導体である、治療用タンパク質。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2017年1月4日出願の米国仮特許出願第62/442,057号及び2016年5月6日出願の米国仮特許出願第62/332,803号の利益を主張し、各号の内容は、引用することにより本明細書の一部をなすものとする。

10

【0002】

本開示は、持続放出用の医薬製剤、及び持続放出型の製剤を用いた治療計画を送達する方法に関する。

【0003】

電子的に提出されたテキストファイルの説明

本明細書と共に電子的に提出されたテキストファイルの内容は、引用することにより本明細書の一部をなすものとする：配列表のコンピューター読み取り可能フォーマットのコピー（ファイルネーム：PHAS__033__02WO__SeqList__ST25.txt、記録日：2017年5月1日、ファイルサイズ287キロバイト）。

20

【背景技術】

【0004】

ペプチド及び小分子薬物の有効性は、多くの場合、循環中でのそのような薬物の半減期、並びに実質的に一定の血漿レベルを得る難しさにより制約を受ける。例えば、インクレチン (GLP - 1) は、その循環中での短い半減期を埋め合わせるために、比較的高用量で投与されなければならない、またこのような高用量は、とりわけ悪心と関連する (Murphy and Bloom, Nonpeptidic glucagon-like peptide 1 receptor agonists: A magic bullet for diabetes? PNAS 104 (3): 689 - 690 (2007))。更に、ペプチド薬剤 (peptide agent) の血管活性腸管ペプチド (VIP) は、いくつかの見積りでは1分未満の半減期を示し、医薬品としてこの薬剤を使用することを非実用的にしている (Domschke et al., Vasoactive intestinal peptide in man: pharmacokinetics, metabolic and circulatory effects, Gut 19: 1049 - 1053 (1978); Hennig and Sawmiller, Vasoactive intestinal peptide: cardiovascular effects, Cardiovascular Research 49: 27 - 37 (2001))。ペプチド薬物の血漿半減期が短いのは、腎クリアランスが速いこと、並びに体循環中の酵素的分解に多くの場合起因する。

30

【発明の概要】

40

【0005】

本開示は、持続放出用の医薬製剤、及び持続放出型の製剤を用いた治療計画を送達する方法を提供する。本開示は、これによりペプチド及び小分子薬物について改善した薬物動態を提供する。

【0006】

いくつかの態様では、本開示は、持続放出型の医薬製剤を提供する。該製剤は、全身投与用の治療剤を含み、該治療剤は、活性薬剤と、対象の体温で可逆性マトリックスを形成する能力を有するアミノ酸配列とを含む。可逆性マトリックスは、水素結合（例えば、分子内及び/又は分子間水素結合）、並びに疎水的寄与により形成される。該製剤は、1つ又は複数の薬学的に許容される賦形剤及び/又は希釈剤を更に含む。マトリックスは、注

50

射部位から循環への低速吸収を提供する。注射部位からの持続放出又は低速吸収は、注射部位において濃度分散するに従いマトリックスがゆっくりと逆転することに起因する。製品が循環中に移動すると、該製剤は半減期の長期化及び安定性の改善をもたらす。従って、低速吸収と長期半減期の独特な組み合わせが実現すると、トラフに対するピーク（ C_{min} に対する C_{max} ）が小さく、 T_{max} に達するのが遅い又は遅延している望ましいPKプロファイルをもたらす。

【0007】

特定の実施形態では、対象の体温で可逆性マトリックスを形成する能力を有するアミノ酸配列は、エラスチン様ペプチド（ELP）配列である。ELP配列は、エラスチンタンパク質中に存在する反復配列と関連する、又はそれを模倣する構造的なペプチド単位若しくは配列を含む、或いはそれから構成される。ELPアミノ酸配列は、選択された製剤において目視可能で可逆的な逆相転移を示し得る。すなわち、アミノ酸配列は、転移温度（ T_t ）未満の製剤において構造的に無秩序化しており、また極めて可溶性であり得るが、該製剤の温度が T_t より上昇すると、鋭敏な（2～3の範囲で）無秩序から秩序への相転移を示す。いくつかの実施形態では、本開示は、約26～約37の間で転移温度を有する治療剤を提供する。温度に付加して、ELPポリマーの長さ、ELPのアミノ酸組成、イオン強度、pH、圧力、選択された溶媒、有機溶質の存在、及びタンパク質濃度も、転移特性に影響を及ぼす可能性があり、またこれらは、所望の吸収プロファイルに応じて特別に調整され得る。いくつかの実施形態では、タンパク質濃度及び塩濃度が、転移特性（例えば、転移温度）に影響を及ぼす。マトリックスを形成するELPアミノ酸配列の代表的な配列又は構造が本明細書に開示される。

10

20

【0008】

特定の実施形態では、全身投与用の活性薬剤は、タンパク質又はペプチドであり、例えば約30秒～約1時間、～約2時間、又は～約5時間等の短い循環半減期を有し得る。いくつかの実施形態では、タンパク質又はペプチドは、30秒～約10時間の循環半減期を有する。治療剤は、タンパク質活性薬剤と、マトリックスを形成する能力を有するアミノ酸配列との間の組換え融合タンパク質であり得る。代表的なペプチド活性薬剤として、アペリン、アルギナーゼ、C型ナトリウム利尿ペプチド（CNP）、GLP-1受容体拮抗薬、GLP-2受容体作動薬、ヘプシジン、IGF-1、ウロジラチン、サイモシン4、TNF関連アポトーシス誘導リガンド（TRAIL）、副甲状腺ホルモン断片（例えば、残基1～34）、完全長副甲状腺ホルモン、副腎皮質刺激ホルモン（Adrenocorticotrophic hormone）、コバーシン（Coversin）、キスペプチン、キスペプチン断片（例えば、アミノ酸残基1～10又はアミノ酸残基1～54）、アネキシンA1由来のペプチド（例えば、アミノ酸残基2～26）、FGF21、又はその誘導体、類似体、模倣体、組み合わせ、若しくは断片が挙げられる。本開示に基づく送達用の小分子薬物が、本明細書に開示される。注射部位からの低速吸収を提供することにより、腎クリアランス及び分解が制御可能となり、これにより所望のPKプロファイルを実現する。

30

【0009】

その他の態様では、本開示は、活性薬剤の持続放出型投薬計画を送達する方法を提供する。該方法は、本明細書に記載する製剤を、これを必要とする対象に投与することを含み、該製剤は、1ヶ月に約1～約8回投与される。いくつかの実施形態では、（例えば）製剤は1週間に約1回投与され、そして皮下又は筋肉内に投与され得る。いくつかの実施形態では、投与部位は病理学的な部位ではない、すなわち、治療剤は意図した作用部位に直接投与されない。

40

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1A】CNP構築物の能力を示す図である。

【図1B】CNP構築物の能力を示す図である。

【図2A】PE0552又は生理食塩水（対照）を、1週間に3回、皮下注射したときの

50

、5週齢雄FVB/nJマウス(n=12/群)の成長に対する効果を示す図である。成長に対する効果を、鼻部から尾部までの長さを測定して決定した。グラフは、群毎の平均測定値と標準誤差を示す。

【図2B】PE0552又は生理食塩水(対照)を、1週間に3回、皮下注射したときの、5週齢雄FVB/nJマウス(n=12/群)の成長に対する効果を示す図である。成長に対する効果を、鼻部から肛門までの長さを測定して決定した。グラフは、群毎の平均測定値と標準誤差を示す。

【図2C】PE0552又は生理食塩水(対照)を、1週間に3回、皮下注射したときの、5週齢雄FVB/nJマウス(n=12/群)の成長に対する効果を示す図である。成長に対する効果を、尾部の長さを測定して決定した。グラフは、群毎の平均測定値と標準誤差を示す。

10

【図3A】PE9206、PE9216、PE9306、PE9326、又は生理食塩水(対照)を1日1回、3週間皮下注射したときの、3週齢雄FVB/nJマウス(n=11/群)の成長に対する効果を示す図である。成長に対する効果を、鼻部から尾部までの長さを測定して決定した。グラフは、3週間経過時のベースラインからの平均成長変化を示す。

【図3B】PE9206、PE9216、PE9306、PE9326、又は生理食塩水(対照)を1日1回、3週間皮下注射したときの、3週齢雄FVB/nJマウス(n=11/群)の成長に対する効果を示す図である。成長に対する効果を、鼻部から肛門までの長さを測定して決定した。グラフは、3週間経過時のベースラインからの平均成長変化を示す。

20

【図3C】PE9206、PE9216、PE9306、PE9326、又は生理食塩水(対照)を1日1回、3週間皮下注射したときの、3週齢雄FVB/nJマウス(n=11/群)の成長に対する効果を示す図である。成長に対する効果を、尾部の長さを測定して決定した。グラフは、3週間経過時のベースラインからの平均成長変化を示す。

【図4】PE0503又はGLP-2(A2G)を、雄のスプラーグドローラット(200~220g、n=12/群)を対象に皮下注射したときの、11日間投与期間における小腸重量に対する効果を示す図である。投与は、生理食塩水を1日1回投与された媒体群；PE0503を1.3mg/kgで1日当たり1回投与されたPE0503 Q1D；PE0503を5.1mg/kgで2日に1回投与されたPE0503 Q2D；PE0503を20.5mg/kgで4日に1回投与されたPE0503 Q4D；0.1mg/kgのGLP2(A2G)を1日2回投与されたGLP-2(A2G)TIDであった。

30

【発明を実施するための形態】

【0011】

本開示は、持続放出用の医薬製剤、及び持続放出型の製剤を用いた治療計画を送達する方法を提供する。特定の実施形態では、本明細書に開示する医薬組成物は、強化された有効性、バイオアベイラビリティ、循環半減期、持続性、分解抵抗等を有する。これにより、本開示は、トラフに対するピークの比が小さく、及び/又はTmaxが延長した比較的平坦なPKプロファイルを含む、ペプチド及び小分子薬物等の活性薬剤の薬物動態を改善する。PKプロファイルは、比較的low頻度の投与スケジュール、例えばいくつかの実施形態では1ヶ月に1~8回の注射等により維持され得る。

40

【0012】

いくつかの態様では、本開示は、持続放出型の医薬製剤を提供する。該製剤は、全身投与用の治療剤を含み、該治療剤は、活性薬剤と、対象の体温でマトリックス又はコアセルベートを形成する能力を有するアミノ酸配列とを含む。可逆性マトリックスは、水素結合(例えば、分子内及び/又は分子間水素結合)、並びに疎水的寄与により形成される。製剤は、1つ又は複数の薬学的に許容される賦形剤及び/又は希釈剤を更に含む。マトリックスは、注射部位から循環への低速吸収を提供する。理論に縛られるものではないが、この低速吸収は、注射部位デポ周辺におけるマトリックス又はコアセルベートの低速反転に

50

起因する。低速吸収プロファイルは、平坦なPKプロファイル、並びに好都合で快適な投与計画を提供する。例えば、様々な実施形態では、活性薬剤の血漿濃度は、日数が経過しても（例えば、2～約60日間、又は約4～約30日間）、20倍を超える、又は約10倍を超える、又は約5倍を超える、又は約3倍を超えるような変化を示さない。一般的に、この平坦なPKプロファイルは、製剤を複数回にわたり（実質的に均等な間隔を置いて）投与しても、例えば少なくとも約2回、少なくとも約5回、又は少なくとも約10回等投与する際にも認められる。いくつかの実施形態では、低速吸収は、約5時間を上回る、約10時間を上回る、約20時間を上回る、約30時間を上回る、又は約50時間を上回るTmax（最高血漿中濃度に達するまでの時間）として顕在化する。

【0013】

可逆性マトリックスを形成するアミノ酸配列

注射部位からの持続放出又は低速吸収は、対象の体温において、水素結合したマトリックス又はコアセルベートを形成する能力を有するアミノ酸配列により制御される。

【0014】

いくつかの実施形態では、アミノ酸配列は、タンパク質骨格基及び/又は側鎖基を介して水素結合を形成し、及びマトリックス形成に対する疎水的相互作用に寄与し得る構造単位を含有する。いくつかの実施形態では、アミノ酸側鎖は、水素結合供与基を含まず、水素結合は、実質的にタンパク質骨格を介して形成される。代表的なアミノ酸として、プロリン、アラニン、バリン、グリシン、及びイソロイシン、及び類似したアミノ酸が挙げられる。いくつかの実施形態では、構造単位は、実質的に反復性の構造的モチーフ及び実質的に反復性の水素結合能力を生み出すために、実質的に反復性の構造単位である。このような及びその他の実施形態では、アミノ酸配列は、実質的に反復性のパターンで配置され得る少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約40%、又は少なくとも約50%のプロリンを含有する。この文脈において、実質的に反復性のパターンとは、アミノ酸配列のプロリン残基のうち、その少なくとも約50%又は少なくとも約75%が、定義可能な構造単位の一部であることを意味する。なおも別の実施形態では、アミノ酸配列は、水素結合ドナー側鎖を有するアミノ酸、例えばセリン、トレオニン、及び/又はチロシン等を含有する。いくつかの実施形態では、反復配列は、1～約4個のプロリン残基を含み得るが、残りの残基は非極性残基、例えば、グリシン、アラニン、ロイシン、イソロイシン、及びバリン等から独立に選択される。非極性又は疎水性残基は、マトリックス形成に対する疎水的相互作用に寄与し得る。

【0015】

その他の実施形態では、体温でマトリックスを形成する能力を有するアミノ酸配列は、ランダムコイル又は非球形の伸長構造を含み得る。例えば、体温でマトリックスを形成する能力を有するアミノ酸配列は、それぞれが本明細書により引用することにより本明細書の一部をなすものとする米国特許公開第2008/0286808号、WIPO特許公開第2008/155134号、及び米国特許公開第2011/0123487号で開示されるアミノ酸配列を含み得る。

【0016】

いくつかの実施形態では、アミノ酸配列は、少なくとも40個のアミノ酸からなる非構造化組換えポリマーを含む。非構造化ポリマーは、約100、約150、約200個を超える、又はそれ超の連続したアミノ酸を含み得る。いくつかの実施形態では、アミノ酸配列は、ランダムコイルドメインを形成する。特に、「ランダムコイルコンホメーション」を有する又は形成するポリペプチド又はアミノ酸ポリマーは、定義された二次及び三次構造を実質的に欠く。いくつかの実施形態では、非構造化ポリマーは、少なくとも40個のアミノ酸を有するポリマーとして定義され、グリシン(G)、アスパラギン酸(D)、アラニン(A)、セリン(S)、トレオニン(T)、グルタミン酸(E)、及びプロリン(P)残基の合計数は、ポリマー内の総アミノ酸の約80%超を占める。いくつかの実施形態では、アミノ酸の少なくとも50%が、チョウ-ファスマン(Chou-Fasman)アルゴリズムにより決定される二次構造を欠損している。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 7 】

アミノ酸配列は、注射した際に、保管温度よりも高い温度で「ゲル様の」状態を形成し得る。代表的な配列は、反復性のペプチド単位を有し、及び/又はより低い温度では比較的非構造的であり、またより高い温度では水素結合し、構造化した状態を実現する。

【 0 0 1 8 】

エラスチン様ペプチド (E L P)

いくつかの実施形態では、体温でマトリックスを形成する能力を有するアミノ酸配列は、4 ~ 10 個のアミノ酸からなる反復単位を有するペプチドである。反復単位は、マトリックスの形成において1、2、又は3個の水素結合を形成し得る。特定の実施形態では、体温でマトリックスを形成する能力を有するアミノ酸配列は、絹、エラスチン、コラーゲン、ケラチン、若しくはその模倣体のアミノ酸配列、又は本明細書により参考として組み込まれる米国特許第 6 , 3 5 5 , 7 7 6 号で開示されるアミノ酸配列である。

10

【 0 0 1 9 】

特定の実施形態では、アミノ酸配列は、エラスチン様ペプチド (E L P) 配列である。E L P 配列は、エラスチンタンパク質と関連する又はその模倣体である構造的ペプチド単位又は配列を含む、又はそれから構成される。E L P 配列は、3 ~ 約 20 個のアミノ酸、又はいくつかの実施形態では、約 4 ~ 約 10 個のアミノ酸、例えば約 4、約 5、若しくは約 6 個のアミノ酸等からなる構造単位から構築される。個々の構造単位の長さは変化してもよく、又は均一であってもよい。代表的な構造単位は、配列番号 1 ~ 13 (下記) により定義され、タンデム反復単位を含む反復性構造単位として採用されてもよく、又はいくつか組み合わせられて採用されてもよい。従って、E L P は、下記で定義されるような配列番号 1 ~ 13 から選択される構造単位 (複数可) を本質的に含み得る又はそれから構成され得る。

20

【 0 0 2 0 】

いくつかの実施形態では、構造単位が E L P 単位である実施形態を含め、アミノ酸配列は、約 1 ~ 約 500 個の構造単位、又は特定の実施形態では約 9 ~ 約 200 個の構造単位、又は特定の実施形態では約 10 ~ 200 個の構造単位、又は特定の実施形態では約 50 ~ 約 200 個の構造単位、又は特定の実施形態では約 80 ~ 約 200 個の構造単位若しくは約 80 ~ 約 150 個の構造単位を本質的に含む又はそれから構成される。いくつかの実施形態では、構造単位は、配列番号 1 ~ 13 のうちの1つ又は複数により定義される E L P 単位である。いくつかの実施形態では、E L P は配列番号 1 ~ 13 により定義される単位の組み合わせを含む。従って、構造単位は、全体として、アミノ酸残基約 50 ~ 約 2000 個、又はアミノ酸残基約 100 ~ 約 800 個、又はアミノ酸残基約 200 ~ 約 700 個、又はアミノ酸残基約 400 ~ 約 600 個の長さを有し得る。代表的な実施形態では、E L P 構造単位のアミノ酸配列は、約 3 個の構造単位、約 7 個の構造単位、約 9 個の構造単位、約 10 個の構造単位、約 15 個の構造単位、約 20 個の構造単位、約 40 個の構造単位、約 80 個の構造単位、約 90 個の構造単位、約 100 個の構造単位、約 120 個の構造単位、約 140 個の構造単位、約 144 個の構造単位、約 160 個の構造単位、約 180 個の構造単位、約 200 個の構造単位、又は約 500 個の構造単位を本質的に含む又はそれから構成される。代表的な実施形態では、構造単位は、全体として、アミノ酸残基約 45 個、アミノ酸残基約 90 個、アミノ酸残基約 100 個、アミノ酸残基約 200 個、アミノ酸残基約 300 個、アミノ酸残基約 400 個、アミノ酸残基約 500 個、アミノ酸残基約 600 個、アミノ酸残基約 700 個、アミノ酸残基約 720 個、アミノ酸残基約 800 個、又はアミノ酸残基約 1000 個の長さを有する。

30

40

【 0 0 2 1 】

アミノ酸配列は、選択された製剤において目視可能で可逆的な逆相転移を示し得る。すなわち、アミノ酸配列は、転移温度 (T_t) 未満の製剤において構造的に無秩序化した状態にあり、また極めて可溶性であり得るが、製剤の温度が T_t より上昇すると、鋭敏な (2 ~ 3 の範囲で) 無秩序から秩序への相転移又はコアセルベーションを示す。温度に付加して、アミノ酸ポリマーの長さ、アミノ酸組成、イオン強度、pH、圧力、選択された

50

溶媒、有機溶質の存在、及びタンパク質濃度も転移特性に影響を及ぼす可能性があり、またこれらは、製剤化において所望の吸収プロファイルが得られるように特別に調整され得る。吸収プロファイルは、血漿濃度又は活性薬剤の活性を経時的に決定することにより容易に試験可能である。

【0022】

特定の実施形態では、ELP成分（複数可）は、

(a) テトラペプチド Val - Pro - Gly - Gly、又は V P G G（配列番号1）、
 (b) テトラペプチド Ile - Pro - Gly - Gly、又は I P G G（配列番号2）、
 (c) ペンタペプチド Val - Pro - Gly - X - Gly（配列番号3）、又は V P G X G であって、式中、Xは、プロリンを除く任意の天然又は非天然のアミノ酸残基であり、及びXは、ポリマー性又はオリゴマー性の反復において任意選択的に異なる前記ペンタペプチド、

(d) ペンタペプチド Ala - Val - Gly - Val - Pro、又は A V G V P（配列番号4）、

(e) ペンタペプチド Ile - Pro - Gly - X - Gly、又は I P G X G（配列番号5）であって、式中、Xは、任意の天然又は非天然のアミノ酸残基であり、及びXは、ポリマー性又はオリゴマー性の反復において任意選択的に異なる前記ペンタペプチド、

(e) ペンタペプチド Ile - Pro - Gly - Val - Gly、又は I P G V G（配列番号6）、

(f) ペンタペプチド Leu - Pro - Gly - X - Gly、又は L P G X G（配列番号7）であって、式中、Xは、任意の天然又は非天然のアミノ酸残基であり、及びXは、ポリマー性又はオリゴマー性の反復において任意選択的に異なる前記ペンタペプチド、

(g) ペンタペプチド Leu - Pro - Gly - Val - Gly、又は L P G V G（配列番号8）、

(h) ヘキサペプチド Val - Ala - Pro - Gly - Val - Gly、又は V A P G V G（配列番号9）、

(i) オクタペプチド Gly - Val - Gly - Val - Pro - Gly - Val - Gly、又は G V G V P G V G（配列番号10）、

(j) ノナペプチド Val - Pro - Gly - Phe - Gly - Val - Gly - Ala - Gly、又は V P G F G V G A G（配列番号11）、

(k) ノナペプチド Val - Pro - Gly - Val - Gly - Val - Pro - Gly - Gly、又は V P G V G V P G G（配列番号12）、及び

(l) ペンタペプチド Xaa - Pro - Gly - Val - Gly、又は X P G V G（配列番号13）であって、式中、Xは任意の天然又は非天然のアミノ酸残基であり、及びXは、ポリマー性又はオリゴマー性の反復において任意選択的に異なるペンタペプチド

を含む、但しこれらに限定されない構造単位から形成され得る。

【0023】

配列番号1～13により定義されるそのような構造単位は、構造的な反復単位を形成し得る、又はELPを形成するために組み合わせて使用され得る。いくつかの実施形態では、ELP成分は、配列番号1～13から選択される構造単位の1つ又はその組み合わせ（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10個の）から全体的に（又はほぼ全体的に）形成される。その他の実施形態では、ELP成分の少なくとも約75%、又は少なくとも約80%、又は少なくとも約90%は、反復単位として存在し得る、配列番号1～13から選択される構造単位の1つ又は組み合わせから形成される。

【0024】

特定の実施形態では、ELPは、タンデム反復単位を含め、Xが上記で定義したような Val - Pro - Gly - X - Gly（配列番号3）からなる反復単位を含有し、またELP成分全体（V P G X G（配列番号3）以外の構造単位を含み得る）に対する Val - Pro - Gly - X - Gly（配列番号3）単位の占めるパーセンテージ（%）は、ELPの約50%を上回る、又は約75%を上回る、又は約85%を上回る、又は約95%を

10

20

30

40

50

上回る。ELPは、配列番号3の5～15個の構造単位（例えば、約9又は約10個の構造単位）からなるモチーフを含むことができ、ゲスト残基Xは、モチーフ内の少なくとも2又は少なくとも3個の単位において異なる。ゲスト残基は、非極性又は疎水性の残基等、例えばアミノ酸V、I、L、A、G、及びW等から独立に選択され得る（及び所望の逆相転移特性を保持するために選択され得る）。特定の実施形態では、ゲスト残基はV、G、及びAより選択される。

【0025】

特定の実施形態では、ELPは、タンデム反復単位を含め、Xが上記で定義したようなXaa-Pro-Gly-Val-Gly（配列番号13）からなる反復単位を含有し、またELP成分全体（XPGVG（配列番号13）以外の構造単位を含み得る）に対するXaa-Pro-Gly-Val-Gly（配列番号13）単位の占めるパーセンテージ（%）は、ELPの約50%を上回る、又は約75%を上回る、又は約85%を上回る、又は約95%を上回る。ELPは、配列番号13の5～15個の構造単位（例えば、約9又は約10個の構造単位）からなるモチーフを含むことができ、ゲスト残基Xは、モチーフ内の少なくとも2又は少なくとも3個の単位において異なる。ゲスト残基は、非極性又は疎水性の残基等、例えばアミノ酸V、I、L、A、G、及びW等から独立に選択され得る（及び所望の逆相転移特性を保持するために選択され得る）。特定の実施形態では、ゲスト残基はV及びAより選択される。

10

【0026】

特定の実施形態では、ELPは、配列番号1～13のいずれか単独又はその組み合わせからなるタンデム反復単位を含め、反復単位を含有する。いくつかの実施形態では、ELPは、任意の配列番号1～13について、その2つ以上を組み合わせた反復部を含有する。特定の実施形態では、ELPは配列番号3及び配列番号13からなる反復部を含有する。いくつかの実施形態では、ELPは、配列番号3及び配列番号13からなる反復部を含有し、ゲスト残基は非極性又は疎水性の残基等、例えばアミノ酸V、I、L、A、G、及びW等から独立に選択される（及び所望の逆相転移特性を保持するため選択され得る）。特定の実施形態では、ゲスト残基はV、G、及びAより選択される。

20

【0027】

いくつかの実施形態では、ELPは、本明細書に開示する1つ又は複数のELP構造単位について、その9個のコピーを含む9-merを含む。いくつかの実施形態では、ELPは、本明細書に開示するペプタペプチドについて、その9個のコピーを含む9-merを含む。いくつかの実施形態では、ELPは、配列番号3及び13を任意の組み合わせで含む9-merを含む。いくつかの実施形態では、ELPは、配列番号3と13とが交互に反復する配列を含む。異なる数の9-merからなるELPを組み合わせ、例えば18、27、36、45、54、63、72、81、90、99、108、117、126、135、144、153、162、171、又は180個の9-merのコピーを有するELPを生成することができる。

30

【0028】

特定の実施形態では、ELPは、配列番号3を含む9-merを含み、ゲスト残基はV、G、及びAから選択される。特定の実施形態では、ELPは、配列番号3を含む9-merを含み、V、G、及びAが7:2:0の比で存在する（ v_1 ）。特定の実施形態では、ELPは、配列番号3を含む9-merを含み、V、G、及びAが7:0:2の比で存在する（ v_2 ）。特定の実施形態では、ELPは、配列番号3を含む9-merを含み、V、G、及びAが6:0:3の比で存在する（ v_3 ）。特定の実施形態では、ELPは、配列番号3を含む9-merを含み、V、G、及びAが5:2:2の比で存在する（ v_4 ）。特定の実施形態では、ELPは、配列番号13を含む9-merを含み、ゲスト残基がV、G、及びAから選択される。特定の実施形態では、ELPは、配列番号13を含む9-merを含み、V、G、及びAが、5:0:4の比で存在する（ v_5 ）。代表的な9-merを表1に開示する。表2は、いくつかの代表的な9-merの転移温度を示す。

40

【0029】

50

【表 1】

表 1 代表的な 9-mer 中のゲスト残基の比。ポリマーは、ELP ポリマーは、10-mer ELP1 シリーズ(最低の疎水性)と 10-mer ELP4 シリーズ(最高の疎水性)の間の疎水性を有する。

ELP シリーズ	ペントマーモチーフ	ゲスト残基の比
1 シリーズ	VPG <u>X</u> G	5 Val : 3 Gly : 2 Ala
α	VPG <u>X</u> G	7 Val : 2 Gly : 0 Ala
β v1	VPG <u>X</u> G	7 Val : 0 Gly : 2 Ala
β v2	VPG <u>X</u> G	6 Val : 0 Gly : 3 Ala
γ	VPG <u>X</u> G	5 Val : 2 Gly : 2 Ala
δ	<u>X</u> PGVG	5 Val : 0 Gly : 4 Ala
	VPG <u>X</u> G	6 Val : 3 Gly : 0 Ala
	VPG <u>X</u> G	6 Val : 2 Gly : 1 Ala
	VPG <u>X</u> G	6 Val : 1 Gly : 2 Ala
	VPG <u>X</u> G	6 Val : 0 Gly : 3 Ala
	VPG <u>X</u> G	7 Val : 1 Gly : 1 Ala
	VPG <u>X</u> G	8 Val : 0 Gly : 1 Ala
	VPG <u>X</u> G	8 Val : 1 Gly : 0 Ala
4 シリーズ	VPG <u>X</u> G	10 Val : 0 Gly : 0 Ala

10

20

【 0 0 3 0 】

30

【表 2】

表 2 代表的な 9-mer の測定転移温度の ELP1 シリーズとの比較。Cary 分光光度計を使用して測定した濁度の変曲は、ELP バイオポリマーが相転移した結果である。

ELP シリーズ(10mg/ml)	転移温度
1 シリーズ(pPB1023)	37°C
α (pPE0253)	29°C
β v1(pPE0254)	28°C
β v2(pPE0311)	31°C
γ (pPE0255)	29°C
δ (pPE0256)	35°C
4 シリーズ(pPE0002)	26°C

40

50

【0031】

いくつかの実施形態では、ELPは、表1に掲載されている9-merの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、ELPは、 v1 、 v2 、及び/又はの9-merの組み合わせを含む。例えば、ELPは、144merが構築されるまで、の9-merと v1 の9-merを交互に16コピー反復することにより構築される。特定の実施形態では、ELPは、と v1 の9-merからなる組み合わせを含む。特定の実施形態では、ELPは、と v2 の9-merからなる組み合わせを含む。特定の実施形態では、ELPは、及びの9-merからなる組み合わせを含む。特定の実施形態では、ELPは、 v1 と v2 の9-merからなる組み合わせを含む。特定の実施形態では、ELPは、 v1 との9-merからなる組み合わせを含む。特定の実施形態では、ELPは、 v2 との9-merからなる組み合わせを含む。特定の実施形態では、ELPは、 v1 、及び v2 の9-merからなる組み合わせを含む。特定の実施形態では、ELPは、 v1 、及びの9-merからなる組み合わせを含む。特定の実施形態では、ELPは、 v2 、及びの9-merからなる組み合わせを含む。例えば、特別な配置では、ELP v2 は、次のゲスト残基を、次の配列、すなわちA-V-A-V-V-A-V-A-Vで繰り返される構造単位に含むことができる。繰り返される配列は、ELP内で約10回、約12回、約15回、約16回、約20回、約25回、約30回、又は約35回、又はそれ超の回数連続して反復され得る。いくつかの態様では、ELPは、約10~約20個の繰り返し配列を含有する。その他の態様では、ELPは、約15~20個の繰り返し配列を含有する。いくつかの態様では、ELPは、約16個の繰り返し配列を含有する。

10

20

【0032】

いくつかの実施形態では、ELPは、本明細書に開示する1つ又は複数のELP構造単位のコピー10個を含む10-merを含む。いくつかの実施形態では、ELPは、本明細書に開示するペントペプチドのコピー10個を含む10-merを含む。いくつかの実施形態では、ELPは、配列番号3及び13を任意の組み合わせで含む10-merを含む。いくつかの実施形態では、ELPは、配列番号3と13の間で交互に繰り返す配列を含む。異なる数の10-merからなるELPを組み合わせ、例えば、20、30、40、60、90、100、120、150、160、又は200個の10-merのコピーを有するELPを生成することができる。代表的な10-merを表3に開示する。

30

【0033】

【表 3】

表 3 代表的な 10-mer におけるゲスト残基の比。ELP ポリマーは、ELP1 シリーズ(最低の疎水性)と ELP4 シリーズ(最高の疎水性)の間の疎水性を有する。

ELP シリーズ	ペントマーモチーフ	ゲスト残基の比
1 シリーズ	VPG <u>X</u> G	5 Val : 3 Gly : 2 Ala
	VPG <u>X</u> G	5 Val : 4 Gly : 1 Ala
	VPG <u>X</u> G	5 Val : 5 Gly : 0 Ala
	VPG <u>X</u> G	5 Val : 2 Gly : 3 Ala
	VPG <u>X</u> G	5 Val : 1 Gly : 4 Ala
	VPG <u>X</u> G	5 Val : 0 Gly : 5 Ala
	VPG <u>X</u> G	6 Val : 4 Gly : 0 Ala
	VPG <u>X</u> G	6 Val : 3 Gly : 1 Ala
	VPG <u>X</u> G	6 Val : 2 Gly : 2 Ala
	VPG <u>X</u> G	6 Val : 1 Gly : 3 Ala
	VPG <u>X</u> G	6 Val : 0 Gly : 4 Ala
	VPG <u>X</u> G	7 Val : 3 Gly : 0 Ala
	VPG <u>X</u> G	7 Val : 2 Gly : 1 Ala
	VPG <u>X</u> G	7 Val : 1 Gly : 2 Ala
	VPG <u>X</u> G	7 Val : 0 Gly : 3 Ala
	VPG <u>X</u> G	8 Val : 2 Gly : 0 Ala
	VPG <u>X</u> G	8 Val : 0 Gly : 2 Ala
	VPG <u>X</u> G	8 Val : 1 Gly : 1 Ala
	VPG <u>X</u> G	9 Val : 1 Gly : 1 Ala
VPG <u>X</u> G	9 Val : 0 Gly : 1 Ala	
4 シリーズ	VPG <u>X</u> G	10 Val : 0 Gly : 0 Ala

【0034】

いくつかの実施形態では、ELPは、ターン構造を形成し得る。ターン構造を作り出すのに適する代表的なペプチド配列は、本明細書によりその全体が引用することにより本明細書の一部をなすものとする国際特許出願 PCT/US 第 96/05186 号に記載されている。例えば、配列 VPGXG (配列番号 3) 内の 4 番目の残基 (X) は、ターン形成を損なわずに変化し得る。

【0035】

代表的な ELP の構造は、表記 $ELP_k [X_i Y_j - n]$ を使用して記載することができ、式中、k は特定の ELP 反復単位を表し、カッコ内の大文字は、一文字のアミノ酸コードであり、及びその対応する下付き文字は構造単位内の各ゲスト残基 X の相対的な比を表し (該当する場合)、そして n は、いくつかの構造的反復部内の ELP の全長を記載する。例えば、ELP1 [V₅A₂G₃ - 10] は、ペントペプチド VPGXG (配列番号 3) の 10 個の反復単位を含有する ELP 成分を表し、式中、X は、相対的な比が約 5 :

2 : 3 のバリン、アラニン、及びグリシンであり；E L P 1 [K ₁ V ₂ F ₁ - 4] は、ペ
 ンタペプチド V P G X G (配列番号 3) の 4 個の反復単位を含有する E L P 成分を表し、
 式中、X は、相対的な比が約 1 : 2 : 1 のリジン、バリン、及びフェニルアラニンであり
 ；E L P 1 [K ₁ V ₇ F ₁ - 9] は、ペ
 ンタペプチド V P G X G (配列番号 3) の 9 個の
 反復単位を含有するポリペプチドを表し、式中、X は、相対的な比が約 1 : 7 : 1 のリジ
 ン、バリン、及びフェニルアラニンであり；E L P 1 [V - 5] は、ペ
 ンタペプチド V P
 G X G (配列番号 3) の 5 個の反復単位を含有するポリペプチドを表し、式中、X はバリン
 であり；E L P 1 [V - 2 0] は、ペ
 ンタペプチド V P G X G (配列番号 3) の 2 0 個
 の反復単位を含有するポリペプチドを表し、式中、X はバリンであり；E L P 2 [5] は
 、ペ
 ンタペプチド A V G V P (配列番号 4) の 5 個の反復単位を含有するポリペプチドを表し、
 式中、X はバリンであり；E L P 3 [V - 5] は、ペ
 ンタペプチド I P G X G (配列番号 5) の 5 個の反復単
 位を含有するポリペプチドを表し、式中、X はバリンであり；E L P 4 [V - 5] は、ペ
 ンタペプチド L P G X G (配列番号 7) の 5 個の反復単位を含有するポリペプチドを表し
 、式中、X はバリンである。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 6 】

E L P に関して、T t は、ゲスト残基の疎水性の関数である。従って、ゲスト残基（複
 数可）の同一性及びそのモル分画（複数可）を変化させることにより、広範囲の温度にわ
 たり逆相転移を示す E L P が合成可能である。従って、所与の E L P 長さにおける T t は
 、E L P 配列内により大きな割合の疎水性ゲスト残基を組み込むことにより低下し得る。
 適する疎水性ゲスト残基の例として、バリン、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニ
 ン、トリプトファン、及びメチオニンが挙げられる。中程度に疎水性であるチロシンも利
 用可能である。反対に、T t は、残基、例えばグルタミン酸、システイン、リジン、アス
 パラギン酸、アラニン、アスパラギン、セリン、トレオニン、グリシン、アルギニン、及
 びグルタミンから選択される残基等を組み込むことにより上昇し得る。

【 0 0 3 7 】

分子量 > 1 0 0 , 0 0 0 を有するポリペプチドの場合、P C T / U S 第 9 6 / 0 5 1 8
 6 号（本明細書により参照としてその全体が組み込まれる）で開示される疎水性スケール
 が、特定の E L P 配列のおよその T t を予測するための 1 つの手段を提供する。分子量 <
 1 0 0 , 0 0 0 を有するポリペプチドの場合、T t は次の二次関数、すなわち $T t = M 0$
 $+ M 1 X + M 2 X^2$ により予測又は決定可能であり、式中、X は、融合タンパク質の M W
 、及び $M 0 = 1 1 6 . 2 1$; $M 1 = - 1 . 7 4 9 9$; $M 2 = 0 . 0 1 0 3 4 9$ である。

【 0 0 3 8 】

E L P は、いくつかの実施形態では、約 1 0 ~ 約 3 7 の範囲の、例えば約 2 0 ~ 約 3
 7 、又は約 2 5 ~ 約 3 7 等の T t を提供するように選択又は設計される。いくつか
 の実施形態では、周辺の体温がわずかに低めであることを考慮すれば、生理条件（例えば
 、0 . 9 % の生理食塩水）における転移温度は約 3 4 ~ 3 6 である。

【 0 0 3 9 】

特定の
 実施形態では、E L P は、[V P G X G]_m を含み、式中、m は、1 ~ 2 0 0 の
 任意の数である。特定の
 実施形態では、E L P は、[V P G X G]_m を含み、式中、m は
 、1 ~ 2 0 0 の任意の数であり、また各 X は、V、G、及び A から選択される。特定の
 実施形態では、E L P は、[V P G X G]_m を含み、式中、m は、1 ~ 2 0 0 の任意の数で
 あり、各 X は、V、G、及び A から選択され、そして V : G : A の比は、約 5 : 3 : 2 で
 あり得る。特定の
 実施形態では、E L P は、[V P G X G]_{6 0} を含み、各 X は、V、G
 、及び A から選択され、そして V : G : A の比は、約 5 : 3 : 2 であり得る。特定の
 実施形態では、E L P は、[V P G X G]_{9 0} を含み、式中、各 X は、V、G、及び A から選
 択され、そして V : G : A の比は、約 5 : 3 : 2 であり得る。例えば、体温で水素結合し
 たマトリックスを形成する能力を有するアミノ酸配列は、[V P G X G]_{1 2 0} を含み、
 式中、各 X は、V、G、及び A から選択され、そして V : G : A の比は、約 5 : 3 : 2 で
 あり得る。本明細書に示す通り、この E L P の 1 2 0 個の構造単位は、約 5 ~ 1 5 m g /
 m l （例えば、約 1 0 m g / m l ）のタンパク質において、約 3 7 の転移温度を提供し

得る。約50～約100mg/mLの濃度において、相転移温度は、セ氏約35.5度(体温のすぐ下)であり、37のすぐ下の周辺体温が許容される。いくつかの実施形態では、ELPは、 $[VPGXG]_{144}$ を含むことができ、式中、各Xは、V、G、及びAから選択され、そしてV:G:Aの比は、約5:3:2であり得る。いくつかの実施形態では、ELPは、 $[VPGXG]_{180}$ を含み、式中、各Xは、V、G、及びAから選択され、そしてV:G:Aの比は、約5:3:2であり得る。

【0040】

特定の実施形態では、ELPは、 $[VPGXG]_m$ を含み、式中、mは、1～200の任意の数であり、各Xは、V、G、及びAから選択され、そしてV:G:Aの比は、約7:2:0である。特定の実施形態では、ELPは、 $[VPGXG]_{60}$ を含み、式中、各Xは、V、G、及びAから選択され、そしてV:G:Aの比は、約7:2:0である。特定の実施形態では、ELPは、 $[VPGXG]_{90}$ を含み、式中、各Xは、V、G、及びAから選択され、そしてV:G:Aの比は、約7:2:0である。特定の実施形態では、ELPは、 $[VPGXG]_{108}$ を含み、式中、各Xは、V、G、及びAから選択され、そしてV:G:Aの比は、約7:2:0である。特定の実施形態では、ELPは、 $[VPGXG]_{120}$ を含み、式中、各Xは、V、G、及びAから選択され、そしてV:G:Aの比は、約7:2:0である。特定の実施形態では、ELPは、 $[VPGXG]_{144}$ を含み、式中、各Xは、V、G、及びAから選択され、そしてV:G:Aの比は、約7:2:0である。特定の実施形態では、ELPは、 $[VPGXG]_{180}$ を含み、式中、各Xは、V、G、及びAから選択され、そしてV:G:Aの比は、約7:2:0である。

10

20

【0041】

特定の実施形態では、ELPは、 $[VPGXG]_m$ を含み、式中、mは、1～200の任意の数であり、各Xは、V、G、及びAから選択され、そしてV:G:Aの比は、約7:0:2である。特定の実施形態では、ELPは、 $[VPGXG]_{60}$ を含み、式中、各Xは、V、G、及びAから選択され、そしてV:G:Aの比は、約7:0:2である。特定の実施形態では、ELPは、 $[VPGXG]_{90}$ を含み、式中、各Xは、V、G、及びAから選択され、そしてV:G:Aの比は、約7:0:2である。特定の実施形態では、ELPは、 $[VPGXG]_{108}$ を含み、式中、各Xは、V、G、及びAから選択され、そしてV:G:Aの比は、約7:0:2である。特定の実施形態では、ELPは、 $[VPGXG]_{120}$ を含み、式中、各Xは、V、G、及びAから選択され、そしてV:G:Aの比は、約7:0:2である。特定の実施形態では、ELPは、 $[VPGXG]_{144}$ を含み、式中、各Xは、V、G、及びAから選択され、そしてV:G:Aの比は、約7:0:2である。特定の実施形態では、ELPは、 $[VPGXG]_{180}$ を含み、式中、各Xは、V、G、及びAから選択され、そしてV:G:Aの比は、約7:0:2である。

30

【0042】

特定の実施形態では、ELPは、 $[VPGXG]_m$ を含み、式中、mは、1～200の任意の数であり、各Xは、V、G、及びAから選択され、そしてV:G:Aの比は、約6:0:3である。特定の実施形態では、ELPは、 $[VPGXG]_{60}$ を含み、式中、各Xは、V、G、及びAから選択され、そしてV:G:Aの比は、約6:0:3である。特定の実施形態では、ELPは、 $[VPGXG]_{90}$ を含み、式中、各Xは、V、G、及びAから選択され、そしてV:G:Aの比は、約6:0:3である。特定の実施形態では、ELPは、 $[VPGXG]_{108}$ を含み、式中、各Xは、V、G、及びAから選択され、そしてV:G:Aの比は、約6:0:3である。特定の実施形態では、ELPは、 $[VPGXG]_{120}$ を含み、式中、各Xは、V、G、及びAから選択され、そしてV:G:Aの比は、約6:0:3である。特定の実施形態では、ELPは、 $[VPGXG]_{144}$ を含み、式中、各Xは、V、G、及びAから選択され、そしてV:G:Aの比は、約6:0:3である。特定の実施形態では、ELPは、 $[VPGXG]_{180}$ を含み、式中、各Xは、V、G、及びAから選択され、そしてV:G:Aの比は、約6:0:3である。

40

【0043】

特定の実施形態では、ELPは、 $[VPGXG]_m$ を含み、式中、mは、1～200の

50

、G、及びAから選択され、そしてV : G : Aの比は、約5 : 0 : 4である。特定の実施形態では、ELPは、 $[XPGVG]_{90}$ を含み、式中、各XはV、G、及びAから選択され、そしてV : G : Aの比は、約5 : 0 : 4である。特定の実施形態では、ELPは、 $[XPGVG]_{120}$ を含み、式中、各Xは、V、G、及びAから選択され、そしてV : G : Aの比は、約5 : 0 : 4である。特定の実施形態では、ELPは、 $[XPGVG]_{144}$ を含み、式中、各Xは、V、G、及びAから選択され、そしてV : G : Aの比は、約5 : 0 : 4である。特定の実施形態では、ELPは、 $[XPGVG]_{180}$ を含み、式中、各Xは、V、G、及びAから選択され、そしてV : G : Aの比は、約5 : 0 : 4である。

【0047】

特定の実施形態では、ELPは、 $[VPGVG]_m$ を含み、式中、mは、1 ~ 200の任意の数である。いくつかの実施形態では、ELPは、 $[VPGVG]_{60}$ 、 $[VPGVG]_{90}$ 、又は $[VPGVG]_{120}$ を含む。本明細書に示す通り、このELPの120個の構造単位は、約0.005 ~ 約0.05 mg/ml (例えば、約0.01 mg/ml)のタンパク質において、約37の転移温度を提供することができる。或いは、ELPは、 $[VPGXG]_{144}$ 又は $[XPGVG]_{144}$ を含む。本明細書に示す通り(表2)、このようなELPのいずれにおいても、その144個の構造単位は、28及び35を含む28 ~ 35の転移温度を提供し得る。

【0048】

様々な実施形態では、意図した対象はヒトであり、また体温は約37であり、従って治療剤は、この温度又はその近傍(例えば、約28 ~ 約37の間)で持続放出を提供するように設計される。水素結合及び/又は疎水的相互作用の逆転を伴う循環への低速放出は、体温が一定に留まったとしても、注射部位において製品が拡散するに従い濃度が低下することにより促進される。その他の実施形態では、対象はヒト以外の哺乳動物であり、また治療剤が約30 ~ 約40であり得る哺乳動物の体温において持続放出を示すように、いくつかの実施形態では、例えば、特定の飼い慣らされたペット(例えば、イヌ若しくはネコ)又は家畜(例えば、ウシ、ウマ、ヒツジ、若しくはブタ)等について設計される。一般的に、Ttは、治療剤が注射用溶液中に留まるように、製剤の保管条件(2 ~ 約25又は15 ~ 22であり得る)よりも高い。

【0049】

いくつかの実施形態では、ELPは、27及び36を含む27 ~ 36の範囲の転移温度を提供することができる。いくつかの実施形態では、ELPは、28及び35を含む28 ~ 35の範囲の転移温度を提供することができる。いくつかの実施形態では、ELPは、29及び34を含む29 ~ 34の範囲の転移温度を提供することができる。いくつかの実施形態では、ELPは、27及び33を含む27 ~ 33の範囲の転移温度を提供することができる。いくつかの実施形態では、ELPは、30及び33を含む30 ~ 33の転移温度を提供することができる。いくつかの実施形態では、ELPは、31及び31を含む31 ~ 31の範囲の転移温度を提供することができる。いくつかの実施形態では、ELPは、27、28、29、30、31、32、33、34、35、又は36の転移温度を提供することができる。いくつかの実施形態では、ELPは、110 mMのNaCl中、10 mg/mLのタンパク質濃度において、28及び35を含む28 ~ 35の範囲の転移温度を提供することができる。

【0050】

本明細書により引用することにより本明細書の一部をなすものとする米国特許公開第2010/0022455号の記載に従い、エラスチン様ペプチド(ELP)タンパク質ポリマー及び組換え融合タンパク質が調製され得る。いくつかの実施形態では、広範囲にわたる分子量において、任意の配列及び所定の長さを有する高度に反復性のポリペプチドをエンコードするDNAを迅速にクローン化するために、ELPタンパク質ポリマーが、反復ライゲーションを通じて構築される。単一サイクルでは、親プラスミドを二等分したそ

10

20

30

40

50

れぞれは、オリゴマーのコピーを含有するが、それを同時にライゲーションし、これによりオリゴマーを二量体化させ、そして機能的プラスミドを再構成する。このプロセスは、反復的に実施され、所望の数の反復部を有するオリゴマー遺伝子が組み立てられる。例えば、1つのELP構造的サブユニット（例えば、ペントペプチド又はペントペプチドの9-mer）がベクターに挿入される。ベクターは消化され、そして別のELP構造単位（例えば、ペントペプチド又はペントペプチドの9-mer）が挿入される。消化及びライゲーションの後続する各ラウンドは、ELPポリマーが所望の長さになるまで、得られたベクターに含まれるELP構造単位の数を二倍化する。初期の構造単位内のペントペプチドの数を変化させることにより、異なる長さのELPが容易に構築され得る。代替的構築手段（すなわち、反復的ライゲーション以外）は、代替的長さのELPを生成するのに利用可能である。

10

【0051】

いくつかの実施形態では、ベクターは、1つ又は複数の追加のアミノ酸又はELP構造単位反復部を含有する。例えば、pPE0248は、追加のペントマー反復部をゲスト位置にバリンを有する144merのN末端に付加し、また追加のペントマーをゲスト残基位置にトリプトファンを有するC末端に付加する。トリプトファンは、例えば280nmでのより良好な吸収測定を可能にする分子吸光係数増加手段として利用可能であり、タンパク質濃度の決定、又は精製期間中のタンパク質含有量の監視に有用であり得る。エンコードDNAが、ELPコーディング配列のいずれかの端部に融合パートナークロニング用の制限酵素認識部位を含有するように、いずれかの端部に付加されるペントマーを設計

20

【0052】

いくつかの実施形態では、治療剤は、活性薬剤及び1つ又は複数のELPを含む。いくつかの実施形態では、治療剤は、N末端又はC末端のいずれかに1つ又は複数のELPを有する活性薬剤を含む。いくつかの実施形態では、治療剤は、N末端又はC末端の両方に1つ又は複数のELPを有する活性薬剤を含む。いくつかの実施形態では、ELPはほぼ同一のサイズである。いくつかの実施形態では、ELPのサイズは異なる。いくつかの実施形態では、一方の端部にあるELPは、他方の端部にあるELPよりも大きい。いくつかの実施形態では、N末端にあるELPは、C末端にあるELPより大きい。いくつかの実施形態では、C末端にあるELPは、N末端にあるELPより大きい。

30

【0053】

活性薬剤

タンパク質活性薬剤

様々な実施形態では、活性薬剤は、それ自体、短い循環半減期、例えば、約30秒～約1時間等を有し得るタンパク質又はペプチドである。治療剤は、タンパク質活性薬剤と、対象の体温において水素結合したマトリックスを形成する能力を有するアミノ酸配列（例えば、ELP）の間の組換え融合タンパク質であり得る。任意の適するタンパク質活性薬剤は、本開示の治療剤で使用可能である。様々な実施形態では、タンパク質活性薬剤は、アクチビン受容体2A細胞外ドメイン、副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）、 α -2マクログロブリン、 α -MSH/アフアメラノチド、アミリン（プラムリンチド）、アンジオテンシン（1-7）、アネキシンA1、アペリン、アルギナーゼ、アスパラギナーゼ、ブラジキニンB2受容体拮抗薬、コンプスタチン、コパーシン、CTLA-4、C型ナトリウム利尿ペプチド、センデリチド（CD-NP）、エラフィン、エキセンジン-4、線維芽細胞増殖因子（FGF）-18/スプリフェルミン、FGF-19、FGF-21、ガラニン、果粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、グレリン、GLP-1/GLIPデュアルアゴニスト、GLP-1/グルカゴンデュアルアゴニスト、GLP-1/GLP-2デュアルアゴニスト、グルカゴン、グルカゴン様ペプチド（GLP）-1受容体拮抗薬、GLP-2、果粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、ヘブシジン、ヒト成長ホルモン（hGH）、hGH拮抗薬、イカチバント、インスリン様増殖因子（IGF）-1、インターロイキン1受容体拮抗薬（IL-1Ra）、インフェスチン-4、キス

40

50

ペプチン、L4Fペプチド、ラクリチン、副甲状腺ホルモン(PTH)、副甲状腺ホルモン関連タンパク質(PTHrP)、PYY、レラモレリン、レラキシン、ソマトスタチン、チオレドキシン、サイモシン 4、TNF関連アポトーシス誘導リガンド(TRAIL)、尿酸オキシダーゼ、ウロジラチン、ウログアニリン、副甲状腺ホルモン断片(例えば、残基1~34)、完全長副甲状腺ホルモン、副腎皮質刺激ホルモン、コバーシン、キスペプチン、キスペプチン断片(例えば、アミノ酸残基1~10又はアミノ酸残基1~54)、アネキシンA1由来ペプチド(例えば、アミノ酸残基2~26)、その類似体、誘導體、模倣体、断片、組み合わせ、又は機能的変異体である。いくつかの実施形態では、本開示は、タンパク質活性薬剤、及び持続放出を提供するアミノ酸配列を含む治療剤を提供する。いくつかの実施形態では、持続放出を提供するアミノ酸配列は、エラスチン様ペプチド(ELP)である。

【0054】

タンパク質活性薬剤の半減期は、サイズ、従ってタンパク質活性薬剤の流体力学的容積を増加させること、改変された又は非天然のアミノ酸を付加すること、部分のコンジュゲーション(例えば、ペグ化)、合成配列(例えば、XTEN(登録商標)配列、PAsylation(登録商標))の付加、hCG(CTP)からのカルボキシ末端延長、アルブミン結合配列(例えば、Albuda(登録商標))の付加、アルブミン結合化合物、例えば脂肪酸のコンジュゲーション、N-グリコシル化等の翻訳後修飾、及びその他のペプチドへの融合、又は哺乳動物の異種タンパク質、例えば、アルブミン、トランスフェリン、若しくは抗体のFc配列等との融合を含む様々な手段により延長され得る。そのような配列は、米国特許第7,238,667号(特にアルブミンコンジュゲートに関して)、米国特許第7,176,278号(特にトランスフェリンコンジュゲートに関して)、及び米国特許第5,766,883号に記載されている。

【0055】

いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書に開示する1つ又は複数の活性タンパク質薬剤の模倣体、類似体、誘導體、変異体、又は突然変異体を提供する。いくつかの実施形態では、模倣体、類似体、誘導體、変異体、又は突然変異体は、天然型のペプチド薬剤のアミノ酸配列と比較して、1つ又は複数のアミノ酸置換を含有する。いくつかの実施形態では、1~20個のアミノ酸が置換される。いくつかの実施形態では、模倣体、類似体、誘導體、変異体、又は突然変異体は、天然型のペプチド薬剤のアミノ酸配列と比較して約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、又は約10個のアミノ酸置換を含有する。いくつかの実施形態では、模倣体、類似体、誘導體、変異体、又は突然変異体は、天然型のペプチド薬剤のアミノ酸配列と比較して、1つ又は複数のアミノ酸欠損を含有する。いくつかの実施形態では、天然型のタンパク質剤のアミノ酸配列と比較して、1~20個のアミノ酸が欠損している。いくつかの実施形態では、模倣体、類似体、誘導體、変異体、又は突然変異体は、天然型のタンパク質剤のアミノ酸配列と比較して、約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、又は約10個のアミノ酸欠損を有する。いくつかの実施形態では、天然型のタンパク質剤のアミノ酸配列と比較して、いずれかの端部において1~10個のアミノ酸が欠損している。いくつかの実施形態では、天然型のタンパク質剤のアミノ酸配列と比較して、両方の端部から1~10個のアミノ酸が欠損している。いくつかの実施形態では、模倣体、類似体、誘導體、変異体、又は突然変異体のアミノ酸配列は、天然型のタンパク質剤のアミノ酸配列と少なくとも約70%同一である。いくつかの実施形態では、模倣体、類似体、誘導體、変異体、又は突然変異体のアミノ酸配列は、天然型のタンパク質剤のアミノ酸配列と約70%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%同一である。同一性のパーセンテージ(%)は、http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/において利用可能なアライメントプログラムEMBOSS Needleを使用して計算可能である。下記のデフォルトパラメーター、すなわちProtein Weight Matrix=BLOSUM62; Gap Open=10; Gap Extension=0.1が、ペアワイズアライメント用として

利用可能である。

【0056】

いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書に開示する任意の2つ以上の活性薬剤からなる共製剤を提供する。いくつかの実施形態では、共製剤は、2つ以上のペプチド活性薬剤及び小分子活性薬剤を含む。いくつかの実施形態では、共製剤は、2つ以上の小分子活性薬剤を含む。いくつかの実施形態では、共製剤は、2つ以上のペプチド活性薬剤を含む。いくつかの実施形態では、共製剤内の活性薬剤のうちの1つ又は複数は、ELPにコンジュゲートしていない。いくつかの実施形態では、共製剤内の活性薬剤のすべてが、ELPにコンジュゲートしている。

【0057】

アペリン

特定の実施形態では、タンパク質活性薬剤は、アペリン、その類似体、模倣体、誘導体、断片、又は機能的変異体である。ヒトアペリンは、アペリン受容体に対する内因性リガンド(APJクラスA Gタンパク質結合型受容体)である。アペリンは、ヒト心筋細胞、内皮細胞、及び血管平滑筋細胞を含むいくつかの細胞型で発現している。アペリン遺伝子は、ヒト、イヌ、ウシ、ラット、マウス、アカゲザル、及びゼブラフィッシュを含む様々な種において同定されており、また77個のアミノ酸からなるアペリンプレプロタンパク質をコードする。3つのエクソンを含む1726塩基対のゲノムDNAにわたり、アペリン遺伝子座は、種間で高度に保存されている。アペリンプレプロタンパク質のプロセッシングでは、アペリンプレプロタンパク質の残基1~22に対応するシグナルペプチドが切り離されて、55個のアミノ酸であるアペリンプロタンパク質が生じ、これは、アペリン-12、アペリン-13、アペリン-16、アペリン-17、及びアペリン-36を含むいくつかの活性な分子形態に処理される。(Kawamata et al., 2001, Biochim Biophys Acta 1538:162-71)。そのような活性な分子形態は、全体としてアペリンと呼ばれ、そしてその長さ及び/又は修飾状態に基づき命名されている。完全長成熟ペプチドであるアペリン-36は、55個のアミノ酸からなる長いアペリンプロタンパク質に由来する36個のアミノ酸からなる長いペプチドであり(Tatemoto et al., 1998, Biochem. Biophys. Res. Comm. 251:471-476, 1998)、またプレプロタンパク質の残基42~77に対応する。アペリン-17及びアペリン-13は、アペリンのカルボキシ(C)末端に由来する。アペリン-17は、アペリンプロタンパク質の残基61~77に対応する。アペリン-13は、アペリンプロタンパク質の残基65~77に対応する。アペリンタンパク質は、アミノ酸誘導体又は修飾を含み得る。例えば、最も活性なアイソフォームは、アペリン-13のピログルタミン酸化された形態(pyrr-アペリン13)である。

【0058】

アペリンは、内因性の血管拡張薬、及びレニン-アンジオテンシン系と拮抗することにより、おそらくは受容体ヘテロトリマーの形成により血圧を低下させ得る変力物質である。

【0059】

本開示の特定の実施形態では、活性薬剤は、持続放出を提供するアミノ酸配列を含み、アペリン、その模倣体、類似体、誘導体、断片、又は機能的変異体と融合又はコンジュゲートしている。いくつかの実施形態では、持続放出を提供するアミノ酸配列はELPである。特定の実施形態では、アペリンは、哺乳動物のアペリンである。いくつかの実施形態では、アペリンはヒトアペリンであり(例えば、配列番号39)、完全長成熟ヒトアペリンペプチド、アペリン-36(配列番号39)である。その他の実施形態では、アペリンは、アペリン-16、アペリン-17(配列番号41)、アペリン-13(配列番号43)、及びアペリン-12(配列番号44)を含む、但しこれらに限定されないアペリン-36のトランケーション体である。いくつかの実施形態では、アペリンは、1つ又は複数の修飾されたアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、アペリンは、1つ又は複数のア

10

20

30

40

50

ミノ酸誘導体を含む。いくつかの実施形態では、アペリンは、p y r - アペリン 1 3 (配列番号 4 2) である。

【 0 0 6 0 】

いくつかの実施形態では、アペリンは、アペリンの N 末端及び / 又は C 末端において、例えば、最大約 3 個のアミノ酸、最大約 5 個のアミノ酸、最大約 1 0 個のアミノ酸、最大約 1 5 個のアミノ酸、最大約 2 0 個のアミノ酸、最大約 2 5 個のアミノ酸、又は最大約 3 0 個のアミノ酸による場合を含む、約 1 ~ 約 3 0 個のアミノ酸によりトランケーションされた機能的断片を含む、哺乳動物アペリンの機能的類似体である。その他の実施形態では、機能的変異体は、天然型又はトランケーションされた配列に対して、約 1 ~ 約 3 0 個のアミノ酸の挿入、欠損、及び / 又は置換を含有する (例えば、配列番号 3 9、4 1、4 2、4 3、又は 4 4)。例えば、機能的変異体は、天然型又はトランケーションされた配列に対して、最大約 3 個のアミノ酸、最大約 5 個のアミノ酸、最大約 1 0 個のアミノ酸、最大約 1 5 個のアミノ酸、最大約 2 0 個のアミノ酸、最大約 2 5 個のアミノ酸、又は最大約 3 0 個のアミノ酸の挿入、欠損、及び / 又は置換を有し得る (例えば、配列番号 3 9、4 1、4 2、4 3、又は 4 4)。タンパク質の活性は、任意の利用可能なアッセイ法を使用して確認又はアッセイされ得る。その他の実施形態では、アペリンは、天然型又はトランケーションされた配列と少なくとも約 7 5 % の同一性、約 8 0 % の同一性、約 9 0 % の同一性、約 9 5 % の同一性、約 9 6 % の同一性、約 9 7 % の同一性、約 9 8 % の同一性、又は約 9 9 % の同一性を有する (例えば、配列番号 3 9、4 1、4 2、4 3、又は 4 4)。同一性のパーセンテージ (%) は、http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/において利用可能なアライメントプログラム EMBOS S Needle を使用して計算可能である。下記のデフォルトパラメーター、すなわち Protein Weight Matrix = B L O S U M 6 2 ; Gap Open = 1 0 ; Gap Extension = 0 . 1 が、ペアワイズアライメント用として利用可能である。いくつかの実施形態では、アペリンは、当技術分野において公知の追加の化学修飾を含み得る。いくつかの実施形態では、アペリンの機能的類似体は、E l a b e l l a / T o d d l e r 又はその類似体若しくは誘導体である (Yang et al . , 2 0 1 5 , Trends in Pharmacol . Sci . 3 6 : 5 6 0 - 5 6 7)。

10

20

30

【 0 0 6 1 】

特定の実施形態では、治療剤は、アペリン、その模倣体、類似体、誘導体、断片、又は機能的変異体の N 末端又は C 末端に融合した E L P を含む。いくつかの態様では、治療剤は、ヒトアペリン - 3 6 の N 末端に融合した E L P を含む (配列番号 4 0)。いくつかの実施形態では、アペリンは、2 つ以上の E L P 配列を有する融合タンパク質の状態にある。いくつかの実施形態では、アペリンは、N 末端及び C 末端の両方に 1 つ又は複数の E L P を有する。いくつかの実施形態では、アペリンの C 末端及び / 又は N 末端に位置する E L P は、約 9 0 ~ 約 1 8 0 個の反復性構造単位を含む。その他の実施形態では、アペリンの C 末端及び / 又は N 末端に位置する E L P は、約 9 0 個よりも少ない反復性構造単位を含む。その他の態様では、アペリンの C 末端及び / 又は N 末端に位置する E L P は、約 1 8 0 個を上回る反復性構造単位を含む。いくつかの実施形態では、N 末端及び C 末端に位置する 2 つ以上の E L P のサイズはほぼ同一である。その他の実施形態では、N 末端及び C 末端に位置する 2 つ以上の E L P のサイズは異なる。いくつかの実施形態では、アペリンの N 末端に位置する E L P は、アペリンの C 末端に位置する E L P より大きい。その他の実施形態では、アペリンの C 末端に位置する E L P は、アペリンの N 末端に位置する E L P より大きい。

40

【 0 0 6 2 】

その他の態様では、本開示は、E L P 及びアペリンを投与することにより、心不全、肺動脈高血圧症 (P A H)、虚血性心疾患、糖尿病、がん、肥満、心臓血管異常、又は血管形成を伴う病理学的状態 (例えば、がん) を含む、但しこれらに限定されない疾患を治療又は予防する方法を提供する。いくつかの実施形態では、本明細書に開示する治療剤は、

50

血管拡張作用（例えば、内皮型一酸化窒素シンターゼ（eNOS）により媒介される）、正の変力作用（例えば、細胞内カルシウムの増加及び筋フィラメントカルシウム感受性の増加に起因する）、虚血再灌流傷害に対する保護（例えば、一酸化窒素（NO）依存性及びNO非依存性の経路を経由する）、及びAPJ受容体媒介型の心肥大（例えば、Gタンパク質媒介型よりはむしろ - アレスチン媒介型）を含む、但しこれらに限定されない作用を提供するために投与され得る。方法は、ELP及びアペリンを含む治療剤（上記のような）を、そのような治療を必要とする患者に投与することを含む。一般的に、患者は、ヒト又はヒト以外の動物患者（例えば、イヌ、ネコ、ウシ、又はウマ）であり得る。好ましくは、患者はヒトである。

【0063】

いくつかの実施形態では、本開示に基づくアペリン治療剤による治療は、例えば、心不全、PAH、虚血性心疾患、糖尿病、がん、肥満、心臓血管異常、又は血管形成を伴う病理学的状態（例えば、がん）を含む、但しこれらに限定されない様々な疾患に起因する又はそれと関連した合併症及び障害を治療及び/又は予防するための薬剤から選択される1つ又は複数の薬理的に活性な物質と組み合わせることも可能である。更なる実施形態では、本開示に基づくアペリン治療剤による治療は、例えば、血管拡張作用（例えば、内皮型一酸化窒素シンターゼ（eNOS）により媒介される）、正の変力作用（例えば、細胞内カルシウムの増加及び筋フィラメントカルシウム感受性の増加に起因する）、虚血再灌流傷害に対する保護（例えば、一酸化窒素（NO）依存性及びNO非依存性の経路を経由する）、及びAPJ受容体媒介型の心肥大（例えば、Gタンパク質媒介型よりはむしろ - アレスチン媒介型）を含む、但しこれらに限定されない作用を提供する薬剤から選択される1つ又は複数の薬理的に活性な物質と組み合わせることができる。

【0064】

アルギナーゼ

いくつかの実施形態では、タンパク質活性薬剤は、アルギナーゼ（EC3.5.3.1；L-アルギニンアミジノヒドロラーゼ）、そのアイソザイム、断片、又は機能的変異体である。アルギナーゼは、哺乳動物の肝臓における尿素形成の最終的な細胞基質反応である、L-アルギニンをオルニチンと尿素に変換する反応を触媒する、尿素サイクルにおいて重要な35kDaの酵素である。アルギナーゼは、3つの重要な機能、すなわち尿素の生成、オルニチンの生成、及び一酸化窒素シンターゼの基質であるアルギニンレベルの制御を担う（Jenkinson et al., 1996, Comp. Biochem. Physiol. 114B:107-132; Kanyo et al., 1996, Nature 383:554-557; Christianson, 1997, Prog. Biophys. Molec. Biol. 67:217-252）。尿素生成は、極めて可溶性の無毒性化合物の形態で窒素を排泄する、従って高アンモニアレベルという危険な結果の可能性を回避する機構を提供する。L-オルニチンは、ポリアミン、スペルミン、及びスペルミジン生合成のための前駆体であり、細胞の増殖及び分化において重要な役割を有する。最終的に、アルギナーゼは、組織内に存在するアルギニンのレベルを制御することにより、一酸化窒素の生成を調節する。

【0065】

一般的に、アルギナーゼは、尿素産生動物（例えば、哺乳動物、軟骨魚類、両生動物、及びカメ）の肝臓、腎臓、及び睾丸で発現している。ヒトを含むほとんどの哺乳動物では、アルギナーゼタンパク質のファミリーとして、肝細胞内で主に発現しているアルギナーゼI、並びに腎臓及び赤血球内で主に発現しているアルギナーゼIIの各アイソザイムが挙げられる。

【0066】

いくつかの実施形態では、ヒト肝臓アルギナーゼ欠乏症は、アルギニン血症、高アンモニア血症を伴う遺伝性常染色体劣性遺伝障害、過剰のアルギニンが発作を引き起こす状態、認知能力障害、及びニューロン障害を引き起こす可能性がある。臨床的に有意な高アルギニン血症は、アルギナーゼI遺伝子内の突然変異に起因する（Cederbaum S

10

20

30

40

50

. D. et al., 1979, *Pediatr. Res.* 13:827-833; Cederbaum S. et al., 1977, *J. Pediatr.* 90:569-573; Michel V. V. et al., 1978, *Clin. Genet.* 13:61-67)。アルギナーゼ欠乏症に起因して、アルギニンは尿素に分解不能となり、オルニチン代謝サイクルに組み込まれ、通常よりも約7～約10倍高い血中アルギニンレベル、脳脊髄液内のアルギニンレベルの増加、尿生成量の増加、及びクレアチニンの尿素排泄の増加を引き起こす。アルギナーゼI欠損患者は、痙縮、発育遅滞、進行性の精神的機能障害、及び挿間性の高アンモニア血症を呈し得る (Cederbaum S.D. et al., 1979, *Pediatr Res* 13:827-833; Cederbaum S.D., et al., 1977, *J. Pediatr* 90:569-573; Thomas K.R. and Capecchi M.R., 1987, *Cell* 51:503-512)。

10

【0067】

本開示の特定の実施形態では、アルギナーゼ治療剤は、アルギナーゼ、その模倣体、類似体、誘導體、断片、又は機能的変異体と融合した又はコンジュゲートした、持続放出を提供するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、持続放出を提供するアミノ酸薬剤は、ELPである。

【0068】

特定の実施形態では、アルギナーゼは、哺乳動物のアルギナーゼである。いくつかの実施形態では、アルギナーゼは、アルギナーゼIである。その他の実施形態では、アルギナーゼは、アルギナーゼIIである。いくつかの実施形態では、アルギナーゼは、ヒトアルギナーゼ(配列番号45)である。

20

【0069】

いくつかの実施形態では、アルギナーゼはアルギナーゼのN末端及び/又はC末端において、例えば、最大約3個のアミノ酸、最大約5個のアミノ酸、最大約10個のアミノ酸、最大約15個のアミノ酸、最大約20個のアミノ酸、最大約25個のアミノ酸、最大約30個のアミノ酸、最大約35個のアミノ酸、最大約40個のアミノ酸、最大約45個のアミノ酸、又は最大約50個のアミノ酸による場合を含む、約1～約50個のアミノ酸によりトランシェーションされた機能的断片を含む、哺乳動物のアルギナーゼの機能的類似体である。その他の実施形態では、機能的変異体は、天然型の配列(例えば、配列番号45)に対して約1～約50個のアミノ酸挿入、欠損、及び/又は置換を含有する。例えば、機能的変異体は、天然型の配列(例えば、配列番号45)に対して最大約3個のアミノ酸、約5個のアミノ酸、最大約10個のアミノ酸、最大約15個のアミノ酸、最大約20個のアミノ酸、最大約25個のアミノ酸、最大約30個のアミノ酸、最大約35個のアミノ酸、最大約40個のアミノ酸、最大約45個のアミノ酸、又は最大約50個のアミノ酸の挿入、欠損、及び/又は置換を有し得る。タンパク質の活性は、任意の利用可能なアッセイ法を使用して確認又はアッセイされ得る。その他の実施形態では、アルギナーゼは、天然型の配列(例えば、配列番号45)と少なくとも約75%の同一性、約80%の同一性、約90%の同一性、約95%の同一性、約96%の同一性、約97%の同一性、約98%の同一性、又は約99%の同一性を有する。同一性のパーセンテージ(%)は、http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/において利用可能なアライメントプログラムEMBOSS Needleを使用して計算可能である。下記のデフォルトパラメーター、すなわちProtein Weight Matrix=BLOSUM62; Gap Open=10; Gap Extension=0.1が、ペアワイズアライメント用として利用可能である。いくつかの実施形態では、アルギナーゼは、当技術分野において公知の追加の化学修飾を含み得る。いくつかの実施形態では、アルギナーゼは、コバルトの代わりにマンガンを補助因子として利用し得る。

30

40

【0070】

50

特定の実施形態では、治療剤は、アルギナーゼ、その模倣体、類似体、誘導體、断片、又は機能的変異体のN末端又はC末端に融合したELPを含む。いくつかの実施形態では、治療剤は、ヒトアルギナーゼ(配列番号46)のC末端に融合したELPを含む。いくつかの実施形態では、アルギナーゼは、2つ以上のELP配列を有する融合タンパク質の状態にある。いくつかの実施形態では、アルギナーゼは、N末端及びC末端の両方に1つ又は複数のELPを有する。いくつかの実施形態では、アルギナーゼのC末端及び/又はN末端に位置するELPは、約90~約180個の反復性構造単位を含む。その他の実施形態では、アルギナーゼのC末端及び/又はN末端に位置するELPは、約90個よりも少ない反復性構造単位を含む。その他の態様では、アルギナーゼのC末端及び/又はN末端に位置するELPは、約180個を上回る反復性構造単位を含む。いくつかの実施形態では、N末端及びC末端に位置する2つ以上のELPのサイズはほぼ同一である。その他の実施形態では、N末端及びC末端に位置する2つ以上のELPのサイズは異なる。いくつかの実施形態では、アルギナーゼのN末端に位置するELPは、アルギナーゼのC末端に位置するELPよりも大きい。その他の実施形態では、アルギナーゼのC末端に位置するELPは、アルギナーゼのN末端に位置するELPよりも大きい。

10

20

30

40

50

【0071】

その他の態様では、本開示は、アルギナーゼ遺伝子又はアルギナーゼ遺伝子発現における欠陥と関連した、又はこれにより引き起こされた疾患、例えば、尿素サイクルの疾患；高血圧症；低血圧症；高アンモニア血症；挿問性の高アンモニア血症；プロリン、グルタミン酸、一酸化窒素、及びオルニチンの生合成における欠陥；高アルギニン血症及びその関連する痙縮；発育遅滞；進行性の精神的機能障害；前立腺疾患、前立腺がん、前立腺炎又は良性の立腺過形成若しくは肥大、前立腺損傷；腎疾患、及び腎損傷；非ホジキンリンパ腫、肝細胞癌、メラノーマ、又は腎細胞癌腫を非限定的に含むがん；自己免疫疾患；線維性疾患；勃起不全；肺高血圧症；アテローム性動脈硬化症；腎疾患；喘息；T細胞機能不全；虚血再灌流傷害；神経変性疾患；創傷治癒；アルギニン依存性過形成；腫瘍；肝細胞癌；メラノーマ；腎細胞癌腫；HCC；又はメラノーマ等の疾患を治療又は予防する方法を提供する。該方法は、ELP及びアルギナーゼを含む治療剤(上記のような)を、そのような治療を必要とする患者に投与することを含む。一般的に、患者は、ヒト又はヒト以外の動物患者(例えば、イヌ、ネコ、ウシ、又はウマ)であり得る。好ましくは、患者はヒトである。

【0072】

いくつかの実施形態では、本開示に基づくアルギナーゼ治療剤による治療は、例えば、高血圧症；低血圧症；高アンモニア血症；挿問性の高アンモニア血症；プロリン、グルタミン酸、一酸化窒素、及びオルニチンの生合成における欠陥；高アルギニン血症及びその関連する痙縮；発育遅滞；進行性の精神的機能障害；前立腺疾患、前立腺がん；前立腺炎又は良性の立腺過形成若しくは肥大；前立腺損傷；腎疾患；腎損傷；非ホジキンリンパ腫、肝細胞癌、メラノーマ、又は腎細胞癌腫を非限定的に含むがん；自己免疫疾患；線維性疾患；勃起不全；肺高血圧症；アテローム性動脈硬化症；腎疾患；喘息；T細胞機能不全；虚血再灌流傷害；神経変性疾患；創傷治癒；アルギニン依存性過形成；腫瘍；肝細胞癌；メラノーマ；腎細胞癌腫；HCC；又はメラノーマを非限定的に含む、様々な疾患に起因する又はそれと関連した合併症及び障害を治療及び/又は予防するための薬剤から選択される1つ又は複数の薬理的に活性な物質と組み合わせることも可能である。

【0073】

C型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)

いくつかの実施形態では、タンパク質活性薬剤は、C型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)、その模倣体、類似体、誘導體、断片、又は機能的変異体である。ナトリウム利尿ペプチドは、心血管ホメオスタシス、利尿作用、ナトリウム利尿、及び血管拡張において役割を演じている。ナトリウム利尿ペプチドファミリーは、3つの構造的に関連したペプチド、すなわち心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)、脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)、及びC型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)から構成される。このような小さ

い、単鎖ペプチド (ANP、BNP、及びCNP) は、17-アミノ酸ループ構造を有し (Levin et al., N. Engl. J. Med., 339: 863-870 (1998)) and play important roles in multiple biological processes. ANP and BNP are produced primarily within the muscle cells of the heart, and have important roles in cardiovascular homeostasis (Science, 252: 120-123 (1991))。CNPは、中枢神経系、生殖器系、骨、及び血管の内皮細胞内を含め、より幅広く発現しており (Hypertension, 49: 419-426 (2007))、また例えば、骨増殖、血管拡張薬、及び変力物質の制御因子として作用し、そして心血管作用を有する。 10

【0074】

ヒトでは、CNPは、ナトリウム利尿ペプチド前駆体C (NPPC) 遺伝子から、単鎖126-アミノ酸プレプロポリペプチドとして最初に生成される (Sudoh, T. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1990, 168: 863-870)。シグナルペプチドが取り除かれるとプロCNPとなり、そしてエンドプロテアーゼのフーリンにより更なる切断を受けると、活性な53-アミノ酸ペプチド (CNP-53) が生成し、これは分泌され、再度切断されて、成熟した22-アミノ酸ペプチド (CNP-22) が生成する (Wu, J. Biol. Chem., 2003年、278巻: 25847~852頁)。CNP-53及びCNP-22は、その分布が異なり、CNP-53は組織内に主に存在し、一方、CNP-22は血漿及び脳脊髄液に主に見出される (J. Alfonzo, Recept. Signal. Transduct. Res., 2006, 26: 269-297)。CNPの主要な生理活性形態は、CNP-22である。 20

【0075】

ナトリウム利尿ペプチドは、2つの受容体、すなわちナトリウム利尿ペプチド受容体-A (NPR-A) 及びナトリウム利尿ペプチド受容体B (NPR-B) を通じて主に作用する。このような受容体は、細胞質グアニリルシクラーゼドメインを有し、これは、ANP、BNP、又はCNPと結合した際に活性化し、そして細胞内cGMPの蓄積を引き起こす。CNP-53及びCNP-22のいずれも、NPR-Bに同様に結合し、そしてそれらはいずれも、用量依存的で類似した様式でcGMP生成を誘発することができる (Yeung, V.T., Peptides, 1996, 17: 101-106)。第3の受容体、NPR-Cは、ナトリウム利尿ペプチドのそれぞれと高い親和性を有して結合し、そして細胞外コンパートメントからペプチドを捕捉するように主に機能し、そしてペプチドをリソソーム内に配置し、そこでペプチドは分解する (Maack, T. et al., Science, 1987, 238: 675-678)。 30

【0076】

CNPはNPR-Bと結合し、これを活性化させ、細胞内サイクリックグアノシンモノホスフェート (cGMP) レベルの増加を引き起こす。cGMP生成により媒介される下流シグナリングは、軟骨内骨化 (縦方向の長骨成長を支配するプロセス) を含む多種多様な生物学的プロセスに影響を及ぼす。 40

【0077】

本開示の特定の実施形態では、治療剤は、CNP、その断片又は機能的変異体と融合した又はコンジュゲートした、持続放出を提供するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、持続放出を提供するアミノ酸配列はELPである。

【0078】

特定の実施形態では、CNPは、哺乳動物のCNPである。いくつかの実施形態では、CNPはヒトCNP-53 (配列番号51) である。その他の実施形態では、CNPは、CNP-22である (配列番号47)。その他の実施形態では、CNPは、CNP-37 (配列番号49) である。なおもその他の実施形態では、CNPは、CNP-39 (配列 50

番号 52) である。

【0079】

いくつかの実施形態では、CNPは、CNPのN末端及び/又はC末端において、例えば、最大約3個のアミノ酸、最大約5個のアミノ酸、最大約10個のアミノ酸、最大約15個のアミノ酸、最大約20個のアミノ酸、最大約25個のアミノ酸、又は最大約30個のアミノ酸による場合を含む、約1~約30個のアミノ酸によりトランケーションされた機能的断片を含む、哺乳動物のCNPの断片又は機能的変異体である。その他の実施形態では、機能的変異体は、天然型又はトランケーションされた配列(例えば、配列番号47、49、51、又は52)に対して約1~約30個のアミノ酸の挿入、欠損、及び/又は置換を含有する。例えば、機能的変異体は、天然型又はトランケーションされた配列(例えば、配列番号47、49、51、又は52)に対して最大約3個のアミノ酸、最大約5個のアミノ酸、最大約10個のアミノ酸、最大約15個のアミノ酸、最大約20個のアミノ酸、最大約25個のアミノ酸、又は最大約30個のアミノ酸の挿入、欠損、及び/又は置換を有し得る。タンパク質の活性は、任意の利用可能なアッセイ法を使用して確認又はアッセイされ得る。その他の実施形態では、CNPは、天然型又はトランケーションされた配列(例えば、配列番号47、49、51、又は52)と少なくとも約75%の同一性、約80%の同一性、約90%の同一性、約95%の同一性、約96%の同一性、約97%の同一性、約98%の同一性、又は約99%の同一性を有する。同一性のパーセンテージは、http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/において利用可能なアライメントプログラムEMBOSS Needleを使用して計算可能である。下記のデフォルトパラメーター、すなわちProtein Weight Matrix = BLOSUM62; Gap Open = 10; Gap Extension = 0.1が、ペアワイズアライメント用として利用可能である。いくつかの実施形態では、CNPは、当技術分野において公知の追加の化学修飾を含み得る。

10

20

【0080】

いくつかの態様では、治療剤は、CNP、その断片又は機能的変異体のN末端又はC末端に融合したELPを含む。いくつかの実施形態では、治療剤は、CNP-22(配列番号48)のN末端に融合したELPを含む。別の態様では、治療剤は、CNP-37(配列番号50)のN末端に融合したELPを含む。いくつかの実施形態では、治療剤は、CNP(例えば、配列番号57又は98)のC末端に融合したELPを含む。いくつかの実施形態では、治療剤は、プロCNP(配列番号56)に融合したELPを含む。いくつかの実施形態では、CNPは、2つ以上のELP配列を有する融合タンパク質の状態にある。いくつかの実施形態では、CNPは、N末端及びC末端の両方に1つ又は複数のELPを有する。いくつかの実施形態では、CNPのC末端及び/又はN末端に位置するELPは、約90~約180個の反復性構造単位を含む。その他の実施形態では、CNPのC末端及び/又はN末端に位置するELPは、約90個よりも少ない反復性構造単位を含む。その他の実施形態では、CNPのC末端及び/又はN末端に位置するELPは、約40個よりも少ない反復性構造単位を含む。その他の態様では、CNPのC末端及び/又はN末端に位置するELPは、約180個を上回る反復性構造単位を含む。いくつかの実施形態では、N末端及びC末端に位置する2つ以上のELPのサイズはほぼ同一である。その他の実施形態では、N末端及びC末端に位置する2つ以上のELPのサイズは異なる。いくつかの実施形態では、CNPのN末端に位置するELPは、CNPのC末端に位置するELPよりも大きい。その他の実施形態では、CNPのC末端に位置するELPは、CNPのN末端に位置するELPよりも大きい。

30

40

【0081】

いくつかの実施形態では、ELPは、リンカー(配列番号83及び55)を介してCNPのC末端及び/又はN末端に連結している。いくつかの実施形態では、リンカーは、トリペプチドGGG配列(配列番号87)を含む。いくつかの態様では、リンカーは、トリペプチドGGG(配列番号87)の単一コピーを含む。別の態様では、リンカーは、トリペプチドGGGの複数の反復部を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、GGG配

50

列の2つの反復部(配列番号102)を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、GGG配列の3つの反復部を(配列番号103)含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、ペントペプチドGGGGS配列(配列番号93)を含む。いくつかの態様では、リンカーは、ペントペプチドGGGGS(配列番号93)の単一コピーを含む。別の態様では、リンカーは、ペントペプチドGGGGSの複数の反復部を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、GGGGS配列の2つの反復部(配列番号104)を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、GGGGS配列の3つの反復部(配列番号105)を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、ペントペプチドPAPAP配列(配列番号94)を含む。いくつかの態様では、リンカーは、ペントペプチドPAPAPの単一コピーを含む。別の態様では、リンカーは、ペントペプチドPAPAPの複数の反復部を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、PAPAP配列の2つの反復部(配列番号106)を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、PAPAP配列の3つの反復部(配列番号107)を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、ペントペプチドEAAAK配列(配列番号95)を含む。いくつかの態様では、リンカーは、ペントペプチドEAAAKの単一のコピーを含む。別の態様では、リンカーは、ペントペプチドEAAAKの複数の反復部を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、EAAAK配列の2つの反復部(配列番号108)を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、EAAAK配列の3つの反復部(配列番号109)を含む。

10

【0082】

いくつかの実施形態では、ELPは、プロテアーゼ認識部位を含むペプチド配列を介してCNPのC末端及び/又はN末端に連結している。いくつかの実施形態では、プロテアーゼ認識部位は、*in vivo*で開裂し、これによりCNPを放出する。いくつかの実施形態では、プロテアーゼ認識部位は、注射部位において開裂し、これによりCNPを放出する。いくつかの実施形態では、プロテアーゼ認識部位は、循環内で開裂し、これによりCNPを放出する。いくつかの実施形態では、プロテアーゼ認識部位は、必要とされる場合、成長板近傍の関節内で開裂し、これによりCNPを放出し、そして副作用を最低限に抑える。プロテアーゼ認識部位は、第Xa因子(例えば、IEGR、IDGR、GR); トロンピン(例えば、LVPRGS、LVPRGF); カテプシン(例えば、カテプシンK、RKPRG、RKLGR); マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)(例えば、MMP1、MMP2、MMP3、MMP7、MMP8、及びMMP9)に対するPLGLWAG「コンセンサス」認識配列(Eckhard et al. (2016) *Matrix Biology* 49, 37-60))に対する認識部位を含む。ChouらによるヒトカテプシンKに関する好ましい切断部位の分析(2006. *J. Biol. Chem.* 281, 12824-12832)では、利用可能である代替的切断部位は、例えば、P3はK、G、H、又はMであり得、P2はP、I、又はLであり得、P1はQ、R、又はKであり得ることが示唆される。

20

30

【0083】

その他の態様では、本開示は、骨成長の制御と関連した疾患(例えば、低身長症及び軟骨形成不全を含む骨格形成異常); 若年性突発性関節炎; 骨関節炎; 心血管系疾患; 心血管ホメオスタシス、利尿作用、ナトリウム利尿作用、又は血管拡張に影響を及ぼす疾患; 中枢神経系の疾患、生殖器系の疾患; 又は血管内皮細胞に影響を及ぼす疾患を含む、但しこれらに限定されない疾患を治療又は予防する方法を提供する。該方法は、ELP及びCNPを含む治療剤(上記のような)を、そのような治療を必要とする患者に投与することを含む。一般的に、患者は、ヒト又はヒト以外の動物患者(例えば、イヌ、ネコ、ウシ、又はウマ)であり得る。好ましくは、患者はヒトである。

40

【0084】

いくつかの実施形態では、本開示に基づくCNP治療剤による治療は、例えば、骨成長の制御に影響を及ぼす疾患(例えば、低身長症及び軟骨形成不全を含む骨格形成異常); 若年性突発性関節炎; 骨関節炎; 心血管系疾患; 心血管ホメオスタシス、利尿作用、ナトリウム利尿作用、又は血管拡張に影響を及ぼす疾患; 中枢神経系の疾患、生殖器系の疾患

50

；又は血管内皮細胞に影響を及ぼす疾患を非限定的に含む様々な疾患に起因する又はそれと関連した合併症及び障害を治療及び／又は予防するための薬剤から選択される１つ又は複数の薬理的に活性な物質と組み合わせることも可能である。

【 0 0 8 5 】

グルカゴン様ペプチド (G L P) - 1 受容体拮抗薬

本開示の特定の実施形態では、治療剤は、 G L P - 1 受容体拮抗薬、例えばアミノ酸 1 ~ 8 を欠いているエキセンジン - 4、その誘導体、類似体、模倣体、断片、又は機能的変異体等と融合した又はコンジュゲートした E L P 成分を含む。

【 0 0 8 6 】

ヒト G L P - 1 は、回腸遠位部内、膵臓内、及び脳内の L 細胞中で合成されるプレプログルカゴンに由来する 37 個のアミノ酸残基ペプチドである。プレプログルカゴンのプロセシングにより、 G L P - 1 (7 ~ 3 6) アミド、 G L P - 1 (7 ~ 3 7) が生じ、また G L P - 2 は L 細胞内で主に生ずる。

10

【 0 0 8 7 】

腸の L 細胞内でのプロセシング後に、 G L P - 1 が、とりわけ食事に応答して循環中に放出される。 G L P - 1 の血漿濃度は、約 1 5 p m o l / L の絶食レベルから 4 0 p m o l / L の食後のピークレベルまで上昇する。

【 0 0 8 8 】

いくつかの態様では、本発明のタンパク質活性薬剤は、 G L P - 1 受容体拮抗薬である。いくつかの実施形態では、 G L P - 1 受容体拮抗薬は、 G L P - 1 の N 末端及び／又は C 末端断片である。特定の実施形態では、 G L P - 1 受容体拮抗薬は、アミノ酸配列 D V S S Y L E G Q A A K E F I A W L V K G R (配列番号 5 4、6 4、及び 6 5) 又はその断片を含む。いくつかの態様では、 G L P - 1 受容体拮抗薬は、 G L P - 1 (9 ~ 3 1) (配列番号 5 4) である。その他の態様では、 G L P - 1 受容体拮抗薬は、 G L P - 1 (9 ~ 2 9) (配列番号 6 4) である。なおもその他の態様では、 G L P - 1 受容体拮抗薬は、 G L P - 1 - エキセンジン - 4 (配列番号 6 5) である。

20

【 0 0 8 9 】

その他の実施形態では、 G L P - 1 受容体拮抗薬は、エキセンジン - 4 の N 末端及び／又は C 末端断片である。特定の実施形態では、 G L P - 1 受容体拮抗薬は、次のアミノ酸配列 D L S K Q M E E E A V R L F I E W L K N G G P (配列番号 2 7、2 8、6 0、6 1、6 2、及び 6 3) 又はその断片を含む。特定の実施形態では、エキセンジン - 4 断片として、エキセンジン - 4 (9 ~ 3 9) (配列番号 2 7)、エキセンジン - 4 (9 ~ 3 1) (配列番号 2 8)、エキセンジン - 4 (9 ~ 3 0) (配列番号 6 0)、M - エキセンジン - 4 (9 ~ 3 9) (配列番号 6 2)、M - エキセンジン - 4 (9 ~ 3 1) (配列番号 6 1)、又は M - エキセンジン - 4 (9 ~ 3 0) (配列番号 6 3) が挙げられるが、但しこれらに限定されない。

30

【 0 0 9 0 】

その他の実施形態では、 G L P - 1 受容体拮抗薬は、アミノ酸配列 D V S S Y L E G Q A A K E F I A W L V K G R (配列番号 6 6 及び 6 7) 又はその断片を含む。いくつかの態様では、 G L P - 1 受容体拮抗薬は、 J a n t - 4 (9 ~ 3 0) (配列番号 6 6) である。別の態様では、 G L P - 1 受容体拮抗薬は、 J a n t - 4 (9 ~ 3 9) (配列番号 6 7) である。

40

【 0 0 9 1 】

特定の実施形態では、 G L P - 1 受容体拮抗薬は、哺乳動物の G L P - 1 受容体拮抗薬である。いくつかの実施形態では、 G L P - 1 受容体拮抗薬は、ヒト G L P - 1 受容体拮抗薬 (例えば、配列番号 2 7、2 8、5 4、5 6、6 0、6 1、6 2、6 3、6 4、6 5、6 6、又は 6 7) である。いくつかの実施形態では、 G L P - 1 受容体拮抗薬は、 G L P - 1 受容体拮抗薬の N 末端及び／又は C 末端において、例えば、最大約 3 個のアミノ酸、最大約 5 個のアミノ酸、最大約 1 0 個のアミノ酸、最大約 1 5 個のアミノ酸、最大約 2 0 個のアミノ酸、最大約 2 5 個のアミノ酸、又は最大約 3 0 個のアミノ酸による場合を含

50

む、約1～約30個のアミノ酸によりトランケーションされた機能的断片を含む、哺乳動物のGLP-1受容体拮抗薬の機能的類似体である。その他の実施形態では、機能的変異体は、天然型又はトランケーションされた配列（例えば、配列番号27、28、54、56、60、61、62、63、64、65、66、又は67）に対して、約1～約30個のアミノ酸の挿入、欠損、及び/又は置換を含有する。例えば、機能的変異体は、天然型又はトランケーションされた配列（例えば、配列番号27、28、54、56、60、61、62、63、64、65、66、又は67）に対して、最大約3個のアミノ酸、最大約5個のアミノ酸、最大約10個のアミノ酸、最大約15個のアミノ酸、最大約20個のアミノ酸、最大約25個のアミノ酸、又は最大約30個のアミノ酸の挿入、欠損、及び/又は置換を有し得る。タンパク質の活性は、任意の利用可能なアッセイ法を使用して確認又はアッセイされ得る。その他の実施形態では、GLP-1受容体拮抗薬は、天然型又はトランケーションされた配列（例えば、配列番号27、28、54、56、60、61、62、63、64、65、66、又は67）と、少なくとも約75%の同一性、約80%の同一性、約90%の同一性、約95%の同一性、約96%の同一性、約97%の同一性、約98%の同一性、又は約99%の同一性を有するアミノ酸配列を有する。同一性のパーセンテージは、http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/において利用可能なアライメントプログラムEMBOSS Needleを使用して計算可能である。下記のデフォルトパラメーター、すなわちProtein Weight Matrix = BLOSUM62; Gap Open = 10; Gap Extension = 0.1が、ペアワイズアライメント用として利用可能である。いくつかの実施形態では、GLP-1受容体拮抗薬は、当技術分野において公知の追加の化学修飾を含み得る。

【0092】

特定の実施形態では、治療剤は、GLP-1受容体拮抗薬、その類似体、模倣体、誘導体、断片、又は機能的変異体のC末端に融合したELPを含む。いくつかの実施形態では、治療剤は、ヒトGLP-1受容体拮抗薬（例えば、配列番号58及び59）のN末端に融合したELPを含む。いくつかの実施形態では、GLP-1受容体拮抗薬は、2つ以上のELP配列を有する融合タンパク質の状態にある。いくつかの実施形態では、GLP-1受容体拮抗薬は、N末端及びC末端の両方に1つ又は複数のELPを有する。いくつかの実施形態では、GLP-1受容体拮抗薬のC末端及び/又はN末端に位置するELPは、約90～約180個の反復性構造単位を含む。その他の実施形態では、GLP-1受容体拮抗薬のC末端及び/又はN末端に位置するELPは、約90個よりも少ない反復性構造単位を含む。その他の態様では、GLP-1受容体拮抗薬のC末端及び/又はN末端に位置するELPは、約180個を上回る反復性構造単位を含む。いくつかの実施形態では、N末端及びC末端に位置する2つ以上のELPのサイズはほぼ同一である。その他の実施形態では、N末端及びC末端に位置する2つ以上のELPのサイズは異なる。いくつかの実施形態では、GLP-1受容体拮抗薬のN末端に位置するELPは、GLP-1受容体拮抗薬のC末端に位置するELPよりも大きい。その他の実施形態では、GLP-1受容体拮抗薬のC末端に位置するELPは、GLP-1受容体拮抗薬のN末端に位置するELPよりも大きい。

【0093】

その他の実施形態では、GLP-1受容体拮抗薬治療剤が、糖尿病（1型又は2型）；代謝性疾患；肥満；高インスリン血症と関連した低血糖症を含む、但しこれに限定されないインスリン過剰分泌に起因する疾患；胃手術後の後天性高インスリン性低血糖症；又は高インスリン症、例えば先天性高インスリン症若しくは胃手術、例えば肥満を治療するための胃手術後の後天性高インスリン症等を含む、但しこれらに限定されない疾患を治療するのに使用される。方法は、ELP及びGLP-1受容体拮抗薬を含む治療剤（上記のような）を、そのような治療を必要とする患者に投与することを含む。一般的に、患者は、ヒト又はヒト以外の動物患者（例えば、イヌ、ネコ、ウシ、又はウマ）であり得る。好ましくは、患者はヒトである。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 4 】

いくつかの実施形態では、本開示に基づく G L P - 1 受容体拮抗薬治療剤による治療は、例えば、糖尿病（1型又は2型）；代謝性疾患；肥満；高インスリン血症と関連した低血糖症を含む、但しこれらに限定されないインスリン過剰分泌に起因する疾患；胃手術後の後天性高インスリン性低血糖症；又は高インスリン症、例えば先天性高インスリン症若しくは胃手術、例えば肥満を治療するための胃手術後の後天性高インスリン症等を含む、但しこれらに限定されない疾患に起因する又はそれと関連した様々な合併症及び障害を治療及び/又は予防するための薬剤から選択される1つ又は複数の薬理的に活性な物質と組み合わせることも可能である。

【 0 0 9 5 】

グルカゴン様ペプチド（G L P）- 2 受容体作動薬

本開示の特定の実施形態では、治療剤は、G L P - 2 受容体作動薬、その誘導体、類似体、模倣体、断片、又は機能的変異体と融合した又はコンジュゲートした E L P を含む。いくつかの実施形態では、G L P - 2 受容体作動薬は、G L P - 2 である。

【 0 0 9 6 】

G L P - 2 は、腸の腸内分泌 L 細胞における、及び脳幹の特異的領域におけるプログルカゴンの翻訳後プロセッシングから放出される 33 - アミノ酸ペプチドである。G L P - 2 は、栄養分摂取に応答して、G L P - 1、オキシントモジュリン及びグリセンチンと共に同時分泌される。G L P - 2 は、アミノ酸配列に関して、グルカゴン及び G L P - 1 との顕著な相同性を示す。異なる哺乳動物間でも、G L P - 2 の形態は高度に保存されている。例えば、ヒト G L P - 2（h G L P - 2）及びデグー（南アメリカの齧歯類）G L P - 2 は、それぞれアミノ酸 1 個及び 3 個だけ、ラット G L P - 2（r G L P - 2）と異なる。G L P - 2 は、クラス I I グルカゴンセクレチンファミリーに属する単一の G タンパク質共役受容体と結合する。G L P - 2 受容体は、G L P - 2 に対して応答性であることが公知の部位である小腸、結腸、及び胃内に局在する（Y u s t a e t a l . , 2 0 0 0 , G a s t r o e n t e r o l o g y , 1 1 9 : 7 4 4 - 5 5）。

【 0 0 9 7 】

本開示の特定の実施形態では、活性薬剤は、G L P - 2 受容体作動薬、その誘導体、類似体、模倣体、断片、又は機能的変異体と融合した又はコンジュゲートした、持続放出を提供するアミノ酸配列を含む。本開示の特定の実施形態では、活性薬剤は、G L P - 2 受容体作動薬及び h G H と融合した又はコンジュゲートした、持続放出を提供するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、G L P - 2 受容体作動薬と h G H は、持続放出を提供するアミノ酸配列の異なる端部に連結している。いくつかの実施形態では、G L P - 2 受容体作動薬が持続放出を提供するアミノ酸配列のアミノ末端に連結しており、また h G H がカルボキシ末端に連結している。いくつかの実施形態では、h G H が持続放出を提供するアミノ酸配列のアミノ末端に連結しており、また G L P - 2 受容体作動薬が、カルボキシ末端に連結している。いくつかの実施形態では、持続放出を提供するアミノ酸配列は E L P である。

【 0 0 9 8 】

特定の実施形態では、G L P - 2 受容体作動薬は、哺乳動物の G L P - 2 受容体作動薬、例えばヒト G L P - 2 受容体作動薬等である。いくつかの実施形態では、G L P - 2 受容体作動薬は、ヒト G L P - 2 ペプチド（配列番号 6 8）である。その他の実施形態では、G L P - 2 受容体作動薬は、G L P - 2 ペプチドの N 末端の位置 2 に位置するアラニン（A）がグリシン（G）に置き換わった G L P - 2 ペプチド類似体である（配列番号 7 0）。特定の実施形態では、G L P - 2 受容体作動薬は、配列 H X D G S F S D E M N T I L D N L A A R D F I N W L I Q T K I T D（配列番号 7 4）を含み、式中、X は、アラニン（A）、グリシン（G）、ロイシン（L）、イソロイシン（I）、又はバリン（V）である。いくつかの実施形態では、X は、アラニン（A）又はグリシン（G）である。

【 0 0 9 9 】

いくつかの実施形態では、G L P - 2 受容体作動薬は、ヒト G L P - 2 ペプチドの C 末

10

20

30

40

50

端において、例えば、最大約3個のアミノ酸、最大約5個のアミノ酸、最大約10個のアミノ酸、最大約15個のアミノ酸、最大約20個のアミノ酸、又は最大約25個のアミノ酸による場合を含む、約1～約25個のアミノ酸によりトランケーションされた機能的断片を含む、哺乳動物GLP-2ペプチドの機能的変異体である。その他の実施形態では、機能的変異体は、天然型又はコンセンサス配列（例えば、配列番号68又は74）に対して、約1～約25個のアミノ酸の挿入、欠損、及び/又は置換を含み得る。例えば、機能的変異体は、天然型又はコンセンサス配列（例えば、配列番号68又は74）に対して、最大約3個のアミノ酸、最大約5個のアミノ酸、最大約10個のアミノ酸、最大約15個のアミノ酸、最大約20個のアミノ酸、又は最大約25個のアミノ酸の挿入、欠損、及び/又は置換を有し得る。タンパク質の活性は、任意の利用可能なアッセイ法を使用して確認又はアッセイされ得る。その他の実施形態では、GLP-2受容体作動薬は、天然型又はコンセンサス配列（例えば、配列番号68又は74）と少なくとも約75%の同一性、約80%の同一性、約90%の同一性、約95%の同一性、約96%の同一性、約97%の同一性、約98%の同一性、又は約99%の同一性を有する。同一性のパーセンテージは、http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/において利用可能なアライメントプログラムEMBOSS Needleを使用して計算可能である。下記のデフォルトパラメーター、すなわちProtein Weight Matrix = BLOSUM62; Gap Open = 10; Gap Extension = 0.1が、ペアワイズアライメント用として利用可能である。いくつかの実施形態では、GLP-2受容体作動薬は、当技術分野において公知の追加の化学修飾を含み得る。

【0100】

特定の実施形態では、治療剤は、GLP-2受容体作動薬、その断片又は機能的変異体のN末端又はC末端に融合したELPを含む。いくつかの実施形態では、治療剤は、GLP-2ペプチドのC末端（配列番号69、71、及び73）に融合したELPを含む。

【0101】

いくつかの実施形態では、GLP-2受容体作動薬は、2つ以上のELP配列を有する融合タンパク質の状態にある。いくつかの実施形態では、GLP-2受容体作動薬は、N末端及びC末端の両方に、1つ又は複数のELPを有する。いくつかの実施形態では、GLP-2受容体作動薬のC末端及び/又はN末端に位置するELPは、約90～約180個の反復性構造単位を含む。その他の実施形態では、GLP-2受容体作動薬のC末端及び/又はN末端に位置するELPは、約90個よりも少ない反復性構造単位を含む。その他の態様では、GLP-2受容体作動薬のC末端及び/又はN末端に位置するELPは、約180個を上回る反復性構造単位を含む。いくつかの実施形態では、N末端及びC末端に位置する2つ以上のELPのサイズはほぼ同一である。いくつかの実施形態では、N末端及びC末端に位置する2つ以上のELPのサイズは異なる。いくつかの実施形態では、GLP-2受容体作動薬のN末端に位置するELPは、GLP-2受容体作動薬のC末端に位置するELPよりも大きい。その他の実施形態では、GLP-2受容体作動薬のC末端に位置するELPは、GLP-2受容体作動薬のN末端に位置するELPよりも大きい。いくつかの実施形態では、ELPは、リンカー（配列番号71及び73）を介してGLP-2受容体作動薬のC末端及び/又はN末端に連結している。いくつかの実施形態では、リンカーは、トリペプチドGGG配列（配列番号87）を含む。別の態様では、リンカーは、トリペプチドGGGの単一コピーを含む。別の態様では、リンカーは、トリペプチドGGGの複数の反復部を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、GGG配列の2つの反復部（配列番号102）を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、GGG配列の3つの反復部（配列番号103）を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、ペンタペプチドGGGGG配列を含む（配列番号93）。いくつかの態様では、リンカーは、ペンタペプチドGGGGG（配列番号93）の単一コピーを含む。別の態様では、リンカーは、ペンタペプチドGGGGGの複数の反復部を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、GGGGG配列の2つの反復部（配列番号104）を含む。いくつかの

実施形態では、リンカーは、GGGS配列の3つの反復部（配列番号105）を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、ペントペプチドPAPAP配列（配列番号94）を含む。いくつかの態様では、リンカーは、ペントペプチドPAPAPの単一コピーを含む。別の態様では、リンカーは、ペントペプチドPAPAPの複数の反復部を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、PAPAP配列の2つの反復部（配列番号106）を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、PAPAP配列の3つの反復部（配列番号107）を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、ペントペプチドEAAAK配列（配列番号95）を含む。いくつかの態様では、リンカーは、ペントペプチドEAAAKの単一コピーを含む。別の態様では、リンカーは、ペントペプチドEAAAKの複数の反復部を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、EAAAK配列の2つの反復部（配列番号108）を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、EAAAK配列の3つの反復部（配列番号109）を含む。

10

20

30

40

50

【0102】

その他の態様では、本開示は、腸の疾患、例えば炎症性腸疾患（IBD）、例えば潰瘍性大腸炎（UC）及びクローン病（CD）、若しくは短腸症候群（SBS）等；化学療法誘発性の粘膜炎；化学療法誘発性の下痢；又は虚血再灌流傷害等を含む、但しこれらに限定されない腸の疾患を治療又は予防する方法を提供する。該方法は、ELP及びGLP-2受容体作動薬を含む治療剤（上記のような）を、そのような治療を必要とする患者に投与することを含む。一般的に、患者は、ヒト又はヒト以外の動物患者（例えば、イヌ、ネコ、ウシ、又はウマ）であり得る。好ましくは、患者はヒトである。いくつかの実施形態では、本開示に基づくGLP-2受容体作動薬による治療は、例えば、IBD（例えば、UC若しくはCD等）若しくはSBS等の腸の疾患；化学療法誘発性の粘膜炎；化学療法誘発性の下痢；又は虚血再灌流傷害等を含む、但しこれらに限定されない腸の疾患を非限定的に含む、様々な疾患に起因する又はそれと関連する様々な合併症及び障害を治療及び/又は予防するための薬剤から選択される1つ又は複数の薬理的に活性な物質と組み合わせることも可能である。

【0103】

ヘプシジン

特定の実施形態では、活性薬剤は、ヘプシジン（aka LEAP-1（肝臓で発現している抗菌ペプチド））、その誘導体、類似体、模倣体、断片、又は機能的変異体である。ヘプシジンは、炎症又は血中鉄レベル上昇に応答して肝細胞により産生される8kDaペプチドホルモンである。

【0104】

マウスにおいて83個のアミノ酸からなるプレプロペプチド、並びにラット及びヒトにおいては84個のアミノ酸からなるプレプロペプチドをエンコードするヘプシジンcDNAが、鉄の制御を受ける肝臓特異的遺伝子を探索した際に同定された（Pigeon et al., 2001, J. Biol. Chem. 276:7811 (2001)）。24残基からなるN末端シグナルペプチドが最初に開裂してプロヘプシジンが生成し、次に更に処理されて、血液及び尿の両方に見出される成熟したヘプシジンが生成する。ヒト尿では、主要なヘプシジンの形態は、25個のアミノ酸を含有するが、より短い22個及び20個のアミノ酸からなるペプチドも存在する。

【0105】

ヒトヘプシジンは、25-アミノ酸ペプチド（Hep25）である。（Krause et al., 2000, FEBS Lett 480:147-150, and Park et al., 2001, J. Biol. Chem. 276:7806-7810を参照）。ヘプシジンの生理活性型25アミノ酸形態の構造は、4つのジスルフィド結合を形成する8個のシステインを含む単純なヘアピンである（Jordan et al., 2009, J. Biol. Chem. 284:24155-67）。

【0106】

ヘプシジンは、その受容体、鉄エクスポートチャネル (iron export channel) フェロポーチンと結合し、そしてその内部移行及び分解を引き起こし、これによりフェロポーチン媒介型の血中への鉄放出を低下させる。内部移行は、腸粘膜を横断する鉄輸送、並びに肝臓及びマクロファージによる取り込みを更に低下させる。ヘプシジン発現は、赤血球生成における鉄利用能を減少させる急性及び慢性の炎症において増加する。特定の実施形態では、ヘプシジン治療剤は、ヘプシジン、その断片又は機能的変異体と融合した又はコンジュゲートした、持続放出を提供するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、持続放出を提供するアミノ酸配列はELPである。

【0107】

特定の実施形態では、ヘプシジンは哺乳動物のヘプシジンである。いくつかの実施形態では、哺乳動物のヘプシジンは、ヒトヘプシジンである (配列番号75)。いくつかの実施形態では、哺乳動物のヘプシジンは、活性にとって重要であるヘプシジンのN末端断片、DTHFPICIF (配列番号88)を含む。特定の実施形態では、本発明は、生理活性型ヒト25-アミノ酸形態であるHep25のヘプシジン活性を模倣するペプチド断片を提供する。そのようなペプチドは、「ミニヘプシジン」と呼ばれる。

10

【0108】

いくつかの実施形態では、ヘプシジンは、ヘプシジンのC末端において、例えば、最大約3個のアミノ酸、最大約5個のアミノ酸、最大約10個のアミノ酸、最大約15個のアミノ酸、又は最大約20個のアミノ酸による場合を含む、約1~約20個のアミノ酸によりトランシェーションされた機能的断片を含むヒトヘプシジンの機能的変異体である。その他の実施形態では、機能的変異体は、天然型の配列 (例えば、配列番号75) に対して、C末端において約1~約20個のアミノ酸の挿入、欠損、及び/又は置換を含有する。例えば、機能的変異体は、天然型の配列 (例えば、配列番号75) に対して、最大約3個のアミノ酸、最大約5個のアミノ酸、最大約10個のアミノ酸、最大約15個のアミノ酸、又は最大約20個のアミノ酸の挿入、欠損、及び/又は置換を有し得る。

20

【0109】

タンパク質の活性は、任意の利用可能なアッセイ法を使用して確認又はアッセイされ得る。本明細書で使用する場合、いくつかの実施形態では、「ヘプシジン活性」を有する化合物とは、対象 (例えば、マウス又はヒト) に投与 (例えば、非経口注射又は経口投与) したときに、用量依存的及び時間依存的に対象内の血漿鉄濃度を低下させる能力を該化合物が有することを表す (例えば、Rivera et al., 2005, Blood, 106: 2196-2199での実証を参照)。いくつかの実施形態では、Nemeth et al., 2006, Blood, 107: 328-333で教示するように、本発明のペプチドは、フェロポーチン発現細胞株においてフェロポーチンの内部移行及び分解を引き起こす能力によりアッセイしたとき、in vitro活性を有する。In vitro活性は、Nemeth et al., 2006, Blood, 107: 328-333で教示するように、例えば、緑色蛍光タンパク質に融合したフェロポーチンを提示するように工学的に作出された細胞の用量依存的蛍光損失により測定され得る。

30

【0110】

いくつかの実施形態では、ヘプシジンは、天然型の配列 (例えば、配列番号75) と少なくとも約75%の同一性、約80%の同一性、約90%の同一性、約95%の同一性、約96%の同一性、約97%の同一性、約98%の同一性、又は約99%の同一性を有する。同一性のパーセンテージは、http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/において利用可能なアライメントプログラムEMBOSS Needleを使用して計算可能である。下記のデフォルトパラメーター、すなわちProtein Weight Matrix = BLOSUM62; Gap Open = 10; Gap Extension = 0.1が、ペアワイズアライメント用として利用可能である。いくつかの実施形態では、ヘプシジンは、当技術分野において公知の追加の化学修飾を含み得る。

40

50

【0111】

特定の実施形態では、治療剤は、ヘプシジン、その断片又は機能的変異体のN末端又はC末端に融合したELPを含む。いくつかの実施形態では、治療剤は、ヒトヘプシジンのN末端(配列番号76)に融合したELPを含む。その他の実施形態では、治療剤は、ヒトヘプシジンのC末端(配列番号77)に融合したELPを含む。

【0112】

いくつかの実施形態では、ヘプシジンは、2つ以上のELP配列を有する融合タンパク質の状態にある。いくつかの実施形態では、ヘプシジンは、N末端及びC末端の両方に1つ又は複数のELPを有する。いくつかの実施形態では、ヘプシジンのC末端及び/又はN末端に位置するELPは、約90~約180個の反復性構造単位を含む。その他の実施形態では、ヘプシジンのC末端及び/又はN末端に位置するELPは、約90個よりも少ない反復性構造単位を含む。その他の態様では、ヘプシジンのC末端及び/又はN末端に位置するELPは、約180個を上回る反復性構造単位を含む。いくつかの実施形態では、N末端及びC末端に位置する2つ以上のELPのサイズはほぼ同一である。その他の実施形態では、N末端及びC末端に位置する2つ以上のELPのサイズは異なる。いくつかの実施形態では、ヘプシジンのN末端に位置するELPは、ヘプシジンペプチドのC末端に位置するELPよりも大きい。いくつかの実施形態では、ヘプシジンのC末端に位置するELPは、ヘプシジンのN末端に位置するELPよりも大きい。

10

【0113】

その他の態様では、本開示は、鉄過剰症、例えば遺伝性のヘモクロマトーシス(HH)若しくは鉄負荷貧血等；2型ヘモクロマトーシス；心疾患、例えば心筋シデローシス若しくは心不全等；内分泌障害を引き起こす疾患；肝疾患、例えば肝硬変若しくは肝細胞癌等；糖尿病；ベータサラセミア；急性重度感染症；又は真性多血症を含む、但しこれらに限定されない腸の疾患を治療又は予防する方法を提供する。方法には、ELP及びヘプシジンを含む治療剤(上記のような)を、そのような治療を必要とする患者に投与することを含む。一般的に、患者は、ヒト又はヒト以外の動物患者(例えば、イヌ、ネコ、ウシ、又はウマ)であり得る。好ましくは、患者はヒトである。

20

【0114】

いくつかの実施形態では、本開示に基づくヘプシジン治療剤による治療は、例えば、鉄過剰症、例えば遺伝性のヘモクロマトーシス(HH)若しくは鉄負荷貧血等；2型ヘモクロマトーシス；心疾患、例えば心筋シデローシス若しくは心不全等；内分泌障害を引き起こす疾患；肝疾患、例えば肝硬変若しくは肝細胞癌等；糖尿病；ベータサラセミア；急性重度感染症；又は真性多血症を含む、但しこれらに限定されない様々な疾患に起因する又はそれと関連した様々な合併症及び障害を治療及び/又は予防するための薬剤から選択される1つ又は複数の薬理学的に活性な物質と組み合わせることも可能である。

30

【0115】

インスリン様増殖因子-1(IGF-1)

いくつかの実施形態では、タンパク質活性薬剤は、IGF-1、その誘導体、類似体、模倣体、断片、又は機能的変異体である。IGF-Iは、血漿及びその他の体液、並びに多くの細胞/組織中に存在する単鎖ペプチドであり、3個のジスルフィド結合を含む70個のアミノ酸を含み、また広範囲の細胞型の増殖を刺激し、そして成長ホルモンのいくつかの作用と関係している。

40

【0116】

IGF-1は、全身的及び局所的効果の両方を有し、また異なる特異的結合タンパク質と主に関連しており、そのうちの4つは、IGFBP1、IGFBP2、IGFBP3、及びIGFBP4と呼ばれる。これらの結合タンパク質は、IGF-1の生物学的機能及び利用能を正及び負の両様式で調節する。

【0117】

IGF-1は、多くの異なる細胞型内の原形質膜外面に露出したIGF-1型受容体との相互作用により主に作用する。IGF-1Rは、多くの異なる細胞型上で発現しており

50

、従っていくつかの生物組織、すなわち肝臓、腎臓、肺、筋肉、骨組織、及び軟骨、並びに神経組織は、IGF-1の作用に依存する。

【0118】

特定の実施形態では、本開示のIGF-1治療剤は、IGF-1、その断片又は機能的変異体と融合した又はコンジュゲートした、持続放出を提供するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、持続放出を提供するアミノ酸配列はELPである。

【0119】

特定の実施形態では、IGF-1は、哺乳動物のIGF-1である。いくつかの実施形態では、哺乳動物のIGF-1は、ヒトIGF-1(配列番号78)である。いくつかの実施形態では、IGF-1は、IGF-1のN末端及び/又はC末端において、例えば、最大約3個のアミノ酸、最大約5個のアミノ酸、最大約10個のアミノ酸、最大約15個のアミノ酸、最大約20個のアミノ酸、最大約25個のアミノ酸、最大約30個のアミノ酸、最大約35個のアミノ酸、最大約40個のアミノ酸、最大約45個のアミノ酸、又は最大約50個のアミノ酸による場合を含む、約1~約50個のアミノ酸によりトランケーションされた機能的断片を含む、ヒトIGF-1の断片又は機能的変異体である。その他の実施形態では、断片又は機能的変異体は、天然型の配列(例えば、配列番号78)に対して約1~約50個のアミノ酸の挿入、欠損、及び/又は置換を含有する。例えば、断片又は機能的変異体は、天然型の配列(例えば、配列番号78)に対して、最大約3個のアミノ酸、最大約5個のアミノ酸、最大約10個のアミノ酸、最大約15個のアミノ酸、最大約20個のアミノ酸、最大約25個のアミノ酸、最大約30個のアミノ酸、最大約35個のアミノ酸、最大約40個のアミノ酸、最大約45個のアミノ酸、又は最大約50個のアミノ酸の挿入、欠損、及び/又は置換を有し得る。タンパク質の活性は、任意の利用可能なアッセイ法を使用して確認又はアッセイされ得る。その他の実施形態では、IGF-1、その誘導体、類似体、模倣体、断片、又は機能的変異体は、天然型の配列(例えば、配列番号78)と、少なくとも約75%の同一性、約80%の同一性、約90%の同一性、約95%の同一性、約96%の同一性、約97%の同一性、約98%の同一性、又は約99%の同一性を有する。同一性のパーセンテージは、http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/において利用可能なアライメントプログラムEMBOSS Needleを使用して計算可能である。下記のデフォルトパラメーター、すなわちProtein Weight Matrix = BLOSUM62; Gap Open = 10; Gap Extension = 0.1が、ペアワイズアライメント用として利用可能である。いくつかの実施形態では、IGF-1、その誘導体、類似体、模倣体、断片、又は機能的変異体は、当技術分野において公知の追加の化学修飾を含み得る。

10

20

30

【0120】

特定の実施形態では、治療剤は、IGF-1、その誘導体、類似体、模倣体、断片、又は機能的変異体のN末端又はC末端に融合したELPを含む。特定の実施形態では、治療剤は、IGF-1のC末端(配列番号79及び80)に融合したELPを含む。

【0121】

いくつかの実施形態では、IGF-1、その誘導体、類似体、模倣体、断片、又は機能的変異体は、2つ以上のELP配列を有する融合タンパク質の状態にある。いくつかの実施形態では、IGF-1は、N末端及びC末端の両方に、1つ又は複数のELPを有する。いくつかの実施形態では、IGF-1のC末端及び/又はN末端に位置するELPは、約90~約180個の反復性構造単位を含む。その他の実施形態では、IGF-1のC末端及び/又はN末端に位置するELPは、約90個よりも少ない反復性構造単位を含む。その他の態様では、IGF-1のC末端及び/又はN末端に位置するELPは、約180個を上回る反復性構造単位を含む。いくつかの実施形態では、N末端及びC末端に位置する2つ以上のELPのサイズはほぼ同一である。その他の実施形態では、N末端及びC末端に位置する2つ以上のELPのサイズは異なる。いくつかの実施形態では、IGF-1のN末端に位置するELPは、IGF-1のC末端に位置するELPよりも大きい。その

40

50

他の実施形態では、IGF-1のC末端に位置するELPは、IGF-1のN末端に位置するELPよりも大きい。

【0122】

その他の態様では、本開示は、原発性IGF-1欠乏症；神経障害；神経系疾患；がん；腎疾患；肝疾患；肺の疾患；糖尿病；成長欠陥；組換えGHに対する中和抗体を発現した、GH遺伝子が欠損している小児の治療；ラロン症候群若しくはラロン型低身長症；心疾患；又は脳卒中を含む、但しこれらに限定されない疾患を治療又は予防する方法を提供する。該方法は、ELP及びIGF-1を含む治療剤（上記のような）を、そのような治療を必要とする患者に投与することを含む。一般的に、患者は、ヒト又はヒト以外の動物患者（例えば、イヌ、ネコ、ウシ、又はウマ）であり得る。好ましくは、患者はヒトである。

10

【0123】

いくつかの実施形態では、本開示に基づくIGF-1化合物による治療は、化学療法と照射療法、並びに例えば、原発性IGF-1欠乏症；神経障害；神経細胞疾患；がん；腎疾患；肝疾患；肺の疾患；糖尿病；成長欠陥；組換えGHに対する中和抗体を発現した、GH遺伝子が欠損している小児の治療；ラロン症候群、又はラロン型低身長症；心疾患；又は脳卒中を含む、但しこれらに限定されない様々な疾患に起因する又はそれと関連した合併症及び障害を治療及び/又は予防するための薬剤から選択される1つ又は複数の薬理的に活性な物質と組み合わせることも可能である。

20

【0124】

ウロジラチン

いくつかの実施形態では、タンパク質活性薬剤は、ウロジラチン、その誘導体、類似体、模倣体、断片、又は機能的変異体である。ウロジラチンは、ナトリウム利尿ペプチド受容体A（NPR-A）作動薬である、32個のアミノ酸からなるペプチドホルモンである。ウロジラチンは、心房性ナトリウム利尿ペプチド（ANP）の腎アイソフォームである。ウロジラチンは、腎臓内でのANPプロホルモンの差次的プロセッシングにより形成され、その他のすべての組織とは対照的に、126個のアミノ酸からなるプロホルモンがアミノ酸98と99の間で開裂してANPとカリウム利尿ペプチドを形成するのではなく、該プロホルモンはアミノ酸95と96の間で開裂する。ANPプロホルモンが腎臓内で開裂すると、その結果、カリウム利尿ペプチドのC末端に由来する4個のアミノ酸（すなわち、トレオニン-アラニン-プロリン-アルギニン）が、ANPのN末端に連結する。従って、ウロジラチンは、N末端延長部の4個のアミノ酸（TAPR）の付加を除けば、28アミノ酸含有型ANPと同一の構造を有する32アミノ酸含有型ペプチドである。

30

【0125】

ウロジラチンは、腎臓において生理学的な量で産生され、差示的プロセッシングを受け、そして尿中に分泌され、そして集合管レベルで水とナトリウムの再吸収を制御する傍分泌系に対する基準を形成する（Forssmann, W.-G. et al., 1998, *Histochemistry and Cell Biology* 110(4): 335-357)。ウロジラチンは、腎臓の血流増加を通じて利尿作用を引き起こす。ウロジラチンは、平均動脈圧の上昇及び血液量の増加にตอบสนองして、遠位尿細管及び集合管の細胞から分泌される。ウロジラチンは、血清クレアチニンを低下させ、また尿量を増加させるので、乏尿患者（例えば、急性腎不全及び慢性腎不全の患者等）において重要である。

40

【0126】

ウロジラチンは、ANPよりも強力であり、またANPの2倍の長さの半減期を有するが、それはウロジラチンのN末端が中性エンドペプチダーゼによる不活性化に対して抵抗性であることに起因し得る。特定の実施形態では、本開示のウロジラチン治療剤は、ウロジラチン、その断片又は機能的変異体と融合した又はコンジュゲートした、持続放出を提供するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、持続放出を提供するアミノ酸配列はELPである。

50

【0127】

特定の実施形態では、ウロジラチンは、哺乳動物のウロジラチンである。いくつかの実施形態では、哺乳動物のウロジラチンは、ヒトウロジラチン（配列番号84）である。いくつかの実施形態では、ウロジラチンは、ウロジラチンのC末端において、例えば、最大約3個のアミノ酸、最大約5個のアミノ酸、最大約10個のアミノ酸、最大約15個のアミノ酸、最大約20個のアミノ酸、又は最大約25個のアミノ酸による場合を含む、約1～約25個のアミノ酸によりトランケーションされた機能的断片を含む、哺乳動物のウロジラチンの誘導体、類似体、模倣体、断片、又は機能的変異体である。その他の実施形態では、ウロジラチン、誘導体、類似体、模倣体、断片、又は機能的変異体は、天然型の配列（例えば、配列番号84）に対して、約1～約25個のアミノ酸の挿入、欠損、及び/又は置換を含有する。例えば、ウロジラチン、誘導体、類似体、模倣体、断片、又は機能的変異体は、天然型の配列（例えば、配列番号84）に対して、最大約3個のアミノ酸、最大約5個のアミノ酸、最大約10個のアミノ酸、最大約15個のアミノ酸、最大約20個のアミノ酸、又は最大約25個のアミノ酸の挿入、欠損、及び/又は置換を有し得る。タンパク質の活性は、任意の利用可能なアッセイ法を使用して確認又はアッセイされ得る。その他の実施形態では、ウロジラチン、誘導体、類似体、模倣体、断片、又は機能的変異体は、天然型の配列（例えば、配列番号84）と少なくとも約75%の同一性、約80%の同一性、約90%の同一性、約95%の同一性、約96%の同一性、約97%の同一性、約98%の同一性、又は約99%の同一性を有する。同一性のパーセンテージは、http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/において利用可能なアライメントプログラムEMBOSS Needleを使用して計算可能である。下記のデフォルトパラメーター、すなわちProtein Weight Matrix = BLOSUM62; Gap Open = 10; Gap Extension = 0.1が、ペアワイズアライメント用として利用可能である。いくつかの実施形態では、ウロジラチン、誘導体、類似体、模倣体、断片、又は機能的変異体は、当技術分野において公知の追加の化学修飾を含み得る。

10

20

【0128】

特定の実施形態では、治療剤は、ウロジラチン、その誘導体、類似体、模倣体、断片、又は機能的変異体のN末端又はC末端に融合したELPを含む。いくつかの実施形態では、治療剤は、ヒトウロジラチンのC末端（配列番号85）に融合したELPを含む。その他の実施形態では、治療剤は、ヒトウロジラチンのN末端（配列番号86）に融合したELPを含む。

30

【0129】

いくつかの実施形態では、ウロジラチン、誘導体、類似体、模倣体、断片、又は機能的変異体は、2つ以上のELP配列を有する融合タンパク質の状態にある。いくつかの実施形態では、ウロジラチン、誘導体、類似体、模倣体、断片、又は機能的変異体は、N末端及びC末端の両方に1つ又は複数のELPを有する。いくつかの実施形態では、ウロジラチン、誘導体、類似体、模倣体、断片、又は機能的変異体のC末端及び/又はN末端に位置するELPは、約90～約180個の反復性構造単位を含む。その他の実施形態では、ウロジラチン、誘導体、類似体、模倣体、断片、又は機能的変異体のC末端及び/又はN末端に位置するELPは、約90個よりも少ない反復性構造単位を含む。その他の態様では、ウロジラチン、誘導体、類似体、模倣体、断片、又は機能的変異体のC末端及び/又はN末端に位置するELPは、約180個を上回る反復性構造単位を含む。いくつかの実施形態では、N末端及びC末端に位置する2つ以上のELPのサイズはほぼ同一である。その他の実施形態では、N末端及びC末端に位置する2つ以上のELPのサイズは異なる。いくつかの実施形態では、ウロジラチンのN末端に位置するELPは、ウロジラチン、誘導体、類似体、模倣体、断片、又は機能的変異体のC末端に位置するELPよりも大きい。その他の実施形態では、ウロジラチンのC末端に位置するELPは、ウロジラチン、誘導体、類似体、模倣体、断片、又は機能的変異体のN末端に位置するELPよりも大きい。

40

50

【0130】

その他の態様では、本開示は、心疾患、例えば急性心不全（A H F）等；又は腎疾患、例えば急性腎不全若しくは慢性腎不全等を含む、但しこれらに限定されない疾患を治療又は予防する方法を提供する。該方法は、E L P及びウロジラチンを含む治療剤（上記のような）を、そのような治療を必要とする患者に投与することを含む。一般的に、患者は、ヒト又はヒト以外の動物患者（例えば、イヌ、ネコ、ウシ、又はウマ）であり得る。好ましくは、患者はヒトである。

【0131】

いくつかの実施形態では、本開示に基づくウロジラチンによる治療は、心疾患、例えばA H F等；又は腎疾患、例えば急性腎不全若しくは慢性腎不全等を含む、但しこれらに限定されない様々な疾患に起因する又はそれと関連した合併症及び障害を治療及び／又は予防するための利尿薬及び薬剤を含む、但しこれらに限定されない1つ又は複数の薬理的に活性な物質と組み合わせることも可能である。

10

【0132】

サイモシン 4

いくつかの実施形態では、タンパク質活性薬剤は、サイモシン 4、その誘導体、類似体、模倣体、断片、又は機能的変異体である。サイモシンとは、胸腺から初めて同定され、また今日では、その他の多くの組織中に存在することが公知であり、そして異なる多様な生理機能を有する生化学的及び機能的に異なるタンパク質のファミリーを指す。20を超える -サイモシンのアイソフォームが異なる種で同定されており、またヒトでは、サイモシン 4、サイモシン 10、及びサイモシン 15を含む3種の -サイモシンが同定されているが、そのすべてが有意なアミノ酸配列相同性を共有する。この相同性にもかかわらず、これらサイモシン タンパク質のそれぞれは、異なる機能を有する異なる遺伝子産物である。

20

【0133】

-サイモシン中、最も豊富に存在するサイモシン 4は、高度に保存された水溶性酸性ポリペプチドである。サイモシン 4は、内皮細胞の移動及び分化期間中に*i n v i t r o*で上方制御されるタンパク質として初めて同定された。サイモシン 4をエンコードする哺乳動物遺伝子は、X染色体に局在している。ヒトサイモシン 4、X連鎖型は、44個のアミノ酸を有し、そして最初のメチオニル残基が除去されて、4.9 k D aの分子量を有する43個のアミノ酸ペプチドに処理されることにより、X染色体不活性化を逃れる（Girardi, M., et al., 2003, Immunology 109: 1-7）。サイモシン 4は、細胞質及び細胞の核の両方に局在する。サイモシン 4は、多くの組織に存在し、また複数の生物学的機能を有する。サイモシン 4は、アクチン重合を強力に制御し、組織リモデリング、細胞分化、及び傷害後の細胞と組織の治癒を刺激し、並びにいくつかの炎症性ケモカイン及びサイトカインの発現にも関与している。

30

【0134】

特定の実施形態では、本開示のサイモシン 4治療剤は、サイモシン 4、その断片又は機能的変異体と融合した又はコンジュゲートした、持続放出を提供するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、持続放出を提供するアミノ酸配列はE L Pである。

40

【0135】

特定の実施形態では、サイモシン 4、誘導体、類似体、模倣体、断片、又は機能的変異体は、哺乳動物のサイモシン 4である。いくつかの実施形態では、哺乳動物のサイモシン 4はヒトサイモシン 4（配列番号89）である。いくつかの実施形態では、サイモシン 4は、サイモシン 4のN末端及び／又はC末端において、例えば、最大約3個のアミノ酸、最大約5個のアミノ酸、最大約10個のアミノ酸、最大約15個のアミノ酸、最大約20個のアミノ酸、最大約25個のアミノ酸、最大約30個のアミノ酸、又は最大約35個のアミノ酸による場合を含む、約1～約35個のアミノ酸によりトランケーションされた機能的断片を含む、哺乳動物のサイモシン 4の誘導体、類似体、模倣体、断

50

片、又は機能的変異体である。その他の実施形態では、サイモシン 4、誘導体、類似体、模倣体、断片、又は機能的変異体は、天然型の配列（例えば、配列番号 89）に対して、約 1 ~ 約 35 個のアミノ酸の挿入、欠損、及び / 又は置換を含有する。例えば、サイモシン 4、誘導体、類似体、模倣体、断片、又は機能的変異体は、天然型の配列（例えば、配列番号 89）に対して、最大約 3 個のアミノ酸、最大約 5 個のアミノ酸、最大約 10 個のアミノ酸、最大約 15 個のアミノ酸、最大約 20 個のアミノ酸、最大約 25 個のアミノ酸、最大約 30 個のアミノ酸、又は最大約 35 個のアミノ酸の挿入、欠損、及び / 又は置換を有し得る。タンパク質の活性は、任意の利用可能なアッセイ法を使用して確認又はアッセイされ得る。その他の実施形態では、サイモシン 4、誘導体、類似体、模倣体、断片、又は機能的変異体は、天然型の配列（例えば、配列番号 89）と少なくとも約 75 % の同一性、約 80 % の同一性、約 90 % の同一性、約 95 % の同一性、約 96 % の同一性、約 97 % の同一性、約 98 % の同一性、又は約 99 % の同一性を有する。同一性のパーセンテージは、http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/において利用可能なアライメントプログラム EMBOS Needle を使用して計算可能である。下記のデフォルトパラメーター、すなわち Protein Weight Matrix = BLOSUM62 ; Gap Open = 10 ; Gap Extension = 0.1 が、ペアワイズアライメント用として利用可能である。いくつかの実施形態では、サイモシン 4、誘導体、類似体、模倣体、断片、又は機能的変異体は、当技術分野において公知の追加の化学修飾を含み得る。

10

20

【0136】

特定の実施形態では、治療剤は、サイモシン 4、その誘導体、類似体、模倣体、断片、又は機能的変異体の N 末端又は C 末端に融合した ELP を含む。いくつかの実施形態では、治療剤は、サイモシン 4 の C 末端（配列番号 90）に融合した ELP を含む。

【0137】

いくつかの実施形態では、サイモシン 4、誘導体、類似体、模倣体、断片、又は機能的変異体は、2 つ以上の ELP 配列を有する融合タンパク質の状態にある。いくつかの実施形態では、サイモシン 4、誘導体、類似体、模倣体、断片、又は機能的変異体は、N 末端及び C 末端の両方に 1 つ又は複数の ELP を有する。いくつかの実施形態では、サイモシン 4、誘導体、類似体、模倣体、断片、又は機能的変異体の C 末端及び / 又は N 末端に位置する ELP は、約 90 ~ 約 180 個の反復性構造単位を含む。その他の実施形態では、サイモシン 4、誘導体、類似体、模倣体、断片、又は機能的変異体の C 末端及び / 又は N 末端に位置する ELP は、約 90 個よりも少ない反復性構造単位を含む。その他の態様では、サイモシン 4、誘導体、類似体、模倣体、断片、又は機能的変異体の C 末端及び / 又は N 末端に位置する ELP は、約 180 個を上回る反復性構造単位を含む。いくつかの実施形態では、N 末端及び C 末端に位置する 2 つ以上の ELP のサイズはほぼ同一である。その他の実施形態では、N 末端及び C 末端に位置する 2 つ以上の ELP のサイズは異なる。いくつかの実施形態では、サイモシン 4、誘導体、類似体、模倣体、断片、又は機能的変異体の N 末端に位置する ELP は、サイモシン 4 の C 末端に位置する ELP よりも大きい。その他の実施形態では、サイモシン 4、誘導体、類似体、模倣体、断片、又は機能的変異体の C 末端に位置する ELP は、N 末端に位置する ELP よりも大きい。

30

40

【0138】

その他の態様では、本開示は、心不全；肺高血圧症；虚血性心疾患；ドライアイ；又は肝線維症を含む、但しこれらに限定されない疾患を治療又は予防する方法を提供する。該方法は、ELP 及びサイモシン 4 を含む治療剤（上記のような）を、そのような治療を必要とする患者に投与することを含む。一般的に、患者は、ヒト又はヒト以外の動物患者（例えば、イヌ、ネコ、ウシ、又はウマ）であり得る。好ましくは、患者はヒトである。

【0139】

いくつかの実施形態では、本開示に基づくサイモシン 4 による治療は、例えば、心不全；肺高血圧症；虚血性心疾患；ドライアイ；又は肝線維症を含む、但しこれらに限定さ

50

れない様々な疾患に起因する又はそれと関連した合併症及び障害を治療及び／又は予防するための薬剤から選択される1つ又は複数の薬理学的に活性な物質と組み合わせることも可能である。

【0140】

TRAIL

特定の実施形態では、タンパク質活性薬剤は、TRAIL (TNF関連アポトーシス誘導リガンド)、その誘導体、類似体、模倣体、断片、又は機能的変異体である。

【0141】

外因性細胞死経路は、細胞内シグナリングイベントを引き起こすリガンド-受容体相互作用を契機とし、最終的には、標的細胞死を引き起こす(アポトーシス)。1つのそのようなリガンドとして、腫瘍壊死因子(TNF)スーパーファミリーのメンバーであるTRAIL又はApo2Lが挙げられる(Wiley, S. R., et al., 1995, *Immunity* 3:673-682; Pitti, R. M., et al., 1996, *J. Biol. Chem.* 271:12687-12690)。TRAILは、281個のアミノ酸からなるII型膜タンパク質である。その細胞外領域は、アミノ酸残基114~281を含み、そしてプロテアーゼにより開裂すると、やはり生物学的に活性な20kDaサイズの可溶性のsTRAIL分子が形成される。内因性のTRAILは、その生物学的機能にとって重要な要件であるホモトリマーとして存在する。活性化Tリンパ球及びNK細胞は、高レベルのTRAILを発現する。

10

【0142】

TRAILタンパク質は、例えば、アポトーシス促進性のTRAIL表面受容体1及び2 (TRAIL-R1/R2又はDR4及びDR5)に結合し、それを活性化させることにより作用する。TRAIL及びsTRAILのいずれも、標的細胞上に存在するTRAIL受容体との相互作用によりアポトーシスを引き起こす能力を有する。

20

【0143】

特定の実施形態では、本開示のTRAIL治療剤は、TRAIL、その断片又は機能的変異体と融合した又はコンジュゲートした、持続放出を提供するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、持続放出を提供するアミノ酸配列はELPである。

【0144】

特定の実施形態では、TRAILは、哺乳動物のTRAILである。いくつかの実施形態では、哺乳動物のTRAILは、ヒトTRAIL(配列番号91)である。いくつかの実施形態では、TRAILは、TRAILのN末端及び／又はC末端において、例えば、最大約3個のアミノ酸、最大約5個のアミノ酸、最大約10個のアミノ酸、最大約15個のアミノ酸、最大約20個のアミノ酸、最大約25個のアミノ酸、最大約30個のアミノ酸、最大約35個のアミノ酸、最大約40個のアミノ酸、最大約45個のアミノ酸、最大約50個のアミノ酸、最大約55個のアミノ酸、最大約60個のアミノ酸、最大約65個のアミノ酸、最大約70個のアミノ酸、最大約75個のアミノ酸、最大約80個のアミノ酸、最大約85個のアミノ酸、最大約90個のアミノ酸、最大約95個のアミノ酸、最大約100個のアミノ酸、最大約105個のアミノ酸、最大約110個のアミノ酸、最大約115個のアミノ酸、最大約120個のアミノ酸、最大約125個のアミノ酸、最大約130個のアミノ酸、最大約135個のアミノ酸、最大約140個のアミノ酸、最大約145個のアミノ酸、最大約150個のアミノ酸、最大約155個のアミノ酸、又は最大約160個のアミノ酸による場合を含む、約1~約160個のアミノ酸によりランケーションされた機能的断片を含む、哺乳動物のTRAILのその誘導体、類似体、模倣体、断片、又は機能的変異体であり得る。TRAIL、誘導体、類似体、模倣体、断片、又は機能的変異体は、天然型の配列(例えば、配列番号91)に対して、約1~約160個のアミノ酸の挿入、欠損、及び／又は置換を含有し得る。例えば、TRAIL、誘導体、類似体、模倣体、断片、又は機能的変異体は、天然型の配列(例えば、配列番号91)に対して、最大約3個のアミノ酸、最大約5個のアミノ酸、最大約10個のアミノ酸、最大約15個のアミノ酸、最大約20個のアミノ酸、最大約25個のアミノ酸、最大約30個のアミ

30

40

50

ノ酸、最大約 35 個のアミノ酸、最大約 40 個のアミノ酸、最大約 45 個のアミノ酸、最大約 50 個のアミノ酸、最大約 55 個のアミノ酸、最大約 60 個のアミノ酸、最大約 65 個のアミノ酸、最大約 70 個のアミノ酸、最大約 75 個のアミノ酸、最大約 80 個のアミノ酸、最大約 85 個のアミノ酸、最大約 90 個のアミノ酸、最大約 95 個のアミノ酸、最大約 100 個のアミノ酸、最大約 105 個のアミノ酸、最大約 110 個のアミノ酸、最大約 115 個のアミノ酸、最大約 120 個のアミノ酸、最大約 125 個のアミノ酸、最大約 130 個のアミノ酸、最大約 135 個のアミノ酸、最大約 140 個のアミノ酸、最大約 145 個のアミノ酸、最大約 150 個のアミノ酸、最大約 155 個のアミノ酸、又は最大約 160 個のアミノ酸の挿入、欠損、及び/又は置換を有し得る。タンパク質の活性は、任意の利用可能なアッセイ法を使用して確認又はアッセイされ得る。その他の実施形態では、T R A I L、誘導体、類似体、模倣体、断片、又は機能的変異体は、天然型の配列（例えば、配列番号 91）と少なくとも約 75% の同一性、約 80% の同一性、約 90% の同一性、約 95% の同一性、約 96% の同一性、約 97% の同一性、約 98% の同一性、又は約 99% の同一性を有する。同一性のパーセンテージは、http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/において利用可能なアライメントプログラム EMBOS S Needle を使用して計算可能である。下記のデフォルトパラメーター、すなわち Protein Weight Matrix = B L O S U M 6 2 ; Gap Open = 1 0 ; Gap Extension = 0 . 1 が、ペアワイズアライメント用として利用可能である。いくつかの実施形態では、T R A I L、誘導体、類似体、模倣体、断片、又は機能的変異体は、当技術分野において公知の追加の化学修飾を含み得る。

【0145】

特定の実施形態では、治療剤は、T R A I L、その誘導体、類似体、模倣体、断片、又は機能的変異体の N 末端又は C 末端に融合した E L P を含む。いくつかの実施形態では、治療剤は、T R A I L（配列番号 92）の N 末端に融合した E L P を含む。

【0146】

いくつかの実施形態では、T R A I L、誘導体、類似体、模倣体、断片、又は機能的変異体は、2 つ以上の E L P 配列を有する融合タンパク質の状態にある。いくつかの実施形態では、T R A I L、誘導体、類似体、模倣体、断片、又は機能的変異体は、N 末端及び C 末端の両方に 1 つ又は複数の E L P を有する。いくつかの実施形態では、T R A I L、誘導体、類似体、模倣体、断片、又は機能的変異体の C 末端及び/又は N 末端に位置する E L P は、約 90 ~ 約 180 個の反復性構造単位を含む。その他の実施形態では、T R A I L、誘導体、類似体、模倣体、断片、又は機能的変異体の C 末端及び/又は N 末端に位置する E L P は、約 90 個よりも少ない反復性構造単位を含む。その他の態様では、T R A I L、誘導体、類似体、模倣体、断片、又は機能的変異体の C 末端及び/又は N 末端に位置する E L P は、約 180 個を上回る反復性構造単位を含む。いくつかの実施形態では、N 末端及び C 末端に位置する 2 つ以上の E L P のサイズはほぼ同一である。その他の実施形態では、N 末端及び C 末端に位置する 2 つ以上の E L P のサイズは異なる。いくつかの実施形態では、T R A I L、誘導体、類似体、模倣体、断片、又は機能的変異体の N 末端に位置する E L P は、C 末端に位置する E L P よりも大きい。その他の実施形態では、T R A I L の C 末端に位置する E L P は、N 末端に位置する E L P よりも大きい。

【0147】

その他の態様では、本開示は、腫瘍形成及び様々な種類のがん；非アルコール性脂肪性肝疾患（N A F L D）；非アルコール性脂肪性肝炎（N A S H）；硬変症；再発性 C 型肝炎ウイルス（H C V）感染症の結果として生じた、同所性肝臓移植後（P O L T）レシピエントにおける移植後の肝線維症又は硬変症；膵臓線維症を含む、但しこれらに限定されない疾患を治療又は予防する方法を提供する。該方法は、E L P 及び T R A I L を含む治療剤（上記のような）を、そのような治療を必要とする患者に投与することを含む。一般的に、患者は、ヒト又はヒト以外の動物患者（例えば、イヌ、ネコ、ウシ、又はウマ）であり得る。好ましくは、患者はヒトである。

【0148】

いくつかの実施形態では、本開示に基づくTRAILによる治療は、化学療法又は放射線療法と組み合わせることも可能である。その他の実施形態では、本開示に基づくTRAILによる治療は、例えば、腫瘍形成及び様々な種類のがん；非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）；非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）；硬変症；再発性C型肝炎ウイルス（HCV）感染症の結果として生じた、同所性肝臓移植後（POLT）レシピエントにおける移植後の肝線維症又は硬変症；膵臓線維症を含む、但しこれらに限定されない様々な疾患と関連した合併症及び障害を治療及び/又は予防するため薬剤のから選択される1つ又は複数の薬理的に活性な物質と組み合わせることも可能である。

【0149】

線維芽細胞増殖因子21（FGF21）

線維芽細胞増殖因子21（FGF21）は、動物の脂質レベル、体重、及びグルコース代謝に対して有益な効果を生み出すFGFファミリーのメンバーである。FGF21を過剰発現する遺伝子導入マウスでは、グルコース及びトリグリセリドレベルの低下、及び食餌誘発性肥満に対する耐性が引き起こされることが明らかにされている（Kharitonov et al. (2005), *J. Clin. Invest.* 115: 1627-1635）。齧歯類及び霊長類に外因性FGF21を投与すると、血中グルコースレベルの正常化、トリグリセリド及びコレステロールレベルの低下、耐糖能の改善、及びインスリン感受性の改善を引き起こす（Kharitonov et al. (2007), *Endocrinol.* 48: 774-781）。実験動物モデルを対象にFGF21を投与すると、エネルギー消費量、身体活動、及び代謝速度が増加することにより、体重及び体脂肪が低下することが明らかにされている（Long and Kharitonov (2011) *Biochim. Biophys. Acta* 1812: 791-795）。

【0150】

FGF21シグナリングは、KLB（KLB）、及び3つの異なるFGF受容体（FGFR1c、FGFR2c、又はFGFR3c）のうちの1つを含む受容体複合体とのその相互作用によって媒介される（Ogawa et al. (2007), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 7432-7437; Suzuki et al. (2008), *Mol. Endocrinol.* 22: 1006-1014）。*In vivo*でのFGF21シグナリングに対する主要な機能的受容体は、KLB/FGFR1c複合体であると考えられている（この複合体は、本明細書では「FGF21R」と呼ぶ）。

【0151】

FGF21シグナリングの薬理的活性化が、2型糖尿病、肥満、脂質異常症、非アルコール性脂肪性肝疾患（非アルコール性脂肪性肝炎、NASH）、及びその他の代謝的状态を含む、ヒトにおける様々な疾患及び障害の治療を目的として提案されている（Gimeno and Moller (2014) *Trends Endocrinol. Metab.* 25, 303-311）。FGF類似体LY2405319（Kharitonov et al. (2013) *PLoS One*, 8, e58575）が、2型糖尿病及び肥満の患者を対象とした臨床トライアルで評価された（Gaich et al. (2013) *Cell Metabolism* 18, 333-340）。Hecht et al. (2012, *PLoS One*, 7 (11): e49345）は、ヒトIgG1のFcドメインに融合した長時間作用型FGF21類似体を開発した。

【0152】

特定の実施形態では、本開示のFGF21治療剤は、FGF21、その断片又は機能的変異体と融合した又はコンジュゲートした、持続放出を提供するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、持続放出を提供するアミノ酸配列はELPである。

【0153】

10

20

30

40

50

特定の実施形態では、FGF21は、哺乳動物のFGF21である。いくつかの実施形態では、哺乳動物のFGF21は、ヒトFGF21（配列番号110）である。いくつかの実施形態では、FGF21は、FGF21のN末端及び/又はC末端において、例えば、最大約3個のアミノ酸、最大約5個のアミノ酸、最大約10個のアミノ酸、最大約15個のアミノ酸、最大約20個のアミノ酸、最大約25個のアミノ酸、最大約30個のアミノ酸、最大約35個のアミノ酸、最大約40個のアミノ酸、最大約45個のアミノ酸、最大約50個のアミノ酸、最大約55個のアミノ酸、最大約60個のアミノ酸、最大約65個のアミノ酸、最大約70個のアミノ酸、最大約75個のアミノ酸、最大約80個のアミノ酸、最大約85個のアミノ酸、最大約90個のアミノ酸、最大約95個のアミノ酸、最大約100個のアミノ酸、最大約105個のアミノ酸、最大約110個のアミノ酸、最大約115個のアミノ酸、最大約120個のアミノ酸、最大約125個のアミノ酸、最大約130個のアミノ酸、最大約135個のアミノ酸、最大約140個のアミノ酸、最大約145個のアミノ酸、最大約150個のアミノ酸、最大約155個のアミノ酸、又は最大約160個のアミノ酸による場合を含む、約1～約160個のアミノ酸によりトランケーションされた機能的断片を含む、哺乳動物FGF21のその誘導体、類似体、模倣体、断片、又は機能的変異体であり得る。FGF21、誘導体、類似体、模倣体、断片、又は機能的変異体は、天然型の配列（例えば、配列番号110）に対して、約1～約160個のアミノ酸の挿入、欠損、及び/又は置換を含み得る。例えば、FGF21、誘導体、類似体、模倣体、断片、又は機能的変異体は、天然型の配列（例えば、配列番号110）に対して、最大約3個のアミノ酸、最大約5個のアミノ酸、最大約10個のアミノ酸、最大約15個のアミノ酸、最大約20個のアミノ酸、最大約25個のアミノ酸、最大約30個のアミノ酸、最大約35個のアミノ酸、最大約40個のアミノ酸、最大約45個のアミノ酸、最大約50個のアミノ酸、最大約55個のアミノ酸、最大約60個のアミノ酸、最大約65個のアミノ酸、最大約70個のアミノ酸、最大約75個のアミノ酸、最大約80個のアミノ酸、最大約85個のアミノ酸、最大約90個のアミノ酸、最大約95個のアミノ酸、最大約100個のアミノ酸、最大約105個のアミノ酸、最大約110個のアミノ酸、最大約115個のアミノ酸、最大約120個のアミノ酸、最大約125個のアミノ酸、最大約130個のアミノ酸、最大約135個のアミノ酸、最大約140個のアミノ酸、最大約145個のアミノ酸、最大約150個のアミノ酸、最大約155個のアミノ酸、又は最大約160個のアミノ酸の挿入、欠損、及び/又は置換を有し得る。タンパク質の活性は、任意の利用可能なアッセイ法を使用して確認又はアッセイされ得る。その他の実施形態では、FGF21、誘導体、類似体、模倣体、断片、又は機能的変異体は、天然型の配列（例えば、配列番号110）と少なくとも約75%の同一性、約80%の同一性、約90%の同一性、約95%の同一性、約96%の同一性、約97%の同一性、約98%の同一性、又は約99%の同一性を有する。同一性のパーセンテージは、http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/において利用可能なアライメントプログラムEMBOSS Needleを使用して計算可能である。下記のデフォルトパラメーター、すなわちProtein Weight Matrix = BLOSUM62; Gap Open = 10; Gap Extension = 0.1が、ペアワイズアライメント用として利用可能である。いくつかの実施形態では、TRAIL、誘導体、類似体、模倣体、断片、又は機能的変異体は、当技術分野において公知の追加の化学修飾を含み得る。

【0154】

特定の実施形態では、治療剤は、FGF21、その誘導体、類似体、模倣体、断片、又は機能的変異体のN末端又はC末端に融合したELPを含む。いくつかの実施形態では、治療剤は、FGF21（配列番号110）のN末端に融合したELPを含む。

【0155】

いくつかの実施形態では、FGF21、誘導体、類似体、模倣体、断片、又は機能的変異体は、2つ以上のELP配列を有する融合タンパク質の状態にある。いくつかの実施形態では、FGF21、誘導体、類似体、模倣体、断片、又は機能的変異体は、N末端及び

C末端の両方に1つ又は複数のELPを有する。いくつかの実施形態では、FGF21、誘導体、類似体、模倣体、断片、又は機能的変異体のC末端及び/又はN末端に位置するELPは、約90~約180個の反復性構造単位を含む。その他の実施形態では、FGF21、誘導体、類似体、模倣体、断片、又は機能的変異体のC末端及び/又はN末端に位置するELPは、約90個よりも少ない反復性構造単位を含む。その他の態様では、FGF21、誘導体、類似体、模倣体、断片、又は機能的変異体のC末端及び/又はN末端に位置するELPは、約180個を上回る反復性構造単位を含む。いくつかの実施形態では、N末端及びC末端に位置する2つ以上のELPのサイズはほぼ同一である。その他の実施形態では、N末端及びC末端に位置する2つ以上のELPのサイズは異なる。いくつかの実施形態では、FGF21、誘導体、類似体、模倣体、断片、又は機能的変異体のN末端に位置するELPは、C末端に位置するELPよりも大きい。その他の実施形態では、FGF21のC末端に位置するELPは、N末端に位置するELPよりも大きい。

10

【0156】

いくつかの実施形態では、治療剤は、FGF21、その誘導体、類似体、模倣体、断片、又は機能的変異体のN末端に融合したELPを含み、そしてGLP-1作動薬がELPのN末端に融合している(配列番号133及び134)。そのような治療剤は、糖尿病、肥満、及び関連する障害の治療について、FGF21活性とGLP-1活性の両方の利益を併せ持つ。

【0157】

その他の態様では、本開示は、腫瘍形成及び様々な種類のがん；非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)；非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)；硬変症；再発性C型肝炎ウイルス(HCV)感染症の結果として生じた、同所性肝臓移植後(POLT)レシピエントにおける移植後の肝線維症又は硬変症；膵臓線維症を含む、但しこれらに限定されない疾患を治療又は予防する方法を提供する。該方法は、ELP及びFGF21を含む治療剤(上記のような)を、そのような治療を必要とする患者に投与することを含む。一般的に、患者は、ヒト又はヒト以外の動物患者(例えば、イヌ、ネコ、ウシ、又はウマ)であり得る。好ましくは、患者はヒトである。

20

【0158】

いくつかの実施形態では、本開示に基づくFGF21による治療は、例えば、腫瘍形成及び様々な種類のがん；非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)；非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)；硬変症；再発性C型肝炎ウイルス(HCV)感染症の結果として生じた、同所性肝臓移植後(POLT)レシピエントにおける移植後の肝線維症又は硬変症；膵臓線維症を含む、但しこれらに限定されない様々な疾患と関連した合併症及び障害を治療及び/又は予防するための薬剤から選択される1つ又は複数の薬理的に活性な物質と組み合わせることも可能である。

30

【0159】**製剤**

本開示は、本明細書に開示する治療剤、及び1つ若しくは複数の薬学的に許容される賦形剤及び/又は希釈剤を含む持続放出型の製剤を提供する。例えば、そのような賦形剤は、塩及び水素結合を安定化するように作用し得るその他の賦形剤を含む。当技術分野において公知の任意の適する賦形剤が利用可能である。代表的な賦形剤として、アミノ酸、例えばヒスチジン、グリシン、又はアルギニン等；グリセロール；糖、例えばスクロース等；界面活性剤、例えばポリソルベート20及びポリソルベート80等；クエン酸；クエン酸ナトリウム；酸化防止剤；アルカリ土類金属の塩を含む塩、例えば、ナトリウム、カリウム、及びカルシウム等；カウンターイオン、例えば塩化物及びリン酸等；糖アルコール(例えば、マンニトール)；防腐剤；糖アルコール(例えば、マンニトール、ソルビトール)；及び緩衝剤が挙げられるが、但しこれらに限定されない。代表的な塩として、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化マグネシウム、塩化カルシウム、二塩基性リン酸ナトリウム、塩基性リン酸ナトリウム、リン酸ナトリウム、及びリン酸カリウムが挙げられる。

40

【0160】

50

治療剤は、体温で（例えば37、又はいくつかの実施形態では34～36において）マトリックス形成を可能にするのに十分なpH、イオン強度で、及び一般的に賦形剤と共に製剤化される。治療剤は、一般的に、保管条件ではマトリックスを形成しないように調製される。製剤は、凍結、冷蔵、又は室温で保管可能である。保管条件は、一般的に製剤の転移温度未満、例えば約32未満、又は約30未満、又は約27未満、又は約25未満、又は約20未満、又は約15未満等である。例えば、製剤は、血液と等張であり得る、又は生理条件を模倣するイオン強度を有する。例えば、製剤は、少なくとも25mMの塩化ナトリウム、又は少なくとも30mMの塩化ナトリウム、又は少なくとも40mMの塩化ナトリウム、又は少なくとも50mMの塩化ナトリウム、又は少なくとも75mMの塩化ナトリウム、又は少なくとも100mMの塩化ナトリウム、又は少なくとも150mMの塩化ナトリウムのイオン強度を有し得る。特定の実施形態では、製剤は、0.9%の生理食塩水（154mMの塩化ナトリウム）のイオン強度と同等のイオン強度を有する。

10

20

30

40

50

【0161】

いくつかの実施形態では、製剤は保管条件で安定である。保管条件は、製剤を安定的に保管するのに使用される任意の条件であり得る。いくつかの実施形態では、製剤は冷蔵される。いくつかの実施形態では、製剤は凍結される。いくつかの実施形態では、保管条件として約30未満の温度が挙げられる。いくつかの実施形態では、保管条件として約2～約8の温度が挙げられる。いくつかの実施形態では、保管条件として0未満の温度が挙げられる。いくつかの実施形態では、保管条件として、約-15～約-80の温度が挙げられる。

【0162】

安定性は、当技術分野における任意の適する手段を使用して測定可能である。一般的に、安定な製剤とは、5%未満の分解生成物の増加又は不純物しか示さない製剤である。いくつかの実施形態では、製剤は、保管条件において少なくとも約1ヶ月、少なくとも約2ヶ月、少なくとも約3ヶ月、少なくとも約4ヶ月、少なくとも約5ヶ月、少なくとも約6ヶ月、又は少なくとも約1年、又はそれ超の期間安定である。いくつかの実施形態では、製剤は、2～8において、少なくとも約1ヶ月、少なくとも約2ヶ月、少なくとも約3ヶ月、少なくとも約4ヶ月、少なくとも約5ヶ月、少なくとも約6ヶ月、少なくとも約1年、又は少なくとも約2年、又はそれ超の期間安定である。いくつかの実施形態では、製剤は、25において、少なくとも約1ヶ月、少なくとも約2ヶ月、少なくとも約3ヶ月、少なくとも約4ヶ月、少なくとも約5ヶ月、少なくとも約6ヶ月、少なくとも約1年、又は少なくとも約2年、又はそれ超の期間安定である。いくつかの実施形態では、製剤は、-15～約-80において、少なくとも約1ヶ月、少なくとも約2ヶ月、少なくとも約3ヶ月、少なくとも約4ヶ月、少なくとも約5ヶ月、少なくとも約6ヶ月、少なくとも約1年、又は少なくとも約2年、又はそれ超の期間安定である。

【0163】

いくつかの実施形態では、製剤は、塩化カルシウム、塩化マグネシウム、塩化カリウム、塩基性リン酸カリウム、塩化ナトリウム、二塩基性リン酸ナトリウム、塩基性リン酸ナトリウム、ヒスチジン、アルギニン、グリシン、グリセロール、抗菌性防腐剤（例えば、メタクレゾール）、張度調整剤（tonicity-adjusting agent）（例えば、マンニトール）、氷酢酸、酢酸ナトリウム三水和物；スクロース、塩基性リン酸ナトリウム一水和物、二塩基性リン酸ナトリウム七水和物、亜鉛、m-クレゾール、フェノール、ソルビトール、ポリソルベート80、及びポリソルベート20のうち2つ以上を含む。

【0164】

いくつかの実施形態では、製剤は、ヒスチジン約10mM～約100mMの範囲で、ヒスチジン又は別のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、製剤は、ヒスチジン約10mM～約30mMの範囲で、ヒスチジン又は別のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、製剤は、ヒスチジン約15mM～約25mMの範囲で、ヒスチジン又は別のアミノ酸

を含む。いくつかの実施形態では、製剤は、NaCl 約 10 mM ~ 約 165 mM の範囲で、NaCl を含む。いくつかの実施形態では、製剤は、約 50 mM ~ 約 165 mM の間の NaCl を含む。いくつかの実施形態では、製剤は、約 54 mM ~ 約 162 mM の間の NaCl を含む。いくつかの実施形態では、製剤は、約 110 mM ~ 約 162 mM の間の NaCl を含む。いくつかの実施形態では、製剤は、約 1 mM ~ 約 20 mM の範囲でリン酸ナトリウムを含む。いくつかの実施形態では、製剤は、約 5 mM ~ 約 15 mM の範囲でリン酸ナトリウムを含む。いくつかの実施形態では、製剤は、約 2 mM ~ 約 10 mM の範囲で塩基性リン酸ナトリウムを含む。いくつかの実施形態では、製剤は、約 4 mM ~ 約 8 mM の範囲で塩基性リン酸ナトリウムを含む。いくつかの実施形態では、製剤は、約 1 mM ~ 約 10 mM の範囲で二塩基性リン酸ナトリウムを含む。いくつかの実施形態では、製剤は、約 2 mM ~ 約 7 mM の範囲で二塩基性リン酸ナトリウムを含む。いくつかの実施形態では、製剤は、約 2 mM ~ 約 5 mM の範囲で二塩基性リン酸ナトリウムを含む。いくつかの実施形態では、製剤は、約 0.01% ~ 約 0.2% の範囲でポリソルベート 20 を含む。いくつかの実施形態では、製剤は、約 0.01% ~ 約 0.2% の範囲でポリソルベート 80 を含む。いくつかの実施形態では、製剤は、リン酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩基性リン酸ナトリウム、二塩基性リン酸ナトリウム、及びポリソルベート 20 を含む。いくつかの実施形態では、製剤は、約 10 mM のリン酸ナトリウム (約 7 mM の塩基性リン酸ナトリウム及び約 3 mM の二塩基性リン酸ナトリウム)、約 110 mM の塩化ナトリウム、及び約 0.1% のポリソルベート 20 を含む。

10

20

30

40

50

【0165】

いくつかの実施形態では、製剤は、生理学的な pH で製剤化される。いくつかの実施形態では、製剤は、約 5.5 ~ 約 7.5 の範囲の pH で製剤化される。いくつかの実施形態では、製剤は、約 6.0 ~ 約 7.0 の範囲の pH で製剤化される。いくつかの実施形態では、製剤は、約 6.5 ~ 約 7.0 の範囲の pH で製剤化される。いくつかの実施形態では、より低い pH の製剤は、より高い pH の製剤と比較して改善した製剤安定性を示す。いくつかの実施形態では、pH が約 6.5 の製剤は、pH が約 7.0 の製剤と比較して改善した安定性を示す。いくつかの実施形態では、pH が約 6.0 の製剤は、pH が約 6.5 の製剤と比較して改善した安定性を示す。いくつかの実施形態では、より低い pH の製剤は、より高い pH の製剤と比較して、より高いパーセンテージのモノマーを保持する。いくつかの実施形態では、pH が約 6.5 の製剤は、pH が約 7.0 の製剤と比較して、より高いパーセンテージのモノマーを保持する。いくつかの実施形態では、pH が約 6.0 の製剤は、pH が約 6.5 の製剤と比較して、より高いパーセンテージのモノマーを保持する。

【0166】

製剤中の治療剤のタンパク質濃度は、投与温度においてマトリックスの形成を促進するように調整される。例えば、より高いタンパク質濃度は、マトリックスの形成を促進するのに役立つ、またこの目的に必要なとされるタンパク質濃度は、使用される ELP シリーズに応じて変化する。例えば、ELP 1 - 120、又は匹敵する転移温度を有するアミノ酸配列を使用する複数の実施形態では、タンパク質は、約 1 mg/mL ~ 約 200 mg/mL の範囲で存在する、又は約 30 mg/mL ~ 約 150 mg/mL の範囲で存在する。ELP 4 - 120、又は匹敵する転移温度を有するアミノ酸配列を使用する複数の実施形態では、タンパク質は、約 0.005 mg/mL ~ 約 10 mg/mL の範囲で存在する、又は約 0.01 mg/mL ~ 約 5 mg/mL の範囲で存在する。

【0167】

いくつかの実施形態では、治療剤は、約 0.5 mg/mL ~ 約 200 mg/mL の範囲で存在し得る、又は約 30 mg/mL ~ 約 150 mg/mL の範囲で存在する。いくつかの実施形態では、治療剤は、約 50 mg/mL ~ 約 125 mg/mL の範囲、又は約 75 mg/mL ~ 約 110 mg/mL の範囲で存在する。いくつかの実施形態では、治療剤は、約 100 mg/mL の濃度で存在する。

【0168】

いくつかの態様では、本開示は、本明細書に開示する活性薬剤の持続放出型投薬計画を送達する方法を提供する。該方法は、本明細書に記載する医薬組成物を、必要とする対象に投与することを含み、該医薬組成物は、1ヶ月当たり約1～約8回投与される。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、1ヶ月当たり約1回、約2回、約3回、及び/又は約4回投与される。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、1週間に1回投与される。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、1日に1回投与される。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、1週間に1～3回投与される。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、2週間毎に1回投与される。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、1ヶ月に1～2回投与される。特定の実施形態では、医薬組成物は、1ヶ月当たり約1回投与される。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、2ヶ月毎に約1回、3ヶ月毎に約1回、4ヶ月毎に約1回、5ヶ月毎に約1回、及び/又は6ヶ月毎に約1回投与される。医薬組成物は、1週間当たり1回、1週間当たり2回、又は1ヶ月当たり1～8回投与するための事前充填されたペン又はシリンジの形態で包装され得る、或いは従来型のバイアル等に充填され得る。

10

【0169】

いくつかの実施形態では、製剤は、ほぼ1ヶ月に1回投与され、そして皮下又は筋肉内に投与され得る。いくつかの実施形態では、製剤は、ほぼ1週間に1回投与され、そして皮下又は筋肉内に投与され得る。いくつかの実施形態では、投与部位は、病理学的部位ではない、例えば、意図した作用部位ではない。

20

【0170】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示する医薬組成物は、長期的に投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に開示の医薬組成物は、約6ヶ月間、約7ヶ月間、約8ヶ月間、約9ヶ月間、約10ヶ月間、約11ヶ月間、約1年間、約2年間、約3年間、約4年間、約5年間、約10年間、又はそれ超の期間投与される。医薬組成物は、本明細書に開示する任意の必要とされる用量及び/又は頻度で投与され得る。

【0171】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示する医薬組成物は、疾患又は障害の症状が改善するまで投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に開示する医薬組成物は、疾患又は障害の症状が良化、遅延、及び/又は治癒するまで投与される。

30

【0172】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示する医薬組成物は、患者が1つ又は複数の疾患又は障害の症状を示し始める前に投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に開示する医薬組成物は、疾患又は障害の症状が発現したときに投与される。

【0173】

治療剤は、薬剤が病理学的部位又は作用部位に対して局所的に送達されないことを意味する「全身送達」用として一般的に製剤化される。むしろ、薬剤は注射部位から血流中に吸収され、その血流中で薬剤は全身的に作用する、又は循環により作用部位に輸送される。治療剤は、任意の公知の経路により、例えば経口、静脈内、筋肉内、鼻腔、皮下、腔内、及び直腸内等により投与され得る。いくつかの実施形態では、製剤は、一般的に皮下投与用である。いくつかの実施形態では、薬剤が皮下に投与されると、薬物動態(PK)パラメーターは延長する。いくつかの実施形態では、融合タンパク質の半減期は延長している。いくつかの実施形態では、薬剤が皮下に投与されると、その他の手段により(例えば、静脈内に)投与される薬剤と比較して、PKパラメーターは延長する。いくつかの実施形態では、薬剤が皮下に投与されると、その他の手段により(例えば、静脈内に)投与される薬剤と比較して、薬剤のデポは延長する。注射部位からの低速吸収を提供することにより、腎クリアランス及び分解が制御可能となり、これにより所望のPKプロファイルが実現する。

40

【0174】

有利には、組成物は、活性薬剤の持続放出に起因する延長した薬物動態曝露を提供する。特別な態様では、最大曝露レベルは、投与後約10時間、約24時間、約48時間、又

50

は約72時間において達成され得る；一般的には、最大曝露レベルは、投与後約10時間～約48時間の間に達成される。最大曝露レベルが達成された後、組成物は持続性の放出速度を実現し得るが、それによって最大レベルの相当なパーセンテージがある期間得られる。例えば、持続率は、最大曝露レベルの約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、又は約100%であり得る。持続率が維持される代表的な期間は、最大曝露レベルが達成された後、約3日間、約4日間、約5日間、約6日間、約1週間、約2週間、約4週間、約6週間、又は約8週間である。その後、持続率は、低曝露率まで低下し得る。そのような低曝露率は、最大曝露レベルの約5%、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、又は約60%であり得る。例えば、1つの実施形態では(PE0256)、最大曝露レベル1000ng/mLが、約1～2日のうちに得られる。この期間後、最大曝露レベルの約70～100%の持続率がおよそ10～12日目までに維持され、その後、約60%から約10%に減少した低下曝露率が、残りの試験期間について得られる。

10

20

30

40

50

【0175】

様々な実施形態では、活性薬剤の血漿濃度は、複数回、例えば少なくとも2回、少なくとも約5回、又は少なくとも約10回等の製剤投与を経ても、約20倍、又は約10倍、又は約5倍、又は約3倍を超えて変化しない。いくつかの実施形態では、活性薬剤の血漿濃度は、各投与間で、約20倍、又は約10倍、又は約5倍、又は約3倍を超えて変化しない。いくつかの実施形態では、定常状態に達するまで(例えば、約3～約4回の投与後)、若干の蓄積が生ずる。投与は、実質的に均等間隔、例えば、1日約1回、又は1週間当たり約1回、又は1ヶ月当たり1～約5回、又は2ヶ月毎に約1回、又は3ヶ月毎に約1回等である。その他の実施形態では、用量は、数回の投与において着実に増加し得るが、そうすると5回又はそれ超の投与後には、定常状態に達する。

【0176】

本明細書に開示の医薬組成物は、非融合又は非コンジュゲート型のカウンターパートよりも少ない用量及び/又は少ない頻度で投与され得る。当業者は、いずれの場合にも望ましい用量を決定することができるが、治療ベネフィットを達成するための治療剤の適する用量は、例えば、1用量につき、レシピエントの体重1キログラム当たり約1マイクログラム(μg)～約100ミリグラム(mg)の範囲、好ましくは1用量につき、体重1キログラム当たり約10 μg ～約50 mg の範囲、及び最も好ましくは1用量につき、体重1キログラム当たり約10 μg ～約50 mg の範囲であり得る。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、低用量で投与される。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、1用量につき、体重1キログラム当たり1 mg ～1用量につき、体重1キログラム当たり約9 mg の間の用量で投与される。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、1用量につき、体重1キログラム当たり約1 mg 、1用量につき、体重1キログラム当たり約3 mg 、及び/又は1用量につき、体重1キログラム当たり約9 mg で投与される。望ましい用量は、1日を通じて1回の用量、又はしかるべき間隔で投与される2回若しくはそれ超のサブ用量として提供され得る。このようなサブ用量は、例えば、1単位剤形当たり、有効成分約10 μg ～約1000 mg 、好ましくは約50 μg ～約500 mg 、及び最も好ましくは約50 μg ～約250 mg を含有する単位剤形で投与され得る。或いは、レシピエントの状態が必要とする場合には、用量は連続輸液として投与され得る。

【0177】

特定の実施形態では、対象はヒトであるが、その他の実施形態では、ヒト以外の哺乳動物、例えば飼育慣らされたペット(例えば、イヌ若しくはネコ)、又は家畜若しくは農耕動物(例えば、ウマ、ウシ、ヒツジ、又はブタ)等であり得る。

【0178】

単数形、例えば「a」、「an」、及び「the」等が本出願全体を通じて便宜上使用されるが、但し、文脈又は明示的記述が別途示唆する場合を除き、単数形は複数形も含むように意図されているものと理解すべきである。すべての数値範囲は、該数値範囲内の数値の点それぞれをすべて含むと理解されるべきであり、また各数値の点を個々にすべて列

挙するものと解釈されるべきである。同一の成分又は特性に関する全範囲の端部の点も含まれ、そして独立に組み合わせ可能であるように意図される。

【0179】

用語「約」は、引用された数値表示と関連して使用される場合、引用された数値表示 ± 引用された数値表示の最大10%を意味する。例えば、「約50」という言語は、45～55の範囲をカバーする。

【0180】

本明細書で使用する場合、単語「～を含む (include)」とその変化形は非限定的であり、すなわちリスト内に各事項を列挙したからといって、この技術の物質、組成物、デバイス、及び方法においてもやはり有用であり得るその他の類似した事項を除外することに当たらないように意図されている。同様に、用語「～することが可能である (can)」及び「～することができる (may)」、並びにその変化形も非限定的であり、すなわち実施形態が特定の要素又は特性を含むことが可能である、又は含むことができるという記述は、そのような要素又は特性を含まない本技術のその他の実施形態が除外されないように意図されている。非制限的用语「～を含むこと (comprising)」は、例えば、～を含むこと (including)、～を含有すること (containing)、又は～を有すること (having) 等の用語の類義語として、本開示を記載及び主張するために本明細書において使用されるが、本技術又はその実施形態は、より制限的用语、例えば列挙した配合物「からなる」又は「から本質的になる」等を使用して代替的に記載される場合もある。

10

20

【0181】

本明細書で使用する場合、「半減期」(一般的に、in vivoでの半減期又は循環半減期を意味する)は、活性薬剤の生物活性が50%消失するのに必要とされる期間である。いくつかの実施形態では、この用語は、延長した曝露及び長期半減期の両方(例えば、非コンジュゲート型ペプチドと比較して、それより低速化した注射部位からの取り込み及び排出遅延の両方)を含む。

【0182】

別途規定しない限り、本明細書内のすべての技術的及び科学的用語は、本開示が属する当業者により一般的に理解される意味と同一の意味を有する。本明細書に記載する方法及び物質と類似する又は同等の任意の方法及び物質が、本開示の実践又は試験において利用可能であるが、好ましい方法及び物質が本明細書に記載されている。

30

【0183】

別途規定しない限り、本明細書内のすべての技術的及び科学的用語は、本開示が属する当業者により一般的に理解される意味と同一の意味を有する。本明細書に記載する方法及び物質と類似する又は同等の任意の方法及び物質が、本開示の実践又は試験において利用可能であるが、好ましい方法及び物質が本明細書に記載されている。

【0184】

本開示は、下記の非限定的な実施例により更に説明される。

【実施例】

【0185】

40

[実施例1]

CNP ELP 構築物の調製

CNP配列の37個のアミノ酸からなるバージョンをエンコードするDNAを合成し、制限酵素BglI/EcoRIで消化し、次にプラスミドpPE0003にサブクローン化してプラスミドpPE0493を提供し、CNP配列をELP1-120配列のC末端に配置した。

【0186】

CNP配列の37個のアミノ酸からなるバージョンをエンコードするDNAを合成し、制限酵素XbaI及びBsrGIで消化し、次にXbaI及びAcc65Iで切断したプラスミドpPE0003にサブクローン化してプラスミドpPE0531を提供し、CN

50

P配列をELP1-120配列のN末端に配置した。

【0187】

CNP配列の37個のアミノ酸からなるバージョンをエンコードするDNAを、グリシン及びセリン反復リンカー(Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Ser)を含めて合成した。これを、制限酵素XbaI及びBsrGIで消化し、次にXbaI及びAcc65Iで切断したプラスミドpPE0003にサブクローン化してプラスミドpPE0552を提供し、CNP配列をELP1-120配列のN末端に配置し、両配列の間にリンカーを配置した。

【0188】

CNP配列の22個のアミノ酸からなるバージョンをエンコードするDNAを合成し、制限酵素BglI及びEcoRIで消化し、次にプラスミドpPE0003にサブクローン化してプラスミドpPE0514を提供し、CNP配列をELP1-120配列のC末端に配置した。

10

【0189】

CNP配列の22個のアミノ酸からなるバージョンをエンコードするDNAを合成し、制限酵素XbaI及びBsrGIで消化し、次にXbaI及びAcc65Iで切断したプラスミドpPE0003にサブクローン化してプラスミドpPE0550を提供し、CNP配列をELP1-120配列のN末端に配置した。

【0190】

CNP配列の22個のアミノ酸からなるバージョンをエンコードするDNAを、グリシン及びセリン反復リンカー(Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Ser)を含めて合成した。これを制限酵素XbaI及びBsrGIで消化し、次にXbaI及びAcc65Iで切断したプラスミドpPE0003にサブクローン化してプラスミドpPE0565を提供し、CNP配列をELP1-120配列のN末端に配置し、両配列の間にリンカーを配置した。

20

【0191】

[実施例2]

CNP構築物の効力決定

実施例1に記載の精製されたCNP構築物の効力を、B型ナトリウム利尿受容体(NPRB)を発現する一次子宮線維芽細胞、及びcGMP蛍光アッセイキット(CatchPoint、Molecular Devices社、Sunnyvale、CA)を利用して実証した。受容体が活性化したとき、細胞内でcGMPの生成を引き起こす。この細胞を溶解し、そしてcGMPの量をcGMPの競合イムノアッセイ法により検出する。各サンプル中のcGMPは、抗cGMP抗体上の結合部位に対してホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)標識cGMPコンジュゲートと競合する。cGMPが存在しない場合、ほとんどのコンジュゲートは、抗体に結合する。cGMPの濃度を増加させると、結合したコンジュゲートの量は競合的に減少し、HRP活性測定値も減少する。

30

【0192】

アッセイ前日に、一次子宮線維芽細胞を、96ウェル組織培養プレート上に播種し、そして37、5%のCO₂中、オーバーナイトでインキュベートした。翌日、CNP構築物の連続希釈物を、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水(DPBS)中で調製した。細胞をクレブス-リンガー炭酸水素バッファー(KRB)でリンスし、次にcGMPの分解を防止するために、2mMの3-イソブチル-1-メチルキサンチン(IBMx)を含むKRBを用いて、室温で10分間インキュベートした。サンプルの連続希釈物を、次にプレートに重複して添加し、そして該プレートを37、5%のCO₂中で40分間インキュベートした。細胞溶解バッファーを、次に各ウェルに添加して細胞を溶解し、そしてcGMPを放出させた。このサンプルを、次にcGMPアッセイプレートに移した。抗cGMP抗体及びHRP-cGMPの両方をアッセイプレートに添加し、そして室温で2時間インキュベートした。プレートを、次にcGMP洗浄バッファーで洗浄した。洗浄後、ストップライトレッドサブストレート(stoplight red substrate)を

40

50

各ウェルに添加し、そしてプレートを室温で1時間インキュベートした。プレートを、次に530nmでの励起、590nmでの発光、及び570nmでのカットオフにより、蛍光プレートリーダー上で読み取った。

【0193】

融合タンパク質のN末端にCNPを配置した構築物は、C末端にCNPを配置した構築物よりも強力であった。最も強力な構築物はPE0552であり、その効力はCNPペプチドの約1/30であった。図1A~Bを参照。

【0194】

PE0552構築物を、通常のマウス(系統FVB/nj)の皮下に1週間当たり3回、最長5週間注射した。マウスは、実験開始時において3~5週齢であった。マウスの線形成長に対する効果を、通常の生理食塩水を注射した対照群との比較において、尾部の長さ、鼻部から肛門までの長さ、及び鼻部から尾部までの長さを各週の投与後に測定することにより決定した。図2A~Cは、両用量レベルのPE0552は、いずれもより迅速な線形成長を引き起したことを示す。

10

【0195】

[実施例3]

プロテアーゼ切断可能なCNP ELP構築物の調製

CNP配列の37個のアミノ酸からなるバージョン、及び5つの異なるプロテアーゼ切断部位のうちの一つを含有する5つの異なる遺伝子をそれぞれ合成した(表4)。

20

【0196】

【表4】

プロテアーゼ	切断部位	構築物	配列番号
第Xa因子	Ile-Glu-Gly-Arg/	PE9206	121 & 122
トロンビン	Leu-Val-Pro-Arg / Gly-Ser	PE9216	123 & 124
カテプシンK部位1	Arg-Lys-Pro-Arg / Gly	PE9306	125 & 126
カテプシンK部位2	Arg-Lys-Leu-Arg / Gly	PE9316	127 & 128
マトリックスメタロプロテアーゼコンセンサス	Pro-Leu-Gly / Leu-Trp-Ala-Gly	PE9326	129 & 130

30

【0197】

各遺伝子配列を制限酵素XbaI / BsrGIで消化し、次にXbaI / Acc65iで消化したpPE0003プラスミドにサブクローン化して、プラスミドpPE9206、pPE9216、pPE9306、pPE9316、及びpPE9326を提供した。このような融合では、CNP配列がELP1-120配列のN末端に配置され、両配列の間にある異なるプロテアーゼ感受性部位が切断可能となり、CNP配列をin vivoで放出する。

40

【0198】

実施例3に記載の精製されたCNP構築物の効力を、実施例2に記載するように、B型ナトリウム利尿受容体(NPRB)を発現する一次子宮線維芽細胞を利用して実証した。プロテアーゼ感受性CNP ELP構築物を事前処理すると、CNP部分の遊離に起因して、未処理構築物と比較して効力が高まった。

【0199】

上記構築物を、通常のマウス(系統FVB/nj)に1日1回、3週間注射した。マウスは、実験開始時において3週齢であった。マウスの線形成長に対する効果を、通常の生理食塩水を注射した対照群との比較において、尾部の長さ、鼻部から肛門までの長さ、及

50

び鼻部から尾部までの長さを、各週の投与後に測定することにより決定した。図3A～Cは、PE9306のみが、より迅速な線形成長を引き起したことを示す。体重に対する有意な効果は認められなかった。

【0200】

カテプシンK切断部位リンカーを介してELP1-120とN末端側で結び付いたCNP53 (PE9446; 配列番号111及び112)、カテプシンK切断部位リンカーを介してELP1-120とN末端側で結び付いたCNP22 (PE9456; 配列番号113及び114)、カテプシンK切断部位リンカーを介してELP1-120とC末端側で結び付いたCNP37 (PE9486; 配列番号115及び116)、カテプシンK切断部位リンカーを介してELP1-120とC末端側で結び付いたCNP53 (PE9496; 配列番号117及び118)、及びカテプシンK切断部位リンカーを介してELP1-120とC末端側で結び付いたCNP22 (PE9506; 配列番号119及び120)を含む追加の代表的構築物を作製した。

10

【0201】

[実施例4]

GLP-2 ELP構築物の調製

GLP-2配列をエンコードするDNAを、DPP-IV抵抗性を高めるためにA2G突然変異を組み込んで合成した。これを制限酵素XbaI及びBsrGIで消化し、次にXbaI及びAcc65Iで切断したプラスミドpPE0003にサブクローン化して、プラスミドpPE0503を提供した。この融合では、GLP-2配列がELP1-120配列のN末端に配置される。

20

【0202】

精製されたPE0503タンパク質を、細胞ベースのcAMP効力アッセイで分析し、そしてGLP-2ペプチドの0.24nMと比較して、1.75nMのEC₅₀を有することが明らかとなった。

【0203】

[実施例5]

GLP-2 ELP構築物のin vivoでの評価

表5に示すように、雄スプレーグドローラット(200～220g、n=12/群)に、PE0503又はGLP-2(A2G)ペプチドを、11日間投与期間において皮下注射した。

30

【0204】

【表 5】

表 5

化合物	投与頻度	投与日	投与量 (mg/kg/投与)	投与量 (nmol/kg/投与)
生理食塩水	1日1回	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11	非該当	非該当
PE0503	1日1回	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11	1.3	25
PE0503	2日1回	1, 3, 5, 7, 9, 11	5.1	100
PE0503	4日1回	1, 5, 9	20.5	400
GLP-1 (A2G)	1日2回	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11	0.1	25

10

20

【0205】

12日目に動物を絶命させ、そして正中線切開を行い、小腸を取り出し、その最大の長さまで伸ばして測定した。次に、糞便物を管腔からフラッシュし、そして小腸の重量を記録した。図4は、PE0503により処置すると、4日毎に投与(Q4D)したとしても、プラセボと比較して小腸重量のきわめて有意な増加を引き起したことを示す。小腸切片の組織学的分析は、GLP-2受容体作動薬について期待される通りに、媒体(生理食塩水)と比較して絨毛高の明確な増加を示した。ヒトでは半減期が有意により長いので、PE0503は、ヒトを対象としたとき、1週間当たり1回以下の投与に適することがデータから確認される。

30

【0206】

[実施例6]

FGF21 ELP構築物の調製

FGF21遺伝子配列を合成し、制限酵素BglI/EcoRIで消化し、次にプラスミドpPE0003にサブクローン化してプラスミドpPE9183(配列番号131及び132)を提供し、FGF21配列をELP1-120配列のC末端に配置した。

【0207】

FGF21遺伝子配列を合成し、制限酵素BglI/EcoRIで消化し、次にプラスミドpPB1023にサブクローン化してプラスミドpPE9193(配列番号133及び134)を提供し、FGF21配列をELP1-120配列のC末端に配置した。こうして、ELPポリマーの一方の端部にGLP-1及び他方の端部にFGF21を有するデュアル作動薬が形成される

40

【0208】

参照による組み込み

本明細書で参照するすべての特許及び公開資料は、下記で開示する公開資料を含め、本明細書により参照としてその全体が組み込まれる。

【0209】

本明細書で議論される公開資料は、本出願の出願日前にそれらを開示することを目的としてもっぱら提供される。本明細書内のいずれも、開示が先行するからといって、それを理由に先行する日付のそのような公開資料に対して本開示が権利を主張できないとする承認とは解釈されない。

50

【0210】

本出願は、下記の公開資料及び出願、すなわち米国特許第2001/0034050 A1号；米国特許第2009/0220455号；米国特許第8,334,257号；米国特許第2013/0310538号；米国特許第2013/0172274号；米国特許第2011/0236384号；米国特許第6,582,926号；米国特許第7,429,458号；米国特許第7,364,859号；米国特許第8,178,495号；米国特許第2013/0079277号；米国特許第2013/0085099号；米国特許第2013/0143802号；米国特許第2014/0024600号；米国特許第2011/0178017号；米国特許第7,709,227号；米国特許第2011/0123487号；米国特許第8,729,018号；米国特許第2014/0171370号；米国特許第2013/0150291号；国際公開第/2014/113434号；米国特許第2014/0213516号、PCT/US2015/061955号；及び米国仮特許出願第62/113,943号、同第62/145,770号、及び同第62/150,679号を、目的の如何を問わず引用することによりその全体を援用する。

【0211】

[参考文献]

【表 6 A】

REFERENCES

Amarante-Mendes and Griffith. Therapeutic applications of TRAIL receptor agonists in cancer and beyond. *Pharm. & Thera.* 155: 117-131 (2015).

Anker et al. Ularitide for the treatment of acute decompensated heart failure: from preclinical to clinical studies. *European Heart J.* 36: 715-723 (2015).

Barnes et al. Sustained Cardiovascular Actions of APJ Agonism During Renin-Angiotensin System Activation and in Patients with Heart Failure. *Circ Heart Fail.* 6:482-491 (2013).

Brame et al. Design, Characterization, and First-In-Human Study of the Vascular Actions of a Novel Biased Apelin Receptor Agonist. *Hypertension* 65:834-840 (2015).

Bukulmez et al. Protective Effects of C-Type natriuretic Peptide on Linear Growth and Articular Cartilage Integrity in a Mouse Model of Inflammatory Arthritis. *Arthritis & Rheum.* 66(1):78-89 (2014).

Calabria et al. GLP-1 Receptor Antagonist Exendin-(9-39) Elevates Fasting Blood Glucose Levels in Congenital Hyperinsulinism Owing to Inactivating Mutations in the ATP-Sensitive K⁺ Channel. *Diabetes* 61:2585-2591 (2012).

Chou et al. Substrate Profiling of Cysteine Proteases Using a Combinatorial Peptide Library Identifies Functionally Unique Specificities. *J. Biol. Chem.* **281**, 12824-12832 (2006)

Chua et al. Small cyclic agonists of iron regulatory hormone hepcidin. *Bioorg. & Med. Chem. Ltr.* 25:4961-4969 (2015).

Dalzell et al. The Emerging Potential of the Apelin-APJ System in Heart Failure. *J. Card. Fail.* 21:489-498 (2015).

De Leon et al. Exendin-(9-39) Corrects Fasting Hypoglycemia in *SUR-1*^{-/-} Mice by Lowering cAMP in Pancreatic β-cells and Inhibiting Insulin Secretion. *J. Biol. Chem.* 283:25786-25793 (2008).

Folino et al. Effects of apelin on the cardiovascular system. *Heart Fail Rev.* 20:505-518 (2015).

Gaich et al. The Effects of LY2405319, an FGF21 Analog, in Obese Human Subjects with Type 2 Diabetes. *Cell Metabolism* 18, 333-340 (2013).

Gimeno and Moller FGF21-based pharmacotherapy – potential utility for metabolic disorders. *Trends Endocrinol. Metab.* 25, 303-311 (2014).

10

20

30

40

【表 6 B】

Hecht *et al.* Rationale-Based Engineering of a Potent Long-Acting FGF21 Analog for the Treatment of Type 2 Diabetes. *PLOS One*, 7(11): e49345 (2012).

Jia *et al.* Cardiovascular effects of a PEGylated apelin. *Peptides* 38:181-188 (2012).

Kharitononkov *et al.* FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J. Clin. Invest.* 115; 1627-1635 (2005).

Kharitononkov *et al.* The metabolic state of diabetic monkeys is regulated by fibroblast growth factor-21. *Endocrinol.* 48:774-781 (2007).

Kharitononkov *et al.* Rational Design of a Fibroblast Growth Factor 21-Based Clinical Candidate, LY2405319. *PLOS One*, 8, e58575 (2013).

Lemke *et al.* Getting TRAIL back on track for cancer therapy. *Cell Death & Diff.* 21:1350-1364 (2014).

Long and Kharitononkov Hormone-like fibroblast growth factors and metabolic regulation. *Biochim. Biophys. Acta* 1812:791-795 (2011).

Lord and De Leon. Monogenic hyperinsulinemic hypoglycemia: current insights into the pathogenesis and management. *Int. J. Ped. Endocrin.* 2013:3 (2013).

Lorget *et al.* Evaluation of the Therapeutic potential of a CNP analog in a *Fgfr3* mouse model recapitulating achondroplasia. *Am. J. Hum. Genet.* 91:1108-1114 (2012).

Mitrovic *et al.* Effects of the renal natriuretic peptide urodilatin (ularitide) in patients with decompensated chronic heart failure: A double-blind, placebo-controlled, ascending-dose trial. *Am. Heart J.* 150:1239.e1-1239.e8 (2005).

Ogawa *et al.* BetaKlotho is required for metabolic activity of fibroblast growth factor 21. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:7432-7437 (2007).

Oh *et al.* Systemic PEGylated TRAIL treatment ameliorates liver cirrhosis in rats by eliminating activated hepatic stellate cells. *Hepatology*. Dec 28. doi: 10.1002/hep.28432 (2015).

Peake *et al.* C-type natriuretic peptide signalling drives homeostatic effects in human chondrocytes. *Biochem. & Biophys. Res. Comm.* 465:784-789 (2015).

Preza *et al.* Minihepcidins are rationally designed small peptides that mimic hepcidin activity in mice and may be useful for the treatment of iron overload. *J. Clin. Invest.* 121:4880-4888 (2011).

10

20

30

40

【表 6 C】

Rochette et al. The iron-regulatory hormone hepcidin: A possible therapeutic target? *Pharm. & Ther.* 146:35-52 (2015).

Ruchala and Nemeth. The pathophysiology and pharmacology of hepcidin. *Trends in Pharm. Sci.* 35:155-161. (2014).

Salehi et al. Blockade of glucagon-like Peptide 1 receptor corrects postprandial hypoglycemia after gastric bypass. *Gastroenterology* 146:669-680 (2014).

10

Suzuki *et al.* betaKlotho is required for fibroblast growth factor (FGF) 21 signaling through FGF receptor (FGFR) 1c and FGFR3c. *Mol. Endocrinol.* 22:1006-1014 (2008).

Wendt et al. Neutral Endopeptidase-Resistant C-Type Natriuretic Peptide Variant Represents a New Therapeutic Approach for Treatment of Fibroblast Growth Factor Receptor 3-Related Dwarfism. *J. Pharm. & Exp. Therap.* 353:132-149 (2015).

Yang et al. Apelin, Elabela/Toddler, and biased agonists as novel therapeutic agents in the cardiovascular system. *Trends Pharm. Sci.* 36:560-567 (2015).

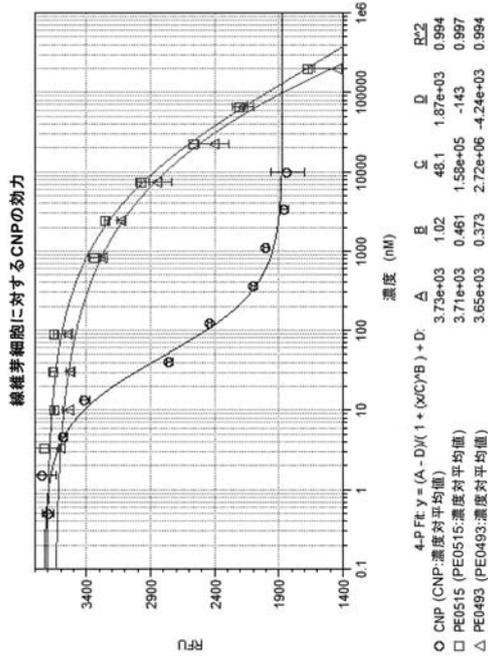
20

Yasoda et al. Systemic Administration of C-Type natriuretic Peptide as a Novel Therapeutic Strategy for Skeletal Dysplasias. *Endocrinology.* 150(7):3138-3144 (2009).

Yorifuji, Tohru. Congenital hyperinsulinism: current status and future perspectives. *Ann Pediatr Endocrinol Metab.* 19:57-68 (2014).

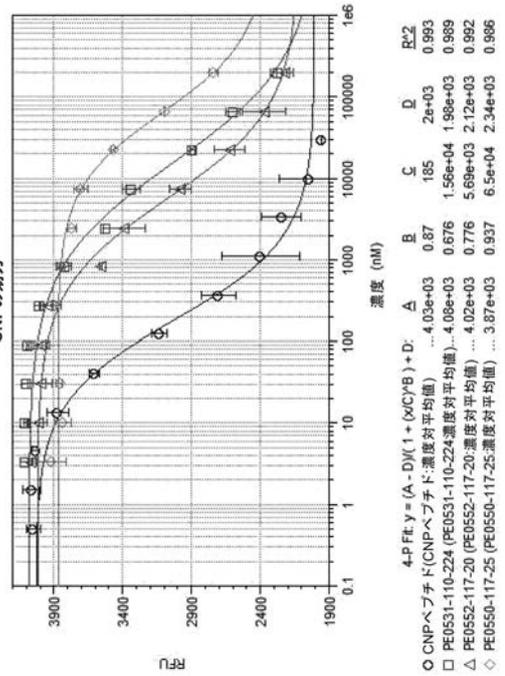
【 図 1 A 】

FIG. 1A CNP構築物の効力



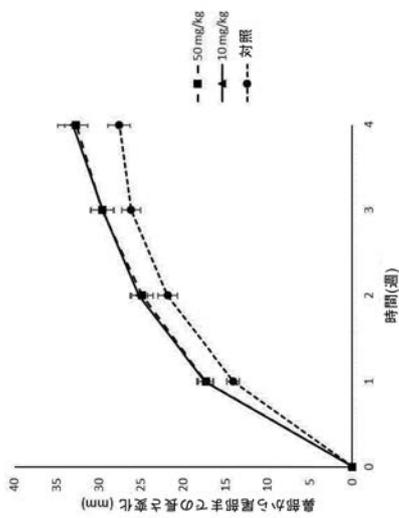
【 図 1 B 】

FIG. 1B CNPの効力



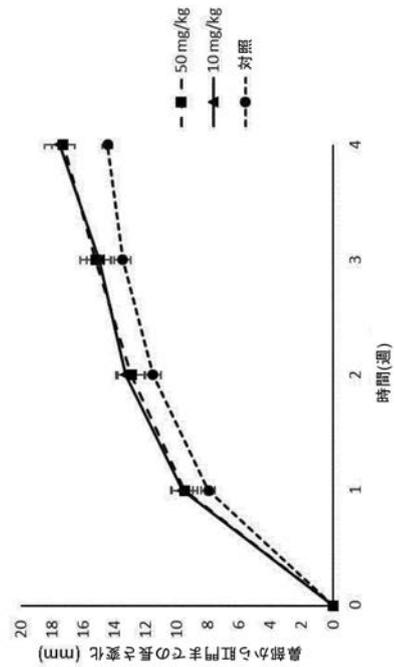
【 図 2 A 】

FIG. 2A



【 図 2 B 】

FIG. 2B



【 図 2 C 】

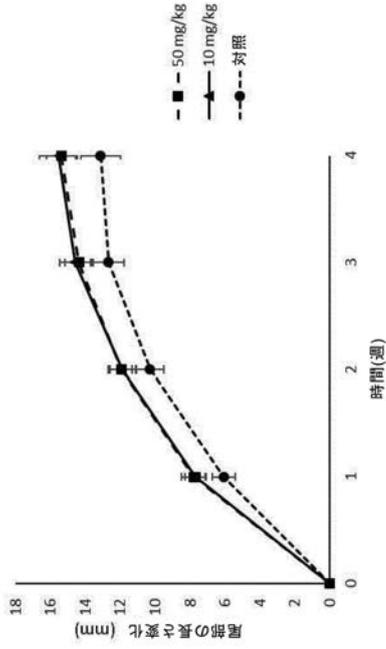


FIG. 2C

【 図 3 A 】

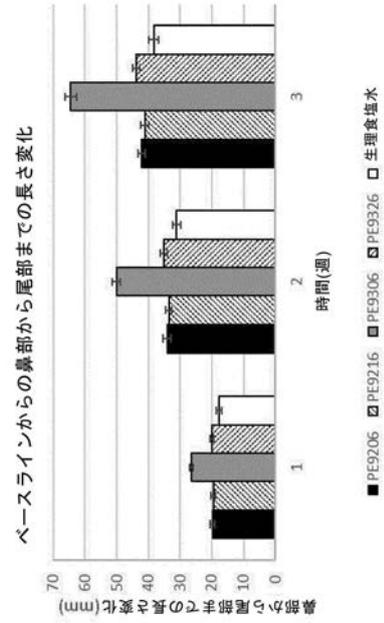


Fig. 3A

【 図 3 B 】

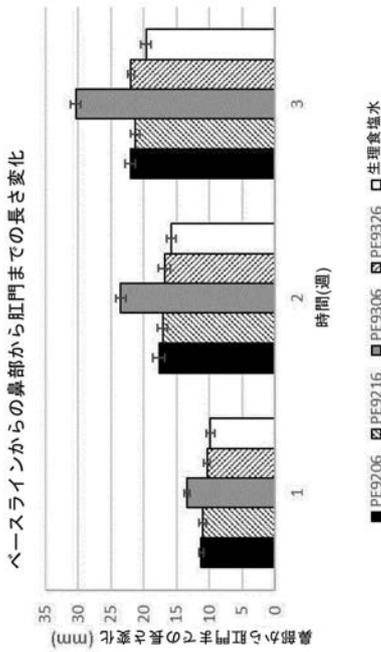


Fig. 3B

【 図 3 C 】

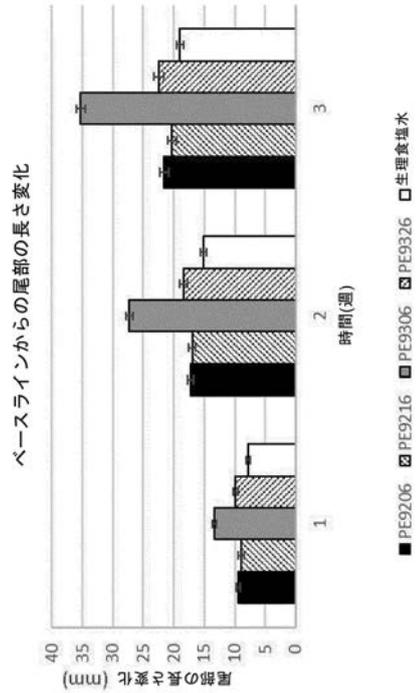
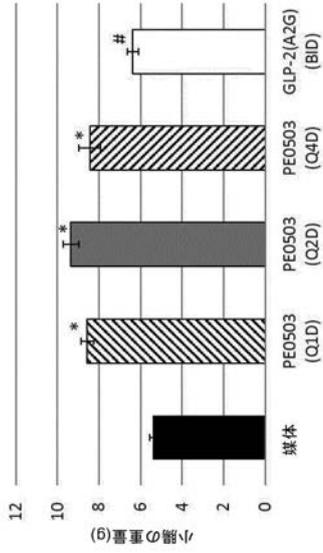


Fig. 3C

【 図 4 】

Figure 4. 正常ラットにおけるPE0503の小腸重量に及ぼす効果



* = 媒体と有意に異なり、t検定により $p < 0.0001$ であり、また GLP-2(A2G) と有意に異なり、 $p < 0.005$ である。
 # = 媒体と有意に異なり、t検定により $p < 0.005$ である。

【 配 列 表 】

2019514949000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2017/030403

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 9/22; A61K 38/00; A61K 47/42 (2017.01) CPC - A61K 38/00; A61K 38/26; A61K 47/48292 (2017.08)		
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) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 424/457; 514/1.1; 514/11.7 (keyword delimited)		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2015/0290328 A1 (PHASEBIO PHARMACEUTICALS, INC.) 15 October 2015 (15.10.2015) entire document	1-8, 10, 11, 15, 16, 32-36, 38-41, 101, 104, 106, 140, 141
-		
Y		9, 12, 17, 42, 60-67, 69-72, 74-79, 81, 82, 85-95, 102, 103, 105, 110-113, 116-119, 123-125, 129-131, 134-136
Y	US 5,428,014 A (LABROO et al) 27 June 1995 (27.06.1995) entire document	9, 12
Y	WALKER et al. "Cell Penetrating Peptides Fused to a Thermally Targeted Biopolymer Drug Carrier Improve the Delivery and Antitumor Efficacy of an Acid-sensitive Doxorubicin Derivative," Int J Pharm, 15 October 2012 (15.10.2012), Vol. 436, Pgs. 825-832. entire document	9, 12
Y	US 2011/0039776 A1 (CHILKOTI) 17 February 2011 (17.02.2011) entire document	17, 42, 69-72, 75, 76, 102, 103, 111, 112, 118, 119, 123-125, 130, 131, 135, 136
Y	WO 2004/081198 A2 (THE ARIZONA BOARD OF REGENTS ON BEHALF OF THE UNIVERSITY OF ARIZONA et al) 23 September 2004 (23.09.2004) entire document	60-67
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 23 August 2017		Date of mailing of the international search report 22 SEP 2017
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US2017/030403
--

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2005/023863 A1 (AVENTIS PHARMA DEUTSCHLAND GMBH et al) 17 March 2005 (17.03.2005) entire document	65, 67
Y	US 2011/0245592 A1 (SCHOOLCRAFT et al) 06 October 2011 (06.10.2011) entire document	72
Y	US 2014/0187746 A1 (THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN THE CITY OF NEW YORK) 03 July 2014 (03.07.2014) entire document	74-79, 81, 82
Y	WO 2000/053755 A2 (GENENTECH, INC. et al) 14 September 2000 (14.09.2000) entire document	77
Y	WO 2009/067639 A2 (BIOMARIN PHARMACEUTICAL INC. et al) 28 May 2009 (28.05.2009) entire document	78, 79
Y	US 2010/0316623 A1 (TURNER et al) 16 December 2010 (16.12.2010) entire document	81, 82
Y	US 2015/0005233 A1 (SENEB BIOSCIENCES, INC.) 01 January 2015 (01.01.2015) entire document	85-95
Y	WO 2009/099783 A1 (INDIANA UNIVERSITY RESEARCH AND TECHNOLOGY CORPORATION et al) 13 August 2009 (13.08.2009) entire document	87, 88
Y	US 2011/0245173 A1 (BACHOVCHIN et al) 06 October 2011 (06.10.2011) entire document	89
Y	WO 2000/066142 A2 (BIONEBRASKA, INC.) 09 November 2000 (09.11.2000) entire document	90
Y	WO 2012/006598 A2 (DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC. et al) 12 January 2012 (12.01.2012) entire document	91, 92
Y	CN 102703459 A (CHINA AGRICULTURAL UNIVERSITY) 03 October 2012 (03.10.2012) entire document; see machine translation	93-95
Y	WO 1998/024813 A2 (AMGEN INC. et al) 11 June 1998 (11.06.1998) entire document	105
Y	US 2006/0019339 A1 (LAUTH et al) 26 January 2006 (26.01.2006) entire document	110-113
Y	US 2011/0020342 A1 (GLASS et al) 27 January 2011 (27.01.2011) entire document	116-119
Y	US 2004/0220111 A1 (KLEINMAN et al) 04 November 2004 (04.11.2004) entire document	129-131
Y	US 2012/0018033 A1 (DEGTEREV et al) 19 January 2012 (19.01.2012) entire document	134-136

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2017/030403

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, 18-31, 37, 43-59, 100
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)	
A 6 1 P	3/04	(2006.01)	A 6 1 P	3/04	
A 6 1 P	3/06	(2006.01)	A 6 1 P	3/06	
A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 P	1/16	
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	1/04	
A 6 1 P	1/12	(2006.01)	A 6 1 P	1/12	
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	9/08	(2006.01)	A 6 1 P	9/08	
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	19/08	(2006.01)	A 6 1 P	19/08	
A 6 1 P	13/02	(2006.01)	A 6 1 P	13/02	
A 6 1 P	15/00	(2006.01)	A 6 1 P	15/00	
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 K	38/22	(2006.01)	A 6 1 K	38/22	
A 6 1 K	38/26	(2006.01)	A 6 1 K	38/26	
A 6 1 K	38/27	(2006.01)	A 6 1 K	38/27	
A 6 1 K	38/16	(2006.01)	A 6 1 K	38/16	
A 6 1 P	9/04	(2006.01)	A 6 1 P	9/04	
A 6 1 P	9/12	(2006.01)	A 6 1 P	9/12	
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/00	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 K	38/43	(2006.01)	A 6 1 K	38/43	
A 6 1 P	13/08	(2006.01)	A 6 1 P	13/08	
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P	13/12	
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/06	
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 1
A 6 1 P	15/10	(2006.01)	A 6 1 P	15/10	
A 6 1 P	11/06	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	1 0 1
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	11/06	
A 6 1 P	17/02	(2006.01)	A 6 1 P	25/28	
A 6 1 K	38/30	(2006.01)	A 6 1 P	17/02	
A 6 1 K	38/19	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
A 6 1 P	3/00	(2006.01)	A 6 1 K	38/30	
A 6 1 P	3/08	(2006.01)	A 6 1 K	38/19	
A 6 1 P	5/48	(2006.01)	A 6 1 P	3/00	
A 6 1 P	7/06	(2006.01)	A 6 1 P	3/08	
A 6 1 P	7/00	(2006.01)	A 6 1 P	5/48	
A 6 1 P	31/00	(2006.01)	A 6 1 P	7/06	
A 6 1 P	5/10	(2006.01)	A 6 1 P	7/00	
A 6 1 P	27/04	(2006.01)	A 6 1 P	31/00	
A 6 1 P	1/18	(2006.01)	A 6 1 P	5/10	
C 0 7 K	14/78	(2006.01)	A 6 1 P	27/04	
C 0 7 K	5/103	(2006.01)	A 6 1 P	1/18	
C 0 7 K	7/06	(2006.01)	C 0 7 K	14/78	Z N A
C 0 7 K	14/605	(2006.01)	C 0 7 K	5/103	

4H045 AA10 AA30 BA13 BA41 BA42 CA40 DA01 DA14 DA30 DA32
DA38 EA20 FA10 FA74