

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6006309号  
(P6006309)

(45) 発行日 平成28年10月12日 (2016. 10. 12)

(24) 登録日 平成28年9月16日 (2016. 9. 16)

(51) Int. Cl.	F I	
<b>C 1 2 N 15/09 (2006. 01)</b>	C 1 2 N 15/00	Z N A A
<b>C O 7 K 14/575 (2006. 01)</b>	C O 7 K 14/575	
<b>C O 7 K 19/00 (2006. 01)</b>	C O 7 K 19/00	
<b>C O 7 K 1/04 (2006. 01)</b>	C O 7 K 1/04	
<b>C 1 2 P 21/02 (2006. 01)</b>	C 1 2 P 21/02	C
請求項の数 8 (全 108 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2014-520217 (P2014-520217)  
 (86) (22) 出願日 平成24年7月3日 (2012. 7. 3)  
 (65) 公表番号 特表2014-527405 (P2014-527405A)  
 (43) 公表日 平成26年10月16日 (2014. 10. 16)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/045451  
 (87) 国際公開番号 W02013/009545  
 (87) 国際公開日 平成25年1月17日 (2013. 1. 17)  
 審査請求日 平成26年5月30日 (2014. 5. 30)  
 (31) 優先権主張番号 61/505, 982  
 (32) 優先日 平成23年7月8日 (2011. 7. 8)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 61/585, 577  
 (32) 優先日 平成24年1月11日 (2012. 1. 11)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 598133654  
 アミリン・ファーマシューティカルズ、リ  
 ミテッド・ライアビリティ・カンパニー  
 AMYLIN PHARMACEUTIC  
 ALS, LLC  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92  
 121, サンディエゴ, タウン センター  
 ドライブ 9360  
 9360 Towne Centre D  
 rive, San Diego, CA  
 92121 USA

前置審査

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 作用持続期間が増大し、免疫原性が減少した操作されたポリペプチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アルブミン結合ドメインポリペプチド (A B D) と、エキセンディン配列、エキセンディン類似体配列またはそれらの活性断片配列を含む第 1 のペプチドホルモンドメイン (H D 1) と、前記 H D 1 および前記 A B D を共有結合によって連結している第 1 のリンカー (L 1) とからなる操作されたポリペプチドであって、

前記操作されたポリペプチドは、

HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLF I EWLKQGGPSKE I I STGGGSASGSLAEAKEANAELDSYGVSDFYKRL I DKAKTVEG  
 VEALKDA I LAALP (配列番号 7 2 7) ;

HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLF I EWLKNGGPSSGAPPKSTGGGSASGSLAEAKEANAELDSYGVSDFYKRL I DKAKTV  
 EGVEALKDA I LAALP (配列番号 7 2 8) ;

HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLF I EWLKNGGPSSGAPPSTGGGSASGSLAEAKEANAELDSYGVSDFYKRL I DKAKTV  
 EGVEALKDA I LAAL (配列番号 7 2 9) ;

HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLF I EWLKNGGPSSGAPPSTGGGSASGSLAEAKEANAELDSYGVSDFYKRL I DKAKTV  
 EGVEALKDA I LAALP (配列番号 7 3 0) ;

HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLF I EWLKNGGPSSGAPPSSGSLAEAKEANAELDSYGVSDFYKRL I DKAKTVEGVEALK  
 DA I LAALP (配列番号 7 3 1) ;

HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLF I EWLKNGGPSSGAPPSTGGGSASGSLAEAKEANAELDSYGVSDFYKRL I DKAKTV  
 EGVEALKDA I LAALP (配列番号 7 3 2) ; および

HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLF I EWLKNGGPSSGAPPSSGSLAEAKEANAELDSYGVSDFYKRL I DKAKTVEGVEALK

10

20

DAILAALP (配列番号 7 3 3) ;

からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、操作されたポリペプチド。

【請求項 2】

HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISTGGGGSASGSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTV  
EGVEALKDAILAALP (配列番号 7 2 7) ;

HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALK

DAILAALP (配列番号 7 3 1) ; および

HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALK  
DAILAALP (配列番号 7 3 3) ;

からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の操作されたポリペプチド。

10

【請求項 3】

必要とする対象における疾患または障害を治療するための、請求項 1 および 2 のいずれか一項に記載の操作されたポリペプチドを含む、医薬組成物。

【請求項 4】

前記疾患または障害が、糖尿病、過体重、肥満症、アルツハイマー病、パーキンソン病、脂肪肝疾患、脂質異常症、冠動脈疾患、脳卒中、短腸症候群 (SBS)、高脂血症、非アルコール性脂肪性肝炎 (NAFLD)、非アルコール性脂肪肝疾患 (NAFLD)、無自覚性低血糖 (HU)、サルコイドーシスを含めた拘束性肺疾患またはメタボリックシンドローム X である、請求項 3 に記載の医薬組成物。

20

【請求項 5】

請求項 1 および 2 のいずれか一項に記載の操作されたポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【請求項 6】

請求項 5 に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項 7】

請求項 6 に記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項 8】

請求項 1 および 2 のいずれか一項に記載の操作されたポリペプチドを製造する方法であって、前記操作されたポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを発現させること、または前記操作されたポリペプチドを非生物学的ペプチド合成により合成することを含む方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2011年7月8日に出願されたUS 61/505982ならびに2012年1月11日に出願されたUS 61/585577の優先権を主張し、その両方ともすべての目的のために参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

40

配列表

本願は、EFS-Webを介してASCII形式で提出された配列表を含有し、参照によりその全文が本明細書に組み込まれる。2012年6月22日に作製された前記ASCIIコピーは、0263WO1.txtと名づけられ、366,392バイトの大きさである。

【背景技術】

【0003】

本願は、良好な作用持続期間、高い効力および/または経口投与を含めた好都合な投与レジメンを有する化合物ならびにその使用方法に関する。アルブミン結合ドメインを、生物学的に活性なペプチドと組み合わせる組み込む操作されたポリペプチドが、本明細書に

50

において提供される。何らかの理論に拘束されようとは思わないが、本明細書に記載された操作されたポリペプチドは、アルブミンと結合し得るので、化合物が捕捉され得（例えば、アルブミンと結合され）、一方で、例えば、腎クリアランスおよび/または分解の減少のために、循環における作用持続期間の増大につながると考えられる。このような治療に適している(amendable)疾患として、肥満症および過体重、糖尿病、脂質異常症、高脂血症、短腸症候群、アルツハイマー病、脂肪肝疾患、パーキンソン病、心血管疾患および中枢神経系のその他の障害またはそれらの組合せが挙げられる。

#### 【発明の概要】

#### 【0004】

上記の代謝疾患、状態および障害において有用なポリペプチドを開発する必要性が依然としてある。したがって、本発明の目的は、上記の状態を治療するのに有用な、半減期が延長された操作されたポリペプチドならびにそれらを製造および使用する方法を提供することである。

10

#### 【0005】

各特許、特許出願および本明細書に引用された刊行物は、参照によりその全文が、すべての目的のために本明細書に組み込まれる。

#### 【0006】

アルブミンに対する結合親和性およびさらなる治療上の有用性を有する、操作されたポリペプチド化合物が提供される。化合物は、アルブミンと結合できる本明細書で定義されたアルブミン結合ドメイン(ABD)ポリペプチドと、ホルモンドメイン(HD)ポリペプチドとを含む、操作されたポリペプチドであり、HDポリペプチドは、生物学的に活性であり、ABDとの共有結合において有益な生物学的応答を発揮できる。本明細書に記載されたABDまたはHDポリペプチドのいずれも、リンカーL、例えば、本明細書に記載のL1を介して、操作されたポリペプチド中で共有結合によって結合されていてもよい。何らかの理論に拘束されようとは思わないが、本明細書に記載された操作されたポリペプチドは、アルブミンと結合し得るので、化合物が、対象において捕捉され得、対象における作用持続期間の増大につながると考えられる。

20

#### 【0007】

第1の態様において、本明細書に記載されるような操作されたポリペプチドが提供される。操作されたポリペプチドは、本明細書に記載のアルブミン結合ドメインポリペプチド(ABD)と、ホルモンドメイン(HD1)とを含む。ホルモンドメインは、エキセンディン、エキセンディンの断片またはエキセンディンの類似体であるポリペプチドを含む。

30

#### 【0008】

別の態様では、治療を必要とする対象において、疾患または障害を治療する方法が提供される。方法は、本明細書に記載されるような操作されたポリペプチドを、対象に投与することを含む。

#### 【0009】

さらに別の態様では、本明細書に記載された操作されたポリペプチド化合物を、医薬上許容される賦形剤と組み合わせて含む医薬組成物が提供される。

#### 【0010】

40

さらに別の態様では、操作されたポリペプチドおよびその中間体をコードするポリヌクレオチド、このようなポリヌクレオチドを有する発現ベクター、このようなポリヌクレオチドを発現する宿主細胞ならびにそれらの発現、合成、翻訳後修飾および単離のための手段である。

#### 【0011】

本発明の1つの利点は、操作されたポリペプチドは、組換え法によって完全に合成され、複雑またはさらなる合成工程または化学工程ならびに関連反応試薬および触媒を避けることができるということである。結果として、本発明のポリペプチドは、化学的に誘導される延長された作用持続期間の化合物よりも、合成するのにあまり費用がかからない。長い作用持続期間(例えば、必要な場合には、1日1回にもかかわらず、ヒト対象において

50

少なくとも1週間も達成され得る)に加えて、さらなる利点は、その比較的小さい大きさであり、それによって、患者のコンプライアンスを改善するための経口送達が可能となり得る。

#### 【0012】

本明細書に開示された化合物は、ヒトでは5~7日またはそれより長くに変換される、マウスにおける少なくとも24時間およびさらに長く2日までのOGTT DOA(作用持続期間についての経口糖負荷試験)試験における驚くべき有効性、頑強な血糖コントロール、体重減少、食物摂取および体重の用量依存的減少を実証する。ラットでは、単回投与の際の化合物曝露は、4~7日間持続し、これは、ヒトでは、少なくとも週に1回の曝露に変換される。化合物は、血漿において、また血漿プロテアーゼに対して安定であり、血清アルブミンと結合していながら活性であり、エキセンディン-4に類似するか、またはそれよりも高いインビボ(in vivo)最大有効性を提供し得る。さらにより驚くべきことに、化合物は、経口送達に適している。

10

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0013】

【図1】図1は、本明細書に開示された操作されたポリペプチド、N末端グリシン残基によって延長されたストレプトコッカス(*Streptococcus*)株G148(配列番号453)のプロテインGに由来するGA3ドメインおよびJonsson et al(Protein Eng. Design & Selection, 2008, 21:515-527);配列番号454)によってこれまでに記載されたようなG148-GA3に由来するアルブミン結合ポリペプチドにおいて有用な、アルブミン結合ポリペプチド(配列番号301~452、配列番号455~461)の例のアミノ酸配列の一覧である。

20

【図2】図2は、アルブミン結合ポリペプチドPEP07912(配列番号457)の、ヒト血清アルブミンとの結合を調べるためにBiacore機器において実施された結合分析の結果を示す。3種の異なる濃度の精製タンパク質(40nM、太い灰色の線;10nM、黒色の線および2.5nM、灰色の線)を、固定化されたヒト血清アルブミンの955RUを有する表面上に注入した。

【図3】図3A~Cは、126種の個々の正常ヒト血清中に存在する、アルブミン結合ポリペプチドPEP07913(配列番号453)、PEP06923(配列番号454)、PEP07271(配列番号455)、PEP07912(配列番号457)、PEP07554(配列番号456)、PEP07914(配列番号458)、PEP07968(すなわち、PEP07911(配列番号459)とコンジュゲートしているDOTA)およびPEP07844(配列番号461)の、IgG分子との結合を調べるためのELISAによって実施された結合分析の結果を示し、A)は、平均OD値を示し、B)は、陰性血清(OD<0.15として定義される)のパーセンテージを示し、C)は、陽性血清(OD>1.0として定義される)のパーセンテージを示す。

30

【図4】図4A~Cは、CD3+CD4+T細胞増殖アッセイにおける、アルブミン結合ポリペプチドPEP07913(配列番号453)、PEP07912(配列番号457)、PEP07914(配列番号458)およびPEP07968(すなわち、PEP07911(配列番号459)とコンジュゲートしているDOTA)の免疫原性評価を示す図である。A)は、52人のコーカサス人種のドナーのコホートにおける、組換えヒトアルブミンと比較したアルブミン結合ポリペプチドに反応する個体数を示す。B)は、組換えヒトアルブミンを含有する陰性対照と比較した、PEP07913、PEP07912、PEP07914およびPEP07968の平均刺激指数(SI)を示す。C)は、バッファ対照と比較される、研究においてすべてのタンパク質に対して反応する個体数を示す。

40

【図5】図5A~5C。4週間の投与後のob/obマウスにおけるアルブミン結合性の操作されたポリペプチドの効果。図5A:7.2または100ナノモル/kg/日の連続注入された(CSI)エキセンディン-4と比較した、25または250nmol/kgの化合物088の週に2回の注射後の示された日でのHbA1c(ヘモグロビンA1c)

50

の変化。図 5 B : 図 5 A について記載されるような投与量後の血糖の変化。図 5 C : 図 5 A について記載されるような投与量後の体重の変化。\* ビヒクル対照に対して  $p < 0.5$  ; 分散分析、ダネット検定。

【図 6】図 6 A ~ 6 C。正常な Harlan スブラグドローリー (HSD) ラットにおける、投薬された例示的な操作されたポリペプチド化合物 11 の薬物動態 (PK) プロフィールおよび生物活性。図 6 A は、食物摂取を低減する化合物の効果を表す。図 6 B は、体重を低減する化合物の効果を表す。図 6 C は、単回用量後の化合物の PK プロフィールを表す。図では、ビヒクルは、中黒四角であり、操作されたポリペプチドは、中白三角である。

【図 7】図 7 A ~ 7 C。正常な Harlan スブラグドローリー (HSD) ラットにおける、投薬された例示的な操作されたポリペプチド化合物 9 の薬物動態 (PK) プロフィールおよび生物活性。図 7 A は、食物摂取を低減する化合物の効果を表す。図 7 B は、体重を低減する化合物の効果を表す。図 7 C は、単回用量後の化合物の PK プロフィールを表す。図では、ビヒクルは、中黒四角であり、操作されたポリペプチドは、中黒三角である。

【図 8】図 8 A ~ 8 C。図 8 A ~ 8 C は、正常な Harlan スブラグドローリー (HSD) ラットにおける、静脈内に投薬されたコンジュゲートしていないエキセンディン類似体と比較した、例示的な操作されたポリペプチド化合物 11 の薬物動態 (PK) プロフィールおよび生物活性を表す。図 8 A は、食物摂取を低減する化合物の効果を表す。図 8 B は、体重を低減する化合物の効果を表す。図 8 C は、単回静脈内用量後の例示的化合物の PK プロフィールを表す。ピコモル血漿レベルとして示された結果。説明文：ビヒクル (菱形) ;  $2 \text{ nmol} / \text{kg}$  IV の  $[^{14}\text{Leu}]$  エキセンディン - 4 (四角) ;  $2 \text{ nmol} / \text{kg}$  IV のエキセンディン - 4 (丸) ;  $2 \text{ nmol} / \text{kg}$  IV の化合物 11 (中白および中黒三角)。

【図 9】図 9 A ~ 9 F。図 9 A ~ 9 F は、毎日か、または週に 2 回のいずれかで亜慢性的に投与された例示的な操作されたポリペプチド化合物 11 の薬物動態 (PK) プロフィールおよび生物活性を表す。化合物 11 は、下向き矢印によって示されるように週に 2 回 (BIW ; 中白下向き三角) か、または毎日 (QD ; 中白四角) のいずれかで 14 日にわたって  $25 \text{ nmol} / \text{kg}$  で皮下投与され、ビヒクル (中黒丸) と比較された。図 9 A は、累積食物摂取を表す。図 9 B は、毎日の食物摂取のパーセント変化を表す。図 9 C は、累積食物摂取のパーセント変化を表す。図 9 D は、総体重を表す。図 9 E は、体重のパーセント変化を表す。図 9 F は、BIW または QD で投与された化合物 11 の PK プロフィールを表す。

【図 10】この図は、経口送達後に血糖を低下させる、コンジュゲートしていないエキセンディン類似体と比較した、ポリペプチド (化合物 088) の生物活性の経時的推移を表す。実施例を参照のこと。平均処理前グルコース : 約  $623 \text{ mg} / \text{dL}$ 。説明文：ビヒクル (中黒四角) ; エキセンディン - 4 類似体 (中白四角) ; 化合物 088 (菱形)。

【発明を実施するための形態】

【0014】

I. 定義

「肥満症」および「過体重」とは、普通に予測されるものよりも多い体重を有する哺乳類を指し、例えば、外見、当技術分野で公知の肥満度指数 (BMI)、ウエストとヒップ周りの比率、皮下脂肪厚、ウエスト周りなどによって決定され得る。疾病管理予防センター (Centers for Disease Control and Prevention) (CDC) は、過体重を、 $25 \sim 29.9$  の BMI を有する成人ヒトとして定義しており ; 肥満を、 $30$  以上の BMI を有する成人ヒトとして定義している。肥満症の決定のためにはさらなる測定基準が存在する。例えば、CDC は、 $1.0$  より大きいウエストとヒップの比率を有するヒトは過体重であると述べている。

【0015】

「除脂肪体重」とは、脂肪を含まない体重を指し、すなわち、総体重 - 体脂肪重量が、

10

20

30

40

50

除脂肪体重である。除脂肪体重は、当技術分野で公知の、流体静力学的計量、コンピュータ化チャンパー、二重エネルギー X 線吸収測定法、皮膚ノギス、磁気共鳴画像法 (MRI) および生体電気インピーダンス法 (BIA) などの方法によって測定できる。

【0016】

「哺乳類」とは、一般に、毛皮または毛を有し、生児出生をその後代に与え、その後代に乳を与える温血動物を指す。哺乳類は、ヒト、コンパニオンアニマル (例えば、イヌ、ネコ)、家畜 (例えば、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ)、野生動物などを含む。一実施形態では、哺乳類は、雌である。一実施形態では、哺乳類は、女性のヒトである。一実施形態では、哺乳類は、ネコまたはイヌである。一実施形態では、哺乳類は、糖尿病哺乳類、例えば、2型糖尿病を有するヒトである。一実施形態では、哺乳類は、肥満糖尿病哺乳類、例えば、2型糖尿病を有する肥満哺乳類である。用語「対象」とは、本明細書に記載された方法との関連で、哺乳類を指す。

10

【0017】

「断片」とは、ポリペプチドとの関連において、本明細書において、通常の化学的意味で、ポリペプチドの一部を指す。例えば、断片は、親ポリペプチドの1個または複数の残基の N 末端欠失または C 末端欠失に起因し得、および/または断片は、親ポリペプチドの1個または複数の残基の内部欠失に起因し得る。「断片」とは、抗体との関連において、可溶性、対象内での分布などを調節するために生物学的に活性な分子と連結され得る抗体の一部を指す。例えば、エキセンディン - 4 (1 - 30) は、アミノ酸 31 ~ 39 のエキセンディン C 末端「テール」が欠失しているエキセンディン - 4 の生物学的に活性な断片を説明する。用語「親」とは、ポリペプチドとの関連において、通常の意味で、修飾、例えば、挿入、欠失および/または置換の前に参照構造として働くポリペプチドを指す。用語「コンジュゲート」とは、本明細書に記載された操作されたポリペプチドとの関連において、成分ポリペプチド、例えば、ABD、HD1 などの間の共有結合を指す。用語「融合」とは、本明細書に記載された操作されたポリペプチドとの関連において、ペプチド主鎖の末端アミノまたはカルボキシ官能基のいずれか、または両方を介した、成分ポリペプチド、例えば、ABD、HD1 などの間の共有結合を指す。操作されたポリペプチドは、合成によってか、または組換えによって製造され得る。典型的には、融合物は、組換えバイオテクノロジーを使用して製造されるが、化学合成およびコンジュゲーション法によっても製造され得る。

20

30

【0018】

本明細書において「類似体」とは、ポリペプチドとの関連において、親化合物に対して、アミノ酸の挿入、欠失および/または置換を有する化合物を指す。ポリペプチドとの関連において、本明細書において「類似体配列」とは、親アミノ酸配列 (例えば、野生型配列、天然配列) に対して、アミノ酸の挿入、欠失および/または置換を有するアミノ酸配列を指す。類似体は、優れた安定性、溶解度、有効性、半減期などを有し得る。いくつかの実施形態では、類似体は、親化合物に対して、少なくとも 50%、例えば、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98% またはさらに高い配列同一性を有する化合物である。好ましい実施形態では、類似体は、挿入、欠失、付加および置換のうちいずれか1種または組合せから独立に選択される1~5のアミノ酸修飾を有する。本明細書における実施形態のいずれかでは、エキセンディン類似体は、挿入、欠失、付加および置換のうちいずれか1種または組合せから独立に選択される1~5のアミノ酸修飾を有し得、好ましくは、親化合物に対して少なくとも50%、例えば、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98% またはさらに高い配列同一性を、より好ましくは、親化合物に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、98% またはさらに高い配列同一性を保持し、好ましくは、親化合物は、エキセンディン - 4、エキセンディン - 4 (1 - 38)、エキセンディン - 4 (1 - 37)、エキセンディン - 4 (1 - 36)、エキセンディン - 4 (1 - 35)、エキセンディン - 4 (1 - 34)、エキセンディン - 4 (1 - 33)、エキセンディン - 4 (1 - 32)、エキセンディン - 4 (1 - 31)、エキセンディン - 4 (1

40

50

- 30)、エキセンディン - 4 (1 - 29) またはエキセンディン - 4 (1 - 28) またはその Leu - 14 置換対応物、例えば、Leu 14 エキセンディン - 4 (1 - 38)、Leu 14 エキセンディン - 4 (1 - 37)、Leu 14 エキセンディン - 4 (1 - 36)、Leu 14 エキセンディン - 4 (1 - 35)、Leu 14 エキセンディン - 4 (1 - 34)、Leu 14 エキセンディン - 4 (1 - 33)、Leu 14 エキセンディン - 4 (1 - 32)、Leu 14 エキセンディン - 4 (1 - 31)、Leu 14 エキセンディン - 4 (1 - 30)、Leu 14 エキセンディン - 4 (1 - 29) または Leu 14 エキセンディン - 4 (1 - 28) であり、最も好ましくは、親化合物は、エキセンディン - 4 または Leu 14 エキセンディン - 4 の配列を有する。好ましい実施形態では、エキセンディン類似体断片は、エキセンディン - 4 (1 - 28) または Leu 14 エキセンディン - 4 (1 - 28) などのそのアミノ酸置換類似体ではない。好ましくは、エキセンディン類似体断片は、少なくとも 29 アミノ酸の長さである。一実施形態では、少なくともエキセンディン - 4 の位置 1、4、6、7 および 9 に対応するアミノ酸とは、天然エキセンディン - 4 中のとおりのものであり、さらに、1 ~ 5 の修飾は、エキセンディン - 4 の位置 1、4、6、7 および 9 以外の位置の保存的アミノ酸置換である。例えば、本明細書における実施形態のなおさらなる実施形態では、エキセンディン類似体は、エキセンディン - 4 の位置 3、4、6、5、7、8、9、10、11、13、15、18、19、22、23、25、26 および / または 30 に少なくとも見られるアミノ酸を保持し、さらに好ましくは、1 ~ 5 以下の別のアミノ酸、最も好ましくは、化学的に保存的なアミノ酸で置換された残りの位置を有する。本明細書における類似体のすべてにおいて、位置 1 および / または 2 の任意の置換または修飾は、デスアミノ - ヒスチジル - エキセンディン - 4 などのエキセンディン - 4 類似体について当技術分野で公知であるように、インスリン分泌活性を保持または改善しながら、DPP - IV 切断に対する抵抗性を保持する。当技術分野で通例のように、用語「保存的」とは、アミノ酸置換との関連において、荷電の種類 (例えば、アニオン性、カチオン性、中性、極性など)、疎水性または親水性、バルク (例えば、ファンデルワールス接触など) および / または官能性 (例えば、ヒドロキシ、アミン、スルフヒドリルなど) の特性を維持する置換を指す。用語「非保存的」とは、保存的ではないアミノ酸置換を指す。

#### 【0019】

「同一性」、「配列同一性」などは、2 種以上の核酸またはポリペプチド配列の比較の関連において、同一であるか、または当技術分野で公知の配列比較アルゴリズム、例えば、BLAST または BLAST 2.0 を使用して測定されるような、特定のパーセンテージの同一であるアミノ酸残基もしくはヌクレオチド (すなわち、比較ウィンドウまたは指定された領域にわたって、最大一致を求めて比較およびアラインされた場合の、特定の領域にわたる、約 50% の同一性、好ましくは、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% またはそれ以上の同一性) を有する 2 種以上の配列または部分配列を指す。この定義は、欠失および / または付加を有する配列、ならびに置換を有するもの、ならびに天然に存在するもの、例えば、多型または対立遺伝子変異体および人為的変異体を含む。好ましいアルゴリズムでは、当技術分野で公知のように、ギャップなどについて考慮される。配列比較のためには、典型的には、1 種の配列が参照配列として作用し、それに対して試験配列が比較される。配列比較アルゴリズムを使用する場合には、試験および参照配列をコンピュータに入力し、必要に応じて、部分配列座標を指定し、配列アルゴリズムプログラムパラメータを指定する。デフォルトプログラムパラメータを使用できるか、または代替パラメータを指定できることが好ましい。次いで、配列比較アルゴリズムによって、プログラムパラメータに基づいて、参照配列に対する、試験配列の配列同一性パーセントが算出される。比較のための配列の最適アラインメントは、例えば、Smith & Waterman, 1981, Adv. Appl. Math. 2:482 の局所相同性アルゴリズムによって、Needleman & Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443 の相同性アラインメントアルゴリズムによって、Pearson & Lipman, 1988, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 の類似法の検

10

20

30

40

50

索によって、これらのアルゴリズム (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis. 中のGAP、BESTFIT、FASTAおよびTFASTA)のコンピュータによる実施によって、または手作業によるアラインメントおよび目視検査によって実施できる。例えば、Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds. 1995 supplement))を参照のこと。配列同一性および配列類似性パーセントを決定するのに適しているアルゴリズムの好ましい例として、BLASTおよびBLAST 2.0アルゴリズムが挙げられ、これらは、Altschul et al., 1977, Nuci. Acids Res. 25:3389-3402およびAltschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410に記載されている。BLASTおよびBLAST 2.0は、当技術分野で公知のように、本発明の核酸およびタンパク質の配列同一性パーセントを決定するために使用される。BLAST解析を実施するためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Informationのウェブサイトを介して市販されている。このアルゴリズムは、まず、クエリー配列において、データベース配列中の同一の長さのワードとアラインされた場合に幾分か正の値の閾値スコアTにマッチするか、またはそれを満たす短いワード長Wを同定することによって高スコアリング配列対(HSP)を同定することを含む。Tは、隣接ワードスコア閾値と呼ばれる(Altschul et al., Id.)。これらの最初の隣接ワードヒットは、それらを含むより長いHSPを見出すための検索を開始するためのシードとして作用する。ワードヒットは、累積的アラインメントスコアが増大され得る限り、各配列に沿って両方向に延長される。例えば、ヌクレオチド配列についての累積的スコアは、パラメータM(1対のマッチング残基についてのリワードスコア; 常に>0)およびN(ミスマッチ残基についてのペナルティスコア; 常に<0)を使用して算出される。アミノ酸配列については、累積的スコアを算出するためにスコアリングマトリックスが使用される。各方向におけるワードヒットの伸長は、累積的アラインメントスコアが、最大達成値から量Xだけ減少する; 1つまたは複数の負のスコアを示す残基のアラインメントの蓄積のために累積的スコアが0以下になる; またはいずれかの配列の末端に到達する時点で停止される。BLASTアルゴリズムパラメータW、TおよびXは、アラインメントの感度および速度を決定する。BLASTNプログラム(ヌクレオチド配列のための)は、デフォルトとして、11のワード長(W)、10の期待値(E)、M=5、N=-4および両鎖の比較を使用する。アミノ酸配列のためには、BLASTPプログラムは、デフォルトとして、3のワード長および10の期待値(E)および50のBLOSUM62スコアリングマトリックス(Henikoff & Henikoff, 1989, Proc. Nati. Acad. Sci. USA 89:10915を参照のこと)アラインメント(B)、10の期待値(E)、M=5、N=-4および両鎖の比較を使用する。

#### 【0020】

用語「約」とは、数値との関連において、数値の+/-10%を指す。

#### 【0021】

用語「ペプチド」および「ポリペプチド」とは、本明細書に記載された操作されたポリペプチドの成分との関連において、同義である。

#### 【0022】

##### II. 化合物

第1の態様において、アルブミン結合ドメイン(ABD)ポリペプチド配列と、少なくとも1種のポリペプチドホルモンドメイン(HD1)配列とを含む配列を有する操作されたポリペプチド化合物が提供される。用語「アルブミン結合ドメイン」、「ABD」などは、本明細書に記載されようなアルブミンと結合できるポリペプチドを指す。用語「ホルモンドメイン」、「ホルモンドメインポリペプチド」などは、対象において生物学的応答を誘発できるGLP-1受容体アゴニストポリペプチドを指す。例示的ホルモンドメインとして、それだけには限らないが、エキセンディン、エキセンディン断片またはエキセンディン類似体が挙げられるが、PEG化誘導体などのレプチン誘導体であってもよい。

#### 【0023】

10

20

30

40

50

驚くべきことに、エキセンディン、エキセンディン類似体または活性断片は、十分なエキセンディン - 4 生物活性を保持し、例えば、ヒト対象では、少なくとも1週間またはそれ以上の持続期間に変換される、げっ歯類における少なくとも3日、さらには5日の延長された作用持続期間を有しながら、ストレプトコッカス (*Streptococcus*) 株 G 1 4 8 の細菌プロテイン G のアルブミン結合ドメインに由来し、それに対して相当なアミノ酸配列同一性を有する極めて高親和性のアルブミン結合ドメイン (A B D) と融合され得ることを見出した。「作用持続期間」とは、通例の意味では、治療レジメンにおいて、より低頻度の投薬を可能にすることを指す。したがって、延長された作用持続期間は、あまり頻繁でないおよび/またはより好都合な投薬スケジュールを可能にする。このような A B D ペプチドが、治療的タンパク質担体として頑強なプラットフォームであることは広く実証されており、それらは、比較的疎水性であり、付いている治療用ペプチドと悪い相互作用をする可能性があり、少なくとも1ファミリーのペプチドホルモンの担体として作用できなかったため、これは幾分か驚くべきことであった。具体的には、ラットアミリンは、本明細書に記載された A B D とコンジュゲートされるか、融合される場合には、種々のエキセンディン - A B D コンストラクトが活性であり、長い作用持続期間を有するとわかった同じげっ歯類モデルにおいて、大きな、または長時間作用性のインビボ (*in vivo*) 活性を全く示さなかった。

#### 【 0 0 2 4 】

さらに、本明細書における治療用コンジュゲートまたは融合化合物は、驚くべきことに、低い免疫原性およびエキセンディン - 4 治療活性を有しながら、アルブミン結合親和性および特異性を保持していた。化合物は、驚くべきことに、エキセンディンと A B D の間に血漿 - プロテアーゼ切断部位がないにもかかわらず、活性である。さらに驚くべきことに、治療用化合物は、アルブミンと結合している場合でさえも活性であると考えられる。本明細書に記載された A B D 化合物は、これまでに記載された A B D 化合物よりも低い免疫原性を有しながら、ストレプトコッカスのプロテイン G 株 1 4 8 ( G 1 4 8 ) の、および Jonsson et al. (*Protein Eng. Design & Selection*, 2008, 21:515-527) 中のアルブミン結合領域に基づいた、アルブミン結合親和性および特異性を提供する。最近、ストレプトコッカスのプロテイン G 株 1 4 8 ( G 1 4 8 ) のアルブミン結合領域内で、2、3 の T および B 細胞エピトープが実験によって同定された (Goetsch et al, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10:125-32, 2003)。著者らは、ワクチンにおける G 1 4 8 の T 細胞エピトープの利用、すなわち、アルブミン結合領域の固有の免疫刺激特性を利用することに興味があった。Goetsch et al. は、さらに、G 1 4 8 の配列中の B 細胞エピトープ、すなわち、免疫処置後に抗体によって結合される領域を見出した。ヒト投与のための医薬組成物では、免疫反応は望まれない。したがって、アルブミン結合ドメイン G 1 4 8 は、その上記の免疫刺激特性のために、このような組成物における使用には、そのようなものとして好ましくない。

#### 【 0 0 2 5 】

生物学的に活性な成分

本明細書に記載された化合物および方法における使用が考慮される生物学的に活性な化合物成分として、エキセンディンが挙げられる。用語「生物学的に活性な化合物」などは、通常の意味で、生物学的応答を誘発し得る化合物、例えば、ポリペプチドなどを指す。

#### 【 0 0 2 6 】

エキセンディン。エキセンディンは、アメリカドクトカゲおよびメキシコドクトカゲ、アリゾナ州およびメキシコ北部に内在する爬虫類の唾液分泌物中に見られるペプチドである。エキセンディン - 3 は、メキシコドクトカゲ (*Heloderma horridum*) の唾液分泌物中に存在し、エキセンディン - 4 は、アメリカドクトカゲ (*Heloderma suspectum*) の唾液分泌物中に存在する。Eng et al, 1990, *J. Biol. Chem.*, 265:20259-62; Eng et al, 1992, *J. Biol. Chem.*, 267:7402-7405 参照のこと。エキセンディン - 3 およびエキセンディン - 4 の配列は、それぞれ以下のとおりである：

HSDGTFSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS-NH<sub>2</sub> (配列番号 1) ;

10

20

30

40

50

HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS-NH<sub>2</sub> (配列番号2)。

【0027】

Hargrove et al. (Regulatory Peptides, 2007, 141:113-119)では、天然エキセンディン-4と比較して位置14に単一ヌクレオチド相違を有する全長C末端アミド化エキセンディン-4ペプチド類似体であるエキセンディン-4ペプチド類似体が報告された。[Leu<sup>14</sup>]エキセンディン-4の配列は以下のとおりである：

HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS-NH<sub>2</sub> (配列番号3)。

Leu<sup>14</sup>エキセンディン-4は、操作されたポリペプチドにおいて使用するのに、また本明細書に記載されたその使用にとって好ましい類似体である。別のエキセンディン-4ペプチド類似体として、位置14および28にアミノ酸置換を有するエキセンディン-4の最初の32個のアミノ酸と、それに続く、非哺乳類(カエル)GLP-1のC末端に由来する5個のアミノ酸配列のキメラ：[Leu<sup>14</sup>, Gln<sup>28</sup>]エキセンディン-4(1-32)-fGLP-1(33-37)がある。この化合物は、以下の配列：

HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIIS (配列番号4)

を有する。また、エキセンディン-4(1-28)、エキセンディン-4(1-29)、エキセンディン-4(1-30)、エキセンディン-4(1-31)、エキセンディン-4(1-32)などのエキセンディン-4のC末端の末端切断型、生物学的に活性な形態およびそれらのアミド化形態も当技術分野で公知である。これらのエキセンディン類似体のすべてが、本発明の操作されたポリペプチドの成分として適している。当技術分野で通例であるように、ペプチド化合物名中の角括弧(すなわち、「[ ]」)は、角括弧内の残基または化学的特徴の置換を示す。例えば、[<sup>14</sup>Leu]エキセンディン-4、[<sup>14</sup>Leu]Ex-4などは、位置14にロイシンを有するエキセンディン-4を指す。アミノ酸の数的位置は、当技術分野で日常的に使用される種々の方法で、先頭に追加されたか、または後ろに追加された数字によって示され得る。例えば、用語<sup>14</sup>Leu、Leu<sup>14</sup>、<sup>14</sup>Leu、Leu<sup>14</sup>などは、位置14のロイシンへの言及において同義である。

【0028】

いくつかの実施形態では、C末端アミドまたはその他のC末端キャッピング部分が、本明細書に記載された化合物中に存在し得るということは理解される。

【0029】

エキセンディンは、グルカゴン様ペプチドファミリーのいくつかのメンバーに対して幾分かの配列類似性を有し、膵細胞からのインスリン分泌を刺激するインスリン分泌効果を有するGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> (Goke et al, 1993, J. Biol. Chem., 268:19650-55) [GLP-1(7-37)NH<sub>2</sub>の配列: HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLKGRG (配列番号5)]、「GLP-1」と呼ばれることもある)に対して最高相同性、53%を有するが、エキセンディンは、GLP-1相同体ではない。

【0030】

薬理学的研究は、エキセンディン-4は、インビトロ(in vitro)で特定のインスリン分泌細胞上のGLP-1受容体で作用し得るという報告につながったが、エキセンディン-4は、GLP-1によっては作用されない受容体で作用する可能性があるということも報告されている。さらに、エキセンディン-4は、すべてではないが一部のインビボにおける生物学的特性をGLP-1と共有し、GLP-1よりも大幅に長い作用持続期間を有する。そのインスリン分泌活性に基づいて、真性糖尿病の治療および高血糖症の予防のためのエキセンディン-3およびエキセンディン-4の使用が提案されており(参照により、すべての目的のためにその全文が本明細書に組み込まれる、英語の米国特許第5,424,286号)、実際、エキセンディン-4は、2型糖尿病を治療するための治療薬として米国において、また欧州において承認されている。

【0031】

実際、アメリカドクトカゲからエキセンディン遺伝子をクローニングしたChenおよびDruckerによって報告されたように、エキセンディンは、哺乳類GLP-1の種相同体ではないと考えられている(J. Biol. Chem. 272:4108-15 (1997))。アメリカドク

10

20

30

40

50

トカゲはまた、プログルカゴン（それからGLP-1がプロセシングされる）について、エキセンディンよりも哺乳類プログルカゴンに対してより類似している別個の遺伝子を有するという知見は、エキセンディンが単にGLP-1の種相同体ではないことを示した。

【0032】

エキセンディンアゴニストを使用して胃腸運動を調節する方法が、米国特許第6,858,576号（すなわち、1996年8月8日出願された米国出願第08/694,954号の一部継続である、1997年8月8日出願された米国出願第08/908,867号に基づく）に記載されている。エキセンディンアゴニストを使用して食物摂取を低減する方法が、米国特許第6,956,026号（すなわち、1997年1月7日出願された米国出願第60/034,905号、1997年8月7日出願された同60/055,404号、1997年11月14日出願された同60/065,442号および1997年11月14日出願された同60/066,029号の利益を主張する、1998年1月7日出願された米国出願第09/003,869号に基づく）に記載されている。

10

【0033】

新規エキセンディンアゴニスト化合物配列は、その認められた米国特許対応物とともに、参照により、すべての目的のために本明細書に組み込まれるWO99/07404（すなわち、1998年8月6日出願されたPCT/US98/16387）に、WO99/25727（すなわち、1998年11月13日出願されたPCT/US98/24210）に、WO99/25728（すなわち、1998年11月13日出願されたPCT/US98/24273）に、WO99/40788に、WO00/41546に、WO00/41548に記載されている。当技術分野で公知の、インビトロおよびインビボで、インスリン分泌性、食物摂取阻害活性および体重活性を含めたエキセンディン活性をアッセイする方法は、本明細書に、また、上記の参考文献およびそこで列挙されたその他の参考文献に記載されている。

20

【0034】

特定の例示的エキセンディン、エキセンディンアゴニストおよびエキセンディン類似体アゴニストとして、エキセンディン断片エキセンディン-4(1-30)(His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly)（配列番号680）；エキセンディン-4(1-28)、エキセンディン-4(1-29)、エキセンディン-4(1-30)、エキセンディン-4(1-31)およびエキセンディン-4(1-32)が挙げられる。類似体は、<sup>14</sup>Met位置（すなわち、<sup>14</sup>Met）で、ロイシンなどの非酸化性アミノ酸での置換を含む。例として、[<sup>14</sup>Leu]エキセンディン-4、[<sup>14</sup>Leu]エキセンディン-4(1-30)、[<sup>14</sup>Leu]エキセンディン-4(1-28)および[<sup>14</sup>Leu, <sup>25</sup>Phe]エキセンディン-4が挙げられる。

30

【0035】

本明細書に記載された操作されたポリペプチドにおいて使用するためのエキセンディン類似体アゴニストとして、米国特許第7,223,725号（参照により、すべての目的のために本明細書に組み込まれる）に記載されるもの、例えば、式： $Xaa_1 Xaa_2 Xaa_3 Gly Xaa_5 Xaa_6 Xaa_7 Xaa_8 Xaa_9 Xaa_{10} Xaa_{11} Xaa_{12} Xaa_{13} Xaa_{14} Xaa_{15} Xaa_{16} Xaa_{17} Ala Xaa_{19} Xaa_{20} Xaa_{21} Xaa_{22} Xaa_{23} Xaa_{24} Xaa_{25} Xaa_{26} Xaa_{27} Xaa_{28} - Z_1$ ；（式中、 $Xaa_1$ は、His、ArgまたはTyrであり； $Xaa_2$ は、Ser、Gly、AlaまたはThrであり； $Xaa_3$ は、Ala、AspまたはGluであり； $Xaa_5$ は、AlaまたはThrであり； $Xaa_6$ は、Ala、Phe、Tyrであり； $Xaa_7$ は、ThrまたはSerであり； $Xaa_8$ は、Ala、SerまたはThrであり； $Xaa_9$ は、AspまたはGluであり； $Xaa_{10}$ は、Ala、Leu、Ile、ValまたはMetであり； $Xaa_{11}$ は、AlaまたはSerであり； $Xaa_{12}$ は、AlaまたはLysであり；

40

50

Xaa<sub>13</sub>は、AlaまたはGlnであり；Xaa<sub>14</sub>は、Ala、Leu、Ile、ValまたはMetであり；Xaa<sub>15</sub>は、AlaまたはGluであり；Xaa<sub>16</sub>は、AlaまたはGluであり；Xaa<sub>17</sub>は、AlaまたはGluであり；Xaa<sub>19</sub>は、AlaまたはValであり；Xaa<sub>20</sub>は、AlaまたはArgであり；Xaa<sub>21</sub>は、AlaまたはLeuであり；Xaa<sub>22</sub>は、Ala、Phe、Tyrであり；Xaa<sub>23</sub>は、Ile、Val、LeuまたはMetであり；Xaa<sub>24</sub>は、Ala、GluまたはAspであり；Xaa<sub>25</sub>は、Ala、Trp、Phe、Tyrであり；Xaa<sub>26</sub>は、AlaまたはLeuであり；Xaa<sub>27</sub>は、AlaまたはLysであり；Xaa<sub>28</sub>は、AlaまたはAsnであり；Z<sub>1</sub>は、-OH、-NH<sub>2</sub>、Gly-Z<sub>2</sub>、Gly-Gly-Z<sub>2</sub>、Gly-Gly-Xaa<sub>31</sub>-Z<sub>2</sub>、Gly-Gly-Xaa<sub>31</sub>Ser-Z<sub>2</sub>（配列番号681）、Gly-Gly-Xaa<sub>31</sub>Ser-Ser-Z<sub>2</sub>（配列番号682）、Gly-Gly-Xaa<sub>31</sub>Ser-Ser-Gly-Z<sub>2</sub>（配列番号683）、Gly-Gly-Xaa<sub>31</sub>Ser-Ser-Gly-Ala-Z<sub>2</sub>（配列番号684）、Gly-Gly-Xaa<sub>31</sub>Ser-Ser-Gly-Ala-Xaa<sub>36</sub>-Z<sub>2</sub>（配列番号685）、Gly-Gly-Xaa<sub>31</sub>Ser-Ser-Gly-Ala-Xaa<sub>36</sub>Xaa<sub>37</sub>-Z<sub>2</sub>（配列番号686）またはGly-Gly-Xaa<sub>31</sub>Ser-Ser-Gly-Ala-Xaa<sub>36</sub>Xaa<sub>37</sub>Xaa<sub>38</sub>-Z<sub>2</sub>（配列番号687）であり；Xaa<sub>31</sub>、Xaa<sub>36</sub>、Xaa<sub>37</sub>およびXaa<sub>38</sub>は独立に、Proであるか、または存在せず；Z<sub>2</sub>は、-OHまたは-NH<sub>2</sub>である）の化合物が挙げられる。上記のエキセンディン類似体のいずれかおよび各々では、Xaa<sub>1</sub>に対応するヒスチジンの置換が、D-ヒスチジン、デスアミノ-ヒスチジン、2-アミノ-ヒスチジン、 $\beta$ -ヒドロキシ-ヒスチジン、ホモヒスチジン、N- $\beta$ -アセチル-ヒスチジン、 $\beta$ -フルオロメチル-ヒスチジン、 $\beta$ -メチル-ヒスチジン、3-ピリジルアラニン、2-ピリジルアラニン、4-ピリジルアラニン、4-イミダゾアセチル、デス-アミノ-ヒスチジル（イミダゾプロピオニル）、 $\beta$ -ヒドロキシ-イミダゾプロピオニル、N-ジメチル-ヒスチジルまたは $\beta$ -カルボキシ-イミダゾプロピオニルのいずれかを用いて行われているものも具体的に考慮される。さらに具体的には、Xaa<sub>2</sub>のグリシンの置換が、D-Ala、Val、Leu、Lys、Aib、（1-アミノシクロプロピル）カルボン酸、（1-アミノシクロブチル）カルボン酸、1-アミノシクロペンチル）カルボン酸、（1-アミノシクロヘキシル）カルボン酸、（1-アミノシクロヘプチル）カルボン酸または（1-アミノシクロオクチル）カルボン酸のいずれかを用いて行われている本明細書に記載されたエキセンディン類似体も本明細書において考慮される。

#### 【0036】

一実施形態によれば、例示的化合物として、Xaa<sub>1</sub>が、HisまたはArgであり；Xaa<sub>2</sub>が、GlyまたはAlaであり；Xaa<sub>3</sub>が、AspまたはGluであり；Xaa<sub>5</sub>が、AlaまたはThrであり；Xaa<sub>6</sub>が、AlaまたはPheであり；Xaa<sub>7</sub>が、ThrまたはSerであり；Xaa<sub>8</sub>が、Ala、SerまたはThrであり；Xaa<sub>9</sub>が、AspまたはGluであり；Xaa<sub>10</sub>が、AlaまたはLeuであり；Xaa<sub>11</sub>が、AlaまたはSerであり；Xaa<sub>12</sub>が、AlaまたはLysであり；Xaa<sub>13</sub>が、AlaまたはGlnであり；Xaa<sub>14</sub>が、AlaまたはLeuであり；Xaa<sub>15</sub>が、AlaまたはGluであり；Xaa<sub>16</sub>が、AlaまたはGluであり；Xaa<sub>17</sub>が、AlaまたはGluであり；Xaa<sub>19</sub>が、AlaまたはValであり；Xaa<sub>20</sub>が、AlaまたはArgであり；Xaa<sub>21</sub>が、AlaまたはLeuであり；Xaa<sub>22</sub>が、Pheであり；Xaa<sub>23</sub>が、Ile、Valであり；Xaa<sub>24</sub>が、Ala、GluまたはAspであり；Xaa<sub>25</sub>が、Ala、TrpまたはPheであり；Xaa<sub>26</sub>が、AlaまたはLeuであり；Xaa<sub>27</sub>が、AlaまたはLysであり；Xaa<sub>28</sub>が、AlaまたはAsnであり；Z<sub>1</sub>が-OH、-NH<sub>2</sub>、Gly-Z<sub>2</sub>、Gly-Gly-Z<sub>2</sub>、Gly-Gly-Xaa<sub>31</sub>-Z<sub>2</sub>、Gly-Gly-Xaa<sub>31</sub>Ser-Z<sub>2</sub>（配列番号681）、Gly-Gly-Xaa<sub>31</sub>Ser-Ser-Z<sub>2</sub>（配列番号682）、Gly-Gly-Xaa<sub>31</sub>Ser-Ser-Gly-Z<sub>2</sub>（配列番号683）、Gly-Gly-Xaa<sub>31</sub>Ser-Ser-Gly-Ala-Z<sub>2</sub>（配列番号684）、Gly-Gly-Xaa<sub>31</sub>Ser-Ser-Gly-Ala-Xaa<sub>36</sub>-Z<sub>2</sub>（配列番号685）、Gly-Gly-Xaa<sub>31</sub>Ser-Ser-Gly-Ala-Xaa<sub>36</sub>Xaa<sub>37</sub>-Z<sub>2</sub>（配列番号686）またはGly-Gly-Xaa<sub>31</sub>Ser-Ser-Gly-Ala-Xaa<sub>36</sub>Xaa<sub>37</sub>Xaa<sub>38</sub>-Z<sub>2</sub>（配列番号687）であり；Xaa<sub>31</sub>、Xaa<sub>36</sub>、Xaa<sub>37</sub>およびXaa<sub>38</sub>は独立に、Proであるか、または存在せず；Z<sub>2</sub>は、-OHまたは-NH<sub>2</sub>である）の化合物が挙げられる。上記のエキセンディン類似体のいずれかおよび各々では、Xaa<sub>1</sub>に対応するヒスチジンの置換が、D-ヒスチジン、デスアミノ-ヒスチジン、2-アミノ-ヒスチジン、 $\beta$ -ヒドロキシ-ヒスチジン、ホモヒスチジン、N- $\beta$ -アセチル-ヒスチジン、 $\beta$ -フルオロメチル-ヒスチジン、 $\beta$ -メチル-ヒスチジン、3-ピリジルアラニン、2-ピリジルアラニン、4-ピリジルアラニン、4-イミダゾアセチル、デス-アミノ-ヒスチジル（イミダゾプロピオニル）、 $\beta$ -ヒドロキシ-イミダゾプロピオニル、N-ジメチル-ヒスチジルまたは $\beta$ -カルボキシ-イミダゾプロピオニルのいずれかを用いて行われているものも具体的に考慮される。さらに具体的には、Xaa<sub>2</sub>のグリシンの置換が、D-Ala、Val、Leu、Lys、Aib、（1-アミノシクロプロピル）カルボン酸、（1-アミノシクロブチル）カルボン酸、1-アミノシクロペンチル）カルボン酸、（1-アミノシクロヘキシル）カルボン酸、（1-アミノシクロヘプチル）カルボン酸または（1-アミノシクロオクチル）カルボン酸のいずれかを用いて行われている本明細書に記載されたエキセンディン類似体も本明細書において考慮される。

10

20

30

40

50

号683)、Gly Gly Xaa<sub>31</sub> Ser Ser Gly Ala-Z<sub>2</sub>(配列番号684)、Gly Gly Xaa<sub>31</sub> Ser Ser Gly Ala Xaa<sub>36</sub>-Z<sub>2</sub>(配列番号685)、Gly Gly Xaa<sub>31</sub> Ser Ser Gly Ala Xaa<sub>36</sub> Xaa<sub>37</sub>-Z<sub>2</sub>(配列番号686)、Gly Gly Xaa<sub>31</sub> Ser Ser Gly Ala Xaa<sub>36</sub> Xaa<sub>37</sub> Xaa<sub>38</sub>-Z<sub>2</sub>(配列番号687)であり; Xaa<sub>31</sub>、Xaa<sub>36</sub>、Xaa<sub>37</sub>およびXaa<sub>38</sub>は独立に、Proであるか、または存在せず、Z<sub>2</sub>は、-OHまたは-NH<sub>2</sub>である(ただし、Xaa<sub>3</sub>、Xaa<sub>5</sub>、Xaa<sub>6</sub>、Xaa<sub>8</sub>、Xaa<sub>10</sub>、Xaa<sub>11</sub>、Xaa<sub>12</sub>、Xaa<sub>13</sub>、Xaa<sub>14</sub>、Xaa<sub>15</sub>、Xaa<sub>16</sub>、Xaa<sub>17</sub>、Xaa<sub>19</sub>、Xaa<sub>20</sub>、Xaa<sub>21</sub>、Xaa<sub>24</sub>、Xaa<sub>25</sub>、Xaa<sub>26</sub>、Xaa<sub>27</sub>およびXaa<sub>28</sub>のうち3種以下が、Alaである)上記の式のもが挙げられる。上記のエキセンディン類似体のいずれかおよび各々において、位置Xaa1に対応するヒスチジンの置換が、D-ヒスチジン、デスアミノ-ヒスチジン、2-アミノ-ヒスチジン、 $\beta$ -ヒドロキシ-ヒスチジン、ホモヒスチジン、N- $\beta$ -アセチル-ヒスチジン、 $\beta$ -フルオロメチル-ヒスチジン、 $\beta$ -メチル-ヒスチジン、3-ピリジルアラニン、2-ピリジルアラニン、4-ピリジルアラニン、4-イミダゾアセチル、デス-アミノ-ヒスチジル(イミダゾプロピオニル)、 $\beta$ -ヒドロキシ-イミダゾプロピオニル、N-ジメチル-ヒスチジルまたは $\beta$ -カルボキシ-イミダゾプロピオニルのいずれかを用いて行われているものも具体的に考慮される。Xaa2のグリシンの置換が、D-Ala、Val、Leu、Lys、Aib、(1-アミノシクロプロピル)カルボン酸、(1-アミノシクロブチル)カルボン酸、1-アミノシクロペンチル)カルボン酸、(1-アミノシクロヘキシル)カルボン酸、(1-アミノシクロヘプチル)カルボン酸または(1-アミノシクロオクチル)カルボン酸のいずれかを用いて行われている本明細書に記載されたエキセンディン類似体が、さらに具体的に考慮される。

10

20

## 【0037】

その他の例示的化合物として、WO99/25727において、そこで化合物2-23として示されるものが挙げられる。別の実施形態によれば、Xaa<sub>14</sub>がLeu、IleまたはVal、より好ましくは、Leuであり、および/またはXaa<sub>25</sub>が、Trp、PheまたはTyr、より好ましくは、TrpまたはPheである化合物が提供される。これらの化合物は、インピトロおよびインピボの両方で、ならびに化合物の合成の際に酸化分解をあまり受けない。

30

## 【0038】

本融合ポリペプチドにおける使用に適したエキセンディン類似体のさらなる例として、2003年3月4日に公開された米国特許第6528486号(参照により、すべての目的のために本明細書に組み込まれる)に記載されるものが挙げられる。具体的には、エキセンディン類似体として、適宜、位置34~39に1~5の間の欠失および前記エキセンディンと共有結合によって結合している4~20個のアミノ酸単位のペプチド配列のC末端伸長を有し、前記ペプチド伸長配列中の各アミノ酸単位が、Ala、Leu、Ser、Thr、Tyr、Asn、Gln、Asp、Glu、Lys、Arg、HisおよびMetからなる群から選択される、エキセンディン-4に対して少なくとも90%の相同性を有するエキセンディンまたはエキセンディン類似体からなるものが挙げられる。より好ましくは、伸長は、4~20個のアミノ酸残基の、例えば、4~15個の範囲の、より好ましくは、4~10個の範囲の、特に、4~7の範囲のアミノ酸残基、例えば、4、5、6、7、8または10個のアミノ酸残基のペプチド配列であり、6個のアミノ酸残基が好ましい。最も好ましくは、米国特許第6528486号によれば、伸長ペプチドは、少なくとも1個のLys残基を含有し、3~7個のリシンがさらにより好ましく、6個のリシンがさらに最も好ましい。

40

## 【0039】

例えば、1種の類似体として、HGEFTSLSKQMEEEAVRLFIEWLKNNG PSSGAPPSKKKKKK(配列番号118)(([デス-<sup>36</sup>Pro]エキセンディン-4(1-39))-Lys<sub>6</sub>と

50

も呼ばれる)がある。さらなる例示的類似体として、Lys<sub>6</sub>-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser-(Lys)<sub>6</sub>(H-Lys<sub>6</sub>-<sup>36</sup>Pro<sup>36</sup>エキセンディン-4(1-39)-Lys<sub>6</sub>)(配列番号688);His-Gly-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Ser(H-[<sup>36</sup>Pro<sup>36</sup>,<sup>37</sup>,<sup>38</sup>Pro])エキセンディン-4(1-39)-NH<sub>2</sub>)(配列番号689);Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Ser(H-(Lys)<sub>6</sub>-[<sup>36</sup>Pro<sup>36</sup>,<sup>37</sup>,<sup>38</sup>Pro])エキセンディン-4(1-39)(配列番号690);Asn-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Ser(H-Asn-(Glu)<sub>5</sub>-[<sup>36</sup>Pro<sup>36</sup>,<sup>37</sup>,<sup>38</sup>Pro])エキセンディン-4(1-39)(配列番号691);His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Ser-(Lys)<sub>6</sub>([<sup>36</sup>Pro<sup>36</sup>,<sup>37</sup>,<sup>38</sup>Pro])エキセンディン-4(1-39)-(Lys)<sub>6</sub>(配列番号692);(Lys)<sub>6</sub>-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Ser-(Lys)<sub>6</sub>(H-(Lys)<sub>6</sub>-[<sup>36</sup>Pro<sup>36</sup>,<sup>37</sup>,<sup>38</sup>Pro])エキセンディン-4(1-39)-(Lys)<sub>6</sub>(配列番号693);およびAsn-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Ser-(Lys)<sub>6</sub>(Asn-(Glu)<sub>5</sub>-[<sup>36</sup>Pro<sup>36</sup>,<sup>37</sup>,<sup>38</sup>Pro])エキセンディン-4(1-39)-(Lys)<sub>6</sub>(配列番号694)が挙げられる。当技術分野で通例のように、アミノ酸の反復は、反復数を示す下付き数字によって示され得る;すなわち、Lys<sub>6</sub>(配列番号695)、(Lys)<sub>6</sub>(配列番号695)などは、ヘキサリシル(配列番号695)を指す。上記のエキセンディン類似体のいずれかおよび各々において、位置1に対応するヒスチジンの置換が、D-ヒスチジン、デスアミノ-ヒスチジン、2-アミノ-ヒスチジン、 $\alpha$ -ヒドロキシ-ヒスチジン、ホモヒスチジン、N- $\alpha$ -アセチル-ヒスチジン、 $\alpha$ -フルオロメチル-ヒスチジン、 $\beta$ -メチル-ヒスチジン、3-ピリジルアラニン、2-ピリジルアラニン、4-ピリジルアラニン、4-イミダゾアセチル、デス-アミノ-ヒスチジル(またはイミダゾプロピオニル)、 $\alpha$ -ヒドロキシ-イミダゾプロピオニル、N-ジメチル-ヒスチジルまたは $\alpha$ -カルボキシ-イミダゾプロピオニルのいずれかを用いて行われているものが具体的に考慮される。位置2のグリシンの置換が、D-Ala、Val、Leu、Lys、Aib、(1-アミノシクロプロピル)カルボン酸、(1-ア

10

20

30

40

50

ミノシクロブチル)カルボン酸、1-アミノシクロペンチル)カルボン酸、(1-アミノシクロヘキシル)カルボン酸、(1-アミノシクロヘプチル)カルボン酸または(1-アミノシクロオクチル)カルボン酸のいずれかを用いて行われている、本明細書に記載されたエキセンディン類似体が、本明細書においてさらに具体的に考慮される。

【0040】

操作されたポリペプチドコンストラクトにおいて使用するのに適したエキセンディン類似体のさらなる例として、エキセンディン-4(1-39)の対応する位置に関して、特に、位置<sup>1 3</sup>Gln、<sup>1 4</sup>Met、<sup>2 5</sup>Trpまたは<sup>2 8</sup>Asnに少なくとも1個の修飾されたアミノ酸残基を有するエキセンディン類似体を説明する、公開されたPCT出願WO2004035623(参照により、すべての目的のために本明細書に組み込まれる)に記載されるもの、特に、天然に生じるアミノ酸を含んでなるものがある。その刊行物によれば、少なくとも1個のLysアミノ酸、より好ましくは、6個または7個のLysアミノ酸単位などの少なくとも5個のLysアミノ酸単位を含む、1~7個のアミノ酸C末端伸長をさらに含むさらなるこのような類似体がある。

【0041】

操作されたポリペプチドコンストラクトにおいて使用するのに適したエキセンディン類似体のなおさらなる例として、エキセンディンまたはエキセンディン類似体のN末端部分中に修飾されたアミノ酸残基を有して、その領域中の高い $\alpha$ -ターン特徴を作製するエキセンディン類似体を説明する、「N-Terminus Conformationally Constrained GLP-1 Receptor Agonist Compounds」と題された公開PCT出願WO/2010/120476に記載されたもの(参照により、すべての目的のために本明細書に組み込まれる)がある。例えば、類似体は、コンホメーション的に制約された領域を作製することによって、アミノ酸残基His1-Gly2-Glu3を模倣するよう設計され、エキセンディン-4における修飾として、リキシセナチドまたは本明細書に記載されたその他の類似体を使用できる、His1-Gly2-Glu3にチアゾリジン-プロリンペプチドミメティックを含有するエキセンディン類似体を含む(例えば、その中の図17A~Fに記載される化合物を参照のこと)。

【0042】

本明細書に記載されたエキセンディン、例えば、エキセンディン-4、類似体および式のいずれかおよび各々において、位置1に対応するヒスチジンの置換が、L-ヒスチジン、D-ヒスチジン、デアミノ-ヒスチジン、2-アミノ-ヒスチジン、 $\alpha$ -ヒドロキシ-ヒスチジン、ホモヒスチジン、N- $\alpha$ -アセチル-ヒスチジン、 $\alpha$ -フルオロメチル-ヒスチジン、 $\beta$ -メチル-ヒスチジン、3-ピリジルアラニン、2-ピリジルアラニン、4-ピリジルアラニン、4-イミダゾアセチル、デアミノ-ヒスチジル(イミダゾプロピオニル)、 $\alpha$ -ヒドロキシ-イミダゾプロピオニル、N-ジメチル-ヒスチジルまたは $\alpha$ -カルボキシ-イミダゾプロピオニルのいずれかを用いて行われているものが具体的に考慮される。例えば、His1位置が修飾されている、本明細書に記載されるような操作されたポリペプチドコンジュゲートにおいて使用するための好ましいエキセンディン類似体として、(4-イミダゾアセチル)エキセンディン-4、(デアミノ-ヒスチジル)エキセンディン-4(または(イミダゾプロピオニル)エキセンディン-4)、( $\alpha$ -ヒドロキシ-イミダゾプロピオニル)エキセンディン-4、(N-ジメチル-ヒスチジル)エキセンディン-4および( $\alpha$ -カルボキシ-イミダゾプロピオニル)エキセンディン-4がある。位置2のグリシンの置換が、D-Ala、Val、Leu、Lys、Aib、(1-アミノシクロプロピル)カルボン酸、(1-アミノシクロブチル)カルボン酸、1-アミノシクロペンチル)カルボン酸、(1-アミノシクロヘキシル)カルボン酸、(1-アミノシクロヘプチル)カルボン酸または(1-アミノシクロオクチル)カルボン酸のいずれかを用いて行われている本明細書に記載されたエキセンディンまたはエキセンディン類似体が、本明細書においてさらに具体的に考慮される。したがって、例えば、このような操作されたポリペプチドとして、エキセンディン-4類似体が、リンカーとしてのグリシンとそのC末端 $\alpha$ -カルボキシ基で結合しているペプチドを介して、ペプチド結合

10

20

30

40

50

を介してPEP07986配列のN末端と連結している、(4-イミダゾアセチル)エキセンディン-4-Gly-PEP07986が挙げられるであろう。

【0043】

上記のエキセンディン類似体またはその活性断片のいずれも、ABDとのリンカーを有するか、有さない、本操作されたポリペプチドにおける使用に適している。

【0044】

アルブミン結合ドメイン(ABD)ペプチド。ストレプトコッカスのプロテインG株148(G148)に由来するこれまでに開示されたアルブミン結合ドメインについて、またアルブミンに対して高親和性を有するいくつかの変異体、例えば、WO09/016043について、熱安定性の低下を犠牲にしてより高い親和性が達成された。さらに、T細胞およびB細胞エピトープが、G148のアルブミン結合領域内で実験的に同定されたことが報告された(Goetsch et al, Clin Diagn Lab Immunol 10:125-32, 2003)。この研究を行った著者らは、ワクチンにおけるG148のT細胞エピトープの使用、すなわち、アルブミン結合領域の固有の免疫刺激特性を利用することに関心をもった。Goetsch et alは、さらに、B細胞エピトープ、すなわち、G148の配列中の、免疫処理後に抗体によって結合される領域を見出した。したがって、アルブミン結合ドメインG148およびG148に由来するポリペプチドおよびひいては、それらを含有する融合物/コンジュゲート、上記の免疫刺激特性のリスク。ヒト投与用の医薬組成物では、免疫応答がないこと(または低減)が望まれる。

【0045】

このような融合物および/またはコンジュゲートの上記の欠点および欠乏は、本発明の操作されたポリペプチドにおいて使用するための本明細書に開示された改善されたアルブミン結合ドメイン(ABD)ペプチドの使用によって克服または低減される。このようなABDは、アルブミンに対して比較的高親和性を有するものであり、ストレプトコッカス株G148の細菌タンパク質Gのアルブミン結合ドメインに由来し、それに対して相当なアミノ酸配列同一性を有し、望ましい免疫学的特性、例えば、低減された免疫原性をさらに提供するように本明細書に記載されるようにさらに修飾されている。したがって、本明細書に記載された長期間の操作されたポリペプチドコンジュゲートまたは融合物を含むアルブミン結合ドメインポリペプチドは、アルブミン結合モチーフと、3ヘリックス立体配置を含むさらなる配列とを含む3ヘリックスバンドルタンパク質ドメインである。本明細書に記載され、本明細書に記載された操作されたポリペプチドについて考慮されるABDペプチドは、Jonsson et al.(Protein Eng. Design & Selection, 2008, 21:515-527)によって記載されたようなアルブミン結合配列を有するものならびに同文献に記載されたABDペプチド、およびPCT公開出願第WO2009/016043号にさらに記載されるABDペプチドよりも優れている。本明細書に記載された操作されたポリペプチドを製造するには、本明細書に記載されたABDポリペプチドに、エキセンディンまたは類似体またはその活性断片が融合される。エキセンディン化合物とのコンジュゲーションまたは融合に適したアルブミン結合ドメインポリペプチドは、以下から選択された配列を含む改善されたABDアミノ酸配列を含み得る：

式(i)

LA X3 AK X6 X7 AN X10 ELD X14 YGVSDF YKRLI X26 KAKTVEGVEALK X39 X40 IL X43 X44 LP (配列番号300)

(配列中、各々独立に、

- X3は、E、S、QおよびCから選択され；
- X6は、E、SおよびCから選択され；
- X7は、AおよびSから選択され；
- X14は、A、S、CおよびKから選択され；
- X10は、A、SおよびRから選択され；
- X26は、DおよびEから選択され；
- X39は、DおよびEから選択され；

10

20

30

40

50

X 4 0 は、A および E から選択され；  
 X 4 3 は、A および K から選択され；  
 X 4 4 は、A、S および E から選択され；  
 位置 4 5 のロイシンは、存在するか、または存在せず；  
 位置 4 6 のプロリンは、存在するか、または存在しない) および  
 式 ( i i ) ( i ) において定義される配列と少なくとも 9 5 % の同一性を有するアミノ  
 酸配列

(ただし、X<sub>7</sub> は、L、E または D ではないか；  
 または代わりに、

アミノ酸配列は、P C T 公開出願番号 W O 2 0 0 9 / 0 1 6 0 4 3 において定義される  
 ような以下の配列： 10

LAEAK X<sub>a</sub> X<sub>b</sub> A X<sub>c</sub> X<sub>d</sub> EL X<sub>e</sub> KY GVSD X<sub>5</sub> YK X<sub>8</sub> X<sub>9</sub> I X<sub>11</sub> X<sub>12</sub> A X<sub>14</sub> TVEGV X<sub>20</sub> AL X<sub>23</sub> X<sub>24</sub> X<sub>25</sub> ILAALP (配列番号 6 7 9) によって定義されず、配列中、互いに独立して、

X<sub>a</sub> は、V および E から選択され；

X<sub>b</sub> は、L、E および D から選択され；

X<sub>c</sub> は、N、L および I から選択され；

X<sub>d</sub> は、R および K から選択され；

X<sub>e</sub> は、D および K から選択され；

X<sub>5</sub> は、Y および F から選択され；

X<sub>8</sub> は、N、R および S から選択され； 20

X<sub>9</sub> は、V、I、L、M、F および Y から選択され；

X<sub>11</sub> は、N、S、E および D から選択され；

X<sub>12</sub> は、R、K および N から選択され；

X<sub>14</sub> は、K および R から選択され；

X<sub>20</sub> は、D、N、Q、E、H、S、R および K から選択され；

X<sub>23</sub> は、K、I および T から選択され；

X<sub>24</sub> は、A、S、T、G、H、L および D から選択され；

X<sub>25</sub> は、H、E および D から選択される)。

#### 【 0 0 4 6 】

第 1 の態様の上記の式 ( i ) または ( i i ) のアルブミン結合ポリペプチドのさらなる  
 実施形態では、X 6 は E である。この態様のアルブミン結合ポリペプチドの別の実施形態  
 では、X 6 は S である。この態様のアルブミン結合ポリペプチドの別の実施形態では、X  
 3 は S である。この態様のアルブミン結合ポリペプチドの別の実施形態では、X 3 は E だ  
 る。この態様のアルブミン結合ポリペプチドの別の実施形態では、X 7 は A である。こ  
 の態様のアルブミン結合ポリペプチドの別の実施形態では、X 7 は S である。この態様の  
 アルブミン結合ポリペプチドの別の実施形態では、X 1 4 は S である。この態様のアルブ  
 ミン結合ポリペプチドの別の実施形態では、X 1 4 は C である。この態様のアルブミン結  
 合ポリペプチドの別の実施形態では、X 1 4 は A である。この態様のアルブミン結合ポリ  
 ペプチドの別の実施形態では、X 1 4 は K である。この態様のアルブミン結合ポリペプチ  
 ドの別の実施形態では、X 1 0 は A である。この態様のアルブミン結合ポリペプチドの別  
 の実施形態では、X 1 0 は S である。この態様のアルブミン結合ポリペプチドの別の実施  
 形態では、X 2 6 は D である。この態様のアルブミン結合ポリペプチドの別の実施形態で  
 は、X 2 6 は E である。この態様のアルブミン結合ポリペプチドの別の実施形態では、X  
 3 9 は D である。この態様のアルブミン結合ポリペプチドの別の実施形態では、X 3 9 は  
 E である。この態様のアルブミン結合ポリペプチドの別の実施形態では、X 4 0 は A であ  
 る。この態様のアルブミン結合ポリペプチドの別の実施形態では、X 4 0 は E である。こ  
 の態様のアルブミン結合ポリペプチドの別の実施形態では、X 4 3 は A である。この態様  
 のアルブミン結合ポリペプチドの別の実施形態では、X 4 3 は K である。この態様のアル  
 ブミン結合ポリペプチドの別の実施形態では、X 4 4 は A である。この態様のアルブミン  
 結合ポリペプチドの別の実施形態では、X 4 4 は S である。この態様のアルブミン結合ポ 50

リペプチドの別の実施形態では、X44はEである。この態様のアルブミン結合ポリペプチドの別の実施形態では、位置45のロイシンは存在する。この態様のアルブミン結合ポリペプチドの別の実施形態では、位置45のロイシンが存在しない。さらなる実施形態では、位置46のプロリンが存在する。さらなる実施形態では、位置46のプロリンが存在しない。

【0047】

さらなる好ましい実施形態では、エキセンディン化合物とのコンジュゲーションまたは融合に適したアルブミン結合ドメインポリペプチドは、

式(iii)

LA X3 AK X6 X7 AN X10 ELD X14 YGVSDF YKRLIDKAKT VEGVEALKDA ILAALP (配列番号678) 10

(配列中、互いに独立して、

X3は、E、S、QおよびCから選択され；

X6は、E、SおよびCから選択され；

X7は、AおよびSから選択され；

X10は、A、SおよびRから選択され；

X14は、A、S、CおよびKから選択され；

位置45のロイシンは、存在するか、または存在せず；

位置46のプロリンは、存在するか、または存在しない)および

式(iv)(iii)において定義される配列と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列 20

(ただし、X7は、L、EまたはDではないか；  
または代わりに、

アミノ酸配列は、PCT公開出願番号WO2009/016043において定義されるような以下の配列：

LAEAK X<sub>a</sub> X<sub>b</sub> A X<sub>c</sub> X<sub>d</sub> EL X<sub>e</sub> KY GVSD X<sub>5</sub> YK X<sub>8</sub> X<sub>9</sub> I X<sub>11</sub> X<sub>12</sub> A X<sub>14</sub> TVEGV X<sub>20</sub> AL X<sub>23</sub> X<sub>24</sub> X<sub>25</sub> ILAALP (配列番号679) によって定義されず、配列中、互いに独立して、

X<sub>a</sub>は、VおよびEから選択され；

X<sub>b</sub>は、L、EおよびDから選択され；

X<sub>c</sub>は、N、LおよびIから選択され；

X<sub>d</sub>は、RおよびKから選択され；

X<sub>e</sub>は、DおよびKから選択され；

X<sub>5</sub>は、YおよびFから選択され；

X<sub>8</sub>は、N、RおよびSから選択され；

X<sub>9</sub>は、V、I、L、M、FおよびYから選択され；

X<sub>11</sub>は、N、S、EおよびDから選択され；

X<sub>12</sub>は、R、KおよびNから選択され；

X<sub>14</sub>は、KおよびRから選択され；

X<sub>20</sub>は、D、N、Q、E、H、S、RおよびKから選択され；

X<sub>23</sub>は、K、IおよびTから選択され；

X<sub>24</sub>は、A、S、T、G、H、LおよびDから選択され；

X<sub>25</sub>は、H、EおよびDから選択される)

から選択された、改善されたABDアミノ酸配列を含み得る。

【0048】

この態様の式(iii)または(iv)のアルブミン結合ポリペプチドのさらなる実施形態では、X6はEである。この態様のアルブミン結合ポリペプチドの別の実施形態では、X6はSである。この態様のアルブミン結合ポリペプチドの別の実施形態では、X3はSである。この態様のアルブミン結合ポリペプチドの別の実施形態では、X3はEである。この態様のアルブミン結合ポリペプチドの別の実施形態では、X7はAである。この態様のアル 50

ブミン結合ポリペプチドの別の実施形態では、X7はSである。この態様のアルブミン結合ポリペプチドの別の実施形態では、X14はSである。この態様のアルブミン結合ポリペプチドの別の実施形態では、X14はCである。この態様のアルブミン結合ポリペプチドの別の実施形態では、X14はAである。この態様のアルブミン結合ポリペプチドの別の実施形態では、X14はKである。この態様のアルブミン結合ポリペプチドの別の実施形態では、X10はAである。この態様のアルブミン結合ポリペプチドの別の実施形態では、X10はSである。この態様のアルブミン結合ポリペプチドの別の実施形態では、位置45のロイシンは存在する。さらなる実施形態では、位置46のプロリンが存在する。さらなる実施形態では、位置46のプロリンが存在しない。

【0049】

10

式(i)~(iv)のいずれか1種のさらなる実施形態では、ABDは、1個または複数のN末端ヘリックスキャッピングアミノ酸を含み、さらなる実施形態では、ヘリックスキャッピングアミノ酸は、セリンであり得るか、またはグリシン-セリンであり得る。したがって、図および配列表中のものを含めて、本明細書に開示された各アルブミン結合ドメイン配列について、その中に含有される式(i)~(iv)のいずれか1種のABDに対応するアルブミン結合ドメイン、そのSer-ABD、Gly-Ser-ABD、Gly-ABD、Ala-ABDおよびそのデス-C末端-プロリン配列が、操作されたポリペプチドにおいて本明細書に開示されるように、すべての態様について具体的に考慮される。

【0050】

20

したがって、得られた配列が、(i)または(iii)によって定義されるクラスに属する配列と少なくとも95%同一であるようなものである(i)または(iii)の修飾された変異体も包含される。例えば、アミノ酸残基の特定の官能基分類(例えば、疎水性、親水性、極性など)に属するアミノ酸残基は、同一官能基群に由来する別のアミノ酸残基と交換され得る可能性がある。

【0051】

アルブミンに対する結合親和性を有するABDポリペプチドと関連する配列の上記で定義されたクラスは、3ヘリックスバンドドメインにフォールディングされる共通の親ポリペプチド配列に由来する。より詳しくは、上記のポリペプチドは、血清アルブミンとアルブミン結合ドメインG148-GA3間の複合体の構造に基づくモデルビルディング(Lejon et al, J. Biol. Chem. 279:42924-8, 2004)ならびに共通の親ポリペプチド配列のいくつかの突然変異による変異体の結合および構造特性の分析から導かれる。式(i)~(iv)のいずれか1種の上記で定義されたアミノ酸配列は、親ポリペプチド配列と比較して、ほとんど同一である3ヘリックスバンドドメインにフォールディングされると予測されるポリペプチドのクラスをもたらすアミノ酸置換を含む。親ポリペプチド配列は、アルブミンとの相互作用のための結合表面をすでに含んでいるが、その結合表面は、上記の定義の置換の一部によって修飾される。上記の定義の置換は、親ポリペプチド配列と比較して、改善されたアルブミン結合能を提供する。重要で、驚くべきことに、上記の定義の置換は、アルブミンに対する強力な親和性の保持および/または改善に加えて、免疫学的特性の増強を提供する。

30

40

【0052】

したがって、開示内容の第1の態様の改善されたABDポリペプチドは、例えば、ヒト投与のための治療分子の融合またはコンジュゲートパートナーとして使用するのに適したものにする一連の特徴を示す。重要で、驚くべきことに、本開示内容の改善されたABDは、例えばアルブミン結合ドメインG148-GA3およびWO09/016043に開示されたアルブミン結合ポリペプチドなどの関連アルブミン結合ポリペプチドとの比較において、以下の6つの特徴のうち少なくとも5つを実証する。

【0053】

(1) ABDポリペプチドは、例えば、G148-GA3およびその他の細菌由来のアルブミン結合ドメインと比較して異なる表面を示す。相違は、このような細菌タンパク質

50

に対して先に曝露されているヒトなどの対象における抗体反応の任意のリスクを低減または排除し得る

【 0 0 5 4 】

( 2 ) A B D ポリペプチドは、例えば、G 1 4 8 - G A 3 および共通の親ポリペプチド配列のその他の関連するが異なる突然変異による変異体よりも、少ない可能性ある T エピトープしか含まず、したがって、ヒトなどの対象に投与された場合に低いおよび/またはより低い免疫原性を示す。

【 0 0 5 5 】

( 3 ) ポリペプチドは、ヒトなどの対象に投与された場合に、循環抗体と、より低い反応性を示す。したがって、循環抗体に曝露されたポリペプチドの表面における、すなわち、アルブミンとの結合相互作用に関与していないポリペプチド表面におけるアミノ酸置換によって、抗体交差反応性は、例えば、ヒト血清の試験セットにおいて測定されるような、G 1 4 8 - G A 3 によって引き起こされる抗体交差反応性と比較して低下する。

【 0 0 5 6 】

( 4 ) ポリペプチドは、 $K_D$  値によって定義されるような、より高い結合親和性の点で、および  $k_{off}$  値によって定義されるような、より遅い解離速度 (  $off - rate$  ) の点の両方で、例えば、細菌タンパク質由来のアルブミン結合ドメインなどの既知の天然に存在するアルブミン結合ポリペプチドよりも高いアルブミン結合能を有する。

【 0 0 5 7 】

( 5 ) ポリペプチドは、例えば、細菌タンパク質由来のアルブミン結合ドメインなどの既知の天然に存在するアルブミン結合ポリペプチドよりも少ない、ポリペプチドの安定性の問題と関連しているアミノ酸残基を含む。したがって、ポリペプチドは、例えば、酸化傾向のあるメチオニンまたはトリプトファンを含まず、1 個しかアスパラギンを含まない。

【 0 0 5 8 】

( 6 ) ポリペプチドは、55 を超える融点によって定義されるような、W 0 0 9 / 0 1 6 0 4 3 に開示されるものなどのこれまでのアルブミン結合ポリペプチドよりも高い構造的安定性を有する。

【 0 0 5 9 】

一実施形態では、第 1 の態様のコンジュゲート/融合物のアルブミン結合ポリペプチドは、上記で列挙された特徴のうち 6 つすべてを示す。別の実施形態では、第 1 の態様のアルブミン結合ポリペプチドは、アルブミンと結合している場合に、例えば、W 0 0 9 / 0 1 6 0 4 3 に開示されるものなどのこれまでのアルブミン結合ポリペプチドよりもより親水性のプロフィールを示す。ポリペプチドがアルブミンと相互作用する場合に周囲に曝露されるアルブミン結合ポリペプチドの表面は、表面疎水性を付与する、より少ないアミノ酸残基を含む。

【 0 0 6 0 】

A B D 配列の本明細書における実施形態の各々についてさらに、C 末端プロリン ( 上記の位置 4 6 に対応する ) が適宜存在しないこともある。A B D 配列の各実施形態についてなおさらに、位置 4 5 のロイシンが適宜存在するか、または存在しないこともある。「A B D 配列」とは、一価または二価であり、必要に応じて、本明細書に開示された操作されたポリペプチドの一部を形成する A B D 化合物の配列である。「ペプチドホルモンドメイン ( H D 1 ) 配列」とは、一価または二価であり、必要に応じて、本明細書に開示された操作されたポリペプチドの一部を形成するペプチドホルモンドメイン ( H D 1 ) 化合物の配列である。「エキセンディン配列」とは、一価または二価であり、必要に応じて、本明細書に開示された操作されたポリペプチドの一部を形成するエキセンディン化合物の配列である。「エキセンディン類似体配列」とは、一価または二価であり、必要に応じて、本明細書に開示された操作されたポリペプチドの一部を形成するエキセンディン類似体化合物の配列である。「エキセンディン活性断片配列」とは、一価または二価であり、必要に応じて、本明細書に開示された操作されたポリペプチドの一部を形成するエキセンディン

10

20

30

40

50

活性断片化合物の配列である。「エキセンディン類似体活性断片配列」とは、一価または二価であり、必要に応じて、本明細書に開示された操作されたポリペプチドの一部を形成するエキセンディン類似体活性断片化合物の配列である。「アルブミン結合モチーフ ( A B M ) 配列」とは、一価または二価であり、必要に応じて、本明細書に開示された操作されたポリペプチドの一部を形成する A B M の配列である。別に記載のない限り、操作されたポリペプチドが、化合物 ( 例えば、 A B D または H D 1 ) を「含む」場合には、操作されたポリペプチドの配列は、化合物 ( 例えば、 A B D 配列または H D 1 配列 ) の配列を含むと理解される。

#### 【 0 0 6 1 】

アルブミン結合モチーフが存在するため、 A B D ペプチドは、最大で  $1 \times 10^{-6}$  M である相互作用の  $K_D$  値で、さらにより好ましくは、最大で  $1 \times 10^{-9}$  M (さらにより密接な親和性) でアルブミンと結合する。より好ましくは、最大で  $1 \times 10^{-10}$  M である相互作用の  $K_D$  値で、いっそうより好ましくは、最大で  $1 \times 10^{-11}$  M であり、なおいっそうより好ましくは、最大で  $1 \times 10^{-12}$  M であり、いっそうさらには、最大で  $1 \times 10^{-13}$  M である。値は、最も好ましくは、ヒト血清アルブミン (「 H S A 」) に対する親和性のものである。

#### 【 0 0 6 2 】

本明細書において使用される用語「アルブミン結合」および「アルブミンに対する結合親和性」とは、例えば、当技術分野において公知の B i a c o r e 機器などにおける表面プラズモン共鳴技術の使用によって試験され得るポリペプチドの特性を指す。例えば、以下の実施例に記載されるように、アルブミン結合親和性は、アルブミンまたはその断片が、機器のセンサーチップ上に固定化されており、試験されるべきポリペプチドを含有するサンプルがチップ上を通過する実験において試験され得る。あるいは、試験されるべきポリペプチドが、機器のセンサーチップ上に固定化されており、アルブミンまたはその断片を含有するサンプルがチップ上を通過する。アルブミンは、この関連では、ヒト血清アルブミンなどの哺乳類に由来する血清アルブミンであり得る。当業者ならば、このような実験によって得られた結果を解釈して、アルブミンに対するポリペプチドの結合親和性の少なくとも定性的測定を確立し得る。定量的測定が望まれる場合には、例えば、相互作用の  $K_D$  値を調べるために、表面プラズモン共鳴法を使用してもよい。結合値は、例えば、 B i a c o r e 2 0 0 0 機器 ( G E H e a l t h c a r e ) において定義され得る。アルブミンは、適宜、測定 of センサーチップ上に固定化されており、その親和性が調べられるポリペプチドのサンプルは、段階希釈によって調製され、注入される。次いで、例えば、機器製造業者 ( G E H e a l t h c a r e ) によって提供された B I A e v a l u a t i o n 4 . 1 ソフトウェアの 1 : 1 ラングミュア結合モデルを使用して、結果から  $K_D$  値が算出され得る。

#### 【 0 0 6 3 】

一実施形態では、この態様のアルブミン結合ポリペプチドは、相互作用の  $k_{off}$  値が、最大で  $5 \times 10^{-5} s^{-1}$ 、例えば、最大で  $5 \times 10^{-6} s^{-1}$  であるようにアルブミンと結合する。

#### 【 0 0 6 4 】

別の実施形態では、アルブミン結合ポリペプチドのアミノ酸配列は、配列番号 3 0 1 ~ 3 4 4 のいずれか 1 種から選択される。さらに詳しくは、アミノ酸配列は、配列番号 3 0 4 ~ 3 0 5、配列番号 3 0 7 ~ 3 0 8、配列番号 3 1 0 ~ 3 1 1、配列番号 3 1 3 ~ 3 1 4、配列番号 3 1 6 ~ 3 1 7、配列番号 3 1 9 ~ 3 2 0、配列番号 3 2 2 ~ 3 2 3、配列番号 3 2 5 ~ 3 2 6、配列番号 3 2 8 ~ 3 2 9、配列番号 3 3 1 ~ 3 3 2、配列番号 3 3 4 ~ 3 3 5、配列番号 3 3 7 ~ 3 3 8、配列番号 3 4 1 ~ 3 4 2 および配列番号 3 4 9 ~ 3 5 0 から選択される。

#### 【 0 0 6 5 】

本明細書に記載された操作されたポリペプチドにおいて使用される A B D の別の好ましい実施形態では、操作されたポリペプチドのアルブミン結合ポリペプチド部分のアミノ酸

10

20

30

40

50

配列は、本明細書における表 1 または図 1、配列表に由来するものを含めた、また、その  
 デス - P r o 4 6 および / または デス - L e u 4 5 形態をさらに含めた本明細書に記載さ  
 れた配列のいずれか 1 種から選択される A B D を含む。

【 0 0 6 6 】

一実施形態では、この態様のアルブミン結合ポリペプチドは、( i ) または ( i i i )  
 において定義される A B D 配列の N 末端および / または C 末端に位置する 1 個または複数  
 のさらなるアミノ酸残基をさらに含む。これらのさらなるアミノ酸残基は、ポリペプチド  
 によるアルブミンの結合のさらなる増強およびフォールディングされたアルブミン結合ド  
 メインのコンホメーション的安定性の改善において役割を果たし得るが、例えば、ポリペ  
 プチドの製造、精製、インビボまたはインビトロでの安定化、カップリング、標識または  
 検出のうち 1 つまたは複数ならびにそれらの任意の組合せと関連するその他の目的に等し  
 く十分に役立ち得る。このようなさらなるアミノ酸残基は、化学的カップリングの目的の  
 ために、例えば、H D 1 に付加された 1 個または複数のアミノ酸残基を含み得る。

10

【 0 0 6 7 】

例えば、したがって、一実施形態では、A B D アミノ酸配列 ( i ) または ( i i i ) の  
 N または C 末端のヘリックスの直前または直後のアミノ酸は、コンホメーションの安定  
 性に影響を及ぼし得る。コンホメーションの安定性の改善に寄与し得るアミノ酸残基の一  
 例として、上記で定義される A B D アミノ酸配列 ( i ) または ( i i i ) の N 末端に位置  
 するセリン残基がある。N 末端セリン残基は、いくつかの場合には、セリン側鎖の 酸素  
 とグルタミン酸残基のポリペプチド主鎖 N H の間に水素結合を含むことによって基準の S  
 - X - X - E キッピングボックスを形成し得る。この N 末端キッピングは、本開示内  
 容の第 1 の態様のアルブミン結合ポリペプチドを構成する 3 ヘリックスドメインの第 1 の  
 ヘリックスの安定化に寄与し得る。

20

【 0 0 6 8 】

したがって、一実施形態では、さらなるアミノ酸は、ポリペプチドの N 末端に少なくと  
 も 1 個のセリン残基を含む。言い換えれば、1 個または複数のセリン残基が A B D アミノ  
 酸配列に先行する。アルブミン結合ポリペプチドの別の実施形態では、さらなるアミノ酸  
 は、A B D 配列の N 末端にグリシン残基を含む。1、2、3、4 または任意の適した数の  
 アミノ酸残基が A B D アミノ酸配列 ( i ) または ( i i i ) に先行し得るということが理  
 解される。したがって、単一のセリン残基、単一のグリシン残基またはグリシン - セリン  
 ( G S ) 組合せもしくはグリシン - セリン - セリン ( G S S ) 組合せなどの 2 種の組合せ  
 が A B D アミノ酸配列に先行し得る。N 末端にさらなるアミノ酸残基を含むアルブミン結合  
 ポリペプチドの例は、配列番号 4 4 5 ~ 4 6 3、例えば、配列番号 4 4 5 ~ 4 4 8 および  
 配列番号 4 6 2 ~ 4 6 3、ならびに表 1 および図 1 に示されている。さらに別の実施形態  
 では、さらなるアミノ酸残基は、配列式 ( i ) または ( i i i ) によって定義されるよう  
 なポリペプチドの N 末端にセリンを含む。N 末端セリンを有するこのような A B D の 1 種  
 の一例として、SGSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAI LAALP ( 配列番号 6 9 6  
 ) がある。対応するデス - プロリン形態は、SGSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEAL  
 KDAI LAAL ( 配列番号 6 9 7 ) である。対応するデス - L e u 形態は、SGSLAEAKEAANAELDSY  
 GVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAI LAAP ( 配列番号 6 9 8 ) である。対応するデス - P r o デス  
 - L e u 形態は、SGSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAI LA ( 配列番号 6 9 9  
 ) である。

30

40

【 0 0 6 9 】

なお別の実施形態では、さらなるアミノ酸残基 ( 単数または複数 ) は、本明細書におい  
 て定義された A B D ポリペプチドの N 末端にアラニン酸を含むか、または上記の A B D 配  
 列の N 末端にアラニン - セリン配列としてセリンと組み合わせて含む。なお別の実施形態  
 では、さらなるアミノ酸残基 ( 単数または複数 ) は、本明細書において定義された A B D  
 ポリペプチドの N 末端にグルタミン酸を含む。なお別の実施形態では、さらなるアミノ酸  
 残基 ( 単数または複数 ) は、本明細書において定義された A B D ポリペプチドの N 末端に  
 システインを含む。このようなさらなる残基は、存在する場合には、好ましくは、1 ~ 5

50

個のアミノ酸であることが好ましい。

【0070】

同様に、C末端キャッピングは、アルブミン結合ポリペプチドを構成する3ヘリックスドメインの第3のヘリックスの安定性を改善するために利用され得る。(i)または(iii)において定義されるABDアミノ酸配列のC末端に存在するC末端プロリン残基は、少なくとも部分的に、キャッピング残基として機能し得る。C末端のプロリン残基の後ろのリシン残基は、リシン残基のアミノ基とポリペプチド主鎖中のリシンの2および3残基前に位置するアミノ酸のカルボニル基、例えば、(i)または(iii)において定義されるABDアミノ酸配列のロイシンおよびアラニン残基のカルボニル基の間に水素結合を形成することによって、アルブミン結合ポリペプチドの第3のヘリックスのさらなる安定化に寄与し得る。したがって、一実施形態では、さらなるアミノ酸は、ポリペプチドのC末端にリシン残基を含む。このようなさらなる残基は、存在する場合には、好ましくは、1~5個のアミノ酸であることが好ましい。

10

【0071】

上記で論じられたように、さらなるアミノ酸は、アルブミン結合ポリペプチドの製造と関連し得る。第1の態様のアルブミン結合ポリペプチドが化学的ペプチド合成によって製造される場合には、特に、C末端プロリンの後ろの1個または複数のオプションなアミノ酸残基が利点を提供し得る。このようなさらなるアミノ酸残基は、例えば、ジケトピペラジンなどの望ましくない物質の形成を、合成のジペプチド段階で防ぎ得る。このようなアミノ酸残基の一例として、グリシンがある。したがって、一実施形態では、さらなるアミノ酸は、上記で説明されるように、プロリン残基の直後またはさらなるリシンおよび/またはグリシン残基の後ろに、ポリペプチドのC末端にグリシン残基を含む。あるいは、ポリペプチドの製造は、ABDアミノ酸配列(i)または(iii)のC末端プロリン残基のアミド化から恩恵を受け得る。この場合には、C末端プロリンは、カルボキシル炭素にさらなるアミン基を含む。

20

【0072】

C末端にさらなるアミノ酸残基をさらに含むアルブミン結合ポリペプチドの例は、配列番号445~452、例えば、配列番号449~450、ならびに表1および図1に示される。当業者ならば、異なる種類のペプチド合成のための予め作られたマトリックスによってC末端修飾を達成する方法を承知している。

30

【0073】

別の実施形態では、さらなるアミノ酸残基は、ポリペプチドのNおよび/またはC末端にシステイン残基を含む。このようなシステイン残基は、(i)または(iii)において定義されるようなABDアミノ酸配列の直前および/もしくは直後にあってもよく、または上記のような任意のその他のさらなるアミノ酸残基の前および/もしくは後ろであってもよい。ポリペプチド鎖のNおよび/またはC末端のシステイン残基を含むアルブミン結合ポリペプチドの例は、配列番号449~450(C末端)および配列番号451~452(N末端)、ならびに表1および図1に示されている。ポリペプチド鎖へのシステイン残基の付加によって、アルブミン結合ポリペプチドの部位指定コンジュゲーションのためのチオール基を得ることができる。あるいは、部位特異的コンジュゲーションを促進するために、セレノシステイン残基が、システイン残基の導入についてと同様の方法でポリペプチド鎖のC末端に導入されてもよい(Cheng et al, Nat Prot 1:2, 2006)。

40

【0074】

一実施形態では、アルブミン結合ポリペプチドは、2個以下のシステイン残基を含む。別の実施形態では、アルブミン結合ポリペプチドは、1個以下のシステイン残基を含む。

【0075】

別の実施形態では、アルブミン結合ポリペプチドのさらなるアミノ酸残基は、ヘキサヒスチジル(His<sub>6</sub>)タグ、(配列番号49)などのポリペプチドの精製または検出のための「タグ」またはタグに対して特異的であり、および/もしくは精製において使用される抗体との相互作用のための「myc」(「c-Myc」)タグもしくは「FLAG」タグ

50

グを含む。当業者ならばその他の代替物も承知している。

【 0 0 7 6 】

例示的 A B D 種として、それだけには限らないが、以下の表 1 および実施例において示される化合物が挙げられる。

【 0 0 7 7 】

【 表 1 - 1 】

表1. 選択されたABDペプチド

名称	ABD ペプチド配列	配列番号
PEP07271	GSSLASAKEAANAELDAYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	455
PEP07554	GSSLASAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	456
PEP07912	GLASAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	457
PEP07914	GLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	458
PEP07911	GLASAKEAANAELDCYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	459
PEP07834	ALASAKEAANAELDCYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	460
PEP07844	GSSLASAKEAANAELDKYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	461
PEP07983	GSLASAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	462
PEP07986	GSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	463
PEP08185	GSLAEAKEAANAELDCYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALPG	448
	LAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	313
	SLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	500
	LAEAKEAANAELDCYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALPG	501
	SLAEAKEAANAELDCYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALPG	502
(デス-C末端Pro) PEP07986	GSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL	700
(デス-C末端Pro-Gly) PEP08185	GSLAEAKEAANAELDCYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL	701
	SLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL	702
	SLAEAKEAANAELDCYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL	703
	LAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL	704
	LAEAKEAANAELDCYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL	705

10

20

30

【表 1 - 2】

	GSSLASAKEAANAELDAYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	455
	GSSLASAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	456
	GLASAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	457
	GLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	458
	GLASAKEAANAELDCYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	459
	ALASAKEAANAELDCYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	460
	GSSLASAKEAANAELDKYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	461
	GSLASAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	462
	GSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	463
	GSLAEAKEAANAELDCYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALPG	448
	LAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	313
	SLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	500
	LAEAKEAANAELDCYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALPG	501
	SLAEAKEAANAELDCYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALPG	502
	GSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL	700
	GSLAEAKEAANAELDCYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL	701
	SLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL	702
	SLAEAKEAANAELDCYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL	703
	LAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL	704
	LAEAKEAANAELDCYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL	705
	GSSLASAKEAANAELDAYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAA	706
	GSSLASAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAA	707
	GLASAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAA	708
	GLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAA	709
	GLASAKEAANAELDCYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAA	710
	ALASAKEAANAELDCYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAA	711
	GSSLASAKEAANAELDKYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAA	712
	GSLASAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAA	713
	GSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAA	714
	GSLAEAKEAANAELDCYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAA	715
	LAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAA	716
	SLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAA	717
	LAEAKEAANAELDCYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAA	718
	SLAEAKEAANAELDCYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAA	719
	GSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAA	714
	GSLAEAKEAANAELDCYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAA	715
	SLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAA	717
	SLAEAKEAANAELDCYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAA	719

10

20

30

40

【表 1 - 3】

	LAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAA	716
	LAEAKEAANAELDCYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAA	718
	GSSLASAKEAANAELDAYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAA	706
	GSSLASAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAA	707
	GLASAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAA	708
	GLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAA	709
	GLASAKEAANAELDCYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAA	710
	ALASAKEAANAELDCYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAA	711
	GSSLASAKEAANAELDKYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAA	712
	GSLASAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAA	713
	GSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAA	714
	GSLAEAKEAANAELDCYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAA	715
	LAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL	704
	SLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAA	717
	LAEAKEAANAELDCYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAA	718
	SLAEAKEAANAELDCYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAA	719
	GSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAA	714
	GSLAEAKEAANAELDCYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAA	715
	SLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAA	717
	SLAEAKEAANAELDCYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAA	719
	LAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAA	716
	LAEAKEAANAELDCYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAA	718

10

20

## 【 0 0 7 8 】

例えば、好ましい操作されたポリペプチド実施形態では、A B D は、LAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP (配列番号 3 1 3)、ならびにSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP (配列番号 5 0 0) およびGSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP (配列番号 4 6 3 ; P E P 0 7 9 8 6) を含めたその N 末端が伸長された A B D 配列形態を含む。位置 2 のセリンは、配列をキャップしており、この位置にグリシンまたはアラニンをもつことと比較して T m をおよそ 2 上げています。アラニンはまた、AGSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP (配列番号 7 2 0) におけるようにセリンの直前であり得る。また、上記の A B D 配列の各々中に、C 末端プロリン、グリシンまたは両方が存在しない対応するポリペプチドが好ましい。したがって、A B D が、親形態と比較して収率を改善し得るデス - プロリン形態 : LAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL (配列番号 7 0 4)、ならびにSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL (配列番号 7 0 2) およびGSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL (配列番号 7 0 0) を含めたその N 末端が伸長された A B D 配列形態を含む配列も好ましい。また、各 A B D のデス - L e u 4 5 形態も好ましい。

30

40

## 【 0 0 7 9 】

C y s - コンジュゲーションが望ましい、好ましい操作されたポリペプチド実施形態では、好ましい A B D は、LAEAKEAANAELDCYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALPG (配列番号 5 0 1) ならびにSLAEAKEAANAELDCYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALPG (配列番号 5 0 2) およびGSLAEAKEAANAELDCYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALPG (配列番号 4 4 8 ; P E P 0 8 1 8 5) を含めたその N 末端が伸長された A B D 配列形態を含み得る。また、上記の A B D 配列の各々中に、C 末端プロリンまたはグリシンまたは両方が存在しないポリペプチドも好ましい。

50

## 【 0 0 8 0 】

本明細書に開示された A B D 配列のいずれかを用いる一態様では、エキセンディン - 4 またはエキセンディン類似体配列に対するリンカーは、本明細書に開示されたようなグリシンを含むリンカー、例えば G、GGG、GGS、GGGS (配列番号 1 9 2)、TGGGGAS (配列番号 1 9 3)、TGGGGGAS (配列番号 1 9 4)、または TGGGGGSAS (配列番号 1 9 5) である。

## 【 0 0 8 1 】

本明細書に記載された操作されたポリペプチドの一実施形態、特に、その C 末端がプロリンまたはペプチド合成の間にラセミ化することが知られているその他のアミノ酸で終わるものでは、C 末端アミノ酸残基のラセミ化に関する可能性ある問題に対抗するために C 末端にグリシンが付加され得る。あるいは、C 末端アミノ酸は、その (アミノ基) アミド化形態にあり得る、例えば、グリシンで終わるよりもむしろ、プロリンに対してプロリンアミド。しかし、アミド化ポリペプチドは、化学合成よりも組換えによって製造されることが望ましく、次いで、C 末端アミノ酸のアミド化が、当技術分野で公知のいくつかの方法、例えば、アミド化 P A M 酵素の使用によって実施され得る。組換え製造によって得ることができる操作されたポリペプチドが好ましい。

## 【 0 0 8 2 】

本明細書において A B D は、完全に可逆的にフォールディングする、すなわち、それらは、変性され得、所望の活性三次構造に自発的に再フォールディングする。これは、20 でとられたスペクトル (フォールディングされた状態) および 90 に加熱した後にとられた第 2 のスペクトル (加熱変性) 20 に戻った後にとられた第 3 のスペクトル (再フォールディングされた状態) を比較する、例えば、A B D 配列番号 4 6 3 の円偏光二色性スペクトル分析によって評価された。この手順の間に、 $T_m$  を求めることができる。

## 【 0 0 8 3 】

操作されたポリペプチドの別の態様は、A B D が、難溶性または低溶解性エキセンディン変異体の水溶液における溶解性の増大を提供し得るということである。この特性は、A B D 自体によってか、またはその会合が水溶液における操作されたポリペプチドの溶解度を高める、インビボもしくはインビトロで高度に可溶性のアルブミンと結合している操作されたポリペプチドの結果として生じる複合体のために付与され得る。したがって、このさらなる態様の実施形態では、本明細書に記載された融合タンパク質またはコンジュゲートとしてアルブミン結合ドメインと共有結合によってカップリングしている、それ自体、1 mg / ml 以下または 2 mg / ml 以下または 5 mg / ml 以下の水における溶解度を有するエキセンディン化合物を含む組成物が提供され、これでは、化合物およびアルブミン結合ポリペプチド、融合タンパク質またはコンジュゲートは、共有結合によってカップリングしており、操作されたポリペプチドの溶解度は、融合していない (またはコンジュゲートしていない) 天然エキセンディン化合物のものよりも高い。

## 【 0 0 8 4 】

アルブミンとの結合。血清アルブミンは、哺乳類血清中に最も豊富にあるタンパク質であり (40 g / L ; ヒトでは、およそ 0 . 7 mM)、ここでは、それは、それだけには限らないが、脂質およびビリルビンを含めたさまざまな分子と結合する (Peters T, 1985, *Advances in Protein Chemistry* 37:161)。血清アルブミンの半減期は、動物の大きさに正比例し、これでは、例えば、ヒト血清アルブミン (HSA) は、19 日の半減期を有し、ウサギ血清アルブミンは、約 5 日の半減期を有するということが観察されてきた (McCurdy TR et al., *J. Lab. Clin. Med.* 143:115, 2004)。ヒト血清アルブミンは、体中に広く、特に、腸および血液の区画において分布しており、ここでは、主に、浸透圧の維持に参与している。構造的に、アルブミンは、3 つの相同なドメインを含み、合計 584 または 585 個のアミノ酸になる一本鎖タンパク質である (Dugaiczky L et al., 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:71)。アルブミンは、17 のジスルフィド橋および単一の反応性チオール、C34 を含有するが、N 結合型および O 結合型炭水化物部分を欠く (Peters, 1985, *Id.*; Nicholson JP et al., 2000, *Br J Anaesth* 85:599)。グリコシル化がないことは、アルブミンの組換え発現を単純化する。アルブミンのこの特性は、その三次構

10

20

30

40

50

造が知られているという事実と一緒に (He, XM and Carter, DC, Nature 358:209 1992)、それを組換え融合タンパク質において使用するための魅力的な候補にしている。このような融合タンパク質は、一般に、単一ポリペプチド鎖において、治療用タンパク質 (タンパク質それ自体の投与の際に身体から迅速に排除される) と血漿タンパク質 (天然の遅いクリアランスを示す) を組み合わせる (Sheffield WP, Curr. Drug Targets Cardiovasc. Haematol. Disord. 1:1, 2001)。このような融合タンパク質は、あまり頻繁な注射を必要としないという点およびインビボにおけるより高いレベルの治療用タンパク質において臨床的有用性を提供し得る。しかし、本明細書における操作されたポリペプチドは、アルブミンとコンジュゲートしていないが、代わりに、アルブミンとの非共有結合を可能にするモチーフを含有する。

10

## 【0085】

アルブミン半減期。種々の種におけるアルブミンの半減期は、一般に、動物体重に基づいた相対成長率に忠実であると観察されている。例えば、マウス、ラット、ウサギおよびヒトにおけるアルブミン半減期は、それぞれ、1、1.9、5.6および19日と推定されている。実際、累乗フィッティング解析 (Davies & Morris, 1993, Pharm. Res. (N.Y.) 10:1093-1095) は、以下の方程式を提供する：

$$\text{アルブミン半減期 (日)} = 3.75 * \text{体重 (kg)}^{0.368}.$$

## 【0086】

さらなる実施形態。本明細書に開示された各ポリペプチドはまた、その天然に生じる第1のアミノ酸とインフレームでN末端にメチオニンを含む (例えば、付加されたN末端メチオニンを有するエキセンディン - 4であるMet - エキセンディン - 4) よう考慮されるということは理解される。本明細書に示された操作されたポリペプチド配列中にC末端Glyが現れる場合には、その残基は、その後のアミド化の間に失われ得るということがさらに理解される。いくつかの実施形態は、合成における中間体、例えば、当技術分野で公知であるように、アフィニティー精製に使用され、その後、適宜、除去されて、治療用途に適した成熟した操作されたポリペプチドをもたらし得る「Hisタグ」を有するものなどである。

20

## 【0087】

本明細書に記載された操作されたポリペプチドのいずれかのいくつかの実施形態では、エキセンディン類似体は、親エキセンディン配列に対して、少なくとも70%、例えば70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%またはさらに高い配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、親エキセンディンは、エキセンディン - 4であり、エキセンディン類似体は、エキセンディン - 4に対して少なくとも70%、例えば70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%またはさらに高い配列同一性を有し得る。当技術分野で公知のように、GLP - 1 (グルカゴン様ペプチド1) は、エキセンディンではなく、GLP - 1の配列は、本明細書に記載された操作されたポリペプチドに適したエキセンディン配列から具体的に排除される。

30

## 【0088】

いくつかの実施形態では、ポリペプチドホルモンドメインを、ABDペプチドと共有結合によって連結するリンカー、例えば、本明細書に記載されたL1を有する化合物が提供される。いくつかの実施形態では、第1のリンカー (L1) は、操作されたポリペプチド内のHD1を共有結合によって連結する。いくつかの実施形態では、L1は結合である。いくつかの実施形態では、ポリペプチドホルモンドメイン (例えば、本明細書に記載されたHD1) は、ペプチドリンカーを介してABDペプチドと共有結合によって連結され得る。任意のリンカーがオプションである；すなわち、任意のリンカーが単に結合であり得る。存在する場合には、リンカーは主にスペーサー機能を果たすので、その化学構造は重要なものではない。一実施形態では、リンカーは、ペプチド結合によって連結している1~30個またはそれより少ないアミノ酸を含む。アミノ酸は、20種の天然に存在する (すなわち、生理学的) アミノ酸から選択され得る。あるいは、非天然アミノ酸は、化学合成、翻訳後化学修飾によってか、または宿主細胞における組換え発現によるインビボ組

40

50

込みのいずれかによって組み込まれ得る。これらのアミノ酸のうちいくつかは、グリコシル化され得る。別の実施形態では、1～30個またはそれより少ないアミノ酸が、グリシン、アラニン、プロリン、アスパラギン、グルタミンおよびリシン、さらにアスパラギン酸およびグルタミン酸から選択される。さらなる実施形態では、リンカーは、過半数の立体障害のないアミノ酸、例えば、グリシン、アラニンおよび/またはセリンで構成されている。「立体障害のない」とは、通例の意味において、小さい側鎖、例えば、0～2個の非水素原子を有し、その結果、大きな側鎖、例えば、Leu、Trp、Tyr、Pheなどを有するアミノ酸に対して立体障害(steric hinderance)が最小化されるアミノ酸を指す。ポリアラニン、ポリ(Gly-Ala)およびポリ(Gly-Ser)と同様に、ポリグリシンは、特に有用である、例えば、(Gly)<sub>3</sub>、(Gly)<sub>4</sub>(配列番号125)、(Gly)<sub>5</sub>(配列番号126)。荷電を有するポリグリシンは有用であり得、例えば、ポリ(Gly<sub>n</sub>-Glu)(配列番号127)、ポリ(Gly<sub>n</sub>-Lys)(配列番号128)、ポリ(Gly<sub>n</sub>-Asp)(配列番号129)およびポリ(Gly<sub>n</sub>-Arg)(配列番号130)モチーフ(配列中、nは1～6であり得る)を含む。リンカーのその他の特定の例として、(Gly)<sub>3</sub>Lys(Gly)<sub>4</sub>(配列番号131);(Gly)<sub>3</sub>AsnGlySer(Gly)<sub>2</sub>(配列番号132);(Gly)<sub>3</sub>Cys(Gly)<sub>4</sub>(配列番号133);およびGlyProAsnGlyGly(配列番号134)がある。GlyおよびSerの組合せと同様に、GlyおよびAlaの組合せは、特に有用である。したがって、さらなる実施形態では、ペプチドリンカーは、グリシンリッチペプチド、例えば、Gly-Gly-Gly;配列[Gly-Ser]<sub>n</sub>(配列番号135)、[Gly-Gly-Ser]<sub>n</sub>(配列番号136)、[Gly-Gly-Gly-Ser]<sub>n</sub>(配列番号137)および[Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]<sub>n</sub>(配列番号138)(配列中、nは、1、2、3、4、5または6である、例えば、[Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]<sub>3</sub>(配列番号721))からなる群から選択される。「グリシンリッチペプチド」とは、複数のグリシン残基、好ましくは、大多数のグリシン残基、より好ましくは、圧倒的多数のグリシン残基を含むポリペプチドを指す。

#### 【0089】

特定の実施形態では、荷電を有するリンカーが使用され得る。このような荷電リンカーは、相当な数の酸性残基(例えば、Asp、Gluなど)を含有し得るか、または相当な数の塩基性残基(例えば、Lys、Argなど)を含有し得、その結果、リンカーは、それぞれ、7より低いか、または7より大きいpIを有する。技術者には理解されるように、すべてのその他の事柄が等しいとして、所与のリンカー中の酸性または塩基性残基の相対量が多いほど、そのリンカーのpIは、それぞれ、より低く、またはより高くなる。このようなリンカーは、ペプチドpI(等電点)を修飾することなどの本明細書に開示された操作されたポリペプチドに有利な特性を付与し得、これは、順に、特定のpHでの、例えば、生理学的pH(例えば、境界を含めたpH7.2からpH7.6の間)での、またはこのようなポリペプチドを含む医薬組成物における、このようなポリペプチドの溶解度および/または安定性特徴を改善し得る。当技術分野で公知であるように、ペプチドの溶解度は、ペプチドのpIから少なくとも±1pH単位または±1pH単位より多いpHを有する組成物における製剤によって改善され得る。

#### 【0090】

例えば、「酸性リンカー」とは、7未満;境界も含めた6から7の間;境界も含めた5から6の間;境界も含めた4から5の間;境界も含めた3から4の間;境界も含めた2から3の間;または境界も含めた1から2の間のpIを有するリンカーである。同様に、「塩基性リンカー」とは、7より大きい;境界も含めた7から8の間;境界も含めた8から9の間;境界も含めた9から10の間;境界も含めた10から11の間;境界も含めた11から12の間または境界も含めた12から13の間のpIを有するリンカーである。特定の実施形態では、酸性リンカーは、[Gly-Glu]<sub>n</sub>(配列番号139);[Gly-Gly-Glu]<sub>n</sub>(配列番号140);[Gly-Gly-Gly-Glu]<sub>n</sub>(配列番号141);[Gly-Gly-Gly-Gly-Glu]<sub>n</sub>(配列番号142)

10

20

30

40

50

、 $[Gly - Asp]_n$  (配列番号143) ;  $[Gly - Gly - Asp]_n$  (配列番号144) ;  $[Gly - Gly - Gly - Asp]_n$  (配列番号145) ;  $[Gly - Gly - Gly - Gly - Asp]_n$  (配列番号146) [配列中、 $n$ は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上である ; 例えば、 $[Gly - Gly - Glu]_6$  (配列番号722) ]の群から選択される配列を含有する。特定の実施形態では、塩基性リンカーは、 $[Gly - Lys]_n$  (配列番号147) ;  $[Gly - Gly - Lys]_n$  (配列番号148) ;  $[Gly - Gly - Gly - Lys]_n$  (配列番号149) ;  $[Gly - Gly - Gly - Gly - Lys]_n$  (配列番号150) 、 $[Gly - Arg]_n$  (配列番号151) ;  $[Gly - Gly - Arg]_n$  (配列番号152) ;  $[Gly - Gly - Gly - Arg]_n$  (配列番号153) ;  $[Gly - Gly - Gly - Gly - Arg]_n$  (配列番号154) [配列中、 $n$ は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上である ; 例えば、 $[Gly - Gly - Lys]_6$  (配列番号723) ]の群から選択される配列を含有する。

10

#### 【0091】

さらに、特定の構造的モチーフまたは特徴、例えば、ヘリックスを有するリンカーが、調製され得る。例えば、このようなリンカーは、 $[Glu - Ala - Ala - Ala - Lys]_n$  (配列番号155) [配列中、 $n$ は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上である ; 例えば、 $[Glu - Ala - Ala - Ala - Lys]_3$  (配列番号724) 、 $[Glu - Ala - Ala - Ala - Lys]_4$  (配列番号725) または $[Glu - Ala - Ala - Ala - Lys]_5$  (配列番号726) ]の群から選択される配列を含有し得る。当業者ならば、任意の特定のリンカー配列のヘリックス含量を容易に決定できる。

20

#### 【0092】

ペプチドリンカー以外の生体適合性リンカーは、エキセンディンC末端を、ABD配列のN末端に共有結合によって付けるために使用され得る。リンカーは、生体適合性ポリマー、好ましくは、水溶性、より好ましくは、約50kD~約5000kDまたは約50kD~500kDまたは約100kD~500kDであり得る。例示的生体適合性、水溶性ポリマーリンカーとして、 $-(CH_2 - CH_2 - O)_n -$  (式中、 $n$ は、PEGリンカーが、100~5000kD、好ましくは、100~500kDの分子量を有し得るようなものである) などのPEGリンカーがある。このようなリンカーは、 $-NH - CH_2 - CH_2 - (O - CH_2 - CH_2)_n - O - CH_2 - CO -$  (式中、 $n$ は、PEGリンカー分子量が、100kD~5000kD、好ましくは、10kD~500kDであるようなものである) であり得る。それだけには限らないが、多糖、ポリプロピレングリコールならびにプロピレンおよびエチレングリコールのコポリマーなどを含めた、その他の生体適合性ポリマーが使用され得る。通常、このようなリンカーは、同一または異なる反応性基であり得る各末端に反応性基を含む。反応性基を有するこのようなリンカーは、公知であり、利用可能である。好ましくは、反応性基は、ペプチドのN末端アミノまたはC末端カルボキシ基のいずれかと反応性である。例えば、反応性基は、当技術分野で公知のように、ブチルアルデヒド、プロピオンアルデヒド、アルデヒド、スクシンイミドまたはマレイミド部分であり得る。低級アルキル(例えば、 $C_1 - C_6$ )、低級アシル、ハロゲン、CNおよび $NH_2$ などの、ペプチド機能を立体障害しない任意の基によってさらに置換され得る、 $-NH - (CH_2)_n - C(O) -$  (式中、 $n = 2 \sim 20$ ) などのアルキルリンカーは、あまり好ましくない。

30

40

#### 【0093】

本発明に従う使用に適したリンカーは、上記および本明細書に記載の特徴およびモチーフのうちの1つまたは複数を有し得るということも理解される。例えば、リンカーは、酸性リンカーならびに構造的モチーフ、例えば、ヘリックスを含み得る。同様に、リンカーは、塩基性リンカーおよび構造的モチーフ、例えば、ヘリックスを含み得る。リンカーは、酸性リンカー、塩基性リンカーおよびヘリックスなどの構造的モチーフを含み得る。さらに、本発明に従う操作されたポリペプチドは、2以上のリンカーを有することも

50

あり、このような各リンカーは、本明細書に記載の特徴のうち1以上を有し得るといふことも理解される。

【0094】

本明細書に記載されたリンカーは、例示的なものであり、本発明の範囲内のリンカーは、より長いものであり得、その他の残基を含み得る。一実施形態では、エキセンディン配列が、リンカーを伴わずにABD配列と直接連結している操作されたポリペプチドは、明確に排除される。

【0095】

いくつかの実施形態では、操作されたポリペプチドは、C末端にABD配列を、N末端にHD1配列を含む。特定の好ましい実施形態では、N末端は、エキセンディン配列、エキセンディン断片配列またはエキセンディン類似体配列である。ABDおよびHD1を含む実施形態に加えて、操作されたポリペプチドは、構造HD1-ABDを有し得る。

10

【0096】

本明細書に示された操作されたポリペプチドのN末端および/またはC末端の明確な指示がない場合には、操作されたポリペプチドは、N末端からC末端配向で読まれるといふことは理解される。例えば、HD1が、エキセンディン化合物またはその類似体の配列を有する場合には、用語HD1-ABD、HD1-L1-ABD、HD1-ABDなどは、N末端および/またはC末端の明確な指示がない場合には、エキセンディン配列またはその類似体が操作されたポリペプチドのN末端にあり、ABDがC末端にあることを意味する。反対に、N末端および/またはC末端が明確に指示される場合には、操作されたポリペプチドは、末端の明確な指示に従って読まれる。例えば、用語HD1<sub>C-term</sub>-ABD、HD1-L1-ABD<sub>N-term</sub>などは、ABDが操作されたポリペプチドのN末端にあり、HD1がC末端にあることを意味する。

20

【0097】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載された操作されたポリペプチドは、ABDポリペプチド単独、すなわち、融合されたホルモンドメインがない場合の親和性とは異なる、血清アルブミンに対する親和性を有する。効果的な会合を得るために、操作されたポリペプチドは、解離定数 $K_D$ が、例えば、約 $10^{-6}$  M、 $10^{-7}$  M、 $10^{-8}$  M、 $10^{-9}$  M、 $10^{-10}$  M、 $10^{-11}$  M、 $10^{-12}$  M、 $10^{-13}$  M、 $10^{-14}$  Mまたはさらに $10^{-15}$  M未満であるような、血清アルブミンに対する結合親和性を有し得る。いくつかの実施形態では、親和性は、操作されたポリペプチドが、アルブミンから解離し、生物学的応答、例えば、受容体、例えば、GLP-1受容体との結合を誘発し得るような過度に堅固なものではない。好ましくは、ヒト血清アルブミンに対する親和性は、制限するものではないが、アッセイおよび合成法を含め、参照によりその全文が、すべての目的のために本明細書に組み込まれるPCT公開出願第WO2009/016043号に記載されるように測定され得る。

30

【0098】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載された操作されたポリペプチドは、ホルモンドメインとコンジュゲートしている、血漿半減期を延長し得る種々の部分(例えば、PEGまたはFcまたはアルブミン)を有する対応する化合物よりも優れている。これに関連して、用語「優れた」とは、疾患または障害の治療の評価において検討され得るさまざまな機能特性を指す。例えば、本明細書に記載された操作されたポリペプチドは、ホルモンドメインとコンジュゲートしている種々の部分を有する対応する化合物よりも少ない、例えば、1x、2x、3x、4x、5x、またはいっそう少ない生物学的に活性な(ホルモンドメイン)成分しか必要とない場合がある。さらなる例のために、本明細書に記載された操作されたポリペプチドは、より高い効力、例えば、1.5x、2x、3x、4x、5x、10x、20x、50xまたはいっそう高い効力を有し得る。

40

【0099】

本明細書において考慮される操作されたポリペプチド化合物として、以下の表2に示される化合物が挙げられる。好ましい化合物は、化合物5、化合物9および化合物11であ

50

る。

【 0 1 0 0 】

【 表 2 - 1 】

表2. 選択された例示的な操作されたポリペプチド

化合物	配列	配列番号
5	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISTGGGGSAS GSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAIL AALP	727
6	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPKSTGGGGS ASGSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKD AILAALP	728
7	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSTGGGGS ASGSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKD AILAAL	729
8	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSTGGGGS ASGSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKD AILAALP	730
9	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSGSLAE AKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	731
10	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSTGGGGS ASGSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKD AILAALP	732
11	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSGSLAE AKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	733
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISTGGGGSAS GSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAIL AAL	734
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPKSTGGGGS ASGSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKD AILAAL	735
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSTGGGGS ASGSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKD AILAA	736
	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSTGGGGS ASGSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKD AILAAL	737
	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSGSLAE AKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL	738
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSGSLAE AKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL	739
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISTGGGGSAS GSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAIL AA	740

10

20

30

40

【表 2 - 2】

HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPKSTGGGGS ASGSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKD AILAA	741
HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSTGGGGS ASGSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKD AILAA	742
HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGSLAE AKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAA	743
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSTGGGGS ASGSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKD AILAA	744
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGSLAE AKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAA	745

10

## 【 0 1 0 1 】

本明細書において具体的に考慮されるさらなる操作されたポリペプチド化合物は、具体的に示される場合、適宜、本明細書に開示された L 1 配列のいずれかを有する H D 1 および A B D 成分にいずれかを有し、以下の表 3 において開示されるものを含めた、本明細書における表および列挙の操作されたポリペプチドのいずれかの構造を有する化合物を含む：

20

## 【 0 1 0 2 】

## 【表 3 - 1】

表 3 . 選択された例示的な操作されたポリペプチド

化合物	配列	配列番号
5	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISTGGGGSASGSLAEAKE AANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	727
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISTGGGGSASGSLAEAKE AANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL	734
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISTGGGGSASSLAEAKEA ANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	746
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISTGGGGSASGSLAEAKE AANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAA	740
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISTGGGGSASSLAEAKEA ANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL	747
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISTGGGGSASLAEAKEAA NAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	748
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISTGGGGSASLAEAKEAA NAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL	749
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISGGGGSALAEAKEAANA ELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	750
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISGGGGSALAEAKEAANA ELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL	751
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISGGGSLAEAKEAANAEL DSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	752
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISGGGSLAEAKEAANAEL DSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL	753
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISGGGLAEAKEAANAEL DSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	754
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISGGGLAEAKEAANAEL DSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL	755
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISGGSLAEAKEAANAELD SYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	756
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISGGSLAEAKEAANAELD SYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL	757
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISGSLAEAKEAANAELDS YGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	985
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISGSLAEAKEAANAELDS YGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL	986
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISGLAEAKEAANAELDSY GVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	987
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISGLAEAKEAANAELDSY GVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL	988

10

20

30

40

【表 3 - 2】

6	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPKSTGGGGS ASGSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKD AILAALP	728
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPKSTGGGGS ASGSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKD AILAAL	735
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPKSTGGGGS ASSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAI LAALP	758
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPKSTGGGGS ASSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAI LAAL	759
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPKSTGGGGS ASLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAIL AALP	760
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPKSTGGGGS ASLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAIL AAL	761
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPKSGGGGSL AEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL P	762
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPKSGGGGSL AEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL	763
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPKSGGGSLA EAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	764
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPKSGGGSLA EAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL	765
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPKSGGGLAE AKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	766
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPKSGGGLAE AKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL	767
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPKSGGSLAE AKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	768
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPKSGGSLAE AKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL	769
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPKSGSLAEA KEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	770
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPKSGSLAEA KEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL	771
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPKSGLAEAK EAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	772
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPKSGLAEAK EAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL	773
	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPKSTGGGG SASGSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKD AILAALP	774

10

20

30

40

【表 3 - 3】

HGEGTFTSDLSKQMEEEA VRLFIEWLKNGGPSSGAPPKSTGGGG SASGLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKD AILAAL	775	
HGEGTFTSDLSKQMEEEA VRLFIEWLKNGGPSSGAPPKSTGGGG SASSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDA ILAALP	776	
HGEGTFTSDLSKQMEEEA VRLFIEWLKNGGPSSGAPPKSTGGGG SASSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDA ILAAL	777	10
HGEGTFTSDLSKQMEEEA VRLFIEWLKNGGPSSGAPPKSTGGGG SASLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAI LAALP	778	
HGEGTFTSDLSKQMEEEA VRLFIEWLKNGGPSSGAPPKSTGGGG SASLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAI LAAL	779	
HGEGTFTSDLSKQMEEEA VRLFIEWLKNGGPSSGAPPKSGGGGS LAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAA LP	780	20
HGEGTFTSDLSKQMEEEA VRLFIEWLKNGGPSSGAPPKSGGGGS LAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAA L	781	
HGEGTFTSDLSKQMEEEA VRLFIEWLKNGGPSSGAPPKSGGGSL AEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL P	782	
HGEGTFTSDLSKQMEEEA VRLFIEWLKNGGPSSGAPPKSGGGSL AEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL	783	
HGEGTFTSDLSKQMEEEA VRLFIEWLKNGGPSSGAPPKSGGGGLA EAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	784	30
HGEGTFTSDLSKQMEEEA VRLFIEWLKNGGPSSGAPPKSGGGGLA EAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL	785	
HGEGTFTSDLSKQMEEEA VRLFIEWLKNGGPSSGAPPKSGGSLAE AKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	786	
HGEGTFTSDLSKQMEEEA VRLFIEWLKNGGPSSGAPPKSGGSLAE AKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL	787	
HGEGTFTSDLSKQMEEEA VRLFIEWLKNGGPSSGAPPKSGSLAEA KEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	788	
HGEGTFTSDLSKQMEEEA VRLFIEWLKNGGPSSGAPPKSGSLAEA KEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL	789	40
HGEGTFTSDLSKQMEEEA VRLFIEWLKNGGPSSGAPPKSGLAEA KEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	790	
HGEGTFTSDLSKQMEEEA VRLFIEWLKNGGPSSGAPPKSGLAEA KEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL	791	

【表 3 - 4】

10	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSTGGGGS ASGLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKD AILAALP	732	
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSTGGGGS ASSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAI LAALP	792	
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSTGGGGS ASGLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKD AILAA	736	10
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSTGGGGS ASSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAI LAAL	793	
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSTGGGGS ASLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAIL AALP	794	
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSTGGGGS ASLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAIL AAL	795	20
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGGGSL AEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL P	796	
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGGGSL AEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL	797	
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGGSLA EAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	798	
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGGSLA EAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL	799	30
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGLAE AKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	800	
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGLAE AKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL	801	

【表 3 - 5】

11	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGSLAE AKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	733	
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGSLAE AKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL	739	
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGSLAEA KEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	802	
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGSLAEA KEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL	803	10
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGLAEAK EAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	804	
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGSLAE AKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAA	745	
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGLAEAK EAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL	805	
8	HGEGTFTSDLSKQMEEEA VRLFIEWLKNGGPSSGAPPSTGGGGGS ASGSLAEAKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKD AILAALP	730	
	HGEGTFTSDLSKQMEEEA VRLFIEWLKNGGPSSGAPPSTGGGGGS ASGSLAEAKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKD AILAAL	737	20
	HGEGTFTSDLSKQMEEEA VRLFIEWLKNGGPSSGAPPSTGGGGGS ASSLAEAKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAI LAALP	806	
	HGEGTFTSDLSKQMEEEA VRLFIEWLKNGGPSSGAPPSTGGGGGS ASSLAEAKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAI LAAL	807	
	HGEGTFTSDLSKQMEEEA VRLFIEWLKNGGPSSGAPPSTGGGGGS ASLAEAKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAIL AALP	808	30
	HGEGTFTSDLSKQMEEEA VRLFIEWLKNGGPSSGAPPSTGGGGGS ASLAEAKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAIL AAL	809	
	HGEGTFTSDLSKQMEEEA VRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGGGSL AEAKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL P	810	
	HGEGTFTSDLSKQMEEEA VRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGGGSL AEAKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL	811	40
	HGEGTFTSDLSKQMEEEA VRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGGSLA EAKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	812	
	HGEGTFTSDLSKQMEEEA VRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGGSLA EAKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL	813	
	HGEGTFTSDLSKQMEEEA VRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGGLAE AKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	814	
	HGEGTFTSDLSKQMEEEA VRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGGLAE AKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL	815	

【表 3 - 6】

9	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGSLAE AKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	731	
	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGSLAE AKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL	738	
	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGSLAE AKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAA	743	
	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGSLAEA KEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	816	10
	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGSLAEA KEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL	817	
	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSLAEAK EAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	818	
	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSLAEAK EAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL	819	
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSKKKKKKKT GGGGSASGSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVE ALKDAILAALP	820	20
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSKKKKKKKT GGGGSASGSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVE ALKDAILAAL	821	
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSKKKKKKKT GGGGSASSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEA LKDAILAALP	822	
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSKKKKKKKT GGGGSASSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEA LKDAILAAL	823	
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSKKKKKKKT GGGGSASLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEA LKDAILAALP	824	30
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSKKKKKKKT GGGGSASLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEA LKDAILAAL	825	
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSKKKKKKK GGGGSALAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALK DAILAALP	826	
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSKKKKKKK GGGGSALAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALK DAILAAL	827	40
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSKKKKKKK GGGSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKD AILAALP	828	
	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSKKKKKKK GGGSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKD AILAAL	829	

【表 3 - 7】

HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSKKKKKKK GGGLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAI LAALP	830
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSKKKKKKK GGGLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAI LAAL	831
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSKKKKKKK GGSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAI LAALP	832
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSKKKKKKK GGSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAI LAAL	833
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSKKKKKKK GSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAI AALP	834
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSKKKKKKK GSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAI AAL	835
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSKKKKKKK GLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAI ALP	836
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSKKKKKKK GLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAI AL	837

10

20

## 【 0 1 0 3 】

具体的には、N末端メチオニンが全く存在しない上記の配列の化合物が考慮される。N末端メチオニンは、細菌発現にとって好都合なものとして主に存在し得る。しかし、本発明の操作されたペプチドは、所望のホルモンまたはA B D配列の天然に存在する成熟ペプチド対応物において見られるようなN末端アミノ酸（すなわち、付加されたメチオニンまたは他のリーダー配列を有さない）をもたらす翻訳後N末端タンパク質分解プロセッシングを有する真核細胞の宿主細胞〔例えば、酵母（例えば、ピチア（*P i c h i a*））、哺乳類、バキュロウイルス〕またはその他の宿主細胞において発現され得る。あるいは、発現および/または分泌（およびさらには精製）に使用されるN末端配列は、例えば、TEVなどのプロテアーゼの使用によってのように、翻訳後に除去され得るものであり得る。

30

## 【 0 1 0 4 】

## I I I . 設計および製造方法

コンストラクトの設計。本明細書に記載された操作されたポリペプチドは、アミノ酸レベルで設計され得る。次いで、これらの配列は、当技術分野で公知のさまざまなソフトウェア製品を使用して、例えば、タンパク質発現、コドン最適化、制限部位含量に基づいて、ヌクレオチド配列が、所望の発現宿主にとって最適化されるように逆翻訳され得る。例えば、ヌクレオチド配列は、タンパク質発現に基づいて、および制限部位含量について、大腸菌（*E . c o l i*）にとって最適化され得る。対象とするヌクレオチド配列に基づいて、当技術分野で公知の多段階PCRのために重複するオリゴヌクレオチドが、提供され得る。これらのオリゴヌクレオチドは、対象とするタンパク質をコードするcDNAを構築するための当技術分野で周知の条件下で多重PCR反応において使用され得る。一例については、1 × *A m p l i t a q* バッファー、1 . 3 m M *M g C l 2*、2 0 0 u M d

40

50

NTP、4U Amplitaq Gold、0.2uMの各プライマー（Amplitaq Gold、ABI）であり、サイクリングパラメータ：（94C：30秒、58C：1分、72C：1分）、35サイクルを用いる。

【0105】

制限部位が、当技術分野で公知のベクター連結において使用されるためのPCR産物の末端に付加されてもよい。特定の部位は、cDNAが、次いで、pET45b発現ベクター（Novagen）において適切なリーディングフレームにあり得るように、Nde1およびXho1を含み得る。これらの部位を使用することによって、このベクターにおいて、翻訳開始部位として除去され得る任意のN末端Hisタグが、タグの下流となる。発現コンストラクトが完了されると、例えば、当技術分野で公知のT7プロモータープライマー、T7ターミネータープライマーおよび標準ABI BigDye Term v3.1プロトコールを使用して配列決定することによって、検証が実施され得る。配列情報は、例えば、ABI 3730 DNA分析器から得ることができ、ベクターNTI v.10ソフトウェア（Invitrogen）を使用して分析され得る。発現コンストラクトは、当技術分野で公知の、リンカー配列が容易に切断除去され、変更され得るモジュラー法で設計され得る。

10

【0106】

当技術分野で公知の、または本明細書に記載されたプロテアーゼ認識部位は、本明細書に記載された組換え操作ポリペプチドの設計、構築、操作および製造にとって有用なコンストラクト中に組み込まれ得る。

20

【0107】

例示的コンストラクト。本明細書において考慮される操作されたポリペプチドの製造において有用なコンストラクトとして、以下の表4に示されるポリペプチドをコードするコンストラクトが挙げられる。

【0108】

## 【表 4】

表 4. 操作されたポリペプチドの組換え製造のための選択された例示的コンストラクト

MAHHHHHHVGTGSNENLYFQ HGEFTFTSDLKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISTGGGGSASGSLAEAKEAAN AELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP (配列番号 838)	
MSDKIIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAEWCGPCKMIAPILDEIADEYQGKLTV AKLNIDQNPGTAPKYGIRGIPTLLLFKNGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLAGS GSGHMHHHHHHSSGLVPRGSGMKETA AAKFERQHMDSPDLGTENLYFQ HGEFTFTSDLKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISTGGGGSASGSLAEAKEAAN AELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP (配列番号 839)	10
MAHHHHHHVGTGSNENLYFQ HGEFTFTSDLKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSTGGGGSASGSLAEAKEA ANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP (配列番号 840)	
MSDKIIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAEWCGPCKMIAPILDEIADEYQGKLTV AKLNIDQNPGTAPKYGIRGIPTLLLFKNGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLAGS GSGHMHHHHHHSSGLVPRGSGMKETA AAKFERQHMDSPDLGTENLYFQ HGEFTFTSDLKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSTGGGGSASGSLAEAKEA ANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP (配列番号 841)	20
MAHHHHHHVGTGSNENLYFQ HGEFTFTSDLKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSTGGGGSASGSLAEAKEA ANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP (配列番号 842)	
MSDKIIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAEWCGPCKMIAPILDEIADEYQGKLTV AKLNIDQNPGTAPKYGIRGIPTLLLFKNGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLAGS GSGHMHHHHHHSSGLVPRGSGMKETA AAKFERQHMDSPDLGTENLYFQ HGEFTFTSDLKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSTGGGGSASGSLAEAKEA ANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP (配列番号 843)	30

## 【 0 1 0 9 】

一般的な製造方法。本明細書に記載された操作されたポリペプチド化合物は、当技術分野で公知の、生物学的、化学的および/または組換え DNA 技術を使用して調製され得る。例示的方法は、本明細書ならびにその開示内容が参照によりその全文で、すべての目的のために本明細書に組み込まれる米国特許第 6, 872, 700 号; WO 2007/139941; WO 2007/140284; WO 2008/082274; WO 2009/011544; および米国公開第 2007/0238669 号に記載されている。化合物を調製するためのその他の方法は本明細書に示されている。

## 【 0 1 1 0 】

本明細書に記載された操作されたポリペプチド化合物は、自動化または半自動化ペプチドシンセサイザーなどの標準的な固相ペプチド合成技術を使用して調製され得る。手短には、一般に、A B D および治療用ホルモンペプチドは、別個に製造され、次いで、一緒にコンジュゲートされ得るか、または単一ポリペプチドとして製造され得る。したがって、アルブミン結合ポリペプチド、治療用ホルモンまたは操作されたポリペプチドは、別法として、保護された反応性側鎖を有するアミノ酸および/またはアミノ酸誘導体を使用する非生物学的ペプチド合成、保護された反応性側鎖を有する第 1 の態様のポリペプチドを形成するためのアミノ酸および/またはアミノ酸誘導体の段階的カップリングを含む非生物学的ペプチド合成、ポリペプチドの反応性側鎖から保護基を除去することおよび水溶液中でのポリペプチドのフォールディングによって製造され得る。したがって、正常なアミノ酸 (例えば、グリシン、アラニン、フェニルアラニン、イソロイシン、ロイシンおよびバ

10

20

30

40

50

リン) および予め保護されたアミノ酸誘導体が、溶液中または有機溶媒中、固相支持体上でポリペプチド配列を逐次構築するために使用される。完全なポリペプチド配列が構築されると、保護基が除去され、ポリペプチドは、水溶液中でフォールディングすることが許される。

#### 【0111】

本開示内容に従う各ポリペプチドは、可逆的にフォールディングし、A B Dドメインは、因子が付加されることなく3ヘリックスバンドドメインに可逆的にフォールディングし、ひいては、自発的にフォールディングする。操作されたコンジュゲートは、例えば、本明細書に記載されるような任意の方法に従って、例えば、非生物学的ペプチド合成によって、アルブミン結合ポリペプチドを製造することおよび製造されたA B Dポリペプチドを、本明細書において定義された治療用ホルモンとコンジュゲートすることを含む方法によって製造され得る。本明細書におけるA B Dは、完全に可逆的にフォールディングする。これを、円二色性スペクトル分析: 20 でとられた1つのスペクトルおよび90 に加熱し、続いて、20 に戻った後の第2のスペクトルによって評価した。この手順の間に、当技術分野において公知のT<sub>m</sub>を求め、変性ポリペプチドのフォールディング後に変化しないことがわかった。

10

#### 【0112】

典型的には、このような技術を使用して、-N-カルバモイル保護されたアミノ酸および樹脂上で伸長中のペプチド鎖に付いているアミノ酸が、塩基(例えば、ジイソプロピルエチルアミンなど)の存在下、カップリング剤(例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミド、1-ヒドロキシベンゾ-トリアゾールなど)の存在下、不活性溶媒(例えば、ジメチルホルムアミド、N-メチルピロリジノン、塩化メチレンなど)中、室温でカップリングされる。-N-カルバモイル保護基は、試薬(例えば、トリフルオロ酢酸、ピペリジンなど)を使用して、得られたペプチド樹脂から除去され、カップリング反応が、ペプチド鎖に付加されるべき次の所望のN保護アミノ酸を用いて反復される。t-ブチルオキシカルボニル(t B o c)フルオレニルメトキシカルボニル(F m o c)などといった適したN保護基が、当技術分野で周知である。ペプチドシンセサイザーにおいて使用される溶媒、アミノ酸誘導体および4-メチルベンゾヒドリル-アミン樹脂は、Applied Biosystems Inc. (Foster City, CA)から購入することができる。

20

30

#### 【0113】

一般に、固相合成は、商業的スケールへの優れた拡張性を有する直接的なアプローチであり、一般的に、比較的長い操作されたポリペプチドに適合するので、操作されたポリペプチドの化学合成には、固相ペプチド合成が使用され得る。固相ペプチド合成は、自動化ペプチドシンセサイザー(モデル430A、Applied Biosystems Inc.、Foster City, CA)を用い、NMP/HOBt(オプション1)システムおよびカップリングを用いるt B o cまたはF m o c化学(APPLIED BIOSYSTEMS USER'S MANUAL FOR THE ABI 430A PEPTIDE SYNTHESIZER, Version 1.3B Jul. 1, 1988, section 6, pp. 49-70、Applied Biosystems Inc.、Foster City, CAを参照のこと)を使用して実施され得る。B o c-ペプチド-樹脂は、HF(-5 ~ 0、1時間)を用いて切断され得る。ペプチドは、水および酢酸を交互に用いて樹脂から抽出され得、濾液を凍結乾燥した。F m o c-ペプチド樹脂は、標準法に従って切断され得(例えば、Introduction to Cleavage Techniques, Applied Biosystems, Inc., 1990, pp. 6-12)。ペプチドはまた、Advanced Chem Techシンセサイザー(モデルMPS 350、Louisville, Ky.)を使用してアセンブルされ得る。

40

#### 【0114】

より良好な収率を提供した化学合成法を、化合物11について以下のとおりに例示する。固相合成は、デフォルト「二重カップリング」設定を使用し、F o m c - P r o - N o v a s y n T G T樹脂(0.2ミリモル/g)を使用するP r e l u d e 6チャンネルペ

50

プチドシンセサイザー (Protein Technologies, Inc., Tucson, AZ, USA) を使用して実施した。しかし、V S (アミノ酸位置 59 ~ 60) および K T (アミノ酸位置 71 ~ 72) 配列については、シュードプロリン (pseudoproline) 二重カップリングを使用し、アミノ酸 V 19、R 20、I 23 および P 37 については、三重カップリングを使用した。His 1 から Ser 39 までのエキセンディン部分については、H A T U / D I E A 二重または三重カップリング (各約 60 分、6 x 過剰の試薬) を、特に断りのない限り、20% ピペリジン 2 x 15 分を用いるブロッキングを用いて実施した。リンカーおよび A B D 部分については、特に断りのない限り、20% ピペリジン 2 x 15 分を用いるブロッキングを用いて H A T U / D I E A 二重カップリングを実施した (各約 60 分、3 x 過剰の試薬)。ポリペプチド精製は、溶媒としてアセトニトリルを使用し、C 5 カラムで R P - H P L C 精製を使用して実施し、溶出されたサンプルを、溶媒としてアセトニトリルを使用する C 18 カラムでの分析用 R P - H P L C での分析と、それに続く、第 1 の R P - H P L C においてより狭い勾配および溶媒としてアセトニトリルを使用する C 18 カラムでの分取 R P - H P L C とによって同定した。所望の操作されたポリペプチドを含有する画分をプールし、凍結乾燥した。

#### 【0115】

本明細書に記載された化合物 (エキセンディン、A B D、リンカー、操作されたポリペプチド) はまた、Sambrook et al., 1989, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2d Ed., Cold Spring Harbor など、当技術分野で公知の方法を使用する組換え D N A 技術を使用して調製され得る。非ペプチド化合物は、当技術分野で公知の方法によって調製され得る。例えば、リン酸含有アミノ酸およびこのようなアミノ酸を含有するペプチドは、Bartlett et al, 1986, Biorg. Chem., 14:356-377 に記載されるものなどの当技術分野で公知の方法を使用して調製され得る。化合物は、当技術分野の方法を使用してか、または本明細書において記載されるようにコンジュゲートされ得る。

#### 【0116】

操作されたポリペプチドは、別法として、当技術分野で周知の組換え技術によって製造され得る。例えば、Sambrook et al., 1989 (Id.) を参照のこと。組換え技術によって製造されたこれらの操作されたポリペプチドは、ポリヌクレオチドから発現され得る。当業者ならば、このような操作されたポリペプチドをコードする、D N A および R N A を含めたポリヌクレオチドを、コドン使用の縮重を考慮して、野生型 c D N A、例えば、エキセンディン - 4 から得ることができ、示された置換を組み込むよう望まれるように、さらに操作できることは理解するであろう。これらのポリヌクレオチド配列は、微生物宿主において m R N A の転写および翻訳を促進するコドンを組み込み得る。このような製造配列は、当技術分野で周知の方法に従って容易に構築され得る。例えば、参照によりその全文が、すべての目的のために本明細書に組み込まれる W O 8 3 / 0 4 0 5 3 を参照のこと。上記のポリヌクレオチドはまた、適宜、N 末端メチオニル残基をコードし得る。本発明において有用な非ペプチド化合物は、当技術分野で公知の方法によって調製され得る。例えば、リン酸含有アミノ酸およびこのようなアミノ酸を含有するペプチドは、当技術分野で公知の方法を使用して調製され得る。例えば、Bartlett and Landen, 1986, Bioorg. Chem. 14: 356-77 を参照のこと。

#### 【0117】

操作されたポリペプチドコード配列を含有し、発現するために、さまざまな発現ベクター / 宿主系が使用され得る。これらとして、それだけには限らないが、組換えバクテリオファージ、プラスミドまたはコスミド D N A 発現ベクターを用いて形質転換された細菌などの微生物；酵母発現ベクターを用いて形質転換された酵母；ウイルス発現ベクター (例えば、バキュロウイルス) に感染した昆虫細胞系；ウイルス発現ベクター (例えば、カリフラワーモザイクウイルス、C a M V；タバコモザイクウイルス、T M V) を用いてトランスフェクトされたか、もしくは細菌発現ベクター (例えば、T i または p B R 3 2 2 プラスミド) を用いて形質転換された植物細胞系；または動物細胞系が挙げられる。組換えタンパク質製造において有用である哺乳類細胞として、それだけには限らないが、V E R

10

20

30

40

50

O細胞、HeLa細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞株、COS細胞（COS-7など）、WI38、BHK、HepG2、3T3、RIN、MDCK、A549、PC12、K562および293細胞が挙げられる。タンパク質の組換え発現の例示的プロトコールは、本明細書に記載されており、および/または当技術分野で公知である。

【0118】

そのようなものとして、新規の、有用なウイルスおよびプラスミドDNAベクター、新規の有用な形質転換され、トランスフェクトされた原核生物および真核生物の宿主細胞（培養で増殖した細菌、酵母および哺乳類細胞を含む）の作製ならびに本操作されたポリペプチドを発現できるこのような宿主細胞の培養された増殖のための新規の、有用な方法において、ポリヌクレオチド配列は有用である。本明細書において、操作されたポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列は、操作されたポリペプチドの産生不足が軽減される場合またはこのようなものの増大したレベルを必要とすることが満たされる場合において、遺伝子療法にとって有用であり得る。

10

【0119】

本発明はまた、本操作されたポリペプチドの組換えDNA製造のプロセスを提供する。(a) DNA分子の発現を促進する条件下で、操作されたポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有する宿主細胞を培養することと、(b) 操作されたポリペプチドを得ることとを含む、操作されたポリペプチドをコードする核酸を含有する宿主細胞から、操作されたポリペプチドを製造するプロセスが提供される。

【0120】

宿主細胞は、原核生物または真核生物のものであり得、細菌、哺乳類細胞（チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、サル細胞、ベビーハムスター腎臓細胞、癌細胞またはその他の細胞）、酵母細胞および昆虫細胞などが挙げられる。

20

【0121】

組換えタンパク質の発現のための哺乳類宿主系もまた、当業者には周知である。宿主細胞株は、発現されたタンパク質をプロセッシングし、タンパク質活性を提供するのに有用となる特定の翻訳後修飾をもたらす特定の能力について選択され得る。ポリペプチドのこのような修飾として、それだけには限らないが、アセチル化、カルボキシル化、グリコシル化、リン酸化、脂質化およびアシル化が挙げられる。タンパク質の「ブレプロ」型を切断する翻訳後プロセッシングはまた、正しい挿入、フォールディングおよび/または機能にとって重要であり得る。CHO、HeLa、MDCK、293、WI38などといった種々の宿主細胞が、このような翻訳後活性のための特定の細胞機構および特徴的な機構を有し、導入された外来タンパク質の正しい修飾およびプロセッシングを確実にするよう選択され得る。

30

【0122】

あるいは、本発明の操作されたポリペプチドを作製するために、酵母系が使用され得る。操作されたポリペプチドDNAのコーディング領域は、PCRによって増幅される。酵母プレ-プロ-リーダー配列をコードするDNAは、接合因子遺伝子のヌクレオチド1~20を含有する1種のプライマーおよびこの遺伝子のヌクレオチド255~235と相補的である別のプライマーを使用するPCR反応において、酵母ゲノムDNAから増幅される（Kurjan and Herskowitz, 1982, Cell, 30:933-43）。プレ-プロ-リーダーコード配列および操作されたポリペプチドコード配列断片は、プロモーターが、成熟した操作されたポリペプチドと融合しているプレ-プロ-因子からなる融合タンパク質の発現を指示するよう、酵母アルコールデヒドロゲナーゼ（ADH2）プロモーターを含有するプラスミド中にライゲーションされる。RoseおよびBroach（Rose & Broach, 1990, Meth. Enz., 185: 234-79, Goeddel ed., Academic Press, Inc., San Diego, CA）によって教示されるように、ベクターは、クローニング部位の下流のADH2転写ターミネーター、酵母「2-ミクロン」複製起点、酵母leu-2d遺伝子、酵母REP1およびREP2遺伝子、大腸菌-ラクタマーゼ遺伝子および大腸菌複製起点をさらに含む。-ラクタマーゼおよびleu-2d遺伝子は、それぞれ、細菌および酵母における選択を提供する

40

50

。leu-2d 遺伝子はまた、高レベルの発現を誘導する酵母中のプラスミドのコピー数の増大を促進する。REP1 および REP2 遺伝子は、プラスミドコピー数の調節に關与しているタンパク質をコードする。

#### 【0123】

前述の段落において記載されたDNAコンストラクトは、公知の方法、例えば、酢酸リチウム処理 (Steams et al., 1990, Meth. Enz. 185: 280-297) を使用して酵母細胞に形質転換される。ADH2 プロモーターは、増殖培地におけるグルコースの消耗の際に誘導される (Price et al., 1987, Gene 55:287)。プレ-プロ-配列は、細胞からの融合タンパク質の分泌を達成する。同時に、酵母KEX2タンパク質が、成熟した操作されたポリペプチドからプレ-プロ配列を切断する (Bitter et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:5330-5334)。

10

#### 【0124】

本発明の操作されたポリペプチドはまた、市販の発現系、例えば、ピチア (Pichia) 発現系 (Invitrogen, San Diego, CA) を使用し、製造業者の使用説明書に従って、酵母、例えば、ピチア (Pichia) において組換えによって発現され得る。この系はまた、分泌を指示するプレ-プロ-配列に頼るものであるが、挿入断片の転写は、メタノールによる誘導の際にアルコールオキシダーゼ (AOX1) プロモーターによって駆動される。分泌された操作されたポリペプチドは、例えば、細菌および哺乳類細胞上清から前記の操作されたポリペプチドを精製するために使用される方法によって酵母増殖培地から精製される。

20

#### 【0125】

あるいは、操作されたポリペプチドをコードするDNAは、バキュロウイルス発現ベクター、例えば、pVL1393 (PharMingen, San Diego, CA) 中にクローニングされ得る。この操作されたポリペプチドをコードするベクターは、次いで、製造業者の指示書 (PharMingen) または例えば、SF9タンパク質を含まない培地で増殖させたスポドプテラ・フルギベルダ (Spodoptera frugiperda) 細胞に感染させる公知の技術に従って使用され、組換えタンパク質を製造する。タンパク質は、精製され、当技術分野で公知の方法、例えば、ヘパリン-セファロースカラム (Pharmacia, Piscataway, New Jersey) およびその後の分子サイジングカラム (Amicon, Beverly, Massachusetts) を使用して培地から濃縮され、適当な溶液、例えば、PBS中に再懸濁される。全アミノ酸アミノ酸配列分析、例えば、Proton 2090ペプチドシーケンサーでのエドマン分解またはそのN末端配列の確認ができるように、例えば、所望の操作されたポリペプチドの大きさが確認される単一バンドを示すことによってタンパク質を特性決定するために、SDS-PAGE分析が使用され得る。

30

#### 【0126】

例えば、予測された成熟した操作されたポリペプチドをコードするDNA配列は、所望のプロモーターおよび、適宜、リーダー配列 (例えば、Better et al., 1988, Science 240:1041-1043を参照のこと) を含有するプラスミド中にクローニングされ得る。このコンストラクトの配列は、自動化配列決定によって確認され得る。次いで、プラスミドは、細菌のCaCl<sub>2</sub>インキュベーションおよび熱ショック処理を使用する標準手順を使用して大腸菌、MC1061株に形質転換される (Sambrook et al., Id.). 形質転換された細菌は、カルベニシリンを補給したLB培地で増殖され、適した培地における増殖によって発現されたタンパク質の製造が誘導される。リーダー配列は、存在する場合には、成熟した操作されたポリペプチドの分泌に影響を及ぼし、分泌の際に切断される。分泌された組換え操作されたポリペプチドは、本明細書に記載された方法によって細菌培養培地から精製される。

40

#### 【0127】

あるいは、操作されたポリペプチドは、昆虫系において発現され得る。タンパク質発現のための昆虫系は、当業者に周知である。1つのこのような系では、スポドプテラ・フル

50

ギペルダ細胞において、またはトリコプルシア幼虫 (*Trichoplusia larva*) において外来遺伝子を発現するためのベクターとして、オートグラフィア・カリフォルニカ (*Autographa californica*) 核多角体病ウイルス (ACNPV) が使用される。操作されたポリペプチドコード配列は、ポリヘドリン遺伝子などのウイルスの非必須領域中にクローニングされ、ポリヘドリンプロモーターの制御下に置かれる。操作されたポリペプチドの挿入の成功は、ポリヘドリン遺伝子を不活性にし、コートタンパク質コートを欠く組換えウイルスを製造する。次いで、組換えウイルスを使用して、*S. フルギペルダ*細胞またはトリコプルシア幼虫に感染させ、そこで、本発明の操作されたポリペプチドが発現される (Smith et al., 1983, *J. Virol.* 46:584; Engelhardt et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:3224-3227)。

10

## 【0128】

別の例では、操作されたポリペプチドをコードするDNA配列は、PCRによって増幅され、適当なベクター、例えば、pGEX-3X (Pharmacia, Piscataway, New Jersey) 中にクローニングされ得る。pGEXベクターは、ベクターによってコードされるグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) と、ベクターのクローニング部位中に挿入されたDNA断片によってコードされるタンパク質とを含む融合タンパク質を製造するよう設計される。PCRのプライマーは、例えば、適当な切断部位を含むよう作製され得る。次いで、組換え融合タンパク質は、融合タンパク質のGST部分から切断され得る。pGEX-3X / 操作されたポリペプチドコンストラクトは、大腸菌XL-1 Blue細胞 (Stratagene, La Jolla, CA) 中に形質転換され、個々の形質転換体が単離され、LB培地 (カルベニシリンを補給した) 中、0.4の波長600nmでの光学濃度に37で増殖され、続いて、0.5mM イソプロピル-D-チオガラクトピラノシド (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri) の存在下で4時間さらにインキュベートされる。個々の形質転換体からプラスミドDNAが精製され、自動シーケンサーを使用して部分配列決定され、適切な配向での所望の操作されたポリペプチドをコードする遺伝子挿入断片の存在が確認される。

20

## 【0129】

融合タンパク質は、細菌中で不溶性封入体として製造されると予測される場合には、上記のように、または以下のように精製され得る。細胞を、遠心分離によって収穫し、0.15M NaCl、10mM Tris、pH8、1mM EDTAで洗浄し、0.1mg/mL リゾチーム (Sigma Chemical Co.) を用いて室温で15分間処理する。溶解物を、超音波処理によって切断し、12,000xgで10分間の遠心分離によって細胞片をペレットにする。融合タンパク質を含有するペレットを50mM Tris、pH8および10mM EDTA中に再懸濁し、50% グリセロール上に層にし、6000xgで30分間遠心分離する。ペレットを、Mg<sup>++</sup>およびCa<sup>++</sup>を含まない標準リン酸緩衝生理食塩水溶液 (PBS) に再懸濁する。変性SDSポリアクリルアミドゲル (Sambrook et al., Id.) において再懸濁されたペレットを分画することによって融合タンパク質をさらに精製する。ゲルを0.4M KCl中に浸漬して、タンパク質を可視化し、これを切り出し、SDSを欠くゲル-ランニングバッファー中で電気溶出 (electroeluted) する。GST / 操作されたポリペプチド融合タンパク質が、細菌中で可溶性タンパク質として製造される場合には、GST精製モジュール (Pharmacia Biotech) を使用して精製してもよい。

30

40

## 【0130】

融合タンパク質は、消化に付して、成熟した操作されたポリペプチドからGSTを切断してもよい。消化反応物 (20~40μg融合タンパク質、20~30ユニットヒトトロンピン [0.5mL PBS中、4000U/mg (Sigma)]) を室温で16~48時間インキュベートし、変性SDS-PAGEゲルにロードして、反応生成物を分画する。ゲルを0.4M KCl中に浸漬し、タンパク質バンドを可視化する。操作されたポリペプチドの予測される分子量に対応するタンパク質バンドの同定は、自動シーケンサー (

50

Applied Biosystems モデル473A、Foster City、CA)を使用する部分アミノ酸配列分析によって確認され得る。

【0131】

本発明の操作されたポリペプチドの組換え発現の特に例示的な方法では、哺乳類293細胞が、リン酸カルシウム法によって、pCMVベクター(5'CMVプロモーター、3' HGHポリA配列)中の操作されたポリペプチドcDNAおよびpSV2neo(neo耐性遺伝子を含有する)を含有するプラスミドを用いて同時トランスフェクトされ得る。一実施形態では、ベクターは、トランスフェクションに先立ってScaIを用いて直線化されなければならない。同様に、neo遺伝子が組み込まれた同様のpCMVベクターを使用する代替コンストラクトも使用され得る。0.5mg/mL G418(ネオマイシン様抗生物質)を含有する増殖培地での10~14日間の制限希釈による単細胞クローンから、安定な細胞株が選択される。細胞株は、ELISAまたはウエスタンブロットによって、操作されたポリペプチドの発現についてスクリーニングされ、高発現細胞株が、大規模増殖のために増やされる。

10

【0132】

形質転換された細胞は、長期間の、高収率タンパク質製造のために使用されることが好ましく、そのようなものとして、安定な発現が望ましい。このような細胞が、所望の発現カセットとともに選択マーカ含有するベクターで形質転換されると、細胞を、強化培地で1~2日間増殖させ、その後、選択培地に交換する。選択マーカは、選択に対する耐性を付与するよう設計され、その存在によって、導入された配列を成功裏に発現する細胞の増殖および回収が可能になる。安定に形質転換された細胞の耐性凝集塊は、細胞にとって適当な組織培養技術を使用して増殖され得る。

20

【0133】

組換えタンパク質製造のために形質転換された細胞を回収するためには、いくつかの選択システムが使用され得る。このような選択として、それだけには限らないが、それぞれ、tk-、hgprt-またはaprt-細胞における、HSVチミジンキナーゼ、ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼおよびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子が挙げられる。また、抗代謝産物耐性も、メトトレキサートに対する耐性を付与するdhfr、ミコフェノール酸に対する耐性を付与するgpt、アミノグリコシド、G418に対する耐性を付与し、また、クロルスルフロンに対する耐性を付与するneoおよびハイグロマイシンに対する耐性を付与するhygroの選択の基準として使用され得る。有用であり得るさらなる選択可能な遺伝子として、細胞がトリプトファンの代わりにインドールを利用するのを可能にするtrpBまたはヒスチジンの代わりにヒスチノール(histinol)を利用するのを可能にするhisDが挙げられる。形質転換体の同定のための可視指示を与えるマーカとして、アントシアニン、-グルクロニダーゼおよびその基質、GUSならびにルシフェラーゼおよびその基質、ルシフェリンが挙げられる。

30

【0134】

本発明の操作されたポリペプチドは、自動化ペプチド合成および組換え技術の両方の組み合わせを使用して製造され得る。例えば、エキセンディン化合物およびABDのいずれかまたは両方ならびに、適宜、リンカーは、合成によって、または組換えによって製造され、次いで、「天然の化学的ライゲーション」などの当技術分野で公知の方法および親化合物を連結するアミド結合が形成される公知のその変法を使用して一緒にライゲーションされ得る。例えば、参照により、すべての目的のために本明細書に組み込まれる米国特許第6,326,468号を参照のこと。あるいは、例えば、本発明の操作されたポリペプチドは、欠失、置換、挿入およびペグ化による誘導体化(またはその他の部分、例えば、ポリマー、脂肪酸アシル鎖、C末端アミド化)を含めた修飾の組合せを含有し得る。このような操作されたポリペプチドは、段階的に製造され得る。最初の段階では、欠失、置換、挿入およびそれらの任意の組合せの修飾を含有する中間体の操作されたポリペプチドは、記載されるような組換え技術によって製造され得る。次いで、本明細書に記載されるよ

40

50

うなオブショナルな精製工程の後、中間体の操作されたポリペプチドは、適当なPEG化試薬（例えば、Nektar Transforming Therapeutics、San Carlos、CA製）を用いる化学修飾によってPEG化され（またはその他の化学的誘導体化、例えば、アシル化、C末端アミド化に付され）、所望の操作されたポリペプチド誘導体が得られる。当業者ならば、上記の手順は、欠失、置換、挿入から選択される修飾、誘導体化および当技術分野で周知の修飾のその他の手段の組合せを含有し、本発明によって考慮される操作されたポリペプチドに適用するよう一般化され得るといことは理解されよう。

【0135】

C末端アミド化は、培養培地中に分泌される - 因子融合タンパク質として、例えば、酵母（例えば、ピチア（*Pichia*））において合成されたグリシンアミノ酸によってC末端伸長された前駆体の使用によって達成され得る。精製後、操作されたポリペプチド前駆体のC末端グリシンは、酵素的アミド化、例えば、ペプチジルグリシン - アミド化モノオキシゲナーゼ（PAM）によってアミドに変換され得る。例えば、Cooper et al., 1989, Biochem. Biophys. Acta, 1014:247-258を参照のこと。参照によりその全文がすべての目的のために本明細書に組み込まれる米国特許第6319685号も参照のこと。この開示は、 - アミド化酵素において十分に純粋であり、タンパク質1mgあたり少なくとも約25mUの比活性を示し、タンパク質分解不純物が十分に除かれていて、天然供給源から精製された基質または組換えDNA技術によって製造された基質とともに使用するのに適している、ラット由来の - アミド化酵素を含む、酵素的アミド化のための方法を教示する。

【0136】

ペプチドは、本明細書に記載されるものを含め、任意の数の当技術分野で公知の方法によって精製され得る。一方法では、ペプチドは、Waters Delta Prep 3000システムを使用してRP-HPLC（分取用および分析用）によって精製される。ペプチドを単離するために、C4、C8またはC18分取用カラム（10ミクロン、2.2 x 25 cm; Vydac、Hesperia、CA）が使用され得、純度は、C4、C8またはC18分析用カラム（5ミクロン、0.46 x 25 cm; Vydac）を使用して決定され得る。溶媒（A = 0.1% TFA / 水およびB = 0.1% TFA / CH<sub>3</sub>CN）が、分析用カラムに1.0 ml / 分の流速でおよび分取用カラムに15 ml / 分で送達され得る。アミノ酸分析は、Waters Pico Tagシステムで実施され、Maximaプログラムを使用して処理され得る。ペプチドは、気相酸加水分解（115、20 ~ 24時間）によって加水分解され得る。加水分解物は、標準法によって誘導体化され、分析され得る[Cohen et al, THE PICO TAG METHOD: A MANUAL OF ADVANCED TECHNIQUES FOR AMINO ACID ANALYSIS, pp. 11-52, Millipore Corporation, Milford, Mass. (1989)]. 高速原子衝撃分析は、M-Scan, Incorporated (West Chester, Pa.) によって実施され得る。質量較正は、ヨウ化セシウムまたはヨウ化セシウム/グリセロールを使用して実施され得る。Applied Biosystems Bio-Ion 20質量分析計で、飛行時間検出を使用するプラズマ脱離法イオン化分析が実施され得る。

【0137】

操作されたポリペプチド発現アッセイ。宿主細胞によるタンパク質発現のレベルをアッセイするための方法が利用可能である。宿主細胞によるタンパク質発現のレベルをアッセイするために有用な手順を以下の典型的なプロトコールにおいて例示する。約25ulのBL21大腸菌細胞を、2ulのプラスミドDNA（操作されたポリヌクレオチドの発現ベクター）で形質転換する。細胞をプレーティングし、37で一晚または室温で48時間インキュベートしてもよい。単一コロニーを選択、使用して、4mlの適当な抗生物質を有するLB培地中で約6時間、種培養を増殖させてもよい。900ulのストックに100ulの80%滅菌グリセロールを添加することによってグリセロールストックを調製してもよく、次いで、これを穏やかに混合し、-80Cで保存してもよい。TCP非誘導

10

20

30

40

50

サンプルのために250  $\mu$ lのサンプルを取り出してもよい。アリコート、例えば、2 mlの適当な抗生物質を含有するMagi c培地に、5  $\mu$ lの種培養を用いて播種してもよく、次いで、これを、37 C、300 rpmで一晩(最大24時間)インキュベートしてもよい。当技術分野で公知のように、Magi c培地は、自動誘導性である。あるいは、250 mlまたは125 mlのThompsonフラスコ中で60 mlの適当な抗生物質を含有するMagi c培地に、60  $\mu$ lの種培養を用いて播種してもよく、次いで、これを、30 C、300 rpmで一晩(最大24時間)インキュベートしてもよい。インキュベーション後、各試験管から250  $\mu$ lの培養物を取り出し、細胞をペレットにしてもよい。細胞を1 mlの50 mM Tris pH 8、150 mM NaCl中に再懸濁し、それに0.1容積(100  $\mu$ l)のPOP培養試薬および1  $\mu$ lのr-リゾチームを添加してもよい(r-リゾチームバッファーでの1:750希釈)。混合物を十分に混合し、室温で少なくとも10分間インキュベートしてもよい。次いで、調製物を、14000 x Gで10分間遠心分離してもよい。上清(可溶性画分)を取り出し、保持してもよく、ゲル分析のためのサンプルを調製してもよい(15  $\mu$ l + 5  $\mu$ l LDS)。残りの封入体ペレットを、超音波処理を用いて1 mlの1% SDSに再懸濁してもよい。ゲル分析のためのサンプルを調製してもよい(15  $\mu$ l + 5  $\mu$ l LDS)。非誘導サンプルのために、1.0容積のPOP培養試薬および1  $\mu$ lのr-リゾチーム(r-リゾチームバッファーでの1:750希釈)を添加してもよい。混合物を十分に混合し、室温で少なくとも10分間インキュベートしてもよい。これらのサンプルは、遠心分離される必要がない場合もある。次いで、ゲル分析のためにサンプルを調製してもよい(15  $\mu$ l + 5  $\mu$ l LDS)。1 x MESバッファー中で非還元性NU-PAGEゲル(4~12%)を実施し、Simply Blueマイクロ波プロトコルを用いて染色してもよい。当技術分野で公知のように、脱染を一晩実施してもよい。ゲルイメージを保持し、分析して、タンパク質発現レベルを調べてもよい。

#### 【0138】

操作されたポリペプチドは、以下のとおりに発現および単離され得、単離された。所望の操作されたポリペプチドのタンパク質配列は、市販のソフトウェアを使用して設計され、大腸菌(E. coli)発現ベクター中にクローニングするためのDNA配列に逆翻訳された。核酸配列は、標準PCR増幅技術を使用してオリゴヌクレオチドとして得られ、ライゲーションされたか、または標準制限酵素を使用して既存の発現コンストラクトから消化され、次いで、一緒にライゲーションされた。対象とするタンパク質を発現する配列を、誘導可能な発現のためにT7プロモーターを有するプラスミドpET45中に入れた。配列決定によってコンストラクトを確認した後、ベクターDNAを精製し、発現宿主、一般に、BL21(DE3)中に形質転換した。シングルコロニーを選択して、4 mlのLB培地中で約6時間種培養を増殖させた。グリセロールストックは、900  $\mu$ lのストックに100  $\mu$ lの80%グリセロールを添加することによって調製し、-80 で保存した。500  $\mu$ lの誘導されていないサンプルをゲル分析のために保持してもよい。125 mlのThompsonフラスコにおいて60  $\mu$ lの種培養を使用して、60 mlの培養物(例えば、Magi c Media(商標)大腸菌発現培地; Invitrogen, USA; Glenn et al., J. Biol. Chem. 2008, 283(19):12717-29)に播種し、30 で一晩インキュベートした。250  $\mu$ lのサンプルを分析のために採取した。遠心分離することによって細胞をペレットとして回収し、後の処理のために凍結した。細胞抽出物の調製およびニッケル樹脂を用いる初回通過精製を、以下のとおりに実施した。大腸菌細胞ペレットを、出発培養容量に等しい容量の溶解バッファー(50 mM Tris HCl、150 mM NaCl、pH 8.0)に完全に再懸濁した。次いで、細胞を100 psiのマイクロfluidizer(Microfluidics, MA)に3回付した。細胞抽出物を16,000 x gで30分間遠心分離して、細片を除去した。EGTA(150 mMストック)を、3 mM EGTAの最終濃度に細胞抽出物に添加した。次いで、溶解物を、洗浄され、予め平衡化されたNi-NTA スーパーフローカラムにアプライした。次いで、カラムと結合しているタンパク質を、溶解バッファーおよびEGTA(50 mM Tris

10

20

30

40

50

s HCl、150 mM NaCl、pH 8.0、3 mM EGTA)を用いて洗浄し、その後、結合しているタンパク質を50 mLの溶出バッファー(25 mM Tris HCl、50 mM NaCl、250 mM イミダゾール、pH 8.0)を用いて溶出した。His-タグの切断およびその後の精製は以下のとおりとした。溶出されたタンパク質を、Amicon-Ultra15遠心分離フィルターユニット(Millipore、USA)を用いて濃縮し、次いで、25 mM Tris HCl、pH 8.0、50 mM NaClを用いて希釈して、所望のタンパク質のN末端からHisタグを除去するプロテアーゼ消化のために調製した。タンパク質溶液に、0.1%のβ-メルカプトエタノールおよび1%のTurbo TEVプロテアーゼ(2 mg/mL、10,000ユニット/mg; Exce llgen、USA)を添加し、これを混合し、室温で4時間、次いで、4  
10  
で一晩インキュベートした。Ni-NTAスーパーフローカラム(Qiagen、USA)を、50 mM Tris HCl、100 mM NaCl、45 mMイミダゾール、pH 8.0を用いて予め平衡化した。TEV消化反応物を、50 mM Tris HCl、150 mM NaCl、pH 8.0を用いて2倍希釈した。希釈した消化反応物を、Ni-NTAカラムの頂部に注意深くアプライし、フロースルーを回収した。カラムに10 mLの50 mM tris HCl、100 mM NaCl、45 mM イミダゾール、pH 8.0を添加して、あらゆる結合していないタンパク質を溶出した。カラムから溶出されたタンパク質を、集め、組み合わせ、次いで、サイズ排除クロマトグラフィー(Superdex 75 HiLoad 26/60カラム; GE Healthcare Bio  
20  
sciences、USAを用いて2x)を使用して最終精製(polish)した。任意の残存する細菌性エンドトキシンを、EndoTrap Red(Lonza、Switzerland)を製造業者の使用説明書に従って使用して除去した。

#### 【0139】

封入体調製物。封入体画分中に見られる操作されたポリペプチドについては、以下の手順が有益であり得る。細胞ペレットを、各50 mLの培養物に対して最少で100 mLの溶解バッファー中に再懸濁してもよい。30 mLを添加した時点で、10 mLピペットを使用して再懸濁してもよく、次いで、試験管をさらなる70 mLで洗浄してもよい。再懸濁された細胞溶液を、全プロセスを通じてチャンバーを氷水に維持するよう注意しながら、100 PSI(分)のマイクロフルイダイザーを通して複数回実施してもよい、例えば、4回通過させてもよい。流動化されたスラリーを、14000xgで20分間遠心分離  
30  
してもよい(例えば、250 mL nalgeneボトルを使用して、JLA 10.5、10,000 rpm)。封入体ペレットを、ピペットチップを用いて破壊した後、攪拌子および攪拌プレートを用いて氷上で冷却した溶解バッファー中に、4°Cで1時間再懸濁してもよい。ペレットを、ピペットチップを用いて破壊した後、攪拌子および攪拌プレートを用いて、蒸留H<sub>2</sub>Oに、4°Cで1時間、2回目の再懸濁をし、それに続いて、14000xgで15分間遠心分離してもよい。上清を取り出し、廃棄してもよい。得られたものは、-80°Cで保存してもよい。

#### 【0140】

タンパク質精製。本明細書に記載されるように、発現されたポリペプチドの単離のために多数の方法が知られている。分泌された操作されたポリペプチドが好ましい。しかし、  
40  
以下は、封入体が形成される場合の一例である。封入体ペレットは、適当な容量の可溶化バッファー(8 M尿素または8 Mグアニジン、50 mM Tris、10 mM DTT、pH 7.75)中で、室温で1時間可溶化され得る。可溶化されたペレットを、27000 gで20分間遠心分離してもよい。濾過された(例えば、0.4 μm)上清を、室温で、適当な容量の再フォールディングバッファー(50 mM Tris-HCl、1 M尿素、0.8 Mアルギニン、4 mMシステイン、1 mMシスタミン;pH 8)中に1滴ずつ移してもよい。次いで、得られたものを、穏やかに混合しながら、4°Cで一晩またはそれ以上置いてもよい。GE Healthsciences AKTA FPLCを使用して、サンプルを濃縮し、4°C環境中、1~2 mL/分でゲル濾過カラム(Superdex 75 26/60)に流してもよい。適当なタンパク質を含有する画分を、SDS-PA  
50

GEによって同定し、プールし、第2のゲル濾過カラムを通して流してもよい。次いで、当技術分野で公知のように、プールされたタンパク質を、Amiconフィルターで適当な濃度に濃縮し、例えば、Endosafe PTSリーダー(Charles River)を使用してエンドトキシンレベルについてアッセイしてもよい。タンパク質サンプルがエンドトキシン判定基準を通ると、滅菌濾過し、アリコートに分配し、品質管理アッセイを通してよい。品質管理アッセイは、およその質量を得るために分析用HPLC-SEC、非還元性SDS PAGEおよびRP HPLC-MSを含み得る。タンパク質は、1xPBS(137mM塩化ナトリウム、2.7mM塩化カリウム、4.3mMリン酸ナトリウム、1.4mMリン酸一カリウム、pH7.2)中で得、アリコートに分配し、-70~-80で急速冷凍することができる。

10

## 【0141】

IV. 使用および疾患の治療方法

適応症。主に、GLP-1受容体との相互作用による、例えば、エキセンディン-4による治療を受け入れられるものに基づいて、種々の疾患および障害が、本明細書に記載されたポリペプチド化合物および方法によって有益に治療されると考慮される。

## 【0142】

肥満症および過体重。肥満症および過体重を含めたその関連障害は、米国および世界中で、よく見られ、極めて重篤な公衆衛生問題である。上半身肥満症は、2型真性糖尿病について知られている最強のリスク因子であり、心血管疾患の強いリスク因子である。肥満症は、高血圧症、アテローム性動脈硬化症、鬱血性心不全、卒中、胆嚢疾患、変形性関節症、睡眠時無呼吸、多嚢胞性卵巣症候群などの生殖障害、乳房、前立腺および結腸の癌ならびに全身麻酔の合併症の頻度上昇の認識されているリスク因子である。例えば、Kopelman, 2000, Nature 404: 635-43を参照のこと。

20

## 【0143】

肥満症は、寿命を減少させ、上記で列挙された併存症、同様に、感染症、静脈瘤、黒色表皮腫、湿疹、運動不耐性、インスリン抵抗性、高血圧高コレステロール血症、胆石症、整形外科的傷害および血栓塞栓性疾患などの障害の深刻なリスクを伴う。例えば、Rissanen et al, 1990 Br. Med. J. 301: 835-7を参照のこと。肥満症はまた、インスリン抵抗性症候群または「シンドロームX」およびメタボリックシンドロームと呼ばれる状態の群のリスク因子である。肥満症および関連障害の世界的な医療費は、莫大である。

30

## 【0144】

肥満症の病理発生は、多因子性であると考えられている。問題は、肥満の対象では、過剰の脂肪組織が存在するまで栄養素利用性とエネルギー消費が釣り合うようにならないということである。中枢神経系(CNS)は、エネルギーバランスを制御し、動物の代謝状態に適当な、さまざまな行動、自律神経および内分泌活性を調和させる。これらの活性を制御する機序またはシステムは、前脳(例えば、視床下部)、後脳(例えば、脳幹)および脊髄中に広く分布している。最終的に、これらのシステムからの代謝(すなわち、栄養利用性)および認知(すなわち、学習された好み)情報が統合され、欲求(食物を探すこと)および完了(経口摂取)行動をとる決意がスイッチが入れられる(食事の調達および開始)か、またはスイッチが切られる(食事の終了)。視床下部は、主に、これらのシグナルを統合すること、次いで、脳幹に指令を発することに関与していると考えられている。完了運動制御システムの要素(例えば、咀嚼および嚥下に関与している筋肉)を制御する脳幹核。そのようなものとして、これらのCNS核は、文字通り、摂食行動の「最終共通路」を構成するといわれている。

40

## 【0145】

神経解剖学的および薬理的証拠は、エネルギーおよび栄養的ホメオスタシスのシグナルが前脳核において統合することおよび完了運動制御システムが脳幹核に、おそらくは、三叉神経運動核の周囲の領域中にあることを支持する。視床下部および脳幹間には大規模な相互接続がある。さまざまなCNSに向けられた抗肥満症治療薬(例えば、小分子およびペプチド)は、主に、視床下部にある前脳基質に、および/または脳幹にある後脳基質

50

に焦点をわせている。

【0146】

肥満症は、不十分にしか治療可能でなく、慢性的であり、本質的に難治性の代謝障害のままである。したがって、対象における体重減少および/または体重維持において有用な新規治療の必要性が存在する。このような治療は、対象の健康に対する著しい有益な効果につながる。

【0147】

糖尿病および心血管疾患。真性糖尿病は、糖尿病患者の間のすべての致死のうち60%~70%が、心血管合併症の結果である複雑な慢性疾患と認識されている。糖尿病は、冠動脈心疾患リスク相当物と考えられるだけでなく、再発性心筋梗塞、鬱血性心不全および心血管インシデント後の死亡を含めた有害事象の独立した予測因子としても同定されている。より密接なグルコース管理および心血管リスク因子の積極的な治療を採ることで、冠動脈心疾患合併症のリスクが低減され、糖尿病患者の間の全体的な生存が改善されると予測される。しかし、糖尿病患者は、非糖尿病患者よりも、2~3倍、急性心筋梗塞を経験する可能性が高く、糖尿病患者は、非糖尿病患者よりも8~13年少くしか生存しない。

【0148】

糖尿病性/急性心筋梗塞患者のハイリスク性を理解することで、不安定狭心症または非ST上昇型心筋梗塞(まとめて「ACS」と呼ばれる)を有する入院患者の管理のための米国心臓病学会/米国心臓協会(American College of Cardiology/American Heart Association)(「ACC/AHA」)臨床実践ガイドラインは、入院している糖尿病患者は、高血糖症の積極的な管理を必要とする特別な集団であるということ最近認識した。具体的には、ガイドラインは、入院している糖尿病/ACS患者のグルコース低下治療は、10mg/dL未満の摂食前グルコース、180mg/dL未満の最大1日標的および7%未満の退院後ヘモグロビンA1cを達成することを標的としなくてはならないと述べている。

【0149】

高齢のACS患者の全国的なサンプルでは、糖尿病患者における30日死亡率の増大は、病院に入院した時点で高グルコース値を有する患者と対応していることが実証された。“Diabetic Coronary Artery Disease & Intervention”, Coronary Therapeutics 2002, Oak Brook, IL, September 20, 2002を参照のこと。入院時に一時的に上昇したグルコースではなく持続した高血糖症は、重篤有害事象と関連しているという証拠はますます増えている。患者における高血糖症および血管リスクの理想的な測定基準は、容易にはわからないが、入院期間の間の平均グルコース値は、死亡率を最も予測するものであるようである。米国中の40を超える病院から得られたACS患者の別個の研究では、入院時のランダムなグルコース値とは対照的に、持続性高血糖症が、院内死亡率をより予測するものであるということがわかった。Acute Coronary Syndrome Summit: A State of the Art Approach, Kansas City, MO, September 21, 2002を参照のこと。入院時のグルコース値と比較して、全入院期間にわたるグルコース管理のロジスティック回帰モデルが、死亡率を最も予測するものであった。120mg/dLを超えるグルコースの10mg/dLの増大ごとに、入院期間の間の死亡率のリスクがほぼ2倍の増大した。継続糖尿病/ACS患者のより小さいコホートでは、入院時にグルコースレベルの増大を伴う場合には、1年で死亡率が段階的に増加した。病院環境では、ACC/AHAガイドラインは、入院期間の間により低い血糖を達成するための積極的なインスリン治療の開始を示唆する。

【0150】

脂質調節疾患。脂質異常症は、血液中の正常な脂質成分の破壊である。インスリンレベルの長期の上昇は、脂質異常症につながり得ると考えられる。高脂血症は、血液中の脂質および/またはリポタンパク質の上昇したまたは異常なレベルの存在である。脂肪肝疾患、例えば、非アルコール性脂肪肝疾患(NAFLD)とは、単純な脂肪肝(脂肪症)から非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)、さらに硬変(不可逆性、肝臓の進行した瘢痕)

の範囲の広いスペクトルの肝臓疾患を指す。すべての段階のNAFLDが、共通して、肝臓細胞（肝細胞）における脂肪の蓄積（脂肪浸潤）を有する。

【0151】

さらに、何らかの理論に拘束されようとは思わないが、2型糖尿病における相対的インスリン欠乏、グルコース毒性および門脈を通る腹部脂肪組織内からのデリバリーの上昇による肝臓遊離脂肪酸負荷の増大が、脂肪肝障害における可能性ある原因と関与していると考えられている。実際、摂食行動が、NAFHを含めた多数の当然の結果を伴う肥満症のメタボリックシンドロームを駆動する重要な因子であると仮説が立てられている。したがって、2型糖尿病においてすでに実証されているように、食物摂取の減少および少ない食事の数の増大を目的とする治療は、NAFHを有効に治療し、予防し得る。インスリン分泌および体重減少を促進し、胃内容排出を遅延する薬物はまた、糖耐性の改善に有効であり、したがって、その付随する高インスリン血症を伴う脂肪肝を改善し得る。したがって、エキセンディン、エキセンディン類似体アゴニスト、エキセンディン誘導体アゴニスト、特に、エキセンディン-4の使用は、この状態のための治療様式としてよく適したものであり得る。したがって、エキセンディンまたはその生物学的に活性な（ホルモンドメイン）ペプチド成分または断片または類似体を含む本明細書に記載された操作されたポリペプチドは、脂肪肝障害の治療において有用であり得る。

10

【0152】

アルツハイマー病。アルツハイマー病（AD）は、当技術分野で公知のように、A-タンパク質の調節不全を含む脳中のプラークおよびもつれを伴う。ニューロンGLP-1受容体の刺激は、ニューロンの可塑性および細胞生存の調節において重要な役割を果たすと報告されている。GLP-1受容体の刺激は、培養ニューロン細胞において、神経突起成長を誘導し、興奮毒性細胞死および酸化傷を保護すると報告されている。GLP-1およびエキセンディン-4は、マウス脳中のアミロイド-ペプチド（A-タンパク質）の内因性レベルを低減し、ニューロン中の-アミロイドタンパク前駆体（-APP）のレベルを低減すると報告された。例えば、Perry et al., 2004, Curr. Drug Targets 5(6):565-571参照のこと。本明細書に開示された操作された化合物を用いる治療は、アルツハイマー病と関連している治療標的に利益を提供し得る。

20

【0153】

パーキンソン病。パーキンソン病（PD）は、「一次性パーキンソニズム」すなわち、任意の続発性全身性原因を伴わない神経変性プロセスによる孤立性パーキンソニズムの同義語である。パーキンソニズムは、ドーパミンの喪失によって引き起こされる振戦、硬直および運動の緩徐化を特徴とする。何らかの理論に拘束されようとは思わないが、エキセンディン-4は、ミクログリア不活性化因子として機能することによってドーパミンニューロンの生存因子として作用し得ると考えられ、エキセンディン-4は、PDなどの神経変性疾患の有用な治療薬であり得るということを示唆する。

30

【0154】

メタボリックシンドロームX。メタボリックシンドロームXは、インスリン抵抗性、脂質異常症、高血圧症および脂肪組織の内臓分布を特徴とし、2型糖尿病の病態生理学において中心的な役割を果たす。また、NAFH、繊維症および肝臓の硬変と強力に相関しているとわかった。したがって、本明細書に記載された操作されたポリペプチドは、メタボリックシンドロームXの治療において有用であり得る。

40

【0155】

ステロイド誘導性糖尿病。グルココルチコイドは、炭水化物代謝に影響を及ぼすと周知である。外因性グルココルチコイド投与に応じて、肝臓グルコース産生の増大ならびにインスリン分泌および末梢組織におけるインスリン刺激性グルコース取り込みの低減が観察される。さらに、グルココルチコイド治療は、当技術分野で公知のように、プロインスリン（P1）/免疫反応性インスリン（IRI）比を変更する。糖尿病を伴わない対象におけるグルココルチコイドによって誘発される高血糖症の通常の特徴として、空腹時血糖の最小上昇、過剰な食後高血糖、外因性インスリンに対する非感受性およびメトホルミンま

50

たはスルホニル尿素治療に対する非反応性が挙げられる。したがって、エキセンディン生物学的に活性な（ホルモンドメイン）ペプチド成分またはその断片または類似体を含む本明細書に記載された操作されたポリペプチドは、ステロイド誘発性糖尿病の治療において有用であり得る。

【0156】

ヒト免疫不全ウイルス（HIV）治療誘発性糖尿病。ヒト免疫不全ウイルス（HIV）-1プロテアーゼ阻害剤（PI）を日常的な臨床用途に導入して間もなく、PT使用を高血糖症の発生と結びつける報告が表れ始めた。PIで治療されるHIV感染対象のおよそ1%～6%が、真性糖尿病を発症するが、相当に大きな集団が、インスリン抵抗性および耐糖能異常を発症する。したがって、エキセンディン生物学的に活性な（ホルモンドメイン）ペプチド成分またはその断片または類似体を含む本明細書に記載された操作されたポリペプチドは、HIV治療によって誘発された糖尿病の治療において有用であり得る。

10

【0157】

成人潜在性自己免疫性糖尿病（LADA）。成人潜在性自己免疫性糖尿病（LADA）としても知られる進行性の自己免疫性糖尿病は、2型糖尿病と診断された患者のおよそ10%中に存在すると考えられている。LADA患者は、島細胞細胞質抗原またはより頻繁には、グルタミン酸デカルボキシラーゼのいずれかに対して循環抗体を有する。これらの対象は、1型および2型糖尿病両方の臨床上的特徴を示す。インスリン分泌は、自己免疫性糖尿病の急速に進行する型においてよりも、遅い進行においてより良好に保たれるが、LADA対象では、インスリン分泌は、時間とともに悪化する傾向がある。したがって、エキセンディンの生物学的に活性な（ホルモンドメイン）ペプチド成分またはその断片または類似体を含む本明細書に記載された操作されたポリペプチドは、LADAの治療において有用であり得る。

20

【0158】

無自覚性低血糖（HU）。低血糖症の単回のみ最近のエピソードの後でさえ、不完全なグルコース対抗制御が起こり得る。低血糖症の反復エピソードを経験する対象は、通常、低血糖症と関連する症状または切迫インスリンショック、「無自覚性低血糖」と呼ばれる状態を認識するその能力を失うことが多い。患者は自身の状態を理解しないので、血糖レベルが、昏睡および痙攣を含めた深刻な神経学的問題が結果として生じるほど低く落ちることがある。したがって、エキセンディンの生物学的に活性な（ホルモンドメイン）ペプチド成分またはその断片または類似体を含む本明細書に記載された操作されたポリペプチドは、HUの治療において有用であり得る。

30

【0159】

拘束性肺疾患。GLP1受容体は、肺に局在している。エキセンディンは、GLP-1受容体を介する生物学的応答を誘発し得る。特に、サルコイドーシスは、肺を頻繁に巻き込む全身性の肉芽腫性疾患である。古典的に、拘束性肺疾患と考えられるが、過去何年かにおいて気道閉塞がこの疾患の認識される特徴となった。サルコイドーシスは、任意のレベルで気道に影響を及ぼし得、関与が小さい気道を含む場合には、喘息および慢性気管支炎などのより一般的な閉塞性気道疾患と似ていることもある。したがって、エキセンディンの生物学的に活性な（ホルモンドメイン）ペプチド成分またはその断片または類似体を含む操作されたポリペプチドは、このようなホルモンドメインペプチドが肺の弾性を改善するか、または強剛性を遅延させ得るので、拘束性肺疾患の治療において有用であり得る。

40

【0160】

短腸症候群（SBS）。エキセンディン-4は、短腸症候群の治療にとって有効であると報告されている。Kunkel et al. Neurogastroenterol. Motil. (2011)参照のこと。SBSは、下痢および栄養欠乏を特徴とする重篤な臨床障害である。回腸においてL-細胞によって産生されるグルカゴン様ペプチド-1（GLP-1）は、近位腸通過を調節する。SBSにおいてのように広範囲の回腸切除が生じると、GLP-1レベルが不十分となる場合がある。エクセナチドが、SBSの患者の栄養状態および腸の症状を改善した。し

50

たがって、SBS患者は、本明細書に記載された操作されたポリペプチドを用いる治療を受け入れられる。排便の頻度および形態を改善することならびにもはや食事と関連していない排便を得ることが達成され得る。さらなる利益は、総非経口栄養が停止され得るということである。本明細書におけるこれらの化合物は、SBS患者の排便習慣、栄養の状態および生活の質の実質的な改善を提供し、さらに非経口栄養および小腸移植の必要性を低減し得る。

【0161】

したがって、一態様では、対象において疾患または障害を治療する方法が提供される。対象は、疾患または障害の治療を必要とするものである。いくつかの実施形態では、対象は、肥満症の治療を必要とする。疾患または障害は、糖尿病、過体重、肥満症、アルツハイマー病、脂肪肝疾患、脂質異常症、冠動脈疾患、脳卒中、SBSまたは高脂血症または本明細書において論じられるその他の疾患である。糖尿病は、I型、II型、妊娠性または前糖尿病ならびにHIVまたはステロイド誘発性糖尿病を含み得る。治療法は、本明細書に記載されたような操作されたポリペプチドを、疾患または障害を治療するのに有効な量で対象に投与することを含む。これらの疾患にとって特に有用なものとして、グルコース低下活性を有する（例えば、ABDと連結しているエキセンディン-4またはその断片または類似体）、体重の低減または食物摂取活性の低減、HbA1cの低下、胃内容排出の遅延、血漿グルカゴンの低下および/または腸管運動性の利益を有する本明細書に記載された化合物がある。

【0162】

いくつかの実施形態では、疾患または障害は、糖尿病、過体重または肥満症または脂質異常症または高脂血症である。操作されたポリペプチドは、ABDおよびHD1ポリペプチド、HD1がエキセンディンまたはその断片または類似体である場合には、適宜、リンカーK1を含み得る。したがって、操作されたポリペプチドは、以下の構造：HD1-ABDまたはHD1-L1-ABDを有し得る。いくつかの実施形態では、エキセンディンは、好ましくは、エキセンディン-4またはLeu14エキセンディン-4である。

【0163】

いくつかの実施形態では、疾患または障害は、糖尿病、過体重、肥満症、脂質異常症、アルツハイマー病、脂肪肝疾患、SBSまたは高脂血症である。操作されたポリペプチドは、エキセンディンまたはその断片または類似体を含み得る。したがって、操作されたポリペプチドは、以下の構造：HD1-ABDまたはHD1-L1-ABDのうち1種を有し得る。いくつかの実施形態では、操作されたポリペプチド中のエキセンディンは、好ましくは、エキセンディン-4またはその類似体Leu14エキセンディン-4である。いくつかの実施形態では、エキセンディン断片は、エキセンディン-4の断片である。いくつかの実施形態では、エキセンディン類似体は、エキセンディン-4と、少なくとも70%、例えば、70%、75%、80%、85%、90%、95%またはさらに高い同一性を有する。これらの疾患にとって特に有用なものとして、グルコース低下活性を有する（例えば、ABDと連結しているエキセンディン-4またはその断片または類似体）、体重の低減または食物摂取活性の低減、HbA1cの低下、胃内容排出の遅延、血漿グルカゴンの低下または腸管運動性の利益を有する本明細書に記載された化合物がある。

【0164】

いくつかの実施形態では、疾患または障害は、糖尿病、過体重、肥満症、脂質異常症、アルツハイマー病、脂肪肝疾患、SBSまたは高脂血症である。操作されたポリペプチドは、エキセンディンまたはその断片または類似体を含み得る。したがって、操作されたポリペプチドは、以下の構造：HD1-ABDまたはHD1-L1-ABDのうち1種を有し得る。いくつかの実施形態では、エキセンディンは、好ましくは、エキセンディン-4またはその類似体Leu14エキセンディン-4である。いくつかの実施形態では、エキセンディン断片は、エキセンディン-4の断片である。いくつかの実施形態では、エキセンディン類似体は、エキセンディン-4と、少なくとも70%、例えば、70%、75%、80%、85%、90%、95%またはさらに高い同一性を有する。これらの疾患にと

10

20

30

40

50

って特に有用なものとして、グルコース低下活性を有する（例えば、A B Dと連結しているエキセンディン - 4またはその断片または類似体）、体重の低減または食物摂取活性の低減、H b A 1 cの低下、胃内容排出の遅延、血漿グルカゴンの低下または腸管運動性の利益を有する本明細書に記載された化合物がある。

【 0 1 6 5 】

疾患または障害は、糖尿病、過体重、肥満症、脂質異常症、アルツハイマー病、脂肪肝疾患、S B S、高脂血症、パーキンソン病または心血管疾患または本明細書に記載されたその他の疾患であり得る。操作されたポリペプチドは、エキセンディンまたはその断片または類似体を含み得る。したがって、操作されたポリペプチドは、以下の構造：H D 1 A B DまたはH D 1 L 1 A B Dのうち1種を有し得る。いくつかの実施形態では、エキセンディンは、好ましくは、エキセンディン - 4またはその類似体 L e u 1 4 エキセンディン - 4である。いくつかの実施形態では、エキセンディン断片は、エキセンディン - 4の断片である。いくつかの実施形態では、エキセンディン類似体は、エキセンディン - 4と、少なくとも70%、例えば、70%、75%、80%、85%、90%、95%またはさらに高い同一性を有する。これらの疾患にとって特に有用なものとして、グルコース低下活性を有する（例えば、A B Dと連結しているエキセンディン - 4またはその断片または類似体）、体重の低減または食物摂取活性の低減、H b A 1 cの低下、胃内容排出の遅延、血漿グルカゴンの低下または腸管運動性の利益を有する本明細書に記載された化合物がある。

【 0 1 6 6 】

本明細書に記載された化合物および方法によって治療され得るさらなる疾患および障害として、ステロイド誘発性糖尿病、H I V治療誘発性糖尿病、成人潜在性自己免疫性糖尿病（L A D A）、非アルコール性脂肪性肝炎（N A S H）および非アルコール性脂肪肝疾患（N A F L D）、無自覚性低血糖（H U）、サルコイドーシスを含めた拘束性肺疾患およびメタボリックシンドローム X が挙げられる。操作されたポリペプチドは、エキセンディンまたはその断片または類似体を含み得る。したがって、操作されたポリペプチドは、以下の構造：H D 1 - A B DまたはH D 1 - L 1 - A B Dのうち1種を有し得る。いくつかの実施形態では、エキセンディンは、好ましくは、エキセンディン - 4またはその類似体 L e u 1 4 エキセンディン - 4である。いくつかの実施形態では、エキセンディン断片は、エキセンディン - 4の断片である。いくつかの実施形態では、エキセンディン類似体は、エキセンディン - 4と、少なくとも70%、例えば、70%、75%、80%、85%、90%、95%またはさらに高い同一性を有する。これらの疾患にとって特に有用なものとして、グルコース低下活性を有する（例えば、A B Dと連結しているエキセンディン - 4またはその断片または類似体）、体重の低減または食物摂取活性の低減、胃内容排出の遅延、H b A 1 cの低下、血漿グルカゴンの低下または腸管運動性の利益を有する本明細書に記載された化合物がある。操作されたポリペプチドは、ホルモンドメインとして、エキセンディンまたはその類似体または断片のみを含み得る。疾患または障害は、糖尿病、過体重、肥満症、脂質異常症、アルツハイマー病、脂肪肝疾患、S B S、高脂血症、パーキンソン病または心血管疾患または本明細書に記載されたその他の疾患であり得る。操作されたポリペプチドは、エキセンディンまたはその断片または類似体を含み得る。したがって、操作されたポリペプチドは、以下の構造：H D 1 - A B DまたはH D 1 - L 1 - A B Dのうち1種を有し得る。A B Dと連結しているエキセンディン - 4またはその断片または類似体）、体重の低減または食物摂取活性の低減、胃内容排出の遅延、血漿グルカゴンの低下または腸管運動性の利益を有する。

【 0 1 6 7 】

本明細書に記載された化合物および方法によって治療され得るさらなる疾患および障害として、ステロイド誘発性糖尿病、H I V治療誘発性糖尿病、成人潜在性自己免疫性糖尿病（L A D A）、非アルコール性脂肪性肝炎（N A S H）および非アルコール性脂肪肝疾患（N A F L D）、無自覚性低血糖（H U）、サルコイドーシスを含めた拘束性肺疾患およびメタボリックシンドローム X が挙げられる。操作されたポリペプチドは、好ましくは

、以下の構造：A B Dに連結するH D 1 - 類似体またはH D 1 - L 1 - A B Dのうち1種を有する。いくつかの実施形態では、エキセンディンは、好ましくは、エキセンディン - 4またはその類似体L e u 1 4エキセンディン - 4である。いくつかの実施形態では、エキセンディン断片は、エキセンディン - 4の断片である。いくつかの実施形態では、エキセンディン類似体は、エキセンディン - 4と、少なくとも70%、例えば、70%、75%、80%、85%、90%、95%またはさらに高い同一性を有する。

#### 【0168】

##### V. アッセイ

本明細書に記載された操作されたポリペプチドを製造およびアッセイする方法は、一般に、当業者に利用可能である。さらに、特定の方法は、本明細書に、ならびに参照により、このさらなる目的のために本明細書に組み込まれる、本明細書に引用された特許公報およびその他の参考文献に記載されている。

#### 【0169】

G L P - 1受容体結合および機能アッセイ：G L P - 1受容体結合活性および親和性は、任意の数の公知の方法で測定され得る。例えば、一方法では、結合活性が、受容体供給源がR I N m 5 F細胞膜であり、リガンドが、 $[^{125}I]$  G L P - 1またはヨウ化エキセンディン(1 - 39)またはヨウ化エキセンディン(9 - 39)である結合置換アッセイを使用して測定される。ホモジナイズされたR I N m 5 F細胞膜を、40,000 c p m  $[^{125}I]$  G L P - 1(またはエキセンディン)トレーサーおよび種々の濃度の試験化合物を有する20 mM H E P E Sバッファー中、23で2時間、一定に混合しながらインキュベートする。反応混合物を、0.3% P E I溶液を用いて予め浸漬させたガラスフィルターパッド通して濾過し、氷冷リン酸緩衝生理食塩水を用いてすすぐ。結合しているカウントを、シンチレーションカウンターを使用して測定する。Graph Pad Prism(登録商標)ソフトウェア(Graph Pad Software, Inc., サンディエゴ、カリフォルニア)を使用して結合親和性を算出する。

#### 【0170】

機能的G L P - 1受容体活性化についてのインビトロアッセイは、公知の方法および細胞および組織を使用して実施され得る。例えば、G L P - 1受容体保有細胞のエキセンディン - 4刺激は、アデニレートシクラーゼ活性化、c A M P合成、膜脱分極増大、細胞内カルシウムの上昇およびグルコース誘導性インスリン分泌の増大を誘導し得る。例えば、Holz et al., 1995, J. Biol. Chem. 270(30):17749-57参照のこと。r M T C 6 - 23(クローン6)細胞株を使用する細胞ベースのアッセイを使用して、生じたc A M Pに基づいて、化合物のG L P - 1受容体アゴニスト活性を決定できる。生物検定法の一実施形態では、化合物のG L P - 1受容体アゴニスト活性は、6 - 23(クローン6)細胞を用いる細胞ベースのアッセイにおけるc A M P産生との相関関係によって定量的に決定される。細胞ベースのアッセイは、生存6 - 23(クローン6)細胞を使用する。6 - 23(クローン6)細胞は、American Type Culture CollectionからATCC(登録商標)番号CRL - 1607(商標)として、およびEuropean Collection of Cell CulturesからE C A C C番号87042206として入手可能である。別の実施形態では、細胞ベースのアッセイは、均一時間分解蛍光アッセイ(Homogeneous Time-Resolved Fluorescence assay)(HTRF(登録商標))である。HTRF(登録商標)キットは、Cisbio International(ベッドフォード、マサチューセッツ)から市販されている。HTRF(登録商標)キットを使用する方法は、当技術分野で公知であり、キットは、一般に、例えば、サンプル、標準、校正曲線およびの調製の仕方および実験の実施の仕方に関する使用説明書マニュアルを含む。均一時間分解蛍光細胞ベースのアッセイは、開示内容が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第5,527,684号およびCisbio HTRF(登録商標)Product Centerから入手可能な文書参照番号62AM4PEB rev02(2007年8月)に記載されている。開示内容が参照により本明細書に組み込まれるwww.htrf.co

10

20

30

40

50

m / p r o d u c t s / g p e r / c a m p / を参照のこと。好ましい方法では、生物検定法は、C i s b i o からカタログ番号 6 2 A M 4 P E B とし て 入 手 可 能 な H T R F ( 登 録 商 標 ) c A M P d y n a m i c 2 1 , 0 0 0 アッセイキットを使用する細胞ベースのアッセイにおいてラット甲状腺癌腫 6 - 2 3 ( クローン 6 ) 細胞を使用する。H T R F ( 登 録 商 標 ) 標 準 お よ び 較 正 は、キ ャ ッ ト 中 の 使 用 説 明 書 に 従 っ て 調 製 す る。アッセイは、アルブミンの存在を伴って実施してもよく、伴わずに実施してもよい。

#### 【 0 1 7 1 】

活性および作用持続期間および薬物動態についてのインビボアッセイは、公知の方法を使用して行われ得る。例えば、持続期間は、薬物が対象に、グルコースが経口投与される ( 薬物作用持続期間を測定するために ; O G T T D O A ) 前の所望の時点で投与され、  
10 グルコース血液レベルが測定される経口糖負荷試験 ( O G T T ) ( 例 えば、マウスにおいて容易に行われる ) を使用して実施され得る。活性および持続期間はまた、薬物が対象に、グルコースが I V 投与される前の所望の時点で投与され ( I V G T T D O A )、血糖レベルが測定される静脈内糖負荷試験 ( I V G T T ) ( 例 えば、ラットにおいて容易に行われ得る ) を使用して測定され得る。好ましい操作された化合物は、薬物の単回用量後の少なくとも 2 4 時間、好ましくは、薬物の単回用量が与えられた後、少なくとも 3 日、少なくとも 4 日、少なくとも 5 日、少なくとも 6 日および少なくとも 1 週間の期間の血糖に対して所望の効果を有する。

#### 【 0 1 7 2 】

例えば、試験ポリペプチドを、ベースラインサンプルの直後の  $t = 0$  で、N I H / S w i s s 雌マウスに皮下注射する。血液サンプルを、1 日目の間に  $t = 2$ 、4 および 8 時間などの所望の時間で採取し、次いで、5 日目までまたは 7 日目までまたはそれより長く毎日採取する。血糖を、One Touch ( 登録商標 ) Ultra ( 登録商標 ) ( L i f e S c a n , I n c . , a J o h n s o n & J o h n s o n C o m p a n y , ミルピタス、カリフォルニア ) を用いて測定する。薬物のグルコース制御活性などの活性持続期間 ( D O A ) 測定のために、薬物投与後の所望の時点で O G T T または I V G T T を実施してもよい。体重および食物摂取またはその他の薬理学的もしくは薬物動態パラメータも測定できる。例えば、雌の N I H / S w i s s マウス ( 8 ~ 2 0 週齢 ) を、0 6 0 0 に明かりをつける 1 2 : 1 2 時間明暗周期で飼育される群とする。水および標準のペレット  
20 化マウス固形飼料食は、記載されない限りは自由に利用可能とした。実験の朝に、動物を  
30 実験群にわけ、およそ 0 6 3 0 時に絶食を開始する。通常の研究では、 $n = 2$  ケージとし、3 匹のマウス / ケージとする。時間 = 0 分で、血糖サンプルを採取し、直ちに、約  $1 \text{ nmol / kg} \sim 25 \text{ nmol / kg}$  の範囲の量のビヒクルまたは化合物の腹腔内注射を続ける。血糖は、3 0、6 0、1 2 0、1 8 0 および 2 4 0 分で、また単回用量後 1 週間以上、毎日測定され得る。実験の変法では、用量を、1 4 もしくは 2 8 日などの長期間にわたって毎日かまたは毎週でさえ提供する。治療前パーセントは、測定時点、例えば、6 0 分または 1 日での血糖を、時間 = 0 分での血糖によって除することによって算出する。有意な治療効果は、ANOVA (  $p < 0 . 0 5$  ) によって同定した。有意差が存在する場合には、ダネット検定 ( P r i s m ( 登録商標 ) v . 4 . 0 1 , G r a p h P a d S o f t w a r e I n c . , サンディエゴ、カリフォルニア ) を使用して試験平均を対照平均  
40 と比較する。血糖は、One Touch ( 登録商標 ) Ultra ( 登録商標 ) ( L i f e S c a n , I n c . , a J o h n s o n & J o h n s o n C o m p a n y , ミルピタス、カリフォルニア ) を用いて測定され得る。\* ビヒクル対照に対して  $p < 0 . 0 5$  ; ANOVA、ダネット検定。その他のパラメータも測定され得る。

#### 【 0 1 7 3 】

食物摂取阻害のインビボアッセイ : 操作されたポリペプチドは、食欲抑制のその持続期間および程度について、ならびに体重減少に対する効果のその持続期間および程度について、種々の公知の方法で試験され得る。例えば、ポリペプチドは、マウス食物摂取アッセイにおいて食欲抑制について、また食事誘発性肥満症 ( D I O ) マウスにおいて体重増加に対するその効果について試験され得る。このようなアッセイの実験プロトコールを以下  
50

に記載する。

【0174】

例えば、雌のNIH/Swissマウス(8~24週齢)が、0600に明かりをつける12:12時間明暗周期で飼育される群である。水および標準のペレット化マウス固形飼料食は、記載されない限りは自由に利用可能とする。動物を、実験の1日前に、およそ1500時に開始して絶食させる。実験の朝に、動物を実験群にわけ、典型的な研究では、 $n = 4$ ケージであり、3匹のマウス/ケージである。時間 = 0分で、すべての動物に、典型的には、約 $2 \text{ nmol/kg} \sim 75 \text{ nmol/kg}$ の範囲の量で、媒体または試験化合物の腹腔内注射を施し、直ちに、予め秤量した量(10~15g)の標準固形飼料を与える。種々の時間、典型的には、30、60および120分またはより長い間隔、例えば毎日、食物を除去し、秤量して、消費された食物の量を調べる(Morley, Flood et al., 1994, Am. J. Physiol. 267:R178-R184)。時間 = 0で最初に提供された食物の重量から、例えば、30または60分の時点で残っている食物の重量を差し引くことによって食物摂取を算出する。ANOVAによって有意な治療効果が同定される( $p < 0.05$ )。有意差が存在する場合には、ダネット検定を使用して試験平均を対照平均と比較する(Prism(登録商標)v.2.01、GraphPad Software Inc., San Diego, CA)。体重も測定され得る。

10

【0175】

体重、脂肪再分布および除脂肪体重アッセイ：体重および関連効果についての活性アッセイも、以下のとおり実施され得る。スプラインドローラットにおける食事誘発性肥満症(DIO)は、肥満症およびエネルギー恒常性の調節の研究のための有用なモデルである。これらのラットは、脂肪およびエネルギーの比較的高い食事で肥満症になりやすい(Cr1:CD(登録商標)(SD)BR)ラットの系統から開発された。例えば、Levin, 1994, Am. J. Physiol. 267:R527-R535、Levin et al., 1997, Am. J. Physiol. 273:R725-R730を参照のこと。DIO雄のラットは、Charles River Laboratories, Inc.(ウィルミントン、マサチューセッツ)から入手した。ラットは、12/12時間明暗周期で22のシューボックスケージに個別に収容する。ラットは、中程度高脂肪食(脂肪から32% kcal; Research Diets D1226B)で自由に維持する。動物は、通常、約500gの平均体重を達成する。Levin DIOラットは、ケージ環境に7日間慣らされる。3晩の慣れの間、動物にビヒクルの単回腹腔内(IP)注射を投与する。試験日に、暗期の開始にラットに化合物またはビヒクル(例えば、10% DMSO)の単回IP注射を投与する。食物摂取は、自動食物摂取測定システム(BioDAQ, Research Diets)によって、研究の過程を通じて5秒間隔で測定する。体重は、毎晩記録する。

20

30

【0176】

身体組成は、NMR(Echo Medical Systems、ヒューストン、テキサス)を使用して薬物治療の前後に測定され得る。身体組成測定のために、ラットを、十分に換気したプレキシガラスチューブ中に短時間(約1分)入れ、次いで、それを特殊化したげっ歯類NMR機器中に挿入した。これによって、脂肪および乾燥除脂肪組織の実際のグラムの変化(例えば、治療後の体脂肪のグラム - ベースラインでの体脂肪のグラム = 体脂肪のグラムの変化)および脂肪および乾燥除脂肪組織の身体組成%の変化(例えば、治療後の体脂肪% - ベースラインでの体脂肪% = 体脂肪%の変化)の算出が可能となった。すべてのデータは、平均 $\pm$ SEMとして表されている。分散分析(ANOVA)およびポストホック検定を使用して、群差について調べる。P-値 $< 0.05$ が有意と考えられる。統計分析およびグラフ作成は、Windows用PRISM(登録商標)4(GraphPad Software, Inc., サンディエゴ、カリフォルニア)を使用して実施される。グラフおよび結果は、通常、体重パーセント、体脂肪および身体タンパク質の変化においてビヒクル補正された変化として示される。

40

【0177】

VI. 医薬組成物

50

一態様では、本明細書に記載された化合物を、医薬上許容される賦形剤（例えば、担体）と組み合わせて含む医薬組成物が提供される。本明細書において、用語「医薬上許容される担体」とは、医薬賦形剤、例えば、活性剤と有害に反応しない、腸内または非経口適用に適した医薬上、生理学上許容される有機または無機担体物質を指す。適した医薬上許容される担体として、水、塩溶液（例えば、リンガー溶液など）、アルコール、オイル、ゼラチンおよびラクトース、アミロースまたはデンプンなどの炭水化物、脂肪酸エステル、ヒドロキシメチセルロース（methycellose）およびポリビニルピロリジンが挙げられる。このような調製物は滅菌され得、必要に応じて、本発明の化合物と有害に反応しない滑沢剤、保存料、安定剤、湿潤剤、乳化剤、浸透圧に影響を及ぼす塩、バッファー、着色料および/または芳香族物質などといった補助剤と混合され得る。

10

## 【0178】

さらなる態様において、本明細書に記載されるような操作されたポリペプチドを、医薬上許容される賦形剤と組み合わせて含む医薬組成物が提供される。一実施形態では、医薬組成物は、本明細書に記載されるような経口医薬組成物である。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、持続性医薬組成物である。医薬組成物の投与と関連して用語「持続性」とは、作用持続期間を指す。したがって、持続性医薬組成物は、例えば、1時間、2時間、4時間、8時間、12時間、1日、2日、3日、4日、5日、6日、1週、2週、3週、1カ月またはいっそう長い間隔で投与され得る。一実施形態では、投与は1日につき2回（すなわち「1日2回」）である。好ましい実施形態では、投与は、1日につき1回（すなわち、「1日1回」）である。より好ましい実施形態では、投与は、1週につき1回（すなわち、「週1回」）である。いくつかの実施形態では、操作されたポリペプチドは、本明細書において表2および3に示される操作されたポリペプチドから選択される。いくつかの実施形態では、操作されたポリペプチドは、本明細書において表2に示される操作されたポリペプチドから選択される。好ましくは、化合物は、化合物5、9または11であるか、またはそれらと少なくとも95%のアミノ酸配列同一性を有する。

20

## 【0179】

## A. 製剤

本明細書に記載された操作されたポリペプチドは、対象に、単独で投与され得るか、または同時投与され得る。同時投与は、化合物の、個別のまたは組合せ（2種以上の化合物）での同時の投与または逐次投与を含むものとする。例えば、肥満症は、レプチン（例えば、メトレプチン）およびアミリン（例えば、プラムリンチド）を含む併用療法で有益に治療され得ることがわかっている。例えば、米国公開出願第2008/0207512号を参照のこと。したがって、例えば、肥満症および過体重の治療にとって有用なABDおよびエキセンディン化合物を含む本明細書に記載された操作されたポリペプチドは、このような治療を達成するために単独で投与されてもよく、またはレプチンもしくはレプチンアゴニスト、例えば、メトレプチンおよび/またはアミリンもしくはアミリンアゴニスト、例えば、プラムリンチドのいずれかと同時投与されてもよい。

30

## 【0180】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載された製剤および方法は、エキセンディン、エキセンディン類似体またはエキセンディン類似体アゴニストの操作されたポリペプチドが、抗高血糖症剤、例えば、インスリン（通常の、短期間作用性、長期間作用性および基本インスリンを含む）、アミリン、プラムリンチド、メトホルミンおよびチアゾリジンジオン（ロシグリタゾンおよびピオグリタゾンを含む）などの1種または複数の抗糖尿病薬と同時投与されることをさらに提供する。

40

## 【0181】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載された製剤および方法は、エキセンディン、エキセンディン類似体またはエキセンディン類似体アゴニスト操作されたポリペプチドが、1種または複数のコレステロールおよび/またはトリグリセリド低下剤と同時投与されることをさらに提供する。例示的薬剤として、HMG CoAレダクターゼ阻害剤（例えば、アトルバスタチン、フルバスタチン、ロバスタチン、プラバスタチン、ロスバスタチ

50

ン、シンバスタチン)；胆汁酸封鎖剤 (bile acid sequestrants) (例えば、コレセベラム、コレステラミン、コレステポール)；フィブラート (例えば、フェノフィブラート、クロフィブラート、ゲムフィプロジル)、エゼチミブ、ニコチン酸、プロブコール、ロバスタチン/ナイアシン組合せ、アトルバスタチン/アムロジピン組合せ；およびシンバスタチン/エゼチミブ組合せが挙げられる。

【0182】

エキセンディン化合物は、治療上活性な化合物であり、驚くべきことに、ABDと融合されている場合に活性を保持するので、本開示内容は、医薬として使用するための、すなわち、治療において使用するための組成物を提供する。液体または乾燥形態いずれかの操作されたポリペプチドと、適宜、少なくとも1種の医薬上許容される担体および/または賦形剤とを含む組成物もまた、具体的に考慮され、本明細書に例示される。

10

【0183】

組成物は、インビゴまたはインビトロで、アルブミンと結合する能力を有する。特定の場合には、生体外で組成物のアルブミンとの複合体を形成すること、すなわち、組成物に外因性アルブミンを添加することは有効であり得る。このような組成物は、凍結乾燥され得、周囲温度での保存に適している製剤を提供する。したがって、本開示内容はまた、ヒト血清アルブミンなどのアルブミンをさらに含み、適宜、乾燥形態であり得る上記で定義されるような組成物を提供する。

【0184】

同時投与は、エキセンディン、エキセンディンアゴニストもしくはエキセンディン類似体アゴニスト操作されたポリペプチドを、第2の薬剤と別個に投与することによってか、またはエキセンディン、エキセンディンアゴニストもしくはエキセンディン類似体アゴニスト操作されたポリペプチドおよび第2の薬剤を含む単一医薬製剤を投与することによって達成され得る。第2の薬剤の適当な投与レジメンは、一般に、当技術分野で公知である。

20

【0185】

調製物はまた、望ましい場合には、当技術分野で公知のその他の活性物質 (例えば、代謝分解を低下させるよう) またはその他の治療上活性な薬剤と同時投与され得る。本明細書に記載されたエキセンディンの操作されたポリペプチドは、レプチンまたはレプチンアゴニストおよびアミリンまたはアミリンアゴニスト化合物、例えば、ダバリンチド (davalintide) およびその類似体を含めたアミリンなどのその他の活性な抗糖尿病または抗肥満症剤とともに投与され得る。

30

【0186】

アミリン。アミリンは、栄養素の摂取に応じて、インスリンと同時分泌される、膵臓-細胞によって合成されるペプチドホルモンである。アミリンの配列は、哺乳類種中で高度に保存されており、当技術分野で公知のカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP)、カルシトニン、インターメジンおよびアドレノメデュリンに対して構造上の類似性を有する。アミリンの血糖調節作用は、栄養素によって刺激されるグルカゴン分泌の抑制によって循環におけるグルコース出現速度を調節することおよび胃内容排出を減速することによって、インスリンの血糖調節作用を補完する。インスリンによって治療されている糖尿病患者では、プラムリンチド、ヒトアミリンの合成および等効力類似体が、不適切に上昇した食後グルカゴン分泌を抑制することおよび胃内容排出を減速することによって食後血糖変動幅を低減する。ラットアミリン、ヒトアミリンおよびプラムリンチドの配列は、それぞれ以下のとおりである：

40

KCNTATCATQRLANFLVRSSNNLGPVLPPTNVGSNTY (配列番号6)；

KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGAILSSTNVGSNTY (配列番号7)；

KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGPILPPTNVGSNTY (配列番号8)。

【0187】

ダバリンチド (Davalintide)。ダバリンチドは、「AC-2307」としても知られ、さまざまな疾患適応症の治療において有用である強力なアミリンアゴニスト

50

である。各々、その全文が、すべての目的のために参照により本明細書に組み込まれるWO 2006/083254およびWO 2007/114838を参照のこと。ダバリンチドは、アミリンまたはカルシトニンおよびその類似体のN末端ループ領域、カルシトニンもしくはその類似体の - ヘリックス領域の少なくとも一部の - ヘリックス領域またはアミリン - ヘリックス領域およびカルシトニン - ヘリックス領域もしくはその類似体の一部を有する - ヘリックス領域およびアミリンまたはカルシトニンのC末端テール領域を有するキメラペプチドである。ヒトカルシトニン、サケカルシトニンおよびダバリンチドの配列は以下のとおりである：

CGNLSTCMLGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAP (配列番号9)；

CSNLSTCVLGKLSQELHKLQTYPRNTGSGTP (配列番号10)；

KCNTATCVLGRLSQELHRLQTYPRNTGSNTY (配列番号11)。

10

#### 【0188】

何らかの理論に拘束されようとは思わないが、アミリンおよびダバリンチドおよびその断片および類似体は、完全な生物学的応答を誘発するのにC末端アミド化を必要とし得ると考えられる。アミリンおよび/またはダバリンチドおよびその断片および類似体を含む本明細書に記載されたものなどのアミリン化合物は、C末端でアミド化され得るということは理解される。

#### 【0189】

「アミリンアゴニスト化合物」は、天然アミリンペプチド、アミリン類似体ペプチドおよびアミリンアゴニスト活性を有するその他の化合物（例えば、小分子）を含む。「アミリンアゴニスト化合物」は、天然供給源から誘導され得、合成であり得、または組換えDNA技術から誘導され得る。アミリンアゴニスト化合物は、アミリンアゴニスト受容体結合活性を有し、アミノ酸（例えば、天然、非天然またはそれらの組合せ）、ペプチドミメティクス、化学部分などを含み得る。当業者ならば、アミリン受容体結合アッセイを使用して、またはヒラメ筋アッセイにおけるアミリンアゴニスト活性を測定することによってアミリンアゴニスト化合物を認識されよう。一実施形態では、アミリンアゴニスト化合物は、本明細書に、その開示内容が、その全文で、すべての目的のために参照により本明細書に組み込まれる米国特許第5,686,411号および米国公開第2008/0176804号に記載されるものなどのアミリン受容体結合アッセイにおいて、約200nM以下、約100nM以下または約50nM以下のIC<sub>50</sub>を有する。一実施形態では、アミリンアゴニスト化合物は、本明細書に、また米国特許第5,686,411号に記載されるものなどのヒラメ筋アッセイにおいて、約20nM以下、約15nM以下、約10nM以下または約5nM以下のEC<sub>50</sub>を有する。一実施形態では、アミリンアゴニスト化合物は、<sup>25, 28, 29</sup>Pro-ヒト-アミリンに対して少なくとも90%または100%の配列同一性を有する。一実施形態では、アミリンアゴニスト化合物は、アミリン（例えば、ヒトアミリン、ラットアミリンなど）およびカルシトニン（例えば、ヒトカルシトニン、サケカルシトニンなど）のペプチドキメラである。適した、例示的アミリンアゴニスト化合物はまた、その開示内容が、その全文で、すべての目的のために、参照により本明細書に組み込まれる米国公開第2008/0274952号に記載されている。

20

30

#### 【0190】

別の活性薬剤と同時に投与される場合には、化合物は、一緒にまたは別個に製剤されて、同時にまたは逐次投与され得る。本明細書において操作された化合物は、本質的に長時間作用性であるので、それらは、1日1回、週に1回またはそれより長い投与に適している。したがって、その他の薬剤は、エキセンディン操作されたポリペプチドの投薬期間の間、必要に応じて、1回または複数回用量で、例えば、1日1回、1日2回、1日3回、週に1回、例えば、週に1回投与され得る。

40

#### 【0191】

アミリン化合物などのその他の薬剤の単回および複数回使用製剤が報告されている。例えば、プラムリンチドは、1日1回、2回および3回の投与のために、糖尿病を治療するためにおよび肥満症を治療するために製剤されており、成功裏に投与される。

50

## 【 0 1 9 2 】

これらの医薬化合物は、Remington's Pharmaceutical Sciences by E. W. Martinに開示されるものなどの従来技術に従って、医薬上許容される担体または希釈剤ならびに任意のその他の公知のアジュバントおよび賦形剤を用いて製剤され得る。Wang et al. (1988) J. of Parenteral Sci. and Tech., Technical Report No. 10, Supp. 42:2 Sも参照のこと。

## 【 0 1 9 3 】

一般に、操作されたポリペプチドは、患者へ投与するための、安定な、安全な医薬組成物に製剤され得る。本発明の方法において使用するために考慮される医薬製剤は、およそ 0.01 ~ 1.0% (w/v)、特定の場合には、0.05 ~ 1.0% の操作されたポリペプチド、約 3.0 ~ 約 7.0 の最終組成物の pH を可能にするおよそ 0.02 ~ 0.5% (w/v) の酢酸、リン酸、クエン酸またはグルタミン酸バッファー、およそ 1.0 ~ 10% (w/v) の炭水化物または多価アルコール等張剤 (tonicifier)、適宜、m-クレゾール、ベンジルアルコール、メチル、エチル、プロピルおよびブチルパラベンおよびフェノールの群から選択されるおよそ 0.005 ~ 1.0% (w/v) の保存料を含み得る。このような保存料は、一般に、製剤されたペプチドが、複数回使用製品で含まれる場合に含まれる。

10

## 【 0 1 9 4 】

特定の実施形態では、本操作されたポリペプチドの医薬製剤は、一定の範囲の濃度の化合物、例えば、約 0.01% ~ 約 98% w/w の間または約 1 ~ 約 98% w/w の間または好ましくは、80% と 90% w/w の間、または好ましくは、約 0.01% ~ 約 50% w/w の間またはより好ましくは、これらの実施形態では、約 10% ~ 約 25% w/w の間を含有し得る。十分な量の注射水を使用して、所望の濃度の溶液を得てもよい。

20

## 【 0 1 9 5 】

塩化ナトリウムなどのさらなる等張剤 (tonicifying agents) ならびにその他の公知の賦形剤も、必要に応じて、存在し得る。いくつかの場合には、このような賦形剤は、化合物の全体的な張力の維持において有用である。賦形剤は、目下記載されている製剤中に種々の濃度で含まれ得る。例えば、賦形剤は、約 0.02% ~ 約 20% w/w、好ましくは、約 0.02% と 0.5% w/w の間、約 0.02% ~ 約 10% w/v または約 1% ~ 約 20% w/w の濃度範囲で含まれ得る。さらに、本製剤自体と同様に、賦形剤は、固体 (粉末化されたものを含む)、液体、半固体またはゲルの形態で含まれ得る。

30

## 【 0 1 9 6 】

医薬製剤は、種々の形態、例えば、固体、液体、半固体または液体からなり得る。用語「固体」とは、本明細書において、例えば、散剤および凍結乾燥製剤を含めた、この用語のすべての通常の使用を包含するものとする。目下記載されている製剤は、凍結乾燥され得る。

## 【 0 1 9 7 】

用語バッファー、バッファー溶液および緩衝溶液は、水素イオン濃度または pH に関して使用される場合には、酸またはアルカリの添加時の、または溶媒での希釈時の pH の変化に抵抗する、系、特に、水溶液の能力を指す。酸または塩基の添加時に pH の小さい変化を受ける緩衝溶液の特徴は、弱酸および弱酸の塩または弱塩基および弱塩基の塩のいずれかの存在である。前者の系の一例として、酢酸および酢酸ナトリウムがある。添加されるヒドロニウムまたはヒドロキシルイオンの量が、バッファー系のそれを中和する能力を超えない限り、pH の変化はわずかである。

40

## 【 0 1 9 8 】

本明細書に記載されるように、さまざまな液体媒体、例えば、水または水性 / 有機溶媒混合物または懸濁液が、操作されたポリペプチドの製剤における使用に適している。

## 【 0 1 9 9 】

本明細書に記載される使用のために、操作されたポリペプチド製剤の安定性は、製剤の

50

pHを、当技術分野で公知の方法によって決定される範囲に維持することによって増強される。特定の実施形態では、製剤のpHは、約3.5~5.0または約3.5~6.5、いくつかの実施形態では、約3.7~4.3または約3.8~4.2の範囲で維持される。いくつかの実施形態では、pHは、約4.0、約5.0、約6.0、約7.0、約8.0、約9.0またはさらに高いものであり得る。いくつかの実施形態では、pHは、生理学的範囲、pH6~8、好ましくは、pH7~7.6にあり得る。

#### 【0200】

特定の実施形態では、操作されたポリペプチドを有するバッファーは、酢酸バッファー（好ましくは、約1~5から約60mMの最終製剤濃度の）、リン酸バッファー（好ましくは、約1~5から約30mMの最終製剤濃度の）またはグルタミン酸バッファー（好ましくは、約1~5から約60mMの最終製剤濃度の）である。いくつかの実施形態では、バッファーは、酢酸（好ましくは、約5~約30mMの最終製剤濃度の）である。

10

#### 【0201】

製剤中に安定剤が含まれ得るが、必ずしも必要ではない。しかし、含まれる場合には、本発明の実施において有用な安定剤は、炭水化物または多価アルコールである。本発明の実施において有用な適した安定剤は、およそ1.0~10% (w/v)の炭水化物または多価アルコールである。多価アルコールおよび炭水化物は、その主鎖中に同一の特徴、すなわち、-CHOH-CHOH-を共有し、これは、タンパク質の安定化に参与している。多価アルコールとして、ソルビトール、マンニトール、グリセロールおよびポリエチレングリコール(PEG)などの化合物が挙げられる。これらの化合物は、直鎖分子である。他方、マンノース、リボース、スクロース、フルクトース、トレハロース、マルトース、イノシトールおよびラクトースなどの炭水化物は、ケトまたはアルデヒド基を含有し得る環状分子である。これら2つのクラスの化合物は、温度上昇によって、また凍結-解凍または凍結-乾燥プロセスによって引き起こされる変性に対してタンパク質を安定化させることにおいて有効であると実証されている。適した炭水化物として、糖尿病患者に有害作用(adverse affect)を有さない、すなわち、炭水化物が代謝されて、血液中でグルコースの許容されない高い濃度を形成することのない、ガラクトース、アラビノース、ラクトースまたは任意のその他の炭水化物が挙げられる。このような炭水化物は、糖尿病患者に適しているとして当技術分野で周知である。スクロースおよびフルクトースは、非糖尿病性適用(例えば、肥満症を治療すること)において化合物を用いる使用に適している。

20

30

#### 【0202】

特定の実施形態では、安定剤が含まれる場合には、化合物は、ソルビトール、マンニトール、イノシトール、グリセロール、キシリトールおよびポリプロピレン/ポリエチレングリコールコポリマーなどの多価アルコールならびに分子量200、400、1450、3350、4000、6000、8000およびさらに高い種々のポリエチレングリコール(PEG)を用いて安定化される。マンニトールは、いくつかの実施形態では、好ましい多価アルコールである。本発明の凍結乾燥製剤の別の有用な特徴は、その安定性を維持するのに役立つ同一製剤成分を用いる、本明細書に記載された凍結乾燥製剤の張力の維持である。いくつかの実施形態では、マンニトールは、本目的のために使用される好ましい多価アルコールである。

40

#### 【0203】

米国薬局方(United States Pharmacopeia)(USP)には、静菌性または静真菌性濃度の抗菌剤が、複数回用量容器中に含有される調製物に添加されなければならないと述べられている。それらは、皮下針およびシリンジを用いて、またはペン型注射器などのデリバリーのためのその他の侵襲的手段を使用して内容物の一部を引き抜く間に、調製物中に不注意に導入された微生物の増殖を防ぐための使用の時点で適切な濃度で存在しなくてはならない。抗菌剤は、処方すべてのその他の成分との適合性を確実にするよう評価されなくてはならず、その活性は、ある製剤において有効である特定の薬剤が別のものでは有効ではないことがないことを確実にするよう、処方全体にお

50

いて評価されなくてはならない。特定の抗菌剤が、ある製剤において有効であるが、別の製剤では有効でないことを見出すことは珍しいことではない。

【0204】

保存料は、一般的な製薬上の意味では、微生物増殖を防ぐか、または阻害し、この目的のために医薬製剤に添加され、微生物による製剤の結果として起こる腐敗を避けることができる物質である。保存料の量は多くはないが、それにもかかわらず、ペプチドの全体的な安定性に影響を及ぼすことがある。

【0205】

医薬組成物において使用するための保存料は、0.005～1.0% (w/v) の範囲であり得るが、いくつかの実施形態では、単独またはその他のものと組み合わせた各保存料の範囲は、ベンジルアルコール(0.1～1.0%)またはm-クレゾール(0.1～0.6%)またはフェノール(0.1～0.8%)またはメチル(0.05～0.25%)およびエチルもしくはプロピルもしくはブチル(0.005%～0.03%)パラベンの組合せである。パラベンは、パラ-ヒドロキシ安息香酸の低級アルキルエステルである。各保存料の詳細な説明は、Remington's Pharmaceutical Sciences(Id.)に示されている。

【0206】

操作されたポリペプチドは、液体形態の場合には、ガラス容器中のガラス上に吸着する傾向を有さないこともあり、したがって、医薬製剤をさらに安定化するために界面活性剤が必要でないこともある。しかし、液体形態の場合に、このような傾向を有する化合物に関しては、その製剤中に界面活性剤が使用されなければならない。次いで、これらの製剤は、凍結乾燥され得る。界面活性剤は、疎水性破壊および塩橋分離によつての両方のタンパク質の変性を頻繁に引き起こす。界面活性剤部分とタンパク質上の反応性部位の間の強力な相互作用のために、比較的低い濃度の界面活性剤が、強力な変性活性を発揮し得る。しかし、この相互作用の賢明な使用により、界面または表面変性に対してタンパク質を安定化できる。操作されたポリペプチドをさらに安定化できる界面活性剤は、適宜、総製剤の約0.001～0.3% (w/v) の範囲で存在し得、これとして、ポリソルベート80(すなわち、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノオレエート)、CHAPS(登録商標)(すなわち、3-[ (3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]1-プロパンスルホネート)、Brij(登録商標)(例えば、(ポリオキシエチレン(23)ラウリルエーテルであるBrij(登録商標)35)、ポロキサマーまたは別の非イオン性界面活性剤が挙げられる。

【0207】

選択された等張剤に応じて、医薬製剤の張力を調整するために塩化ナトリウムまたはその他の塩を添加することが望ましいこともある。しかし、これはオプショナルであり、選択された特定の製剤に応じて変わる。非経口製剤は、好ましくは、等張性または実質的に等張性であり得る。

【0208】

非経口製剤にとって好ましい媒体として、水がある。非経口投与に適した品質の水は、蒸留によつてか、または逆浸透によつてのいずれかによつて調製され得る。注射水は医薬製剤における使用にとって好ましい水性媒体である。

【0209】

医薬製剤中にその他の構成成分が存在し得ることがあり得る。このようなさらなる構成成分として、例えば、湿潤剤、乳化剤、オイル、抗酸化物質、充填剤(bulking agents)、張力修飾因子、キレート化剤、金属イオン、油性媒体、タンパク質(例えば、ヒト血清アルブミン、ゼラチンまたはタンパク質)および両性イオン(例えば、ベタイン、タウリン、アルギニン、グリシン、リシンおよびヒスチジンなどのアミノ酸)を挙げることができる。さらに、ポリマー溶液またはポリマーとの混合物は、ペプチドの制御放出の機会を提供する。このようなさらなる構成成分は、もちろん、本発明の医薬製剤の全体的な安定性に有害に影響を与えてはならない。

10

20

30

40

50

## 【0210】

容器はまた、注射の製剤の不可欠な部分であり、完全に不活性であるか、特に、液体が水性である場合には、含有する液体にいくつかの点で影響を及ぼさない容器がないので、一成分と考えられ得る。したがって、特定の注射のための容器の選択は、容器の組成、ならびに溶液の考慮およびそれが付される治療に基づいたものでなくてはならない。バイアルのガラス表面へのペプチドの吸着も、必要に応じて、ホウケイ酸ガラス、例えば、Wheaton I型ホウケイ酸ガラス番号33 (Wheaton Type I-33) またはその等価物 (Wheaton Glass Co.) の使用によって最小化され得る。製造に許容される、同様のホウケイ酸ガラスバイアルおよびカートリッジのその他の販売会社として、Kimbel Glass Co.、West Co.、Bunder Glas GmbHおよびForma Vitrumが挙げられる。化合物の生物学的および化学的特徴は、Wheaton Type I-33 ホウケイ酸血清バイアル中での、5%マンニトールおよび0.02% Tween 80の存在下での0.1mg/mlおよび10mg/mlの化合物の終濃度への製剤および凍結乾燥によって安定化され得る。

10

## 【0211】

注射によって送達される製剤については、皮下シリンジからのニードルの、複数回用量バイアル中への導入を可能にし、ニードルが引き抜かれるや否や再密封を提供するために、各バイアルの解放端は、アルミニウムバンドによって適当な位置に止められたゴムストッパー封鎖で密封されることが好ましい。

20

## 【0212】

West 4416/50、4416/50 (テフロン表面の) および4406/40、Abbott 5139または任意の同等ストッパーなどのガラスバイアルのためのストッパーを、注射用医薬の封鎖として使用してもよい。ペプチド性抗肥満症剤を含む製剤については、これらのストッパーは、ペプチドならびに製剤のその他の成分と適合する。本発明者らはまた、これらのストッパーは、患者使用パターンを使用して試験される場合にストッパー完全性試験を通る、例えば、ストッパーは少なくとも約100回の注射に持ちこたえることができることを発見した。あるいは、ペプチドは、その後の再構成のために、バイアル、シリンジまたはカートリッジ中に凍結乾燥され得る。本発明の液体製剤は、1もしくは2室カートリッジまたは1もしくは2室シリンジ中に充填され得る。

30

## 【0213】

上記の医薬製剤の各成分は、当技術分野で公知であり、参照によりその全文が本明細書に組み込まれるPharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Vol.1, 2nd ed., Avis et al. Ed., Merceel Dekker, New York, N.Y. 1992に記載されている。

## 【0214】

上記の液体製剤の製造プロセスは、一般に、配合、滅菌濾過および充填工程を含む。配合手順は、指定の順序での構成成分の溶解 (保存料、それに続く、安定剤/等張剤、バッファーおよびペプチド) または同時の溶解を含む。

## 【0215】

代替製剤、例えば、非-非経口は、滅菌を必要としない場合もある。しかし、滅菌が望ましいか、または必須である場合には、本発明のペプチド医薬製剤の開発において任意の適した滅菌プロセスを使用してもよい。典型的な滅菌プロセスは、濾過、蒸気 (湿式加熱)、乾式加熱、ガス (例えば、エチレンオキシド、ホルムアルデヒド、二酸化塩素、酸化プロピレン、 $\gamma$ -プロピオラクトン (propiolactone)、オゾン、クロロピクリン、過酢酸メチルプロミドなど)、放射線源に対する曝露および無菌取り扱いを含む。濾過は、本発明の液体製剤の好ましい滅菌方法である。滅菌濾過は、順次、接続され得る0.45  $\mu\text{m}$  および0.22  $\mu\text{m}$  (1または2) を通した濾過を含む。濾過後、溶液は、適当なバイアルまたは容器中に充填される。

40

## 【0216】

特定の実施形態では、本明細書に記載された操作されたポリペプチドは、対象に末梢性

50

に投与される。いくつかの実施形態では、本発明の液体医薬製剤は、非経口投与に意図される。適した投与経路として、筋肉内の、静脈内の、皮下、皮内、関節内、くも膜下腔内などが挙げられる。いくつかの実施形態では、皮下投与経路が好ましい。特定の実施形態では、粘膜デリバリーも好ましい。これらの経路として、それだけには限らないが、液体、半固体または固体形態のペプチドの投与を含み得る、経口、鼻腔、舌下、肺および頰側経路が挙げられる。操作されたポリペプチドを含む製剤については、これらの経路による投与は、非経口デリバリーと比較して、バイオアベイラビリティの低下のために、所望の生物学的効果を得るために実質的により多くの化合物を必要とし得る。

【0217】

さらに、非経口制御放出デリバリーは、高分子マイクロカプセル、マトリックス、溶液、インプラントおよびデバイスを形成することならびにそれらを非経口的にか、または外科的手段によって投与することによって達成され得る。制御放出製剤の例は、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第6,368,630号、第6,379,704号および第5,766,627号に記載されている。これらの剤形は、ポリマーマトリックスまたはデバイス中にペプチドの一部が捕捉されるために、より低いバイオアベイラビリティを有し得る。例えば、各々、参照によりその全文が、すべての目的のために本明細書に組み込まれる、米国特許第6,379,704号、第6,379,703号および第6,296,842号を参照のこと。

10

【0218】

化合物は、1用量または複数用量で有効となる操作されたポリペプチドの量を含む投与単位形態で提供され得る。

20

【0219】

当業者には認識されるであろうが、操作されたポリペプチドの有効量は、対象の年齢および体重、対象の身体状態、治療される状態および当技術分野で公知のその他の因子を含めた多数の因子につれて変わる。操作されたポリペプチドの有効量はまた、投与される特定の組合せにつれて変わる。本明細書に記載されるように、組み合わせた操作されたポリペプチドの投与は、投与される操作されたポリペプチドのいずれかの低減した量が、有効量であることを可能にし得る。

【0220】

投与は、経細胞性、傍細胞性または受容体媒介性経路を含めた経口経路によってであり得る。何らかの理論に拘束されようとは思わないが、本明細書に記載されるようなエキセンディンを含む操作されたポリペプチドは、幾分かは比較的小さい大きさおよび腸酵素に対する相対的な安定性のために、経口的に利用可能である。吸収/浸透促進剤によって開けられる腸細胞間の密着結合は、20nm未満の幅であると報告されている。例えば、Chao et al., 1998, J. Drug Targeting, 6:37-43を参照のこと。したがって、本明細書に記載されるような十分に小さい(例えば、10kDまたは15kD未満)操作されたポリペプチドは、腸壁を通過し、門脈系においてアルブミンと結合し、それによって、循環へアクセスできる。本発明の操作されたポリペプチドの経口送達は、1日2回、1日1回、2日に1回、3日に1回、週に1回、2週に1回、3週に1回またはさらには月に1回であり得る。その他のペプチドに適した経口送達系が使用され得る。一実施形態では、経口送達系は、比較的迅速な取り込みプロフィール、例えば、1~4時間を有し得、その場合には、操作されたポリペプチドの本質的に長い作用持続期間は、所望の延長された作用持続期間、例えば、1日1回または週に1回の投与を提供する。作用持続期間は、例えば、ABDおよびそのアルブミンに対する親和性の選択によって選択され得る。理論に拘束されようとは思わないが、アルブミンに対する親和性が高いほど、長い循環時間をもたらし、長い作用持続期間を提供すると考えられる。経口送達は、公知のインビトロおよびインビボ法を使用して試験され得る。例えば、マウスは、任意の添加された賦形剤の経口アベイラビリティおよび効果を調べるために、浸透/吸収促進剤および/またはプロテアーゼ阻害薬とともに、伴わずに製剤された操作されたポリペプチドを含む溶液を用いて経口的に経管栄養され得る。薬物血漿レベル、急性または慢性グルコースおよび/

30

40

50

またはHbA1c低下、インスリン血漿レベル、食物摂取阻害、体重減少および/または脂質レベルなどの、薬力学的(治療効果)および薬物動態(薬物特性)のいずれかまたは両方が、経時的に測定され得る。

#### 【0221】

##### B. 有効投与量

本明細書において提供される医薬組成物は、有効成分が、治療上有効な量で、すなわち、その意図される目的を達成するのに有効な量で含有される組成物を含む。特定の適用にとって有効な実際の量は、とりわけ、治療される状態に応じて変わる。例えば、糖尿病を治療する方法において投与される場合には、このような組成物は、所望の結果(例えば、対象において空腹時血糖を低下させること)を達成するのに有効な有効成分の量を含む。肥満症を治療するための方法において投与される場合には、このような組成物は、所望の結果(例えば、体重の減少)を達成するのに有効な有効成分の量を含む。

10

#### 【0222】

投与される化合物の投与量および頻度(単回または複数回用量)は、投与経路; レシピエントの大きさ、年齢、性別、健康状態、体重、肥満度指数および食事; 治療されている疾患の症状の性質および程度(例えば、本明細書に記載された化合物に应答性の疾患; 空腹時血糖); その他の疾患またはその他の健康に関連する問題の存在; 同時治療の種類; および任意の疾患または治療レジメンに由来する合併症を含めたさまざまな因子に応じて変わり得る。その他の治療レジメンまたは薬剤が、本発明の方法および化合物とともに使用され得る。

20

#### 【0223】

ヒトにおいて使用するための治療上有効な量は、動物モデルから決定され得る。例えば、ヒトのための用量は、動物において有効であるとわかっている濃度を達成するよう処方され得る。ヒトにおける投与量は、上記のようにおよび当技術分野で公知のように、それだけには限らないが、血糖および体重を含めた1種または複数の生理学的パラメータをモニタリングすることおよび投与量を上方または下方に調整することによって調整され得る。

#### 【0224】

投与量は、患者の要求および使用されている化合物に応じて変わり得る。本発明に関連して、患者に投与される用量は、患者における有益な治療反応に経時的に影響を及ぼすのに十分でなくてはならない。用量の大きさはまた、任意の有害な副作用の存在、性質および程度によって決定される。一般に、治療は、化合物の最適用量よりも少ないより少量の投与量で開始される。その後、投与量を、状況下で最適効果が到達されるまで小さい増分で増大させる。本発明の一実施形態では、投与量範囲は、0.001%~10%w/vである。別の実施形態では、投与量範囲は、0.1%~5%w/vである。

30

#### 【0225】

しかし、通常の用量は、本明細書における操作されたポリペプチドの延長された半減期を考慮して、1日あたり約1 $\mu$ g、5 $\mu$ g、10 $\mu$ g、50 $\mu$ g、100 $\mu$ gから150 $\mu$ gの下限から週あたり約50 $\mu$ gまで、100 $\mu$ gまで、150 $\mu$ gまで、200 $\mu$ gまでまたはさらに300 $\mu$ gまでの上限までの医薬化合物を含有し得る。用量は、所望の間隔、例えば、毎日または毎週で、別個の単位用量で送達され得る。

40

#### 【0226】

投与量の量および間隔は、治療されている特定の臨床適応症に有効な投与される化合物のレベルを提供するよう個別に調整され得る。これによって、個々の病状の重症度にふさわしい治療レジメンが提供される。

#### 【0227】

本明細書において提供された教示を利用することで、実質的な毒性を引き起こさないが、特定の患者によって実証される臨床症状を治療するのに完全に有効である、有効な予防的または治療的治療計画を立てることができる。この計画を立てることは、化合物の効力、相対バイオアベイラビリティ、患者の体重、有害な副作用の存在および重症度、好まし

50

い投与様式および選択された薬剤の毒性プロフィールなどの因子を考慮することによって、活性化化合物の注意深い選択を含まなければならない。

【 0 2 2 8 】

本発明の操作されたポリペプチドの驚くべき用量節約特性は、その驚くべき長い血漿半減期および薬理学的作用の持続期間とともに、優れた医薬品を提供する。また、エキセンディンを含む操作されたポリペプチドの場合には、驚くべきは、その経口アペイラビリティーである。用量節約を含めた優れた特性は、より少ない投薬、したがって、より少ないか、または重度がより低い副作用および商品原価の改善および/または親化合物単独によって現在は達成されていない1日1回または週に1回の投与のためのより費用効率の高い、より簡単な製剤を可能にする。

10

【 0 2 2 9 】

C. 毒性

特定の化合物の毒性および治療的効果間の比は、その治療係数であり、LD<sub>50</sub>（集団の50%において致死的な化合物の量）とED<sub>50</sub>（集団の50%において有効な化合物の量）の間の比として表され得る。高い治療指数を示す化合物が好ましい。細胞培養アッセイおよび/または動物研究から得られた治療係数データは、ヒトにおいて使用するための投与量の範囲の処方において使用され得る。このような化合物の投与量は、毒性がほとんどないか、または全くないED<sub>50</sub>を含む血漿濃度の範囲内にあることが好ましい。投与量は、使用される剤形および利用される投与経路に応じてこの範囲内で変わり得る。例えば Fingl et al., In: THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS, Ch.1, p.1, 1975を参照のこと。正確な処方、投与経路および投与量は、患者の状態および化合物が使用される特定の方法を考慮して個々の医師によって選択され得る。

20

【 0 2 3 0 】

何らかの理論に拘束されようとは思わないが、ABDアルブミン結合ドメインの、本明細書に記載されるようなホルモンドメインとの融合は、ABD融合を伴わないホルモンドメインと比較して、免疫応答の低減によって判断されるような免疫原性の低減を提供し得ると考えられる。例えば、参照によりその全文が、すべての目的のために本明細書に組み込まれるWO2009/016043を参照のこと。

【 0 2 3 1 】

例示的HD1、リンカーおよびABD配列として、以下が挙げられる：

30

HSDGTFSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS-NH<sub>2</sub>（配列番号1）；

HGEGTFSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS-NH<sub>2</sub>（配列番号2）；

HGEGTFSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS-NH<sub>2</sub>（配列番号3）；

HGEGTFSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIIS（配列番号4）；

HAEGTFSDVSSYLEGQAAKEFIAWLKGRG（配列番号5）；

KCNTATCATQRLANFLVRSSNGLPVLPTNVGSNTY（配列番号6）；

KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGAILSSTNVGSNTY（配列番号7）；

KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGPILPPTNVGSNTY（配列番号8）；

CGNLSTCMLGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAP（配列番号9）；

CSNLSTCVLGKLSQELHKLQTYPRNTGSGTP（配列番号10）；

40

KCNTATCVLGRLSQELHRLQTYPRNTGSNTY（配列番号11）；

HGEGTFSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKN（配列番号12）；

HHHHHH（配列番号49）；

HGEGTFSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIIS（配列番号111）；

HGEGTFSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPS（配列番号112）；

HGEGTFSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPS（配列番号113）；

HGEGTFSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISKKKKKK（配列番号114）；

HGEGTFSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSKKKKKK（配列番号115）；

HGEGTFSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISKKKKKK（配列番号116）；

HGEGTFSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSKKKKKK（配列番号117）；

50

HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSKKKKKK ( 配列番号 1 1 8 ) ;

GGGG ( 配列番号 1 2 5 ) ;

GGGGG ( 配列番号 1 2 6 ) ;

[ G ]<sub>n</sub> E ( 配列番号 1 2 7 ) ( 配列中、n は 1 ~ 6 である ) ;

[ G ]<sub>n</sub> K ( 配列番号 1 2 8 ) ( 配列中、n は 1 ~ 6 である ) ;

[ G ]<sub>n</sub> D ( 配列番号 1 2 9 ) ( 配列中、n は 1 ~ 6 である ) ;

[ G ]<sub>n</sub> R ( 配列番号 1 3 0 ) ( 配列中、n は 1 ~ 6 である ) ;

GGGKGGGG ( 配列番号 1 3 1 ) ;

GGNGSGG ( 配列番号 1 3 2 ) ;

GGCGGGG ( 配列番号 1 3 3 ) ;

GPNGG ( 配列番号 1 3 4 ) ;

[ G S ]<sub>n</sub> ( 配列番号 1 3 5 ) ( 配列中、n は 1 ~ 6 である ) ;

[ G G S ]<sub>n</sub> ( 配列番号 1 3 6 ) ( 配列中、n は 1 ~ 6 である ) ;

[ G G G S ]<sub>n</sub> ( 配列番号 1 3 7 ) ( 配列中、n は 1 ~ 6 である ) ;

[ G G G G S ]<sub>n</sub> ( 配列番号 1 3 8 ) ( 配列中、n は 1 ~ 6 である ) ;

[ G E ]<sub>n</sub> ( 配列番号 1 3 9 ) ( 配列中、n は 1 ~ 10 である ) ;

[ G G E ]<sub>n</sub> ( 配列番号 1 4 0 ) ( 配列中、n は 1 ~ 10 である ) ;

[ G G G E ]<sub>n</sub> ( 配列番号 1 4 1 ) ( 配列中、n は 1 ~ 10 である ) ;

[ G G G G E ]<sub>n</sub> ( 配列番号 1 4 2 ) ( 配列中、n は 1 ~ 10 である ) ;

[ G D ]<sub>n</sub> ( 配列番号 1 4 3 ) ( 配列中、n は 1 ~ 10 である ) ;

[ G G D ]<sub>n</sub> ( 配列番号 1 4 4 ) ( 配列中、n は 1 ~ 10 である ) ;

[ G G G D ]<sub>n</sub> ( 配列番号 1 4 5 ) ( 配列中、n は 1 ~ 10 である ) ;

[ G G G G D ]<sub>n</sub> ( 配列番号 1 4 6 ) ( 配列中、n は 1 ~ 10 である ) ;

[ G K ]<sub>n</sub> ( 配列番号 1 4 7 ) ( 配列中、n は 1 ~ 10 である ) ;

[ G G K ]<sub>n</sub> ( 配列番号 1 4 8 ) ( 配列中、n は 1 ~ 10 である ) ;

[ G G G K ]<sub>n</sub> ( 配列番号 1 4 9 ) ( 配列中、n は 1 ~ 10 である ) ;

[ G G G G K ]<sub>n</sub> ( 配列番号 1 5 0 ) ( 配列中、n は 1 ~ 10 である ) ;

[ G R ]<sub>n</sub> ( 配列番号 1 5 1 ) ( 配列中、n は 1 ~ 10 である ) ;

[ G G R ]<sub>n</sub> ( 配列番号 1 5 2 ) ( 配列中、n は 1 ~ 10 である ) ;

[ G G G R ]<sub>n</sub> ( 配列番号 1 5 3 ) ( 配列中、n は 1 ~ 10 である ) ;

[ G G G G R ]<sub>n</sub> ( 配列番号 1 5 4 ) ( 配列中、n は 1 ~ 10 である ) ;

[ E A A A K ]<sub>n</sub> ( 配列番号 1 5 5 ) ( 配列中、n は 1 ~ 10 である ) ;

LA X3 AK X6 X7 AN X10 ELD X14 YGVSDF YKRLI X26 KAKTVEGVEALK X39 X40 IL X43 X44

LP ( 配列番号 3 0 0 )、

配列中、互いに独立に、X 3 は、E、S、Q および C から選択され；X 6 は、E、S および C から選択され；X 7 は、A および S から選択され；X 1 4 は、A、S、C および K から選択され；X 1 0 は、A、S および R から選択され；X 2 6 は、D および E から選択され；X 3 9 は、D および E から選択され；X 4 0 は、A および E から選択され；X 4 3 は、A および K から選択され；X 4 4 は、A、S および E から選択され；位置 4 5 のロイシンは存在するかまたは存在せず；位置 4 6 のプロリンは、存在するかまたは存在せず；

LA X3 AK X6 X7 AN X10 ELD X14 YGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP ( 配列番号 6 7 8 )

配列中、互いに独立に、X 3 は、E、S、Q および C から選択され；X 6 は、E、S および C から選択され；X 7 は、A および S から選択され；X 1 0 は、A、S および R から選択され；X 1 4 は、A、S、C および K から選択され；位置 4 5 のロイシンは存在するかまたは存在せず；位置 4 6 のプロリンは、存在するかまたは存在せず；

表 1、表 2、表 3 および図 1 参照のこと。

#### 【 0 2 3 2 】

エキセンディン、エキセンディン類似体またはその活性断片を含む操作されたポリペプチド、それを使用する方法および本明細書に記載された医薬組成物の例示的实施形態として、以下が挙げられる：

10

20

30

40

50

## 【 0 2 3 3 】

実施形態 1 . アルブミン結合ドメインポリペプチド ( A B D ) 配列と、エキセンディン配列、エキセンディン類似体配列またはその活性断片配列から選択される第 1 のペプチドホルモンドメイン ( H D 1 ) 配列とを含む操作されたポリペプチド。実施形態 2 . 前記 H D 1 配列および前記 A B D 配列を共有結合によって連結している第 1 のリンカー ( L 1 ) をさらに含む実施形態 1 に従う操作されたポリペプチド。3 . 前記の操作されたポリペプチドが、C 末端部分として前記 A B D 配列と、N 末端部分として前記 H D 1 配列を含む、実施形態 1 または 2 に従う操作されたポリペプチド。4 . 構造 : H D 1 - A B D を含む実施形態 3 に従う操作されたポリペプチド。5 . 構造 : H D 1 - L 1 - A B D を含む実施形態 3 に従う操作されたポリペプチド。6 . 前記 H D 1 配列が、前記エキセンディンまたはエキセンディン類似体配列である、実施形態 1 から 5 のいずれか 1 つに従う操作されたポリペプチド。7 . 前記エキセンディン配列が、エキセンディン - 4 配列であり、エキセンディン類似体配列が、L e u 1 4 エキセンディン - 4 配列である、実施形態 6 に従う操作されたポリペプチド。8 . 前記エキセンディン断片配列が、エキセンディン - 4 ( 1 - 2 8 ) 、エキセンディン - 4 ( 1 - 2 9 ) 、エキセンディン - 4 ( 1 - 3 0 ) 、エキセンディン - 4 ( 1 - 3 1 ) またはエキセンディン - 4 ( 1 - 3 2 ) の配列である、実施形態 6 に従う操作されたポリペプチド。9 . 前記エキセンディンまたはエキセンディン類似体配列が、

HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS ( 配列番号 3 ) 、HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIIS ( 配列番号 4 ) 、

HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS ( 配列番号 2 ) 、

HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIIS ( 配列番号 1 1 1 ) 、

HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPS ( 配列番号 1 1 2 ) 、

HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPS ( 配列番号 1 1 3 ) 、

HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISKKKKKK ( 配列番号 1 1 4 ) 、HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKQGGPS

AVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSKKKKKK ( 配列番号 1 1 5 ) 、HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKQGGPS

KEIISKKKKKK ( 配列番号 1 1 6 ) 、HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSKKKKKK ( 配

列番号 1 1 7 ) およびHGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSKKKKKK ( 配列番号 1 1 8

)

からなる配列の群から選択される、実施形態 6 に従う操作されたポリペプチド。10 . 前記エキセンディンまたはエキセンディン類似体が、H i s 1 に対応する位置に修飾を含み、L - ヒスチジン、D - ヒスチジン、デスアミノ - ヒスチジン、2 - アミノ - ヒスチジン、 - ヒドロキシ - ヒスチジン、ホモヒスチジン、N - - アセチル - ヒスチジン、 - フルオロメチル - ヒスチジン、 - メチル - ヒスチジン、3 - ピリジルアラニン、2 - ピリジルアラニン、4 - ピリジルアラニン、4 - イミダゾアセチル、デス - アミノ - ヒスチジル ( イミダゾプロピオニル ) 、 - ヒドロキシ - イミダゾプロピオニル、N - ジメチル - ヒスチジンおよび - カルボキシ - イミダゾプロピオニルからなる群から選択される、上記実施形態のいずれか 1 つに従う操作されたポリペプチド。11 . 前記類似体が、H i s 1 に対応する位置に修飾を含むエキセンディン - 4 を含み、( 4 - イミダゾアセチル )

エキセンディン - 4 、( デス - アミノ - ヒスチジル ) エキセンディン - 4 ( または ( イミダゾプロピオニル ) エキセンディン - 4 ) 、( - ヒドロキシ - イミダゾプロピオニル ) エキセンディン - 4 、( N - ジメチル - ヒスチジン ) エキセンディン - 4 および ( - カルボキシ - イミダゾプロピオニル ) エキセンディン - 4 からなる群から選択される、上記実施形態のいずれか 1 つに従う操作されたポリペプチド。12 . 前記エキセンディン類似体配列が、エキセンディン - 4 と、実施形態 9 のエキセンディン類似体に対して、または実施形態 8 のエキセンディン断片に対して少なくとも 7 0 % のアミノ酸配列同一性を有する、上記実施形態のいずれか 1 つに従う操作されたポリペプチド。13 . 前記エキセンディン類似体が、エキセンディン - 4 と、実施形態 9 のエキセンディン類似体に対して、または実施形態 8 のエキセンディン断片に対して少なくとも 8 0 % の同一性を有する、実施

形態 1 から 1 2 のいずれか 1 つに従う操作されたポリペプチド。14 . 前記エキセンディ

10

20

30

40

50

ン類似体が、エキセンディン - 4 と、実施形態 9 のエキセンディン類似体に対して、または実施形態 8 のエキセンディン断片に対して少なくとも 90% の同一性を有する、上記実施形態に従う操作されたポリペプチド。15. 前記エキセンディン類似体が、エキセンディン - 4 と、実施形態 9 のエキセンディン類似体に対して、または実施形態 8 のエキセンディン断片に対して少なくとも 95% の同一性を有する、上記実施形態に従う操作されたポリペプチド。16. 前記エキセンディン類似体配列が、挿入、欠失、付加および置換のいずれか 1 種またはそれらの組合せから独立に選択される 1 ~ 5 のアミノ酸修飾を有する上記実施形態のいずれか 1 つに従う操作されたポリペプチド。17. 前記 A B D 配列が、式 ( i ) LA X3 AK X6 X7 AN X10 ELD X14 YGVSD YKRLI X26 KAKTVEGVEALK X39 X40 IL X43 X44 LP (配列番号 300) (式中、互いに独立に、X3 は、E、S、Q および C から選択され; X6 は、E、S および C から選択され; X7 は、A および S から選択され; X14 は、A、S、C および K から選択され; X10 は、A、S および R から選択され; X26 は、D および E から選択され; X39 は、D および E から選択され; X40 は、A および E から選択され; X43 は、A および K から選択され; X44 は、A、S および E から選択され; 位置 45 のロイシンは存在するか、または存在せず; 位置 46 のプロリンは、存在するか、または存在しない); および式 ( i i ) ( i ) で定義される配列に対して少なくとも 95% の同一性を有するアミノ酸配列 [ただし、X<sub>7</sub> は、L、E または D ではないか; あるいは、アミノ酸配列は、P C T 公開出願第 WO 2009/016043 号において定義されるような以下の配列: LAEAK X<sub>a</sub> X<sub>b</sub> A X<sub>c</sub> X<sub>d</sub> EL X<sub>e</sub> KY GVS D X<sub>5</sub> YK X<sub>8</sub> X<sub>9</sub> I X<sub>11</sub> X<sub>12</sub> A X<sub>14</sub> TVEGV X<sub>20</sub> AL X<sub>23</sub> X<sub>24</sub> X<sub>25</sub> ILAALP (配列番号 679) (配列中、互いに独立に、X<sub>a</sub> は、V および E から選択され; X<sub>b</sub> は、L、E および D から選択され; X<sub>c</sub> は、N、L および I から選択され; X<sub>d</sub> は、R および K から選択され; X<sub>e</sub> は、D および K から選択され; X<sub>5</sub> は、Y および F から選択され; X<sub>8</sub> は、N、R および S から選択され; X<sub>9</sub> は、V、I、L、M、F および Y から選択され; X<sub>11</sub> は、N、S、E および D から選択され; X<sub>12</sub> は、R、K および N から選択され; X<sub>14</sub> は、K および R から選択され; X<sub>20</sub> は、D、N、Q、E、H、S、R および K から選択され; X<sub>23</sub> は、K、I および T から選択され; X<sub>24</sub> は、A、S、T、G、H、L および D から選択され; X<sub>25</sub> は、H、E および D から選択される) によって定義されない] を含むアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列を含む、前記の実施形態のいずれか 1 つに従う操作されたポリペプチド。18. 前記 A B D 配列が、式 ( i ) LA X3 AK X6 X7 AN X10 ELD X14 YGVSD YKRLI X26 KAKTVEGVEALK X39 X40 IL X43 X44 LP (配列番号 300) (式中、互いに独立に、X3 は、E、S、Q および C から選択され 0; X6 は、E、S および C から選択され; X7 は、A および S から選択され; X14 は、A、S、C および K から選択され; X10 は、A、S および R から選択され; X26 は、D および E から選択され; X39 は、D および E から選択され; X40 は、A および E から選択され; X43 は、A および K から選択され; X44 は、A、S および E から選択され; 位置 45 のロイシンは、存在するか、または存在せず; 位置 46 のプロリンは、存在するか、または存在しない) を含むアミノ酸配列を含む、実施形態 17 に従う操作されたポリペプチド。19. 前記 A B D 配列が、( i ) において定義される配列に対して少なくとも 95% の同一性を有する式 ( i i ) アミノ酸配列 [ただし、X<sub>7</sub> は、L、E または D ではなく; あるいは、アミノ酸配列は、P C T 公開出願第 WO 2009/016043 号において定義されるような以下の配列: LAEAK X<sub>a</sub> X<sub>b</sub> A X<sub>c</sub> X<sub>d</sub> EL X<sub>e</sub> KY GVSD X<sub>5</sub> YK X<sub>8</sub> X<sub>9</sub> I X<sub>11</sub> X<sub>12</sub> A X<sub>14</sub> TVEGV X<sub>20</sub> AL X<sub>23</sub> X<sub>24</sub> X<sub>25</sub> ILAALP (配列番号 679) (式中、互いに独立に、X<sub>a</sub> は、V および E から選択され; X<sub>b</sub> は、L、E および D から選択され; X<sub>c</sub> は、N、L および I から選択され; X<sub>d</sub> は、R および K から選択され; X<sub>e</sub> は、D および K から選択され; X<sub>5</sub> は、Y および F から選択され; X<sub>8</sub> は、N、R および S から選択され; X<sub>9</sub> は、V、I、L、M、F および Y から選択され; X<sub>11</sub> は、N、S、E および D から選択され; X<sub>12</sub> は、R、K および N から選択され; X<sub>14</sub> は、K および R から選択され; X<sub>20</sub> は、D、N、Q、E、H、S、R および K から選択され; X<sub>23</sub> は、K、I および T から選択され; X<sub>24</sub> は、A、S、T、G、H、L および D から選択され; X<sub>25</sub> は、H、E および D

10

20

30

40

50

から選択される)によって定義されない]を含むアミノ酸配列を含む、実施形態17に従う操作されたポリペプチド。20.前記ABD配列が、式(iii)LA X3 AK X6 X7 AN X10 ELD X14 YGVSDF YKRLIDKAKTVEGVEALKDA ILAALP(配列番号678)(配列中、互いに独立して、X3は、E、S、QおよびCから選択され;X6は、E、SおよびCから選択され;X7は、AおよびSから選択され;X10は、A、SおよびRから選択され;X14は、A、S、CおよびKから選択され;位置45のロイシンは、存在するか、または存在せず;位置46のプロリンは、存在するか、または存在しない)と、式(iv)(iii)において定義される配列と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列(ただし、X7は、L、EまたはDではないか;または代わりに、アミノ酸配列は、PCT公開出願第WO2009/016043号において定義されるような以下の配列:LAEAK X<sub>a</sub> X<sub>b</sub> A X<sub>c</sub> X<sub>d</sub> EL X<sub>e</sub> KY GVSD X<sub>5</sub> YK X<sub>8</sub> X<sub>9</sub> I X<sub>11</sub> X<sub>12</sub> A X<sub>14</sub> TVEGV X<sub>20</sub> AL X<sub>23</sub> X<sub>24</sub> X<sub>25</sub> ILAALP(配列番号679)によって定義されず、配列中、互いに独立して、X<sub>a</sub>は、VおよびEから選択され;X<sub>b</sub>は、L、EおよびDから選択され;X<sub>c</sub>は、N、LおよびIから選択され;X<sub>d</sub>は、RおよびKから選択され;X<sub>e</sub>は、DおよびKから選択され;X<sub>5</sub>は、YおよびFから選択され;X<sub>8</sub>は、N、RおよびSから選択され;X<sub>9</sub>は、V、I、L、M、FおよびYから選択され;X<sub>11</sub>は、N、S、EおよびDから選択され;X<sub>12</sub>は、R、KおよびNから選択され;X<sub>14</sub>は、KおよびRから選択され;X<sub>20</sub>は、D、N、Q、E、H、S、RおよびKから選択され;X<sub>23</sub>は、K、IおよびTから選択され;X<sub>24</sub>は、A、S、T、G、H、LおよびDから選択され;X<sub>25</sub>は、H、EおよびDから選択される)を含むアミノ酸配列を含む、前記の実施形態のいずれか1つに記載の操作されたポリペプチド。21.前記ABD配列が、式(iii)LA X3 AK X6 X7 AN X10 ELD X14 YGVSDF YKRLIDKAKTVEGVEALKDA ILAALP(配列番号678)(配列中、互いに独立して、X3は、E、S、QおよびCから選択され;X6は、E、SおよびCから選択され;X7は、AおよびSから選択され;X10は、A、SおよびRから選択され;X14は、A、S、CおよびKから選択され;位置45のロイシンは、存在するか、または存在せず;位置46のプロリンは、存在するか、または存在しない)を含むアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態20に記載の操作されたポリペプチド。22.前記ABD配列が、(iii)において定義される配列に対して少なくとも95%の同一性を有する式(iv)アミノ酸配列[ただし、X7は、L、EまたはDではなく;あるいは、アミノ酸配列は、PCT公開出願第WO2009/016043号において定義されるような以下の配列:LAEAK X<sub>a</sub> X<sub>b</sub> A X<sub>c</sub> X<sub>d</sub> EL X<sub>e</sub> KY GVSD X<sub>5</sub> YK X<sub>8</sub> X<sub>9</sub> I X<sub>11</sub> X<sub>12</sub> A X<sub>14</sub> TVEGV X<sub>20</sub> AL X<sub>23</sub> X<sub>24</sub> X<sub>25</sub> ILAALP(配列番号679)(式中、互いに独立に、X<sub>a</sub>は、VおよびEから選択され;X<sub>b</sub>は、L、EおよびDから選択され;X<sub>c</sub>は、N、LおよびIから選択され;X<sub>d</sub>は、RおよびKから選択され;X<sub>e</sub>は、DおよびKから選択され;X<sub>5</sub>は、YおよびFから選択され;X<sub>8</sub>は、N、RおよびSから選択され;X<sub>9</sub>は、V、I、L、M、FおよびYから選択され;X<sub>11</sub>は、N、S、EおよびDから選択され;X<sub>12</sub>は、R、KおよびNから選択され;X<sub>14</sub>は、KおよびRから選択され;X<sub>20</sub>は、D、N、Q、E、H、S、RおよびKから選択され;X<sub>23</sub>は、K、IおよびTから選択され;X<sub>24</sub>は、A、S、T、G、H、LおよびDから選択され;X<sub>25</sub>は、H、EおよびDから選択される)によって定義されない]を含むアミノ酸配列を含む、実施形態20に従う操作されたポリペプチド。23.X6が、ABDにおいて、Sである、前記の実施形態のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。24.X6が、ABDにおいて、Eである、前記の実施形態のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。25.X3が、ABDにおいて、Sである、前記の実施形態のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。26.X3が、ABDにおいて、Eである、前記の実施形態のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。27.X3が、ABDにおいて、Qである、前記の実施形態のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。28.X7が、ABDにおいて、Aである、前記の実施形態のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。29.X7が、ABDにおいて、Sである、前記の実施形態のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。30.X

10

20

30

40

50

10が、ABDにおいて、Aである、前記の実施形態のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。31.X10が、ABDにおいて、Sである、前記の実施形態のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。32.X10が、ABDにおいて、Rである、前記の実施形態のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。33.X14が、ABDにおいて、Sである、前記の実施形態のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。34.X14が、ABDにおいて、Cである、前記の実施形態のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。35.X14が、ABDにおいて、Kである、前記の実施形態のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。36.X14が、ABDにおいて、Aである、前記の実施形態のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。37.X26が、ABDにおいて、Dである、前記の実施形態のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。38.X26が、ABDにおいて、Eである、前記の実施形態のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。39.X39が、ABDにおいて、Dである、前記の実施形態のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。40.X39が、ABDにおいて、Eである、前記の実施形態のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。41.X40が、ABDにおいて、Aである、前記の実施形態のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。42.X40が、ABDにおいて、Eである、前記の実施形態のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。43.X43が、ABDにおいて、Aである、前記の実施形態のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。44.X43が、ABDにおいて、Kである、前記の実施形態のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。45.X44が、ABDにおいて、Aである、前記の実施形態のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。46.X44が、ABDにおいて、Sである、前記の実施形態のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。47.X44が、ABDにおいて、Eである、前記の実施形態のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。48.ABDにおいて、位置45のロイシンが存在する、前記の実施形態のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。49.ABDにおいて、位置45のロイシンが存在しない、前記の実施形態のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。50.ABDにおいて、位置46のプロリンが存在する、前記の実施形態のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。51.ABDにおいて、位置46のプロリンが存在しない、前記の実施形態のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。52.相互作用の $k_{ff}$ 値が、最大 $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ であるよう、ABDがアルブミンと結合する、前記の実施形態のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。53.相互作用の $k_{ff}$ 値が、最大 $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ であるよう、ABDがアルブミンと結合する、前記の実施形態のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。54.ABD配列が、本明細書に開示されたか、または表1に由来するか、または図1もしくは配列番号301~444に由来するABD配列のいずれか1つから選択される、前記の実施形態のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。55.ABD配列が、配列番号304~305、配列番号307~308、配列番号310~311、配列番号313~314、配列番号316~317、配列番号319~320、配列番号322~323、配列番号325~326、配列番号328~329、配列番号331~332、配列番号334~335、配列番号337~338、配列番号341~342および配列番号349~350のいずれか1つから選択されるアミノ酸配列から選択される、前記の実施形態のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。56.ABD配列が、表1または図1の配列のうちいずれか1種に由来するアミノ酸配列から選択される配列を含む、前記の実施形態のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。57.ABD配列が、式(i)または(iii)において定義される配列のNおよび/またはC末端に位置する1種または複数のさらなるアミノ酸残基をさらに含む、前記の実施形態のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。58.1種または複数のさらなるアミノ酸残基が、ABD配列のN末端にセリン残基を含む、前記の実施形態に従う操作されたポリペプチド。59.1種または複数のさらなるアミノ酸残基が、ABD配列のN末端にグリシン残基を含む、前記の実施形態のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。60.1種または複数のさらなるアミノ酸残基が、ABD配列のN末端にグルタミン酸残基またはシステイン残基を含む、前記の実施形態

10

20

30

40

50

のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。61. 1種または複数のさらなるアミノ酸残基が、ABD配列のN末端にアラニン残基を含む、前記の実施形態のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。62. 1種または複数のさらなるアミノ酸残基が、ABD配列のC末端にグリシン残基を含む、前記の実施形態のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。63. 1種または複数のさらなるアミノ酸残基が、ABD配列のC末端にシステイン残基を含む、前記の実施形態のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。64. ABDが、配列番号445~450および配列番号462~463のいずれか1種から選択されるアミノ酸配列を含む、前記の実施形態のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。65. ABDが、2個以下のシステイン残基を含む、前記の実施形態のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。66. ABD配列が、1個以下のシステイン残基を含む、前記の実施形態に従う操作されたポリペプチド。67. エキセンディン配列またはエキセンディン類似体配列またはその断片が、ポリペプチドの位置X<sub>14</sub>のシステイン残基のチオール基を介してABDとコンジュゲートしている、前記の実施形態のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。68. 前記ABDが、GSLAEAKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP(配列番号463)またはGSLAEAKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL(配列番号700)である、実施形態18に従う操作されたポリペプチド。69. 前記ABD配列が、表1、図1または本明細書における表のいずれかに由来する配列からなる群から選択されるペプチド配列のいずれか1種を含む、実施形態18に従う操作されたポリペプチド。70. 前記ABD配列が、式i)もしくはi i i)のABDと、または表1、図1もしくは本明細書における表のいずれかのABDのいずれか1種と、少なくとも95%の同一性を有するABD類似体を含む、実施形態1から69のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。71. 前記リンカーL1が、1~30個のアミノ酸または30個未満のアミノ酸のペプチドである、実施形態1から70のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。72. 前記リンカーL1が、20種の天然に存在するアミノ酸から選択される、実施形態1から71のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。73. 前記リンカーL1が、化学合成、翻訳後化学修飾によってか、または宿主細胞への組換え発現によるインピボ組み込みによって組み込まれた非天然アミノ酸を含む、実施形態1から72のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。74. 前記リンカーL1アミノ酸が、グリシン、アラニン、プロリン、アスパラギン、グルタミンおよびリシンから選択される、実施形態1から73のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。75. 前記リンカーL1アミノ酸が、グリシンである、実施形態1から74のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。76. 前記リンカーL1が、過半数の立体障害のないアミノ酸を含む、実施形態1から74のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。77. 前記リンカーL1が、ポリグリシン、ポリアラニン、ポリ(Gly-Ala)またはポリ(Gly-Ser)を含む、実施形態1から76のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。78. 前記リンカーL1が、(Gly)<sub>3</sub>、(Gly)<sub>4</sub>(配列番号125)、または(Gly)<sub>5</sub>(配列番号126)、(Gly)<sub>3</sub>Lys(Gly)<sub>4</sub>(配列番号131); (Gly)<sub>3</sub>AsnGlySer(Gly)<sub>2</sub>(配列番号132); (Gly)<sub>3</sub>Cys(Gly)<sub>4</sub>(配列番号133); GlyProAsnGlyGly(配列番号134)、GG、GGG、GGS、またはGGGS(配列番号192)の配列を含む、実施形態1から77のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。79. 前記リンカーL1が、GlyおよびAlaの組合せを含む、実施形態1から74のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。80. 前記リンカーL1が、GlyおよびSerの組合せを含む、実施形態1から74のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。81. 前記リンカーL1が、グリシンリッチペプチドからなる群から選択される、実施形態1から80のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。82. 前記リンカーL1が、N末端TGジペプチドを含む、実施形態1から81のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。83. 前記リンカーL1が、C末端ASジペプチドを含む、実施形態1から82のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。84. 前記リンカーL1が、N末端TGジペプチドおよびC末端ASジペプチドを含む、実施形態1から83のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。85. 前記リンカーL1が、TG-(GGGS)<sub>1</sub>(配列番号848)、TG-(GGGS)<sub>2</sub>(配列番号849)

、TG-(GGGS)3 (配列番号 8 5 0 )、TG-(GGGS)4 (配列番号 8 5 1 )、TG-(GGGS)5 (配列番号 8 5 2 )、(GGGS)1-AS (配列番号 8 5 3 )、(GGGS)2-AS (配列番号 8 5 4 )、(GGGS)3-AS (配列番号 8 5 5 )、(GGGS)4-AS (配列番号 8 5 6 )、(GGGS)5-AS (配列番号 8 5 7 )、TG-(GGGS)1-AS (配列番号 1 9 5 )、TG-(GGGS)2-AS (配列番号 8 5 8 )、TG-(GGGS)3-AS (配列番号 8 5 9 )、TG-(GGGS)4-AS (配列番号 8 6 0 )、およびTG-(GGGS)5-AS (配列番号 8 6 1 ) からなる群から選択される、実施形態 1 から 8 4 のいずれか 1 つに従う操作されたポリペプチド。8 6 . 前記リンカー L 1 T G および / または A S が、存在しないか、T、A、S および G から選択されるアミノ酸の対によって置換されている、実施形態 1 から 8 5 のいずれか 1 つに従う操作されたポリペプチド。8 7 . 約  $10^{-6}$  mol / L 未満の解離定数を有する血清アルブミンに対する親和性を有する、実施形態 1 から 8 6 のいずれか 1 つに従う操作されたポリペプチド。8 8 . 約  $10^{-9}$  mol / L 未満の解離定数を有する血清アルブミンに対する親和性を有する、実施形態 8 7 に従う操作されたポリペプチド。8 9 . 約  $10^{-12}$  mol / L 未満の解離定数を有する血清アルブミンに対する親和性を有する、実施形態 8 8 に従う操作されたポリペプチド。9 0 . 少なくとも 1 日の作用持続期間を有する、実施形態 1 から 8 9 のいずれか 1 つに従う操作されたポリペプチド。9 1 . 少なくとも 3 日の作用持続期間を有する、実施形態 9 0 に従う操作されたポリペプチド。9 2 . 少なくとも 6 日の作用持続期間を有する、実施形態 9 1 に従う操作されたポリペプチド。9 3 . ヒト対象において少なくとも 6 日の作用持続期間を有する、実施形態 9 2 に従う操作されたポリペプチド。9 4 . 少なくとも 7 日の作用持続期間を有する、実施形態 9 1 に従う操作されたポリペプチド。9 5 . ヒト対象において少なくとも 7 日の作用持続期間を有する、実施形態 9 2 に従う操作されたポリペプチド。9 6 . 本明細書における表 2 または表 3 の配列のいずれか 1 種からなる群から選択される、前記の実施形態のいずれか 1 つに従う操作されたポリペプチド。9 7 . HEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISTGGGGSASGSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP (配列番号 7 2 7 ) ; HEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPKSTGGGGSASGSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP (配列番号 7 2 8 ) ; HEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSTGGGGSASGSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL (配列番号 7 2 9 ) ; HEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSTGGGGSASGSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP (配列番号 7 3 0 ) ; HEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSTGGGGSASGSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP (配列番号 7 3 1 ) ; HEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSTGGGGSASGSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP (配列番号 7 3 2 ) ; HEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSTGGGGSASGSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP (配列番号 7 3 3 ) ; HEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISTGGGGSASGSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL (配列番号 7 3 4 ) ; HEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPKSTGGGGSASGSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL (配列番号 7 3 5 ) ; HEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSTGGGGSASGSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL (配列番号 7 3 6 ) ; HEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSTGGGGSASGSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL (配列番号 7 3 7 ) ; HEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSTGGGGSASGSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL (配列番号 7 3 8 ) ; HEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSTGGGGSASGSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL (配列番号 7 3 9 ) ; HEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISTGGGGSASGSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL (配列番号 7 4 0 ) ; HEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPKSTGGGGSASGSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL (配列番号 7 4 1 ) ; HEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSTGGGGSASGSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL (配列番号 7 4 2 ) ; HEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSTGGGGSASGSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL (配列番号 7 4 3 ) ; HEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSTGGGGSASGSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL (配列番号 7 4 4 ) ; および HEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSTGGGGSASGSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL (配列番号 7 4 5 )

10

20

30

40

50

からなる群から選択される、前記の実施形態のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。98. HEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISTGGGSASGSLAEAKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP(配列番号727); HEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPKSTGGGSASGSLAEAKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP(配列番号728); HEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSTGGGSASGSLAEAKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL(配列番号729); HEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSTGGGSASGSLAEAKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP(配列番号730); HEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSTGGGSASGSLAEAKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP(配列番号731); HEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSTGGGSASGSLAEAKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP(配列番号732); HEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSTGGGSASGSLAEAKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP(配列番号733); HEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISTGGGSASGSLAEAKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL(配列番号734); HEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPKSTGGGSASGSLAEAKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL(配列番号735); HEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSTGGGSASGSLAEAKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL(配列番号737); HEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSTGGGSASGSLAEAKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL(配列番号738); およびHEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSTGGGSASGSLAEAKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL(配列番号739)からなる群から選択される、前記の実施形態のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。99. 化合物5、化合物9または化合物11を含む、前記の実施形態のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。100. 前記の操作されたポリペプチドと、少なくとも95%の配列同一性を有する、前記の実施形態のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。101. 前記の操作されたポリペプチドと、少なくとも98%の配列同一性を有する、前記の実施形態のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。102. 哺乳類への投与の際に、免疫応答を誘発しないか、またはABDに付いていないか、もしくは本明細書に記載されるような低減した免疫原性のために修飾されていない、PCT公開出願第WO2009/016043号において記載されるABDに付いているエキセンディンの、哺乳類への投与の際に誘発される免疫応答と比較して、低減した免疫応答を誘発する、前記の実施形態のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。103. 医薬として使用するための、前記の実施形態のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。104. 1日2回の投与に適した血漿中半減期を有する、前記の実施形態のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。105. 1日1回の投与に適した血漿中半減期を有する、前記の実施形態のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。106. 週に2回の投与に適した血漿中半減期を有する、前記の実施形態のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。107. 週に1回の投与に適した血漿中半減期を有する、前記の実施形態のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。108. 少なくとも40時間の血漿中半減期を有する、前記の実施形態のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。109. 少なくとも60時間の血漿中半減期を有する、前記の実施形態のいずれか1種に従う操作されたポリペプチド。110. 少なくとも72時間の血漿中半減期を有する、前記の実施形態のいずれか1つに従う操作されたポリペプチド。111. 前記の実施形態のいずれか1つに従う操作されたポリペプチドと、医薬上許容される賦形剤とを含む組成物。112. 水性である、実施形態111に従う組成物。113. 固体である、実施形態111に従う組成物。114. 医薬として使用するための前記の実施形態のいずれか1種に従う組成物。115. 操作されたポリペプチドが、凍結乾燥された固体である、前記の実施形態のいずれか1種に従う組成物。116. ヒト血清アルブミンをさらに含む、前記の実施形態のいずれか1種に従う組成物。117. 前記の実施形態のいずれか1種に従う操作されたポリペプチドを含む医薬組成物。118. 操作されたポリペプチドと医薬上許容される賦形剤とを含む、実施形態117の医薬組成物。119. 水性である、前記の実施形態のいずれか1種に従う医薬組成物。120. 固体である、前記の実施形態のいずれか1種に従う医薬組成物。121. 医薬として使用するための、前記の実施形態のいずれか1種に従う医薬組成物。122

．操作されたポリペプチドが、凍結乾燥した固体である、前記の実施形態のいずれか1種に従う医薬組成物。123．ヒト血清アルブミンをさらに含む、前記の実施形態のいずれか1種に従う医薬組成物。124．筋肉内、静脈内、皮下、皮内、関節内、くも膜下腔内、粘膜、経口、経鼻腔、舌下、肺または頰側送達のための医薬組成物である、前記の実施形態のいずれか1種に従う医薬組成物。125．皮下送達のための医薬組成物である、前記の実施形態のいずれか1種に従う医薬組成物。126．注射による送達のための医薬組成物である、前記の実施形態のいずれか1種に従う医薬組成物。127．経口送達のための医薬組成物である、前記の実施形態のいずれか1種に従う医薬組成物。128．経口送達のための医薬組成物であり、固体形態を含む、実施形態127に従う医薬組成物。129．経口送達のための医薬組成物であり、錠剤、顆粒剤、微粒子剤またはカプセル剤を含む、実施形態128に従う医薬組成物。130．除放性または持続性医薬組成物である、前記の実施形態のいずれか1種に従う医薬組成物。131．1日に2回投与される医薬組成物である、前記の実施形態のいずれか1種に従う医薬組成物。132．1日に1回投与される医薬組成物である、前記の実施形態のいずれか1種に従う医薬組成物。133．週に2回投与される医薬組成物である、前記の実施形態のいずれか1種に従う医薬組成物。134．週に1回の医薬組成物である、前記の実施形態のいずれか1種に従う医薬組成物。135．このような治療を必要とする対象において疾患または障害を治療するための、前記の実施形態のいずれか1種に従う医薬組成物。136．疾患または障害が、糖尿病、過体重、肥満症、アルツハイマー病、パーキンソン病、脂肪肝疾患、脂質異常症、冠動脈疾患、卒中、短腸症候群(SBS)、高脂血症、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)、非アルコール性脂肪肝疾患(NAFLD)、無自覚性低血糖(HU)、サルコイドーシスを含めた拘束性肺疾患またはメタボリックシンドロームXである、実施形態135の医薬組成物。137．前記疾患または障害が、糖尿病、過体重、肥満症、SBSまたはパーキンソン病である、実施形態136の医薬組成物。138．前記糖尿病が、I型糖尿病、II型糖尿病、前糖尿病、妊娠性糖尿病、HIV-治療誘発性糖尿病、ステロイド誘発性糖尿病または成人潜在性自己免疫性糖尿病(LADA)である、実施形態137の医薬組成物。139．操作されたポリペプチドが週に1回の投与を提供する、実施形態1から138のいずれか1種の操作されたポリペプチドまたは医薬組成物。140．前記の実施形態のいずれか1種に従う操作されたポリペプチドを、それを必要とする対象に、前記疾患または障害を治療するのに有効な量で投与することを含む、対象において疾患または障害を治療する方法。141．前記疾患または障害が、糖尿病、過体重、肥満症、アルツハイマー病、パーキンソン病、脂肪肝疾患、脂質異常症、冠動脈疾患、卒中、短腸症候群(SBS)、高脂血症、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)、非アルコール性脂肪肝疾患(NAFLD)、無自覚性低血糖(HU)、サルコイドーシスを含めた拘束性肺疾患またはメタボリックシンドロームXである、実施形態140に従う方法。142．前記疾患または障害が、糖尿病、過体重、肥満症、アルツハイマー病、脂肪肝疾患、脂質異常症、冠動脈疾患、卒中、SBS、高脂血症またはパーキンソン病である、実施形態140に従う方法。143．前記疾患または障害が、糖尿病、過体重、肥満症、SBSまたはパーキンソン病である、実施形態142に従う方法。144．前記疾患または障害が、I型糖尿病、II型糖尿病または前糖尿病である、実施形態143に従う方法。145．前記疾患または障害が、II型糖尿病である、実施形態142に従う方法。146．前記疾患または障害が、脂質異常症または高脂血症である、実施形態142に従う方法。147．前記の実施形態のいずれか1種に従う操作されたポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。148．実施形態147に従うポリヌクレオチドを含む発現ベクター。149．請求項148に従う発現ベクターを含む宿主細胞。150．操作されたポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを発現させることを含む、前記の実施形態のいずれか1種の操作されたポリペプチドを製造する方法。151．反応性側鎖が保護されているアミノ酸および/またはア

ミノ酸誘導体を使用する非生物学的ペプチド合成によって、前記の実施形態のいずれか1種に従う操作されたポリペプチドを製造する方法であって、非生物学的ペプチド合成が、

10

20

30

40

50

アミノ酸および/またはアミノ酸誘導体を段階的にカップリングして、反応性側鎖が保護されている、前記の実施形態のいずれか1種に従うポリペプチドを形成することと、ポリペプチドの反応性側鎖から保護基を除去することと、水溶液中での得られたポリペプチドのフォールディングとを含む、方法。152. エキセンディンを製造すること、ABDを製造すること、および製造されたABDを製造されたエキセンディンとコンジュゲートすることを含む、前記の実施形態のいずれか1種に従う操作されたポリペプチドを製造する方法。

#### 【実施例】

#### 【0234】

実施例1~5は、その他の事柄の中でも、本明細書に記載されたABDの優れた特性、例えば、これまでのABDと比較して低減された免疫原性特性を例示するために提供される。

10

#### 【0235】

##### 実施例1

アルブミン結合ポリペプチドのクローニング、発現、精製および特性決定。

この実施例では、そのアミノ酸配列が図1に示されている8種の異なるアルブミン結合ポリペプチド、PEP07913(配列番号453)、PEP07912(配列番号457)、PEP07914(配列番号458)、PEP07968(すなわち、PEP07911、配列番号459とコンジュゲートしているDOTA)、PEP06923(配列番号454)、PEP07271(配列番号455)、PEP07554(配列番号456)およびPEP07844(配列番号461)をクローニングし、精製し、特性決定した。

20

#### 【0236】

##### 材料および方法

G148-GA3の突然変異体を、適当なオリゴヌクレオチドを用い、部位特異的突然変異誘発を使用して作製し、所望のアルブミン結合ポリペプチド変異体を得た。特異的エンドヌクレアーゼ部位ならびにアルブミン結合ポリペプチド変異体の前のN末端MGSS配列(配列番号844)を付加するプライマーを用い、PCRによって、遺伝子断片を増幅した。NdeIおよびNotIを用いて断片を切断し、精製し、同一酵素で制限された、クローニングベクター、プラスミドpAY02556(pBR322由来の複製起点、カナマイシン耐性遺伝子および対象とする遺伝子の発現のためのT7プロモーターを含有する)にライゲーションした。ライゲーションをエレクトロコンピテント大腸菌TOP10細胞に形質転換した。形質転換された細胞を、50μg/mlのカナマイシンを補給した、TBABプレート(30g/lトリプトース(tryptose)血液寒天基礎培地)上に広げ、続いて、37°Cで一晩インキュベーションした。PCRを使用してコロニーをスクリーニングし、ピオチン化オリゴヌクレオチドおよび製造業者のプロトコールに従って使用されるBigDye(登録商標)Terminator v3.1 Cycle Sequencingキット(Applied Biosystems)を使用して増幅した断片の配列決定を実施した。Magnatrix 8000(NorDiag AB)を使用して、磁性ストレプトアビジンコーティングされたビーズと結合させることによって配列決定反応物を精製し、ABI PRISM(登録商標)3100 Genetic Analyzer(PE Applied Biosystems)で分析した。すべてのアルブミン結合ポリペプチド変異体を、モノマーとしてサブクローニングし、発現ベクターによってコードされるコンストラクトを、MGSS-[PP###]た(配列番号844として開示される「MGSS」)(ここで、PP###は、アルブミン結合ポリペプチドの配列を構成する46個のアミノ酸残基に対応する)。

30

40

#### 【0237】

さらに、G148-GA3の遺伝子断片、PP007(配列番号307)、PP013(配列番号313)およびPP037(配列番号337)を、アルブミン結合ポリペプチドの配列を構成する46個のアミノ酸残基の前に、特異的エンドヌクレアーゼ部位ならび

50

にヘキサヒスチジン配列（配列番号49）、TEVプロテアーゼ部位およびグリシン残基を付加するプライマーを用い、PCRによって増幅させた。ポリペプチドPEP07913（配列番号453）、PEP07912（配列番号457）、PEP07914（配列番号458）およびPEP07968（配列番号459）は、グリシン残基が付加された、アルブミン結合ポリペプチドG148-GA3、PP007（配列番号307）、PP013（配列番号313）およびPP037（配列番号337）に対応する。断片をXbaIおよびNotIで切断し、精製し、同一酵素で制限された、クローニングベクターであるプラスミドpAY02512（pBR322由来の複製起点、カナマイシン耐性遺伝子および対象とする遺伝子の発現のためのT7プロモーターを含有する。クローニング部位の前には、ヘキサヒスチジントグ（配列番号49）を含有するペプチドをコードする配列とそれに続くTEVプロテアーゼの切断部位がある。）にライゲーションした。連結、形質転換および配列検証を、上記のように実施した。4種のアルブミン結合ポリペプチド変異体G148-GA3、PP007、PP013およびPP037を、モノマーとしてサブクローニングし、発現ベクターによってコードされるコンストラクトを、MGSSHHHHHHLLQSSGVDLGTENLYFQG-[PP###]（配列中、MGSSHHHHHHLLQSSGVDLGTENLYFQGは、配列番号600であり、「PP##」は、本明細書に記載のABD配列を表す）とした。

10

#### 【0238】

##### タンパク質発現

アルブミン結合ポリペプチド変異体を、N末端MGSS伸長（配列番号844として開示される「MGSS」）またはN末端His6-タグ（配列番号49）とそれに続くTEV-プロテアーゼ認識部位およびグリシン残基のいずれかを有する大腸菌BL21(DE3)において発現させた。各アルブミン結合ポリペプチド変異体のコロニーを使用して、カナマイシンを50 µg/mlの濃度に補給した、4mlのTSB+YE培地に播種した。培養物を、37 °Cでおよそ5時間増殖させた。パラレルバイオリアクター（Gretasystem, Belach Bioteknik AB）において、各培養物から得られた3mlを使用して、カナマイシンを50 µg/mlの濃度に補給した800mlのTSB+YEに播種した。培養を、800ml/分のエアレーションおよび攪拌プロフィールを用い、37 °Cで実施して、2のOD600まで30%を上回る溶存酸素レベルを維持し、続いて、IPTGを0.5mMの終濃度に添加した。培養を5時間継続し、その後、培養物を10 °Cに冷却し、エアレーションを停止し、攪拌を300rpmに低下させた。遠心分離（15600 × g、4分、20分）によって細胞ペレットを回収し、精製まで、-20 °Cで保存した。

20

30

#### 【0239】

##### His6-タグ（配列番号49）およびTEV-プロテアーゼ部位を用いるアルブミン結合ポリペプチド変異体の精製

可溶性ヘキサヒスチジントグのついたポリペプチド（配列番号49として開示される「ヘキサヒスチジン」）PEP07913（配列番号453）、PEP07912（配列番号456）、PEP07914（配列番号458）およびPEP07968（配列番号459）を有する凍結細胞ペレットを、35mlの結合バッファー（20mMリン酸ナトリウム、0.5M NaCl、20mMイミダゾール、pH7.4）に懸濁し、1000Uのベンゾナーゼ（登録商標）（1.01654.001, Merck）を添加し、超音波処理によって破壊した。各ポリペプチドについて、超音波処理した懸濁液を遠心分離（1時間、37000 × g、4分）によって清澄化し、上清をHis GraviTrapTMカラム（11-0033-99, GE Healthcare）にロードした。カラムを10mlの洗浄バッファー（20mMリン酸ナトリウム、0.5M NaCl、60mMイミダゾール、pH7.4）で洗浄し、その後、3mlの溶出バッファー（20mMリン酸ナトリウム、0.5M NaCl、0.5Mイミダゾール、pH7.4）を用いてポリペプチドを溶出した。バッファーを、PD-10脱塩カラム（17-0851-01, GE Healthcare）を使用して切断バッファー（50mM Tris-HCl

40

50

、150 mM NaCl、pH 8) に交換した。280 nmでの吸光度を測定することによって、ポリペプチド生成物の量を決定し、その後、DTTを5 mMの終濃度に添加した。切断バッファーに、His 6 タグをつけたTEVプロテアーゼ(配列番号49として開示される「His 6」)をポリペプチド生成物に対して1:10の質量比で添加した。切断を、4、緩徐な混合下で一晩実施した。切断混合物にイミダゾールを20 mMの濃度に添加し、その後、混合物をHis GraviTrap™カラム(11-0033-99、GE Healthcare)にロードし、切断されたHis 6 タグ(配列番号49)、His 6 - タグのついたTEVプロテアーゼ(配列番号49として開示される「His 6」)およびHis 6 タグのついた未切断生成物(配列番号49として開示される「His 6」)を回収した。

10

## 【0240】

各変異体について、アルブミン結合ポリペプチド変異体を含有するフロースルーを、以下のように逆相クロマトグラフィー(RPC)によってさらに精製した。フロースルー画分を、RPC Aバッファー(水中、0.1% TFA)で先に平衡化させた1 mlのResource 15 RPCカラム(GE Healthcare)にロードした。10カラム容積(CV)のRPC Aバッファーを用いるカラム洗浄後、結合しているポリペプチドを、10 CVの間、0~50% RPC Bバッファー(アセトニトリル中、0.1% TFA)の直線勾配を用いて溶出した。流速を2 ml/分とし、280 nmの吸光度をモニタリングした。アルブミン結合ポリペプチド変異体を含有する画分を、SDS-PAGE分析によって同定し、プールした。

20

## 【0241】

RPC精製したアルブミン結合ポリペプチド変異体を、XK16カラム(GE Healthcare)に充填した120 mlのSuperdex 75(GE Healthcare)でのゲル濾過によってさらに精製した。ランニングバッファーは、1x PBSとし、流速は2 ml/分とした。純粋なアルブミン結合ポリペプチド変異体を含有する画分をプールし、およそ1.3 mg/mlに濃縮した。最後に、製造業者の推奨に従って、Affinity Pak Detoxi-ゲルエンドトキシン除去ゲル(Pierce、prod番号20344)の1 mlのカラムを使用することによって、微量の残存するエンドトキシンから濃縮物を精製した。

30

## 【0242】

以下のとおり、RPC-精製工程の前に、アルブミン結合ポリペプチド変異体PEP07911を、Mal-DOTAとコンジュゲートした。ディスプレイブルPD-10脱塩カラム(GE Healthcare)を使用して、IMAC-FT精製工程からのフロースルー画分のバッファーを、0.2 M NaAc、pH 5.5に交換した。マレイミド-モノ-アミド-DOTA(Macrocyclics、カタログ番号B-272)を5倍モル過剰に加え、連続振盪下、30 で60分間インキュベートした。得られたポリペプチドをPEP07968と表した。

## 【0243】

His 6 - タグ(配列番号49)を含まないアルブミン結合ポリペプチド変異体の精製  
可溶性アルブミン結合ポリペプチド変異体PEP06923(配列番号454)、PEP07271(配列番号455)、PEP07554(配列番号456)およびPEP07844(配列番号461)を有する凍結細胞ペレットを20 mM Tris-HCl、pH 8に懸濁し、超音波処理によって破壊した。各ポリペプチド変異体について、超音波処理された懸濁液を遠心分離(30分、32000 x g、4)によって清澄化し、上清をHSA-セファロースカラム(GE Healthcare)上にロードした。TST-バッファー(25 mM Tris-HCl、1 mM EDTA、200 mM NaCl、0.05% Tween 20、pH 8.0)、続いて、5 mM NH4Ac、pH 5.5を用いて洗浄した後、0.5 M HAc、pH 3.2を用いて結合しているアルブミン結合ポリペプチド変異体を溶出した。

40

## 【0244】

50

アルブミン結合ポリペプチド変異体を、逆相クロマトグラフィー（RPC）によって以下のとおりにさらに精製した。各変異体について、HSA-アフィニティー精製工程から得た溶出液を、RPC Aバッファー（水中、0.1% TFA）で先に平衡化させた1mlのResource 15 RPCカラム（GE Healthcare）上にロードした。10CVのRPC Aバッファーを用いるカラム洗浄後、結合しているポリペプチドを、10CVの間、0~50% RPC Bバッファー（アセトニトリル中、0.1% TFA）の直線勾配を用いて溶出した。流速を2ml/分とし、280nmの吸光度をモニタリングした。アルブミン結合ポリペプチド変異体を含有する画分を、SDS-PAGE分析によって同定し、プールした。最後に、ディスパーザブルPD-10脱塩カラム（GE Healthcare）を使用して、1xPBS（2.68mM KCl、13.7mM NaCl、1.47mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、8.1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、pH 7.4）にバッファーを交換した。

10

## 【0245】

精製アルブミン結合ポリペプチド変異体の特性決定

濃度は、NanoDrop（登録商標）ND-1000分光光度計を使用して、280nmの吸光度を測定することによって評価した。SDS-PAGEおよびLC-MSを用いてタンパク質をさらに分析した。

## 【0246】

SDS-PAGE分析のために、各アルブミン結合ポリペプチド変異体のおよそ10μgを、NuPAGE LDSサンプルバッファー（Invitrogen）と混合し、70で15分間インキュベートし、NuPAGE 4~12% Bis-Tris Gels（Invitrogen）上にロードした。ゲルを、分子量マーカーとしてSharp Prestained Standard（Invitrogen）を使用し、染色のためにPhastGel BlueR（GE Healthcare）を使用し、XCell II SureLock 電気泳動セル（Novex）中で、NuPAGE MES SDSランニングバッファー（Invitrogen）を用いて流した。

20

## 【0247】

アルブミン結合ポリペプチド変異体の同定を検証するために、API-ESIおよびシングル四重極質量分析器を備えたAgilent 1100 LC/MSDシステムを使用してLC/MS分析を実施した。およそ10μgの各精製アルブミン結合ポリペプチド変異体を、0.5ml/分の流速のZorbax 300SB-C8 Narrow-Boreカラム（2.1x150mm、3.5μm、Agilent Technologies）上にロードした。0.5ml/分で15分間の10~70%溶液Bの直線勾配を使用してポリペプチドを溶出した。分離を、30で実施した。イオンシグナルおよび280および220nmでの吸光度をモニタリングした。精製アルブミン結合ポリペプチド変異体の分子量をMSによって確認した。

30

## 【0248】

結果

アルブミン結合ポリペプチド変異体の発現レベルは、10~30mgの生成物/1gの細胞ペレットであると、SDS-PAGE分析から推定された。

40

## 【0249】

すべての変異体について、SDS-PAGE分析によって決定される純度は、95%を超え、LC/MS分析は、正しい分子量を検証した。精製後、8種のアルブミン結合ポリペプチド変異体各々の、1から8mgの間の純粋なポリペプチドが得られた。

## 【0250】

実施例2

アルブミン結合ポリペプチドの親和性決定

この実施例では、実施例1において合成または発現および精製された、PEP06923（配列番号454）、PEP07271（配列番号455）、PEP07844（配列番号461）、PEP07912（配列番号457）、PEP07913（配列番号45

50

3)、PEP07914(配列番号458)およびPEP07968、(すなわち、PEP07911、配列番号459とコンジュゲートしているDOTA)を、Biacore機器を使用して、ヒト血清アルブミン(HSA)に対する親和性について特性決定した。PEP07913は、N末端グリシン残基が付加されたG148-GA3のアミノ酸配列と対応するのに対し、PEP07271、PEP07844、PEP07912、PEP07914およびPEP07968は、種々のN末端アミノ酸が付加された、PP001(配列番号301)、PP043(配列番号343)、PP007(配列番号307)、PP013(配列番号313)およびPP037(配列番号337)のアルブミン結合ポリペプチドに対応する。

#### 【0251】

10

#### 材料および方法

Biacore 2000機器(GE Healthcare)でのバイオセンサー分析を、製造業者の推奨に従って、CM-5チップ(研究等級;Biacore)の表面のカルボキシル化デキストラン層上にアミンカップリングによって固定化されたHSA(Albuclt(登録商標)、Novozyme)を用いて実施した。チップの表面1を活性化し、不活性化し、注入の間の参照セル(ブランク表面)として使用したのに対し、表面2は、731レゾナンスユニット(RU)に固定化されたHSAを含み、表面4は、955RUに固定化されたHSAを含んでいた。精製アルブミン結合ポリペプチド変異体を、ランニングバッファ-HBS-EP(GE Healthcare)で2.5nM、10nMおよび40nMに希釈し、50 $\mu$ l/分の一定流速で5分間注入し、続いて、HBS-EPを60分間注入した。表面を25 $\mu$ l HCl、10mMの1回の注入で再生した。2セットで親和性測定を実施し、第1のセットでは、HBS-EP、PEP06923、PEP07271、PEP07912、PEP07913、PEP07914およびPEP07968を注入し(チップ表面2)、第2のセットでは、HBS-EP、PEP06923、PEP07844、PEP07912およびPEP07914を注入した(チップ表面4)。対照として、各実施においてPEP06923を2回注入した。Biacore Evaluationソフトウェア(GE Healthcare)を用いて結果を解析した。ブランク表面の曲線を、リガンド表面の曲線から差し引いた。

20

#### 【0252】

#### 結果

30

Biacore 2000機器には、技術的な限界があり、極めて高親和性の測定を妨げる。したがって、Biacore研究の目的は、アルブミン結合ポリペプチド変異体のHSAに対する親和性の正確な動態学パラメータを調べることではない。しかし、結果は、これらのポリペプチドのアルブミンに対する相対的親和性の定量的推定を提供する。参照表面およびバッファ注入を差し引いた後、Biacore Evaluationソフトウェアを使用し、質量移動について補正し、局所パラメータとしてRUmaxセットを用いて曲線を1:1(ラングミュア)結合モデルにフィッティングした。曲線は、図2に示されている。相対的 $K_D$ 、 $k_a$ ( $k_{on}$ )および $k_d$ ( $k_{off}$ )値を推定し、以下の表に示されている。

#### 【0253】

40

## 【表 5】

表 5:

アルブミン結合ポリペプチドの HSA に対する動態学パラメータ( $k_a$ 、 $k_d$  および  $K_D$ )、第 1 のセット

	$k_a$ ( $M s^{-1}$ )	$k_d$ ( $s^{-1}$ )	$K_D$ (M)
PEP07913	$5.7 \times 10^5$	$9.3 \times 10^{-4}$	$1.6 \times 10^{-9}$
PEP06923 (1)	$2.9 \times 10^7$	$2.9 \times 10^{-5}$	$9.9 \times 10^{-13}$
PEP06923 (2)	$2.6 \times 10^7$	$2.8 \times 10^{-5}$	$1.1 \times 10^{-12}$
PEP07271	$3.9 \times 10^6$	$2.9 \times 10^{-5}$	$7.5 \times 10^{-12}$
PEP07912	$4.6 \times 10^6$	$2.8 \times 10^{-5}$	$6.2 \times 10^{-12}$
PEP07914	$3.5 \times 10^6$	$2.5 \times 10^{-5}$	$7.2 \times 10^{-12}$
PEP07968	$3.0 \times 10^6$	$2.7 \times 10^{-5}$	$9.0 \times 10^{-12}$

10

## 【 0 2 5 4 】

## 【表 6】

表 6:

アルブミン結合ポリペプチドの HSA に対する動態学パラメータ( $k_a$ 、 $k_d$  および  $K_D$ )、第 2 のセット

	$k_a$ ( $M s^{-1}$ )	$k_d$ ( $s^{-1}$ )	$K_D$ (M)
PEP06923 (1)	$2.0 \times 10^7$	$2.6 \times 10^{-5}$	$1.3 \times 10^{-12}$
PEP06923 (2)	$2.1 \times 10^7$	$2.5 \times 10^{-5}$	$1.2 \times 10^{-12}$
PEP07912	$5.4 \times 10^6$	$2.8 \times 10^{-5}$	$5.2 \times 10^{-12}$
PEP07914	$3.8 \times 10^6$	$2.6 \times 10^{-5}$	$6.9 \times 10^{-12}$
PEP07844	$5.4 \times 10^6$	$2.3 \times 10^{-5}$	$4.4 \times 10^{-12}$

20

30

## 【 0 2 5 5 】

表 5 および 6 に示されるように、PEP07271 (配列番号 455)、PEP07844 (配列番号 461)、PEP07912 (配列番号 457)、PEP07914 (配列番号 458) および PEP07968 (DOTA とコンジュゲートしている PEP07911、配列番号 459) はすべて、HSA に対して、親 G148-GA3 (PEP07913; 配列番号 453) の親和性を大きく超えるおおよそ同一の親和性を有するようである。これらのポリペプチドの HSA 親和性は、PEP06923 (配列番号 454) と比較して、同様の解離速度 (off-rate) にもかかわらず、わずかに低い。

## 【 0 2 5 6 】

## 実施例 3

アルブミン結合ポリペプチドの融解温度 ( $T_m$ ) の決定

この実施例では、実施例 1 に記載のとおり発現および精製された、アルブミン結合ポリペプチド変異体 PEP07913 (配列番号 453)、PEP06923 (配列番号 454)、PEP07271 (配列番号 455)、PEP07554 (配列番号 456)、PEP07912 (配列番号 457)、PEP07914 (配列番号 458)、PEP07968 (DOTA とコンジュゲートしている PEP07911、配列番号 459) および PEP07844 (配列番号 461) ならびにアルブミンポリペプチド変異体 PEP07975 (すなわち、マレイミド-モノ-アミド-DOTA (Macrocyclics、カタログ番号 B-272) を用い Cys14 を介して DOTA がコンジュゲートしている PEP07834、配列番号 460) を、CD 分析によって分析した。PEP07913

40

50

は、N末端グリシン残基を有するG148 - GA3の配列に対応し、PEP06923は、Jonsson et al、前掲によってこれまでに記載された操作された高親和性誘導体であるのに対し、PEP07271、PEP07554、PEP07912、PEP07914、PEP07968、PEP07844およびPEP07975は、本開示内容に従って種々のN末端アミノ酸付加を有する、PP001(配列番号301)、PP007(配列番号307)、PP013(配列番号313)、PP037(配列番号337)およびPPP043(配列番号343)の46個のアミノ酸残基のアルブミン結合ポリペプチドの例である。

【0257】

材料および方法

精製アルブミン結合ポリペプチド変異体を1×PBSで、0.4から0.5mg/mlの間の終濃度に希釈した。円偏光二色性(CD)分析は、1mmの光路長を有するセル中で、Jasco J-810分光偏光計で実施した。可変温度測定では、20°~90で5 /分の温度勾配を用い、221nmの吸光度を測定した。

【0258】

結果

CD対温度プロットにおける遷移の中間点を求めることによって、種々のアルブミン結合ポリペプチド変異体の融解温度(Tm)を算出した。結果は、以下の表7に要約されている。

【0259】

【表7】

表7. 試験されたアルブミン結合ポリペプチド変異体の決定されたTm値

変異体	配列番号:#	N末端配列 <sup>3</sup>	Tm(°C)
PEP07913	配列番号:453	<u>GL</u>	61
PEP06923	配列番号:454	<u>GSSL</u>	57
PEP07271	配列番号:455	<u>GSSL</u>	65
PEP07554	配列番号:456	<u>GSSL</u>	58
PEP07912	配列番号:457	<u>GL</u>	53
PEP07914	配列番号:458	<u>GL</u>	59
PEP07968	配列番号:159 <sup>1</sup>	<u>GL</u>	53
PEP07975	配列番号:160 <sup>1,2</sup>	<u>AL</u>	50
PEP07844	配列番号:461	<u>GSSL</u>	65

1) ペプチドは、システインでマレイミド-DOTAとコンジュゲートしている

2) ペプチドは、C末端でアミド化されている

3) ロイシン(下線が引かれている)は、本開示内容の第1の態様において定義されるようなアルブミン結合ポリペプチドの46個のアミノ酸の配列の位置1の残基である

配列番号845として開示される表7中の「GSSL」。

【0260】

ポリペプチドPEP07968は、PEP07912と、前者が、位置14にシステイン残基を有し、これがマレイミドDOTAとコンジュゲートしており、後者が、セリン残基である点を除き同一である。したがって、DOTA修飾は、融解温度に影響を及ぼしてはならない。また、PEP07975は、Cys14を使用してDOTAとマレイミドコンジュゲートしており、C末端アミド(ペプチド合成に起因する)およびグリシンの代わりにN末端アラニンに有する点を除いてPEP07968と同一である。さらに、PEP

07912およびPEP07554を比較することで、N末端セリンが、同一位置のグリシンよりも高い融解温度をもたらす（ $T_m$ における5の相違）ことが示される。したがって、PEP07912およびDOTAがコンジュゲートしている変異体を除く、本開示内容に従うすべてのアルブミン結合ポリペプチド変異体は、55を上回る $T_m$ を示す。N末端部分の重要性を考慮して、すべての試験されたアルブミン結合ポリペプチドは、Jonsson et alの誘導体、例えば、PEP06923よりも優れている。

#### 【0261】

##### 実施例4

##### 血清反応分析

本明細書に開示されるような一連のアルブミン結合ポリペプチドと結合できる、IgGを含有するヒト血清のパーセンテージを、ELISAによって分析した。127の個体に対応する合計149種の血清サンプルをスクリーニングした。

#### 【0262】

##### 材料および方法

ELISAプレート[96ウェル、ハーフエリアプレート(Costar、カタログ番号3690)]を、コーティングバッファー(Sigma、カタログ番号3041)で8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈した50 $\mu\text{l}$ /ウェルのAlbuCult(登録商標)(Novozyme)を用いてコーティングした。プレートを、4で3日間オーバーナイトでコーティングした。分析の当日に、プレートを水道水で2回洗浄し、0.05%のカゼイン(PBSC)を含有する100 $\mu\text{l}$ のリン酸緩衝生理食塩水(PBS)を用いて2時間ブロッキングした。プレートを空にし、PBSCで2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈した、50 $\mu\text{l}$ /ウェルのアルブミン結合ポリペプチドPEP07913(配列番号453)、PEP06923(配列番号454)、PEP07271(配列番号455)、PEP07912(配列番号457)、PEP07554(配列番号456)、PEP07914(配列番号458)、PEP07968(DOTAがコンジュゲートしているPEP07911、配列番号459)およびPEP07844(配列番号461)を、事前に作製したプレート配置に従って添加した。室温(RT)で2時間のインキュベーション後、自動化ELISA洗浄機を使用してプレートをPBSCで4回洗浄した。129の個体から得た149種の血清サンプルを、1174 $\mu\text{l}$ のPBSCに、24 $\mu\text{l}$ の血清を添加することによって、PBSCで50倍希釈した。事前に作製したプレート配置に従って、ウェルあたり、希釈した血清のうち50 $\mu\text{l}$ を添加した。各血清サンプルを一連で試験した。各プレート上に、各アルブミン結合ポリペプチドの陽性および陰性対照が含まれる。アルブミン結合抗体(50 $\mu\text{l}$ 、PEP06923を用いて免疫処理した霊長類から得た血清から社内で調製された0.5 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 免疫グロブリン溶液)を陽性対照として添加し、50 $\mu\text{l}$ のPBSCを陰性対照として使用した。プレートを室温で1時間インキュベートし、続いて、自動化ELISA洗浄機を使用してPBSCで4回洗浄した。結合しているIgGを、PBSCで10000倍希釈した50 $\mu\text{l}$ /ウェルの抗ヒトIgG(Southern Biotech、カタログ番号2040-05)を用いて検出した。自動化ELISA洗浄機を使用してPBSCで4回洗浄した後、50 $\mu\text{l}$ /ウェルの基質を添加した(Pierceカタログ番号34021)。10~15分後、各ウェルに50 $\mu\text{l}$ のH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を添加することによって反応を停止させ、その後、マルチウェルプレートリーダー(Victor3、Perkin Elmer)を使用して吸光度を測定した。

#### 【0263】

##### 結果。

アルブミン結合ポリペプチドに対するIgG結合についてスクリーニングされた149種の血清のうち、23種が、8種すべてのポリペプチドについて陰性であり(OD値<0.1)、すなわち、ポリペプチドと結合しているIgGを示さなかった。1種または複数のアルブミン結合ポリペプチドについて陽性であった126種の血清を用いて分析を実施した。平均吸光度を算出し(図3A)、OD値を有する血清のパーセンテージは、<0.15(図3B)または>1.0(図3C)のいずれかを評価する。IgG結合を有する血

10

20

30

40

50

清の最高平均OD値および最高パーセンテージが、PEP07913(配列番号453)、PEP06923(配列番号454)およびPEP07844(配列番号461)を用いて得られたのに対し、PEP07968(DOTAがコンジュゲートしているPEP07911、配列番号459)、PEP07914(配列番号458)およびPEP07954(配列番号456)に対して最小の反応性が見られた。

#### 【0264】

したがって、最も反応性のアルブミン結合ポリペプチドは、親のG148-GA3(PEP07913、配列番号453)およびG148-GA3から保持されたヘリックス1を有するこれまでに親和性が改善された誘導体(PEP06923、配列番号454)であった。第3のより反応性のポリペプチド(PEP07844、配列番号461)は、ヘリックス1中の位置14に元のリシンを含有する。この残基はコンジュゲーションに意図され、したがって、そのようなものとして使用される場合に曝露されない。位置14にアラニンを有する点を除いて同一であるアルブミン結合ポリペプチド変異体(PEP07954、配列番号456)は、最も反応性が低いものの1種である。

10

#### 【0265】

##### 実施例5

##### アルブミン結合ポリペプチドの免疫原性試験

PEP07913(配列番号453)、PEP07912(配列番号457)、PEP07914(配列番号458)およびPEP07968(すなわち、DOTAがコンジュゲートしているPEP07911、配列番号159)を、52人のヒトコーカサス人種の個体から得た末梢血単核細胞(PBMC)(CRI-Labo Medische Analyse, Gent, Belgiumから入手)においてT細胞増殖を誘導するその能力についてスクリーニングした。PEP07913は、N末端グリシン残基を有するG148-GA3の配列に対応するのに対し、PEP07912、PEP07914およびPEP07968は、本開示内容に従って種々のN末端アミノ酸付加を有する、PP007(配列番号7)、PP013(配列番号13)およびPP037(配列番号37)の46個のアミノ酸残基のアルブミン結合ポリペプチドの例である。

20

#### 【0266】

##### 材料および方法

組織培養(TC)処理した96ウェル丸底プレート(Falcon)に、標準細胞生物学的方法に従って調製されたPBMCを300000個PBMC/ウェルの量で添加した。900µg/mlの(3倍モル過剰)の組換えヒトアルブミン(Albucult(登録商標)、Novozyme)をさらに含有するAIMV培地(Invitrogen)中の、アルブミン結合ポリペプチドPEP07913、PEP07912、PEP07914およびPEP07968、100µl/ウェルの添加によって細胞を刺激した。これは、30µg/mlのアルブミン結合ポリペプチドの終濃度に対応していた。刺激を8連で行い、すなわち、同一量の同一アルブミン結合ポリペプチドを、同一条件下で、8つのウェルに添加した。陽性対照ウェルでは、30µg/mlのキーホールリンペットヘモシアニン(KLH、Calbiochem)または30µg/ml破傷風トキソイド(TT、Statens Serum Institut)のいずれかを用いて細胞を刺激した。陰性対照ウェルでは、900µg/mlのアルブミンを含むか含まないAIMV培地のみを添加した。

30

40

#### 【0267】

Alexa Fluor 488 Click-iT EdUフローサイトメトリーアッセイキット(Invitrogen)を使用して、7日の培養後に細胞増殖を評価した。6日目に1µM/ウェルのEdU組み込みマーカを添加した。7日目に、細胞を洗浄し、プレートから解離させ、再度洗浄し、抗CD3-PerCP試薬(Becton Dickinson)および抗CD4-Alexa647試薬(Becton Dickinson)を用いて30分間染色した。染色後、細胞を洗浄し、固定し(BD cell fix、BD biosciences)、透過処理し(サポニンを使用して)、製造業

50

者のプロトコールに従って (Invitrogen) Click-iT 試薬を添加することによって EdU について染色した。染色が完了した後、細胞を再度洗浄し、フローサイトメトリー (FACSCanto II、BD Biosciences) を使用して分析した。増殖細胞の数を評価するために、分析の前に各ウェルに固定された数のフルオスフェア (fluospheres) (Invitrogen) を添加した。すべての染色手順および洗浄は、96 ウェルプレート中で直接的に実施した。

【0268】

生の FACSCanto II データを、CD3 + CD4 + T 細胞に関して階層的にゲーティングし、ゲーティングされた細胞数ならびに EdU - Alexa Fluor 488 組み込みマーカーのその蛍光強度を記録した。増殖細胞数 / 8 連のタンパク質処理ウェルの平均値を、陽性および陰性対照と比較し、刺激指数 (SI) として記載される得られる比を算出した。SI および複製間の変動に基づいて、刺激および阻害について閾値 SI 値をそれぞれ、2.0 および 0.5 に設定した。

10

【0269】

結果

アルブミン結合ポリペプチド PEP07913、PEP07912、PEP07914 および PEP07968 を、インビトロ PBMC 増殖アッセイを使用して、標的ヒト集団における 3 倍過剰の組換えヒトアルブミンの存在下でのその免疫学的可能性について評価した。アルブミン対照と比較して、PEP07913 は、52 ドナーのうち 6 において、PEP07912 は、52 ドナーのうち 5 において、PEP07914 および PEP07968 は、52 ドナーのうち 1 において CD3 + CD4 + T 細胞増殖を誘導した (図 4A)。

20

【0270】

52 ドナーすべての平均刺激指数 (SI) は、組換えヒトアルブミンを含有する陰性対照と比較して、PEP07914 および PEP07968 について大きく異ならなかった (それぞれ、 $p = 0.79$  および  $0.48$ 、図 4B)。PEP07913 の SI は、大幅に高かった ( $p = 0.002$ ) のに対し、PEP07912 の SI は高かったが有意ではなかった ( $p = 0.03$ 、図 4B)。

【0271】

バッファーのみと比較して、反応する個体の数は、PEP07912 について 10、PEP07912 について 7、PEP07914 について 2、PEP07968 について 1、組換えヒトアルブミンについて 2 であり、2 つの陽性対照 TT および KLH についてそれぞれ、49 および 51 であった (図 4C)。アルブミン結合ポリペプチドを、その免疫原性に従って以下の順序にランク付けした: PEP07913 > PEP07912 > PEP07914 > PEP07968。PEP07914 および PEP07968 は両方とも、非免疫原性と定義された。したがって、上記の結果は、本開示内容のアルブミン結合ポリペプチドの免疫原性の可能性が、陽性対照と比較して低いことを実証する。

30

【0272】

実施例 6

エキセンディン類似体 - ABD 型の操作されたポリペプチドの精製。

40

方法。当技術分野で公知のように、本発明の操作されたポリペプチド出発形態、例えば、同様の発現ペプチド、例えば、成熟した操作されたポリペプチド HGGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISTGGGGSASGLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAI LAALP (配列番号 727) (化合物 5) をもたらす MAHHHHHHVGTGSNENLYFQHGGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISTGGGGSASGLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAI LAALP (配列番号 838) に適用可能である組換え合成の一例を提供する、例えば、本発明の ABD ではなく ABD00239 を含有して化合物 684 をもたらす配列: MAHHHHHHVGTGSNENLYFQHGGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISTGGGGSASGLAEAKVLNRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKHLI LAALP (配列番号 846) におけるように His<sub>6</sub> (配列番号 49) 「タグ」を組み込む、N 末端伸長を有する操作されたポリペプチドを製造した。

50

## 【0273】

細胞抽出物の調製。細胞抽出物を調製するために、50 mLの細胞培養物から得た細胞ペレットを、60 mLの溶解バッファー(50 mM Tris HCl、150 mM NaCl、pH 8.0)に完全に再懸濁した。再懸濁された細胞を、100 PSIのマイクロフルイダイザー(Microfluidics、MA)に3回通した。細胞抽出物を16,000 × gで30分間遠心分離して、細片を除去した。EGTA(150 mMストック)を、細胞抽出物に、3 mMの最終濃度に添加した。

## 【0274】

Ni-NTAクロマトグラフィー。15 mLの空のカラムに、10 mLのNi-NTAスーパーフローの50%懸濁液を充填した。10 mLの水、50 mLの溶解バッファーおよび20 mLの、3 mM EGTA(50 mM Tris HCl、150 mM NaCl、pH 8.0、3 mM EGTA)を有する溶解バッファーを用いてカラムを洗浄した。Ni-NTAカラムの頂部に細胞抽出物を注意深く添加し、フロースルーを集めた。30 mLの、EGTA(50 mM Tris HCl、150 mM NaCl、pH 8.0、3 mM EGTA)を有する溶解バッファーを用いてカラムを洗浄した。カラムの頂部に10 mLの溶出バッファー(25 mM Tris HCl、50 mM NaCl、250 mM イミダゾール、pH 8.0)を添加し、溶出画分(2 mL/画分)を集めた。SDS-PAGEを実施して、フロースルーおよび各画分を調べた。Hisタグのついた化合物を含有する画分をプールした。

10

## 【0275】

TEVプロテアーゼ消化。His<sub>6</sub>タグをつけた化合物(配列番号49として開示される「His<sub>6</sub>」)を、25 mM Tris HCl、50 mM NaCl、pH 8.0を用いて3倍希釈した。-メルカプトエタノール(0.1%)および2%のTurbo TEVプロテアーゼ(2 mg/mL、10,000ユニット/mg、Accelagen)を添加し、その結果を混合し、室温で2時間および4で一晚インキュベートした。

20

## 【0276】

Ni-NTAを用いる切断されたHis-タグおよびTurbo TEVの除去。15 mLの空のカラムに、6 mLのNi-NTAスーパーフローの50%懸濁液を充填した。カラムを20 mLの水および20 mLの50 mM Tris HCl、100 mM NaCl、45 mM イミダゾール、pH 8.0を用いて洗浄した。TEV消化反応物を、50 mM Tris HCl、150 mM NaCl、pH 8.0を用いて2倍希釈した。希釈された消化反応物を、Ni-NTAカラムの頂部に注意深く添加し、フロースルーを集めた。10 mLの50 mM Tris HCl、100 mM NaCl、45 mM イミダゾール、pH 8.0をカラムに添加し、あらゆる結合していないタンパク質を溶出した。フロースルーを集め、組み合わせた。

30

## 【0277】

第1のサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)。Ni-NTAフロースルーを、0.2 μmフィルターを用いて濾過した。Superdex 75 HiLoad 26/60カラムを、390 mLのPBSを用いて予め平衡化した。濾過されたフロースルーを、サンプルポンプを用いてHiLoad 26/60カラムに注入した。1.5 CVのPBSを用いてタンパク質を溶出し、モノマーピークをプールした。

40

## 【0278】

第2のサイズ排除クロマトグラフ。第1のSECプールを0.2 μmフィルターを用いて濾過した。Superdex 75 HiLoad 26/60カラムを、390 mLのPBSを用いて予め平衡化した。濾過されたフロースルーを、サンプルポンプを用いてカラムHiLoad 26/60に注入した。1.5 CVのPBSを用いてタンパク質を溶出し、モノマーピークをプールした。

## 【0279】

第3のサイズ排除クロマトグラフィー。第2のSECプールを、0.2 μmフィルターを用いて濾過した。Superdex 75 HiLoad 26/60カラムを、39

50

0 mLのPBSを用いて予め平衡化した。濾過されたフロースルーを、サンプルポンプを用いてカラムHi Load 26/60に注入した。1.5 CVのPBSを用いてタンパク質を溶出し、モノマーピークをプールした。

#### 【0280】

EndoTrap Redを用いる残存するエンドトキシンの除去。第3のSECプールは、約20 EU/mgのエンドトキシンを依然として含有しており、これを、EndoTrap Redの使用によって除去した。手短には、スラリーに1 mLの再生バッファを添加し、チューブをおよそ5秒間穏やかに振盪することによって混合し、0.5 mLのゲルスラリーを活性化した。上清を遠心分離し、吸引した。この工程をさらに2回反復した。1 mLの平衡バッファを添加し、チューブをおよそ5秒間穏やかに振盪することによって混合を実施した。上清を遠心分離し、吸引した。この工程をさらに2回反復した。樹脂にタンパク質サンプル(5.5 mL)を添加し、室温で90分間インキュベートし、インキュベートしながらチューブを穏やかに揺り動かし回転させた。結果を、1200 × gで5分間遠心分離し、上清を清潔なチューブに移した。

10

#### 【0281】

結果。最終精製タンパク質は、使用された条件下でおよそ6 kDのタンパク質としてSDS-PAGEゲル上で移動した。LC-MSは、9827ダルトンの正確な分子量を示した。タンパク質収量は、50 mLの細胞培養物から3.3 mgであった。

#### 【0282】

##### 実施例7

20

エキセンディン - ABD操作されたポリペプチドの活性

本発明のエキセンディン - ABD操作されたポリペプチドは、インビトロ細胞活性化アッセイにおいて十分なエキセンディン活性を保持していた。したがって、操作されたポリペプチドは、哺乳類に単回用量として投与された場合にエキセンディン - 4と比較した場合に、血糖低下および体重減少について、著しく改善された作用持続期間を提供した。驚くべきことに、作用持続期間は、げっ歯類モデルにおいて少なくとも1日に、さらに少なくとも4日、さらに少なくとも7日またはそれより長くに延長され得、これは、ヒト対象では、少なくとも1週間の作用持続期間に変換され得、したがって、1日2回、1日1回、週に3回、週に2回またはさらに週に1回の投与にも適している。

#### 【0283】

30

##### 実施例8

アルブミン結合

操作されたポリペプチド化合物のアルブミンとの結合の特性決定は、本明細書に記載されたBiacoreを含めた任意の数の方法によって実施され得る。25 でGLCセンサーチップを使用するBioRad ProteOn XPR36システム(Bio-Rad Laboratories、ハーキュリーズ カリフォルニア、USA; ProteOn XPR36タンパク質相互作用アレイシステムカタログ番号176-0100)。アミンカップリングのために、以下に示されるように最初のストックから水で30倍希釈したスルホ-NHS/EDCの1:1混合物を使用してGLCチップを5分間活性化した。各アルブミンサンプルを10 mM酢酸Na pH 5.0で25 ug/mLに希釈し、別個のセンサー表面上に5分間注入した。次いで、1 MエタノールアミンpH 8.5を用いて各表面をブロッキングした。各アルブミンをレゾナンスユニットにおいて2000~5000の密度でカップリングした。3倍希釈シリーズにおいて最高濃度として5 nMを使用して、操作されたポリペプチドの結合を調べた。ランニングバッファは、10 mM HEPES pH 7.4、150 mM NaCl、3 mM EDTAおよび0.005% tween-20を含有していた。3倍希釈シリーズを使用してすべてのサンプルを調べた。各濃度シリーズを2連で試験した。最高濃度の解離相を、3時間モニタリングした。

40

#### 【0284】

操作されたポリペプチドの測定された相対 $K_D$ が、以下の表8に示されている。結果は

50

、アルブミン結合ポリペプチドが、アルブミンと高親和性で会合していることを示す。括弧内の数字は、最下位桁での標準偏差を表す。以下の表からわかるように、ABD00239のアルブミン結合ドメインと（ポリペプチド化合物684または化合物088を作製するために）または本発明のABDと（本発明の操作されたポリペプチド、例えば、化合物5を作製するために）融合しているエキセンディンポリペプチドは、コンジュゲートしていないABD PEP07986自体と比較してでさえ、種々の種から得た血清アルブミン、特に、ヒト血清アルブミンに対して極めて高親和性を保持する。操作されたポリペプチドは、新規PEP7986の代わりに先のABD00239と融合している、同定されたエキセンディン類似体-リンカー構築物と比較してでさえ高親和性を保持する（化合物684を化合物5を比較する）。

【0285】

【表8】

表8

化合物	ヒトSA	イヌSA	サルSA	マウスSA	ラットSA
ABD00239	16.1(4)pM	201(2)pM	123(1)pM	1.24(1)nM	18.3(5)pM
PEP07986	9.5(2)pM	126(2)pM	84.0(8)pM	160(2)pM	5.7(2)pM
化合物088	84.7(9)pM	397(2)pM	77.5(6)pM	1.332(6)nM	16(1)pM
化合物684	68(1)pM	513(3)pM	90.9(9)pM	1.253(8)nM	200(200)pM
化合物5	160(1)pM	606(4)pM	140(1)pM	300.2(5)pM	12.5(2)pM
化合物11	251 pM	2450 pM	431 pM	1029 pM	51 pM

【0286】

実施例9

GLP-1受容体機能アッセイにおける化合物の活性

化合物の機能活性は、GLP-1受容体を発現する細胞株を使用して調べられ得る。例えば、アッセイ法については、参照により組み込まれる米国特許出願公開US20110097751A1を参照のこと。この実施例では、GLP-1Rを内因性に発現する細胞を使用して機能活性を調べ、エキセンディン活性の尺度としてcAMP誘導を検出する。HTRFアッセイキットを使用した（Cisbio International（ベッドフォード、マサチューセッツ）。生物検定法では、カタログ番号62AM4PEBとしてCisbioから入手可能なHTRF（登録商標）cAMP dynamic 21,000アッセイキットを使用する細胞ベースのアッセイにおいて、ラット甲状腺癌腫6-23（クローン6）細胞を使用した。HTRF（登録商標）標準および較正は、キット中の使用説明書に従って調製する。384ウェル形式のHTRF（CisBio）細胞ベースのcAMPアッセイキットを使用して、化合物処理の30分後にcAMPの蓄積を測定する。ペプチドの有効性は、10μMのフォルスコリン（アデニレートシクラーゼの構成的アクチベーター）を用いる細胞処理に対して調べられ、ペプチドの効力（EC50）は、4-パラメータモデルにフィッティングさせた非線形回帰分析を使用する濃度反応曲線の分析によって調べられる。効力（EC50）についてのGLP-1受容体機能活性（cAMP誘導）の結果は、以下の表9に提供されている。

【0287】

## 【表 9】

表 9. GLP-1R 機能活性

説明	nM での GLP-1R 機能活性(EC <sub>50</sub> )
エキセンディン-4	0.004
[Leu <sup>14</sup> ,Gln <sup>28</sup> ]エキセンディン-4(1-32)-fGLP-1)33-37(配 列番号 4)	0.016
エキセンディン-4(1-28)アミド	0.011
化合物 088	0.131
化合物 5	0.486
化合物 6	0.560
化合物 7	0.904
化合物 8	0.612
化合物 9	3.21
化合物 10	0.575
化合物 11	1.28

10

20

## 【 0 2 8 8 】

血清アルブミンの存在下での操作されたポリペプチド化合物のインビトロ活性の特性決定を実証した。アッセイは、アルブミン、特に、ヒト血清アルブミンの存在下および不在下で実施され得る。上記のデータは、約 0.1% のウシ血清アルブミン (BSA) の存在下で調べた。以下の表 10 は、上記のであるが、種々の種に由来し、増大した量の血清アルブミンの存在下での受容体活性化 (cAMP 誘導) アッセイの機能活性を示す。わかるように、驚くべきことに、化合物 11 が血清アルブミンと、例えば、ヒト血清アルブミンと結合している場合でさえ、その立体障害の可能性およびアルブミン結合に起因する化合物の見かけのストークス半径の変化を有する ABD および大きな血清アルブミンの存在にもかかわらず、操作されたポリペプチドは、GLP-1 受容体アゴニスト活性を保持する。一部の種の血清アルブミン、例えば、ヒト血清アルブミンに対する、ABD および操作されたポリペプチドのピコモル親和性を考えると、操作されたポリペプチドは、アッセイにおいて存在するアルブミンと有効に十分に結合している (従って、循環血液中でインビボで同様に十分に結合している) と考えられる。アルブミンと結合している化合物の極めて高い親和性 (上記のような) および血液中の高濃度の血清アルブミンの存在のために、化合物はインビボで本質的に結合した状態で存在するが、驚くべきことに十分なエキセンディン機能を提供する (本明細書において実証されるような) と予測される。

30

40

## 【 0 2 8 9 】

## 【表 10】

表 10 種々の量の血清アルブミンにおけるGLP-1R機能活性

化合物	GLP-1R活性化：cAMP誘導EC50(nM)			
	0.1%ウシア アルブミン	1%ウシア アルブミン	1%ヒトア アルブミン	1%ラット アルブミン
GLP-1(7-36)アミド	0.0306	0.0058	0.0112	0.0179
化合物684	0.7854	0.2204	0.185	0.2473
化合物088	1.1013	0.2234	0.2022	0.2164
化合物11	0.8719	0.1774	0.2079	0.1854

10

## 【0290】

## 実施例 10

OGTT DOA (経口糖負荷試験作用持続期間) インビボ活性。

経口胃管栄養法 (1.5 k/kg デキストロス) の前およびに胃管栄養法の 30 分後に血糖を低下させる効果を、25 nmol/kg で投薬された示された化合物を用いる用量の 1 日後に調査し、結果は以下の表に示されている。薬物を、4 時間絶食させた NIH/Swiss マウスに投与した。薬物投与の 24 時間後に、OGTT を実施して、化合物活性の持続期間を評価した。血糖は、One Touch (登録商標) Ultra (登録商標) (LifeScan, Inc., a Johnson & Johnson Company、ミルピタス、カリフォルニア) を用いて測定した。\* ビヒクル対照に対して  $p < 0.05$ ; ANOVA、ダネット検定。胃管栄養法の 30 分後での、ビヒクルと比較した低下パーセントとしてのグルコース低下が示されている (負の値が、グルコースの低下を示す)。この OGTT DOA は、薬物活性が、薬物が投与された後、少なくとも 24 時間 (OGTT に先立つ期間の間) 存在することを示す。結果は、表 11 に示されている。エキセンディン - 4 (ABD とコンジュゲートしていない)、Leu14 エキセンディン - 4 (ABD とコンジュゲートしていない) およびコンジュゲートしていない ABD EP07986 は、t - 24 時間で投薬された場合に、より高用量で提供された場合であっても、このアッセイにおいて不活性である。コンジュゲートしていないエキセンディン化合物が、OGTT の直前に 30 nmol/kg で投与される場合には、エキセンディン - 4 および Leu14 エキセンディン - 4 の両方とも、基礎からのグルコースの - 41% 変化を提供する。比較的短いリンカー (HGEFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNTGGGGSASGSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP; 配列番号 847) を介して ABD と融合している C 末端切断型エキセンディン - 4 (1 - 28) を有する化合物 12 は、GLP-1 受容体に対してインビトロで活性であったが、この持続期間アッセイにおいて 24 の持続期間は示さなかった。この場合には、リンカー長を増大することは、このアッセイにおいて望ましい 24 以上の持続期間をもたらすと予測される。本明細書に示されるこの作用持続期間アッセイならびにその他のインビボアッセイは、改善された操作されたポリペプチドが、ヒト血漿およびヒト細胞膜プロテアーゼに対して極めて安定であることを実証する。

20

30

40

## 【0291】

## 【表 1 1】

表 1 1 O G T T D O A

説明	ビヒクルと比較したグルコース低下パーセント
化合物5	-19、-22
化合物6	-22
化合物7	-16
化合物8	-18、-17
化合物9	-12
化合物10	-12
化合物11	-23

10

20

## 【 0 2 9 2 】

## 実施例 1 1

糖尿病 o b / o b マウスにおけるエキセンディン - アルブミン結合ドメインポリペプチドの効果

グルコース低下 (例えば、H b A 1 c ) および体重減少に対する、第 1 世代アルブミン結合ドメインポリペプチド ( P C T 公開出願第 W O 2 0 0 9 / 0 1 6 0 4 3 号において開示されるような ) と融合しているエキセンディンの慢性曝露の効果を実証するために、o b / o b / マウス ( 糖尿病 ) を、その C 末端で、A B D 0 0 2 3 9 ( P C T 公開出願第 W O 2 0 0 9 / 0 1 6 0 4 3 号においてこれまでに公開された A B D 、本発明の A B D ではない ) と呼ばれるアルブミン結合ドメイン型ポリペプチドと融合しているエキセンディンを用いて処理したが、これは、本明細書に開示された新規の改善された A B D 、例えば、P E P 7 9 8 6 を使用する、本改善された操作されたポリペプチドの活性の一例を提供する。o b / o b マウスにおける体重、グルコース低下および H b A <sub>1c</sub> 低下に対する試験化合物の効果の経時的推移を用量後に調査し、4 週間での値が図 5 A ~ 5 C に示されている。図 5 C に表されるように、大幅な体重減少が、2 8 日間各週に 2 回の 2 5 および 2 5 0 n m o l / k g の化合物 I P を用いる処理に伴われる。図 5 A および 5 B は、グルコース ( 処理前 % ) ( 図 5 B ) および H b A 1 c ( 処理前 % ) ( 図 5 A ) の変化を表す。点は、平均 ± s . d . ( 標準偏差 ) を表す。試験化合物は、絶食していない雄の o b / o b マウスにおいて日 = 0 にベースラインサンプル採取の直後に s c 注入した。別に示さない限り、本明細書に記載された血糖測定は、O n e T o u c h ( 登録商標 ) U l t r a ( 登録商標 ) デバイス ( L i f e S c a n 、 I n c . M i l i p t a s を使用した。2 5 n m o l / k g b i w ( 週に 2 回 ) 用量について観察された効果は、およそ連続注入 ( C S I ) によって約 7 . 2 n m o l / k g / d で投与されたエキセンディン - 4 について観察されたものであった。したがって、匹敵する用量で、エキセンディン - 4 - G G S - A B D 0 0 2 3 9 化合物 ( 化合物 0 8 8 ) 、最大に有効な用量のエキセンディン - 4 の血糖および体重減少効果に対応していた。2 5 0 n m o l / k g では、化合物 0 8 8 は、最大に有効な用量のエキセンディン - 4 の 2 倍有効であった。さらに、驚くべきことに、等モル投薬では、化合物 0 8 8 は、血糖低下、H b A 1 c 低下および体重減少について、リラグルチド [ N - - ( - G l u ( N - - ヘキサデカノイル ) ) - L y s 2 6 , A r g 3 4 ] - G L P - 1 - ( 7 - 3 7 ) - 酸、アルブミン結合 G L P - 1 誘導体よりも有効であ

30

40

50

った（示されていないデータ）。

【0293】

驚くべきことに、上記で観察されるようなコンジュゲートしていないエキセンディン-4と比較して、低下したインビトロ効力にもかかわらず、本明細書に開示されたアルブミン結合ポリペプチドと融合しているエキセンディンの急性(6時間以内)インビボ活性は、マウスにおける食物摂取の低減によって測定される場合など、最大有効性に関して、コンジュゲートしていないエキセンディンのものと同様であり、効力(ED50;例えば)に関しては、わずかに小さい(数倍)だけである(示されていないデータ)。さらにより驚くべきことに、本明細書に開示されたアルブミン結合ポリペプチドと融合しているエキセンディンの慢性曝露の効果は、エキセンディン-4(連続注入された)とほぼ同程度に強力であったが、より大きな最大効果を提供できた。さらに、マウスまたはラットアルブミンの極めて高い親和性および低い解離速度(off rates)を考慮すると、インビボアッセイでは(ならびに、インビトロアッセイでは)、操作された化合物はすべて、アルブミンと有効に結合している。したがって、改善された操作されたポリペプチドは、アルブミンと結合している場合でさえGLP-1R機能活性を保持する。これは、幾分かは、アルブミン化合物、例えば、リラグルチドが、アルブミンから解離している場合のみ大幅に活性であると報告されているので、驚くべきことである。また、別の人々は、GLP-1受容体機能を得るためにコンジュゲートしていたアルブミン結合ペプチドからタンパク質分解的にGLP-1またはエキセンディンを除去する必要性を報告している。したがって、本願を通じて記載された改善された操作されたポリペプチドのインビボ活性は、さらにより素晴らしいものである。

10

20

【0294】

実施例12

インビボでの操作されたポリペプチドの長い持続期間および作用

本明細書に記載された操作されたポリペプチドの活性の長い半減期および長い持続期間をさらに実証するために、ラットを使用して薬物動態(PK)および薬力学的(PD)特性を調べた。正常なHarlanスプラグドローリー(HSD)ラットにおける皮下に投薬された例示された操作されたポリペプチドの薬物動態プロフィールおよび生物活性が示されている。組換え操作された化合物である化合物11(そのC末端でグリシンリンカーを介してPEP07986と融合しているLeu14エキセンディン-4を有する)および化合物9を、正常なHSDラットに25nmol/kgでt=0で皮下に注射した。給餌したHSD雄のラットから、t=1時間、3時間、6時間、24時間、48時間、72時間、96時間および168時間で尾出血によって血液を採取した。食物および体重を毎日測定した。図6A(化合物11)および7A(化合物9)は、食物摂取を低減する化合物の効果を表す。図6B(化合物11)および7B(化合物9)は、体重を低減する化合物の効果を表す。図6C(化合物11)および7C(化合物9)は、単回用量後の化合物のPKプロフィールを表す。点は、平均±s.dを表す。図中、ピクセルは、中黒四角であり、化合物11は、中白の下向き三角であり、化合物9は、中黒三角である。図6C中の血漿最大濃度は、約25,000ピコモルに相当する。

30

40

【0295】

これらの例示的な操作されたポリペプチド化合物11について、最大7(7)日の曝露を観察し、この投与経路によるラットにおいて、42(42)時間の半減期を有し、化合物9は、46(46)時間の半減期を有していた。相対成長率によって、またヒトアルブミンに対する操作されたポリペプチドの強力な親和性を考慮して、ヒト対象において少なくとも長い、さらにより長い身体的および生物学的活性持続期間が予測される。したがって、化合物は、特に、ヒト対象における少なくとも毎日、週に2回、さらには毎週の投与のための用途を有する。

【0296】

実施例13

インビボでの操作されたポリペプチドの長い持続期間および作用および絶対血漿中半減

50

期

正常な Harlan スプラーグドローリー (HSD) ラットにおける、静脈内に投薬された例示的な操作されたポリペプチドの薬物動態プロフィールおよび生物活性が示されており、それから、絶対血漿中半減期が算出され得る。組換え操作された化合物である化合物 11 を、正常な HSD ラットにおいて  $2 \text{ nmol} / \text{kg}$  で  $t = 0$  で静脈内に注入した。コンジュゲートしていないエキセンディン - 4 およびエキセンディン - 4 類似体 Leu 14 エキセンディン - 4 を、 $2 \text{ nmol} / \text{kg}$  で静脈内に注入した。給餌した HSD 雄のラットから、 $t = 1$  時間、3 時間、6 時間、24 時間、48 時間、72 時間、96 時間および 168 時間で尾出血によって血液を採取した。食物および体重を毎日測定した。図 8 A は、食物摂取を低減する化合物 11 の効果を表す。図 8 B は、体重を低減する化合物 11 の効果を表す。図 8 C は、単回 IV 用量後の化合物 11 の PK プロフィールを表す。予測されるように、コンジュゲートしていないエキセンディンの半減期は、15 分未満である。例示的な操作されたポリペプチド化合物 11 の絶対半減期は、およそ少なくとも 12.3 時間で推定される。点は、平均  $\pm$  s.d を表す。

【0297】

この例示的な操作されたポリペプチドについて、この投与経路によるこれらの比較的低用量でさえも最大 4 日間の曝露を観察した。相対成長率によって、またヒトアルブミンに対する操作されたポリペプチドの強力な親和性を考慮して、ヒト対象において少なくとも長い、さらにより長い身体的および生物学的活性持続期間が予測される。したがって、化合物は、特に、ヒト対象における少なくとも 1 日 2 回 (例えば、朝および夜)、少なくとも毎日、週に 2 回、さらには週に 1 回の投与のための用途を有する。

【0298】

実施例 14

亜慢性投薬は、重ね合わせおよびエキセンディン様薬理学を提供する

インビボで例示的な操作されたポリペプチドの亜慢性曝露の効果を実証するために、化合物 11 を 14 日間、週に 2 回または毎日皮下投与した。食物摂取阻害、体重減少および化合物 11 の血漿レベルを毎日調べた。正常な痩せた HSD ラットを、図 9 A ~ 9 F に示されるように、下向き矢印によって示されるように週に 2 回 (BIW; 中白下向き三角) か、または毎日 (QD; 中白四角) のいずれかで、 $25 \text{ nmol} / \text{kg}$  化合物 11 を 14 日間にわたって用いて皮下処理した。累積食物摂取図 9 A、毎日の食物摂取の変化パーセント図 9 B および累積食物摂取の変化パーセント図 9 C によって示されるように、BIW および QD 投与の両方とも、ビヒクル (中黒丸) と比較した毎日の食物摂取を阻害した。BIW および QD 投与の両方とも、ビヒクルと比較した、総体重の低減図 9 D および体重の大きな負変化パーセント図 9 E によって示されるように、体重減少をもたらした。図 9 F は、BIW または QD で投与された化合物 11 の PK プロフィールを表す。点は、点あたり 4 ~ 6 匹の動物を用いる、平均  $\pm$  s.d (標準偏差) を表す。試験化合物は、ベースラインサンプル採取の直後に  $t = 0$  で皮下注入した。

【0299】

わかるように、両投与様式とも、定常状態が得られるまで、各その後の用量の際の化合物のより高い血漿レベルにつながる重ね合わせ効果を提供する。わずか 11 日の処理で、BIW (週に 2 回) 用量について観察された有効性が、連続注入 (CSI) によって約  $7.2 \text{ nmol} / \text{kg} / \text{d}$  で投与された Leu 14 エキセンディン - 4 について観察されたもの - 定常状態レベルで約 7% 低いビヒクル補正した体重に近似し始めた。QD 投薬は、より円滑なプロフィールを提供するが、より大きな動物およびより長い固有のアルブミン血漿中半減期を有するものに変換されると、ラットにおいて観察された QD パターンに近似する、より円滑な血漿レベルが、このおよび本明細書に記載された任意の操作されたポリペプチドの BIW、週に 3 回、さらには毎週の投与について予測される。この操作されたポリペプチドを用いる QD 用量は、短い処理期間の間にコンジュゲートしていない注入されたエキセンディンまたはエキセンディン類似体の有効性を達成または上回り、従って、本明細書に記載された操作されたポリペプチドの各々についてもそうであると予測され

10

20

30

40

50

る。

【0300】

実施例15

空胞形成の欠如

いくつかのペグ化タンパク質などのいくつかの薬物を用いると、近位尿細管の内側の上皮細胞の細胞質中に望ましくない空胞が形成することがあり、これは望ましくない毒性尺度である。本願の操作されたアルブミン結合化合物は、腎臓空胞を形成しない。C57BL/6 雌のマウス (n = 2 ケージ、3 匹のマウス/ケージ) を、消灯の3時間前に毎日秤量した。秤量の直後に、0 ~ 6 日目に試験化合物を用いてマウスに皮下注射した。7日目にマウスを屠殺し、腎臓を組織病理学に付した。腎皮質尿細管上皮細胞の細胞質空胞形成の重症度スコアは、以下のとおりとした：スコア1 = 最小 (8 ~ 15%) ; 2 = 軽度 (16 ~ 35%) ; 3 = 中程度 (36 ~ 60%) ; 4 = 著しい (> 60%)。空胞形成を引き起こすと知られている陽性対照化合物は、3とスコア化した。ABDポリペプチドPEP07986自体は0とスコア化した。操作されたポリペプチド化合物5は0とスコア化した。

10

【0301】

実施例16

経口送達は全身分布を達成する

腸取り込みを伴う経口送達を、化合物088を使用して調査した。糖尿病のdb/dbマウスに、240 nmol/kgの以下の化合物、エキセンディン類似体 [Leu14、Gln28]エキセンディン-4-(1-32)-fGLP-1-(33-37)酸および化合物088を用いて経口投与した(胃管栄養法によって経口)。データは、操作されたペプチドが、送達および取り込みを増強し得るその他の特定の賦形剤が存在しない製剤PBS/プロピレングリコール(50:50)においてでさえ、経口的にバイオアベイラブルであることを実証する。エキセンディン類似体と比較して、エキセンディン類似体の2倍を超える分子量での化合物088(両方とも、1mg/kg用量で)も、同一製剤において経口的にバイオアベイラブルである。これらの結果は、両化合物が、経口投薬された場合に活性であり、120分まで試験された条件下で等しく有効であったことを示す。結果は、図10に示されている。点は平均±s.dを表す。ペプチドは、ベースラインサンプルの採取の直後にt=0で胃管栄養法によって経口的に投薬した。マウスは2時間絶食させたdb/dbマウスとした。したがって、本明細書に示された改善された操作されたポリペプチド化合物は、特に、ヒト対象において、少なくとも1日2回(例えば、朝および夜)、少なくとも毎日、週に3回、種に2回、さらには週に1回の経口投与のための用途を有する。

20

30

【 図 1 - 1 】

Figure 1

ABD	アミノ酸配列	非公式配列番号
	LA X3 AK X6 X7 AN X10 ELD X14 YGVSDF YKRLIDKAKT VEGEALKDA ILAALP	678
式 1)	LA X3 AK X6 X7 AN X10 ELD X14 YGVSDF YKRLI X26 KAKTVEGEALK X39 X40 IL X43 X44 LP	300
PP001	LASAKEAANAELDAYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	301
PP002	LASAKEAANSELDAYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	302
PP003	LASAKESANSELDAYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	303
PP004	LASAKESANAELDAYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	304
PP005	LASAKSAANAELDAYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	305
PP006	LASAKSAANSELDAYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	306
PP007	LASAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	307
PP008	LASAKEAANSELDYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	308
PP009	LASAKESANSELDYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	309
PP010	LASAKESANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	310
PP011	LASAKSAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	311
PP012	LASAKSAANSELDYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	312
PP013	LAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	313
PP014	LAEAKEAANSELDYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	314
PP015	LAEAKESANSELDYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	315
PP016	LAEAKESANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	316
PP017	LAEAKSAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	317
PP018	LAEAKSAANSELDYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	318
PP019	LAEAKEAANAELDAYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	319
PP020	LAEAKEAANSELDAYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	320
PP021	LAEAKESANSELDAYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	321
PP022	LAEAKESANAELDAYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	322
PP023	LAEAKSAANAELDAYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	323
PP024	LAEAKSAANSELDAYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	324
PP025	LAQAKSAANAELDAYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	325
PP026	LAQAKSAANSELDAYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	326
PP027	LAQAKESANSELDAYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	327
PP028	LAQAKESANAELDAYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	328
PP029	LAQAKSAANAELDAYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	329
PP030	LAQAKSAANSELDAYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	330
PP031	LAQAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	331
PP032	LAQAKEAANSELDYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	332
PP033	LAQAKESANSELDYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	333
PP034	LAQAKESANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	334
PP035	LAQAKSAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	335

【 図 1 - 2 】

PP036	LAQAKSAANSELDYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	336
PP037	LASAKEAANAELDCYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	337
PP038	LASAKEAANSELDYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	338
PP039	LASAKESANSELDYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	339
PP040	LASAKESANAELDCYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	340
PP041	LASAKSAANAELDCYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	341
PP042	LASAKSAANSELDYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	342
PP043	LASAKEAANAELDKYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	343
PP044	LASAKEAANSELDYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	344
PP045	LASAKESANSELDYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	345
PP046	LASAKESANAELDKYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	346
PP047	LASAKSAANAELDKYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	347
PP048	LASAKSAANSELDYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	348
PP049	LAEAKEAANAELDCYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	349
PP050	LAEAKEAANSELDYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	350
PP051	LAEAKESANSELDYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	351
PP052	LAEAKESANAELDKYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	352
PP053	LAEAKSAANAELDCYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	353
PP054	LAEAKSAANSELDYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	354
PP055	LAEAKEAANAELDKYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	355
PP056	LAEAKEAANSELDYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	356
PP057	LAEAKESANSELDYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	357
PP058	LAEAKESANAELDKYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	358
PP059	LAEAKSAANAELDKYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	359
PP060	LAEAKSAANSELDYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	360
PP061	LAQAKSAANAELDKYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	361
PP062	LAQAKSAANSELDYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	362
PP063	LAQAKESANSELDYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	363
PP064	LAQAKESANAELDKYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	364
PP065	LAQAKSAANAELDCYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	365
PP066	LAQAKSAANSELDYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	366
PP067	LAQAKEAANAELDKYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	367
PP068	LAQAKEAANSELDYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	368
PP069	LAQAKESANSELDYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	369
PP070	LAQAKESANAELDKYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	370
PP071	LAQAKSAANAELDKYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	371
PP072	LAQAKSAANSELDYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	372
PP073	LACAKEAANAELDCYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	373
PP074	LACAKEAANSELDYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	374
PP075	LACAKESANSELDYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	375
PP076	LACAKESANAELDKYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	376

【 図 1 - 3 】

PP077	LACAKSAANAELDCYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	377
PP078	LACAKSAANSELDYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	378
PP079	LACAKEAANAELDKYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	379
PP080	LACAKEAANSELDYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	380
PP081	LACAKESANSELDYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	381
PP082	LACAKESANAELDKYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	382
PP083	LACAKSAANAELDKYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	383
PP084	LACAKSAANSELDYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	384
PP085	LACAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	385
PP086	LACAKEAANSELDYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	386
PP087	LACAKESANSELDYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	387
PP088	LACAKESANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	388
PP089	LACAKSAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	389
PP090	LACAKSAANSELDYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	390
PP091	LACAKEAANAELDAYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	391
PP092	LACAKEAANSELDAYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	392
PP093	LACAKESANSELDAYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	393
PP094	LACAKESANAELDAYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	394
PP095	LACAKSAANAELDAYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	395
PP096	LACAKSAANSELDAYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	396
PP097	LAQAKCAANAELDAYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	397
PP098	LAQAKCAANSELDAYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	398
PP099	LAQAKCSANSELDAYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	399
PP100	LAQAKCSANAELDAYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	400
PP101	LAQAKCAANAELDCYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	401
PP102	LAQAKCAANSELDYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	402
PP103	LAQAKCAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	403
PP104	LAQAKCAANSELDYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	404
PP105	LAQAKCSANSELDYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	405
PP106	LAQAKCSANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	406
PP107	LAQAKCAANAELDKYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	407
PP108	LAQAKCAANSELDYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	408
PP109	LASAKCAANAELDAYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	409
PP110	LASAKCAANSELDAYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	410
PP111	LASAKCSANSELDAYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	411
PP112	LASAKCSANAELDAYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	412
PP113	LASAKCAANAELDCYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	413
PP114	LASAKCAANSELDYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	414
PP115	LASAKCAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	415
PP116	LASAKCAANSELDYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	416
PP117	LASAKCSANSELDYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	417

【 図 1 - 4 】

PP118	LASAKCSANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	418
PP119	LASAKCAANAELDKYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	419
PP120	LASAKCAANSELDYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	420
PP121	LAEAKCAANAELDAYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	421
PP122	LAEAKCAANSELDYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	422
PP123	LAEAKCSANSELDYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	423
PP124	LAEAKCSANAELDAYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	424
PP125	LAEAKCAANAELDCYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	425
PP126	LAEAKCAANSELDYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	426
PP127	LAEAKCAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	427
PP128	LAEAKCAANSELDYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	428
PP129	LAEAKCSANSELDYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	429
PP130	LAEAKCSANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	430
PP131	LAEAKCAANAELDKYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	431
PP132	LAEAKCAANSELDYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	432
PP133	LACAKCAANAELDAYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	433
PP134	LACAKCAANSELDYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	434
PP135	LACAKCSANSELDYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	435
PP136	LACAKCSANAELDAYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	436
PP137	LACAKCAANAELDCYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	437
PP138	LACAKCAANSELDYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	438
PP139	LACAKCAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	439
PP140	LACAKCAANSELDYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	440
PP141	LACAKCSANSELDYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	441
PP142	LACAKCSANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	442
PP143	LACAKCAANAELDKYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	443
PP144	LACAKCAANSELDYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALP	444
PP145	GSLASAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALPG	445
PP146	GSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALPG	446
PP147	GSLASAKEAANAELDCYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALPG	447
PEP08185	GSLAEAKEAANAELDCYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALPG	448
PP149	GSLASAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALPG	449
PP150	GSLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALPG	450
PP151	GCSLASAKEAANAELDKYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALPG	451
PP152	GCSLAEAKEAANAELDKYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALPG	452
PEP07913	GLAEAKVLANRELDYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALPG	453
PEP06923	GSSLAEAKVLANRELDYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALPG	454
PEP07271	GSSLASAKEAANAELDAYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALPG	455
PEP07554	GSSLASAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALPG	456
PEP07912	GLASAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALPG	457
PEP07914	GLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGEALKDAILAALPG	458

【 図 1 - 5 】

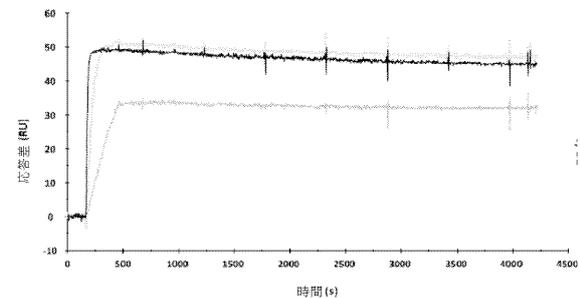
PEP07911	GLASAKAANAELDCYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	459
PEP07834	ALASAKAANAELDCYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	460
PEP07844	GSLASAKAANAELDKYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	461
PEP07983	GSLASAKAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	462
PEP07986	GSLAEAKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	463
PP013+NtermS	SLAEAKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	500
501	LAEAKEANAELDCYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALPG	501
501+NtermS	SLAEAKEANAELDCYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALPG	502
	GSLAQAKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	862
	GSLAEAKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	863
	GSLAQAKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	864
	GSLAEAKEANAELDAYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	865
	GSLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	866
	SLAQAKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	867
	SLAEAKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	868
	SLAQAKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	869
	SLAEAKEANAELDAYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	870
	SLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	871
	LAQAKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	872
	LAEAKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	873
	LAQAKEANAELDAYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	874
	LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP	875
	GSLAQAKEANAELDSYGVSDFYKRLIEKAKTVEGVEALKDAILAALP	876
	GSLAEAKEANAELDSYGVSDFYKRLIEKAKTVEGVEALKDAILAALP	877
	GSLAQAKEANAELDSYGVSDFYKRLIEKAKTVEGVEALKDAILAALP	878
	GSLAEAKEANAELDAYGVSDFYKRLIEKAKTVEGVEALKDAILAALP	879
	GSLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLIEKAKTVEGVEALKDAILAALP	880
	SLAQAKEANAELDSYGVSDFYKRLIEKAKTVEGVEALKDAILAALP	881
	SLAEAKEANAELDSYGVSDFYKRLIEKAKTVEGVEALKDAILAALP	882
	SLAQAKEANAELDSYGVSDFYKRLIEKAKTVEGVEALKDAILAALP	883
	SLAEAKEANAELDAYGVSDFYKRLIEKAKTVEGVEALKDAILAALP	884
	SLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLIEKAKTVEGVEALKDAILAALP	885
	LAQAKEANAELDSYGVSDFYKRLIEKAKTVEGVEALKDAILAALP	886
	LAEAKEANAELDSYGVSDFYKRLIEKAKTVEGVEALKDAILAALP	887
	LAQAKEANAELDSYGVSDFYKRLIEKAKTVEGVEALKDAILAALP	888
	LAEAKEANAELDAYGVSDFYKRLIEKAKTVEGVEALKDAILAALP	889
	LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLIEKAKTVEGVEALKDAILAALP	890
	GSLAQAKEANAELDSYGVSDFYKRLIEKAKTVEGVEALKEAILAALP	891
	GSLAEAKEANAELDSYGVSDFYKRLIEKAKTVEGVEALKEAILAALP	892
	GSLAQAKEANAELDSYGVSDFYKRLIEKAKTVEGVEALKEAILAALP	893
	GSLAEAKEANAELDAYGVSDFYKRLIEKAKTVEGVEALKEAILAALP	894
	GSLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLIEKAKTVEGVEALKEAILAALP	895
	SLAQAKEANAELDSYGVSDFYKRLIEKAKTVEGVEALKEAILAALP	896
	SLAEAKEANAELDSYGVSDFYKRLIEKAKTVEGVEALKEAILAALP	897
	SLAQAKEANAELDSYGVSDFYKRLIEKAKTVEGVEALKEAILAALP	898
	SLAEAKEANAELDAYGVSDFYKRLIEKAKTVEGVEALKEAILAALP	899
	SLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLIEKAKTVEGVEALKEAILAALP	900
	LAQAKEANAELDSYGVSDFYKRLIEKAKTVEGVEALKEAILAALP	901
	LAEAKEANAELDSYGVSDFYKRLIEKAKTVEGVEALKEAILAALP	902
	LAQAKEANAELDSYGVSDFYKRLIEKAKTVEGVEALKEAILAALP	903

【 図 1 - 6 】

	LAEAKEANAELDAYGVSDFYKRLIEKAKTVEGVEALKEAILAALP	904
	LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLIEKAKTVEGVEALKEAILAALP	905
	GSLAQAKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILASLP	906
	GSLAEAKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILASLP	907
	GSLAQAKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILASLP	908
	GSLAEAKEANAELDAYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILASLP	909
	GSLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILASLP	910
	SLAQAKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILASLP	911
	SLAEAKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILASLP	912
	SLAQAKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILASLP	913
	SLAEAKEANAELDAYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILASLP	914
	LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILASLP	915
	LAQAKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILASLP	916
	LAEAKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILASLP	917
	LAQAKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILASLP	918
	LAEAKEANAELDAYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILASLP	919
	LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILASLP	920
	GSLAQAKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAELP	921
	GSLAEAKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAELP	922
	GSLAQAKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAELP	923
	GSLAEAKEANAELDAYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAELP	924
	GSLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAELP	925
	SLAQAKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAELP	926
	SLAEAKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAELP	927
	SLAQAKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAELP	928
	SLAEAKEANAELDAYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAELP	929
	SLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAELP	930
	LAQAKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAELP	931
	LAEAKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAELP	932
	LAQAKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAELP	933
	LAEAKEANAELDAYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAELP	934
	LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAELP	935
	GSLAQAKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILKALP	936
	GSLAEAKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILKALP	937
	GSLAQAKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILKALP	938
	GSLAEAKEANAELDAYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILKALP	939
	GSLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILKALP	940
	SLAQAKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILKALP	941
	SLAEAKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILKALP	942
	SLAQAKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILKALP	943
	SLAEAKEANAELDAYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILKALP	944
	SLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILKALP	945
	LAQAKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILKALP	946
	LAEAKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILKALP	947
	LAQAKEANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILKALP	948
	LAEAKEANAELDAYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILKALP	949
	LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILKALP	950

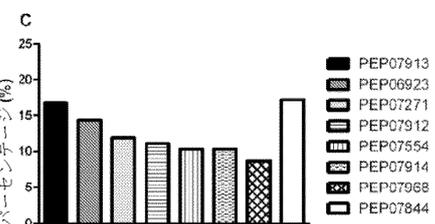
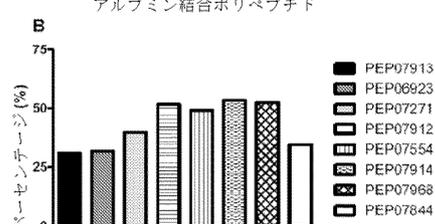
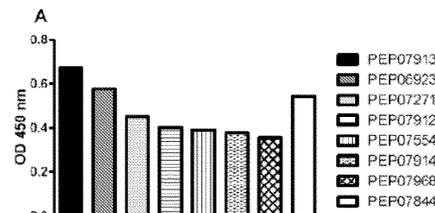
【 図 2 】

Figure 2



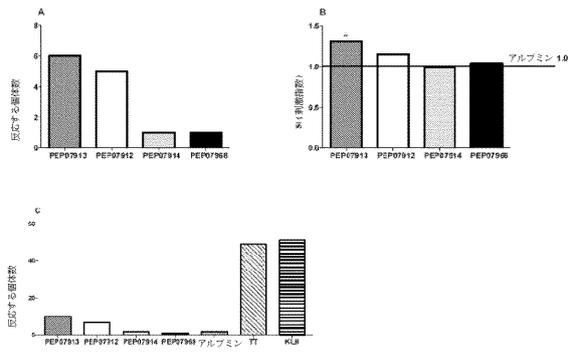
【 図 3 】

Figures 3A, 3B and 3C



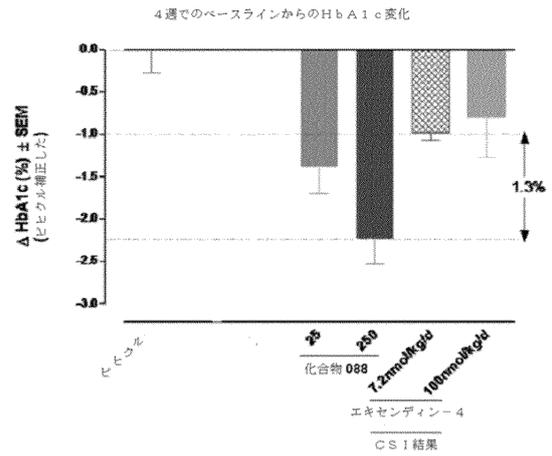
【 図 4 】

Figures 4A, 4B and 4C



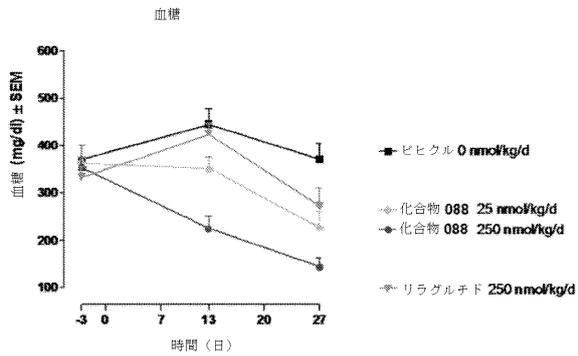
【 図 5 A 】

Figure 5A



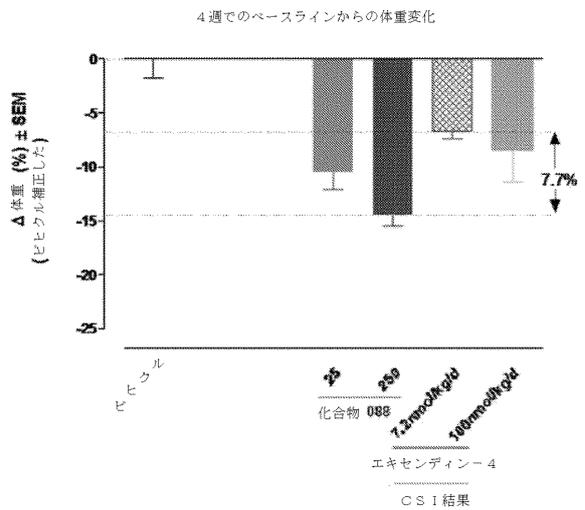
【 図 5 B 】

Figure 5B



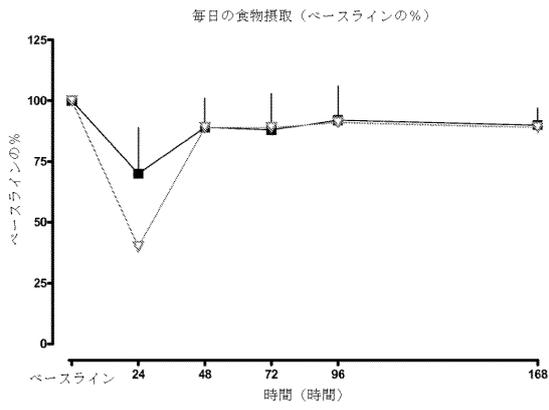
【 図 5 C 】

Figure 5C



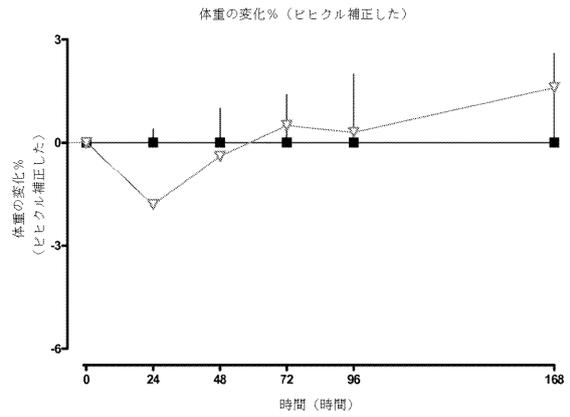
【 図 6 A 】

Figure 6A



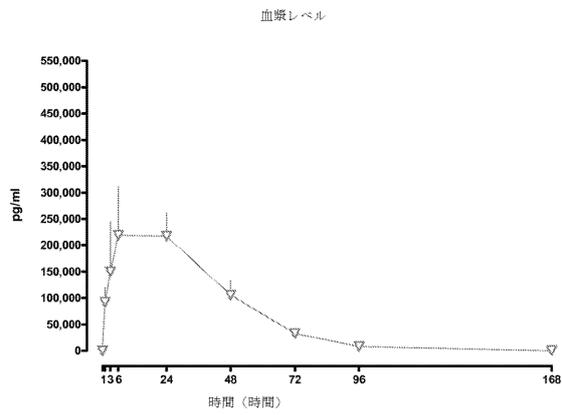
【 図 6 B 】

Figure 6B



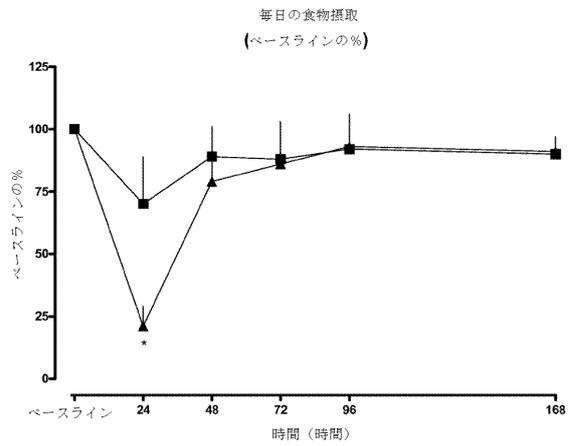
【 図 6 C 】

Figure 6C



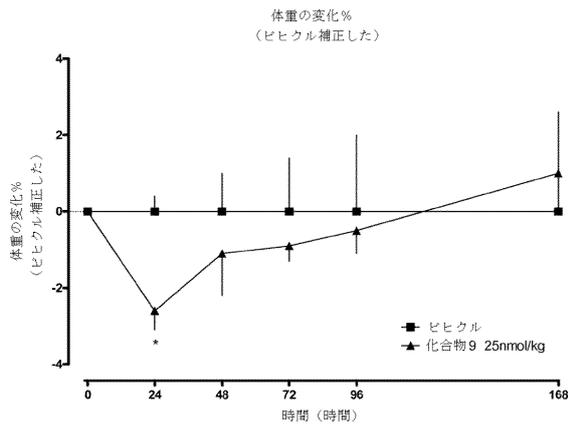
【 図 7 A 】

Fig. 7A



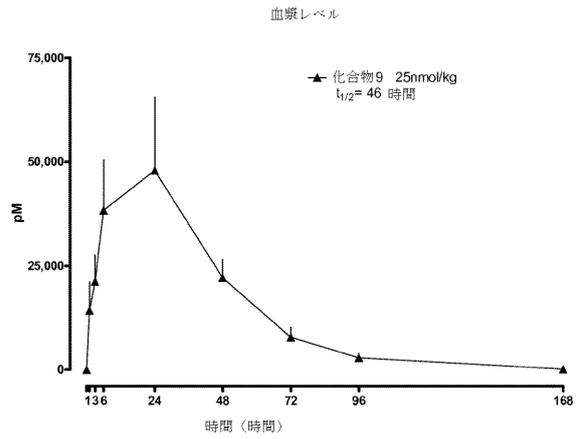
【 図 7 B 】

Fig. 7B



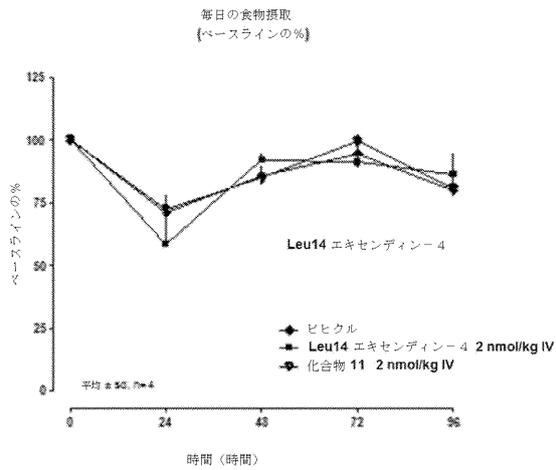
【 図 7 C 】

Fig. 7C



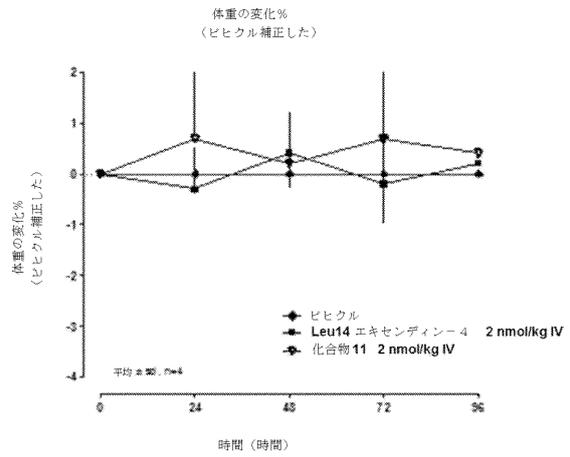
【 図 8 A 】

Fig. 8A



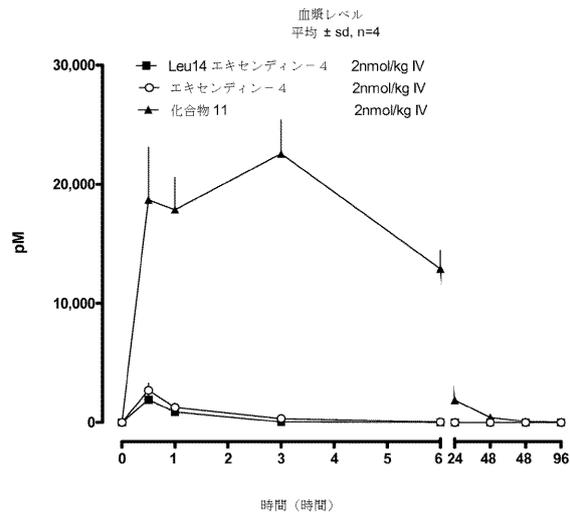
【 図 8 B 】

Fig. 8B



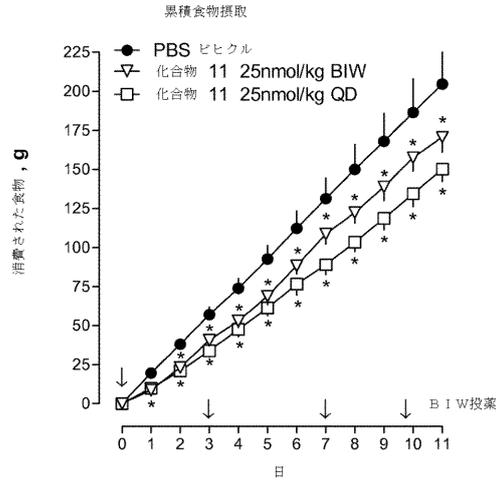
【 図 8 C 】

Fig. 8C



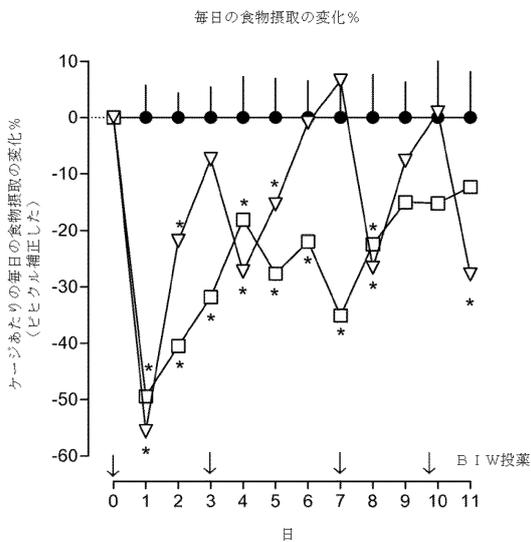
【 図 9 A 】

Fig. 9A



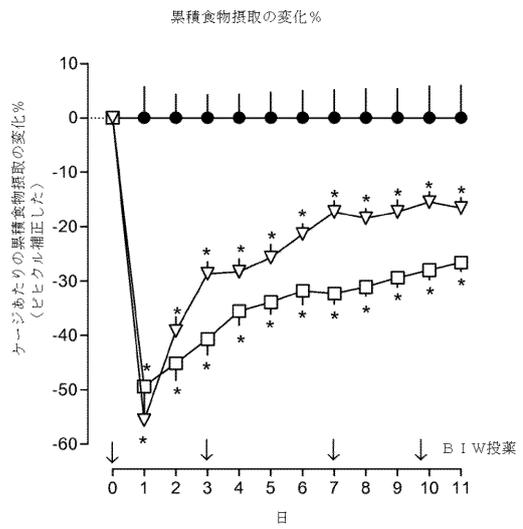
【 図 9 B 】

Fig. 9B



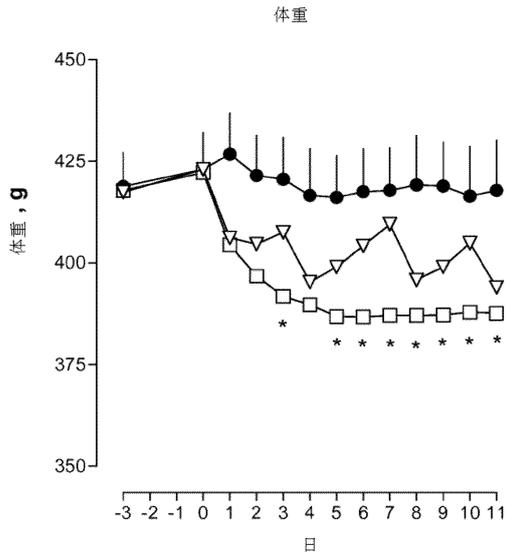
【 図 9 C 】

Fig. 9C



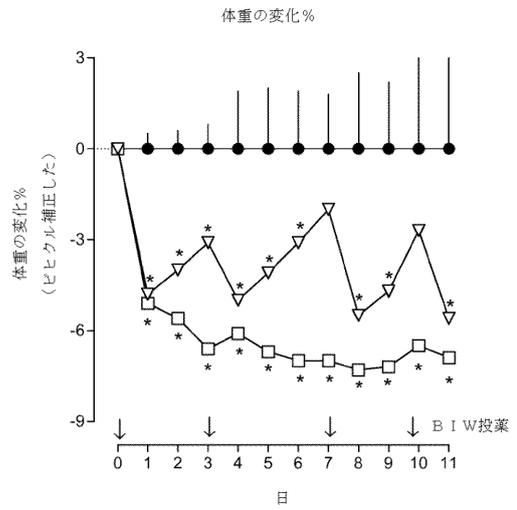
【 図 9 D 】

Fig. 9D



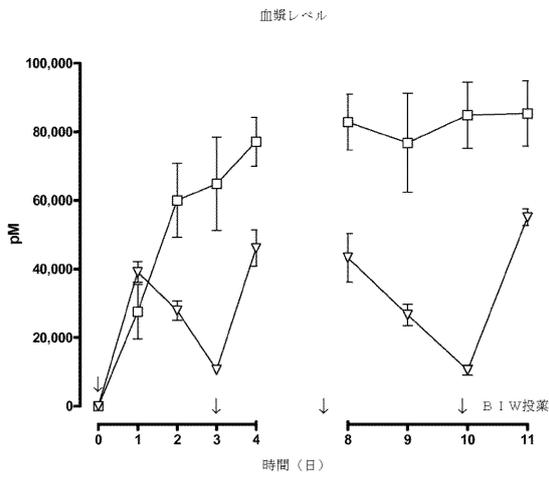
【 図 9 E 】

Fig. 9E



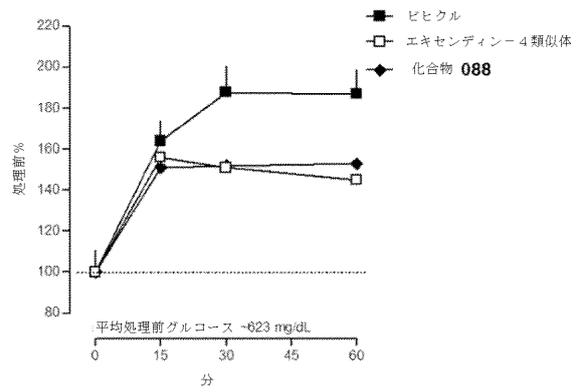
【 図 9 F 】

Fig. 9F



【 図 1 0 】

Fig. 10



【配列表】

0006006309000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10
A 6 1 K	38/22 (2006.01)	A 6 1 K 37/24
A 6 1 P	3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10

(73)特許権者 513094387

アストラゼネカ・ファーマシューティカルズ・リミテッド・パートナーシップ  
 AstraZeneca Pharmaceuticals LP  
 アメリカ合衆国デラウェア州、ウィルミントン、コンコード・バイク1800番

(74)代理人 100081422

弁理士 田中 光雄

(74)代理人 100084146

弁理士 山崎 宏

(74)代理人 100122301

弁理士 富田 憲史

(74)代理人 100157956

弁理士 稲井 史生

(74)代理人 100170520

弁理士 笹倉 真奈美

(72)発明者 メアリー・エリクソン

アメリカ合衆国92121カリフォルニア州サンディエゴ、タウン・センター・ドライブ9360番、アミリン・ファーマシューティカルズ・リミテッド・ライアビリティ・カンパニー内

(72)発明者 デイビッド・シー・リッツィンガー

アメリカ合衆国92121カリフォルニア州サンディエゴ、タウン・センター・ドライブ9360番、アミリン・ファーマシューティカルズ・リミテッド・ライアビリティ・カンパニー内

(72)発明者 スーミトラ・エス・ゴッシュ

アメリカ合衆国92121カリフォルニア州サンディエゴ、タウン・センター・ドライブ9360番、アミリン・ファーマシューティカルズ・リミテッド・ライアビリティ・カンパニー内

(72)発明者 ジジエン・グオ

アメリカ合衆国92121カリフォルニア州サンディエゴ、タウン・センター・ドライブ9360番、アミリン・ファーマシューティカルズ・リミテッド・ライアビリティ・カンパニー内

(72)発明者 マノジ・ピー・サマント

アメリカ合衆国92121カリフォルニア州サンディエゴ、タウン・センター・ドライブ9360番、アミリン・ファーマシューティカルズ・リミテッド・ライアビリティ・カンパニー内

(72)発明者 アブヒナンディニ・シャルマ

アメリカ合衆国92121カリフォルニア州サンディエゴ、タウン・センター・ドライブ9360番、アミリン・ファーマシューティカルズ・リミテッド・ライアビリティ・カンパニー内

(72)発明者 ララ・マメドバ

アメリカ合衆国92121カリフォルニア州サンディエゴ、タウン・センター・ドライブ9360番、アミリン・ファーマシューティカルズ・リミテッド・ライアビリティ・カンパニー内

(72)発明者 オディール・エスター・レビー

アメリカ合衆国92121カリフォルニア州サンディエゴ、タウン・センター・ドライブ9360番、アミリン・ファーマシューティカルズ・リミテッド・ライアビリティ・カンパニー内

(72)発明者 キャロライン・エクブラッド

アメリカ合衆国92121カリフォルニア州サンディエゴ、タウン・センター・ドライブ9360番

番、アミリン・ファーマシューティカルズ・リミテッド・ライアビリティ・カンパニー内

審査官 川合 理恵

(56)参考文献 国際公開第2011/039096(WO, A1)  
特表2010-534486(JP, A)  
国際公開第2010/054699(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/09

C07K 1/00-19/00

UniProt/GeneSeq

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS  
(STN)

JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDreamIII)