

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7405486号

(P7405486)

(45)発行日 令和5年12月26日(2023.12.26)

(24)登録日 令和5年12月18日(2023.12.18)

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 K 19/00 (2006.01)

C 0 7 K 19/00

Z N A

C 1 2 N 15/62 (2006.01)

C 1 2 N 15/62

Z

C 1 2 N 15/17 (2006.01)

C 1 2 N 15/17

C 1 2 N 15/13 (2006.01)

C 1 2 N 15/13

C 0 7 K 16/00 (2006.01)

C 0 7 K 16/00

請求項の数 29 (全126頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2022-536936(P2022-536936)

(86)(22)出願日 令和2年12月7日(2020.12.7)

(65)公表番号 特表2023-507376(P2023-507376  
A)

(43)公表日 令和5年2月22日(2023.2.22)

(86)国際出願番号 PCT/US2020/063673

(87)国際公開番号 WO2021/126584

(87)国際公開日 令和3年6月24日(2021.6.24)

審査請求日 令和4年8月25日(2022.8.25)

(31)優先権主張番号 62/950,803

(32)優先日 令和1年12月19日(2019.12.19)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/988,441

(32)優先日 令和2年3月12日(2020.3.12)

最終頁に続く

(73)特許権者 519206793

アクストン バイオサイエンス コーポ  
レーションAKSTON BIOSCIENCES  
CORPORATION

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0

1 9 1 5, ビバリー, カミングス セン

ター 1 0 0

1 0 0 Cummings Center

, Beverly, Massachus

etts 0 1 9 1 5 (US)

(74)代理人 100107342

弁理士 横田 修孝

(74)代理人 100155631

弁理士 榎 保孝

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 超長時間作用型インスリン - F C 融合タンパク質および使用法

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

インスリンポリペプチドと、F c フラグメントと、を含む融合タンパク質であって、  
前記インスリンポリペプチドおよび前記F c フラグメントはリンカーによって接続され  
ており、N末端からC末端へ以下の配向：

( N末端 ) - インスリンポリペプチド - リンカー - F c フラグメント - ( C末端 )

で各ドメインを含み、

前記F c フラグメントはヒト由来であり、且つ以下の配列（配列番号77）：

## 【化1】

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH  
NAKTKPREEQYXISTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY  
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK  
RWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 77)

を含み、X<sub>1</sub>はSまたはRであり、

前記インスリンポリペプチドは

以下の配列：

F V N Q H L C G S H L V E A L A L V C G E R G F H Y G G G G G S G G G G G I V  
E Q C C T S T C S L D Q L E N Y C (配列番号10)、

を含み、かつ

前記リンカーが以下の配列：

G G G G G A G G G G A G G G G A G G G G G ( 配列番号 6 7 ) ；

G G G G G Q G G G G Q G G G G Q G G G G G Q G G G G G ( 配列番号 9 9 ) ；または

G G G G G Q G G G G Q G G G G Q G G G G G ( 配列番号 1 3 )

を含む、

融合タンパク質。

【請求項 2】

インスリンポリペプチドと、Fcフラグメントと、を含む融合タンパク質であって、

前記インスリンポリペプチドおよび前記Fcフラグメントはリンカーによって接続されて  
おり、

前記融合タンパク質は以下の配列（配列番号 8 7）：

【化 2】

FVNQHLCGSHLVEALALVCGERGFHYGGGGGGSGGGGGIVEQCCTSTCSLDQLENYCGGGGGA  
GGGGAGGGGAGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED  
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYSSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE  
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD  
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 87)

を含む、請求項 1 に記載の融合タンパク質。

【請求項 3】

以下の配列（配列番号 7 8）：

【化 3】

FVNQHLCGSHLVEALALVCGERGFHYGGGGGGSGGGGGIVEQCCTSTCSLDQLENYCGGGGGQ  
GGGGQGGGGQGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED  
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYSSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE  
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD  
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 78).

を含む、請求項 1 に記載の融合タンパク質。

【請求項 4】

以下の配列（配列番号 8 4）：

【化 4】

FVNQHLCGSHLVEALALVCGERGFHYGGGGGGSGGGGGIVEQCCTSTCSLDQLENYCGGGGGQ  
GGGGQGGGGQGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED  
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYRSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE  
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD  
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 84)

を含む、請求項 1 に記載の融合タンパク質。

【請求項 5】

以下の配列（配列番号 9 6）：

【化 5】

FVNQHLCGSHLVEALALVCGERGFHYGGGGGGSGGGGGIVEQCCTSTCSLDQLENYCGGGGGQ  
GGGGQGGGGQGGGGGQGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV  
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY\$STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK  
ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK  
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 96)

を含む、請求項 1 に記載の融合タンパク質。

【請求項 6】

ホモ二量体である、請求項 1 に記載の融合タンパク質。

【請求項 7】

ホモ二量体である、請求項 2 ~ 5 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 8】

融合タンパク質のホモ二量体率が 90 % 超である、請求項 6 または請求項 7 に記載の融合タンパク質。

【請求項 9】

ホモ二量体の力価が 150 mg / L を超える、請求項 6 または請求項 7 に記載の融合タンパク質。

【請求項 10】

融合タンパク質のインスリン受容体 IC50 が 5000 nM 以下である、請求項 6 または請求項 7 に記載の融合タンパク質。

【請求項 11】

融合タンパク質のインスリン受容体 IC50 が 2400 nM 以下である、請求項 6 または請求項 7 に記載の融合タンパク質。

【請求項 12】

融合タンパク質のヒト FcRn 受容体 EC50 が 1000 ng / mL 以下である、請求項 6 または請求項 7 に記載の融合タンパク質。

【請求項 13】

融合タンパク質の、ビオチン化 FcRI 濃度が 3000 ng / mL である場合のヒト FcRI 受容体アッセイにおける OD450 比が 0.50 以下である、請求項 6 または請求項 7 に記載の融合タンパク質。

【請求項 14】

ビオチン化 C1q 濃度が 1000 ng / mL である場合のヒト C1q アッセイにおける OD450 比が 0.35 以下である、請求項 6 または請求項 7 に記載の融合タンパク質。

【請求項 15】

請求項 6 または請求項 7 に記載の融合タンパク質を含む、医薬組成物。

【請求項 16】

前記融合タンパク質が約 3 mg / mL 以上の濃度で医薬組成物中に存在する、請求項 15 に記載の医薬組成物。

【請求項 17】

皮下投与に好適である、請求項 15 に記載の医薬組成物。

【請求項 18】

患者の血糖値を低下させるために用いられる、請求項 15 ~ 17 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 19】

前記患者が糖尿病と診断された患者である、請求項 18 に記載の医薬組成物。

【請求項 20】

前記融合タンパク質が皮下投与される、請求項 18 に記載の医薬組成物。

【請求項 21】

前記融合タンパク質が毎日、週 2 回、または週 1 回患者に投与される、請求項 18 に記載の医薬組成物。

【請求項 22】

前記融合タンパク質が 0.025 ~ 0.5 mg / kg / 週の投与量で患者に週 1 回投与される、請求項 18 に記載の医薬組成物。

【請求項 23】

請求項 2 ~ 5 のいずれか一項に記載の融合タンパク質を発現するように改変された細胞。

【請求項 24】

前記融合タンパク質をコードする核酸でトランスフェクトされた、請求項 23 に記載の細胞。

10

20

30

40

50

## 【請求項 25】

H E K 2 9 3 細胞または C H O 細胞である、請求項 23 に記載の細胞。

## 【請求項 26】

請求項 1 に記載の融合タンパク質をコードする c D N A。

## 【請求項 27】

以下の核酸配列（配列番号 88）：

## 【化 6】

```
atggaatggagctgggtctttctcttctcgtcagtaacgactggtgtccactccttcgtgaaccagcacctgtgcggctcccacctgggtggaagctctggc  
actcgtgtgcggcgagcggggctccactacgggggtggcggaggaggttctggtggcggcgaggcatcgtggaacagtgtgcacctccacctgct  
ccctggaccagctggaactactgctggtggcggagggtggtgcaggagcggtggagccggtggaggtggggctggaggaggcgggggagacaa  
aactcacacatgcccaccgtgccagcacctgaactcctggggggaccgtcagttctcctcttcccccaaaaccaaggacacccctcatgatctccgg  
acccctgaggtcacatgctggtggtggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaa  
acaaagccgaggaggagcagtagacagcagcgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagt  
caaggtctccaacaaagccctccagcccccatcgagaaaacatctccaaagccaaaggcagccccgagaaccacaggtgtacacccctgccccat  
cccggtgagctgaccaaagaaccaggtcagcctgacctgctgcaaggcttctatccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcag  
ccggagaacaactacaagaccacgctccgtgctgactccgacggctccttctcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcag  
gggaacgtcttctcatgctccgtgatgatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctcctgtctccgggttag (SEQ ID NO: 88)
```

10

を含む、配列番号 87 の融合タンパク質をコードする c D N A。

20

## 【請求項 28】

以下の核酸配列（配列番号 79）：

## 【化 7】

```
atggaatggagctgggtctttcttctcgtcagtaacgactggtgtccactccttcgtgaaccagcacctgtgcggctcccacctgggtggaagctctggc  
actcgtgtgcggcgagcggggctccactacgggggtggcggaggaggttctggtggcggcgaggcatcgtggaacagtgtgcacctccacctgct  
ccctggaccagctggaactactgctggtggcggagggtggtcaaggaggcgggtggacagggtggaggtgggcaggaggaggcgggggagacaa  
aactcacacatgcccaccgtgccagcacctgaactcctggggggaccgtcagttctccttcccccaaaaccaaggacacccctcatgatctccgg  
acccctgaggtcacatgctggtggtggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaa  
acaaagccgaggaggagcagtagacagcagcgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagt  
caaggtctccaacaaagccctccagcccccatcgagaaaacatctccaaagccaaaggcagccccgagaaccacaggtgtacacccctgccccat  
cccggtgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgcaaggcttctatccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcag  
ccggagaacaactacaagaccacgctccgtgctgactccgacggctccttctcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcag  
gggaacgtcttctcatgctccgtgatgatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctcctgtctccgggttag (SEQ ID NO: 79)
```

30

を含む、配列番号 78 の融合タンパク質をコードする c D N A。

## 【請求項 29】

以下の核酸配列（配列番号 85）：

## 【化 8】

```
atggaatggagctgggtctttcttctcgtcagtaacgactggtgtccactccttcgtgaaccagcacctgtgcggctcccacctgggtggaagctctggc  
actcgtgtgcggcgagcggggctccactacgggggtggcggaggaggttctggtggcggcgaggcatcgtggaacagtgtgcacctccacctgct  
ccctggaccagctggaactactgctggtggcggagggtggtcaaggaggcgggtggacagggtggaggtgggcaggaggaggcgggggagacaa  
aactcacacatgcccaccgtgccagcacctgaactcctggggggaccgtcagttctccttcccccaaaaccaaggacacccctcatgatctccgg  
acccctgaggtcacatgctggtggtggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaa  
acaaagccgaggaggagcagtagaagcagcgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagt  
caaggtctccaacaaagccctccagcccccatcgagaaaacatctccaaagccaaaggcagccccgagaaccacaggtgtacacccctgccccat  
cccggtgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgcaaggcttctatccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcag  
ccggagaacaactacaagaccacgctccgtgctgactccgacggctccttctcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcag  
gggaacgtcttctcatgctccgtgatgatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctcctgtctccgggttag (SEQ ID NO: 85)
```

40

を含む配列番号 84 の融合タンパク質をコードする c D N A。

50

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

優先権および関連出願の相互参照

本出願は、2019年12月19日に出願された米国仮特許出願第62/950,803号、および、2020年3月12日に出願された米国仮特許出願第62/988,441号に関連し、これらの優先権の利益を主張するものである。上記の各特許出願の内容は、その全体が参照によって本明細書に援用される。

## 【0002】

本発明の技術は、インスリン - Fc融合タンパク質の組成物、およびヒトにおける糖尿病を治療するためのその使用に関する。

10

## 【背景技術】

## 【0003】

本発明の技術の背景技術に関する以下の記述は、単に、本発明の技術の理解の一助として提供されるものであり、本発明の技術に対する先行技術の記述や構成を認めるものではない。

## 【0004】

糖尿病は、インスリンの欠乏および/またはインスリン使用が効かないことを特徴とする、慢性的な状態である。インスリンが絶対的に欠乏した糖尿病患者は、1型糖尿病またはインスリン依存性糖尿病（IDDM）患者と分類される。1型糖尿病患者は、膵臓のインスリン産生細胞の免疫による破壊と結び付いた遺伝的素因を有すると考えられている。それに対して、いくらかのインスリンをまだ生産できるが、インスリン抵抗性または他の機能障害による相対的な欠乏を有する糖尿病患者は、2型糖尿病またはインスリン非依存性糖尿病（NIDDM）患者に分類される。2型糖尿病は、遺伝的素因、肥満症、およびある特定の薬物療法に関連している。女性は、いわゆる妊娠糖尿病において、妊娠中も、一次的なインスリン抵抗性を発症する可能性がある。成人の中には、緩やかに進行する型の自己免疫性糖尿病である、成人潜在性自己免疫性糖尿病（LADA）と診断されるものもある。1型糖尿病と同様に、LADAでは、膵臓のインスリン産生細胞が破壊されるが、速度はゆっくりである。若年発症成人型糖尿病（MODY）と診断される人の割合は小さいが、これは、インスリン産生を阻害する常染色体優性遺伝子の変異によって引き起こされるいくつかの遺伝性真性糖尿病型のいずれかを指す。

20

30

## 【0005】

1型糖尿病患者、LADA患者、またはMODY患者の膵臓が十分なインスリンを産生していない場合、その患者は通常、高血糖症を特徴とする非定型の糖血症表現型を示す。これらの場合、患者は慢性的なインスリン注射療法で治療される。2型糖尿病および妊娠糖尿病でも、患者は、膵臓によって産生されているインスリンを適切に利用できないために、高血糖症を示す場合が多い。これらの場合、患者は経口薬で治療することができ、食事と運動は変更する場合と変更しない場合があるが、多くの被験者は最終的には、1型糖尿病に似た状態（細胞量の著しい減少を伴う膵臓の炎症性疾患）へと進行し、外因性インスリンに依存するようになる。未治療のままであると、糖尿病は、体重減少、食欲不振、嘔吐、脱水、運動機能に関連する問題、昏睡、さらには死亡に繋がる可能性がある。

40

## 【0006】

およそ3000万人、すなわち合衆国の人口の9.4%が、糖尿病を有している。1型糖尿病は、糖尿病と診断された全ての症例の約5%を占め、およそ150万人に発症している。現行の糖尿病治療薬としては、種々の短時間作用型のインスリン製品（例えば、Humalog（登録商標）（イーライリリー社（Eli Lilly）、インディアナポリス、インディアナ州）およびNovoLog（登録商標）（ノボノルディスク社（Novo Nordisk）、バウスベア、デンマーク））、並びに、長時間作用型のインスリン製品（例えば、Lantus（登録商標）（サノフィ社（Sanofi）、パリ、フランス）およびLevemir（登録商標）（ノボノルディスク社、バウスベア、デンマ

50

ーク))が挙げられ、これらは、1日に複数回皮下注射で投与されるか、または装着型皮下注入ポンプによって投与される。頻繁な注射による負担は、治療レジメンのコンプライアンスの不足や投与量の不足に繋がり、長期的な健康アウトカムを悪化する結果となる。実際、米国成人のうち、心血管イベント、切断、ケトアシドーシスにより、毎年700万人以上の糖尿病に関連した退院が報告されている。さらに、米国成人のうち、低血糖症や高血糖症の危機などにより、毎年1,400万人以上の糖尿病に関連した救急外来が報告されている。糖尿病と診断されている20歳以上の米国成人のうち、腎疾患の有病率は36%以上と推定されている。糖尿病は、米国における主要死因の第7位であり、年間の総費用は2450億ドル以上と推定されている。そのため、この疾患に対する費用対効果が高く、負担の少ない治療法の選択肢が求められている。

10

#### 【発明の概要】

##### 【0007】

1つの態様において、本開示は、インスリンポリペプチドと、Fcフラグメントと、を含む融合タンパク質であって、上記インスリンポリペプチドおよび前記Fcフラグメントはリンカーによって接続されており、上記融合タンパク質は以下の配列：

FVNQHLCGSHLVEALALVCGERGFGHYGGGGGGSGGGGGGIV  
EQCCTSTCSLDQLENYCGGGGGAGGGGAGGGGAGGGGGDK  
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV  
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYSSSTYRV  
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ  
PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE  
SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV  
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(配列番号87)、

20

を含む、融合タンパク質を提供する。

##### 【0008】

いくつかの実施形態において、本開示は、インスリンポリペプチドと、Fcフラグメントと、を含む融合タンパク質であって、上記インスリンポリペプチドおよび上記Fcフラグメントはリンカーによって接続されており、上記Fcフラグメントはヒト由来であり、且つ以下の配列：

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT  
CVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYX<sub>1</sub>ST  
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK  
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV  
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ  
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(配列番号77)、

30

を含み、X<sub>1</sub>はS、D、A、またはRであり、上記インスリンポリペプチドはC鎖を介してインスリンA鎖アナログに連結されたインスリンB鎖アナログからなり、上記インスリンポリペプチドのインスリンB鎖アナログのN末端から16番目のアミノ酸(すなわち、B16)はアラニンである(すなわち、B16A)、融合タンパク質を提供する。

##### 【0009】

いくつかの実施形態において、上記インスリンポリペプチドは、配列：

FVNQHLCGSX<sub>1</sub>LVEALALVCGERGFGHYGGGGGGSGGGGGI  
VEQCCX<sub>2</sub>STCSLDQLENYC(配列番号9)、

を含み、X<sub>1</sub>はDではなく、X<sub>2</sub>はHではない。いくつかの実施形態において、上記インスリンポリペプチドは、以下の配列：

FVNQHLCGSHLVEALALVCGERGFGHYGGGGGGSGGGGGI  
VEQCCTSTCSLDQLENYC(配列番号10)、

を含む。

##### 【0010】

いくつかの構成において、上記リンカーは、配列：

50

G G G G G Q G G G G Q G G G G Q G G G G G ( 配列番号 1 3 ) 、  
を含む。構成において、上記リンカーは、配列：  
G G G G G A G G G G A G G G G A G G G G G ( 配列番号 6 7 ) 、  
を含む。構成において、上記リンカーは、配列：  
G G G G A G G G G ( 配列番号 1 1 ) 、  
を含む。

【 0 0 1 1 】

いくつかの実施形態において、上記融合タンパク質は、以下の配列：

F V N Q H L C G S H L V E A L A L V C G E R G F H Y G G G G G G S G G G G G I V  
E Q C C T S T C S L D Q L E N Y C G G G G A G G G G D K T H T C P P C P A P E L  
L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K  
F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y S S T Y R V V S V L T V L H Q D W L  
N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S  
R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T  
P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N  
H Y T Q K S L S L S P G ( 配列番号 8 9 ) 、  
を含む。

10

【 0 0 1 2 】

いくつかの実施形態において、上記融合タンパク質は、以下の配列：

F V N Q H L C G S H L V E A L A L V C G E R G F H Y G G G G G G S G G G G G I V  
E Q C C T S T C S L D Q L E N Y C G G G G G Q G G G G Q G G G G Q G G G G G D K  
T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V  
V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y S S T Y R V  
V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q  
P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E  
S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V  
F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G ( 配列番号 7 8 ) 、  
を含む。

20

【 0 0 1 3 】

いくつかの実施形態において、上記融合タンパク質は、以下の配列：

F V N Q H L C G S H L V E A L A L V C G E R G F H Y G G G G G G S G G G G G I V  
E Q C C T S T C S L D Q L E N Y C G G G G G Q G G G G Q G G G G Q G G G G G D K  
T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V  
V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y D S T Y R V  
V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q  
P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E  
S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V  
F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G ( 配列番号 8 0 ) 、  
を含む。

30

【 0 0 1 4 】

いくつかの実施形態において、上記融合タンパク質は、以下の配列：

F V N Q H L C G S H L V E A L A L V C G E R G F H Y G G G G G G S G G G G G I V  
E Q C C T S T C S L D Q L E N Y C G G G G G Q G G G G Q G G G G Q G G G G G D K  
T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V  
V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y A S T Y R V  
V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q  
P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E  
S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V  
F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G ( 配列番号 8 2 ) 、  
を含む。

40

50

## 【 0 0 1 5 】

いくつかの実施形態において、上記融合タンパク質は、以下の配列：

F V N Q H L C G S H L V E A L A L V C G E R G F H Y G G G G G G S G G G G G I V  
E Q C C T S T C S L D Q L E N Y C G G G G G Q G G G G Q G G G G Q G G G G G D K  
T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V  
V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y R S T Y R V  
V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q  
P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E  
S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V  
F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G ( 配列番号 8 4 )、  
を含む。

10

## 【 0 0 1 6 】

いくつかの実施形態において、上記融合タンパク質は、N末端からC末端へ以下の配向で各ドメインを含む：

( N末端 ) - インスリンポリペプチド - リンカー - F c フラグメント - ( C末端 )。

## 【 0 0 1 7 】

いくつかの実施形態において、上記融合タンパク質は、ホモ二量体である。例において、上記融合タンパク質のホモ二量体率は90%超である。いくつかの例において、上記融合タンパク質は、HEK293細胞またはCHO細胞の一方を用いて作製され、プロテインAビーズまたはプロテインAカラムを用いた精製後に得られるホモ二量体の力価は150mg/Lを超える。実施形態において、上記融合タンパク質のインスリン受容体IC50は5000nM以下である。いくつかの実施形態において、上記融合タンパク質のインスリン受容体IC50は2400nM以下である。

20

## 【 0 0 1 8 】

いくつかの実施形態において、上記融合タンパク質のヒトFcRn受容体EC50は1000ng/mL以下である。例において、上記融合タンパク質の、ビオチン化FcRI濃度が3000ng/mLである場合のヒトFcRI受容体アッセイにおけるOD450比は0.50以下である。実施形態において、ビオチン化C1q濃度が1000ng/mLである場合のヒトC1qアッセイにおけるOD450比は0.35以下である。実施形態において、上記融合タンパク質は医薬組成物として製剤化される。いくつかの例において、上記医薬組成物中の上記融合タンパク質の濃度は約3mg/mL以上である。いくつかの実施形態において、上記医薬組成物は、皮下投与に好適である。

30

## 【 0 0 1 9 】

実施形態において、患者の血糖値を低下させる方法として、上記融合タンパク質またはその医薬組成物の生理学的有効量が患者に投与され得る。例において、上記患者は糖尿病と診断された患者である。いくつかの実施形態において、上記融合タンパク質は皮下投与される。上記融合タンパク質は、患者に毎日、週2回、または週1回投与されてもよい。いくつかの例において、上記融合タンパク質は、0.025~0.500mg/kg/週の投与量で患者に週1回投与される。

## 【 0 0 2 0 】

実施形態において、上記融合タンパク質を発現するように細胞が改変されてもよい。上記細胞は、上記融合タンパク質をコードする核酸でトランスフェクトされてもよい。いくつかの例において、上記細胞は、HEK293細胞またはCHO細胞である。

40

## 【 0 0 2 1 】

実施形態において、配列番号87の上記融合タンパク質をコードする核酸(cDNA)は、以下の核酸配列：

a t g g a a t g g a g c t g g g t c t t t c t c t t c t t c c t g t c a g t a a  
c g a c t g g t g t c c a c t c c t t c g t g a a c c a g c a c c t g t g c g g  
c t c c c a c c t g g t g g a a g c t c t g g c a c t c g t g t g c g g c g a g  
c g g g g c t t c c a c t a c g g g g g t g g c g g a g g a g g t t c t g g t g

50

g c g g c g g a g g c a t c g t g g a a c a g t g c t g c a c c t c c a c c t g  
c t c c c t g g a c c a g c t g g a a a a c t a c t g c g g t g g c g g a g g t  
g g t g c a g g a g g c g g t g g a g c c g g t g g a g g t g g g g c t g g a g  
g a g g c g g g g g a g a c a a a a c t c a c a c a t g c c c a c c g t g c c c  
a g c a c c t g a a c t c c t g g g g g g a c c g t c a g t c t t c c t c t t c  
c c c c c a a a a c c c a a g g a c a c c c t c a t g a t c t c c c g g a c c c  
c t g a g g t c a c a t g c g t g g t g g t g g a c g t g a g c c a c g a a g a  
c c c t g a g g t c a a g t t c a a c t g g t a c g t g g a c g g c g t g g a g  
g t g c a t a a t g c c a a g a c a a a g c c g c g g g a g g a g c a g t a c a  
g c a g c a c g t a c c g t g t g g t c a g c g t c c t c a c c g t c c t g c a  
c c a g g a c t g g c t g a a t g g c a a g g a g t a c a a g t g c a a g g t c  
t c c a a c a a a g c c c t c c c a g c c c c a t c g a g a a a a c c a t c t  
c c a a a g c c a a a g g g c a g c c c c g a g a a c c a c a g g t g t a c a c  
c c t g c c c c c a t c c c g g g a t g a g c t g a c c a a g a a c c a g g t c  
a g c c t g a c c t g c c t g g t c a a a g g c t t c t a t c c c a g c g a c a  
t c g c c g t g g a g t g g g a g a g c a a t g g g c a g c c g g a g a a c a a  
c t a c a a g a c c a c g c c t c c c g t g c t g g a c t c c g a c g g c t c c  
t t c t t c c t c t a c a g c a a g c t c a c c g t g g a c a a g a g c a g g t  
g g c a g c a g g g g a a c g t c t t c t c a t g c t c c g t g a t g c a t g a  
g g c t c t g c a c a a c c a c t a c a c g c a g a a g a g c c t c t c c c t g  
t c t c c g g g t t a g ( 配列番号 8 8 )、  
を含む。

10

20

【 0 0 2 2 】

実施形態において、配列番号 8 9 の上記融合タンパク質をコードする核酸 ( c D N A )  
は、以下の核酸配列：

a t g g a a t g g a g c t g g g t c t t t c t c t t c t t c c t g t c a g t a a  
c g a c t g g t g t c c a c t c c t t c g t g a a c c a g c a c c t g t g c g g  
c t c c c a c c t g g t g g a a g c t c t g g c a c t c g t g t g c g g c g a g  
c g g g g c t t c c a c t a c g g g g g t g g c g g a g g a g g t t c t g g t g  
g c g g c g g a g g c a t c g t g g a a c a g t g c t g c a c c t c c a c c t g  
c t c c c t g g a c c a g c t g g a a a a c t a c t g c g g t g g c g g a g g t  
g c c g g a g g c g g g g g a g a c a a a a c t c a c a c a t g c c c a c c g t  
g c c c a g c a c c t g a a c t c c t g g g g g g a c c g t c a g t c t t c c t  
c t t c c c c c c a a a a c c c a a g g a c a c c c t c a t g a t c t c c c g g  
a c c c c t g a g g t c a c a t g c g t g g t g g t g g a c g t g a g c c a c g  
a a g a c c c t g a g g t c a a g t t c a a c t g g t a c g t g g a c g g c g t  
g g a g g t g c a t a a t g c c a a g a c a a a g c c g c g g g a g g a g c a g  
t a c a g c a g c a c g t a c c g t g t g g t c a g c g t c c t c a c c g t c c  
t g c a c c a g g a c t g g c t g a a t g g c a a g g a g t a c a a g t g c a a  
g g t c t c c a a c a a a g c c c t c c c a g c c c c a t c g a g a a a a c c  
a t c t c c a a a g c c a a a g g g c a g c c c c g a g a a c c a c a g g t g t  
a c a c c c t g c c c c c a t c c c g g g a t g a g c t g a c c a a g a a c c a  
g g t c a g c c t g a c c t g c c t g g t c a a a g g c t t c t a t c c c a g c  
g a c a t c g c c g t g g a g t g g g a g a g c a a t g g g c a g c c g g a g a  
a c a a c t a c a a g a c c a c g c c t c c c g t g c t g g a c t c c g a c g g  
c t c c t t c t t c c t c t a c a g c a a g c t c a c c g t g g a c a a g a g c  
a g g t g g c a g c a g g g g a a c g t c t t c t c a t g c t c c g t g a t g c  
a t g a g g c t c t g c a c a a c c a c t a c a c g c a g a a g a g c c t c t c  
c c t g t c t c c g g g t t a g ( 配列番号 9 0 )、  
を含む。

30

40

50

## 【 0 0 2 3 】

実施形態において、配列番号 7 8 の上記融合タンパク質をコードする核酸 ( c D N A ) は、以下の核酸配列：

```

a t g g a a t g g a g c t g g g t c t t t c t c t t c t t c c t g t c a g t a a
c g a c t g g t g t c c a c t c c t t c g t g a a c c a g c a c c t g t g c g g
c t c c c a c c t g g t g g a a g c t c t g g c a c t c g t g t g c g g c g a g
c g g g g c t t c c a c t a c g g g g g t g g c g g a g g a g g t t c t g g t g
g c g g c g g a g g c a t c g t g g a a c a g t g c t g c a c c t c c a c c t g
c t c c c t g g a c c a g c t g g a a a a c t a c t g c g g t g g c g g a g g t
g g t c a a g g a g g c g g t g g a c a g g g t g g a g g t g g g c a g g g a g
g a g g c g g g g g a g a c a a a a c t c a c a c a t g c c c a c c g t g c c c
a g c a c c t g a a c t c c t g g g g g g a c c g t c a g t c t t c c t c t t c
c c c c c a a a a c c c a a g g a c a c c c t c a t g a t c t c c c g g a c c c
c t g a g g t c a c a t g c g t g g t g g t g g a c g t g a g c c a c g a a g a
c c c t g a g g t c a a g t t c a a c t g g t a c g t g g a c g g c g t g g a g
g t g c a t a a t g c c a a g a c a a a g c c g c g g g a g g a g c a g t a c a
g c a g c a c g t a c c g t g t g g t c a g c g t c c t c a c c g t c c t g c a
c c a g g a c t g g c t g a a t g g c a a g g a g t a c a a g t g c a a g g t c
t c c a a c a a a g c c c t c c c a g c c c c c a t c g a g a a a a c c a t c t
c c a a a g c c a a a g g g c a g c c c c g a g a a c c a c a g g t g t a c a c
c c t g c c c c c a t c c c g g g a t g a g c t g a c c a a g a a c c a g g t c
a g c c t g a c c t g c c t g g t c a a a g g c t t c t a t c c c a g c g a c a
t c g c c g t g g a g t g g g a g a g c a a t g g g c a g c c g g a g a a c a a
c t a c a a g a c c a c g c c t c c c g t g c t g g a c t c c g a c g g c t c c
t t c t t c c t c t a c a g c a a g c t c a c c g t g g a c a a g a g c a g g t
g g c a g c a g g g g a a c g t c t t c t c a t g c t c c g t g a t g c a t g a
g g c t c t g c a c a a c c a c t a c a c g c a g a a g a g c c t c t c c c t g
t c t c c g g g t t a g ( 配列番号 7 9 )、

```

を含む。

## 【 0 0 2 4 】

実施形態において、配列番号 8 0 の上記融合タンパク質をコードする核酸 ( c D N A ) は、以下の核酸配列：

```

a t g g a a t g g a g c t g g g t c t t t c t c t t c t t c c t g t c a g t a a
c g a c t g g t g t c c a c t c c t t c g t g a a c c a g c a c c t g t g c g g
c t c c c a c c t g g t g g a a g c t c t g g c a c t c g t g t g c g g c g a g
c g g g g c t t c c a c t a c g g g g g t g g c g g a g g a g g t t c t g g t g
g c g g c g g a g g c a t c g t g g a a c a g t g c t g c a c c t c c a c c t g
c t c c c t g g a c c a g c t g g a a a a c t a c t g c g g t g g c g g a g g t
g g t c a a g g a g g c g g t g g a c a g g g t g g a g g t g g g c a g g g a g
g a g g c g g g g g a g a c a a a a c t c a c a c a t g c c c a c c g t g c c c
a g c a c c t g a a c t c c t g g g g g g a c c g t c a g t c t t c c t c t t c
c c c c c a a a a c c c a a g g a c a c c c t c a t g a t c t c c c g g a c c c
c t g a g g t c a c a t g c g t g g t g g t g g a c g t g a g c c a c g a a g a
c c c t g a g g t c a a g t t c a a c t g g t a c g t g g a c g g c g t g g a g
g t g c a t a a t g c c a a g a c a a a g c c g c g g g a g g a g c a g t a c g
a c a g c a c g t a c c g t g t g g t c a g c g t c c t c a c c g t c c t g c a
c c a g g a c t g g c t g a a t g g c a a g g a g t a c a a g t g c a a g g t c
t c c a a c a a a g c c c t c c c a g c c c c c a t c g a g a a a a c c a t c t
c c a a a g c c a a a g g g c a g c c c c g a g a a c c a c a g g t g t a c a c
c c t g c c c c c a t c c c g g g a t g a g c t g a c c a a g a a c c a g g t c

```

a g c c t g a c c t g c c t g g t c a a a g g c t t c t a t c c c a g c g a c a  
t c g c c g t g g a g t g g g a g a g c a a t g g g c a g c c g g a g a a c a a  
c t a c a a g a c c a c g c c t c c c g t g c t g g a c t c c g a c g g c t c c  
t t c t t c c t c t a c a g c a a g c t c a c c g t g g a c a a g a g c a g g t  
g g c a g c a g g g g a a c g t c t t c t c a t g c t c c g t g a t g c a t g a  
g g c t c t g c a c a a c c a c t a c a c g c a g a a g a g c c t c t c c c t g  
t c t c c g g g t t a g ( 配列番号 8 1 )、

を含む。

【 0 0 2 5 】

実施形態において、配列番号 8 2 の上記融合タンパク質をコードする核酸 ( c D N A )  
は、以下の核酸配列：

10

a t g g a a t g g a g c t g g g t c t t t c t c t t c t t c c t g t c a g t a a  
c g a c t g g t g t c c a c t c c t t c g t g a a c c a g c a c c t g t g c g g  
c t c c c a c c t g g t g g a a g c t c t g g c a c t c g t g t g c g g c g a g  
c g g g g c t t c c a c t a c g g g g g t g g c g g a g g a g g t t c t g g t g  
g c g g c g g a g g c a t c g t g g a a c a g t g c t g c a c c t c c a c c t g  
c t c c c t g g a c c a g c t g g a a a a c t a c t g c g g t g g c g g a g g t  
g g t c a a g g a g g c g g t g g a c a g g g t g g a g g t g g g c a g g g a g  
g a g g c g g g g g a g a c a a a a c t c a c a c a t g c c c a c c g t g c c c  
a g c a c c t g a a c t c c t g g g g g a c c g t c a g t c t t c c t c t t c  
c c c c c a a a a c c c a a g g a c a c c c t c a t g a t c t c c c g g a c c c  
c t g a g g t c a c a t g c g t g g t g g t g g a c g t g a g c c a c g a a g a  
c c c t g a g g t c a a g t t c a a c t g g t a c g t g g a c g g c g t g g a g  
g t g c a t a a t g c c a a g a c a a a g c c g c g g g a g g a g c a g t a c g  
c c a g c a c g t a c c g t g t g g t c a g c g t c c t c a c c g t c c t g c a  
c c a g g a c t g g c t g a a t g g c a a g g a g t a c a a g t g c a a g g t c  
t c c a a c a a a g c c c t c c c a g c c c c a t c g a g a a a a c c a t c t  
c c a a a g c c a a a g g g c a g c c c c g a g a a c c a c a g g t g t a c a c  
c c t g c c c c c a t c c c g g g a t g a g c t g a c c a a g a a c c a g g t c  
a g c c t g a c c t g c c t g g t c a a a g g c t t c t a t c c c a g c g a c a  
t c g c c g t g g a g t g g g a g a g c a a t g g g c a g c c g g a g a a c a a  
c t a c a a g a c c a c g c c t c c c g t g c t g g a c t c c g a c g g c t c c  
t t c t t c c t c t a c a g c a a g c t c a c c g t g g a c a a g a g c a g g t  
g g c a g c a g g g g a a c g t c t t c t c a t g c t c c g t g a t g c a t g a  
g g c t c t g c a c a a c c a c t a c a c g c a g a a g a g c c t c t c c c t g  
t c t c c g g g t t a g ( 配列番号 8 3 )、

20

30

を含む。

【 0 0 2 6 】

実施形態において、配列番号 8 4 の上記融合タンパク質をコードする核酸 ( c D N A )  
は、以下の核酸配列：

40

a t g g a a t g g a g c t g g g t c t t t c t c t t c t t c c t g t c a g t a a  
c g a c t g g t g t c c a c t c c t t c g t g a a c c a g c a c c t g t g c g g  
c t c c c a c c t g g t g g a a g c t c t g g c a c t c g t g t g c g g c g a g  
c g g g g c t t c c a c t a c g g g g g t g g c g g a g g a g g t t c t g g t g  
g c g g c g g a g g c a t c g t g g a a c a g t g c t g c a c c t c c a c c t g  
c t c c c t g g a c c a g c t g g a a a a c t a c t g c g g t g g c g g a g g t  
g g t c a a g g a g g c g g t g g a c a g g g t g g a g g t g g g c a g g g a g  
g a g g c g g g g g a g a c a a a a c t c a c a c a t g c c c a c c g t g c c c  
a g c a c c t g a a c t c c t g g g g g a c c g t c a g t c t t c c t c t t c  
c c c c c a a a a c c c a a g g a c a c c c t c a t g a t c t c c c g g a c c c

50

c t g a g g t c a c a t g c g t g g t g g t g g a c g t g a g c c a c g a a g a  
 c c c t g a g g t c a a g t t c a a c t g g t a c g t g g a c g g c g t g g a g  
 g t g c a t a a t g c c a a g a c a a a g c c g c g g g a g g a g c a g t a c a  
 g a a g c a c g t a c c g t g t g g t c a g c g t c c t c a c c g t c c t g c a  
 c c a g g a c t g g c t g a a t g g c a a g g a g t a c a a g t g c a a g g t c  
 t c c a a c a a a g c c c t c c c a g c c c c a t c g a g a a a a c c a t c t  
 c c a a a g c c a a a g g g c a g c c c c g a g a a c c a c a g g t g t a c a c  
 c c t g c c c c c a t c c c g g g a t g a g c t g a c c a a g a a c c a g g t c  
 a g c c t g a c c t g c c t g g t c a a a g g c t t c t a t c c c a g c g a c a  
 t c g c c g t g g a g t g g g a g a g c a a t g g g c a g c c g g a g a a c a a  
 c t a c a a g a c c a c g c c t c c c g t g c t g g a c t c c g a c g g c t c c  
 t t c t t c c t c t a c a g c a a g c t c a c c g t g g a c a a g a g c a g g t  
 g g c a g c a g g g g a a c g t c t t c t c a t g c t c c g t g a t g c a t g a  
 g g c t c t g c a c a a c c a c t a c a c g c a g a a g a g c c t c t c c c t g  
 t c t c c g g g t t a g (配列番号 85)、

を含む。

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1】図1は、例示的なインスリン - Fc融合タンパク質ホモ二量体の模式図を示して  
 いる。

【図2】図2は、N = 3のイヌに、0.2 mg / kgの配列番号31 (SEQ ID NO:31)  
 のホモ二量体を0日目に静脈内投与した場合の、0日目から3日目までの、平均空腹時血  
 糖値%を示している。

【図3】図3は、配列番号31 (SEQ ID NO:31)、配列番号32 (SEQ ID NO:32)、  
 配列番号33 (SEQ ID NO:33)、配列番号34 (SEQ ID NO:34)、および配列番号3  
 5 (SEQ ID NO:35)の、並列配列比較を示している。「\*」は、所与の配列位置におい  
 て全ての配列間で完全に相同であることを示しており、一方、「:」、「.」、空白は、  
 それぞれ、所与の配列位置における配列間のアミノ酸変異が保存的であること、中程度で  
 あること、または全く異なるものであること、を示している。

【図4】図4は、配列番号31 (SEQ ID NO:31)、配列番号36 (SEQ ID NO:36)、  
 配列番号37 (SEQ ID NO:37)、および配列番号38 (SEQ ID NO:38)の、並列配列  
 比較を示している。「\*」は、所与の配列位置において全ての配列間で完全に相同である  
 ことを示しており、一方、「:」、「.」、空白は、それぞれ、所与の配列位置における  
 配列間のアミノ酸変異が保存的であること、中程度であること、または全く異なるもので  
 あること、を示している。

【図5】図5は、N = 3のイヌに、0.2 mg / kgの配列番号36 (SEQ ID NO:36)  
 のホモ二量体を0日目に静脈内投与した場合の、0日目から7日目までの、平均空腹時血  
 糖値%を示している。

【図6】図6は、N = 6のイヌに、0.33 mg / kgの配列番号36 (SEQ ID NO:36)  
 )のホモ二量体を0日目に皮下投与した場合の、0日目から7日目までの、平均空腹時血  
 糖値%を示している。

【図7】図7は、N = 3のイヌに、配列番号36 (SEQ ID NO:36)のホモ二量体を0日  
 目(0.30 mg / kg)、28日目(0.33 mg / kg)、35日目(0.33 mg  
 / kg)、42日目(0.50 mg / kg)、49日目(1.00 mg / kg)、および  
 56日目(1.00 mg / kg)に皮下投与した場合の、平均抗薬物抗体価( $\mu$ g / mL  
 )を示している。

【図8】図8は、配列番号39 (SEQ ID NO:39)、配列番号40 (SEQ ID NO:40)、  
 配列番号41 (SEQ ID NO:41)、および配列番号42 (SEQ ID NO:42)の、並列配列  
 比較を示している。「\*」は、所与の配列位置において全ての配列間で完全に相同である  
 ことを示しており、一方、「:」、「.」、空白は、それぞれ、所与の配列位置における

配列間のアミノ酸変異が保存的であること、中程度であること、または全く異なるものであること、を示している。

【図 9】図 9 は、N = 1 のイヌに、配列番号 4 2 (SEQ ID NO:42) のホモ二量体を 0 日目 (0.33 mg / kg)、7 日目 (0.50 mg / kg)、14 日目 (0.50 mg / kg)、および 21 日目 (0.50 mg / kg) に皮下投与した場合の、平均抗薬物抗体価 (μg / mL) を示している。

【図 10】図 10 は、N = 1 のイヌに、配列番号 4 3 (SEQ ID NO:43) のホモ二量体を 0 日目 (0.33 mg / kg) および 14 日目 (0.16 mg / kg) に皮下投与した場合の、平均抗薬物抗体価 (μg / mL) を示している。

【図 11】図 11 は、N = 2 のイヌに、0.33 mg / kg の配列番号 4 3 (SEQ ID NO:43) のホモ二量体を 0 日目に皮下投与した場合の、0 日目から 7 日目までの、平均空腹時血糖値 % を示している。

【図 12】図 12 は、配列番号 4 3 (SEQ ID NO:43)、配列番号 4 4 (SEQ ID NO:44)、配列番号 4 5 (SEQ ID NO:45)、配列番号 4 6 (SEQ ID NO:46)、配列番号 4 7 (SEQ ID NO:47)、および配列番号 4 8 (SEQ ID NO:48) の、並列配列比較を示している。「\*」は、所与の配列位置において全ての配列間で完全に相同であることを示しており、一方、「:」、「.」、空白は、それぞれ、所与の配列位置における配列間のアミノ酸変異が保存的であること、中程度であること、または全く異なるものであること、を示している。

【図 13】図 13 は、配列番号 4 3 (SEQ ID NO:43)、配列番号 4 9 (SEQ ID NO:49)、配列番号 5 0 (SEQ ID NO:50)、配列番号 5 1 (SEQ ID NO:51)、および配列番号 5 2 (SEQ ID NO:52) の、並列配列比較を示している。「\*」は、所与の配列位置において全ての配列間で完全に相同であることを示しており、一方、「:」、「.」、空白は、それぞれ、所与の配列位置における配列間のアミノ酸変異が保存的であること、中程度であること、または全く異なるものであること、を示している。

【図 14】図 14 は、配列番号 4 3 (SEQ ID NO:43)、配列番号 4 8 (SEQ ID NO:48)、および配列番号 5 3 (SEQ ID NO:53) の、並列配列比較を示している。「\*」は、所与の配列位置において全ての配列間で完全に相同であることを示しており、一方、「:」、「.」、空白は、それぞれ、所与の配列位置における配列間のアミノ酸変異が保存的であること、中程度であること、または全く異なるものであること、を示している。

【図 15】図 15 は、配列番号 4 3 (SEQ ID NO:43)、配列番号 5 1 (SEQ ID NO:51)、配列番号 5 2 (SEQ ID NO:52)、および配列番号 5 4 (SEQ ID NO:54) の、並列配列比較を示している。「\*」は、所与の配列位置において全ての配列間で完全に相同であることを示しており、一方、「:」、「.」、空白は、それぞれ、所与の配列位置における配列間のアミノ酸変異が保存的であること、中程度であること、または全く異なるものであること、を示している。

【図 16】図 16 は、配列番号 2 6 (SEQ ID NO:26)、配列番号 2 8 (SEQ ID NO:28)、配列番号 4 3 (SEQ ID NO:43)、配列番号 5 5 (SEQ ID NO:55)、配列番号 5 6 (SEQ ID NO:56)、および配列番号 5 7 (SEQ ID NO:57) の、並列配列比較を示している。「\*」は、所与の配列位置において全ての配列間で完全に相同であることを示しており、一方、「:」、「.」、空白は、それぞれ、所与の配列位置における配列間のアミノ酸変異が保存的であること、中程度であること、または全く異なるものであること、を示している。

【図 17】図 17 は、N = 1 のイヌに、0.16 mg / kg の配列番号 2 8 (SEQ ID NO:28) のホモ二量体を 0 日目に皮下投与した場合の、0 日目から 7 日目までの、空腹時血糖値 % を示している。

【図 18】図 18 は、N = 1 のイヌに、配列番号 2 8 (SEQ ID NO:28) のホモ二量体を 0 日目 (0.16 mg / kg)、14 日目 (0.16 mg / kg)、28 日目 (0.16 mg / kg)、および 42 日目 (0.16 mg / kg) に皮下投与した場合の、抗薬物抗体価 (μg / mL) を示している。

10

20

30

40

50

【図19】図19は、N = 1のイヌに、0.33 mg / kgの配列番号26 (SEQ ID NO:26) のホモ二量体を0日目に皮下投与した場合の、0日目から7日目までの、空腹時血糖値%を示している。

【図20】図20は、N = 1のイヌに、配列番号26 (SEQ ID NO:26) のホモ二量体を0日目 (0.33 mg / kg)、15日目 (0.16 mg / kg)、31日目 (0.16 mg / kg)、および45日目 (0.15 mg / kg) に皮下投与した場合の、0日目から60日目までの、空腹時血糖値%を示している。

【図21】図21は、N = 1のイヌに、配列番号26 (SEQ ID NO:26) のホモ二量体を0日目 (0.33 mg / kg)、15日目 (0.16 mg / kg)、31日目 (0.16 mg / kg)、および45日目 (0.15 mg / kg) に皮下投与した場合の、抗薬物抗体価 (μg / mL) を示している。

10

【図22】図22は、N = 1のイヌに、0.16 mg / kgの配列番号58 (SEQ ID NO:58) のホモ二量体を0日目に皮下投与した場合の、0日目から7日目までの、空腹時血糖値%を示している。

【図23】図23は、N = 1のイヌに、0.16 mg / kgの配列番号59 (SEQ ID NO:59) のホモ二量体を0日目に皮下投与した場合の、0日目から7日目までの、空腹時血糖値%を示している。

【図24】図24は、配列番号61 (SEQ ID NO:61) および配列番号62 (SEQ ID NO:62) の、並列配列比較を示している。「\*」は、所与の配列位置において全ての配列間で完全に相同であることを示しており、一方、「:」、「.」、空白は、それぞれ、所与の配列位置における配列間のアミノ酸変異が保存的であること、中程度であること、または全く異なるものであること、を示している。

20

【図25】図25は、N = 1のイヌに、0.16 mg / kgの配列番号61 (SEQ ID NO:61) のホモ二量体を0日目に皮下投与した場合の、0日目から7日目までの、空腹時血糖値%、および、N = 1のイヌに、0.16 mg / kgの配列番号62 (SEQ ID NO:62) のホモ二量体を0日目に皮下投与した場合の、0日目から7日目までの、空腹時血糖値%を示している。

【図26】図26は、N = 1のイヌに配列番号30 (SEQ ID NO:30) のホモ二量体を皮下投与した場合の0日目から7日目までの空腹時血糖値%を、当該イヌが餌を与えられた時間と共に、示している。

30

【図27】図27は、配列番号76 (SEQ ID NO:76)、配列番号91 (SEQ ID NO:91)、および配列番号78 (SEQ ID NO:78) の、並列配列比較を示している。「\*」は、所与の配列位置において全ての配列間で完全に相同であることを示しており、一方、「:」、「.」、空白は、それぞれ、所与の配列位置における配列間のアミノ酸変異が保存的であること、中程度であること、または全く異なるものであること、を示している。

【図28】図28は、配列番号75 (SEQ ID NO:75)、配列番号76 (SEQ ID NO:76)、配列番号91 (SEQ ID NO:91)、配列番号92 (SEQ ID NO:92)、配列番号93 (SEQ ID NO:93)、配列番号94 (SEQ ID NO:94)、および配列番号95 (SEQ ID NO:95) の、並列配列比較を示している。「\*」は、所与の配列位置において全ての配列間で完全に相同であることを示しており、一方、「:」、「.」、空白は、それぞれ、所与の配列位置における配列間のアミノ酸変異が保存的であること、中程度であること、または全く異なるものであること、を示している。

40

【図29】図29は、配列番号76 (SEQ ID NO:76)、配列番号78 (SEQ ID NO:78)、配列番号80 (SEQ ID NO:80)、配列番号82 (SEQ ID NO:82)、配列番号84 (SEQ ID NO:84)、および配列番号86 (SEQ ID NO:86) の、並列配列比較を示している。「\*」は、所与の配列位置において全ての配列間で完全に相同であることを示しており、一方、「:」、「.」、空白は、それぞれ、所与の配列位置における配列間のアミノ酸変異が保存的であること、中程度であること、または全く異なるものであること、を示している。

【図30】図30は、配列番号87 (SEQ ID NO:87)、配列番号96 (SEQ ID NO:96)

50

)、配列番号 78 (SEQ ID NO:78)、配列番号 97 (SEQ ID NO:97)、配列番号 89 (SEQ ID NO:89)、および配列番号 98 (SEQ ID NO:98) の、並列配列比較を示している。「\*」は、所与の配列位置において全ての配列間で完全に相同であることを示しており、一方、「:」、「.」、空白は、それぞれ、所与の配列位置における配列間のアミノ酸変異が保存的であること、中程度であること、または全く異なるものであること、を示している。

【図 3 1】図 3 1 は、融合タンパク質のリーダー配列を含む完全なアミノ酸配列 (配列番号 78 (SEQ ID NO:78)) と、その対応する核酸配列 (配列番号 79 (SEQ ID NO:79)) を示している。

【図 3 2】図 3 2 は、融合タンパク質のリーダー配列を含む完全なアミノ酸配列 (配列番号 80 (SEQ ID NO:80)) と、その対応する核酸配列 (配列番号 81 (SEQ ID NO:81)) を示している。

10

【図 3 3】図 3 3 は、融合タンパク質のリーダー配列を含む完全なアミノ酸配列 (配列番号 82 (SEQ ID NO:82)) と、その対応する核酸配列 (配列番号 83 (SEQ ID NO:83)) を示している。

【図 3 4】図 3 4 は、融合タンパク質のリーダー配列を含む完全なアミノ酸配列 (配列番号 84 (SEQ ID NO:84)) と、その対応する核酸配列 (配列番号 85 (SEQ ID NO:85)) を示している。

【図 3 5】図 3 5 は、融合タンパク質のリーダー配列を含む完全なアミノ酸配列 (配列番号 87 (SEQ ID NO:87)) と、その対応する核酸配列 (配列番号 88 (SEQ ID NO:88)) を示している。

20

【図 3 6】図 3 6 は、融合タンパク質のリーダー配列を含む完全なアミノ酸配列 (配列番号 89 (SEQ ID NO:89)) と、その対応する核酸配列 (配列番号 90 (SEQ ID NO:90)) を示している。

【図 3 7】図 3 7 は、融合タンパク質のリーダー配列を含む完全なアミノ酸配列 (配列番号 86 (SEQ ID NO:86)) と、その対応する核酸配列 (配列番号 100 (SEQ ID NO:100)) を示している。

【図 3 8】図 3 8 は、N = 12 の B a l b / c マウスを、1 時間絶食させた後、配列番号 87 (SEQ ID NO:87) のホモ二量体または配列番号 89 (SEQ ID NO:89) のホモ二量体を、300  $\mu$ g / kg の投与量で皮下注射した場合の、0 時間目から 10 時間目までの平均空腹時血糖値 % を示している。

30

【発明を実施するための形態】

【0028】

インスリン治療は、必要な投与回数が少ないほど (例えば、週 1 回の注射)、患者にとっての負担が少なくなり、コンプライアンスの改善、グルコースコントロールの改善、そして最終的には長期健康アウトカムの改善に繋がる。本明細書に開示されるように、ヒト臨床用に提唱された超長時間作用型インスリン治療は、インビボでの作用を延長するためにヒト F c フラグメントを利用するインスリン - F c 融合タンパク質を含んでいる。糖尿病の超長時間作用型治療に適したインスリン - F c 融合タンパク質は、様々な設計目標を満たす必要がある。糖尿病の超長期作用型治療に適したインスリン - F c 融合タンパク質は、哺乳類細胞、例えばヒト胎児由来腎臓 (HEK、例えば HEK 293) 細胞で、所望のホモ二量体生成物が許容できる力価 (例えば、一過性にトランスフェクトされた HEK 細胞から 50 mg / L を超えるホモ二量体力価、HEK 細胞から一過性にトランスフェクトされた 75 mg / L を超えるホモ二量体力価、一過性にトランスフェクトされた HEK 細胞から 100 mg / L を超えるホモ二量体力価、一過性にトランスフェクトされた HEK 細胞から 150 mg / L を超えるホモ二量体力価など) を有して、製造可能であることが望ましい。ホモ二量体力価が 150 mg / L を超えるヒトインスリン - F c 融合タンパク質の構成のみを、本発明では有用と見なしているが、これは、一過性にトランスフェクトされた HEK 細胞におけるこのレベル未満のホモ二量体力価では、比較的コモディティ化したヒトインスリン市場の低製造コスト要件を満たす安定にトランスフェクトされたチ

40

50

ヤイニースハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞における商業生産ホモ二量体力価が得られにくいことが、経験的に分かっているからである。

【 0 0 2 9 】

さらに、インスリン - F c 融合タンパク質は、4 での I M - 9 I R 結合アッセイで測定した場合に、かなりの親和性（例えば、5 0 0 0 n M 未満の I C 5 0、4 0 0 0 n M 未満の I C 5 0、3 0 0 0 n M 未満の I C 5 0、2 4 0 0 n M 未満の I C 5 0、より好ましくは 2 0 0 0 n M 未満 I C 5 0 など）で I R と結合する必要がある。経験に基づいて、I R 活性 I C 5 0 値が 5 0 0 0 n M 未満の分子のみを、必要な生物活性を示す可能性があるものと見なしている。好ましい実施形態において、インスリン - F c 融合タンパク質は、2 4 0 0 n M 未満の I R 活性 I C 5 0 値、より好ましくは 2 0 0 0 n M 未満の I R 活性 I C 5 0 値を示す。インスリン - F c 融合タンパク質の構成はまた、投与頻度を少なくすることを妥当なものとするために、インピボで持続的な生物活性（例えば、約 2 時間超、約 6 時間超、約 9 時間超、約 1 2 時間超、約 1 8 時間超、約 1 日超、約 1 . 5 日超、約 2 日超、約 2 . 5 日超、約 3 日超、約 4 日超、約 5 日超、約 6 日超、約 7 日超、またはそれ以上のグルコース低減活性を示す）を示す必要もある。インスリン - F c 融合タンパク質の構成はまた、インピボにおける系滞留時間の延長（例えば、血清半減期は 3 日超、またはそれ以上でなければならない）も示す必要がある。所与のインスリン - F c 融合タンパク質の持続的な生物活性および滞留時間の延長は、抗体および F c 融合タンパク質のインピボ排出半減期の延長に關与する、F c R n 受容体との結合能によって予測することができる。F c R n 受容体活性は、典型的には、マイクロプレートリーダーで測定される O D 4 5 0 n m の値を用いたアッセイ（例えば、酵素結合免疫吸着測定法（E L I S A）アッセイ）で測定される、インスリン - F c 融合タンパク質にその最大結合の半分に到達させるインスリン - F c 融合タンパク質の濃度（すなわち、E C 5 0 値）によって評価される。経験に基づいて、1 5 0 0 n g / m L 以下（より好ましくは 1 0 0 0 n g / m L 未満）のヒト F c R n 受容体 E C 5 0 値を示すインスリン - F c 融合タンパク質の構成は、週 1 回の投与を妥当なものとするのに十分に長い半減期を示す可能性が最も高い。

【 0 0 3 0 】

最後に、糖尿病などの慢性疾患の治療に有用であるためには、インスリン - F c 融合タンパク質の構成は、抗薬物抗体、特に反復投与後の上記分子の生物活性を中和する抗体の産生を誘導するものであってはならない。所与のインスリン - F c 融合タンパク質の構成が有害な免疫原性反応を誘発する傾向は、まず、オプソニン化された分子のファゴサイトーシス、炎症メディエーターの放出、抗体依存性細胞傷害を含む多くの免疫系エフェクター機能で重要な役割を担っている、F c R I 受容体と結合する能力によって予測することができる。F c R I 受容体活性は、通常、インスリン - F c 融合タンパク質を所与の濃度とした酵素結合免疫吸着測定法（E L I S A）アッセイにおいて、マイクロプレートリーダーで得られる 4 5 0 n m の波長における吸光度（O D 4 5 0）の値によって評価される。経験に基づいて、ビオチン化 F c R I 濃度を 3 0 0 0 n g / m L としたヒト F c R I 受容体アッセイにおける O D 4 5 0 比（ここで、比のための参照インスリン - F c 融合タンパク質の構成は配列番号 7 6）が 0 . 5 0 以下を示すインスリン - F c 融合タンパク質の構成は、週 1 回の反復投与を妥当なものとするのに十分に低い免疫原性を示す可能性がある。有害な免疫原性反応を誘導する所与のインスリン - F c 融合タンパク質の構成の傾向は、結合した分子を貪食細胞に除去させる補体カスケードを活性化し、炎症によりさらなる食細胞を引き付け、細胞殺害膜攻撃複合体を活性化する、補体成分 1 q（C 1 q）との結合能によっても予測することができる。C 1 q 活性は、通常、マイクロプレート上にコートされるインスリン - F c 融合タンパク質の構成を所与の濃度とした酵素結合免疫吸着測定法（E L I S A）アッセイにおいて、マイクロプレートリーダーで得られる O D 4 5 0 値によって評価される。経験に基づいて、ビオチン化 C 1 q 濃度を 1 0 0 0 n g / m L としたヒト C 1 q 受容体アッセイにおける O D 4 5 0 比（ここで、比のための参照インスリン - F c 融合タンパク質の構成は配列番号 7 6）が 0 . 3 5 以下を示すインスリン - F c 融合タンパク質の構成は、週 1 回の反復投与を妥当なものとするのに十分に低

10

20

30

40

50

い免疫原性を示す可能性がある。

【 0 0 3 1 】

ヒト臨床用に提唱された超長時間作用型インスリン治療は、インビボでの作用を延長するためにヒトFcフラグメントを利用するインスリン-Fc融合タンパク質を含んでいる。様々な設計のインスリン-Fc融合タンパク質の構成の挙動を理解するために、まず、イヌ用の超長時間作用型インスリンとして有用なインスリン-Fc融合タンパク質の構成を検討した。ヒトFcフラグメントは、イヌにおいては免疫原性であることで、抗薬物抗体の産生を誘導できると予想されるため、ヒトFcフラグメントをイヌFcフラグメントに置き換えた。

【 0 0 3 2 】

しかし、予想外にも、インスリン-Fc融合タンパク質の構成でヒトFcフラグメントと任意のイヌFcフラグメントとを単純に交換しても、許容できるホモ二量体力価（例えば、50mg/Lを超えるホモ二量体力価）や、十分に高いNAOC値（例えば、150%FBGL・日・kg/mgを超えるNAOC）を有する生成物を、必ずしも得られないことが分かった。例えば、場合によっては、Fcフラグメントが特定のアイソタイプ（例えば、イヌIgG B）である場合のみ、設計目標を満たすのに十分に高いホモ二量体力価（例えば、50mg/Lを超えるイヌインスリン-Fc融合タンパク質のホモ二量体力価）および許容できる高いNAOC値（例えば、150%FBGL・日・kg/mgを超えるNAOC）を有するインスリン-Fc融合タンパク質の構成が得られた。他の場合では、インスリン-Fc融合タンパク質の構成のインスリンポリペプチドの特定のアミノ酸が、標的種において免疫原性であることにより部位特異的変異を必要とすることが分かり、許容できるほど高いNAOC値（例えば、150%FBGL・日・kg/mgを超えるNAOC値）および0.50を超える3回目の週1回皮下投与後のNAOCR値を有し、標的種において非免疫原性であり且つ生物活性を示す、インスリン-Fc融合タンパク質の構成は比較的少数であることが分かった。

【 0 0 3 3 】

さらなる場合で、Fcフラグメントを、グリコシル化を防止するために変異させ、それによってインスリン-Fc融合タンパク質の構成の免疫原性をさらに低減させた場合、予想外にも、Fcフラグメントの特定のアミノ酸変異のみが、所望のホモ二量体力価（例えば、50mg/Lを超えるイヌインスリン-Fc融合タンパク質の構成のホモ二量体力価）およびNAOC値（例えば、150%FBGL・日・kg/mgを超えるNAOC値）をもたらすことが見出された。さらに、インスリン-Fc融合タンパク質の構成のインスリン成分を追加で変異させることが、所望のホモ二量体力価（例えば、50mg/Lを超えるイヌインスリン-Fc融合タンパク質の構成のホモ二量体力価）およびNAOC値（例えば、150%FBGL・日・kg/mgを超えるNAOC値）を有しながら、0.50を超える3回目の週1回皮下投与後のNAOCR値も達成する、Fc変異型非グリコシル化インスリンFc融合タンパク質の構成を製造するために必要であることが見出された。

【 0 0 3 4 】

ヒト超長時間作用型インスリンにおいては、ホモ二量体力価を最大化し製造コストを削減するため、ヒトIgG分子の異なるアイソタイプ（例えば、IgG1とIgG2）をベースとするFcフラグメントを含むインスリン-Fc融合タンパク質の構成が製造された。かなり予想外なことであるが、インスリン-Fc融合タンパク質の構成において、IgG2分子ベースのFcフラグメントからIgG1分子ベースのFcフラグメントに切り替えると、IR結合活性またはFcRn結合活性を著しく損なうことなく、平均ホモ二量体力価が50%以上増加することが、見出された。しかし、得られたIgG1由来インスリン-Fc融合タンパク質の構成は、ビオチン化FcRI濃度を3000ng/mLとしたヒトFcRI受容体アッセイにおけるOD450比（ここで、比のための参照インスリン-Fc融合タンパク質の構成は配列番号76）が0.50よりもかなり大きく、ビオチン化C1q濃度を1000ng/mLとしたヒトC1q受容体アッセイにおけるOD450比（ここで、比のための参照インスリン-Fc融合タンパク質の構成は配列番号76

10

20

30

40

50

）が0.35よりもかなり大きかったことから、免疫系と不利益に相互作用し中和抗体を発生する可能性がかなり高いと判断された。

#### 【0035】

望ましくない免疫原性を低減する試みとして、インスリン-Fc融合タンパク質の構成に、宿主細胞内での合成時にFcフラグメントのグリコシル化を妨げるための変異を導入した。具体的には、インスリン-Fc融合タンパク質ホモ二量体の収量改善を維持しながら、FcRI相互作用とC1q相互作用を低減するために、IgG1Fc領域の重鎖のCH2ドメインに保存されているアスパラギン(N)-グリコシル化部位を異なるアミノ酸(例えば、S、D、A、R、およびQ)に変異させた。興味深いことに、S、D、A、およびR変異型の非グリコシル化インスリン-Fc融合タンパク質の構成は、グリコシル化された親構成と比較してホモ二量体力価が改善された。しかし、保存アスパラギン(N)-グリコシル化部位にQ変異を有するインスリン-Fc融合タンパク質の構成のホモ二量体力価は、低過ぎて(すなわち、ヒトインスリン-Fc融合タンパク質の構成の設計目標である150mg/L未満)、低製造コスト要件を支持することができなかった。さらに、FcRI結合およびC1q結合は、S、D、A、およびR変異型の非グリコシル化インスリン-Fc融合タンパク質の構成において顕著に低減した。しかし、これらのインスリン-Fc融合タンパク質の構成では、収量および免疫原性の改善が、グリコシル化した親構成と比較して、予想外に低いFcRn結合親和性と著しく低いIR結合によって相殺され、インビボでの生物活性と滞留時間において許容できない低減が示された。

#### 【0036】

イヌ由来Fcフラグメントを含むインスリン-Fc融合タンパク質の構成で予想外に発見されたことのように、ヒトインスリン-Fc融合タンパク質の構成におけるインスリン配列の1つのアミノ酸を変更することで、S、D、A、およびR変異型の非グリコシル化インスリン-Fc融合タンパク質の構成の収量および免疫原性の改善を維持または改善しつつ、IR結合親和性およびFcRn結合親和性を、元のグリコシル化した親構成と比較して減少させるのではなく、増加させる(例えば、IRアッセイにおけるIC50値が低くなった)ことが見出された。このことから、得られたグリコシル化されていない変異型インスリン-Fc融合タンパク質の構成は、許容できるインビボグルコース低減能と滞留時間の延長を示すと予想される。予想外なことに、非グリコシル化インスリン-Fc融合タンパク質の構成の同じアミノ酸を、保存されたアスパラギン(N)-グリコシル化部位のQ変異で変更したところ、既に不十分であったホモ二量体力価が著しく減少する結果となった。

#### 【0037】

S、D、A、およびR変異型の非グリコシル化インスリン-Fc融合タンパク質の特性をさらに操作できる方法を理解するため、インスリンポリペプチドとFcフラグメントを繋ぐ、インスリン-Fc融合タンパク質の構成のリンカー領域に改変を加えた。試験の結果、リンカーがない場合、得られたイヌインスリン-Fc融合タンパク質の構成のホモ二量体力価は許容できないほどに低い(すなわち、50mg/L未満)ことが示された。同じ長さのリンカーを含むインスリン-Fc融合タンパク質の構成の場合、インスリン-Fc融合タンパク質の構成のホモ二量体力価、IR受容体結合およびFcRn受容体結合、並びにFcRI結合およびC1q結合の観点から、特定のアミノ酸配列が他のものより好ましいことが見出された。

#### 【0038】

そこで、本明細書では、変異型インスリンポリペプチドと、非グリコシル化Fcフラグメントと、変異型インスリンポリペプチドと非グリコシル化Fcフラグメントとの間のリンカーと、を含み、許容できる高いホモ二量体力価(例えば、150mg/Lを超えるホモ二量体力価)、IRアッセイにおけるIC50値(例えば、5000nM未満、2400nM未満、より好ましくは2000nM未満のIC50)、ヒトFcRn受容体のEC50値(例えば、1500ng/L以下、より好ましくは1000ng/mL未満のEC50)、ヒトFcRI受容体のOD450比(例えば、ビオチン化FcRI受容体濃

10

20

30

40

50

度 3 0 0 0 n g / m L における O D 4 5 0 比が 0 . 5 0 以下。ここで、比のための参照インスリン - F c 融合タンパク質の構成は配列番号 7 6 )、および、ヒト C 1 q 受容体の O D 4 5 0 比 (例えば、ビオチン化 C 1 q 濃度 1 0 0 0 n g / m L における O D 4 5 0 比が 0 . 3 5 以下。ここで、比のための参照インスリン - F c 融合タンパク質の構成は配列番号 7 6 ) の各設計目標を達成する、特定の、製造性の高い、高純度の、長時間作用性の、生物活性を示す、非免疫原性のインスリン - F c 融合タンパク質の構成が、提供される。これらの例示的なインスリン - F c 融合タンパク質の構成は、週 1 回反復投与を妥当なものとし、糖尿病の治療に好適なものとする、十分に低い免疫原性 十分に長い半減期を示すことが期待される。

【 0 0 3 9 】

定義

本明細書で使用される場合、冠詞「 a 」および「 an 」は、その冠詞の文法上の目的語が 1 つであること、または 2 つ以上であることを指し、例えば、少なくとも 1 つであることを指す。本明細書において「含む ( c o m p r i s i n g ) 」という用語と共に使用された場合での、「 a 」または「 an 」という語の使用は、「 1 つ」を意味する場合もあるが、「 1 つまたは複数」、「少なくとも 1 つ」、および「 1 つまたは 2 つ以上」という意味とも合致する。

【 0 0 4 0 】

本明細書で使用される場合、「約」および「およそ」は、通常、測定の性質または精度を考慮に入れた、測定量に対する許容可能な誤差の程度を意味する。例示的な誤差の程度としては、所与の値の範囲の、 2 0 パーセント ( % ) 以内、典型的には 1 0 % 以内、さらに典型的には 5 % 以内である。

【 0 0 4 1 】

本明細書で使用される場合、障害 (例えば、本明細書に記載の障害) を治療するのに有効な分子、化合物、複合体、または物質の量、「治療有効量」または「有効量」とは、対象に単回または複数回投与を行う際、対象の治療において、または障害 (例えば、本明細書に記載の障害) を有する対象の治癒、緩和、軽減、もしくは改善において、そのような治療を行わない場合に予想されるよりも有効である、当該分子、化合物、複合体、または物質の量を指す。

【 0 0 4 2 】

本明細書で使用される場合、用語「アナログ」とは、別の化合物または複合体の化学構造と類似しているが、少なくとも 1 つの側面においてそれとは異なっている、化学構造を有する化合物または複合体 (例えば、本明細書に記載の化合物または複合体、例えば、インスリン) を指す。

【 0 0 4 3 】

本明細書で使用される場合、用語「抗体」または「抗体分子」とは、免疫グロブリン分子 ( I g )、免疫グロブリン ( I g ) 分子の免疫学的活性を有する部分、すなわち、抗原と特異的に結合する、例えば免疫反応する、抗原結合部位を含む分子、を指す。本明細書で使用される場合、用語「抗体ドメイン」とは、免疫グロブリンの可変領域または定常領域を指す。本明細書で使用される場合、用語「抗体ドメイン」とは、免疫グロブリンの可変領域または定常領域を指す。当該技術分野では、抗体は、哺乳類 (例えば、ヒト) の場合は I g A、I g M、または I g G などのいくつかのクラスを含むと記述されている。免疫グロブリンの各クラスは、さらに、イヌの場合は I g G A、I g G B、I g G C、および I g G D、ヒトの場合は I g G 1、I g G 2、I g G 3、および I g G 4 のように、種々のアイソタイプに分類できる。与の免疫グロブリンクラスの各免疫グロブリンアイソタイプが、互いに異なるアミノ酸配列、構造、および機能特性を含む (例えば、F c 受容体に対する異なる結合親和性) ことは、当業者が認めるところである。「特異的に結合する」または「免疫反応する」は、抗体が、所望の抗原の 1 または複数の抗原決定基と反応し、他のポリペプチドに対してはより低い親和性を示す、例えば、他のポリペプチドとは反応しない、ことを意味する。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 4 4 】

本明細書で使用される場合、用語「曲線下面積」または「AUC」とは、所与の投与量のインスリン - Fc融合タンパク質を投与した後の対象における、時間に対する%FBGL（空腹時血糖値）の曲線の下側の積分面積を指す。本明細書で使用される場合、用語「曲線上面積」または「AOC」は、インスリン - Fc融合タンパク質の生物学的効力の尺度として用いられ、AOCは、時間に対する%FBGLの曲線の下側の可能な総面積とAUC値との間の差に等しい。本明細書で使用される場合、「正規化曲線上面積」、「正規化AOC」、または「NAOC」は、AOC値を、投与されたインスリン - Fc融合タンパク質の実際の投与量で割ったものである。本明細書で使用される場合、用語「正規化AOC比」または「NAOCR」は、一連の投与における、最初のインスリン - Fc融合タンパク質投与から得られたNAOCに対する、特定のインスリン - Fc融合タンパク質投与から得られたNAOCの比である。そのため、NAOCRは、反復投与後のインスリン - Fc融合タンパク質の生物活性における変化の尺度となる。

10

## 【 0 0 4 5 】

本明細書で使用される場合、用語「生物活性」、「活性」、「生物活性」、「効力」、「生物活性効力」、または「生物学的効力」とは、インスリン - Fc融合タンパク質が、IRを活性化し、且つ/または、標的対象において血糖値の低減を及ぼす、程度を指す。本明細書で使用される場合、「インビトロ活性」または「IR活性」とは、インスリン - Fc融合タンパク質がIRに結合する際の親和性を指し、典型的には、競合的結合アッセイにおいてインスリン - Fc融合タンパク質がインスリン参照標準の半分のIRから押しのける濃度（すなわち、IC50）によって評価される。本明細書で使用される場合、「インビボ活性」とは、インスリン - Fc融合タンパク質投与後の標的対象の空腹時血糖値における低減の程度および持続時間を指す。

20

## 【 0 0 4 6 】

本明細書で使用される場合、用語「生合成」、「組換え合成」、または「組換え製造」は、インスリン - Fc融合タンパク質をコードする核酸分子（例えば、ベクター）（例えば、インスリン - Fc融合タンパク質全体が単一の核酸分子によってコードされる場合）で細胞をトランスフェクトすることによって、インスリン - Fc融合タンパク質を宿主細胞内で発現させるプロセスを指す。例示的な宿主細胞としては、哺乳類細胞、例えば、HEK293細胞またはCHO細胞が挙げられる。細胞は、当技術分野において標準的な方法を用いて培養することができ、発現されたインスリン - Fc融合タンパク質は、当技術分野において標準的な方法を用いて細胞培養物から採取および精製してもよい。

30

## 【 0 0 4 7 】

本明細書で使用される場合、「細胞表面受容体」という用語は、一般に細胞の膜の外表面に存在し、可溶性分子、例えば血液供給中を循環する分子と相互作用する、タンパク質などの分子を指す。いくつかの実施形態において、細胞表面受容体は、ホルモン受容体（例えば、インスリンホルモン受容体またはインスリン受容体（IR））、または抗体のFcフラグメントもしくはFc領域に結合するFc受容体（例えば、Fc受容体、例えばFcRI、または胎児性Fc受容体、例えばFcRn）を含む場合がある。本明細書で使用される場合、「インビトロ活性」または「Fc受容体活性」または「Fc受容体結合」または「FcRn受容体活性」または「FcRn結合」は、インスリン - Fc融合タンパク質がFc受容体（例えば、Fc受容体またはFcRn受容体）に結合する親和性を指し、典型的には、マイクロプレートリーダーで測定されるOD450nm値を用いたアッセイ（例えば、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）アッセイ）で測定される、インスリン - Fc融合タンパク質にその最大結合の半分に到達させる濃度（すなわち、EC50値）によって評価される。あるいは、インスリン - Fc融合タンパク質がFc受容体（例えば、Fc受容体またはFcRn受容体）に結合する親和性は、インスリン - Fc融合タンパク質を所与の濃度とした、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）アッセイにおいて、マイクロプレートリーダーで得られたOD450nm値によって評価される。

40

## 【 0 0 4 8 】

50

本明細書で使用される場合、「C 1 q」または「補体成分 1 q」という用語は、自然免疫系の一部である、補体系に關与するタンパク質複合体を意味する。C 1 q は、C 1 r および C 1 s と一緒に、C 1 複合体を形成する。C 1 q は、T 細胞や B 細胞に対する樹状細胞による特異的な抗原提示に關与する役割を担っている。

【0049】

本明細書で使用される場合、用語「空腹時血糖値」または「F B G L」は、食物を与えない期間の終わり、且つ、インスリン - F c 融合タンパク質を投与する直前の、標的対象の平均血糖値を指す。本明細書で使用される場合、用語「空腹時血糖値パーセント」、「空腹時血糖値 %」、または「% F B G L」は、空腹時血糖値に対する所与の血糖値の比率に 100 を乗じたものを指す。

10

【0050】

本明細書で使用される場合、用語「免疫原性の」または「免疫原性」は、分子の反復投与後、対象が当該分子と特異的に結合することができる抗体（すなわち、抗薬物抗体）を発現するように、所与の分子（例えば、本発明のインスリン - F c 融合タンパク質）が標的対象の免疫系を誘起する能力を指す。本明細書で使用される場合、用語「中和すること」、「中和抗体」、または「中和抗薬物抗体」は、抗体が標的対象における化合物の生物活性を妨害する能力を指す。本明細書で使用される場合、用語「免疫原性エピトープ」、「免疫原性ホットスポット」、または「ホットスポット」は、抗薬物抗体の中程度または強い結合の原因となる、所与の分子（例えば、本発明のインスリン - F c 融合タンパク質）の変異またはエピトープを指す。

20

【0051】

本明細書で使用される場合、用語「インスリン参照標準」は、(i) 哺乳動物（例えば、イヌ、またはヒト）由来の天然由来のインスリン；(ii) F c フラグメントを含まないインスリンポリペプチド；または、(iii) 標準治療用インスリン（例えば、市販のインスリン）のいずれか 1 つである。

【0052】

本明細書で使用される場合、用語「モノマー」は、単一のポリペプチドから構成されるタンパク質または融合タンパク質を指す。実施形態において、「モノマー」は、タンパク質または融合タンパク質であり、例えば、インスリンポリペプチドと F c フラグメントポリペプチドとを含む単一ポリペプチドであって、当該インスリンおよび当該 F c フラグメントポリペプチドがペプチド結合により結合されることで形成される、単一ポリペプチドである。実施形態において、モノマーは、単一の核酸分子にコードされる。

30

【0053】

本明細書で使用される場合、「N 末端」は、アミノ酸の  $\alpha$ -アミノ基である遊離アミノ基（例えば、第 2 の炭素原子に隣接して位置する 1 つの炭素原子に共有結合している遊離アミノ基であって、この第 2 の炭素原子がこのアミノ酸のカルボニル基の一部となっている）を含むアミノ酸によって開始されるタンパク質またはポリペプチドの始まりを指す。本明細書で使用される場合、「C 末端」は、カルボン酸基を含むアミノ酸で終わっているタンパク質またはポリペプチドの末端を指し、ここでこのカルボン酸基の炭素原子は、このアミノ酸の  $\alpha$ -アミノ基に隣接して位置している。

40

【0054】

本明細書で使用される場合、「OD 450」、「450 nm の光学密度」、および「450 nm の吸光度」は、同義的に使用され、アッセイ、例えばマイクロプレートベースアッセイ、例えば酵素結合免疫吸着測定法、例えば E L I S A アッセイ、において試料を通過した 450 nm の光の吸光度を、マイクロプレートリーダーを用いて読み取ることを指す場合がある。

【0055】

本明細書で使用される場合、特定のアッセイにおいての「OD 450 比」は、特定の時点に実行された第 1 の被験インスリン - F c 融合タンパク質について得られた OD 450 値を、別の時点に実行された第 2 の被験インスリン - F c 融合タンパク質について得られ

50

たOD450値と、比較する方法を指す。OD450比は、第1の被験物質のOD450値を、参照インスリン-Fc融合タンパク質のOD450値で割ることによって得られる。同様に、第二の被験物質のOD450値を、第一の被験物質のOD450比の算出に用いたものと同じ参照インスリン-Fc融合タンパク質のOD450値で割ることによって、第二の被験物質の第二のOD450比を得ることができる。結果として、第1の被験インスリン-Fc融合タンパク質と第2の被験インスリン-Fc融合タンパク質のアッセイ特性を比較することができる。OD450比の算出に用いる参照インスリン-Fc融合タンパク質の構成は、配列番号76である。

#### 【0056】

本明細書で使用される場合、「薬力学」または「PD」は、通常、対象におけるインスリン-Fc融合タンパク質の生物学的効果を指す。具体的には、本明細書において、PDは、インスリン-Fc融合タンパク質の投与後、対象における経時的な空腹時血糖値の低下の指標を指す。

10

#### 【0057】

本明細書で使用される場合、「薬物動態」または「PK」は、通常、吸収、分布、代謝、および排泄の観点での、インスリン-Fc融合タンパク質と対象の体との特徴的な相互作用を指す。具体的には、本明細書において、PKは、インスリン-Fc融合タンパク質を投与した後の所与の時点における、対象の血液または血清中のインスリン-Fc融合タンパク質の濃度を指す。本明細書で使用される場合、「半減期」とは、薬物排泄の一次指数関数的減衰モデルから算出される、対象の血液または血清中のインスリン-Fc融合タンパク質の濃度が元の値の半分に達するまでの時間を指す。「半減期」の値が大きいインスリン-Fc融合タンパク質ほど、標的対象においてより長い作用持続時間を示す。

20

#### 【0058】

本明細書で使用される場合、アミノ酸またはヌクレオチド配列における「配列同一性」、「配列相同性」、「相同性」、または「同一の」という用語は、バリエーションのヌクレオチド配列またはアミノ酸配列の特定の連続するセグメントを、参照配列のヌクレオチド配列またはアミノ酸配列に対してアラインメントして比較したとき、バリエーションおよび参照配列内に同じヌクレオチドまたはアミノ酸残基が存在することを述べている。配列アラインメント法および配列間の同一性を求めるための方法は、当該技術分野において公知であり、類似性のために配列を整理、整列、および比較するクラスタルオメガの使用が挙げられ、このソフトウェアは、各配列位置を強調し、その位置において全配列間で比較し、以下のスコアのうちの1つを割り当てる。「\*」（アステリスク）は、単一の完全に保存された残基を有する配列位置に割り当てられ、「:」（コロン）は、Gonnet PAM 250マトリックスで0.5を超えるスコアを有する、強く類似した特性のグループ間の保存を示し、「.」（ピリオド）は、Gonnet PAM 250マトリックスで0.5以下のスコアを有する弱く類似した特性のグループ間の保存を示し、「-」（ダッシュ）は配列ギャップを示し、ある配列範囲内の特定の比較集合の中に局所的な相同性が存在しないことを意味し、空白「 」は比較配列全体でその特定の位置に配列相同性がほとんど存在しないことを示す。例えば、Ausubelら（編）（1995年）、Current Protocols in Molecular Biology、19章（グリーン・パブリッシング（Greene Publishing）およびワイリー・インターサイエンス（Wiley-Interscience）、ニューヨーク）；および、ALIGNプログラム、Dayhoff、Atlas of Polypeptide Sequence and Structure 5: Suppl. 3（国立生物医学研究財団（National Biomedical Research Foundation）、ワシントンD.C.）を参照されたい。2つのヌクレオチド配列の最適なアラインメントに関して、バリエーションヌクレオチド配列の連続するセグメントは、参照ヌクレオチド配列に対して追加のヌクレオチドまたは削除されたヌクレオチドを有していてもよい。同様に、2つのアミノ酸配列の最適なアラインメントの目的のために、バリエーションアミノ酸配列の連続するセグメントは、参照アミノ酸配列に対して追加のアミノ酸残基または削除されたアミ

30

40

50

ノ酸残基を有していてもよい。いくつかの実施形態において、参照ヌクレオチド配列または参照アミノ酸配列との比較に用いられる連続セグメントは、少なくとも6個、10個、15個、または20個の連続ヌクレオチド、またはアミノ酸残基から構成され、30個、40個、50個、100個、またはそれ以上のヌクレオチドまたはアミノ酸残基であってよい。バリエーションのヌクレオチド配列またはアミノ酸配列にギャップが含まれることに付随する配列同一性の増加の補正は、ギャップペナルティを割り当てることによって行うことができる。配列アライメントの方法は、当技術分野において公知である。

#### 【0059】

実施形態において、2つの配列間のパーセント同一性または「相同性」の決定は、数学的アルゴリズムを使用して達成される。例えば、アミノ酸配列のパーセント同一性は、ギャップ開始ペナルティ12、ギャップ伸長ペナルティ2、B L O S U M行列62を用いるアフィン6ギャップ検索を使用するスミス-ウォーターマン相同性検索アルゴリズムを用いて決定される。スミス-ウォーターマン相同性検索アルゴリズムは、参照によって本明細書に援用される、SmithおよびWaterman (1981)、Adv. Appl. Math.、2巻: pp 482~489で説明されている。実施形態において、ヌクレオチド配列のパーセント同一性は、ギャップ開始ペナルティ25、ギャップ伸長ペナルティ5を用いる、スミス-ウォーターマン相同性検索アルゴリズムを使用して決定される。このような配列同一性の決定は、例えば、タイムロジック社 (Time Logic) のDecipherハードウェアアクセラレータを用いて、実施することができる。

#### 【0060】

本明細書で使用される場合、用語「相同性」は、例えば ストランド、ヘリックス、フォールドなどの共通の構造特性および共通の空間分布の位置を見つけることによって、2つ以上のタンパク質を比較するために使用される。従って、相同なタンパク質構造は、空間的な分析によって定義される。構造相同性の測定には、空間の幾何学的トポロジック的特徴を計算することが必要である。タンパク質の3次元構造を生成・解析するのに用いられる1つの手法として、3次元の類似性が2次元の類似性を反映しているという事実に基づいて類似配列を見つけ出す、ホモロジーモデリング (比較モデリング、知識ベースモデリングとも呼ばれる) がある。相同構造は、配列の類似性を必須条件とはしていない。

#### 【0061】

本明細書で使用される場合、用語「対象」および「患者」は、疾患または障害、例えば、糖尿病または本明細書に記載の別の疾患または障害、を有する犬科動物およびヒト、または正常な対象を含むことを意図している。

#### 【0062】

本明細書で使用される場合、用語「力価」または「収量」は、細胞培養物の体積当たりの生合成 (例えば、哺乳動物細胞、例えば、HEK293細胞またはCHO細胞における生合成) から生じる融合タンパク質生成物 (例えば、本明細書に記載のインスリン-Fc融合タンパク質) の量を指す。生成物の量は、生産プロセスの任意の工程 (例えば、精製の前または後) で求めることができるが、収量または力価は、常に、元の細胞培養物の体積当たりで記載される。本明細書で使用される場合、用語「生成物収量」または「総タンパク質収量」は、細胞によって発現され、少なくとも1つのアフィニティークロマトグラフィー工程 (例えば、プロテインAまたはプロテインG) を介して精製されたインスリン-Fc融合タンパク質の総量を指し、インスリン-Fc融合タンパク質の単量体、インスリン-Fc融合タンパク質のホモ二量体、およびインスリン-Fc融合タンパク質のホモ二量体の高次分子凝集体を含む。本明細書で使用される場合、用語「パーセントホモ二量体」または「ホモ二量体率」は、所望のホモ二量体である融合タンパク質生成物 (例えば、本明細書に記載のインスリン-Fc融合タンパク質) の割合を指す。本明細書で使用される場合、用語「ホモ二量体力価」は、細胞培養物の体積当たりで報告される、プロテインA精製工程後のホモ二量体率と総タンパク質収量との積を指す。

#### 【0063】

本明細書で使用される場合、疾患または障害を有する対象を「治療する」または「治療

すること」という用語は、疾患または障害の少なくとも1つの症状が解消、治癒、緩和、軽減、変化、軽快、緩解、または改善するように、対象をレジメン、例えば本明細書に記載の融合タンパク質などの融合タンパク質の投与に供することを意味する。治療は、疾患もしくは障害、または疾患もしくは障害の症状を緩和、軽減、変化、軽快、緩解、改善する、または影響を与えるのに有効な量を投与することを含む。治療は、疾患または障害の症状の増悪または悪化を抑制するものであってもよい。

#### 【0064】

インスリン - Fc融合タンパク質の組成および構造

本開示は、ペプチドリinkerを介して種特異的なFcフラグメントに連結されたインスリンポリペプチドを含む融合タンパク質（すなわち、インスリン - Fc融合タンパク質）の組成、並びに、糖尿病（例えば、ヒトおよび/またはイヌにおける糖尿病）を治療するためのその使用に関する。本明細書で使用される場合、「融合タンパク質」および「インスリン - Fc融合タンパク質」という用語は、ペプチド結合を介して共有結合した、例えば異なる供給源（異なるタンパク質、ポリペプチド、細胞など）からの、2以上の部分からなるタンパク質を指す。インスリン - Fc融合タンパク質は、(i)各部分をコードする遺伝子を連結して1つの核酸分子にし、(ii)核酸分子が以下のようにコードしているタンパク質を宿主細胞（例えば、HEKまたはCHO）中で発現することで、共有結合される：(N末端) - - インスリンポリペプチド - - リンカー - - Fcフラグメント - - (C末端)。完全に組換え合成するアプローチの方が、インスリンポリペプチドとFcフラグメントを別々に合成してから化学的に結合させる方法よりも好ましい。化学的結合工程とその後の精製プロセスは、製造の複雑さを増加させ、製品の収量を減少させ、コストを増加させる。

#### 【0065】

本明細書で使用される場合、「二量体」という用語は、共有結合した2つのポリペプチドを含むタンパク質または融合タンパク質を指す。実施形態において、2つの同一のポリペプチドが共有結合（例えば、ジスルフィド結合を介して）し、「ホモ二量体」を形成している（図1に図示）。ジスルフィド結合を図1に示しているが、実際のジスルフィド結合の総数は、図1に示される数よりも多くても少なくてもよい。実施形態において、ホモ二量体は、単一の核酸分子によってコードされており、ホモ二量体は、まずインスリン - Fc融合タンパク質単量体を形成し、次に細胞内でのさらなるプロセッシング後に2つの同一のインスリン - Fc融合タンパク質単量体をホモ二量体へと構築することによって、細胞内で組換え製造される。

#### 【0066】

本明細書で使用される場合、「多量体」、「多量体の」、または「多量体状態」という用語は、Fc融合タンパク質二量体と平衡状態にあり得る、または、Fc融合タンパク質二量体の永久凝集型として作用し得る、Fc融合タンパク質二量体の非共有結合性の会合形態（例えば、Fc融合タンパク質ホモ二量体の二量体、Fc融合タンパク質ホモ二量体の三量体、Fc融合タンパク質ホモ二量体の四量体、または5以上のFc融合タンパク質ホモ二量体を含む高次凝集体）を指す。Fc融合タンパク質の多量体型は、インスリン - Fc融合タンパク質ホモ二量体とは異なる物理的、安定性、または薬理活性を有し得ると予想できる。

#### 【0067】

インスリンポリペプチド

インスリンポリペプチドは、例えば、膵臓内のランゲルハンス島の細胞によって産生されるインスリンまたはインスリン類似体であってもよい。インスリンは、血液からのグルコースの吸収を調節することで機能する。タンパク質レベルの上昇およびグルコースレベルの上昇などの刺激により、インスリンは細胞から放出され、IRに結合し、哺乳類（例えば、ヒト）の代謝の多くの側面に影響を与えるシグナルカスケードを開始する。このプロセスの崩壊は、いくつかの疾患、特に糖尿病、インスリンノーマ、インスリン抵抗性、メタボリックシンドローム、および多嚢胞性卵巣症候群に直接関係する。本開示のイン

スリン類似体は、インスリンの構造に関連しているが、1またはそれ以上の改変を含んでいるものであってもよい。いくつかの実施形態において、インスリン類似体は、インスリンに対する少なくとも1つのアミノ酸の置換、欠失、付加、または化学修飾を含み、これらは、インスリン - Fc融合タンパク質の構成の特定の特徴または特性に影響を与える可能性がある。例えば、本明細書に記載の修飾または変更は、参照標準と比較して、インスリン - Fc融合タンパク質の構成の構造、安定性、pH感受性、生物活性、または細胞表面受容体（例えば、インスリンホルモン受容体）に対する結合親和性に影響を与える可能性がある。

#### 【0068】

インスリンのアミノ酸配列は、進化を通じて、特に脊椎動物において強く保存されている。例えば、天然型イヌインスリンと天然型ブタインスリンは、ヒトインスリンと1つのアミノ酸しか異なっておらず、天然型ウシインスリンは、ヒトインスリンと3つのアミノ酸しか異なっておらず、天然型ネコインスリンは、ヒトインスリンとたった4つのアミノ酸しか異なっていない。本明細書で使用される場合、用語「B鎖またはB鎖アナログ」、「Cペプチド」または「C鎖」、および「A鎖またはA鎖アナログ」は、図1に例示されるようなインスリンポリペプチドのペプチドセグメントを指す。インスリンは、ジスルフィド結合（例えば、1または複数のB鎖システイン側鎖チオールおよび1または複数のA鎖システイン側鎖チオールによって形成されるジスルフィド結合）を介して接続された、2つのペプチド鎖（すなわち、B鎖およびA鎖）を含む、51アミノ酸のホルモンである。インスリンのA鎖は21アミノ酸長であり、インスリンのB鎖は30アミノ酸長である。天然型のインスリンでは、A鎖は、2つのA鎖システイン側鎖チオールによって形成された1つの鎖内ジスルフィド結合を含む。参考のため、配列番号1のヒトインスリンB鎖および配列番号2のヒトインスリンA鎖の配列を以下に示す：

F V N Q H L C G S H L V E A L Y L V C G E R G F F Y T P K T（配列番号1）

G I V E Q C C T S I C S L Y Q L E N Y C N（配列番号2）。

#### 【0069】

本明細書で使用される場合、「インスリン」または「インスリンポリペプチド」という用語は、成熟インスリン、プレプロインスリン、プロインスリン、および天然に存在するインスリン、またはその類似体を包含する。実施形態において、インスリンポリペプチドは、完全長インスリンポリペプチドまたはその断片とすることができる。実施形態において、インスリンポリペプチドは、成熟インスリン、プレプロインスリン、プロインスリン、または天然に存在するインスリンからの1または複数の断片を含むことができる。

#### 【0070】

インスリンは通常、N末端 - - B鎖：C鎖：A鎖 - - C末端ポリペプチドとして構築され、生物活性を示すようにするためにC鎖が切断される。参考のため、C鎖を含むヒトインスリン分子全体（すなわち、ヒトプロインスリン）の配列を、C鎖に下線を引いて以下に示す：

F V N Q H L C G S H L V E A L Y L V C G E R G F F Y T P K T R R E A E D L Q V G Q V E L G G G P G A G S L Q P L A L E G S L Q K R G I V E Q C C T S I C S L Y Q L E N Y C N（配列番号3）。

単鎖インスリンポリペプチドの、生理活性を有する2鎖ポリペプチドへの変換は、通常、グルコース刺激によるインスリン分泌より前に、ランゲルハンス島の細胞内で、I型エンドプロテアーゼ（Cペプチド - B鎖接続を破壊するPC1およびPC3、並びにPC2）、およびCペプチド - A鎖結合を正しい部位で正確に切断するII型エンドプロテアーゼの2つのエンドプロテアーゼによって達成されている。しかし、インスリンなどの治療用分子の生合成に用いられる細胞系（例えば、細菌、酵母、および哺乳類（HEKおよびCHO）細胞系）はこの経路を有していないため、化学的または酵素的な方法を用いて単鎖ポリペプチドを発現および回収した後に変換を行わなければならない。発現および回収後にC鎖を切断するための公知の技術は全て、C鎖がA鎖のN末端直前のリジンで終端するように、まずC鎖を改変することに依存している。次に、リジン残基のC末端で特異的

10

20

30

40

50

にペプチド結合を切断する、トリプシンまたは L y s - C ファミリーから選択される酵素を用いて、単鎖インスリンポリペプチドを C 鎖の C 末端リジンおよび B 鎖の N 末端から 29 番目の位置の C 末端リジンで切断する。場合によっては、得られた生物活性を示す 2 鎖インスリンは、B 鎖の N 末端から 30 番目の位置の切断されたアミノ酸を再付加せずに使用され、場合によっては、B 鎖の N 末端から 30 番目の位置の切断されたアミノ酸が追加の酵素的な方法を用いて当該分子に再付加される。このような処理がインスリンではうまくいくのは、インスリンが 2 鎖ポリペプチド形態の全体の中にリジンを 1 つしか含まないためである。しかし、既知の F c フラグメントは全て複数のリジン残基を含むため、この処理は本明細書に含まれるインスリン - F c 融合タンパク質に対しては使用することができない。従って、酵素切断プロセスは、F c フラグメントを非機能的な部分にまで消化することによって、インビボでインスリンポリペプチドの作用を延長する F c フラグメントの能力を取り除くことになる。従って、本発明のインスリン - F c 融合タンパク質は、C 鎖切断を必要としないことから単鎖形態で生物活性を示す、インスリンポリペプチドを含まなければならない。

#### 【0071】

生物活性を示すいくつかの単鎖インスリンポリペプチドが、当該技術分野において報告されている。いずれの場合も、単鎖インスリンポリペプチドは、静電バランスをとり、凝集を防ぎ、I R 結合および / または下流シグナル伝達を増強して天然型の 2 鎖インスリンと同等レベルの生物活性を達成するために、特定の長さで組成の C 鎖、並びに、特定のアミノ酸部位で変異した A 鎖および B 鎖を含んでいる。ここで、ペプチドセグメント上の変異の位置は、セグメントの名称（例えば、B 鎖、C 鎖、A 鎖）と、セグメントの N 末端から数えたアミノ酸の数を用いて表記される。例えば、「B 1 6」という表記は、B 鎖のアミノ酸配列の N 末端から 16 番目のアミノ酸のことをいう。また、「A 8」という表記は、A 鎖の N 末端から 8 番目のアミノ酸のことをいう。さらに、あるアミノ酸が特定の位置で天然型から新しいアミノ酸に変異している場合、その位置にはその新しいアミノ酸のための 1 文字アミノ酸コードが付加される。例えば、B 1 6 A は B 鎖のアミノ酸配列の N 末端から 16 番目のアミノ酸におけるアラニン変異のことをいい、A 8 H は A 鎖のアミノ酸配列の N 末端から 8 番目のアミノ酸におけるヒスチジン変異をいう。

#### 【0072】

米国特許第 9 8 5 5 3 1 8 B 2 号では、配列 G G S G G G G ( 配列番号 7 2 ) の C 鎖 ( 「第 1 のリンカー」 ) 、 A 鎖における置換、並びに B 鎖における置換および欠失 ( 非天然型アミノ酸には下線を引き、欠失させた天然型アミノ酸は下線を引いた Z で表している ) を有する単鎖インスリン類似体が報告されている：

F V N Q H L C G S H L V E A L E L V C G E R G F H Y G G G G G G S G G G G G I V  
E Q C C T S I C S L D Q L E N Y C Z ( 配列番号 7 \_\_ N U L L ) 。

#### 【0073】

以下に、上に示した配列を、インスリンポリペプチド配列の表記から記号 Z の不在アミノ酸を取り除いて、再掲したものである。ここでも、前と同様に、非天然型のアミノ酸に下線を引いている。2 つの別々の表記をしたが、この 1 対の配列は全く同じインスリンポリペプチドを指している。

F V N Q H L C G S H L V E A L E L V C G E R G F H Y G G G G G G S G G G G G I V  
E Q C C T S I C S L D Q L E N Y C ( 配列番号 7 )

#### 【0074】

いくつかの実施形態において、予想外にも、配列番号 7 の B 鎖の N 末端から 16 番目の位置 ( すなわち、B 1 6 ) でアラニンをグルタミン酸に置換して配列番号 10 を得る、インスリン - F c 融合タンパク質の構成は、インスリン - F c 融合タンパク質のホモ二量体力価、I R 結合親和性、および F c R n 結合を向上させながら、F c R I 結合親和性および C 1 q 結合親和性が低いことによって判断される免疫原性の低減を維持することが見出された。B 1 6 におけるこの特定のアミノ酸置換は、もともと、この位置のアラニンはインスリン特異的 T 細胞を活性化する能力が低いことが知られていることで動機付けられ

ていた (Alleva, D. G., Gaur, A., Jin, L., Wegmann, D., Gottlieb, P. A., Pahuja, A., Johnson, E. B., Motheral, T., Putnam, A., Crowe, P. D., Ling, N., Boehme, S. A., Conlon, P. J., (2002年), Diabetes, 51巻、7号、pp 2126 ~ 2134)。配列番号10を、非天然型のアミノ酸のそれぞれに下線を引いて以下に挙げる：

F V N Q H L C G S H L V E A L A L V C G E R G F H Y G G G G G G S G G G G G I V  
E Q C C T S T C S L D Q L E N Y C (配列番号10)。

【0075】

リンカー

いくつかの例では、インスリンポリペプチドのC末端は、FcフラグメントのN末端に直接接続される (例えば、無リンカーまたはリンカーなし)。他の例では、組換え製造されたインスリン-Fc融合タンパク質の構築を成功させるために、インスリンポリペプチドをFcフラグメントに接続するリンカーが必要となる。実施形態において、本明細書に記載のインスリン-Fc融合タンパク質の構成は、アミノ酸 (例えば、天然アミノ酸または非天然アミノ酸) から構成される、インスリンポリペプチドとFcフラグメントとの間のペプチドリンカーを含む。実施形態において、例えば、単一の核酸分子が、インスリンポリペプチド内の様々なペプチドと、ペプチドリンカーおよびFcフラグメントとをコードできるように、ペプチドリンカーは核酸分子にコードさせることができる。ペプチドリンカーの選択肢 (例えば、長さ、組成、疎水性、および二次構造) は、インスリン-Fc融合タンパク質の構成の製造性 (すなわち、ホモ二量体力価)、化学的および酵素的な安定性、生物活性 (すなわち、NAOC値)、生物活性と相関するパラメータ (すなわち、FcRnアッセイにおけるEC50値)、並びにインスリン-Fc融合タンパク質の免疫原性に影響し得る (Chen, X., Zaro, J., Shen, W. C., Adv Drug Deliv Rev., 2013年10月15日; 65巻(10号): pp 1357 ~ 1369)。表1は、ホモ二量体力価と生物活性を向上させる目的で、インスリン-Fc融合タンパク質の構成の設計に使用されるいくつかのリンカーを挙げている。

【表1】

表1：インスリン-Fc融合タンパク質におけるA鎖とFcフラグメントの間のペプチドリンカー
GGGGAGGGG (配列番号11)
GGGGS GGGG (配列番号12)
GGGGGAGGGG (配列番号64)
GGGGS GGGG S GGGG S GGGG (配列番号65)
GGGGKGGGKG GGGKG GGGG (配列番号66)
GGGGGAGGGGAGGGGAGGGGG (配列番号67)
GGGGGQGGGGQGGGGQGGGGG (配列番号13)
SGGGGQGGGGQGGGGQGGGGG (配列番号68)
HGGGGQGGGGQGGGGQGGGGG (配列番号69)
PGGGGGQGGGGQGGGGQGGGGG (配列番号70)
GGGGGQGGGGQGGGGQGGGGGQGGGG (配列番号99)

【0076】

実施形態において、ペプチドリンカーは、配列：

GGGGGQGGGGQGGGGQGGGGG (配列番号13)

を有する。他の実施形態において、ペプチドリンカーは、配列：

GGGGS GGGG (配列番号12)

を有する。好ましい実施形態において、ペプチドリンカーは、配列：

G G G G G A G G G G A G G G G A G G G G G ( 配列番号 6 7 )

または、配列：

G G G G A G G G G ( 配列番号 1 1 )

を含む。

【 0 0 7 7 】

配列番号 1 3 のペプチドリンカーのようなペプチドリンカーを有する組換え製造されたインスリン - F c 融合タンパク質の構成を構築する際には、インスリン A 鎖の C 末端とペプチドリンカーの N 末端の間の、望ましくない酵素切断の可能性に注意を払わなければならない。インスリンポリペプチドからリンカーおよび F c フラグメントを切断した場合、インスリン - F c 融合タンパク質の構成は、長時間の生物活性を提供することができないものとなるであろう。アスパラギン - グリシン結合の間には、既知の酵素切断部位が存在する ( V l a s a k , J . , I o n e s c u , R . , ( 2 0 1 1 年 ) , M A b s , 3 巻、3 号、p p 2 5 3 ~ 2 6 3 ) 。配列番号 1 3 の好ましいペプチドリンカーを包含する多くのペプチドリンカーの実施形態では、N 末端アミノ酸はグリシンである。さらに、インスリン A 鎖の C 末端 ( すなわち、A 鎖の N 末端から 2 1 番目のアミノ酸 ( すなわち、A 2 1 ) ) は、アスパラギンである。そこで、配列番号 7、配列番号 9、および配列番号 1 0 のインスリンポリペプチドでは、インスリン - F c 融合タンパク質の構成において A 鎖とペプチドリンカーとの間に形成されるであろう、酵素切断可能であり得るアスパラギン - グリシン結合を除去するために、A 2 1 アスパラギンを省いている。予想外にも、A 鎖の C 末端にアスパラギンを保持している、配列番号 8 のインスリンポリペプチドから構築されたインスリン - F c 融合タンパク質の構成が、許容できるホモ二量体力価 ( すなわち、5 0 m g / L を超えるイヌインスリン - F c 融合タンパク質のホモ二量体力価 ) での哺乳類細胞における製造性、イヌにおける許容できるインビボ生物活性 ( すなわち、1 5 0 % F B G L ・日・k g / m g を超える N A O C ) 、および、複数回投与後の生物活性レベルの維持 ( すなわち、0 . 5 を超える、イヌにおける 3 回目注射後の N A O C R 値 ) を示している。結果は、以前の教示に基づく予想に反して、少なくとも本明細書に開示される F c フラグメント配列を含むインスリン - F c 融合タンパク質の構成については、インスリンポリペプチドとペプチドリンカーとの間のアスパラギン - グリシン結合を含むインスリン - F c 融合タンパク質の構成の酵素切断または非活性化のリスクは存在しないことを示している。

【 0 0 7 8 】

別の実施形態において、インスリンポリペプチド組成および F c フラグメント組成が同じ場合、配列番号 1 3 のグルタミン ( Q ) をアラニン ( A ) に変異させ、G G G G G A G G G G A G G G G A G G G G G ( 配列番号 6 7 ) のペプチドリンカーを作製したところ、ホモ二量体力価が高く、I R に対する結合親和性が増加し、F c R n 受容体に対する結合親和性が増加した、インスリン - F c 融合タンパク質の構成が得られることが見出された。

【 0 0 7 9 】

別の実施形態において、インスリンポリペプチド組成および F c フラグメント組成が同じ場合、配列番号 6 7 のペプチドリンカーは、インスリン - F c 融合タンパク質のホモ二量体力価にも F c R n 受容体に対する結合親和性にも顕著な影響を与えずに、I R アッセイにおける I C 5 0 値を 6 0 % 増加させて、短くできることが見出された。この短縮型ペプチドリンカーは、配列：

G G G G A G G G G ( 配列番号 1 1 )

を含む。

【 0 0 8 0 】

F c フラグメント

「F c フラグメント」、「F c 領域」、「F c ドメイン」、または「F c ポリペプチド」という用語は、本明細書では、免疫グロブリン重鎖の C 末端領域を規定するために使用される。F c フラグメント、F c 領域、F c ドメイン、または F c ポリペプチドは、天然型配列の F c 領域であってもよいし、バリエーション / 変異型 F c 領域であってもよい。免疫

グロブリン重鎖のF c領域の境界は様々であり得るが、一般に、重鎖のヒンジ領域、重鎖のC H 2領域、および重鎖のC H 3領域の一部または全部から構成される。イヌF cフラグメントまたはヒトF cフラグメントのヒンジ領域は、重鎖のC H 1ドメインと重鎖のC H 2領域とを接続し、また、2つの同一だが別々のF c融合タンパク質単量体からF c融合タンパク質のホモ二量体を形成するための1または複数の重鎖間ジスルフィド架橋を形成する1または複数のシステインを含む、アミノ酸配列を含む。ヒンジ領域は、天然に存在するアミノ酸配列または天然に存在しないアミノ酸配列の全部または一部を含んでもよい。

#### 【0081】

F c受容体(F c R)とは、F cフラグメントまたは抗体のF c領域に結合する受容体を指す。実施形態において、F c Rは、イヌF c RまたはヒトF c Rの天然型配列である。実施形態において、F c Rは、I g G抗体のF cフラグメントまたはF c領域と結合するもの(受容体)であり、F c R I サブクラス、F c R I I a サブクラス、F c R I I b サブクラス、およびF c R I I I サブクラスという受容体を含むが、これらに限定はされず、これらの受容体の対立遺伝子バリエーションおよび選択的スプライシングを受けた型を含む。「F c R」は、新生児型受容体であるF c R nも含み、これは、母親のI g G分子の胎児への移行に関与しており(Guyerら、1976年、J. Immunol.、117巻:p 587;およびKimら、1994年、J. Immunol.、24巻:p 249)、また、インビボにおける抗体およびF c融合タンパク質のインビボ排出半減期の延長にも関与している。ある種由来の哺乳類F c R(例えば、ヒト由来のF c R)は、同じ種(例えば、ヒト由来)のF cフラグメントを含むインスリン-F c融合タンパク質のインビトロ結合が可能であり、また、別の哺乳類種由来(例えば、イヌ由来)のF cフラグメントのインビトロ結合が可能な場合もあることは、当業者には理解される。実施形態において、ヒト由来のF c Rは、ヒトまたはイヌ由来のF cフラグメントを含むインスリン-F c融合タンパク質の構成のF c R結合特性を評価するための、結合特性測定に、インビトロで(例えば、アッセイで)使用される。実施形態において、イヌ由来のF c Rは、イヌ由来F cフラグメントを含むインスリン-F c融合タンパク質の構成の結合を測定するために、インビトロで(例えば、アッセイで)使用される。

#### 【0082】

実施形態において、天然型のイヌおよびヒトのI g GアイソタイプF cフラグメントのアミノ酸配列に存在する場合が多いC末端リジン(すなわち、F cフラグメント配列の最後のアミノ酸を表すリジン)が、製造時に望ましくないアミノ酸配列バリエーションが偶然生成されることを防ぐために取り除かれる(例えば、C末端リジンを含むF cフラグメントと、C末端リジンが取り除かれたF cフラグメントとの混在が、細胞内で所望のタンパク質が生産される際に起こる可能性がある)(Dick, LW.、(2008年)、Bio technology Bioeng.、8月15日;100巻(6号)pp 1132~43)。

#### 【0083】

イヌインスリン-F c融合タンパク質の実施形態において、F cフラグメントは、イヌI g G AのF cフラグメント(配列番号14)、イヌI g G BのF cフラグメント(配列番号15)、イヌI g G CのF cフラグメント(配列番号16)、またはイヌI g G DのF cフラグメント(配列番号17)のF c領域(例えば、ヒンジ領域、C H 2ドメイン、およびC H 3ドメイン)を含む。すなわち、イヌインスリン-F c融合タンパク質の構成において、C末端リジンを欠いたイヌF cフラグメント配列としては、以下のものがある：

R C T D T P P C P V P E P L G G P S V L I F P P K P K D I L R I T R T P E V T C  
V V L D L G R E D P E V Q I S W F V D G K E V H T A K T Q S R E Q Q F N G T Y R  
V V S V L P I E H Q D W L T G K E F K C R V N H I D L P S P I E R T I S K A R G  
R A H K P S V Y V L P P S P K E L S S S D T V S I T C L I K D F Y P P D I D V E  
W Q S N G Q Q E P E R K H R M T P P Q L D E D G S Y F L Y S K L S V D K S R W Q  
Q G D P F T C A V M H E T L Q N H Y T D L S L S H S P G (配列番号14)  
D C P K C P A P E M L G G P S V F I F P P K P K D T L L I A R T P E V T C V V V

D L D P E D P E V Q I S W F V D G K Q M Q T A K T Q P R E E Q F N G T Y R V V S  
V L P I G H Q D W L K G K Q F T C K V N N K A L P S P I E R T I S K A R G Q A H  
Q P S V Y V L P P S R E E L S K N T V S L T C L I K D F F P P D I D V E W Q S N  
G Q Q E P E S K Y R T T P P Q L D E D G S Y F L Y S K L S V D K S R W Q R G D T  
F I C A V M H E A L H N H Y T Q E S L S H S P G ( 配列番号 15 )

C N N C P C P G C G L L G G P S V F I F P P K P K D I L V T A R T P T V T C V V  
V D L D P E N P E V Q I S W F V D S K Q V Q T A N T Q P R E E Q S N G T Y R V V  
S V L P I G H Q D W L S G K Q F K C K V N N K A L P S P I E E I I S K T P G Q A  
H Q P N V Y V L P P S R D E M S K N T V T L T C L V K D F F P P E I D V E W Q S  
N G Q Q E P E S K Y R M T P P Q L D E D G S Y F L Y S K L S V D K S R W Q R G D  
T F I C A V M H E A L H N H Y T Q I S L S H S P G ( 配列番号 16 )

10

C I S P C P V P E S L G G P S V F I F P P K P K D I L R I T R T P E I T C V V L  
D L G R E D P E V Q I S W F V D G K E V H T A K T Q P R E Q Q F N S T Y R V V S  
V L P I E H Q D W L T G K E F K C R V N H I G L P S P I E R T I S K A R G Q A H  
Q P S V Y V L P P S P K E L S S S D T V T L T C L I K D F F P P E I D V E W Q S  
N G Q P E P E S K Y H T T A P Q L D E D G S Y F L Y S K L S V D K S R W Q Q G D  
T F T C A V M H E A L Q N H Y T D L S L S H S P G ( 配列番号 17 )。

ヒトインスリン - F c 融合タンパク質の構成において、C末端リジンを欠いたヒトF c フラグメント配列としては、以下のものがある：

D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T  
C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y  
R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K  
G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E  
W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G  
N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G ( 配列番号 73 )

20

E C P P C P A P P V A G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D  
V S H E D P E V Q F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T F R V V S V  
L T V V H Q D W L N G K E Y K C K V S N K G L P A P I E K T I S K T K G Q P R E  
P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G  
Q P E N N Y K T T P P M L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C  
S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G ( 配列番号 74 )。

30

#### 【 0 0 8 4 】

イヌの場合、イヌにおけるI g G AアイソタイプがF c エフェクター機能を有していないことから（ヒトにおけるヒトI g G 2アイソタイプとよく似ている）、任意の望ましくない免疫原性を最低限にするのに、イヌI g G Aが好ましい。しかし、配列番号4のインスリンポリペプチドと配列番号11のペプチドリンカーとを含むインスリン - F c 融合タンパク質の実施形態において、予想外にも、イヌI g G Aフラグメント（配列番号14）を含むインスリン - F c 融合タンパク質の構成が、高度に凝集し、所望のホモ二量体の力価が低い（すなわち、イヌインスリン - F c 融合タンパク質のホモ二量体力価が50 mg / L未満）ことが発見された。さらに、インスリン - F c 融合タンパク質の構成は、イヌにおいて生物活性を示さなかった（すなわち、NAOC値が150% F B G L ・日・k g / m g 未満）が、これは、その高い凝集度（例えば、低いホモ二量体率）によると推測される。配列番号4のインスリンポリペプチド、イヌI g G A F cフラグメント（配列番号14）、および／またはリンカーを変異させたが、凝集度が十分に低く、所望のホモ二量体の力価が十分に高いイヌI g G A F cフラグメントを含むインスリン - F c 融合タンパク質の実施形態はなかった。しかし、インスリン - F c 融合タンパク質の構成でイヌI g G A F cフラグメント（配列番号14）をイヌI g G B F cフラグメント（配列番号15）で置き換えた場合、著しく凝集度の低い化合物が得られ、所望のホモ二量体の比較的高い力価が得られた。さらに、配列番号4のインスリンポリペプチドとイヌI g G B F cフラグメント（配列番号15）を含むインスリン - F c 融合タンパク質の構成は

40

50

、イヌにおいて生物活性を示し、複数日に亘ってグルコースを低減させる生物活性を示した（すなわち、N A O C 値が 1 5 0 % F B G L ・ 日 ・ k g / m g より大きい）。

【 0 0 8 5 】

イヌ I g G B F c フラグメントがイヌ I g G A F c フラグメントよりも好ましいことが、配列番号 7 のインスリンポリペプチドと配列番号 1 3 のペプチドリンカーを含むインスリン - F c 融合タンパク質の構成において確認されたが、どちらの構成も、配列番号 4 のインスリンポリペプチドおよび配列番号 1 1 のペプチドリンカーとかなり異なるものであった。配列番号 7 のインスリンポリペプチドと配列番号 1 3 のペプチドリンカーを含むインスリン - F c 融合タンパク質の構成は、イヌ I g G A（配列番号 1 4）、イヌ I g G B（配列番号 1 5）、イヌ I g G C（配列番号 1 6）、またはイヌ I g G D（配列番号 1 7）の免疫グロブリン由来の F c フラグメントを用いて合成された。従来の精製法を用いて、イヌ I g G A を含むインスリン - F c 融合タンパク質構成とイヌ I g G B を含むインスリン - F c 融合タンパク質の構成のみが、かなりのタンパク質収量を示した。しかし、前述の通り、インスリン - F c 融合タンパク質のイヌ I g G A 構成は、高度に凝集しており、生物活性レベルが低かったが、一方、インスリン - F c 融合タンパク質のイヌ I g G B 構成は、凝集度が低く（すなわち、ホモ二量体率が高い）、望ましいホモ二量体の力価が高く（すなわち、イヌインスリン - F c 融合タンパク質の構成のホモ二量体力価が 5 0 m g / L を超える）、イヌにおける長時間グルコース低減生物活性がかなりのレベルであった（すなわち、N A O C 値が 1 5 0 % F B G L ・ 日 ・ k g / m g 以上）。別の精製法を用いて、インスリン - F c 融合タンパク質のイヌ I g G C 構成は、低い凝集度で回収されたが、おそらくは F c R n 受容体に対する親和性の低さから、イヌにおいて最小限の生物活性しか示さなかった（すなわち、N A O C 値が 1 5 0 % F B G L ・ 日 ・ k g / m g）。以上から、イヌ特異的製品に関しては、イヌ I g G B（配列番号 1 5）が、インスリンポリペプチドの選択にかかわらず、イヌに使用される全てのインスリン - F c 融合タンパク質の構成において、好ましい F c フラグメントである。

【 0 0 8 6 】

イヌ I g G B アイソタイプがイヌ I g G A アイソタイプよりも高い親和性でイヌ F c 受容体と相互作用すると考えると、イヌ I g G B を含むインスリン - F c 融合タンパク質の構成を反復注射した後に、望ましくない免疫原性のリスクが存在する可能性がある。そこで、インスリン - F c 融合タンパク質のより大きなホモ二量体力価を維持しつつ、イヌ F c R I 受容体に対する親和性を低減させるために、イヌ I g G B F c フラグメントに対する様々な変異の検討を行った。

【 0 0 8 7 】

F c R I 相互作用を低減する 1 つの方法では、宿主細胞内でインスリン - F c 融合タンパク質を合成する際に、F c フラグメントの脱グリコシル化またはグリコシル化防止が行われる。各 I g G フラグメントは、F c 領域の各重鎖の C H 2 ドメインに保存されたアスパラギン（N）-グリコシル化部位を含んでいる。ここでは、保存された N -グリコシル化部位を指す表記として、「c N g」を用いる。合成されたインスリン - F c 融合タンパク質から結合したグリカンを除去する 1 つの方法として、宿主細胞での生産中にグリカンの結合を完全に防止するために c N g 部位を変異させることが挙げられる。本明細書では、c N g 変異を記述するために用いられる表記は、c N g -（置換アミノ酸）である。例えば、c N g 部位のアスパラギンがセリンに変異している場合、この変異は「c N g - S」と表記される。

【 0 0 8 8 】

インスリン - F c 融合タンパク質の構成の B 鎖の N 末端からの c N g 部位の絶対位置は、インスリンポリペプチドの長さ、リンカーの長さ、c N g 部位より前の F c フラグメント中で取り除かれたアミノ酸によって変化する。本明細書において、所与のインスリン - F c 融合タンパク質配列における c N g 部位の絶対位置（インスリン - F c 融合タンパク質の B 鎖の N 末端から数えて測定）を指して用いられる表記は「N B（番号）」である。例えば、c N g 部位が B 鎖の N 末端から数えて 1 5 5 番目のアミノ酸位置に存在する場合

、この部位の絶対位置は「c N g - N B 1 5 5」と称される。さらなる例として、c N g 部位がB鎖のN末端から数えて1 5 5番目のアミノ酸位置に存在し、この部位のアスパラギンがセリンに変異している場合、この変異は「c N g - N B 1 5 5 - S」と表記される。

#### 【0089】

配列番号4のインスリンポリペプチドと、c N g - Q変異、c N g - S変異、c N g - D変異、c N g - K変異を有するイヌI g G B F cフラグメントとを含むインスリン - F c融合タンパク質の実施形態において、予想外にも、c N g - Kを含む化合物とc N g - S変異を含む化合物のみが、必要な、50 mg / Lを超えるイヌインスリン - F c融合タンパク質のホモ二量体力価と最低のF c R I結合親和性を示すことが見出された。一方、配列番号7のインスリンポリペプチドとc N g - S変異を有するイヌI g G B F cフラグメントを含むインスリン - F c融合タンパク質の実施形態では、予想外にも、得られたインスリン - F c融合タンパク質は、対応するインスリン - F c融合タンパク質の構成であるが天然型のイヌI g G B F cを含むものと比較して、イヌにおいて著しく低い生物活性を示すことが見出された（すなわち、N A O C値は、天然型のグリコシル化部位アミノ酸、例えばc N g - Nを含む対応するインスリン - F c融合タンパク質の方が著しく低かった）。予想外にも、このインスリン - F c融合タンパク質の生物活性は、配列番号10のインスリンポリペプチドについて上述したようにB 1 6アミノ酸をアラニンに変異させたとき、c N g - S変異体において回復した（すなわち、N A O C値が著しく増加した）。まとめると、インスリン - F c融合タンパク質の構成のF cフラグメント上のc N g変異の選択とインスリンポリペプチドの組成との間には、好ましいインスリン - F c融合タンパク質の実施形態を特定するのに実験が必要となるような、予想外の顕著な相互作用が存在している。特定のインスリン - F c融合タンパク質の実施形態では、c N g - S変異を含むイヌI g G B F c変異体が好ましく、c N g - Sに下線を引いたその配列は、以下のように示される：

D C P K C P A P E M L G G P S V F I F P P K P K D T L L I A R T P E V T C V V V  
D L D P E D P E V Q I S W F V D G K Q M Q T A K T Q P R E E Q F S G T Y R V V S  
V L P I G H Q D W L K G K Q F T C K V N N K A L P S P I E R T I S K A R G Q A H  
Q P S V Y V L P P S R E E L S K N T V S L T C L I K D F F P P D I D V E W Q S N  
G Q Q E P E S K Y R T T P P Q L D E D G S Y F L Y S K L S V D K S R W Q R G D T  
F I C A V M H E A L H N H Y T Q E S L S H S P G (配列番号18)。

#### 【0090】

一般に、ヒトF c I g G 2アイソタイプは、F c エフェクター機能を持たないために、望ましくない免疫原性を誘発する傾向が低いことから、他のアイソタイプよりも好ましい。例として、F c R I結合E L I S AおよびC 1 q結合E L I S Aの1つの実行において、ヒトI g G 1フラグメントを含む配列番号76のインスリン - F c融合タンパク質の実施形態は、ビオチン化F c R I濃度を3000 ng / mLとしたヒトF c R I結合アッセイにおけるOD 450が2.078であり、ビオチン化C 1 q濃度を1000 ng / mLとしたヒトC 1 q結合アッセイにおけるOD 450が3.006であったが、このように高い値は、配列番号76が患者において免疫原性を示す可能性があることを示している。これに対して、F c R I結合E L I S AおよびC 1 q結合E L I S Aの同じ実行において、配列番号7のインスリンポリペプチドと、配列番号13のペプチドリンカーと、ヒトI g G 2 F cフラグメント（配列番号74）と、を含むインスリン - F c融合タンパク質の構成（配列番号75）は、ビオチン化F c R I濃度を3,000 ng / mLとしたヒトF c R I結合アッセイにおけるOD 450が0.093であり、ビオチン化C 1 q濃度を1,000 ng / mLとしたヒトC 1 q結合アッセイにおけるOD 450が0.928であり、配列番号75が患者において免疫原性を示す可能性が著しく減少したことが示された。

#### 【0091】

インスリン - F c融合タンパク質の構成のOD 450測定値の絶対値は、例えばアッセイの実行時の小さな変動によって、E L I S Aの1つの実行から次の実行まで変化する可

能性がある。これにより、試験対象のインスリン - F c 融合タンパク質の構成の濃度を一定としても、異なる E L I S A 実行間の異なるインスリン - F c 融合タンパク質の構成の O D 4 5 0 の絶対値測定値の比較は、信頼性が低くなる。対照的に、ある E L I S A 実行におけるあるインスリン - F c 融合タンパク質の構成の O D 4 5 0 測定値と、同じ E L I S A 実行からの第 2 のインスリン - F c 融合タンパク質の構成の O D 4 5 0 測定値との比較（ここでも、インスリン - F c 融合タンパク質濃度を一定に保つ）は、異なる E L I S A 実行間の同じ 2 つのインスリン - F c 融合タンパク質の構成において比較的安定となる。これを受けて、ヒト F c R I 結合アッセイおよび C 1 q 結合アッセイの O D 4 5 0 に関するインスリン - F c 融合タンパク質の設計目標を O D 4 5 0 比として表したが、この比は、参照インスリン - F c 融合タンパク質の構成の絶対 O D 4 5 0 値に対する分析中のインスリン - F c 融合タンパク質の絶対 O D 4 5 0 値の比であり、両方の測定を同じ E L I S A 実験内で行うものである。試験された全ての試料について、F c R I 結合 E L I S A O D 4 5 0 におけるインスリン - F c 融合タンパク質構成試料のビオチン化 F c R I 濃度は、3 0 0 0 n g / m L に設定し、C 1 q 結合 E L I S A O D 4 5 0 におけるインスリン - F c 融合タンパク質構成試料のビオチン化 C 1 q 濃度は、1 0 0 0 n g / m L に設定する。

#### 【 0 0 9 2 】

配列番号 7 6 のインスリン - F c 融合タンパク質の構成（ヒト I g G 1 F c フラグメントを含む）を、F c R I 結合 E L I S A および C 1 q 結合 E L I S A における O D 4 5 0 比を算出するための参照インスリン - F c 融合タンパク質として用いる。上記で与えられた測定 O D 4 5 0 値を用いた、配列番号 7 5 のインスリン - F c 融合タンパク質の構成（ヒト I g G 2 F c フラグメントを含む）の、F c R I 結合 E L I S A における O D 4 5 0 比は：

#### 【 数 1 】

$$F c \gamma R I \text{ 結合 } E L I S A \text{ O D } 4 5 0 \text{ 比 } \left( \frac{\text{配列番号75}}{\text{配列番号76}} \right) = \frac{0.093}{2.078} = 0.045$$

上記で与えられた測定 O D 4 5 0 値を用いた、配列番号 7 5 のインスリン - F c 融合タンパク質の構成の、C 1 q 結合 E L I S A における O D 4 5 0 比は：

#### 【 数 2 】

$$C 1 q \text{ 結合 } E L I S A \text{ O D } 4 5 0 \text{ 比 } \left( \frac{\text{配列番号75}}{\text{配列番号76}} \right) = \frac{0.928}{3.06} = 0.309$$

#### 【 0 0 9 3 】

配列番号 7 6 のインスリン - F c 融合タンパク質の構成（h I g G 1）に対する、配列番号 7 5 のインスリン - F c 融合タンパク質の構成（h I g G 2）の F c R I 結合 E L I S A O D 4 5 0 比および C 1 q 結合 E L I S A O D 4 5 0 比は、望ましくない免疫原性の傾向を低減することを目的として、種々のインスリン - F c 融合体構成の F c R I 結合および C 1 q 結合を評価するための設計目標を作成する際に使用した、意欲的な基準である。よって、ヒト F c R I 結合（試験対象のインスリン - F c 融合タンパク質のビオチン化 F c R I 濃度は 3 0 0 0 n g / m L）の場合に設けられた設計目標は、0 . 5 0 未満の O D 4 5 0 比であり、C 1 q 結合の場合に設けられた設計目標（試験対象のインスリン - F c 融合タンパク質のビオチン化 C 1 q 濃度は 1 0 0 0 n g / m L）は、0 . 3 5 未満の O D 4 5 0 比である。

#### 【 0 0 9 4 】

ヒトIgG2Fcフラグメントを含むこのインスリン-Fc融合タンパク質の構成(配列番号75)の2つの別々の合成から得られた平均ホモ二量体力価は、117mg/Lであった。

【0095】

比較すると、同じ配列番号7のインスリンポリペプチドと、同じ配列番号13のペプチドリンカーと、ヒトIgG1フラグメント(配列番号73)と、を含むインスリン-Fc融合タンパク質の実施形態(配列番号76)では、インスリン-Fc融合タンパク質は、2つの別々の合成からの平均ホモ二量体力価が180mg/Lであり、ヒトIgG2フラグメントを含む類似のインスリン-Fc融合タンパク質の構成の場合で得られた平均ホモ二量体力価よりも50%以上大きいことが見出された。ヒトIgG1アイソタイプがヒトIgG2アイソタイプよりも高い親和性でヒトFcRI受容体と相互作用することを考えると、ヒトIgG1を含むインスリン-Fc融合タンパク質の構成を反復注射した後に、望ましくない免疫原性のリスクが存在する可能性がある。

【0096】

そこで、インスリン-Fc融合タンパク質のホモ二量体力価を高く維持しつつ、ヒトFcRI受容体およびC1qに対する親和性を低減させるために、ヒトIgG1Fcフラグメントに対する様々な変異の検討を行った。

【0097】

前述のように、FcRI相互作用を低減する1つの方法では、宿主細胞内でインスリン-Fc融合タンパク質を合成する際に、Fcフラグメントの脱グリコシル化またはグリコシル化防止が行われる。合成されたインスリン-Fc融合タンパク質から結合したグリカン除去する1つの方法として、宿主細胞での生産中にグリカンの結合を完全に防止するためにcNg部位を変異させることが挙げられる。

【0098】

cNg部位に下線が引かれた、変異型ヒトIgG1Fcフラグメントの一般構成は以下の通りであり：

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYX<sub>1</sub>STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(配列番号77)、

例において、X<sub>1</sub>はS、D、A、R、またはQである。

【0099】

配列番号7のインスリンポリペプチドと、配列番号13のペプチドリンカーと、X<sub>1</sub>がSである(すなわち、cNg-NB155-S変異を有する)配列番号77のヒトIgG1Fcフラグメントと、を含むヒトIgG1Fcフラグメントを、以下に示す：

FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFGHYGGGGGGSGGGGGGIV  
EQCCTSTCSDLQLENYCGGGGGGQGGGGGQGGGGGQGGGGGDK  
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV  
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYSSSTYRV  
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQ  
PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE  
SNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNV  
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(配列番号91)

【0100】

予想外にも、配列番号91の非グリコシル化インスリン-Fc融合タンパク質の実施形態は、グリコシル化した親物質(配列番号76)と比べて、ホモ二量体力価が向上することが見出された。さらに、配列番号76の参照インスリン-Fc融合タンパク質に対する配列番号91のインスリン-Fc融合タンパク質実施形態の、ビオチン化FcRI濃度

10

20

30

40

50

が3000 ng/mLであるヒトFcRIアッセイにおけるOD450比は0.50未満であり、配列番号76の参照インスリン-Fc融合タンパク質に対する配列番号91のインスリン-Fc融合タンパク質の構成の、ビオチン化C1q濃度が1,000 ng/mLである場合のヒトC1q結合アッセイにおけるOD450比は0.35未満であった。しかし、得られた配列番号91の非グリコシル化インスリン-Fc融合タンパク質は、配列番号76の親グリコシル化インスリン-Fc融合タンパク質に対して、IR結合の低減(IRアッセイにおけるIC50値の増加)と、FcRn結合親和性の低減(EC50値の増加)を示し、インビボにおける滞留時間の許容できない減少に伴って生物活性の許容できない低減を示す可能性が高いことが示された。

#### 【0101】

インスリン-Fc融合タンパク質

本明細書において、インスリンポリペプチドと、Fcフラグメントと、当該インスリンポリペプチドと当該Fcフラグメントとの間のリンカーと、を含む、インスリン-Fc融合タンパク質の構成が提供される。実施形態において、インスリンポリペプチドは、N末端からC末端へ以下の配向で各ドメインを含む：

(N末端) - B鎖 - C鎖 - A鎖 - (C末端)。

実施形態において、インスリンポリペプチドは、FcフラグメントのN末端側に位置する。実施形態において、上記融合タンパク質は、N末端からC末端へ以下の配向で各ドメインを含む：

(N末端) - インスリンポリペプチド - リンカー - Fcフラグメント - (C末端)  
(例えば、(N末端) - B鎖 - C鎖 - A鎖 - リンカー - Fcフラグメント - (C末端)) (図1に図示)。

#### 【0102】

イヌインスリン-Fc融合タンパク質

実施形態において、配列番号5の好ましい非免疫原性生物活性インスリンポリペプチドを、配列番号13の好ましいリンカーを用いて、配列番号15の好ましいイヌIgGFcフラグメントと組み合わせたところ、イヌにおける一連の反復注射の3回目の注射の後、50 mg/Lを超えるホモ二量体力価、イヌにおいて150% FBGL・日・kg/mgを超えるNAOC値、および、0.5を超えるNAOCR値を示す、配列番号20の、高いホモ二量体力価をもたらす、非凝集性の、生物活性を有する、非免疫原性の、イヌインスリン-Fc融合構成ファミリーが得られた。以下は配列番号20を示しており、非天然型のアミノ酸には下線が引かれており：

FVNQHLCGSSX<sub>1</sub>LVEALELVCGERGFHYGGGGGGSGGGGGGI  
VEQCCX<sub>2</sub>STCSDLQLENYCX<sub>3</sub>GGGGGGQGGGGQGGGGQGGG  
GGDCPKCPAPEMLGGPSVFIFPPKPKDTLLIARTPEVTCV  
VVDLDPEDPEVQISWFDGKQMKTAKTQPREEQFNGTYRV  
VSVLPIGHQDWLKGKQFTCKVNNKALPSPPIERTISKARGQ  
AHQPSVYVLPSPREELSKNTVSLTCLIKDFFPPDIDVEWQ  
SNGQQEPESKYRTTPPQLDEEDGSYFLYSKLSVDKSRWQRG  
DTFICAVMHEALHNHYTQESLSHSPG (配列番号20)、

X<sub>1</sub>はDではなく、X<sub>2</sub>はHではなく、X<sub>3</sub>は存在しないかNである。

#### 【0103】

配列番号20を含むイヌインスリン-Fc融合タンパク質の好ましい実施形態においては、X<sub>1</sub>はHであり、X<sub>2</sub>はTであり、X<sub>3</sub>は存在しないかNである。セレクションにより、イヌにおける一連の反復注射の3回目の注射の後、50 mg/Lを超えるホモ二量体力価、イヌにおいて150% FBGL・日・kg/mgを超えるNAOC値、および、0.5を超えるNAOCR値を示す、配列番号21の、高いホモ二量体力価をもたらす、非凝集性の、生物活性を有する、非免疫原性の、イヌインスリン-Fc融合タンパク質の構成が得られる。以下は配列番号21を示しており、非天然型のアミノ酸には下線が引かれており：

10

20

30

40

50

F V N Q H L C G S H L V E A L E L V C G E R G F H Y G G G G G G S G G G G G I V  
 E Q C C T S I C S L D Q L E N Y C X<sub>3</sub> G G G G G Q G G G G Q G G G G Q G G G G G  
 D C P K C P A P E M L G G P S V F I F P P K P K D T L L I A R T P E V T C V V V  
 D L D P E D P E V Q I S W F V D G K Q M Q T A K T Q P R E E Q F N G T Y R V V S  
 V L P I G H Q D W L K G K Q F T C K V N N K A L P S P I E R T I S K A R G Q A H  
 Q P S V Y V L P P S R E E L S K N T V S L T C L I K D F F P P D I D V E W Q S N  
 G Q Q E P E S K Y R T T P P Q L D E D G S Y F L Y S K L S V D K S R W Q R G D T  
 F I C A V M H E A L H N H Y T Q E S L S H S P G (配列番号 21)、

X<sub>3</sub> は存在しないか N である。

#### 【0104】

好ましい実施形態において、配列番号 21 において X<sub>3</sub> が存在しない場合、イヌにおける一連の反復注射の 3 回目の注射の後、50 mg / L を超えるホモ二量体力価、イヌにおいて 150 % FBGL・日・kg / mg を超える NAOC 値、および、0.5 を超える NAOCR 値を示す、配列番号 26 の、高いホモ二量体をもたらす、非凝集性の、生物活性を有する、非免疫原性の、イヌインスリン - Fc 融合タンパク質が得られる。以下は配列番号 26 を示しており、非天然型のアミノ酸には下線が引かれている：

F V N Q H L C G S H L V E A L E L V C G E R G F H Y G G G G G G S G G G G G I V  
 E Q C C T S I C S L D Q L E N Y C G G G G G Q G G G G Q G G G G Q G G G G G D C  
 P K C P A P E M L G G P S V F I F P P K P K D T L L I A R T P E V T C V V V D L  
 D P E D P E V Q I S W F V D G K Q M Q T A K T Q P R E E Q F N G T Y R V V S V L  
 P I G H Q D W L K G K Q F T C K V N N K A L P S P I E R T I S K A R G Q A H Q P  
 S V Y V L P P S R E E L S K N T V S L T C L I K D F F P P D I D V E W Q S N G Q  
 Q E P E S K Y R T T P P Q L D E D G S Y F L Y S K L S V D K S R W Q R G D T F I  
 C A V M H E A L H N H Y T Q E S L S H S P G (配列番号 26)。

#### 【0105】

好ましい実施形態において、配列番号 21 において X<sub>3</sub> が N である場合、イヌにおける一連の反復注射の 3 回目の注射の後、50 mg / L を超えるホモ二量体力価、イヌにおいて 150 % FBGL・日・kg / mg を超える NAOC 値、および、0.5 を超える NAOCR 値を示す、配列番号 28 の、高いホモ二量体力価をもたらす、非凝集性の、生物活性を有する、非免疫原性の、イヌインスリン - Fc 融合タンパク質が得られる。以下は配列番号 28 を示しており、非天然型のアミノ酸には下線が引かれている：

F V N Q H L C G S H L V E A L E L V C G E R G F H Y G G G G G G S G G G G G I V  
 E Q C C T S I C S L D Q L E N Y C N G G G G G Q G G G G Q G G G G Q G G G G G D  
 C P K C P A P E M L G G P S V F I F P P K P K D T L L I A R T P E V T C V V V D  
 L D P E D P E V Q I S W F V D G K Q M Q T A K T Q P R E E Q F N G T Y R V V S V  
 L P I G H Q D W L K G K Q F T C K V N N K A L P S P I E R T I S K A R G Q A H Q  
 P S V Y V L P P S R E E L S K N T V S L T C L I K D F F P P D I D V E W Q S N G  
 Q Q E P E S K Y R T T P P Q L D E D G S Y F L Y S K L S V D K S R W Q R G D T F  
 I C A V M H E A L H N H Y T Q E S L S H S P G (配列番号 28)。

#### 【0106】

好ましい実施形態において、配列番号 18 の好ましい非グリコシル化 cNg - S 変異型イヌ IgGB Fc フラグメントを、配列番号 13 の好ましいリンカーを用いて、配列番号 9 の好ましい B16A 変異型インスリンポリペプチド配列と組み合わせると、イヌにおける一連の反復注射の 3 回目の注射の後、50 mg / L を超えるホモ二量体力価、イヌにおいて 150 % FBGL・日・kg / mg を超える NAOC 値、および、0.5 を超える NAOCR 値を示す、配列番号 22 の、高いホモ二量体力価をもたらす、非凝集性の、生物活性を有する、非免疫原性の、イヌインスリン - Fc 融合タンパク質ファミリーが得られる。以下は配列番号 22 を示しており、非天然型のアミノ酸には下線が引かれており：

F V N Q H L C G S X<sub>1</sub> L V E A L A L V C G E R G F H Y G G G G G G S G G G G G I  
 V E Q C C X<sub>2</sub> S I C S L D Q L E N Y C G G G G G Q G G G G Q G G G G Q G G G G G

10

20

30

40

50

DCPKCPAPEMLGGPSVFIFFPPKPKDTLLIARTPEVTCVVV  
 DLPEDPEVQISWFDVGKQMQTAKTQPREEQFSGTYRVVS  
 VLPIGHQDWLKGKQFTCKVNNKALPSP IERTISKARGQAH  
 QPSVYVLPSPSREELSKNTVSLTCLIKDFFPPDIDVEWQSN  
 GQQEPESKYRTTTPPQLDEEDGSYFLYSKLSVDKSRWQRGDT  
 FICAVMHEALHNHYTQESLSHSPG (配列番号22)、

$X_1$ はDではなく、 $X_2$ はHではない。

#### 【0107】

好ましい実施形態において、配列番号22において $X_1$ がHであり、 $X_2$ がTである場合、イヌにおける一連の反復注射の3回目の注射の後、50mg/Lを超えるホモ二量体力価、イヌにおいて150%FBGL・日・kg/mgを超えるNAOC値、および、0.5を超えるNAOCR値を示す、配列番号30の、高いホモ二量体力価をもたらす、非凝集性の、生物活性を有する、非免疫原性の、イヌインスリン-Fc融合タンパク質が得られる。以下は配列番号30を示しており、非天然型のアミノ酸には下線が引かれている：

FVNQHLCGSHLVEALALVCGERGFHYGGGGGGSGGGGGGIV  
 EQCCTSTCSLDQLENYCGGGGGGQGGGGGQGGGGGQGGGGGGDC  
 PCKCPAPEMLGGPSVFIFFPPKPKDTLLIARTPEVTCVVVDL  
 DPEDPEVQISWFDVGKQMQTAKTQPREEQFSGTYRVVSVL  
 PIGHQDWLKGKQFTCKVNNKALPSP IERTISKARGQAHQP  
 SVYVLPSPSREELSKNTVSLTCLIKDFFPPDIDVEWQSNQG  
 QEPESKYRTTTPPQLDEEDGSYFLYSKLSVDKSRWQRGDTFI  
 CAVMHEALHNHYTQESLSHSPG (配列番号30)。

#### 【0108】

配列番号30の、製造性と有効性が高い、超長時間作用型イヌインスリン-Fc融合タンパク質の実施形態が予想外にも発見されたことにより、本発明者らは、ヒト患者用の、同様の製造性と有効性を有する、超長時間作用型インスリン-Fc融合タンパク質の構成をつくり出す試みを行った。

#### 【0109】

ヒトインスリン-Fc融合タンパク質

他の非グリコシル化インスリン-Fc融合タンパク質の構成が同じ挙動を示すかどうかを判定するための、さらなる実験を行った。cNg部位に下線が引かれた、ヒトIgG1Fcフラグメントの一般構成は以下の通りであり：

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVT  
 CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYX<sub>1</sub>ST  
 YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAK  
 KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV  
 EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQ  
 GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (配列番号77)、

$X_1$ はS、D、A、R、またはQである。

#### 【0110】

配列番号7のインスリンポリペプチド(B16A変異なし)と、配列番号13のリンカーと、グリコシル化を防ぐためのcNg変異を有していてもよいヒトIgG1Fcフラグメントの構成(配列番号77、 $X_1$ はS、D、A、R、またはQ)と、を含むインスリン-Fc融合タンパク質の実施形態を、以下に示す：

FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFHYGGGGGGSGGGGGGIV  
 EQCCTSTCSLDQLENYCGGGGGGQGGGGGQGGGGGQGGGGGGDK  
 THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPKPKPKDTLMISRTPEVTCV  
 VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYSSSTYRV  
 VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQ  
 PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE

S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V  
 F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G ( 配列番号 9 1 )  
 F V N Q H L C G S H L V E A L E L V C G E R G F H Y G G G G G G S G G G G G I V  
 E Q C C T S T C S L D Q L E N Y C G G G G G Q G G G G Q G G G G G Q G G G G G D K  
 T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V  
 V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y D S T Y R V  
 V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q  
 P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E  
 S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V  
 F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G ( 配列番号 9 2 )  
 F V N Q H L C G S H L V E A L E L V C G E R G F H Y G G G G G G S G G G G G I V  
 E Q C C T S T C S L D Q L E N Y C G G G G G Q G G G G Q G G G G G Q G G G G G D K  
 T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V  
 V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y A S T Y R V  
 V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q  
 P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E  
 S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V  
 F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G ( 配列番号 9 3 )  
 F V N Q H L C G S H L V E A L E L V C G E R G F H Y G G G G G G S G G G G G I V  
 E Q C C T S T C S L D Q L E N Y C G G G G G Q G G G G Q G G G G G Q G G G G G D K  
 T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V  
 V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y R S T Y R V  
 V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q  
 P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E  
 S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V  
 F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G ( 配列番号 9 4 )  
 F V N Q H L C G S H L V E A L E L V C G E R G F H Y G G G G G G S G G G G G I V  
 E Q C C T S T C S L D Q L E N Y C G G G G G Q G G G G Q G G G G G Q G G G G G D K  
 T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V  
 V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y Q S T Y R V  
 V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q  
 P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E  
 S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V  
 F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G ( 配列番号 9 5 )

【 0 1 1 1 】

配列番号 1 3 の好ましいリンカーを用いた、配列番号 7 のインスリンポリペプチドと、  
 X<sub>1</sub> が S ( c N g - N B 1 5 5 - S : 配列番号 9 1 )、D ( c N g - N B 1 5 5 - D : 配  
 列番号 9 2 )、A ( c N g - N B 1 5 5 - A : 配列番号 9 3 )、R ( c N g - N B 1 5 5  
 - R : 配列番号 9 4 )、または Q ( c N g - N B 1 5 5 - Q : 配列番号 9 5 ) である配列  
 番号 7 7 のヒト I g G 1 - F c フラグメントと、を含む実施形態においては、予想外にも  
 、これらの非グリコシル化インスリン - F c 融合タンパク質のそれぞれが、グリコシル化  
 型の親物質 ( 配列番号 7 6 ) と比べて、ホモ二量体力価の向上を示すことが発見された。  
 さらに、配列番号 9 1、配列番号 9 2、配列番号 9 3、配列番号 9 4、および配列番号 9  
 5 の、脱グリコシル化インスリン - F c 融合タンパク質のそれぞれについては、ビオチン  
 化 F c - R I 濃度が 3 0 0 0 n g / m L である場合のヒト F c - R I アッセイにおける O  
 D 4 5 0 比 ( O D 4 5 0 比算出に使用される参照インスリン - F c 融合タンパク質が配列  
 番号 7 6 のインスリン - F c 融合タンパク質である場合 ) は全て 0 . 5 0 未満であり、ビ  
 オチン化 C 1 q 濃度が 1 , 0 0 0 n g / m L である場合のヒト C 1 q 結合アッセイにおけ  
 る O D 4 5 0 比 ( O D 4 5 0 比算出に使用される参照インスリン - F c 融合タンパク質が  
 配列番号 7 6 のインスリン - F c 融合タンパク質である場合 ) は全て 0 . 3 5 未満であっ

10

20

30

40

50

た。しかし、配列番号 9 1、配列番号 9 2、配列番号 9 3、配列番号 9 4、および配列番号 9 5 の脱グリコシル化インスリン - F c 融合タンパク質は、その全てが、グリコシル化型の親物質（配列番号 7 6）と比べて、I R 結合親和性が低く（I R アッセイにおける I C 5 0 値が高い）、F c R n 結合親和性が低くなる（E C 5 0 値が高い）ことが明らかとなり、これらの化合物が、インビボにおける生物活性および滞留時間の許容できない低減を示す可能性が高いことが示された。予想外にも、配列番号 1 3 の好ましいリンカーを用いた、配列番号 7 のインスリンポリペプチドと、X<sub>1</sub> が Q である配列番号 7 7 のヒト I g G 1 F c フラグメントと、を含む実施形態（配列番号 9 5）においては、得られた非グリコシル化インスリン - F c 融合タンパク質は、ホモ二量体力価が 1 3 6 m g / L であり、このインスリン - F c 融合タンパク質の構成では、ホモ二量体力価の設計目標である 1 5 0 m g / L が達成されなかった。

10

#### 【0 1 1 2】

図 2 8 は、配列番号 7 5（天然ヒト I g G 2 を含む）および配列番号 7 6（天然ヒト I g G 1 を含む）、並びに、配列番号 7 7 のバリエーションを含む配列である、配列番号 9 1、配列番号 9 2、配列番号 9 3、配列番号 9 4、および配列番号 9 5 の、並列配列比較を示している。「\*」は、所与の配列位置において全ての配列間で完全に相同であることを示しており、一方、「:」、「.」、空白は、それぞれ、所与の配列位置における配列間のアミノ酸変異が保存的であること、中程度であること、または全く異なるものであること、を示している。

#### 【0 1 1 3】

20

前述のイヌインスリン - F c 融合タンパク質の構成に関する予想外の結果から学んだことを適用して、配列番号 9 1、配列番号 9 2、配列番号 9 3、および配列番号 9 4 のインスリン - F c 融合タンパク質の実施形態におけるインスリンポリペプチドの B 鎖上の第 1 6 アミノ酸（B 1 6）をアラニンに変異させた結果、配列番号 7 8（c N g - N B 1 5 5 - S を有する）、配列番号 8 0（c N g - N B 1 5 5 - D を有する）、配列番号 8 2（c N g - N B 1 5 5 - A を有する）、配列番号 8 4（c N g - N B 1 5 5 - R を有する）が得られた。上記の通り B 1 6 アミノ酸をアラニンに変異させて、配列番号 1 0 のインスリンポリペプチドを得た場合の、配列番号 7 8、配列番号 8 0、配列番号 8 2、および配列番号 8 4 のインスリン - F c 融合タンパク質の構成においては、ホモ二量体力価の増加も、F c R I 結合親和性および C 1 q 結合親和性の低減も損なうことなく、許容できるインスリン受容体結合が予想外に回復した（すなわち、I R 結合親和性および F c R n 受容体結合親和性が顕著に増加した）。

30

#### 【0 1 1 4】

好ましい実施形態において、配列番号 7 8 のヒトインスリン - F c 融合タンパク質の構成は、配列番号 1 0 のインスリンポリペプチドと、配列番号 1 3 のリンカーと、配列番号 7 7 のヒト I g G 1 F c フラグメントの c N g - N B 1 5 5 - S 変異体と、を含む。配列番号 7 8 のインスリン - F c 融合タンパク質は、1 5 0 m g / L を超えるホモ二量体力価を示す。以下は、B 1 6 A 変異および c N g - N B 1 5 5 - S 変異に下線が引かれた、配列番号 7 8 のインスリン - F c 融合タンパク質を示している：

F V N Q H L C G S H L V E A L A L V C G E R G F H Y G G G G G G S G G G G G I V  
E Q C C T S T C S L D Q L E N Y C G G G G G Q G G G G Q G G G G Q G G G G G D K  
T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V  
V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y S S T Y R V  
V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q  
P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E  
S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V  
F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G（配列番号 7 8）。

40

#### 【0 1 1 5】

イヌインスリン - F c 融合タンパク質の構成での予想外の発見と同様に、B 1 6 A 変異と、c N g - N B 1 5 5 - S 変異を有するヒト I g G 1 F c フラグメントと、を含む、

50

配列番号 78 の非グリコシル化インスリン - F c 融合タンパク質の実施形態の生物活性は、B 16 A 変異を含んでいない、配列番号 91 の非グリコシル化インスリン - F c 融合タンパク質の実施形態の生物活性と比較して、予想外に回復した（すなわち、I R 結合親和性および F c R n 受容体結合親和性が顕著に増加した）。配列番号 78 のインスリン - F c 融合タンパク質の実施形態は、I R アッセイにおける I C 50 値が 2400 nM 未満、より好ましくは 2000 nM 未満であり、ヒト F c R n アッセイにおける E C 50 値が 1500 ng / L 未満、より好ましくは 1000 ng / mL 未満であり、ビオチン化 F c R I 濃度が 3,000 ng / mL である場合のヒト F c R I アッセイにおける O D 450 比（O D 450 比算出に使用された参照インスリン - F c 融合タンパク質が配列番号 76 のインスリン - F c 融合タンパク質である場合）が 0.50 未満であり、ビオチン化 C 1 q 濃度が 1,000 ng / mL である場合のヒト C 1 q 結合アッセイにおける O D 450 比（O D 450 比算出に使用された参照インスリン - F c 融合タンパク質が配列番号 76 のインスリン - F c 融合タンパク質である場合）が 0.35 未満であることが分かった。  
【0116】

10

好ましい実施形態において、配列番号 80 のインスリン - F c 融合タンパク質は、配列番号 10 のインスリンポリペプチドと、配列番号 13 のリンカーと、配列番号 77（X<sub>1</sub> は D）の F c フラグメントの c N g - N B 155 - D 変異体と、を含む。配列番号 80 のインスリン - F c 融合タンパク質は、ホモ二量体力価が 150 mg / L を超え、I R アッセイにおける I C 50 値が 2400 nM 未満であり、ヒト F c R n アッセイにおける E C 50 値が 1000 ng / mL 未満であり、ビオチン化 F c R I 濃度が 3,000 ng / mL である場合のヒト F c R I アッセイにおける O D 450 比が 0.50 未満であり、ビオチン化 C 1 q 濃度が 1,000 ng / mL である場合のヒト C 1 q 結合アッセイにおける O D 450 比が 0.35 未満であった。以下は、B 16 A 変異および c N g - N B 155 - D 変異に下線が引かれた、配列番号 80 を示している：

20

F V N Q H L C G S H L V E A L A L V C G E R G F H Y G G G G G S G G G G G I V  
E Q C C T S T C S L D Q L E N Y C G G G G G Q G G G G Q G G G G Q G G G G G D K  
T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V  
V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y D S T Y R V  
V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q  
P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E  
S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V  
F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G（配列番号 80）。

30

【0117】

好ましい実施形態において、配列番号 82 のインスリン - F c 融合タンパク質は、配列番号 10 のインスリンポリペプチドと、配列番号 13 のリンカーと、配列番号 77（X<sub>1</sub> は A）の F c フラグメントの c N g - N B 155 - A 変異体と、を含む。配列番号 82 のインスリン - F c 融合タンパク質は、ホモ二量体力価が 150 mg / L を超え、I R アッセイにおける I C 50 値が 2400 nM 未満であり、ヒト F c R n アッセイにおける E C 50 値が 1000 ng / mL 未満であり、ビオチン化 F c R I 濃度が 3,000 ng / mL である場合のヒト F c R I アッセイにおける O D 450 比が 0.50 未満であり、ビオチン化 C 1 q 濃度が 1,000 ng / mL である場合のヒト C 1 q 結合アッセイにおける O D 450 比が 0.35 未満であった。以下は、B 16 A 変異および c N g - N B 155 - A 変異に下線が引かれた、配列番号 82 を示している：

40

F V N Q H L C G S H L V E A L A L V C G E R G F H Y G G G G G S G G G G G I V  
E Q C C T S T C S L D Q L E N Y C G G G G G Q G G G G Q G G G G Q G G G G G D K  
T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V  
V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y A S T Y R V  
V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q  
P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E  
S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V

50

F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G (配列番号 8 2)。

【 0 1 1 8 】

好ましい実施形態において、配列番号 8 4 のインスリン - F c 融合タンパク質は、配列番号 1 0 のインスリンポリペプチドと、配列番号 1 3 のリンカーと、配列番号 7 7 (X<sub>1</sub> は R) の F c フラグメントの c N g - N B 1 5 5 - R 変異体と、を含む。配列番号 8 4 のインスリン - F c 融合タンパク質は、ホモ二量体力価が 1 5 0 m g / L を超え、I R アッセイにおける I C 5 0 値が 2 4 0 0 n M 未満であり、ヒト F c R n アッセイにおける E C 5 0 値が 1 0 0 0 n g / m L 未満であり、ビオチン化 F c R I 濃度が 3 , 0 0 0 n g / m L である場合のヒト F c R I アッセイにおける O D 4 5 0 比が 0 . 5 0 未満であり、ビオチン化 C 1 q 濃度が 1 , 0 0 0 n g / m L である場合のヒト C 1 q 結合アッセイにおける O D 4 5 0 比が 0 . 3 5 未満であった。以下は、B 1 6 A 変異および c N g - N B 1 5 5 - R 変異に下線が引かれた、配列番号 8 4 を示している：

F V N Q H L C G S H L V E A L A L V C G E R G F H Y G G G G G G S G G G G G I V  
E Q C C T S T C S L D Q L E N Y C G G G G G Q G G G G Q G G G G Q G G G G G D K  
T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V  
V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y R S T Y R V  
V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q  
P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E  
S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V  
F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G (配列番号 8 4)。

【 0 1 1 9 】

配列番号 7 8 での場合のように、c N g - N B 1 5 5 - D 変異、c N g - N B 1 5 5 - A 変異、c N g - N B 1 5 5 - R 変異、および c N g - N B 1 5 5 - Q 変異を有する各ヒト I g G 1 F c フラグメントを含む非グリコシル化インスリン - F c 融合タンパク質の構成 (配列番号 9 2、配列番号 9 3、配列番号 9 4、および配列番号 9 5) の生物活性は、当該インスリンポリペプチドの B 鎖上の第 1 6 番アミノ酸 (B 1 6) をアラニンに変異させた (配列番号 1 0 のインスリンポリペプチドを得た) 場合、配列番号 9 2、配列番号 9 3、および配列番号 9 4 の非グリコシル化インスリン - F c 融合タンパク質の構成の、ホモ二量体力価の増加も、F c R I 結合親和性および C 1 q 結合親和性の低減も損なうことなく、回復した (すなわち、すなわち、I R 結合親和性および F c R n 受容体結合親和性が顕著に増加した) (前述の通り、配列番号 9 5 のインスリン - F c 融合タンパク質の構成のホモ二量体力価は設計目標である 1 5 0 m g / L を達成しなかった)。

【 0 1 2 0 】

しかし、配列番号 1 0 のインスリンポリペプチドと、配列番号 1 3 のリンカーと、配列番号 7 7 (X<sub>1</sub> は Q) の F c フラグメントの c N g - N B 1 5 5 - Q 変異体と、を含む配列番号 8 6 のインスリン - F c 融合タンパク質は、配列番号 9 5 の非グリコシル化インスリン - F c 融合タンパク質の構成の、F c R I 結合親和性および C 1 q 結合親和性における低減を示さなかったが、配列番号 8 6 のインスリン - F c 融合タンパク質の構成のホモ二量体力価は、配列番号 9 5 のホモ二量体力価から 1 1 1 m g / L までさらに低下しており、1 5 0 m g / L を超えるホモ二量体力価という、インスリン - F c 融合タンパク質の設計目標を達成していない。以下は、B 1 6 A 変異および c N g - N B 1 5 5 - Q 変異に下線が引かれた、配列番号 8 6 を示している：

F V N Q H L C G S H L V E A L A L V C G E R G F H Y G G G G G G S G G G G G I V  
E Q C C T S T C S L D Q L E N Y C G G G G G Q G G G G Q G G G G Q G G G G G D K  
T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V  
V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y Q S T Y R V  
V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q  
P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E  
S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V  
F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G (配列番号 8 6)。

## 【 0 1 2 1 】

これらの結果から、ヒト I g G 1 F c フラグメント上の c N g 変異の選択と、インスリンポリペプチドの組成との間には、予想外且つ顕著な相互作用があることが示されたため、得られるインスリン - F c 融合タンパク質の I R 結合親和性および F c R n 結合親和性に関して好ましい構成を特定するための実験法が必要である。

## 【 0 1 2 2 】

いくつかの構成において、本明細書に記載のインスリン - F c 融合タンパク質の構成は、N末端にリーダーアミノ酸配列を含まない。他の構成において、本明細書に記載のインスリン - F c 融合タンパク質の構成は、N末端などに、リーダー配列を含む。いくつかの実施形態において、例示的なリーダー配列としては、アミノ酸配列：

M E W S W V F L F F L S V T T G V H S ( 配列番号 2 4 )

が挙げられる。いくつかの実施形態において、本明細書に記載のインスリン - F c 融合タンパク質の構成は、細胞（例えば、真核細胞、例えば、哺乳類細胞）での発現（例えば、組み換え発現）などのためのリーダー配列を含む核酸分子にコードされている。ある実施形態では、リーダー配列は、細胞培養などにおいて、発現中に切断される。リーダー配列をコードする例示的な核酸配列としては、核酸配列：

a t g g a a t g g a g c t g g g t c t t t c t c t t c t t c c t g t c a g t a a  
c g a c t g g t g t c c a c t c c ( 配列番号 2 3 )

が挙げられる。実施形態において、配列番号 2 3 の例示的な核酸は、配列番号 2 4 の例示的なリーダー配列をコードする。

## 【 0 1 2 3 】

配列番号 7 8 のインスリン - F c 融合タンパク質の構成を含む好ましい実施形態において、核酸配列（リーダー配列は下線部）は以下である：

a t g g a a t g g a g c t g g g t c t t t c t c t t c t t c c t g t c a g t a a  
c g a c t g g t g t c c a c t c c t t c g t g a a c c a g c a c c t g t g c g g  
c t c c c a c c t g g t g g a a g c t c t g g c a c t c g t g t g c g g c g a g  
c g g g g c t t c c a c t a c g g g g g t g g c g g a g g a g g t t c t g g t g  
g c g g c g g a g g c a t c g t g g a a c a g t g c t g c a c c t c c a c c t g  
c t c c c t g g a c c a g c t g g a a a a c t a c t g c g g t g g c g g a g g t  
g g t c a a g g a g g c g g t g g a c a g g g t g g a g g t g g g c a g g g a g  
g a g g c g g g g a g a c a a a a c t c a c a c a t g c c c a c c g t g c c c  
a g c a c c t g a a c t c c t g g g g g a c c g t c a g t c t t c c t c t t c  
c c c c c a a a a c c c a a g g a c a c c c t c a t g a t c t c c c g g a c c c  
c t g a g g t c a c a t g c g t g g t g g t g g a c g t g a g c c a c g a a g a  
c c c t g a g g t c a a g t t c a a c t g g t a c g t g g a c g g c g t g g a g  
g t g c a t a a t g c c a a g a c a a a g c c g c g g a g g a g c a g t a c a  
g c a g c a c g t a c c g t g t g g t c a g c g t c c t c a c c g t c c t g c a  
c c a g g a c t g g c t g a a t g g c a a g g a g t a c a a g t g c a a g g t c  
t c c a a c a a a g c c c t c c c a g c c c c a t c g a g a a a a c c a t c t  
c c a a a g c c a a a g g g c a g c c c c g a g a a c c a c a g g t g t a c a c  
c c t g c c c c c a t c c c g g g a t g a g c t g a c c a a g a a c c a g g t c  
a g c c t g a c c t g c c t g g t c a a a g g c t t c t a t c c c a g c g a c a  
t c g c c g t g g a g t g g g a g a g c a a t g g g c a g c c g g a g a a c a a  
c t a c a a g a c c a c g c c t c c c g t g c t g g a c t c c g a c g g c t c c  
t t c t t c c t c t a c a g c a a g c t c a c c g t g g a c a a g a g c a g g t  
g g c a g c a g g g g a a c g t c t t c t c a t g c t c c g t g a t g c a t g a  
g g c t c t g c a c a a c c a c t a c a c g c a g a a g a g c c t c t c c c t g  
t c t c c g g g t t a g ( 配列番号 7 9 ) 。

## 【 0 1 2 4 】

配列番号 8 0 のインスリン - F c 融合タンパク質の構成を含む好ましい実施形態におい

て、核酸配列（リーダー配列は下線部）は以下である：

a t g g a a t g g a g c t g g g t c t t t c t c t t c t t c c t g t c a g t a a  
c g a c t g g t g t c c a c t c c t t c g t g a a c c a g c a c c t g t g c g g  
 c t c c c a c c t g g t g g a a g c t c t g g c a c t c g t g t g c g g c g a g  
 c g g g g c t t c c a c t a c g g g g g t g g c g g a g g a g g t t c t g g t g  
 g c g g c g g a g g c a t c g t g g a a c a g t g c t g c a c c t c c a c c t g  
 c t c c c t g g a c c a g c t g g a a a a c t a c t g c g g t g g c g g a g g t  
 g g t c a a g g a g g c g g t g g a c a g g g t g g a g g t g g g c a g g g a g  
 g a g g c g g g g a g a c a a a a c t c a c a c a t g c c c a c c g t g c c c  
 a g c a c c t g a a c t c c t g g g g g a c c g t c a g t c t t c c t c t t c  
 c c c c c a a a a c c c a a g g a c a c c c t c a t g a t c t c c c g g a c c c  
 c t g a g g t c a c a t g c g t g g t g g t g g a c g t g a g c c a c g a a g a  
 c c c t g a g g t c a a g t t c a a c t g g t a c g t g g a c g g c g t g g a g  
 g t g c a t a a t g c c a a g a c a a a g c c g c g g g a g g a g c a g t a c g  
 a c a g c a c g t a c c g t g t g g t c a g c g t c c t c a c c g t c c t g c a  
 c c a g g a c t g g c t g a a t g g c a a g g a g t a c a a g t g c a a g g t c  
 t c c a a c a a a g c c c t c c c a g c c c c a t c g a g a a a a c c a t c t  
 c c a a a g c c a a a g g g c a g c c c c g a g a a c c a c a g g t g t a c a c  
 c c t g c c c c c a t c c c g g g a t g a g c t g a c c a a g a a c c a g g t c  
 a g c c t g a c c t g c c t g g t c a a a g g c t t c t a t c c c a g c g a c a  
 t c g c c g t g g a g t g g g a g a g c a a t g g g c a g c c g g a g a a c a a  
 c t a c a a g a c c a c g c c t c c c g t g c t g g a c t c c g a c g g c t c c  
 t t c t t c c t c t a c a g c a a g c t c a c c g t g g a c a a g a g c a g g t  
 g g c a g c a g g g g a a c g t c t t c t c a t g c t c c g t g a t g c a t g a  
 g g c t c t g c a c a a c c a c t a c a c g c a g a a g a g c c t c t c c c t g  
 t c t c c g g g t t a g（配列番号 81）。

【0125】

配列番号 82 のインスリン - Fc 融合タンパク質の構成を含む実施形態において、核酸配列（リーダー配列は下線部）は以下である：

a t g g a a t g g a g c t g g g t c t t t c t c t t c t t c c t g t c a g t a a  
c g a c t g g t g t c c a c t c c t t c g t g a a c c a g c a c c t g t g c g g  
 c t c c c a c c t g g t g g a a g c t c t g g c a c t c g t g t g c g g c g a g  
 c g g g g c t t c c a c t a c g g g g g t g g c g g a g g a g g t t c t g g t g  
 g c g g c g g a g g c a t c g t g g a a c a g t g c t g c a c c t c c a c c t g  
 c t c c c t g g a c c a g c t g g a a a a c t a c t g c g g t g g c g g a g g t  
 g g t c a a g g a g g c g g t g g a c a g g g t g g a g g t g g g c a g g g a g  
 g a g g c g g g g a g a c a a a a c t c a c a c a t g c c c a c c g t g c c c  
 a g c a c c t g a a c t c c t g g g g g a c c g t c a g t c t t c c t c t t c  
 c c c c c a a a a c c c a a g g a c a c c c t c a t g a t c t c c c g g a c c c  
 c t g a g g t c a c a t g c g t g g t g g t g g a c g t g a g c c a c g a a g a  
 c c c t g a g g t c a a g t t c a a c t g g t a c g t g g a c g g c g t g g a g  
 g t g c a t a a t g c c a a g a c a a a g c c g c g g g a g g a g c a g t a c g  
 c c a g c a c g t a c c g t g t g g t c a g c g t c c t c a c c g t c c t g c a  
 c c a g g a c t g g c t g a a t g g c a a g g a g t a c a a g t g c a a g g t c  
 t c c a a c a a a g c c c t c c c a g c c c c a t c g a g a a a a c c a t c t  
 c c a a a g c c a a a g g g c a g c c c c g a g a a c c a c a g g t g t a c a c  
 c c t g c c c c c a t c c c g g g a t g a g c t g a c c a a g a a c c a g g t c  
 a g c c t g a c c t g c c t g g t c a a a g g c t t c t a t c c c a g c g a c a  
 t c g c c g t g g a g t g g g a g a g c a a t g g g c a g c c g g a g a a c a a  
 c t a c a a g a c c a c g c c t c c c g t g c t g g a c t c c g a c g g c t c c

10

20

30

40

50

t t c t t c c t c t a c a g c a a g c t c a c c g t g g a c a a g a g c a g g t  
g g c a g c a g g g a a c g t c t t c t c a t g c t c c g t g a t g c a t g a  
g g c t c t g c a c a a c c a c t a c a c g c a g a a g a g c c t c t c c c t g  
t c t c c g g g t t a g ( 配列番号 83 )。

【 0 1 2 6 】

配列番号 84 のインスリン - Fc 融合タンパク質の構成を含む好ましい実施形態において、核酸配列 ( リーダー配列は下線部 ) は以下である :

a t g g a a t g g a g c t g g g t c t t t c t c t t c t t c c t g t c a g t a a  
c g a c t g g t g t c c a c t c c t t c g t g a a c c a g c a c c t g t g c g g  
c t c c c a c c t g g t g g a a g c t c t g g c a c t c g t g t g c g g c g a g  
c g g g g c t t c c a c t a c g g g g g t g g c g g a g g a g g t t c t g g t g  
g c g g c g g a g g c a t c g t g g a a c a g t g c t g c a c c t c c a c c t g  
c t c c c t g g a c c a g c t g g a a a a c t a c t g c g g t g g c g g a g g t  
g g t c a a g g a g g c g g t g g a c a g g g t g g a g g t g g g c a g g g a g  
g a g g c g g g g g a g a c a a a a c t c a c a c a t g c c c a c c g t g c c c  
a g c a c c t g a a c t c c t g g g g g g a c c g t c a g t c t t c c t c t t c  
c c c c c a a a a c c c a a g g a c a c c c t c a t g a t c t c c c g g a c c c  
c t g a g g t c a c a t g c g t g g t g g t g g a c g t g a g c c a c g a a g a  
c c c t g a g g t c a a g t t c a a c t g g t a c g t g g a c g g c g t g g a g  
g t g c a t a a t g c c a a g a c a a a g c c g c g g g a g g a g c a g t a c a  
g a a g c a c g t a c c g t g t g g t c a g c g t c c t c a c c g t c c t g c a  
c c a g g a c t g g c t g a a t g g c a a g g a g t a c a a g t g c a a g g t c  
t c c a a c a a a g c c c t c c c a g c c c c a t c g a g a a a a c c a t c t  
c c a a a g c c a a a g g g c a g c c c c g a g a a c c a c a g g t g t a c a c  
c c t g c c c c c a t c c c g g g a t g a g c t g a c c a a g a a c c a g g t c  
a g c c t g a c c t g c c t g g t c a a a g g c t t c t a t c c c a g c g a c a  
t c g c c g t g g a g t g g g a g a g c a a t g g g c a g c c g g a g a a c a a  
c t a c a a g a c c a c g c c t c c c g t g c t g g a c t c c g a c g g c t c c  
t t c t t c c t c t a c a g c a a g c t c a c c g t g g a c a a g a g c a g g t  
g g c a g c a g g g g a a c g t c t t c t c a t g c t c c g t g a t g c a t g a  
g g c t c t g c a c a a c c a c t a c a c g c a g a a g a g c c t c t c c c t g  
t c t c c g g g t t a g ( 配列番号 85 )。

【 0 1 2 7 】

配列番号 86 のインスリン - Fc 融合タンパク質の構成を含む好ましい実施形態において、核酸配列 ( リーダー配列は下線部 ) は以下である :

a t g g a a t g g a g c t g g g t c t t t c t c t t c t t c c t g t c a g t a a  
c g a c t g g t g t c c a c t c c t t c g t g a a c c a g c a c c t g t g c g g  
c t c c c a c c t g g t g g a a g c t c t g g c a c t c g t g t g c g g c g a g  
c g g g g c t t c c a c t a c g g g g g t g g c g g a g g a g g t t c t g g t g  
g c g g c g g a g g c a t c g t g g a a c a g t g c t g c a c c t c c a c c t g  
c t c c c t g g a c c a g c t g g a a a a c t a c t g c g g t g g c g g a g g t  
g g t c a a g g a g g c g g t g g a c a g g g t g g a g g t g g g c a g g g a g  
g a g g c g g g g g a g a c a a a a c t c a c a c a t g c c c a c c g t g c c c  
a g c a c c t g a a c t c c t g g g g g g a c c g t c a g t c t t c c t c t t c  
c c c c c a a a a c c c a a g g a c a c c c t c a t g a t c t c c c g g a c c c  
c t g a g g t c a c a t g c g t g g t g g t g g a c g t g a g c c a c g a a g a  
c c c t g a g g t c a a g t t c a a c t g g t a c g t g g a c g g c g t g g a g  
g t g c a t a a t g c c a a g a c a a a g c c g c g g g a g g a g c a g t a c c  
a a a g c a c g t a c c g t g t g g t c a g c g t c c t c a c c g t c c t g c a  
c c a g g a c t g g c t g a a t g g c a a g g a g t a c a a g t g c a a g g t c

t c c a a c a a a g c c c t c c c a g c c c c c a t c g a g a a a a c c a t c t  
 c c a a a g c c a a a g g g c a g c c c c g a g a a c c a c a g g t g t a c a c  
 c c t g c c c c c a t c c c g g g a t g a g c t g a c c a a g a a c c a g g t c  
 a g c c t g a c c t g c c t g g t c a a a g g c t t c t a t c c c a g c g a c a  
 t c g c c g t g g a g t g g g a g a g c a a t g g g c a g c c g g a g a a c a a  
 c t a c a a g a c c a c g c c t c c c g t g c t g g a c t c c g a c g g c t c c  
 t t c t t c c t c t a c a g c a a g c t c a c c g t g g a c a a g a g c a g g t  
 g g c a g c a g g g g a a c g t c t t c t c a t g c t c c g t g a t g c a t g a  
 g g c t c t g c a c a a c c a c t a c a c g c a g a a g a g c c t c t c c c t g  
 t c t c c g g g t t a g ( 配列番号 100 )。

10

【 0128】

用途によっては、インスリン - Fc 融合タンパク質に対して共有結合修飾を行うことで、その特性をさらに改変することが望ましい場合がある。例えば、Dozier, J.; Distefano, M., Site-Specific PEGylation of Therapeutic Proteins., Int. J. Mol. Sci., 2015 年、16 巻 (10 号)、pp25831 ~ 25864) に記載されているように、インスリン - Fc 融合タンパク質を、様々な長さのポリエチレングリコール (PEG) 分子に複合することで、その循環半減期をさらに延長させてもよい。1つのそのような複合法は、アシル転移反応を介して一級アミン (例えば、PEG 分子の末端) とグルタミン (例えば標的タンパク質上の Q、例えば標的インスリン - Fc 融合タンパク質上の Q) のカルボキサミド基との間に共有結合を形成する、トランスグルタミナーゼ (TGase) と呼ばれる酵素クラスに基づくものである (Dozier, J.; Distefano, M., p25853)。配列番号 86 および配列番号 95 のインスリン - Fc 融合タンパク質の NB153 位の Q は、好ましい TGase 結合部位であるが、インスリン - Fc 融合タンパク質はそれぞれが GGGGGQGGGGQGGGGQGGGGG (配列番号 13) リンカーを含んでいるため、そのリンカーも当該 Q 残基に結合することとなる。そのため、リンカーの Q 部位における望ましくない TGase 結合を最小限にするため、リンカーにおけるグルタミン (Q) のアラニン (A) への変異を調べた。従って、好ましい実施形態において、配列番号 87 のインスリン - Fc 融合タンパク質は、配列番号 10 のインスリンポリペプチドと、GGGGGAGGGGAGGGGAGGGGG (配列番号 67) のリンカーと、配列番号 77 (X<sub>1</sub> は S) の Fc フラグメントの cNg - NB155 - S 変異体と、を含む。配列番号 87 のインスリン - Fc 融合タンパク質は、ホモ二量体力価が 150 mg/L を超え、IR アッセイにおける IC50 値が 2400 nM 未満であり、ヒト FcRn アッセイにおける EC50 値が 1000 ng/mL 未満であり、ビオチン化 FcRI 濃度が 3,000 ng/mL である場合のヒト FcRI アッセイにおける OD450 比が 0.50 未満であり、ビオチン化 C1q 濃度が 1,000 ng/mL である場合のヒト C1q 結合アッセイにおける OD450 比が 0.35 未満であった。以下は、B16A 変異および cNg - NB155 - S 変異、並びにリンカー配列に下線が引かれた、配列番号 87 を示している：

20

30

FVNQHLCGSHLVEALALLVCGERGFHYGGGGGGSGGGGGGIV  
 EQCCTSTCSDLQLENYCGGGGGAGGGGAGGGGAGGGGGDK  
 THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV  
 VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYSSTYRV  
 VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKISKAKGQ  
 PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE  
 SNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV  
 FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLSPG ( 配列番号 87 )。

40

【 0129】

配列番号 87 のインスリン - Fc 融合タンパク質を含む実施形態において、核酸配列 (リーダー配列は下線部) は以下である：

50

a t g g a a t g g a g c t g g g t c t t t c t c t t c t t c c t g t c a g t a a  
c g a c t g g t g t c c a c t c c t t c g t g a a c c a g c a c c t g t g c g g  
c t c c c a c c t g g t g g a a g c t c t g g c a c t c g t g t g c g g c g a g  
c g g g g c t t c c a c t a c g g g g g t g g c g g a g g a g g t t c t g g t g  
g c g g c g g a g g c a t c g t g g a a c a g t g c t g c a c c t c c a c c t g  
c t c c c t g g a c c a g c t g g a a a a c t a c t g c g g t g g c g g a g g t  
g g t g c a g g a g g c g g t g g a g c c g g t g g a g g t g g g g c t g g a g  
g a g g c g g g g a g a c a a a a c t c a c a c a t g c c c a c c g t g c c c  
a g c a c c t g a a c t c c t g g g g g g a c c g t c a g t c t t c c t c t t c  
c c c c c a a a a c c c a a g g a c a c c c t c a t g a t c t c c c g g a c c c  
c t g a g g t c a c a t g c g t g g t g g t g g a c g t g a g c c a c g a a g a  
c c c t g a g g t c a a g t t c a a c t g g t a c g t g g a c g g c g t g g a g  
g t g c a t a a t g c c a a g a c a a a g c c g c g g g a g g a g c a g t a c a  
g c a g c a c g t a c c g t g t g g t c a g c g t c c t c a c c g t c c t g c a  
c c a g g a c t g g c t g a a t g g c a a g g a g t a c a a g t g c a a g g t c  
t c c a a c a a a g c c c t c c c a g c c c c a t c g a g a a a a c c a t c t  
c c a a a g c c a a a g g g c a g c c c c g a g a a c c a c a g g t g t a c a c  
c c t g c c c c c a t c c c g g g a t g a g c t g a c c a a g a a c c a g g t c  
a g c c t g a c c t g c c t g g t c a a a g g c t t c t a t c c c a g c g a c a  
t c g c c g t g g a g t g g g a g a g c a a t g g g c a g c c g g a g a a c a a  
c t a c a a g a c c a c g c c t c c c g t g c t g g a c t c c g a c g g c t c c  
t t c t t c c t c t a c a g c a a g c t c a c c g t g g a c a a g a g c a g g t  
g g c a g c a g g g g a a c g t c t t c t c a t g c t c c g t g a t g c a t g a  
g g c t c t g c a c a a c c a c t a c a c g c a g a a g a g c c t c t c c c t g  
t c t c c g g g t t a g ( 配列番号 88 )。

10

20

## 【 0 1 3 0 】

F c 融合タンパク質複合体におけるリンカーの長さは、収量から生物活性の範囲にわたって、当該融合タンパク質の特徴に影響を与えることが知られている。従って、リンカーを短くしたインスリン - F c 融合タンパク質の構成を試験にかけ、リンカーの長さによる収量や機能の増減を求めた。別の好ましい実施形態において、配列番号 89 のインスリン - F c 融合タンパク質は、配列番号 10 のインスリンポリペプチドと、G G G G A G G G G ( 配列番号 11 ) のリンカーと、配列番号 77 ( X<sub>1</sub> は S ) の F c フラグメントの c N g - N B 1 5 5 - S 変異体と、を含む。配列番号 89 のインスリン - F c 融合タンパク質は、ホモ二量体力価が 1 5 0 m g / L を超え、I R アッセイにおける I C 5 0 値が 2 4 0 0 n M 未満であり、ヒト F c R n アッセイにおける E C 5 0 値が 1 0 0 0 n g / m L 未満であり、ビオチン化 F c R I 濃度が 3 , 0 0 0 n g / m L である場合のヒト F c R I アッセイにおける O D 4 5 0 比が 0 . 5 0 未満であり、ビオチン化 C 1 q 濃度が 1 , 0 0 0 n g / m L である場合のヒト C 1 q 結合アッセイにおける O D 4 5 0 比が 0 . 3 5 未満であった。

30

## 【 0 1 3 1 】

以下は、B 1 6 A 変異および c N g - N B 1 5 5 - S 変異、並びにリンカー配列に下線が引かれた、配列番号 89 を示している：

F V N Q H L C G S H L V E A L A L V C G E R G F H Y G G G G G S G G G G I V  
E Q C C T S T C S L D Q L E N Y C G G G G A G G G G D K T H T C P P C P A P E L  
L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K  
F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y S S T Y R V V S V L T V L H Q D W L  
N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S  
R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T  
P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N  
H Y T Q K S L S L S P G ( 配列番号 89 )。

40

50

## 【 0 1 3 2 】

配列番号 89 のインスリン - Fc 融合タンパク質を含む実施形態において、核酸配列（リーダー配列は下線部）は以下である：

a t g g a a t g g a g c t g g g t c t t t c t c t t c t t c c t g t c a g t a a  
c g a c t g g t g t c c a c t c c t t c g t g a a c c a g c a c c t g t g c g g  
c t c c c a c c t g g t g g a a g c t c t g g c a c t c g t g t g c g g c g a g  
c g g g g c t t c c a c t a c g g g g g t g g c g g a g g a g g t t c t g g t g  
g c g g c g g a g g c a t c g t g g a a c a g t g c t g c a c c t c c a c c t g  
c t c c c t g g a c c a g c t g g a a a a c t a c t g c g g t g g c g g a g g t  
g c c g g a g g c g g g g g a g a c a a a a c t c a c a c a t g c c c a c c g t  
g c c c a g c a c c t g a a c t c c t g g g g g a c c g t c a g t c t t c c t  
c t t c c c c c a a a a c c c a a g g a c a c c c t c a t g a t c t c c c g g  
a c c c c t g a g g t c a c a t g c g t g g t g g t g g a c g t g a g c c a c g  
a a g a c c c t g a g g t c a a g t t c a a c t g g t a c g t g g a c g g c g t  
g g a g g t g c a t a a t g c c a a g a c a a a g c c g c g g g a g g a g c a g  
t a c a g c a g c a c g t a c c g t g t g g t c a g c g t c c t c a c c g t c c  
t g c a c c a g g a c t g g c t g a a t g g c a a g g a g t a c a a g t g c a a  
g g t c t c c a a c a a a g c c c t c c c a g c c c c a t c g a g a a a a c c  
a t c t c c a a a g c c a a a g g g c a g c c c c g a g a a c c a c a g g t g t  
a c a c c c t g c c c c c a t c c c g g g a t g a g c t g a c c a a g a a c c a  
g g t c a g c c t g a c c t g c c t g g t c a a a g g c t t c t a t c c c a g c  
g a c a t c g c c g t g g a g t g g g a g a g c a a t g g g c a g c c g g a g a  
a c a a c t a c a a g a c c a c g c c t c c c g t g c t g g a c t c c g a c g g  
c t c c t t c t t c c t c t a c a g c a a g c t c a c c g t g g a c a a g a g c  
a g g t g g c a g c a g g g g a a c g t c t t c t c a t g c t c c g t g a t g c  
a t g a g g c t c t g c a c a a c c a c t a c a c g c a g a a g a g c c t c t c  
c c t g t c t c c g g g t t a g（配列番号 90）。

10

20

## 【 0 1 3 3 】

通常の好ましい構成において、配列番号 77（X<sub>1</sub> は S、D、A、または R）の、免疫原性の低い、非グリコシル化型の、cNg 変異型のヒト IgG1 Fc フラグメントを、  
配列番号 10 の好ましい B16A 変異型インスリンポリペプチドおよび各種リンカー（配列番号 11、配列番号 13、配列番号 67）と組み合わせると、糖尿病患者における長期に亘る週 1 回投与を可能にするのに十分なインビボ効力および作用持続時間を示すことが期待される、高いホモ二量体力価をもたらす、生物活性を示し、非免疫原性である、ヒトインスリン - Fc 融合タンパク質の構成ファミリーが得られる。

30

## 【 0 1 3 4 】

インスリン - Fc 融合タンパク質の生産

実施形態において、融合タンパク質は、実施例のセクションでより詳細に記載されるように、細胞に発現させることができる。

## 【 0 1 3 5 】

発現および精製

実施形態において、インスリン - Fc 融合タンパク質は、哺乳類細胞や非哺乳類細胞などの真核細胞などにおいて、組換え発現することができる。発現に用いられる例示的な哺乳類細胞としては、HEK 細胞（例えば、HEK 293 細胞）または CHO 細胞が挙げられる。CHO 細胞は種々の株やサブクラスに細分することができ（例えば、CHO DG 44、CHO - M、および CHO - K1）、これらの細胞株のいくつかは、実施例セクションに記載されるような、特定の種類の核酸分子（例えば、DNA を含むベクター）や特定の細胞増殖培地組成との使用を最適化するために、遺伝子改変されていてもよい。実施形態において、細胞は、インスリン - Fc 融合タンパク質をコードする核酸分子（例えば、ベクター）（例えば、インスリン - Fc 融合タンパク質全体が単一の核酸分子にコード

40

50

されている)でトランスフェクトされる。実施形態において、H E K 2 9 3 細胞は、インスリン - F c 融合タンパク質をコードするベクターでトランスフェクトしても、当該宿主細胞がはっきり認められるレベルのインスリン - F c 融合タンパク質を発現しなくなるまでの期間(例えば、3日間、4日間、5日間、7日間、10日間、12日間、14日間、またはそれ以上)、インスリン - F c 融合タンパク質を一次的に発現するのみである(すなわち、一過性トランスフェクション)。インスリン - F c 融合タンパク質をコードする核酸配列で一過性にトランスフェクトされたH E K 2 9 3 細胞は、複数のインスリン - F c 融合タンパク質候補の作製と選別を容易にする、より迅速な組換えタンパク質生産を可能にする場合が多い。実施形態において、C H O 細胞は、宿主細胞D N A に恒久的に組み込まれ、細胞が適切に培養されている限りインスリン - F c 融合タンパク質の一貫性のある永続的な発現(すなわち、安定なトランスフェクション)をもたらす、ベクターでトランスフェクトされる。インスリン - F c 融合タンパク質をコードする核酸で安定にトランスフェクトされたC H O 細胞およびC H O 細胞株は、成長するのにより時間がかかる場合があるが、より高い総タンパク質収量が得られる場合が多く、低コスト製品(例えば、比較的小モディティ化が進んだヒトインスリン市場用の製品)の製造により適している。細胞および細胞株は、当該技術分野における標準方法を用いて培養することができる。

10

#### 【0136】

好ましい実施形態において、配列番号79を含むc D N A 配列(配列番号78のインスリン - F c 融合タンパク質の実施形態に対応)、配列番号81を含むc D N A 配列(配列番号80のインスリン - F c 融合タンパク質の実施形態に対応)、配列番号83を含むc D N A 配列(配列番号82のインスリン - F c 融合タンパク質の実施形態に対応)、配列番号85を含むc D N A 配列(配列番号84のインスリン - F c 融合タンパク質の実施形態に対応)、配列番号88を含むc D N A 配列(配列番号87のインスリン - F c 融合タンパク質の実施形態に対応)、および配列番号90を含むc D N A 配列(配列番号89のインスリン - F c 融合タンパク質の実施形態に対応)のうちの1つを含むH E K 細胞を用いて、インスリン - F c 融合タンパク質が発現される。好ましい実施形態において、配列番号79を含むc D N A 配列(配列番号78のインスリン - F c 融合タンパク質の実施形態に対応)、配列番号81を含むc D N A 配列(配列番号80のインスリン - F c 融合タンパク質の実施形態に対応)、配列番号83を含むc D N A 配列(配列番号82のインスリン - F c 融合タンパク質の実施形態に対応)、配列番号85を含むc D N A 配列(配列番号84のインスリン - F c 融合タンパク質の実施形態に対応)、配列番号88を含むc D N A 配列(配列番号87のインスリン - F c 融合タンパク質の実施形態に対応)、および配列番号90を含むc D N A 配列(配列番号89のインスリン - F c 融合タンパク質の実施形態に対応)のうちの1つを含むC H O 細胞を用いて、インスリン - F c 融合タンパク質が発現される。

20

30

#### 【0137】

いくつかの実施形態において、インスリン - F c 融合タンパク質は、細胞から(例えば、細胞の溶解によって)精製または単離される。他の実施形態では、インスリン - F c 融合タンパク質は、細胞によって分泌され、細胞が成長した細胞培地から精製または単離される。インスリン - F c 融合タンパク質の精製は、カラムクロマトグラフィ(例えば、アフィニティークロマトグラフィー)の使用、または、サイズの違い、電荷の違い、および/もしくは特定の分子に対する親和性の違いに基づいた他の分離法の使用を含むことができる。実施形態において、インスリン - F c 融合タンパク質の精製は、例えば、F c フラグメントを含むタンパク質を、プロテインAビーズに共有結合したプロテインAに、中性溶液p Hにおいて高い親和性で結合させる、プロテインAビーズまたはプロテインAカラムを用いることで、F c フラグメントを含むタンパク質を、選別または濃縮することを含む。次いで、結合したインスリン - F c 融合タンパク質は、溶液における変量を変化(例えば、溶液p Hを低下)させることで、プロテインAビーズから溶離させることができる。イオン交換クロマトグラフィーおよび/またはゲル濾過クロマトグラフィーなどの他の分離法を、代わりにまたは追加で使用することもできる。実施形態において、インスリン

40

50

- F c 融合タンパク質の精製は、タンパク質調製物の濾過または遠心分離をさらに含む。実施形態において、インスリン - F c 融合タンパク質のさらなる精製は、ダイアフィルトレーション、限外濾過、および各種サイズの多孔質膜を通す濾過を含み、さらに、医薬品添加物による最終的な製剤化が行われる。

#### 【0138】

精製インスリン - F c 融合タンパク質は、純度、総タンパク質収量、構造、および/または活性などについて、種々の方法、例えば、280 nmにおける吸光度（例えば、総タンパク質収量を測定するため）、分子ふるいまたはキャピラリー電気泳動（例えば、分子量、凝集率、および/または純度を測定するため）、質量分析（MS）および/もしくは液体クロマトグラフィー（LC-MS）（例えば、純度および/またはグリコシル化を測定するため）、並びに/または、ELISA（例えば、抗インスリン抗体に対する結合の程度、例えば親和性、を測定するため）を用いて、特徴付けすることができる。例示的な特徴付け方法も、実施例セクションに記載される。

10

#### 【0139】

実施形態において、一過性にトランスフェクトされたHEK細胞で産生され、プロテインA精製された後の、インスリン - F c 融合タンパク質の総タンパク質収量は、5 mg / L 超、10 mg / L 超、または20 mg / L 超である。好ましい実施形態において、一過性にトランスフェクトされたHEK細胞で産生され、プロテインA精製された後の、ヒトインスリン - F c 融合タンパク質の総タンパク質収量は、100 mg / L 超（例えば、150 mg / L 超）である。実施形態において、一過性にトランスフェクトされたHEK細胞で産生され、プロテインA精製された後の、インスリン - F c 融合タンパク質のホモ二量体率は、70 % 超（例えば、80 % 超、85 % 超、90 % 超、95 % 超、96 % 超、97 % 超、98 % 超、99 % 超）である。好ましい実施形態において、インスリン - F c 融合体の総タンパク質収量とホモ二量体率との積として算出される、一過性にトランスフェクトされたHEK細胞で産生され、プロテインA精製された後の、ヒトインスリン - F c 融合タンパク質のホモ二量体力価は、100 mg / L 超（例えば、150 mg / L 超）である。ホモ二量体力価が150 mg / L より大きいヒトインスリン - F c 融合タンパク質の構成のみを、本発明では有用と見なしたが、これは、このレベル未満のホモ二量体力価では、比較的コモディティ化したヒトインスリン市場の厳しい低製造コスト要件を満たすCHO細胞における商業生産力価が得られにくいことが、経験的に分かっているからである。

20

30

#### 【0140】

実施形態において、安定にトランスフェクトされたCHO細胞（例えば、CHO細胞株またはCHO細胞クローン）で産生され、プロテインA精製された後のインスリン - F c 融合タンパク質の総タンパク質収量は、1 L 当たり100 mg（例えば、mg / 1 L の培地）超のインスリン - F c 融合タンパク質である。好ましい実施形態において、安定にトランスフェクトされたCHO細胞（例えば、CHO細胞株またはCHO細胞クローン）で産生され、プロテインA精製された後のインスリン - F c 融合タンパク質の総タンパク質収量は、150 mg 超のインスリン - F c 融合タンパク質 / 1 L の培地（例えば、200 mg / L 超、300 mg / L 超、400 mg / L 超、500 mg / L 超、600 mg / L 超、またはそれ以上）である。実施形態において、安定にトランスフェクトされたCHO細胞（例えば、CHO細胞株またはCHO細胞クローン）で産生され、プロテインA精製された後のインスリン - F c 融合タンパク質のホモ二量体率は、70 % 超（例えば、80 % 超、85 % 超、90 % 超、95 % 超、96 % 超、97 % 超、98 % 超、99 % 超）である。実施形態において、安定にトランスフェクトされたCHO細胞（例えば、CHO細胞株またはCHO細胞クローン）で産生され、プロテインA精製された後のインスリン - F c 融合タンパク質の、インスリン - F c 融合体の総タンパク質収量とホモ二量体率との積として算出されるホモ二量体力価は、150 mg / L 超（例えば、200 mg / L 超、300 mg / L 超、400 mg / L 超、500 mg / L 超、600 mg / L 超、またはそれ以上）である。

40

50

## 【0141】

インスリン - Fc 融合タンパク質の機能的特徴

インスリン受容体との相互作用により標的対象（例えば、イヌまたはヒト）の血糖を低下させる方法であって、インスリン - Fc 融合タンパク質、例えば本明細書に記載の融合タンパク質を対象に投与することを含む、方法が本明細書に記載される。いくつかの実施形態において、対象は糖尿病と診断されたものである（例えば、イヌの場合はイヌ糖尿病、あるいは、ヒトの場合は1型糖尿病または2型糖尿病）。

## 【0142】

実施形態において、本明細書に記載のインスリン - Fc 融合タンパク質は、実施例12に記載の4 でのIM - 9を用いたIR結合アッセイにおけるIC50によって評価された場合に、かなりの親和性でIRに結合する（例えば、5000 nM未満のIC50、4000 nM未満のIC50、3000 nM未満のIC50、2400 nM未満のIC50、2000 nM未満のIC50）。経験に基づいて、5000 nM未満、好ましくは2400 nM未満、より好ましくは2000 nM未満の、IR活性IC50値を示す化合物のみを、標的対象において生物活性を示す可能性があるものと見なした。通常、IR結合の親和性が高いほど（すなわち、IC50値が低いほど）、好ましい。しかし、周知のように、インスリンおよびインスリン類似体（例えば、本明細書に記載のインスリンポリペプチド）のクリアランスは主に、IRに結合後の、IRの内部移行と細胞内分解によって支配されている。従って、IR結合親和性が高過ぎる（すなわち、IC50が低過ぎる、例えば、IC50が500 nM未満）インスリン - Fc 融合タンパク質の構成は、血行からの除去が早過ぎて、標的対象におけるグルコース低減生物活性の持続時間が所望のものよりも短くなる可能性がある。

## 【0143】

実施形態において、本明細書に記載のインスリン - Fc 融合タンパク質の構成は、実施例19に従って測定される、インスリン - Fc 融合タンパク質参照標準のそれよりも高い親和性で、FcRn受容体に結合する。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される、ヒトFcRn受容体アッセイにおけるEC50値によって評価される、インスリン - Fc 融合タンパク質の構成のFcRn受容体に対する親和性は、1500 ng/mL以下、より好ましくは1000 ng/mL以下である。

## 【0144】

実施形態において、本明細書に記載のインスリン - Fc 融合タンパク質は、対象に投与後、グルコースレベル（例えば、血糖値）を低下させることができる。実施形態において、インスリン - Fc 融合タンパク質のグルコース低減活性は、インスリン参照標準のそれよりも大きい。いくつかの実施形態において、インスリン - Fc 融合タンパク質の活性の持続時間は、投与前空腹時血糖値に対する、空腹時血糖の減少、例えば統計的に有意な減少、によって評価することができる。実施形態において、インスリン - Fc 融合タンパク質の活性の持続時間（例えば、投与前レベルと比べて、対象における空腹時血糖値の統計的に有意な減少がある期間）は、約2時間よりも長い。実施形態において、インスリン - Fc 融合タンパク質の活性の持続時間（例えば、投与前レベルと比べて、対象における血糖値の統計的に有意な減少がある期間）は、約6時間よりも長い、9時間よりも長い、12時間よりも長い、18時間よりも長い、1日よりも長い、1.5日よりも長い、2日よりも長い、2.5日よりも長い、3日よりも長い、4日よりも長い、5日よりも長い、6日よりも長い、7日よりも長い、またはそれ以上である。実施形態において、インスリン - Fc 融合タンパク質は、長時間作用性である（例えば、半減期、例えば血清中半減期、が長い）。

## 【0145】

実施形態において、標的対象における本明細書に記載のインスリン - Fc 融合タンパク質の血清半減期は、インスリン参照標準や対照製剤のそれよりも長い。実施形態において、標的対象におけるインスリン - Fc 融合タンパク質の血清半減期（例えば、投与してすぐの対象の血液中のインスリン - Fc 融合タンパク質の血清半減期）は、約2時間よりも

長い。実施形態において、標的対象におけるインスリン - F c 融合タンパク質の血清半減期は、約 0.5 日間、1 日間、2 日間、または 2.5 日間である。好ましい実施形態において、標的対象におけるインスリン - F c 融合タンパク質の血清半減期は、約 3 日間以上である。

#### 【0146】

実施形態において、本明細書に記載のインスリン - F c 融合タンパク質の効力と、生物活性の持続時間とを組み合わせたものを、% F B G L ・日・k g / m g を単位として、所与の投与量（単位 m g / k g ）に対して正規化された空腹時血糖 %（% F B G L ）曲線上の面積（N A O C）を算出することで、定量化している場合がある。実施形態において、本明細書に記載のインスリン - F c 融合タンパク質の N A O C は、150 % F B G L ・日・k g / m g 超（例えば、200 % F B G L ・日・k g / m g 超、250 % F B G L ・日・k g / m g 超、またはそれ以上）である。ここでも経験に基づくが、N A O C 値が 150 % F B G L ・日・k g / m g より大きいと、標的対象における投与量要件は、許容できる治療コストを達成するのに十分に低いものとなる。実施形態において、インスリン - F c 融合タンパク質の N A O C は、標的対象における反復投与後に維持されなければならない（すなわち、インスリン - F c 融合タンパク質の 1 回目投与後の N A O C に対する 3 回目投与後の N A O C の比は、0.5 超（例えば、0.6 超、0.7 超、0.8 超、0.9 超、またはそれ以上）である。

#### 【0147】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載のインスリン - F c 融合タンパク質の構成は、実施例 15 に従って測定される、インスリン - F c 融合タンパク質参照標準のそれよりも低い親和性で、F c 受容体に結合する。いくつかの実施形態において、インスリン - F c 融合タンパク質参照標準（すなわち、配列番号 76 のインスリン - F c 融合タンパク質）の F c 受容体親和性に対する、インスリン - F c 融合タンパク質の F c 受容体親和性の比は、0.50 未満（例えば 0.40 未満、0.30 未満、0.20 未満）である。いくつかの実施形態において、ビオチン化 F c R I が 3000 n g / m L である場合のヒト F c R I 受容体アッセイにおける O D 450 比（配列番号 76 の参照インスリン - F c 融合タンパク質に対しての比）によって評価される、インスリン - F c 融合タンパク質の F c 受容体に対する親和性は、0.50 以下である。

#### 【0148】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載のインスリン - F c 融合タンパク質の構成は、実施例 16 に従って測定される、インスリン - F c 融合タンパク質参照標準のそれよりも低い親和性で、C 1 q に結合する。いくつかの実施形態において、インスリン - F c 融合タンパク質参照標準（すなわち、配列番号 76 のインスリン - F c 融合タンパク質）の F c 受容体親和性に対する、インスリン - F c 融合タンパク質の C 1 q 結合親和性の比は、0.50 未満（例えば 0.40 未満、0.30 未満、0.20 未満）である。いくつかの実施形態において、ビオチン化 C 1 q 濃度が 1000 n g / m L である場合のヒト C 1 q 結合アッセイにおける O D 450 比（配列番号 76 の参照インスリン - F c 融合タンパク質に対しての比）によって評価される、インスリン - F c 融合タンパク質の C 1 q 結合親和性は、0.35 以下である。

#### 【0149】

治療方法および対象選択の特徴

糖尿病（例えば、ヒトにおける 1 型糖尿病または 2 型糖尿病）を治療するための方法であって、インスリン - F c 融合タンパク質（例えば、本明細書に記載のインスリン - F c 融合タンパク質の構成）を標的対象に投与することを含む、方法が、本明細書に記載される。

#### 【0150】

実施形態において、本明細書に記載の任意の方法で用いられる参照標準は、参照処置または参照治療を含む。いくつかの実施形態において、上記参照は、糖尿病治療のための標準的治療剤（例えば、インスリン糖尿病用の標準的治療剤、またはヒトの 1 型糖尿病用の標準的

10

20

30

40

50

治療剤、またはヒトの2型糖尿病用の標準的治療剤)を含む。いくつかの実施形態において、参照標準は、市販のインスリンまたはインスリン類似体である。いくつかの実施形態において、参照標準は、長時間持続型インスリン、中間持続型インスリン、短時間持続型インスリン、速効型インスリン、短時間作用型、中間作用型、長時間作用型インスリンを含む。いくつかの実施形態において、イヌインスリンの参照標準は、Vetsulin(登録商標)、Prozinc(登録商標)、インスリンNPH、インスリングルルギン(Lantus(登録商標))、または組換えヒトインスリンを含む。いくつかの実施形態において、ヒトインスリンの参照標準は、Humalog(登録商標)、Novolog(登録商標)、Novolin(登録商標)R(ノボノルディスク社、バウスベア、デンマーク)、Novolin(登録商標)N(ノボノルディスク社、バウスベア、デンマーク)、Humulin(登録商標)R(イーライリリー社、インディアナポリス、インディアナ州)、Humulin(登録商標)N(イーライリリー社、インディアナポリス、インディアナ州)、Lantus(登録商標)、およびLevemir(登録商標)を含み、あるいは、遺伝子組換えヒトインスリンを含む。

10

#### 【0151】

実施形態において、本明細書に記載の任意の方法で用いられる参照標準は、糖尿病治療(例えば、イヌ糖尿病治療またはヒト糖尿病治療)の、成績、例えば本明細書に記載される成績、を含む。

#### 【0152】

実施形態において、参照標準は、治療の開始前の、例えば本明細書に記載のインスリン-Fc融合タンパク質治療の開始前の、糖尿病を有する標的対象のマーカー(例えば、血糖またはHbA1c)のレベルである。実施形態において、標的対象の血糖値は、治療の開始前で、200mg/dL超(例えば250mg/dL超、300mg/dL超、350mg/dL超、400mg/dL超、またはそれ以上)である。実施形態において、イヌにおけるフルクトサミンレベルは、治療の開始前で、250μmol/L超、350μmol/L超(例えば、400μmol/L超、450μmol/L超、500μmol/L超、550μmol/L超、600μmol/L超、650μmol/L超、700μmol/L超、750μmol/L超、またはそれ以上)である。実施形態において、ヒト標的対象におけるHbA1cレベルは、治療の開始前で、7mmol/L超(例えば、7.5mmol/L超、8mmol/L超、9mmol/L超、10mmol/L超、11mmol/L超、12mmol/L超、またはそれ以上)である。実施形態において、参照標準は、疾患の存在、進行、または重症度の尺度である。実施形態において、参照標準は、例えば標的対象が糖尿病を有するものである、治療の開始前の、例えば本明細書に記載のインスリン-Fc融合タンパク質治療の開始前の、病気の症状の存在または重症度の尺度である。

20

30

#### 【0153】

医薬組成物および投与経路

標的対象の血糖を低下させるために用いることができる、本明細書に記載のインスリン-Fc融合タンパク質の構成を含有する医薬組成物が、本明細書で提供される。医薬組成物中のインスリン-Fc融合タンパク質の含量および濃度、並びに医薬組成物の標的対象への投与量は、医学的に関連性がある対象の特徴(例えば、年齢、体重、性別、他の医学的条件など)、医薬組成物中の化合物の溶解性、化合物の効力および活性、並びに医薬組成物の投与様式などの臨床的に関連性がある要因に基づいて、選択することができる。投与経路および投与レジメンに関するさらなる情報について、読者は、Comprehensive Medicinal Chemistry(Corwin Hansch; 編集委員長)、ベルガモン・プレス社、1990年の第5巻の25.3章を参照されたい。

40

#### 【0154】

本開示の製剤は、非経口投与に好適な製剤を包含する。「非経口投与」および「非経口的に投与される」という表現は、本明細書で使用される場合、腸内投与および局所投与以外の、通常は静脈内注射または皮下注射による投与様式を意味する。

50

## 【 0 1 5 5 】

本開示の医薬組成物中に使用されてもよい好適な水性担体および非水性担体の例として、水、エタノール、ポリオール類（グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、およびこれらの好適な混合物、オリーブ油などの植物油、並びに、オレイン酸エチルなどの注射用有機酸エステル類が挙げられる。レシチンなどのコーティング材を使用し、分散液の場合は必要な粒径を維持し、界面活性剤、例えば T w e e n のような界面活性剤を使用するなどして、適切な流動性を維持することができる。いくつかの実施形態において、医薬組成物（例えば、本明細書に記載の医薬組成物）は、T w e e n のような界面活性剤、例えば、ポリソルベート 2 0、ツイン 2 0、またはツイン 8 0 を含む。いくつかの実施形態において、医薬組成物（例えば、本明細書に記載の医薬組成物）は、T w e e n のような界面活性剤、例えば、ツイン 8 0 を、約 0 . 0 0 1 % ~ 約 2 %、または約 0 . 0 0 5 % ~ 約 0 . 1 %、または約 0 . 0 1 % ~ 約 0 . 5 % の濃度で含む。

10

## 【 0 1 5 6 】

いくつかの実施形態において、水性担体中のインスリン - F c 融合タンパク質の濃度は、約 3 m g / m L である。いくつかの実施形態において、水性担体中のインスリン - F c 融合タンパク質の濃度は、約 6 m g / m L である。いくつかの実施形態において、水性担体中のインスリン - F c 融合タンパク質の濃度は、約 8 m g / m L、9 m g / m L、1 0 m g / m L、1 2 m g / m L、1 5 m g / m L、またはそれ以上である。

## 【 0 1 5 7 】

いくつかの実施形態において、インスリン - F c 融合タンパク質は、ボーラス投与、点滴投与、または静脈内プッシュ投与される。いくつかの実施形態において、融合タンパク質は、シリンジ注入、ポンプ、ペン、針、または留置カテーテルを介して投与される。いくつかの実施形態において、インスリン - F c 融合タンパク質は、皮下ボーラス注入で投与される。また、導入方法は、充電式または生分解性のデバイスによって提供されてもよい。近年、タンパク質性バイオ医薬品を含む薬剤の制御送達用に、様々な徐放ポリマー製デバイスが開発され、インビボ試験されている。生分解性ポリマーおよび非分解性ポリマーの両方を含む、種々の生体適合性ポリマー（ヒドロゲルを含む）を用いて、特定の標的部位で化合物を持続放出するためのインプラントを形成することができる。

20

## 【 0 1 5 8 】

投与量

本明細書に記載される構成のインスリン - F c 融合タンパク質の実際の投与量レベルは、特定の標的対象（例えば、イヌまたはヒト）において、所望の治療反応を達成するのに有効な、有効成分の量を得るために、変えることができる。選択された投与量レベルは、種々の要因に依存することとなり、例えば、使用された特定の融合タンパク質、またはそのエステル、塩、もしくはアミドの活性、投与経路、投与時期、使用されている化合物の排泄速度、治療期間、使用された特定の融合タンパク質と組み合わせて使用された他の薬剤、化合物および/または物質、治療を受けている対象の年齢、性別、体重、状態、全体的な健康、および既往歴、並びに医学分野で周知の同様の要因が挙げられる。

30

## 【 0 1 5 9 】

通常、インスリン - F c 融合タンパク質の好適な投与量は、治療効果を生むのに有効な最低投与量である量となる。このような有効量は、上記の要因に通常は依存することとなる。通常、標的対象に対するインスリン - F c 融合タンパク質の静脈内投与量および皮下投与量は、1 日当たり体重 1 キログラム当たり約 0 . 0 0 1 ~ 約 1 m g（例えば m g / k g）、例えば、約 0 . 0 0 1 ~ 1 m g / k g / 日、約 0 . 0 1 ~ 0 . 1 m g / k g / 日、約 0 . 1 ~ 1 m g / k g / 日、または約 0 . 0 1 ~ 1 m g / k g / 日の範囲となる。さらに他の実施形態では、融合タンパク質は、0 . 0 2 5 ~ 4 m g / キログラム体重 / 週、例えば、0 . 0 2 5 ~ 1 . 0 m g / k g / 週の投与量で投与される。

40

## 【 0 1 6 0 】

本開示は、上記の医薬組成物および製剤のうちのいずれかにおける、インスリン - F c 融合タンパク質の製剤化を企図している。さらに、本開示は、上記の投与経路のいずれか

50

を介した投与を企図している。当業者は、治療中の状態、並びに治療中の対象の健康全般、年齢、および大きさに基づいて、適切な製剤および投与経路を選択することができる。

【実施例】

【0161】

以下の実施例により本発明の技術のさらなる例示がなされるが、それらはいかなる限定とも見なされるべきではない。

【0162】

一般的な方法、アッセイ、および材料

実施例1：HEK293細胞におけるインスリン-Fc融合タンパク質の合成および作製法

インスリン-Fc融合タンパク質を以下の通りに合成した。目的の遺伝子配列を、プロ  
プライエタリソフトウェア（レイクファーマ社（LakePharma）、ベルモント、  
カリフォルニア州）を用いて構築し、高発現哺乳類ベクターにクローニングした。HEK  
293細胞をトランスフェクションの24時間前に振盪フラスコ内に播種し、無血清合成  
培地を用いて増殖させた。目的のインスリン-Fc融合タンパク質をコードするDNA発  
現コンストラクトを、一過性トランスフェクションのための標準操作手順（レイクファ  
ーマ社、ベルモント、カリフォルニア州）を用いて、HEK293細胞浮遊液に一過性にト  
ランスフェクトした。20時間後、細胞を計数して生存率と生細胞数を求め、Forte  
Bio（登録商標）Octet（登録商標）（ポール・フォルテバイオ社（Paul Forte Bio LLC）、フリーモント、カリフォルニア州）で力価を測定した。一過  
性トランスフェクションのプロダクションラン中、追加の測定値を得た。5日目以降に培  
養物の回収を行った。

【0163】

実施例2：CHO細胞におけるインスリン-Fc融合タンパク質の合成および作製法

CHO細胞株は、元はCHO-K1（レイクファーマ社、ベルモント、カリフォルニア  
州）由来のものであり、当該技術分野において公知の方法を用いた組換え技術によって内  
在性グルタミンシンターゼ（GS）遺伝子をノックアウトしたものである。CHO発現  
およびGSセレクション用の安定発現DNAベクターを設計・最適化し、高発現哺乳類ベ  
クター（レイクファーマ社、ベルモント、カリフォルニア州）に組み込んだ。完成したコ  
ンストラクトの配列をそれぞれ確認してから、スケールアップ実験を開始した。浮遊液順  
応CHO細胞を、37、5%CO<sub>2</sub>の加湿恒温器内の、合成培地（CD OptiCHO；インビトロジェン社（Invitrogen）、カールズバッド、カリフォルニア州）  
中で、培養した。CHO細胞の培養では、血清などの動物由来産物は用いなかった。

【0164】

対数増殖期にCD OptiCHO培地中で増殖中の、およそ $8 \times 10^7$ 個の浮遊液順  
応CHO細胞を、MaxCyte（登録商標）STX（登録商標）系（マックスサイト社  
（MaxCyte, Inc.）、ゲイサースバーグ、メリーランド州）と、各インスリン  
-Fc融合タンパク質用の安定なCHO細胞株を作製するためのDNA（DNAコンスト  
ラクトはインスリン-Fc融合タンパク質の完全長配列を含む）80 μgを用いた、エレ  
クトロポレーションによるトランスフェクションにかけた。24時間後、トランスフェク  
ト細胞を計数し、インスリン-Fc融合遺伝子の安定した組み込みのためのセレクション  
にかけた。トランスフェクト細胞を、振盪フラスコ内の0~100 μMメチオニンスルホ  
キシミン（MSX）を含有するCD OptiCHO選択培地中に、 $0.5 \times 10^6$ 細胞  
/mLの細胞密度で播種し、37、5%CO<sub>2</sub>でインキュベートした。セレクション工  
程の間、CHOの安定なプールがその成長速度と生存率を回復させるまで、細胞は2~3  
日毎にスピンドウンして新鮮選択培地に再懸濁した。細胞培養物は、増殖および力価をモ  
ニターした。

【0165】

細胞を $2.5 \times 10^6$ 細胞/mLまで増殖させた。細胞バンク用に回収した際、生存率  
は95%超であった。次に細胞を遠心し、細胞数が $1.5 \times 10^6$ 細胞/mL/バイアルと  
なるように、細胞ペレットを7.5%ジメチルスルホキシド（DMSO）を含むCD O

10

20

30

40

50

p t i C H O 培地中に再懸濁した。バイアルを液体窒素中で凍結保存し貯蔵した。

【 0 1 6 6 】

小規模スケールアップ製造を、C H O 細胞を用いて以下の通りに行った。細胞を、37  
の、100 μM M S X を含有するC D O p t i C H O 増殖培地中で、製造用にスケールアップし、およそ14～21日間、グルコースと必要に応じて追加のアミノ酸とを添加したC D O p t i C H O 増殖培地を、必要に応じて2～4日毎に添加した。安定プールのプロダクションランから回収された条件培地上清を遠心スピンドで清澄化した。タンパク質を、結合バッファーで予め平衡化されたプロテインA ( M a b S e l e c t 、 G E ヘルスケア社 ( G E H e a l t h c a r e ) 、 リトル・チャルフォント、英国 ) カラムに通した。O D 2 8 0 値 ( N a n o D r o p 、 サーマサイエンティフィック社 ( T h e r m o S c i e n t i f i c ) ) を測定したときにバックグラウンドレベルかその付近になるまで、洗浄バッファーをカラムに通した。インスリン - F c 融合タンパク質を低pH緩衝液を用いて溶出させ、溶出画分を回収し、各画分のO D 2 8 0 値を記録した。標的インスリン - F c 融合タンパク質を含有する画分をプールし、所望により、0.2 μM メンブランフィルターを用いてさらに濾過した。

10

【 0 1 6 7 】

この細胞株を所望によるさらなるサブクローニングにかけて単クローン性とし、当業者  
に公知の方法である限界希釈法を用いて、高力価インスリン - F c - 融合タンパク質発現  
クローンを求めて、所望によるさらなるセクションを行った。高力価モノクローナルイン  
スリン - F c 融合タンパク質発現細胞株を得た後、インスリン - F c 融合タンパク質の  
製造を、上記のように、M S X を含有しない増殖培地中、または所望によりM S X を含有  
する増殖培地中で達成することで、組換え型の、C H O で作製された、インスリン - F c  
融合タンパク質を含有する細胞培養上清を得た。所望によりM S X 濃度を経時的に増加さ  
せて、追加の選択性を及ぼすことで、より高い産物の力価をもたらすことが可能なクロー  
ンを得た。

20

【 0 1 6 8 】

実施例 3 : C H O 細胞におけるインスリン - F c 融合タンパク質の合成および作製法

C H O 細胞株は、元はC H O - K 1 ( レイクファーマ社、ベルモント、カリフォルニア  
州 ) 由来のものであり、当該技術分野において公知の方法を用いた組換え技術によって内  
在性グルタミンシンターゼ ( G S ) 遺伝子をノックアウトしたものである。C H O 発現  
およびG S セクション用の安定発現D N A ベクターを設計・最適化し、高発現哺乳類ベ  
クター ( レイクファーマ社、ベルモント、カリフォルニア州 ) に組み込む。完成したコン  
ストラクトの配列をそれぞれ確認してから、スケールアップ実験を開始する。浮遊液順  
応C H O 細胞を、37、5 % C O <sub>2</sub> の加湿恒温器内の、合成培地 ( C D O p t i C H O  
; インビトロジェン社、カールズバッド、カリフォルニア州 ) 中で、培養する。C H O 細  
胞の培養では、血清などの動物由来産物は用いない。

30

【 0 1 6 9 】

対数増殖期にC D O p t i C H O 培地中で増殖中の、およそ $8 \times 10^7$ 個の浮遊液順  
応C H O 細胞を、M a x C y t e ( 登録商標 ) S T X ( 登録商標 ) 系 ( マックスサイト社  
、ゲイサーズバーグ、メリーランド州 ) と、各インスリン - F c 融合タンパク質用の安定  
なC H O 細胞株を作製するためのD N A ( D N A コンストラクトはインスリン - F c 融合  
タンパク質の完全長配列を含む ) 80 μg を用いた、エレクトロポレーションによるトラ  
ンスフェクションにかける。24時間後、トランスフェクト細胞を計数し、インスリン -  
F c 融合遺伝子の安定した組み込みのためのセクションにかける。トランスフェクト細  
胞を、振盪フラスコ内の0～100 μM メチオニンスルホキシミン ( M S X ) を含有する  
C D O p t i C H O 選択培地中に、 $0.5 \times 10^6$  細胞 / m L の細胞密度で播種し、37、5 % C O <sub>2</sub> でインキュベートする。セクション工程の間、C H O の安定なプール  
がその成長速度と生存率を回復させるまで、細胞は2～3日毎にスピンドウンして新鮮選  
択培地に再懸濁する。細胞培養物は、増殖および力価をモニターする。

40

【 0 1 7 0 】

50

細胞を  $2.5 \times 10^6$  細胞/mL まで増殖させる。細胞バンク用に回収した際、生存率は 95% 超を維持する。次に細胞を遠心し、細胞数が  $1.5 \times 10^6$  細胞/mL / バイアルとなるように、細胞ペレットを 7.5% ジメチルスルホキシド (DMSO) を含む CD Opti CHO 培地中に再懸濁する。バイアルを液体窒素中で凍結保存し貯蔵する。

【0171】

小規模スケールアップ製造を、CHO 細胞を用いて以下の通りを行う。細胞を、37 の、 $100 \mu\text{M}$  MSX を含有する CD Opti CHO 増殖培地中で、製造用にスケールアップし、およそ 14 ~ 21 日間、グルコースと必要に応じて追加のアミノ酸とを添加した CD Opti CHO 増殖培地を、必要に応じて 2 ~ 4 日毎に添加する。安定プールのプロダクションランから回収された条件培地上清を遠心スピンで清澄化する。タンパク質を、結合バッファーで予め平衡化されたプロテイン A (Mab Select、GE ヘルスケア社、リトル・チャルフォント、英国) カラムに通す。OD 280 値 (NanoDrop、サーモサイエンティフィック社 (Thermo Scientific)) を測定したときにバックグラウンドレベルかその付近になるまで、洗浄バッファーをカラムに通す。インスリン-Fc 融合タンパク質を低 pH 緩衝液を用いて溶出させ、溶出画分を回収し、各画分の OD 280 値を記録する。標的インスリン-Fc 融合タンパク質を含有する画分をプールし、所望により、 $0.2 \mu\text{M}$  メンブランフィルターを用いてさらに濾過する。

【0172】

この細胞株を所望によるさらなるサブクローニングにかけて単クローン性とし、当業者に公知の方法である限界希釈法を用いて、高力価インスリン-Fc-融合タンパク質発現クローンを求めて、所望によるさらなるセクションを行う。高力価モノクローナルインスリン-Fc 融合タンパク質発現細胞株を得た後、インスリン-Fc 融合タンパク質の製造を、上記のように、MSX を含有しない増殖培地中、または所望により MSX を含有する増殖培地中で達成することで、組換え型の、CHO で作製された、インスリン-Fc 融合タンパク質を含有する細胞培養上清を得る。所望により MSX 濃度を経時的に増加させて、追加の選択性を及ぼすことで、より高い産物の力価をもたらすことが可能なクローンを得る。

【0173】

実施例 4：インスリン-Fc 融合タンパク質の精製

インスリン-Fc 融合タンパク質の精製は以下の通りに行った。分泌インスリン-Fc 融合タンパク質を含有する条件培地上清を、一過性トランスフェクト HEK、安定トランスフェクト HEK、または安定トランスフェクト CHO のプロダクションランから回収し、遠心分離で清澄化した。所望のインスリン-Fc 融合タンパク質を含有する上清をプロテイン A カラムに流し、 $0.15 \sim 0.50 \text{ M}$  塩化ナトリウムを含む各種洗浄バッファーで洗浄し、その後、低 pH 液を用いて溶出させた。その後、所望のタンパク質を含有する溶出画分をプールし、緩衝液を  $200 \text{ mM}$  HEPES、 $100 \text{ mM}$  NaCl、 $50 \text{ mM}$  NaOAc、pH 7.0 の緩衝液に交換した。最後の濾過工程は  $0.2 \mu\text{m}$  メンブランフィルターを用いて行った。最終的なタンパク質濃度は  $280 \text{ nm}$  での溶液吸光度から算出した。イオン交換クロマトグラフィー (例えば、陰イオン交換ビーズ樹脂または陽イオン交換ビーズ樹脂を用いるイオン交換クロマトグラフィー)、ゲル濾過クロマトグラフィー、などの方法による任意のさらなる精製を、必要に応じて行った。

【0174】

実施例 5：インスリン-Fc 融合タンパク質の精製

インスリン-Fc 融合タンパク質の精製は以下の通りを行う。分泌インスリン-Fc 融合タンパク質を含有する条件培地上清を、一過性トランスフェクト HEK、安定トランスフェクト HEK、または安定トランスフェクト CHO のプロダクションランから回収し、遠心分離で清澄化する。所望のインスリン-Fc 融合タンパク質を含有する上清をプロテイン A カラムに流し、 $0.15 \sim 0.50 \text{ M}$  塩化ナトリウムを含む各種洗浄バッファーで洗浄し、その後、低 pH 液を用いて溶出させる。その後、所望のタンパク質を含有する溶出画分をプールし、緩衝液を  $200 \text{ mM}$  HEPES、 $100 \text{ mM}$  NaCl、 $50 \text{ mM}$

10

20

30

40

50

NaOAc、pH 7.0 の緩衝液に交換する。最後の濾過工程は 0.2  $\mu$ m メンブレンフィルターを用いて行う。最終的なタンパク質濃度は 280 nm での溶液吸光度から算出する。イオン交換クロマトグラフィー（例えば、陰イオン交換ビーズ樹脂または陽イオン交換ビーズ樹脂を用いるイオン交換クロマトグラフィー）、ゲル濾過クロマトグラフィー、などの方法による任意のさらなる精製を、必要に応じて行う。

【0175】

#### 実施例 6：非還元 CE - SDS および還元 CE - SDS による構造確認

キャピラリー電気泳動ドデシル硫酸ナトリウム (CE - SDS) 分析を、LabChip (登録商標) GXII (パーキンエルマー社 (Perkin Elmer)、ウォルサム、マサチューセッツ州) において、200 mM HEPES、100 mM NaCl、50 mM NaOAc、pH 7.0 の緩衝液中に溶解された精製インスリン - Fc 融合タンパク質の溶液に対して行い、電気泳動図をプロットした。非還元条件下で、試料を分子量 (MW) 既知のタンパク質標準と共に泳動した。溶出ピークはインスリン - Fc 融合タンパク質ホモ二量体の「見かけの」分子量を表すものであった。

【0176】

インスリン - Fc 融合タンパク質の構造純度が正しいものであるらしいと判断する手段として、還元条件下（例えば、インスリン - Fc 融合物ホモ二量体のジスルフィド結合を切断するために -メルカプトエタノールを使用）で、得られたインスリン - Fc 融合タンパク質モノマーの見かけの分子量を、インスリン - Fc 融合タンパク質ホモ二量体の分子量の半分と比較する。

【0177】

#### 実施例 7：非還元 CE - SDS および還元 CE - SDS による構造確認

キャピラリー電気泳動ドデシル硫酸ナトリウム (CE - SDS) 分析を、LabChip (登録商標) GXII (パーキンエルマー社 (Perkin Elmer)、ウォルサム、マサチューセッツ州) において、200 mM HEPES、100 mM NaCl、50 mM NaOAc、pH 7.0 の緩衝液中に溶解された精製インスリン - Fc 融合タンパク質の溶液に対して行い、電気泳動図をプロットする。非還元条件下で、試料を分子量 (MW) 既知のタンパク質標準と共に泳動する。溶出ピークはインスリン - Fc 融合タンパク質ホモ二量体の「見かけの」分子量を表す。

【0178】

インスリン - Fc 融合タンパク質の構造純度が正しいものであるらしいと判断する手段として、還元条件下（例えば、インスリン - Fc 融合物ホモ二量体のジスルフィド結合を切断するために -メルカプトエタノールを使用）で、得られたインスリン - Fc 融合タンパク質モノマーの見かけの分子量を、インスリン - Fc 融合タンパク質ホモ二量体の分子量の半分と比較する。

【0179】

#### 実施例 8：グリカンを含む化合物のグリカン除去を伴う LC - MS による配列同定

質量分析 (MS) によるインスリン - Fc 融合タンパク質質量の正確な評価のために、インスリン - Fc 融合タンパク質が天然でグリコシル化されている場合は、試料にまず、MS 分析に干渉し得る天然起源グリカン除去する処理を行った。200 mM HEPES、100 mM NaCl、50 mM NaOAc、pH 7.0 の緩衝溶液中に溶解させた 2.5 mg/mL インスリン - Fc 融合タンパク質 100  $\mu$ L を、まず、Zeba 脱塩カラム (ピアス、サーモフィッシャー・サイエンティフィック社、ウォルサム、マサチューセッツ州) を用いて、5 mM EDTA を含有する 0.1 M Tris、pH 8.0 の緩衝液に緩衝液交換した。融合タンパク質に存在する N 結合型グリカン（例えば、cNg - N 部位に位置するアスパラギンの側鎖に連結したグリカン）を除去するために、この溶液に、1.67  $\mu$ L の PNGase F 酵素 (Prozyme N - グリカナーゼ) を添加し、この混合物を 37 の恒温器内で一晩インキュベートした。次に、試料を LC - MS (ノババイオアッセイズ社、ウォバーン、マサチューセッツ州) による分析にかけ、グリカンを含まない所望のホモ二量体に対応する分子の分子量を得た。cNg - アスパラギンから

グリカンを切断するために用いられた酵素過程は、アスパラギン側鎖を脱アミノ化してアスパラギン酸の形成も引き起こすため、この質量のさらなる補正を次に行った。補正を行う場合、酵素処理後のホモ二量体は全体として2 Da増加し、これは、ホモ二量体に存在する各鎖において、1 Daの質量に相当する。従って、実際の分子量は、分析試料中のインスリン-Fc融合タンパク質構造の酵素修飾を補正するために、測定質量から2 Daを引いたものである。

#### 【0180】

インスリン-Fc融合タンパク質のアミノ酸組成が、天然グリコシル化がc Ng部位で生じることを妨げるものである場合、当該分子をPNGアーゼ酵素で前処理せずに、LC-MS（ノババイオアクセス社、ウォバーン、マサチューセッツ州）を用いて、インスリン-Fc融合タンパク質質量の正確な評価を直接得た。

10

#### 【0181】

##### 実施例9：グリカンを含む化合物のグリカン除去を伴うLC-MSによる配列同定

質量分析（MS）によるインスリン-Fc融合タンパク質質量の正確な評価のために、インスリン-Fc融合タンパク質が天然でグリコシル化されている場合は、試料にまず、MS分析に干渉し得る天然起源グリカン除去する処理を行う。200 mM HEPES、100 mM NaCl、50 mM NaOAc、pH 7.0の緩衝溶液中に溶解させた2.5 mg/mLインスリン-Fc融合タンパク質100 µLを、まず、Zeba脱塩カラム（ピアス、サーモフィッシャー・サイエンティフィック社、ウォルサム、マサチューセッツ州）を用いて、5 mM EDTAを含有する0.1 M Tris、pH 8.0の緩衝液に緩衝液交換する。融合タンパク質に存在するN結合型グリカン（例えば、c Ng-N部位に位置するアスパラギンの側鎖に連結したグリカン）を除去するために、この溶液に、1.67 µLのPNGase F酵素（Prozyme N-グリカナターゼ）を添加し、この混合物を37 °Cの恒温器内で一晩インキュベートする。次に、試料をLC-MS（ノババイオアクセス社、ウォバーン、マサチューセッツ州）による分析にかけ、グリカンを含まない所望のホモ二量体に対応する分子の分子量を得る。c Ng-アスパラギンからグリカン切断のために用いられた酵素過程は、アスパラギン側鎖を脱アミノ化してアスパラギン酸の形成も引き起こすため、この質量のさらなる補正を次に行う。補正を行う場合、酵素処理後のホモ二量体は全体として2 Da増加し、これは、ホモ二量体に存在する各鎖において、1 Daの質量に相当する。従って、実際の分子量は、分析試料中のインスリン-Fc融合タンパク質構造の酵素修飾を補正するために、測定質量から2 Daを引いたものである。

20

30

#### 【0182】

インスリン-Fc融合タンパク質のアミノ酸組成が、天然グリコシル化がc Ng部位で生じることを妨げるものである場合、当該分子をPNGアーゼ酵素で前処理せずに、LC-MS（ノババイオアクセス社、ウォバーン、マサチューセッツ州）を用いて、インスリン-Fc融合タンパク質質量の正確な評価を直接得ることができる。

#### 【0183】

##### 実施例10：分子ふるいクロマトグラフィーによるホモ二量体の割合

インスリン-Fc融合タンパク質の分子ふるいクロマトグラフィー（SEC-HPLC）は、2998フォトダイオードアレイに接続したWaters 2795 HT HPLC（ウォーターズ社（Waters Corporation）、ミルフォード、マサチューセッツ州）を用いて、280 nmの波長で行った。100 µL以下の、目的のインスリン-Fc融合タンパク質を含有する試料を、流速0.2 mL/分で、50 mMリン酸ナトリウム、300 mM NaCl、および0.05 % w/vアジ化ナトリウムを含むpH 6.2の移動相を用いて機能する、MAbPac SEC-1、5 µm、4 x 300 mmカラム（サーモフィッシャー・サイエンティフィック社、ウォルサム、マサチューセッツ州）に注入した。このMAbPac SEC-1カラムは、分子サイズ分離の原則に基づいて機能する。すなわち、大型の可溶性インスリン-Fc凝集体（例えば、インスリン-Fc融合タンパク質ホモ二量体の多量体）ほど、より早い滞留時間で溶出し、非凝集性のホ

40

50

モノ量体はより遅い滞留時間に溶出した。分析用SEC-HPLCにより、ホモ二量体の凝集型多量体からホモ二量体の混合物を分離する場合、非凝集型ホモ二量体の割合に対して、インスリン-Fc融合タンパク質溶液の純度を確認した。

【0184】

実施例11：分子ふるいクロマトグラフィーによるホモ二量体の割合

インスリン-Fc融合タンパク質の分子ふるいクロマトグラフィー（SEC-HPLC）は、2998フォトダイオードアレイに接続したWaters 2795HT HPLC（ウォーターズ社、ミルフォード、マサチューセッツ州）を用いて、280nmの波長で行う。100μL以下の、目的のインスリン-Fc融合タンパク質を含有する試料を、流速0.2mL/分で、50mMリン酸ナトリウム、300mM NaCl、および0.05%w/vアジ化ナトリウムを含むpH6.2の移動相を用いて機能する、MAbPac SEC-1、5μm、4×300mmカラム（サーモフィッシャー・サイエンティフィック社、ウォルサム、マサチューセッツ州）に注入する。このMAbPac SEC-1カラムは、分子サイズ分離の原則に基づいて機能する。すなわち、大型の可溶性インスリン-Fc凝集体（例えば、インスリン-Fc融合タンパク質ホモ二量体の多量体）ほど、より早い滞留時間で溶出し、非凝集性のホモ二量体はより遅い滞留時間に溶出することとなる。分析用SEC-HPLCにより、ホモ二量体の凝集型多量体からホモ二量体の混合物を分離する場合、非凝集型ホモ二量体の割合に対して、インスリン-Fc融合タンパク質溶液の純度を確認する。

【0185】

実施例12：インビトロでのIM-9における例示的なインスリン-Fc融合タンパク質のインスリン受容体（IR）への4での結合

ヒトIRを発現するヒトIM-9細胞（ATTC番号CCL-159）を、5%FBS含有RPMI完全培地中で、70～80%コンフルエントに培養・維持した。IM-9細胞の培養物を250×g（約1000rpm）で10分間遠心し、細胞をペレット化した。細胞をHBSS緩衝液またはPBS緩衝液で1回洗浄し、 $8 \times 10^6$ 細胞/mLの濃度となるように冷FACS染色用培地（HBSS/2mM EDTA/0.1%ナトリウムアジド+4%ウマ血清）中に再懸濁し、試験液が作製されるまで氷上または4で維持した。インスリン-Fcタンパク質を、1.2mLチューブ内で、FACS緩衝液で1:3連続希釈して（各希釈液の体積はおおよそ60μL）、2×濃度とし、この溶液はピペティングの準備ができるまで氷上で保冷した。

【0186】

ビオチン化RHIをFACS染色用培地で1.25μg/mLの濃度に希釈した。40μLの連続希釈された試験化合物と、8μLの1.25μg/mLビオチン-RHIを、V底マイクロタイタープレートの各ウェルに添加し、ゆっくりとしたボルテックスで混合し、氷上に置いた。次いで、40μLのIM-9細胞懸濁液（ $8 \times 10^6$ 細胞/mL）をマルチチャンネルピペットで各ウェルに加え、再度穏やかに混合し、30分間氷上でインキュベートして、IM-9細胞上のIRに対する競合的結合を生じさせた。次いで、V底プレートを3000rpmで3分間遠心し、上清を吸引除去することにより、細胞を275μLの氷冷FACS洗浄バッファー（HBSS/2mM EDTA/0.1%ナトリウムアジド+0.5%ウマ血清）で2回洗浄した。次いで、細胞を、1:100希釈ストレプトアビジン-PE（ライフテクノロジーズ社（Life Technologies））を含有するFACS染色用培地40μL中に再懸濁し、氷上で20分間置いた。次いで、細胞を275μLの氷冷FACS緩衝液で1回洗浄し、最後に、3%パラホルムアルデヒドで室温で10分間固定した。次いで、細胞を275μLの氷冷FACS緩衝液で1回洗浄し、250μLのFACS緩衝液中に再懸濁し、分析を行った。

【0187】

次いで、細胞を含有するV底プレートを、Guava 8-HTフローサイトメーター（ミリポア社（Millipore））で分析した。各濃度の試験化合物について、ビオチン化RHIのIRへの結合を、FACS FL-2チャンネル上の細胞の平均蛍光強度（

10

20

30

40

50

MFI)によって定量化した。対照ウェルはビオチン化RHIのみで標識されたものであり、各試験化合物濃度よりもたらされる阻害率(%)の算出に用いた。IM-9細胞に対するビオチン化RHI結合の試験化合物による阻害率を、試験化合物の対数濃度に対してプロットし、得られたIC50値は、各試験化合物について、GraphPad Prism(グラフパッド・ソフトウェア社(GraphPad Software)、ラ・ホーヤ、カリフォルニア州)を用いて算出したものである。従って、試験化合物のIC50値が低いほど、低濃度でのビオチン化RHIの阻害レベルが大きいことを示し、インスリン-Fc融合タンパク質のIRへの結合が強いことを示している。また、非標識組換えヒトインスリン(RHI)などの対照化合物を内部標準として用いて、RHI IC50を求め、これに対し、所与の化合物のIC50の比を得ることができた(IC50(化合物)/IC50(RHI))。IC50比が低いほど、RHIにより類似した結合を有していることとなり(IRとの結合が強くなる)、IC50比が高いほど、RHIに比べて、IRとの結合が弱くなる。

【0188】

実施例13：インビトロでのIM-9における例示的なインスリン-Fc融合タンパク質のインスリン受容体(IR)への4での結合

ヒトIRを発現するヒトIM-9細胞(ATTC番号CCL-159)を、5%FBS含有RPMI完全培地中で、70~80%コンフルエントに培養・維持する。IM-9細胞の培養物を250×g(約1000rpm)で10分間遠心し、細胞をペレット化する。細胞をHBSS緩衝液またはPBS緩衝液で1回洗浄し、 $8 \times 10^6$ 細胞/mLの濃度となるように冷FACS染色用培地(HBSS/2mMEDTA/0.1%ナトリウムアジド+4%ウマ血清)中に再懸濁し、試験液が作製されるまで氷上または4で維持する。インスリン-Fcタンパク質を、1.2mLチューブ内で、FACS緩衝液で1:3連続希釈して(各希釈液の体積はおおよそ60μL)、2×濃度とし、この溶液はピペティングの準備ができるまで氷上で保冷する。

【0189】

ビオチン化RHIをFACS染色用培地で1.25μg/mLの濃度に希釈する。40μLの連続希釈された試験化合物と、8μLの1.25μg/mLビオチン-RHIを、V底マイクロタイタープレートの各ウェルに添加し、ゆっくりとしたボルテックスで混合し、氷上に置く。次いで、40μLのIM-9細胞懸濁液( $8 \times 10^6$ 細胞/mL)をマルチチャンネルピペットで各ウェルに加え、再度穏やかに混合し、30分間氷上でインキュベートして、IM-9細胞上のIRに対する競合的結合を生じさせる。次いで、V底プレートを3000rpmで3分間遠心し、上清を吸引除去することにより、細胞を275μLの氷冷FACS洗浄バッファー(HBSS/2mMEDTA/0.1%ナトリウムアジド+0.5%ウマ血清)で2回洗浄する。次いで、細胞を、1:100希釈ストレプトアビジン-PE(ライフテクノロジーズ社)を含有するFACS染色用培地40μL中に再懸濁し、氷上で20分間置く。次いで、細胞を275μLの氷冷FACS緩衝液で1回洗浄し、最後に、3%パラホルムアルデヒドで室温で10分間固定する。次いで、細胞を275μLの氷冷FACS緩衝液で1回洗浄し、250μLのFACS緩衝液中に再懸濁し、分析を行う。

【0190】

次いで、細胞を含有するV底プレートを、Guava 8-HTフローサイトメーター(ミリポア社)で分析する。各濃度の試験化合物について、ビオチン化RHIのIRへの結合を、FACS FL-2チャンネル上の細胞の平均蛍光強度(MFI)によって定量化する。対照ウェルはビオチン化RHIのみで標識されたものであり、各試験化合物濃度よりもたらされる阻害率(%)の算出に用いる。IM-9細胞に対するビオチン化RHI結合の試験化合物による阻害率を、試験化合物の対数濃度に対してプロットし、得られるIC50値は、各試験化合物について、GraphPad Prism(グラフパッド・ソフトウェア社、ラ・ホーヤ、カリフォルニア州)を用いて算出されるものである。従って、試験化合物のIC50値が低いほど、低濃度でのビオチン化RHIの阻害レベルが大き

10

20

30

40

50

いことを示し、インスリン - Fc 融合タンパク質の IR への結合が強いことを示している。また、非標識組換えヒトインスリン (RHI) などの対照化合物を内部標準として用いて、RHI IC50 を求め、これに対し、所与の化合物の IC50 の比を得ることができる ( $IC50(\text{化合物}) / IC50(RHI)$ )。IC50 比が低いほど、RHI との結合と類似しており (IR との結合が強い)、IC50 比が高いほど、RHI との結合に対して、IR との結合が弱い。

【0191】

#### 実施例 14：インビトロヒトにおける Fc RI 結合親和性アッセイ

ヒト Fc RI (すなわち、rhFc RI) を用いた以下のような ELISA アッセイを用いて、pH 7.4 におけるインスリン - Fc 融合タンパク質の Fc RI に対する結合を実施した。インスリン - Fc 融合タンパク質を、pH 9.6 の炭酸水素ナトリウム緩衝液で  $10 \mu\text{g} / \text{mL}$  に希釈し、Maxisorp (ヌンク社 (Nunc)) マイクロタイタープレート上に 4 で一晚コートし、その後、そのマイクロプレートの各ストリップを PBST (PBS / 0.05% Tween-20) 緩衝液で 5 回洗浄し、Superblock ブロッッキング試薬 (サーモフィッシャー社) でブロッッキングした。ビオチン化 rhFc RI (組換えヒト Fc RI; R&D システムズ社 (R&D Systems)) の連続希釈物を、 $3000 \text{ ng} / \text{mL}$  から  $4.1 \text{ ng} / \text{mL}$  まで、PBST / 10% Superblock 緩衝液中で作製し、インスリン - Fc 融合タンパク質でコートされたマイクロプレートストリップ上に  $100 \mu\text{L} / \text{ウェル}$  で添加した。このマイクロタイタープレートを室温で 1 時間インキュベートした後、マイクロプレートストリップを PBST で 5 回洗浄してから、PBST / 10% Superblock 緩衝液で 1:10000 希釈したストレプトアビジン - HRP を  $100 \mu\text{L} / \text{ウェル}$  で添加した。45 分間のインキュベーション後、マイクロプレートストリップを再度 PBST で 5 回洗浄した。TMB を添加して結合した Fc RI タンパク質を除去し、ELISA 反応停止試薬 (ボストン・バイオプロダクツ社 (Boston Bioproducts)) で停止させた。プレートを ELISA プレートリーダーにおいて  $450 \text{ nm}$  で読み取り、各ウェルに添加された rhFc RI の対数濃度に対して OD450 値 (rhFc RI のインスリン - Fc タンパク質に対する結合に比例) をプロットして、GraphPad Prism ソフトウェアを用いて結合曲線を作成した。曲線がやや似ている化合物の分類については、例えば  $3000 \text{ ng} / \text{mL}$  の rhFc RI 濃度のような、高濃度のうちの 1 つにおける OD450 を用いることで、コートされたインスリン - Fc 融合タンパク質化合物間の違いを識別することができる。様々な時間にランが行われた複数のインスリン - Fc 融合タンパク質間の違いを比較するために、ヒト Fc RI アッセイにおける OD450 比は、を、 $3000 \text{ ng} / \text{mL}$  のビオチン化 Fc RI 濃度で得られた試験インスリン - Fc 融合タンパク質化合物の OD450 値を、 $3000 \text{ ng} / \text{mL}$  のビオチン化 Fc RI 濃度で得られた配列番号 76 の参照インスリン - Fc 融合タンパク質の OD450 値で割ったものとして算出した。

【0192】

#### 実施例 15：インビトロヒトにおける Fc RI 結合親和性アッセイ

ヒト Fc RI (すなわち、rhFc RI) を用いた以下のような ELISA アッセイを用いて、pH 7.4 におけるインスリン - Fc 融合タンパク質の Fc RI に対する結合を実施する。インスリン - Fc 融合タンパク質を、pH 9.6 の炭酸水素ナトリウム緩衝液で  $10 \mu\text{g} / \text{mL}$  に希釈し、Maxisorp (ヌンク社) マイクロタイタープレート上に 4 で一晚コートし、その後、そのマイクロプレートの各ストリップを PBST (PBS / 0.05% Tween-20) 緩衝液で 5 回洗浄し、Superblock ブロッッキング試薬 (サーモフィッシャー社) でブロッッキングする。ビオチン化 rhFc RI (組換えヒト Fc RI; R&D システムズ社) の連続希釈物を、 $3000 \text{ ng} / \text{mL}$  から  $4.1 \text{ ng} / \text{mL}$  まで、PBST / 10% Superblock 緩衝液中で作製し、インスリン - Fc 融合タンパク質でコートされたマイクロプレートストリップ上に  $100 \mu\text{L} / \text{ウェル}$  で添加する。このマイクロタイタープレートを室温で 1 時間インキュベート

した後、マイクロプレートストリップをP B S Tで5回洗浄してから、P B S T / 1 0 % S u p e r b l o c k 緩衝液で1 : 1 0 0 0 0 希釈したストレプトアビジン - H R P を1 0 0  $\mu$  L / ウェルで添加する。4 5 分間のインキュベーション後、マイクロプレートストリップを再度P B S Tで5回洗浄する。T M B を添加して結合したF c R I タンパク質を除去し、E L I S A 反応停止試薬（ボストン・バイオプロダクツ社）で停止させる。プレートをE L I S A プレートリーダーにおいて4 5 0 n m で読み取り、各ウェルに添加されたr h F c R I の対数濃度に対してO D 4 5 0 値（r h F c R I のインスリン - F c タンパク質に対する結合に比例）をプロットして、G r a p h P a d P r i s m ソフトウェアを用いて結合曲線を作成する。曲線がやや似ている化合物の分類については、例えば3 0 0 0 n g / m L のr h F c R I 濃度のような、高濃度のうちの1 つにおけるO D 4 5 0 を用いることで、コートされたインスリン - F c 融合タンパク質化合物間の違いを識別することができる。様々な時間にランが行われた複数のインスリン - F c 融合タンパク質間の違いを比較するために、ヒトF c R I アッセイにおけるO D 4 5 0 比は、を、3 0 0 0 n g / m L のビオチン化F c R I 濃度で得られた試験インスリン - F c 融合タンパク質化合物のO D 4 5 0 値を、3 0 0 0 n g / m L のビオチン化F c R I 濃度で得られた配列番号7 6 の参照インスリン - F c 融合タンパク質のO D 4 5 0 値で割ったものとして算出する。

【0 1 9 3】

#### 実施例 1 6 : インビトロにおけるC 1 q 結合親和性アッセイ

ヒト補体成分C 1 q を用いた以下のようなE L I S A アッセイを用いて、p H 7 . 4 に  
 おけるインスリン - F c 融合タンパク質の補体成分C 1 q に対する結合を実施した。イン  
 スリン - F c 融合タンパク質を、p H 9 . 6 の炭酸水素ナトリウム緩衝液で1 0  $\mu$  g / m  
 L に希釈し、M a x i s o r p（ヌンク社（N u n c））マイクロタイタープレート上に  
 4 で一晚コートし、その後、そのマイクロプレートの各ストリップをP B S T（P B S  
 / 0 . 0 5 % T w e e n - 2 0）緩衝液で5回洗浄し、S u p e r b l o c k ブロッキン  
 グ試薬（サーモフィッシャー社）でブロッキングした。ビオチン化補体成分C 1 q（ヒト  
 補体成分C 1 q；シグマ・アルドリッチ社（S i g m a - A l d r i c h））の連続希釈  
 物を、1 0 0 0 n g / m L から1 . 4 n g / m L まで、P B S T / 1 0 % S u p e r b l o c k 緩衝液中  
 で作製し、インスリン - F c 融合タンパク質でコートされたマイクロプレ  
 ートストリップ上に1 0 0  $\mu$  L / ウェルで添加した。このマイクロタイタープレートを室  
 温で1 時間インキュベートした後、マイクロプレートストリップをP B S Tで5回洗浄し  
 てから、P B S T / 1 0 % S u p e r b l o c k 緩衝液で1 : 1 2 0 0 0 希釈したストレ  
 プトアビジン - H R P を1 0 0  $\mu$  L / ウェルで添加した。4 5 分間のインキュベーション  
 後、マイクロプレートストリップを再度P B S Tで5回洗浄した。T M B を添加して結合  
 した補体C 1 q タンパク質を除去し、E L I S A 反応停止試薬（ボストン・バイオプロダ  
 クツ社）で停止させた。プレート吸光度をE L I S A プレートリーダーにおいて4 5 0 n  
 m で読み取り（O D 4 5 0）、各ウェルに添加された補体成分C 1 q の対数濃度に対して  
 このO D 4 5 0 値（補体成分C 1 q のインスリン - F c タンパク質に対する結合に比例）  
 をプロットして、G r a p h P a d P r i s m ソフトウェアを用いて結合曲線を作成し  
 た。曲線がやや似ている化合物の分類については、例えば1 0 0 0 n g / m L の補体成分  
 C 1 q 濃度のような、高濃度のうちの1 つにおけるO D 4 5 0 を用いることで、コートさ  
 れたインスリン - F c 融合タンパク質化合物間の違いを識別した。さらに、様々な時間  
 にランが行われた複数のインスリン - F c 融合タンパク質間の違いを比較するために、ヒト  
 C 1 q アッセイにおけるO D 4 5 0 比は、を、1 0 0 0 n g / m L のビオチン化C 1 q 濃  
 度で得られた試験インスリン - F c 融合タンパク質化合物のO D 4 5 0 を、1 0 0 0 n g  
 / m L のビオチン化C 1 q 濃度で得られた配列番号7 6 の参照インスリン - F c 融合タン  
 パク質のO D 4 5 0 で割ったものとして算出した。

【0 1 9 4】

#### 実施例 1 7 : インビトロにおけるC 1 q 結合親和性アッセイ

ヒト補体成分C 1 q を用いた以下のようなE L I S A アッセイを用いて、p H 7 . 4 に

おけるインスリン - F c 融合タンパク質の補体成分 C 1 q に対する結合を実施する。インスリン - F c 化合物を、pH 9 . 6 の炭酸水素ナトリウム緩衝液で 1 0 μ g / m L に希釈し、Maxisorp (ヌンク社) マイクロタイタープレート上に 4 で一晚コートし、その後、そのマイクロプレートの各ストリップを PBST (PBS / 0 . 0 5 % Tween - 2 0 ) 緩衝液で 5 回洗浄し、Superblock ブロッキング試薬 (サーモフィッシャー社) でブロッキングする。ビオチン化補体成分 C 1 q (ヒト補体成分 C 1 q ; シグマ・アルドリッチ社) の連続希釈物を、1 0 0 0 n g / m L から 1 . 4 n g / m L まで、PBST / 1 0 % Superblock 緩衝液中で作製し、インスリン - F c 融合タンパク質でコートされたマイクロプレートストリップ上に 1 0 0 μ L / ウェルで添加する。このマイクロタイタープレートを室温で 1 時間インキュベートした後、マイクロプレートストリップを PBST で 5 回洗浄してから、PBST / 1 0 % Superblock 緩衝液で 1 : 1 2 0 0 0 希釈したストレプトアビジン - HRP を 1 0 0 μ L / ウェルで添加する。4 5 分間のインキュベーション後、マイクロプレートストリップを再度 PBST で 5 回洗浄する。TMB を添加して結合した補体 C 1 q タンパク質を除去し、ELISA 反応停止試薬 (ボストン・バイオプロダクツ社) で停止させる。プレート吸光度を ELISA プレートリーダーにおいて 4 5 0 n m で読み取り (OD 4 5 0 )、各ウェルに添加された補体成分 C 1 q の対数濃度に対してこの OD 4 5 0 値 (補体成分 C 1 q のインスリン - F c タンパク質に対する結合に比例) をプロットして、GraphPad Prism ソフトウェアを用いて結合曲線を作成する。曲線がやや似ている化合物の分類については、例えば 1 0 0 0 n g / m L の補体成分 C 1 q 濃度のような、高濃度のうちの 1 つにおける OD 4 5 0 を用いることで、コートされたインスリン - F c 融合タンパク質化合物間の違いを識別することができる。さらに、様々な時間にランが行われた複数のインスリン - F c 融合タンパク質間の違いを比較するために、ヒト C 1 q アッセイにおける OD 4 5 0 比は、を、1 0 0 0 n g / m L のビオチン化 C 1 q 濃度で得られた試験インスリン - F c 融合タンパク質化合物の OD 4 5 0 を、1 0 0 0 n g / m L のビオチン化 C 1 q 濃度で得られた配列番号 7 6 の参照インスリン - F c 融合タンパク質の OD 4 5 0 で割ったものとして算出する。

【 0 1 9 5 】

実施例 1 8 : インビトロにおけるインスリン - F c 融合タンパク質のイヌ F c R n 受容体に対する親和性の測定

イヌ Ig G 由来の F c フラグメントを含むインスリン - F c 融合タンパク質のイヌ F c R n 受容体に対するインビトロ結合親和性を、溶液 pH 5 . 5 で実施された ELISA 法により測定した。この弱酸性の pH は、F c フラグメント含有分子が F c R n 受容体に結合するのに好ましい結合環境である。インビボでは、細胞は F c R n を細胞表面上に発現し、また、エンドソーム内に内部発現する。F c フラグメントを含む分子が天然プロセス (ピノサイトーシスやエンドサイトーシスなど) を通じて細胞に運ばれると、エンドソーム内では pH がより低い pH へと変化するため、そこで F c R n 受容体がエンドソーム - リソソーム区画で分解されるはずであった F c フラグメント含有分子に結合し、それによって、これらの分子が pH が中性付近 (例えば、pH 7 . 0 ~ 7 . 4 ) である細胞表面に戻されて再利用される。中性 pH は F c R n 受容体に対する結合に好適でないため、F c フラグメント含有分子は放出されて、血行中に戻される。これが、F c フラグメント含有分子がインビボにおいて示す薬物動態学的な血中半減期が長い、主な仕組みである。

【 0 1 9 6 】

イヌ由来 F c フラグメントを含むインスリン - F c 融合タンパク質を炭酸水素ナトリウム緩衝液 (pH 9 . 6 ) で 1 0 μ g / m L に希釈し、Maxisorb ELISA プレートストリップ上に室温で 1 ~ 2 時間、デュプリケートでコートした。次いで、各ストリップを PBST (PBS / 0 . 1 % Tween - 2 0 ) 緩衝液で 4 回洗浄し、Superblock ブロッキング試薬 (サーモフィッシャー社) で洗浄した。次いで、F c R n 結合用のストリップを、再度、pH 5 . 5 の MES / NaCl / Tween (5 0 m M MES / 1 5 0 m M NaCl / 0 . 1 % Tween - 2 0 ) 緩衝液で 2 回洗浄し、その後

、FcRn試薬（ビオチン化イヌFcRn；イムニトラック社（Immunitrack））を添加した。ビオチン化FcRn試薬の連続希釈物（1：3希釈）を、1000ng/mlから0.45ng/mLまでの濃度で、pH5.5のMES/NaCl/Tween/10%Superblock緩衝液中で作製し、マルチチャネルピペッターを用いて、インスリン-Fc融合タンパク質化合物でコートされたストリップ上に100μL/ウェルで添加した。その後、このアッセイプレートを室温で1時間インキュベートした。FcRnが結合中のストリップをpH5.5のMES/NaCl/Tween緩衝液で4回洗浄した後、pH5.5のMES/NaCl/10%Superblock緩衝液で1：10000希釈されたストレプトアビジン-HRPを100μL/ウェルで添加した。45分間のインキュベーション後、再度ストリップをpH5.5のMES/NaCl/Tween緩衝液で4回洗浄した。最後に、TMBを添加することで、結合したビオチン化イヌFcRn試薬を除去し、発色はELISA反応停止試薬で停止させた。ELISAプレートリーダーにおいて450nmの波長でプレートの読み取りを行った。OD値（イヌFcRnのインスリン-Fc融合タンパク質試験化合物に対する結合に比例）を、各ウェルに添加されたFcRnの対数濃度に対してプロットして、GraphPad Prismソフトウェアを用いて結合曲線を作成した。各結合曲線のEC50値を算出し、様々な化合物間で比較を行った。

【0197】

実施例19：インビトロにおけるインスリン-Fc融合タンパク質のヒトFcRn受容体に対する親和性の測定

ヒトIgG由来のFcフラグメントを含むインスリン-Fc融合タンパク質のヒトFcRn受容体に対するインビトロ結合親和性を、溶液pH5.5で実施されたELISA法により測定した。この弱酸性のpHは、Fcフラグメント含有分子がFcRn受容体に結合するのに好ましい結合環境である。インビボでは、細胞はFcRnを細胞表面上に発現し、また、エンドソーム内に内部発現する。Fcフラグメントを含む分子が天然プロセス（ピノサイトーシスやエンドサイトーシスなど）を通じて細胞に運ばれると、エンドソーム内ではpHがより低いpHへと変化するため、そこでFcRn受容体がエンドソーム-リソソーム区画で分解されるはずであったFcフラグメント含有分子に結合し、それによって、これらの分子がpHが中性付近（例えば、pH7.0～7.4）である細胞表面に戻されて再利用される。中性pHはFcRn受容体に対する結合に好適でないため、Fcフラグメント含有分子は放出されて、血行中に戻される。これが、Fcフラグメント含有分子がインビボにおいて示す薬物動態学的な血中半減期が長い、主な仕組みである。

【0198】

Fcフラグメントを含むインスリン-Fc融合タンパク質を炭酸水素ナトリウム緩衝液（pH9.6）で10μg/mLに希釈し、Maxisorb ELISAプレートストリップ上に室温で1～2時間、デュプリケートでコートした。次いで、各ストリップをPBST（PBS/0.1%Tween-20）緩衝液で5回洗浄し、Superblockブロッキング試薬（サーモフィッシャー社）で洗浄した。次いで、FcRn結合用のストリップを、再度、pH5.5のMES/NaCl/Tween（50mM MES/150mM NaCl/0.1%Tween-20）緩衝液で3回洗浄し、その後、FcRn試薬（ビオチン化ヒトFcRn；イムニトラック社）を添加した。ビオチン化FcRn試薬の連続希釈物（1：3希釈）を、6000ng/mLから8.23ng/mLまでの濃度で、pH5.5のMES/NaCl/Tween/5%Superblock緩衝液中で作製し、マルチチャネルピペッターを用いて、インスリン-Fc融合タンパク質化合物でコートされたストリップ上に100μL/ウェルで添加した。その後、このアッセイプレートを室温で1.5時間インキュベートした。FcRnが結合中のストリップをpH5.5のMES/NaCl/Tween緩衝液で4回洗浄した後、pH5.5のMES/NaCl/5%Superblock緩衝液で1：10000希釈されたストレプトアビジン-HRPを100μL/ウェルで添加した。45分間のインキュベーション後、再度ストリップをpH5.5のMES/NaCl/Tween緩衝液で5回洗浄した。最後に

、TMBを添加することで、結合したビオチン化FcRn試薬を除去し、発色はELISA反応停止試薬で停止させた。ELISAプレートリーダーにおいて450nmの波長でプレートの読み取りを行った。OD450値(ヒトFcRnのインスリン-Fc融合タンパク質試験化合物に対する結合に比例)を、各ウェルに添加されたFcRnの対数濃度に対してプロットして、GraphPad Prismソフトウェアを用いて結合曲線を作成した。各結合曲線のEC50値を算出し、様々な化合物間で比較を行った。

【0199】

実施例20：インビトロにおけるインスリン-Fc融合タンパク質のヒトFcRn受容体に対する親和性の測定

ヒトIgG由来のFcフラグメントを含むインスリン-Fc融合タンパク質のヒトFcRn受容体に対するインビトロ結合親和性を、溶液pH5.5で実施されたELISA法により測定する。この弱酸性のpHは、Fcフラグメント含有分子がFcRn受容体に結合するのに好ましい結合環境である。インビボでは、細胞はFcRnを細胞表面上に発現し、また、エンドソーム内に内部発現する。Fcフラグメントを含む分子が天然プロセス(ピノサイトーシスやエンドサイトーシスなど)を通じて細胞に運ばれると、エンドソーム内ではpHがより低いpHへと変化するため、そこでFcRn受容体がエンドソーム-リソソーム区画で分解されるはずであったFcフラグメント含有分子に結合し、それによって、これらの分子がpHが中性付近(例えば、pH7.0~7.4)である細胞表面に戻されて再利用される。中性pHはFcRn受容体に対する結合に好適でないため、Fcフラグメント含有分子は放出されて、血行中に戻される。これが、Fcフラグメント含有分子がインビボにおいて示す薬物動態学的な血中半減期が長い、主な仕組みである。

【0200】

イヌ由来Fcフラグメントを含むインスリン-Fc融合タンパク質を炭酸水素ナトリウム緩衝液(pH9.6)で10µg/mLに希釈し、Maxisorb ELISAプレートストリップ上に室温で1~2時間、デュブリケートでコートする。次いで、各ストリップをPBST(PBS/0.1%Tween-20)緩衝液で5回洗浄し、Superblockブロッキング試薬(サーモフィッシャー社)で洗浄した。次いで、FcRn結合用のストリップを、再度、pH5.5のMES/NaCl/Tween(50mM MES/150mM NaCl/0.1%Tween-20)緩衝液で3回洗浄し、その後、FcRn試薬(ビオチン化イヌFcRn;イムニトラック社)を添加した。ビオチン化FcRn試薬の連続希釈物(1:3希釈)を、6000ng/mLから8.23ng/mLまでの濃度で、pH5.5のMES/NaCl/Tween/5%Superblock緩衝液中で作製し、マルチチャネルピペッターを用いて、インスリン-Fc融合タンパク質化合物でコートされたストリップ上に100µL/ウェルで添加する。その後、このアッセイプレートを室温で1.5時間インキュベートする。FcRnが結合中のストリップをpH5.5のMES/NaCl/Tween緩衝液で4回洗浄した後、pH5.5のMES/NaCl/5%Superblock緩衝液で1:10000希釈されたストربتアビジン-HRPを100µL/ウェルで添加する。45分間のインキュベーション後、再度ストリップをpH5.5のMES/NaCl/Tween緩衝液で5回洗浄する。最後に、TMBを添加することで、結合したビオチン化FcRn試薬を除去し、発色はELISA反応停止試薬で停止させる。ELISAプレートリーダーにおいて450nmの波長でプレートの読み取りを行う。OD450値(ヒトFcRnのインスリン-Fc融合タンパク質試験化合物に対する結合に比例)を、各ウェルに添加されたFcRnの対数濃度に対してプロットして、GraphPad Prismソフトウェアを用いて結合曲線を作成する。各結合曲線のEC50値を算出し、様々な化合物間で比較を行う。

【0201】

実施例21：イヌにイヌインスリンFc融合タンパク質を単回投与した後のインビボ薬物動態(PD)を求めるための一般化手順

イヌにおける空腹時血糖値に対する作用について、以下のように、インスリン-Fc融合タンパク質を評価した。およそ10~15kgの重量の、N=1、2、3、またはそれ

10

20

30

40

50

以上の、健常な抗体未処置のイヌを、各インスリン - F c 融合タンパク質に対して 1 匹ずつ用いた。アナフィラキシー、嗜眠、窮迫、疼痛などの徴候がないか、動物の観察も 1 日 2 回行い、所望によりいくつかの化合物については、追加で 3 週間以上の皮下注射により治療を継続し、中和抗薬物抗体の誘導性を示すものとして重要な、当該化合物のグルコース低減能が経時的に低下するかどうかの確認を行った。0 日目、動物に、インスリン F c 融合タンパク質ホモ二量体を含有する医薬組成物の、静脈内投与または皮下投与による単回投与を、10 ~ 50 mM のリン酸水素ナトリウム、50 ~ 150 mM の塩化ナトリウム、0.005 ~ 0.05 % v / v の Tween - 80、および所望により濃度 0.02 ~ 1.00 mg / mL の静菌剤（例えば、フェノール、m クレゾール、またはメチルパラベン）の溶液中 1 ~ 10 mg / mL の濃度、7.0 ~ 8.0 の溶液 pH、0.08 ~ 0.80 mg のインスリン - F c 融合タンパク質 / kg（または、モルベースで、およそ 1.2 ~ 12.3 nmol / kg またはおよそ 0.4 ~ 4.0 U / kg のインスリン当量に相当）の投与量で、実施した。0 日目に、注射の直前と、注射の 15 分後、30 分後、45 分後、60 分後、120 分後、240 分後、360 分後、および 480 分後、並びに 1 日後、2 日後、3 日後、4 日後、5 日後、6 日後、および 7 日後に、適当な静脈から、血液を採取した。

10

#### 【0202】

それぞれの時点について、最低 1 mL の全血を採取した。グルコース計（ACCUCHEK（登録商標）Aviva Plus）を用いて直ちにグルコースレベルの読み取りを行い、これにはおよそ 1 滴の血液が必要であった。0 日目から 7 日目までの平均空腹時血糖値 %（%FBGL）をプロットし、所与のインスリン - F c 融合タンパク質の生物活性を評価した。

20

#### 【0203】

実施例 22：イヌにイヌインスリン - F c 融合タンパク質を反復投与した後のインビボ薬物動態（PD）を求めるための一般化手順

反復注射の際の血糖値に対する作用について、以下のように、インスリン - F c 融合タンパク質を評価した。およそ 10 kg ~ 20 kg の重量の健常な抗体未処置のイヌを用いて、各動物にインスリン - F c 融合タンパク質を反復投与した。アナフィラキシー、嗜眠、窮迫、疼痛などの負の副作用の徴候がないか、動物を 1 日 2 回観察し、所望によりいくつかの化合物については、追加で 2 ~ 5 回の皮下注射の分だけ治療を継続し、インビボで中和抗薬物抗体が存在する可能性を示す、当該化合物のグルコース低減能が経時的に低下するかどうかの確認を行った。0 日目、動物に、インスリン F c 融合タンパク質を含有する医薬組成物の単回皮下注射を、10 ~ 50 mM のリン酸水素ナトリウム、50 ~ 150 mM の塩化ナトリウム、0.005 ~ 0.05 % v / v の Tween - 80、および所望により濃度 0.02 ~ 1.00 mg / mL の静菌剤（例えば、フェノール、m クレゾール、またはメチルパラベン）の溶液中、7.0 ~ 8.0 の溶液 pH、0.08 ~ 0.80 mg のインスリン - F c 融合タンパク質 / kg（または、モルベースで、およそ 1.2 ~ 12.3 nmol / kg またはおよそ 0.4 ~ 4.0 U / kg のインスリン当量に相当）の投与量で、実施した。0 日目に、注射の直前と、注射の 15 分後、30 分後、45 分後、60 分後、120 分後、240 分後、360 分後、および 480 分後、並びに 1 日後、2 日後、3 日後、4 日後、5 日後、6 日後、および 7 日後に、適当な静脈から、血液を採取した。

30

40

#### 【0204】

その後、皮下注射は週 1 回よりも少ない頻度で行い、場合によっては、所与のインスリン - F c 融合タンパク質製剤の薬力学に基づいて異なる間隔で注射を行った。その後、明らかとなったインスリン - F c 融合タンパク質の薬力学に応じて、各インスリン - F c 融合タンパク質の注射を、より高用量またはより低用量に調整した。例えば、0 日目の 1 回目注射の投与量が血糖を低下させる際に不十分であると分かった場合、注射されるインスリン - F c 融合タンパク質のその後の投与量レベルは上向きに調整した。同様に、0 日目の 1 回目注射の投与量によるグルコースの低減が強力過ぎると分かった場合、注射される

50

インスリン - F c 融合タンパク質のその後の投与量レベルは下向きに調整した。また、中間投与量や最終投与量も、必要に応じて同様に調整できることが分かった。各投与量について、注射の直前と、注射の 15 分後、30 分後、45 分後、60 分後、120 分後、240 分後、360 分後、および 480 分後、並びに 1 日後、2 日後、3 日後、4 日後、5 日後、6 日後、および 7 日後（並びに所望により 14 日後）に、適当な静脈から、血液を採取した。それぞれの時点について、最低 1 mL の全血を採取した。グルコース計（ACCU - CHEK（登録商標）Aviva Plus）を用いて直ちにグルコースレベルの読み取りを行い、これにはおよそ 1 滴の血液が必要であった。試験全体を通じた平均空腹時血糖値（%FBGL）を、融合タンパク質の生物活性を求めた時点に対して、プロットした。

10

#### 【0205】

各投与量の生物活性を求めるため、曲線上面積（AOC）解析を以下のように行った。時間に対する %FBGL のデータを作成した後、そのデータを、データ解析ソフトウェア（GraphPad Prism、グラフパッド・ソフトウェア社、サンディエゴ、カリフォルニア州）に入力した。このソフトウェアを用いて、まず、曲線下面積解析（AUC）を行って、各投与量について、%FBGL 対時間曲線下面積の積分を行った。AUC データを所望の AOC データに変換するために、以下の式を用いた： $AOC = TPA - AUC$ ；式中、TPA は、各投与持続期間（例えば、7 日間、14 日間など）に、100%（ここで、100% は %FBGL 対時間曲線の  $y = 100\%$  を表す）を掛けて得られる、総可能面積である。例えば、投与量持続期間が 7 日間であり、算出された AUC が 500%FBGL・日である場合、AOC は以下の通りに算出される： $AOC = (100\%FBGL \times 7日) - (500\%FBGL \cdot 日) = 200\%FBGL \cdot 日$ 。一連の注射量の注射量ごとにこの解析を行い、1 回目注射、2 回目注射、3 回目注射などの場合の AOC 値を得た。

20

#### 【0206】

前述のようにインスリン - F c 融合タンパク質の投与量は異なる場合があるため、所与のインスリン - F c 融合タンパク質について算出された全ての AOC 値を、特定の投与量の当該インスリン - F c 融合タンパク質に対して、正規化した方が、都合がよい場合が多い。そうすることで、所与の試験の注射間で投与量レベルが変化しても、複数の注射間で、インスリン - F c 融合タンパク質のグルコース低減能を、簡便に比較することが可能になる。所与の投与量の正規化後の AOC（NAOC）は以下のように算出した： $NAOC = AOC / D$ （単位は %FBGL・日・kg/mg）；式中、D は mg/kg を単位とする動物に注射された実際の投与量である。所与の動物において、一連の注射のそれぞれ注射ごとに NAOC 値を算出し、同じインスリン - F c 融合タンパク質製剤を投与された動物群間で平均した。

30

#### 【0207】

所与の動物において、一連の注射の注射ごとの NAOC 比（NAOCR）を、以下のように、注射ごと（例えば 1 回目注射、2 回目注射、3 回目注射、... N 回目注射）の NAOC 値を求め、所与の注射のそれぞれの NAOC を 1 回目注射から得られた NAOC で割ることにより算出した：

40

$NAOCR = (NAOC(N \text{ 回目注射}) / NAOC(1 \text{ 回目注射}))$ 。

一連の注射の N 回目注射についての所与のインスリン - F c 融合タンパク質製剤の NAOCR を評価することによって、インビボにおける所与のインスリン - F c 融合タンパク質のグルコース低減能が、一連の N 回の投与の間に、その生物活性を実質的に保持した（例えば、N 回目投与の NAOCR が 0.5 より大きい）かどうか、あるいは、所与のインスリン - F c 融合タンパク質のインビボでのグルコース低減活性が、N 回の投与の間に、その効力のかなりの部分を失った（例えば、N 回目投与の NAOCR が 0.5 未満）かどうか、を判定することができ、これにより、インビボにおいて中和抗薬物抗体が形成される可能性が示される。好ましい実施形態において、3 回目皮下注射後の NAOC の、1 回目皮下注射後の NAOC に対する比は、0.5 よりも大きかった（すなわち、3 回目の皮下

50

注射のNAOCRは0.5よりも大きかった)。

【0208】

実施例23：イヌ血清中のイヌインスリン-Fc融合タンパク質のインビボ薬物動態(PK)を求めるための一般化手順

イヌ血清中のイヌアイソタイプのFcフラグメントを含むインスリン-Fc融合タンパク質の濃度を測定するためのアッセイを、以下のように構築した。このアッセイにはサンドイッチ形式のELISAが含まれ、当該ELISAでは、血清試料中の治療化合物を、ELISAプレート上にコートされた抗インスリン/プロインスリンモノクローナル抗体(mAb)に捕捉させ、次いでHRP結合型抗イヌIgG-Fc特異的抗体で検出し、その後、TMB基質系を用いて発色を行った。Maxisorp ELISAプレート(ヌンク社)を、コーティング緩衝液(pH=9.6の炭酸ナトリウム-重炭酸ナトリウム緩衝液)中5µg/mlの抗インスリンmAbクローンD6C4(バイオラド社(Biorad))で、4℃で一晩コートした。次いで、プレートを、PBST(PBS+0.05%Tween20)で5回洗浄し、SuperBlockブロッキング液(サーモフィッシュャー社)で室温で最低1時間(または4℃で一晩)ブロッキングした。試験血清試料をPBST/SB/20%HS試料希釈緩衝液(PBS+0.1%Tween20+10%SuperBlock+20%ウマ血清)で1:20希釈した。検量線を作成する場合、目的のインスリン-Fc融合タンパク質を、試料希釈緩衝液(PBST/SB/20%HS)+5%ビーグル血清プール(バイオIVT社(BioIVT))で、200ng/mlから0.82ng/mlまでの濃度範囲で、1:2.5連続希釈で、希釈した。標準および希釈後血清試料を、デュプリケートで100µl/ウェルでブロッキング後のプレートに添加し、室温で1時間インキュベートした。インキュベーション後、試料および標準をPBSTで5回洗い流した。HRP結合型ヤギ抗イヌIgG-Fc(シグマ社)検出用抗体をPBST/SB/20%HS緩衝液で約1:15,000希釈し、100µlを全てのウェルに添加し、室温、暗所で45分間インキュベートした。プレートをPBSTで5回、脱イオン水で1回洗浄し、100µl/ウェルのTMB(インビトロジェン社)を室温で8~10分間添加することで発色させた。その後、100µl/ウェルのELISA停止液(ボストン・バイオプロダクツ社)を添加することで発色を停止させ、30分以内にSpectraMaxプレートリーダー(モレキュラーデバイス社)を用いて450nmの吸光度を読み取った。試料中のインスリン-Fc融合タンパク質化合物の濃度は、SoftMaxProソフトウェアを用いて4-PL曲線上の補間を行うことにより算出した。

【0209】

実施例24：イヌ血清中の抗薬物抗体を測定するためのアッセイプロトコル

Maxisorp ELISAプレート(ヌンク社)を、コーティング緩衝液(pH=9.6、炭酸塩-重炭酸塩(Biocarbonate)緩衝液)で希釈された、10µg/mLの目的のインスリン-Fc融合タンパク質で4℃で一晩コートし、試験化合物に対するADAの測定を行った。イヌIgG由来のFcフラグメントを含むインスリン-Fc融合タンパク質のインスリン部分に対するADAの測定のために、プレートをコーティング緩衝液中30µg/mLの精製インスリンでコートした。次いで、プレートを、PBST(PBS+0.05%Tween20)で5回洗浄し、SuperBlockブロッキング液(サーモフィッシュャー社、ウォルサム、マサチューセッツ州)で少なくとも1時間(または一晩)ブロッキングした。イヌIgGユニットにおけるADAを算出するため、ストリップを直接、pH=9.6の炭酸-重炭酸(Biocarb)コーティング緩衝液で1:2連続希釈した、濃度300~4.69ng/mlのイヌIgG(ジャクソン・イムノリサーチ・ラボラトリーズ社(Jackson ImmunoResearch Laboratories)、ウェスト・グローブ、ペンシルベニア州)で、4℃で一晩コートし、7点疑似検量線の作成に用いた。標準用のストリッププレートも、洗浄して、SuperBlockブロッキング液で少なくとも1時間(または一晩)ブロッキングした。

【0210】

試験血清試料を P B S T / S B / 2 0 % H S 試料希釈緩衝液 ( P B S + 0 . 1 % T w e e n 2 0 + 1 0 % S u p e r B l o c k + 2 0 % ウマ血清 ) で 1 : 1 0 0 以上 ( 通常、 1 : 2 0 0 として試験 ) に希釈し、インスリン - F c 融合タンパク質でコート ( または R H I でコート ) したストリップに 1 0 0  $\mu$  L / ウェルでデュプリケートで添加した。イヌ I g G でコートした標準用ストリップのデュプリケートストリップも各プレートに加え、 P B S T / S B ( P B S + 0 . 1 % T w e e n 2 0 + 1 0 % S u p e r B l o c k ) 緩衝液を 1 0 0  $\mu$  L / ウェルで添加した。プレートを室温で 1 時間インキュベートした後、 P B S T で 5 回洗浄した。 A D A の検出のために、 H R P 結合型ヤギ抗ネコ I g G F ( a b ' ) 2 ( 抗ネコ I g G F ( a b ' ) 2 試薬はイヌ抗体に対して交差反応性を示した ; ジャクソン・イムノリサーチ・ラボラトリーズ社、ウェスト・グローブ、ペンシルベニア州 ) を P B S T / S B で 1 : 1 0 0 0 0 希釈し、試料ウェルと標準ウェルの両方に 1 0 0  $\mu$  L / ウェルで添加し、室温、暗所で 4 5 分間インキュベートした。プレートを P B S T で 5 回、次いで脱イオン水で 1 回洗浄した後、 1 0 0  $\mu$  L / ウェルの T M B 基質 ( インビトロジエン、サーモフィッシャー・サイエンティフィック社、ウォルサム、マサチューセッツ州 ) を添加して室温、暗所で 1 5 ~ 2 0 分間置くことで、発色させた。その後、 1 0 0  $\mu$  L / ウェルの E L I S A 停止液 ( ボストン・バイオプロダクツ社 ) を添加することで発色を停止させ、 3 0 分以内に S p e c t r a M a x プレートリーダーを用いて 4 5 0 n m の吸光度を読み取った。 S o f t M a x P r o ソフトウェア ( モレキュラーデバイス社、サンノゼ、カリフォルニア州 ) を用いて、 O D 値を 4 - P L 疑似検量線に内挿することにより抗薬物抗体濃度を求めた。

10

20

#### 【 0 2 1 1 】

検出された A D A の特異性を明らかにするため、「阻害」アッセイを行った。薬物阻害 A D A アッセイでは、血清試料を P B S T / S B / 2 0 % H S 緩衝液で 1 : 1 0 0 希釈し、等量の 3 0 0  $\mu$  g / m L の関連治療化合物 ( 最終的な試料希釈は 1 : 2 0 0 であり、最終的な阻害性化合物は 1 5 0  $\mu$  g / m L である ) と混合し、室温で 3 0 ~ 4 0 分間インキュベートすることで、抗薬物抗体を遊離阻害剤 ( すなわち、治療化合物 ) と結合させた。プレインキュベーションの後、試料を、インスリン - F c 融合タンパク質でコート ( または R H I でコート ) したストリップに 1 0 0  $\mu$  L / ウェルでデュプリケートで添加した。阻害性化合物を含まない P B S T / S B / 2 0 % H S 緩衝液で 1 : 2 0 0 希釈した試料も、イヌ I g G でコートした標準のデュプリケートストリップと共に、試料プレートで試験した。アッセイ法の残りの工程は上記のように行った。薬物阻害ウェルで測定された A D A を、非阻害 A D A 濃度と対応させることで、 A D A の特異性を評価した。薬物阻害ウェルで A D A シグナルの著しい阻害が確認された場合、これは、 A D A が治療化合物に対して特異的であったことを意味する。

30

#### 【 0 2 1 2 】

実施例 2 5 : マウスにヒトインスリン F c 融合タンパク質を単回投与した後のインビボ薬物動態 ( P D ) を求めるための一般化手順

空腹時血糖値に対する作用について、以下のように、インスリン - F c 融合タンパク質を評価した。 1 群当たり N = 3 の b a l b / c マウスまたは糖尿病の野生型非肥満性糖尿病 ( w t N O D ) マウス ( ジャクソン・ラボラトリーズ社 ) からデータを収集した。実験の 1 時間前に動物を絶食させ、その後、 0 時間の時点で、マウスに、インスリン F c 融合タンパク質ホモ二量体を含有する医薬組成物の単回皮下投与を、 1 0 ~ 5 0 m M のリン酸水素ナトリウム、 5 0 ~ 1 5 0 m M の塩化ナトリウム、 0 . 0 0 5 ~ 0 . 0 5 % v / v の T w e e n - 8 0、および所望により濃度 0 . 0 2 ~ 1 . 0 0 m g / m L の静菌剤 ( 例えばフェノール、 m クレゾール、またはメチルパラベン ) の溶液中、 3 0 0  $\mu$  g / k g のインスリン - F c 融合タンパク質濃度で、最終的な溶液 p H は水酸化ナトリウムおよび / または塩酸を用いて 7 . 0 ~ 8 . 0 に調整して、実施した。

40

#### 【 0 2 1 3 】

各時点において、血液試料を採取し、グルコース計 ( A l p h a T R A K ( 登録商標 ) 2 ペット用グルコース計 ) を用いて直ちにグルコースレベルの読み取りを行い、これには

50

およそ1滴の血液が必要であった。0時間から9時間までの平均空腹時血糖値% (% F B G L) をプロットし、所与のインスリン - F c 融合タンパク質の生物活性を評価した。

【0214】

実施例26：マウスにヒトインスリンF c 融合タンパク質を単回投与した後のインビボ薬物動態(PD)を求めるための一般化手順

空腹時血糖値に対する作用について、以下のように、インスリン - F c 融合タンパク質を評価する。1群当たりN = 3のb a l b / cマウスまたは糖尿病w t N O Dマウス(ジャクソン・ラボラトリーズ社)からデータを収集する。実験の1時間前に動物を絶食させ、その後、0時間の時点で、マウスに、インスリンF c 融合タンパク質ホモ二量体を含む医薬組成物の単回皮下投与を、10 ~ 50 mMのリン酸水素ナトリウム、50 ~ 150 mMの塩化ナトリウム、0.005 ~ 0.05 % v / vのT w e e n - 80、および所望により濃度0.02 ~ 1.00 mg / mLの静菌剤(例えばフェノール、m クレゾール、またはメチルパラベン)の溶液中、300 µg / kgのインスリン - F c 融合タンパク質濃度で、最終的な溶液pHは水酸化ナトリウムおよび/または塩酸を用いて7.0 ~ 8.0に調整して、実施する。

【0215】

各時点において、血液試料を採取し、グルコース計(A l p h a T R A K (登録商標) 2 ペット用グルコース計)を用いて直ちにグルコースレベルの読み取りを行い、これにはおよそ1滴の血液が必要である。0時間から9時間までの平均空腹時血糖値% (% F B G L) をプロットし、所与のインスリン - F c 融合タンパク質の生物活性を評価する。

【0216】

実施例27：免疫原性エピトープを特定するためのアッセイ手順

ライブラリー中の各化合物をE L I S Aマイクロプレートウェルの個別のストリップ上にコートする以外は、実施例25の抗薬物抗体E L I S Aアッセイにおける記載と同様に、M a x i s o r p E L I S Aマイクロプレート(ヌンク社)を、アミノ酸配列既知のインスリン - F c 融合タンパク質ホモ二量体化合物ライブラリーでコートし、このコートされたプレートをブロッキングした。ライブラリー中の化合物は、様々なB鎖、C鎖、およびA鎖のアミノ酸変異を含んで、インスリンポリペプチドのアミノ酸組成が異なり、リンカー組成が異なり、ヒト由来のいくつかのものを含んで、F cフラグメント組成が異なる、一連のインスリン - F c 融合タンパク質からなる。別に、実施例24に記載したように、それぞれ、イヌI g Gユニットにおける抗薬物抗体(A D A)を算出するため、いくつかのプレートストリップウェルを直接、1 : 2連続希釈したイヌI g G(ジャクソン・イムノリサーチ・ラボラトリーズ社、ウェスト・グローブ、ペンシルベニア州)でコートした。

【0217】

インスリン - F c 融合タンパク質の反復投与を受けた個々のイヌから得られた血清は、まず、実施例24の抗薬物抗体E L I S Aアッセイでの選別にかける。実施例24のアッセイで中程度または高い陽性(例えば、中程度または高い抗体力価)を示す血清試料を、P B S T / S B / 20 % H S 試料希釈緩衝液(P B S + 0.1 % T w e e n 20 + 10 % S u p e r B l o c k + 20 % ウマ血清)で連続希釈(1 : 200 ~ 1 : 8000)し、インスリン - F c 融合タンパク質化合物ライブラリーでコートしたプレートに添加し、室温で1時間置く。インキュベーション後、プレートをP B S Tで5回洗浄する。コートされた化合物ライブラリーに対して交差反応可能なイヌ抗体の検出のため、イヌI g Gに交差反応性を示す、H R P 結合型ヤギ抗ネコI g G F ( a b ' ) 2 (ジャクソン・イムノリサーチ・ラボラトリーズ社、ウェスト・グローブ、ペンシルベニア州)を、P B S T / S Bで1 : 10000希釈し、試料ウェルと標準ウェルの両方に100 µL / ウェルで添加し、室温、暗所で45分間インキュベートする。プレートをP B S Tで5回、脱イオン水で1回洗浄した後、100 µL / ウェルのT M B 基質(インビトロジェン、サーモフィッシュャー・サイエンティフィック社、ウォルサム、マサチューセッツ州)を添加して室温、暗所で15 ~ 20分間置くことで、発色させる。その後、100 µL / ウェルのE L I S

A 停止液（ボストン・バイオプロダクツ社、アシュランド、マサチューセッツ州）を添加することで発色を停止させ、30分以内に SpectraMax プレートリーダーを用いて 450 nm の吸光度を読み取る。血清試料中に存在する抗化合物交差反応性の抗体濃度は、SoftMax Pro ソフトウェア（モレキュラーデバイス社、サンノゼ、カリフォルニア州）を用いて、直接コートされた イヌ IgG 抗体対照に対する 4-PL 疑似検量線に OD 値を内挿することにより求める。

【0218】

アッセイから得られた抗体濃度と、コートされたインスリン-Fc 融合タンパク質ライブラリーの既知のアミノ酸組成とを相関させることで、特定のアミノ酸変異やエピトープが、アッセイ上の全抗体シグナルの、いずれの原因にもなっていない、あるいは、いくつか、大部分、または全ての原因になっているか、を判断し、各種のインスリン-Fc 融合タンパク質ホモ二量体に結合しないこと、弱く結合すること、または強く結合することを示すことができる。中程度または強い結合の原因となる変異やエピトープを、本明細書では、免疫原性の「ホットスポット」と称する。

【0219】

実施例 28：高いホモ二量体力価と許容可能なレベルの急性および反復投与生物活性とを有する イヌインスリン-Fc 融合タンパク質を得るための設計プロセス

発明を実施するための形態に記載された設計目標を達成するためのプロセスは、以下の工程を含むものであった。まず、得られるインスリン-Fc 融合タンパク質が、免疫原性が最小限であり、長時間作用性の生物活性を有する産物をもたらす可能性が最も高いように（例えば、Fc 受容体 I 結合性が最小限の種特異的な IgG アイソタイプを選択した）、配列番号 4 または配列番号 5 のインスリンポリペプチドを、特定の IgG アイソタイプの種特異的な Fc フラグメントおよびリンカーと組み合わせた。所望の融合タンパク質をコードする DNA 配列を作製し、ベクター（レイクファーマ社、サン・カルロス、カリフォルニア州）にクローニングした後、そのベクターを用いて、実施例 1 に記載の手順に従って、HEK 細胞に一過性にトランスフェクトした。次いで、インスリン-Fc 融合タンパク質を実施例 4 に従って精製し、総タンパク質収量およびホモ二量体率を実施例 10 に従って測定した。ホモ二量体力価が 50 mg/L よりも大きい候補のみを許容可能なものと見なしたが、これは、このレベルに満たない力価では、動物用製品の厳しい低製造コスト要件を満たす商業生産力価は得られにくいからである。選別されたインスリン-Fc 融合タンパク質を、次に、実施例 12 に記載したような、インビトロのインスリン受容体結合研究を通じて、生物活性の各指標でスクリーニングした。経験に基づいて、IR 活性の IC50 値が 5000 nM 未満の化合物のみを、標的種で生物活性を示す可能性があるものと見なした。インビトロにおける IR の IC50 値は、定性的なスクリーニングツールとして有用であるが、ヒトインスリン受容体を発現するヒト IM-9 細胞を利用するため、イヌ IR とヒト IR との間の親和性の小さな違いの一部を捉えられない場合がある。さらに、インスリン受容体結合以外の要素が、インビボにおける化合物の生物活性に影響を与える場合がある（例えば、インビボにおける薬物動態学的な排出半減期の延長を可能にするイヌ FcRn に対する親和性）。そこで、製造および IR 活性 IC50 値の観点から許容できる選別されたインスリン-Fc 融合タンパク質を、イヌでの生物活性についてさらに選別し、所望の効力および/または生物活性の持続時間に満たない（例えば、NAOC が 150% FBGL・日・kg/mg 未満）物質を振るい落とした。ここでも経験に基づくが、NAOC 値が 150% FBGL・日・kg/mg より大きいと、標的種における投与量要件は、許容できる治療コストを達成するのに十分に低いものとなる。最後に、当該技術分野ではほとんど言及されない評価基準をさらに追加した。下記の実施例でより詳細に論じるが、初回投与後の標的種で許容できる NAOC レベルを示す多くのインスリン-Fc 融合タンパク質実施形態が、予想外にも、反復投与後にその生物活性レベルを維持できない。さらに、ほとんどの場合で、標的種における反復投与時の生物活性の低減は中和抗薬物抗体の発生と相関していた。抗薬物抗体がつくられて活性を維持できないというこの傾向は、このようなインスリン-Fc 融合タンパク質のイヌ糖尿病などの慢性疾患

10

20

30

40

50

の治療での使用を非実用的なものにしている。そこで、許容できる反復投与後生物活性レベル（例えば、1回目投与に対する3回目投与のNAOCR値が0.5よりも大きい）を示し、抗薬物抗体が最低レベルの、インスリン-Fc融合体タンパク質のみを、本発明で使用するのに許容できるものと見なした。

【0220】

実施例29：高いホモ二量体力価と許容可能なレベルの急性および反復投与生物活性とを有するヒトインスリン-Fc融合タンパク質を得るための設計プロセス

発明を実施するための形態に記載された設計目標を達成するためのプロセスは、以下の工程を含むものであった。まず、得られるインスリン-Fc融合タンパク質が、長時間作用性の生物活性を有する産物をもたらす可能性が最も高いように、配列番号7または配列番号10のインスリンポリペプチドを、特定のIgGアイソタイプ（IgG2またはIgG1）のヒトFcフラグメントおよびリンカーと組み合わせた。所望の融合タンパク質をコードするDNA配列を作製し、ベクター（レイクファーマ社、サン・カルロス、カリフォルニア州）にクローニングした後、そのベクターを用いて、実施例1に記載の手順に従って、HEK細胞に一過性にトランスフェクトした。次いで、インスリン-Fc融合タンパク質を実施例4に従って精製し、総タンパク質収量およびホモ二量体率を実施例10に従って測定し、ホモ二量体力価を算出した。ホモ二量体力価が150mg/Lよりも大きい候補のみを許容可能なものと見なしたが、これは、このレベルに満たないホモ二量体力価は、ホモ二量体力価が高いCHO安定感染細胞株とは換言しにくく、比較のコモディティ化したヒトインスリン市場の低製造コスト要件を満たす商業生産力価が得られにくいからである。選別されたインスリン-Fc融合タンパク質の構成を、次に、実施例12に記載したような、インビトロのIR結合研究を通じて、生物活性の各指標でスクリーニングした。経験に基づいて、IR活性のIC50値が2400nM未満、より好ましくは2000nM未満の化合物のみを、インビボで生物活性を示す可能性があるものと見なした。インビトロにおけるIR IC50値は、このアッセイはヒトIRを発現するヒトIM-9細胞を利用しており、結合性が小さい（IR IC50値が大きい）化合物と比較して、結合性が大きいほど（IR IC50値が小さいほど）、所与の投与量でインビボ効力が大きくなると予想されることから、有用な定性的スクリーニング手段である。さらに、IR結合以外の要因が、インビボにおける化合物の生物活性に影響を与えている可能性がある。例えば、Fc融合タンパク質のヒトFcRn受容体に対する親和性は、化合物のインビボ薬物動態学的排出半減期に関係している。インスリン-Fc融合タンパク質のインビボ半減期の数日間以上の延長は、インビトロにおけるヒトFcRn結合アッセイ（実施例19）で測定されるEC50値が1500ng/mL未満、より好ましくは1000ng/mL未満であることと、よく相関している。

【0221】

製造、IR活性IC50値、およびヒトFcRn活性EC50値の各領域で許容できるものであった選別後のインスリン-Fc融合タンパク質の構成を、さらに、ヒトFcRI受容体結合親和性とヒトC1q結合親和性を試験することによって、インビボ免疫原性の可能性についてスクリーニングした。これらの免疫系成分により強く結合する分子ほど、抗原提示細胞（APC）の増加を経て、抗薬物抗体によって評価される免疫原性プロファイルがより大きい可能性が高い。抗薬物抗体は望ましくないものであり、上記分子のインビボ薬物動態学的半減期を阻害する可能性や、薬物の活性を中和する可能性や、あるいは、その両方の機能を果たす可能性がある。抗薬物抗体の可能性がインスリン-Fcのインビボ成績に与える影響は、大きな問題になる可能性があった。そこで、望ましくない抗原提示のリスクと抗薬物抗体を誘導する免疫原性の可能性を軽減するために、FcRI（実施例14）およびC1q（実施例16）に対して、候補インスリン-Fc融合タンパク質をスクリーニングする研究を行った（Guilliams, Martin & Bruhns, Pierre & Saey, Yvan & Hammad, Hamida & Lambrecht, Bart. (2014), The function of Fc gamma receptors in dendritic cells and macrophages

10

20

30

40

50

ges., Nature reviews Immunology., 14巻、10.1038/nri3582)。ヒトFc RI結合(試験対象のインスリン-Fc融合タンパク質のビオチン化Fc RI濃度は3000ng/mL)の場合に設けられた設計目標は、0.50未満のOD450比(配列番号76のインスリン-Fc融合タンパク質の構成に対しての比)であり、C1q結合の場合に設けられた設計目標(試験対象のインスリン-Fc融合タンパク質のビオチン化C1q濃度は1000ng/mL)は、0.35未満のOD450比(配列番号76のインスリン-Fc融合タンパク質の構成に対しての比)である。

#### 【0222】

別の場所で記載したように、ヒトIgG1 Fcを含むインスリン-Fc融合タンパク質の構成は、予想外にも、ヒトIgG2 Fcを含む構成よりも収量がかなり高いことが分かり、そのため、製造性の点で好ましいものであった。しかし、ヒトIgG1 Fcを含むインスリン-Fc融合タンパク質の構成は、cNg部位に天然のN結合型グリコシル化を含む場合、Fc RIおよびC1qの両方に対して非常に高い結合性を示す場合が多く、これらの部分のうちの片方または両方に対する結合性が強いと、それに相関して、インビボにおける抗原提示および免疫原性が増強されている可能性が高かった(Kouser, L., Madhukaran, S. P., Shastri, A., Saraon, A., Ferluga, J., Al-Mozaini, M., およびKishore, U. (2015年), Emerging and Novel Functions of Complement Protein C1q., Frontiers in Immunology, 6巻、317号、doi:10.3389/fimmu.2015.00317)。そこで、hIgG1アイソタイプのFcを含むインスリン-Fc融合タンパク質の構成のいくつかのバリエーションを、まず、生合成中の自然なグリコシル化を防ぐために天然型のグリコシル化部位(cNg)を変異させた化合物をスクリーニングすることにより、試験した。次に、これらの分子をさらに変異させ、インスリンポリペプチドの組成を操作することにより、その特性を向上させた。最後に、組成と長さの異なるいくつかのリンカーバリエーションを検討し、種々の設計特性のさらなる最適化が可能であることを確認した。複数回の最適化によるスクリーニングの後、許容レベルのホモ二量体力価、IR結合、FcRn結合、Fc RI結合、およびC1q結合を示すインスリン-Fc融合タンパク質構成のみを、本発明で使用するのに許容できるものと見なした。

#### 【0223】

結果：イヌFcフラグメントを含むインスリン-Fc融合タンパク質

実施例30：イヌFc IgGAアイソタイプを含むイヌインスリン-Fc融合タンパク質

配列番号4のインスリンポリペプチド配列とイヌIgGAアイソタイプのFcフラグメント(配列番号14)とを含み、配列番号11のペプチドリンカーを用いる、インスリン-Fc融合タンパク質の作製を試みた。得られたインスリン-Fc融合タンパク質の完全アミノ酸配列は以下の通りである：

FVNQHLCGSDLEALALVCGERGFFYTDP TGGGPRRGIVE  
QCCHSICSLYQLENYCNGGGGAGGGGRCTDTPPCPVPEPL  
GGPSVLIFFPKPKDILRITRTPEVTCVVLDLGREDEPVQI  
SWFVDGKEVHTAKTQSREQQFNGTYRVVSVLP I EHQDWLT  
GKEFKCRVNHIDLPSP I ERTISKARGRAHKPSVYVLPSP  
KELSSSDTVSITCLIKDFYPPDIDVEWQSNQQEPERKHR  
MTPPQLDEDDGSYFLYSKLSVDKSRWQQGDPFTCAVMHETL  
QNHYTDLSSL SHSPG(配列番号31)。

#### 【0224】

配列番号31のインスリン-Fc融合タンパク質は、実施例1に従ってHEK細胞で合成し、実施例4に従って精製した。プロテインA精製工程後のタンパク質収量は22mg/Lであった。インスリン-Fc融合タンパク質の構造は実施例6に従って非還元CE-SDSおよび還元CE-SDSで確認し、さらに、実施例8に記載のグリカン除去を伴う

LC-MSによって配列の確認を行った。実施例10に従って分子ふるいクロマトグラフィーでホモ二量体率を測定したところ、24%であると求められ、ホモ二量体の凝集の程度が高いことが示された。すなわち、得られたホモ二量体力価は5 mg/Lに過ぎなかった。要約すると、HEK細胞で配列番号31のインスリン-Fc融合タンパク質を製造した場合、凝集レベルが高く、ホモ二量体力価が低い(5 mg/L)結果となり、50 mg/Lより大きいホモ二量体力価という設計目標を達成しなかった。

#### 【0225】

設計目標は達成されていないが、配列番号31のインスリン-Fc融合タンパク質を、生物活性について評価した。まず、配列番号31のインスリン-Fc融合タンパク質のインスリン受容体結合を実施例12に従って測定したところ、IC50値は2,733 nM

10

#### 【0226】

次に、実施例21に従って当該化合物をN=3のイヌに単回静脈内投与した後、インビボにおける配列番号31のインスリン-Fc融合タンパク質の薬力学的特性(PD)を測定した。図2は、時間の関数としての、配列番号31の空腹時血糖値%を示している。配列番号31のNAOCを実施例22の手順に従って算出したところ、105%FBGL・日・kg/mgであった。実施例23の方法を用いて、配列番号31のインビボ半減期を算出したところ、1日未満であった。NAOCが比較的低いのは、試料中の凝集体量が多い(すなわち、ホモ二量体率が低い)ことの結果であると考えられるが、血行中に残った可溶性ホモ二量体は薬物動態学的排出半減期が1日未満であり、これは、週1回投与を支持するものにはなりにくいと思なされた。

20

#### 【0227】

実施例31：イヌIgGAアイソタイプを含むインスリン-Fc融合タンパク質のFcフラグメント領域の変異

配列番号31のインスリン-Fc融合タンパク質のホモ二量体含有率を増加させ、生物活性を向上させ、半減期を延長する試みでは、当該FcフラグメントのCH3領域に変異を挿入して、分子間の会合(例えば、Fcフラグメント-Fcフラグメント分子間相互作用)を妨げて、FcRn受容体により強く結合する(例えば、FcRnに対するより高い親和性)ことを促すことで、再循環および体循環時間を増加させる試みを行った。以下のインスリン-Fc融合タンパク質を、実施例1に従ってHEK細胞で合成し、実施例4に従って精製し、実施例6、実施例8、および実施例10に従って試験した。試験の結果は以下の表2に示す。配列番号31に対しての、配列番号32、配列番号33、配列番号34、および配列番号35の配列アラインメント、並びに、アミノ酸配列の相違を、図3に示す。

30

FVNQHLCGSDLV EALALVCGERGF F YTDPTGGGPRRGIVE  
QCCHSICSLYQLENYCNGGGGAGGGGRCTDTPPCPVPEPL  
GGPSVLIFPPKPKDILRITRTPEVTCVVLDLGREDP EVQI  
SWFVDGKEVHTAKTQSREQQFNGTYRVVSVLP IEHQDWLT  
GKEFKCRVNHIDLPSPIERTISKARGRAHKPSVYVLP PSP  
KE LSSSDT VSI TCLI KDFYPPDIDVEWQSN GQQE PERKHR  
MT PPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQQGDPFTCAVLHEAL  
HSHYTQKSLSLSPG (配列番号32)

40

FVNQHLCGSDLV EALALVCGERGF F YTDPTGGGPRRGIVE  
QCCHSICSLYQLENYCNGGGGAGGGGRCTDTPPCPVPEPL  
GGPSVLIFPPKPKDILRITRTPEVTCVVLDLGREDP EVQI  
SWFVDGKEVHTAKTQSREQQFNGTYRVVSVLP IEHQDWLT  
GKEFKCRVNHIDLPSPIERTISKARGRAHKPSVYVLP PSP  
KE LSSSDT VSI TCLI KDFYPPDIDVEWQSN GQQE PERKHR  
MT PPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQQGDPFTCAVLHETL

50

Q S H Y T D L S L S H S P G ( 配列番号 3 3 )

F V N Q H L C G S D L V E A L A L V C G E R G F F Y T D P T G G G P R R G I V E  
Q C C H S I C S L Y Q L E N Y C N G G G G A G G G G R C T D T P P C P V P E P L  
G G P S V L I F P P K P K D I L R I T R T P E V T C V V L D L G R E D P E V Q I  
S W F V D G K E V H T A K T Q S R E Q Q F N G T Y R V V S V L P I E H Q D W L T  
G K E F K C R V N H I D L P S P I E R T I S K A R G R A H K P S V Y V L P P S P  
K E L S S S D T V S I T C L I K D F Y P P D I D V E W Q S N G Q Q E P E R K H R  
M T P P Q L D E D G S Y F L Y S K L S V D K S R W Q Q G D P F T C A V M H E T L  
Q S H Y T D L S L S H S P G ( 配列番号 3 4 )

F V N Q H L C G S D L V E A L A L V C G E R G F F Y T D P T G G G P R R G I V E  
Q C C H S I C S L Y Q L E N Y C N G G G G A G G G G R C T D T P P C P V P E P L  
G G P S V L I F P P K P K D I L R I T R T P E V T C V V L D L G R E D P E V Q I  
S W F V D G K E V H T A K T Q S R E Q Q F N G T Y R V V S V L P I E H Q D W L T  
G K E F K C R V N H I D L P S P I E R T I S K A R G R A H K P S V Y V L P P S P  
K E L S S S D T V S I T C L I K D F Y P P D I D V E W Q S N G Q Q E P E R K H R  
M T P P Q L D E D G S Y F L Y S K L S V D K S R W Q Q G D P F T C A V L H E T L  
Q N H Y T D L S L S H S P G ( 配列番号 3 5 )

【 0 2 2 8 】

各イヌ I g G A バリエーションをベースとしたインスリン - F c 融合タンパク質を、対応するタンパク質収量、ホモ二量体率、およびホモ二量体力価と共に、表 2 に列挙する。結果から分かるように、I g G A F c フラグメントに対する種々の変異は、ホモ二量体率およびホモ二量体力価を向上させず、高度なタンパク質凝集を引き起こし、ホモ二量体力価は 5 m g / L 未満という極めて低いものであった。従って、これらの化合物のインビボにおける生物活性および薬物動態は、評価できなかった。

【 表 2 】

表 2 : 天然型または変異型のイヌ I g G A F c フラグメント C H 3 領域を利用した配列のホモ二量体力価			
配列番号	タンパク質収量 (m g / L)	ホモ二量体率 %	ホモ二量体力価 (m g / L)
配列番号 3 1	2 2	2 4 %	5
配列番号 3 2	3 3	0 %	0
配列番号 3 3	5 7	0 %	0
配列番号 3 4	6 7	0 %	0
配列番号 3 5	8 0	0 %	0

【 0 2 2 9 】

実施例 3 2 : 他のイヌ F c フラグメントアイソタイプを用いたイヌインスリン - F c 融合タンパク質

上記のように、イヌ I g G A は、イヌにおいて F c I エフェクター機能を示さないため（ヒトにおけるヒト I g G 2 アイソタイプとよく似ている）、イヌ用の非免疫原性インスリン - F c 融合タンパク質を作製するための F c フラグメントのアイソタイプとして好ましいと考えられている。しかし、イヌ I g G A F c フラグメントを用いて製造されたインスリン - F c 融合タンパク質は、凝集性が高く、ホモ二量体力価が許容できないほど低く、生物活性と作用持続時間が許容できないほど低いレベルであった。そのため、配列番号 3 1 のインスリン - F c 融合物のイヌ I g G A F c フラグメントの代わりとして、他のイヌ I g G アイソタイプ（配列番号 1 5 のイヌ I g G B）、配列番号 1 6 のイヌ I g G C、および配列番号 1 7 のイヌ I g G D の F c フラグメントを評価した。イヌ I g G B アイソタイプ、イヌ I g G C アイソタイプ、およびイヌ I g G D アイソタイプをベースとした F c フラグメントを含むこれら 3 種のインスリン - F c 融合タンパク質は、配列番号

31のインスリン-Fc融合タンパク質の作製に用いたものと同じ、配列番号4のインスリンポリペプチドと配列番号11のペプチドリンカーを用いて、合成した。タンパク質製造は実施例1に従ってHEK293細胞で行った。次いで、インスリン-Fc融合タンパク質を、実施例4に従ってプロテインAカラムを用いて精製した。インスリン-Fc融合タンパク質の構造は実施例6に従って非還元CE-SDSおよび還元CE-SDSで確認し、さらに、実施例8に記載のグリカン除去を伴うLC-MSによって配列の確認を行った。ホモ二量体率は実施例10に従って分子ふるいクロマトグラフィーで測定した。これらの配列を以下に示し、配列番号31に対するこれらの配列アラインメント比較を図4に示す：

FVNQHLCGSD LVEALALVCGERGF F YTDPTGGGPRRGIVE  
QCCHSICSLYQLENYCNGGGGAGGGGDCPKCPAPEMLGGP  
SVFIFPPKPKD TLLIARTPEVTCVVVDLDPEDPEVQISWF  
VDGKQMQTAKTQPREEQFNGTYRVVSVLPIGHQDWLKGKQ  
FTCKVNNKALPSP IERTISKARGQAHQPSVYVLPSPREEL  
SKNTVSLTCLIKDFFPPDIDVEWQSN GQQEPESKYRTTTP  
QLDEEDGSYFLYSKLSVDKSRWQRGDTFICAVMHEALHNHY  
TQESLSHSPG (配列番号36)

10

FVNQHLCGSD LVEALALVCGERGF F YTDPTGGGPRRGIVE  
QCCHSICSLYQLENYCNGGGGAGGGGCNNCP CPGCGLLGG  
PSVFIFPPKPKD ILVTARTPTVTTCVVVDLDPENPEVQISW  
FVDSKQVQTANTQPREEQSNGTYRVVSVLPIGHQDWLSGK  
QFKCKVNNKALPSP IEEIISKTPGQAHQPNVYVLPSPRDE  
MSKNTVTLTCLVKDFFPPEIDVEWQSN GQQEPESKYRMTTP  
PQLDEEDGSYFLYSKLSVDKSRWQRGDTFICAVMHEALHNH  
YTQISLSHSPG (配列番号37)

20

FVNQHLCGSD LVEALALVCGERGF F YTDPTGGGPRRGIVE  
QCCHSICSLYQLENYCNGGGGAGGGGCISPCPVPESELGGP  
SVFIFPPKPKD ILRITRTPEITTCVVLDLGREDEPEVQISWF  
VDGKEVHTAKTQPREQQFNSTYRVVSVLPIEHQDWLTGKE  
FKCRVNHIGLPSPIERTISKARGQAHQPSVYVLPSPKEL  
SSSDT VT LTCLIKDFFPPEIDVEWQSN GQPEPESEKYHTTA  
PQLDEEDGSYFLYSKLSVDKSRWQQGDTFTCAVMHEALQNH  
YTDLSLSHSPG (配列番号38)

30

#### 【0230】

得られたタンパク質収量、ホモ二量体率、およびホモ二量体力価を表3に示す。予想外にも、イヌIgGBアイソタイプベースのFcフラグメントを含む配列番号36のインスリン-Fc融合タンパク質のみが、50mg/L超という設計基準を達成するホモ二量体力価を示した。イヌIgGCアイソタイプベースのFcフラグメントを含む配列番号37のインスリン-Fc融合タンパク質からは、化合物が全く得られず、イヌIgGDアイソタイプベースのFcフラグメントを含む配列番号38のインスリン-Fc融合タンパク質は、かなりのタンパク質収量を示したものの、凝集度が高く、そのためホモ二量体力価が許容できないほどに低かった。

40

#### 【0231】

配列番号36および配列番号38のインスリン-Fc融合タンパク質の、インビトロにおけるインスリン受容体結合を、実施例12の手順に従って試験した。配列番号38のインスリン-Fc融合タンパク質は5000nMより大きいIC50を示したが、これは、当該化合物がインビボにおいて生物活性を示さない可能性が高いことを示している。しかし、配列番号36のインスリン-Fc融合タンパク質は28nMというIC50を示し、これは、この配列がインビボにおいて生物活性を示す可能性があることを示している。

50

【表 3】

表 3：天然型イヌ I g G B F c フラグメント、天然型イヌ I g G C F c フラグメント、および天然型イヌ I g G D F c フラグメントを利用している配列の場合のホモ二量体力価					
配列番号	I g G フラグメント	タンパク質収量 (mg/L)	ホモ二量体率 %	ホモ二量体力価 (mg/L)	I R 結合、I C 5 0 (nM)
配列番号 3 1	I g G A	2 1	2 4 %	5	2, 7 3 3
配列番号 3 6	I g G B	8 0	9 3 %	7 4	2 8
配列番号 3 7	I g G C	0	0 %	0	DNM*
配列番号 3 8	I g G D	1 3 4	1 2 %	1 6	> 5 0 0 0

\*DNM=未測定

## 【 0 2 3 2 】

実施例 3 3：イヌ I g G B アイソタイプ F c フラグメントを有する配列番号 4 のインスリンポリペプチドを含むインスリン - F c 融合タンパク質のインビボにおける効力

実施例 3 2 の有望なホモ二量体力価およびインスリン受容体活性の結果を考慮して、配列番号 3 6 のインスリン - F c 融合タンパク質を、およそ 1 0 k g の重さの N = 3 の健常な抗体未処置ビーグル犬のそれぞれに静脈内注射後、実施例 2 1 に従ってインビボ生物活性について試験した。別の実験で、上記化合物を N = 3 の未処置ビーグル犬に皮下投与した。図 5 は、配列番号 3 6 のインスリン - F c 融合タンパク質を単回静脈内投与した場合の、時間に対する % F B G L を示しており、図 6 は、配列番号 3 6 のインスリン - F c 融合タンパク質を単回皮下投与した場合の、時間に対する % F B G L を示しており、共に、配列番号 3 6 のインスリン - F c 融合タンパク質が、イヌにおいて顕著な生物活性を示すことを示している。

## 【 0 2 3 3 】

N A O C を実施例 2 2 の手順に従って算出して、上記インスリン - F c 融合タンパク質の相対生物活性および作用持続時間を求めた。静脈内注射した配列番号 3 6 のインスリン - F c 融合タンパク質の N A O C は、3 9 9 % F B G L ・ 日 ・ k g / m g であり、これは、静脈内注射した配列番号 3 1 のインスリン - F c 融合タンパク質の N A O C の 3 . 8 倍であり、イヌ I g G A F c フラグメントを含むインスリン - F c 融合タンパク質に対する、イヌ I g G B F c フラグメントを含むインスリン - F c 融合タンパク質の、生物活性における顕著な増加が示された。皮下注射した配列番号 3 6 のインスリン - F c 融合タンパク質の N A O C は 3 6 6 % F B G L ・ 日 ・ k g / m g であり、皮下投与を介した生物活性レベルは静脈内投与を介して得られる生物活性レベルと同様であることが明らかとなった。

## 【 0 2 3 4 】

実施例 3 4：イヌ I g G B アイソタイプ F c フラグメントを有する配列番号 4 のインスリンポリペプチドを含むインスリン - F c 融合タンパク質を反復皮下投与した後のインビボ免疫原性スクリーニング

イヌにおいて、配列番号 3 6 のインスリン - F c 融合タンパク質を反復皮下投与した場合の生物活性を、実施例 2 2 に記載の方法に従って試験した。N = 3 の動物に 0 日目、3 5 日目、および 4 2 日目に皮下投与を行い、実施例 2 2 に従って、各投与後の 7 日間の枠について、% F B G L を測定した。反復皮下注射のそれぞれについて、実施例 2 2 の手順に従って、N A O C および N A O C R を算出した。表 4 に示されているように、イヌにおける反復皮下投与では、予想外にも、N A O C R における顕著な減少（すなわち、3 回目注射の N A O C が、1 回目注射の N A O C の 0 . 4 0、すなわち 4 0 % しかない）によって判断されるように、3 回目の投与までに生物活性が顕著に減衰することが明らかになった。

10

20

30

40

50

【表 4】

表 4：配列番号 36 を反復投与した場合の投与毎の NAOC および NAOCR		
配列番号 36 の注射番号	NAOC (%FBGL・日・kg/mg)	NAOCR (第 1 週に対する比)
1	330	1.0
2	339	1.1
3	115	0.4

## 【0235】

特定の説明に束縛されるものではないが、イヌにおける 3 回目の反復皮下投与後に配列番号 36 のインスリン - Fc 融合タンパク質の生物活性が顕著に減少した原因は、その生物活性を中和する抗薬物抗体の発生によるものであると想定された。抗薬物抗体は、インスリン - Fc 融合タンパク質のインスリンポリペプチド部分、リンカー部分、または Fc フラグメント部分に対するものである場合がある。免疫原性反応が抗原提示細胞間、ヘルパー T 細胞間、B 細胞間、およびその関連サイトカイン間の相互作用として現れ、当該薬物（例えば、抗薬物抗体）に対する内因性抗体の産生に繋がり得る。結合抗体は、インスリン - Fc 融合タンパク質と結合可能な全てのアイソタイプであり、これらは実施例 24 に記載されているような免疫学的検定で検出できる。インスリン - Fc 融合タンパク質の機能活性を阻害する中和抗体は、通常は、生物活性のために必要なエピトープに対するものである。この通りであるかどうかの判断を行うため、各投与の施行前と、実施例 11 および実施例 12 に記載の実験の最後に血清を採取し、これを実施例 24 に従って抗薬物抗体レベルを定量化する試験にかけた。図 7 に示されているように、抗薬物抗体のレベルは上記化合物の複数回の皮下投与に伴って確かに増加し、配列番号 36 のインスリン Fc 融合タンパク質の 3 回目の注射後の中和抗薬物抗体の産生が、NAOCR の減少の原因である可能性があることが示された。

## 【0236】

実施例 35：潜在的な免疫原性リスクを低減するための、配列番号 4 のインスリンポリペプチドとイヌ IgGB アイソタイプ Fc フラグメントとを含む非グリコシル化インスリン - Fc 融合タンパク質

実施例 32 および実施例 33 で示したように、配列番号 36 のインスリン - Fc 融合タンパク質は、イヌにおいて、許容可能なホモ二量体含有率、ホモ二量体力価、および生物活性を示した。しかし、糖尿病などの慢性疾患へのその使用には、反復皮下投与に伴って生物活性が低減し（実施例 34）、抗薬物抗体が産生される（実施例 34）という欠陥がある。特定の理論に束縛されるものではないが、抗薬物抗体の産生と生物活性の低減の可能性のある 1 つの原因として、イヌ IgGB Fc フラグメントが、イヌ免疫系の各種受容体（例えば、Fc RI などの Fc 受容体）と、相互作用することが増えることが挙げられる。しかしながら、イヌ IgGB アイソタイプは、4 種のイヌ IgG アイソタイプの中で、Fc フラグメントに用いられた場合に、製造性および単回投与生物活性の各設計目標を達成するインスリン - Fc 融合タンパク質をもたらず（実施例 28）、唯一のアイソタイプであった。発明を実施するための形態に記載したように、Fc 相互作用を低減するための 1 つの方法には、Fc フラグメントの cNg 部位を変異させることで、宿主細胞内で合成される際のグリコシル化を妨げることが行われる。すなわち、cNg 部位の変異を配列番号 36 の Fc フラグメント領域に対して行ったことで、実施例 14 に記載のインビトロヒト Fc RI アッセイにおける結合性によって評価される、インビボにおける Fc 受容体に対する Fc フラグメントの結合親和性が低減された。グリカンを持たないことの確認は、実施例 8 の LC-MS 法を用いて行い、ただし、PNG アーゼ F 処理工程は省略した。配列番号 36 のインスリン - Fc 融合タンパク質における cNg 部位の位置は cNg - NB139 である。配列番号 36 への変異としては、cNg - NB139 - Q という変異を含む配列番号 39、cNg - NB139 - S という変異を含む配列番号 40

、c N g - N B 1 3 9 - D という変異を含む配列番号 4 1、および c N g - N B 1 3 9 - K という変異を含む配列番号 4 2 があつた。c N g 変異型インスリン - F c 融合タンパク質の完全アミノ酸配列を以下に挙げ ( N B 1 3 9 位には下線 )、得られた配列アラインメントを図 8 に示した ( クラスタルオメガ ) :

F V N Q H L C G S D L V E A L A L V C G E R G F F Y T D P T G G G P R R G I V E  
Q C C H S I C S L Y Q L E N Y C N G G G G A G G G G D C P K C P A P E M L G G P  
S V F I F P P K P K D T L L I A R T P E V T C V V V D L D P E D P E V Q I S W F  
V D G K Q M Q T A K T Q P R E E Q F Q G T Y R V V S V L P I G H Q D W L K G K Q  
F T C K V N N K A L P S P I E R T I S K A R G Q A H Q P S V Y V L P P S R E E L  
S K N T V S L T C L I K D F F P P D I D V E W Q S N G Q Q E P E S K Y R T T P P  
Q L D E D G S Y F L Y S K L S V D K S R W Q R G D T F I C A V M H E A L H N H Y  
T Q E S L S H S P G ( 配列番号 3 9 )

10

F V N Q H L C G S D L V E A L A L V C G E R G F F Y T D P T G G G P R R G I V E  
Q C C H S I C S L Y Q L E N Y C N G G G G A G G G G D C P K C P A P E M L G G P  
S V F I F P P K P K D T L L I A R T P E V T C V V V D L D P E D P E V Q I S W F  
V D G K Q M Q T A K T Q P R E E Q F S G T Y R V V S V L P I G H Q D W L K G K Q  
F T C K V N N K A L P S P I E R T I S K A R G Q A H Q P S V Y V L P P S R E E L  
S K N T V S L T C L I K D F F P P D I D V E W Q S N G Q Q E P E S K Y R T T P P  
Q L D E D G S Y F L Y S K L S V D K S R W Q R G D T F I C A V M H E A L H N H Y  
T Q E S L S H S P G ( 配列番号 4 0 )

20

F V N Q H L C G S D L V E A L A L V C G E R G F F Y T D P T G G G P R R G I V E  
Q C C H S I C S L Y Q L E N Y C N G G G G A G G G G D C P K C P A P E M L G G P  
S V F I F P P K P K D T L L I A R T P E V T C V V V D L D P E D P E V Q I S W F  
V D G K Q M Q T A K T Q P R E E Q F D G T Y R V V S V L P I G H Q D W L K G K Q  
F T C K V N N K A L P S P I E R T I S K A R G Q A H Q P S V Y V L P P S R E E L  
S K N T V S L T C L I K D F F P P D I D V E W Q S N G Q Q E P E S K Y R T T P P  
Q L D E D G S Y F L Y S K L S V D K S R W Q R G D T F I C A V M H E A L H N H Y  
T Q E S L S H S P G ( 配列番号 4 1 )

30

F V N Q H L C G S D L V E A L A L V C G E R G F F Y T D P T G G G P R R G I V E  
Q C C H S I C S L Y Q L E N Y C N G G G G A G G G G D C P K C P A P E M L G G P  
S V F I F P P K P K D T L L I A R T P E V T C V V V D L D P E D P E V Q I S W F  
V D G K Q M Q T A K T Q P R E E Q F K G T Y R V V S V L P I G H Q D W L K G K Q  
F T C K V N N K A L P S P I E R T I S K A R G Q A H Q P S V Y V L P P S R E E L  
S K N T V S L T C L I K D F F P P D I D V E W Q S N G Q Q E P E S K Y R T T P P  
Q L D E D G S Y F L Y S K L S V D K S R W Q R G D T F I C A V M H E A L H N H Y  
T Q E S L S H S P G ( 配列番号 4 2 )。

#### 【 0 2 3 7 】

インスリン - F c 融合タンパク質を、実施例 1 に従って H E K 2 9 3 細胞で製造し、実施例 4 に従ってプロテイン A カラムを用いて精製した。インスリン - F c 融合タンパク質の構造は実施例 6 に従って非還元 C E - S D S および還元 C E - S D S で確認し、さらに、実施例 8 に記載のグリカン除去を伴う L C - M S によって配列の確認を行った。ホモ二量体率は実施例 1 0 に従って分子ふるいクロマトグラフィーで測定した。表 5 に示すように、配列番号 4 0、配列番号 4 1、および配列番号 4 2 のインスリン - F c 融合タンパク質のホモ二量体力価は設計目標を達成しているが、予想外なことに、c N g - N B 1 3 9 - Q 変異を含む配列番号 3 9 のインスリン - F c 融合タンパク質はホモ二量体力価の設計目標を達成しなかった。

40

【表 5】

表 5：配列番号 36 の c N g を変化させた場合のホモ二量体力価				
配列番号	c N g 変異	タンパク質収量 (m g / L)	ホモ二量体率%	ホモ二量体力価 (m g / L)
配列番号 39	c N g - Q	37	98%	36
配列番号 40	c N g - S	77	98%	75
配列番号 41	c N g - D	88	98%	86
配列番号 42	c N g - K	68	98%	67

10

## 【0238】

残り 3 種の化合物のうちのどれが低減された免疫原性を示す可能性が最も高いかを判断するため、実施例 15 の手順に従って F c 受容体との結合を測定した。F c 受容体との結合性が低いことが、免疫原性が最小となることと、関連している可能性が最も高い。表 6 は、これらのインスリン - F c 融合タンパク質の F c 受容体 I 結合を、配列番号 36 のインスリン - F c 融合タンパク質の F c 受容体結合と比較しており、予想外にも、c N g - D 変異を含む配列番号 41 のインスリン - F c 融合タンパク質が、c N g - S 変異を含む配列番号 40 および c N g - K 変異を含む配列番号 42 の各インスリン - F c 融合タンパク質の F c 受容体結合活性のおよそ 2 倍の、F c 受容体結合活性を示すことが明らかにされている。このことから、c N g - S 変異および c N g - K 変異を含む後者 2 つの化合物を含むインスリン - F c 融合タンパク質のみを、イヌにおける反復投与生物活性試験に好適であると見なした。

20

【表 6】

表 6：配列番号 36 の c N g を変化させた場合の F c $\gamma$ 受容体結合				
配列番号	c N g 変異	OD 450 nm Log [Fc $\gamma$ RI] (ng/mL)	OD 450 nm -アッセイバック グラウンド	配列番号 36 に 対する比
配列番号 36	天然 c N g	0.386	0.323	1.00
配列番号 40	c N g - S	0.140	0.077	0.24
配列番号 41	c N g - D	0.204	0.141	0.44
配列番号 42	c N g - K	0.126	0.063	0.20
アッセイバック グラウンド (化合物なし)	N/A	0.063	0.000	N/A

30

## 【0239】

実施例 36：非グリコシル化 c N g - K イヌ I g G B アイソタイプ F c フラグメントを有する配列番号 4 のインスリンポリペプチド、および非グリコシル化 c N g - S イヌ I g G B アイソタイプ F c フラグメントを有する配列番号 4 のインスリンポリペプチドの、インビボにおける生物活性および免疫原性の評価

40

c N g - S 変異を含む配列番号 40 のインスリン - F c 融合タンパク質が、イヌにおける反復投与時の生物活性の成績を向上させたかどうかを確かめるため、当該化合物を N = 1 のイヌに、0 日目、7 日目、14 日目、および 28 日目に、実施例 22 の手順に従って皮下投与した。イヌの % F B G L が低下し過ぎた場合、そのイヌに餌を与えて、血糖を安全なレベルまで上昇させた。1 回目注射の N A O C は 191 % F B G L  $\cdot$  日  $\cdot$  k g / m g であり、配列番号 40 のインスリン - F c 融合タンパク質がインビボにおいて十分な生物活性を示すことが示された。それ以降の各投与についても、実施例 22 の一般手順に従って、N A O C および N A O C R の測定を行い、投与を施行した時間から次の投与を施行する直前までを算出した。表 7 に示される N A O C および N A O C R は、配列番号 40 のイ

50

ンスリン - F c 融合タンパク質が、4 回投与レジメンの 3 回目投与および 4 回目投与時に N A O C R の顕著な減少を示したことを表している。すなわち、c N g - S 変異を含む配列番号 4 0 のインスリン - F c 融合タンパク質は、配列番号 3 6 のインスリン - F c 融合タンパク質の F c R I 結合の 1 / 4 という低い F c R I 結合を有しているにもかかわらず、イヌにおいて反復投与時の生物活性を示すことができない。

【表 7】

表 7：配列番号 4 0 の反復投与の投与毎の N A O C		
配列番号 4 0 の注射番号	N A O C (%FBGL・日・kg/mg)	N A O C R
1	1 9 1	1. 0
2	2 4 0	1. 3
3	0	0. 0
4	3 9	0. 2

10

## 【0 2 4 0】

c N g - K 変異を含む配列番号 4 2 のインスリン - F c 融合タンパク質が、イヌにおける反復投与時の生物活性の成績を向上させたかどうかを確かめるため、当該化合物を N = 1 のイヌに、0 日目、7 日目、1 4 日目、および 2 8 日目に、実施例 2 2 の手順に従って皮下投与した。イヌの % F B G L が低下し過ぎた場合、そのイヌに餌を与えて、血糖を安全なレベルまで上昇させた。1 回目注射の N A O C は 4 4 9 % F B G L ・日・kg / mg であり、配列番号 4 2 のインスリン - F c 融合タンパク質がインビボにおいて十分な生物活性を示すことが示された。また、当該化合物の薬物動態プロファイルを、E L I S A を使用する実施例 2 3 の方法で測定し、2 コンパートメントモデルをそのデータに適合し、当該化合物の排出半減期を求めたところ、約 0. 9 日であった。それ以降の各投与についても、実施例 2 2 の一般手順に従って、N A O C および N A O C R の測定を行い、投与を施行した時間から次の投与を施行する直前までを算出した。表 8 に示される N A O C および N A O C R は、配列番号 4 2 のインスリン - F c 融合タンパク質が、4 回の投与中、0. 6 よりも大きな N A O C R を維持することを示している。以上から、予想外にも、c N g - K 変異を含む配列番号 4 2 のインスリン - F c 融合タンパク質が、イヌにおける反復投与時の生物活性を顕著に向上させた唯一の、配列番号 3 6 のインスリン - F c 融合タンパク質の非グリコシル化変異体であった。

20

30

【表 8】

表 8：配列番号 4 2 の反復投与の投与毎の N A O C		
配列番号 4 2 の注射番号	N A O C (%FBGL・日・kg/mg)	N A O C R
1	4 4 9	1. 0
2	3 6 1	0. 8
3	2 5 9	0. 6
4	6 3 8	1. 4

40

## 【0 2 4 1】

また、抗薬物抗体レベルおよび抗インスリン抗体レベルを、治療の全期間（2 8 日間）と、追加で 2 週間、実施例 2 4 に従って測定した。図 9 は、配列番号 4 2 のインスリン - F c 融合タンパク質が、イヌにおける反復皮下投与に伴って、抗薬物抗体を発生させるものの、その抗薬物抗体価は、配列番号 3 6 のインスリン - F c 融合タンパク質によって発生するもの（実施例 3 2）よりもずっと低いことを示している。

## 【0 2 4 2】

実施例 3 7：抗薬物抗体を含有するイヌ血清のスクリーニング、並びにインスリンポリペ

50

プチドの B 1 0 D 位および A 8 H 位における免疫原性である可能性があるエピトープの特定

イヌ I g G B F c フラグメントの c N g 部位の L y s への変異（すなわち、c N g - K）は、配列番号 4 のインスリンポリペプチドと配列番号 1 1 のペプチドリinker とを含むインスリン - 融合タンパク質の反復投与時の生物活性を向上させたが（実施例 3 6）、得られた配列番号 4 2 のインスリン - F c 融合タンパク質は抗薬物抗体を発生させてしまった（実施例 3 6）。このことから、配列番号 4 のインスリンポリペプチドが、予想外にも、イヌの免疫系の対象にされる特定のエピトープ（すなわち、免疫原性の「ホットスポット」）を含む可能性があるという仮定が得られた。そのため、実施例 2 4 に記載の血清試料中に存在する抗体の結合特異性を、実施例 2 7 の一般手順に従って評価した。コートされたインスリン - F c 融合タンパク質ライブラリーに対する、配列番号 3 6 のインスリン - F c 融合タンパク質（実施例 3 2）の反復投与から得られた抗体含有血清試料の解析によって、予想外にも、配列番号 5 のインスリンポリペプチド配列内に、B 鎖の N 末端から 1 0 番目の位置（すなわち、B 1 0）のアスパラギン酸変異、および、別に、A 鎖の N 末端から 8 番目の位置（すなわち、A 8）のヒスチジン変異という、2 つの主要な「ホットスポット」が存在することが示された。これらの結果は、これら 2 つの特定のアミノ酸変異を含むインスリンポリペプチドアミノ酸組成を含むインスリン - F c 融合タンパク質が、イヌにおいて免疫原性である可能性があり、そのため、反復注射後に生物活性を中和する抗薬物抗体を発生する可能性があることを示唆している。以上から、B 1 0 アスパラギン酸と A 8 ヒスチジンを含まないインスリンポリペプチドが、長期間に亘ってイヌに反復投与（例えば、イヌ糖尿病を治療するため）する必要があるインスリン - F c 融合タンパク質には好適であることが確認された。

【 0 2 4 3 】

実施例 3 8：配列番号 4 のインスリンポリペプチドと非グリコシル化イヌ I g G B アイソタイプ F c フラグメントとを含むインスリン - F c 融合タンパク質において、インスリンポリペプチドの B 1 0 D 変異および A 8 H 変異を天然組成に戻すと、潜在的な免疫原性リスクが低減される

「ホットスポット」変異の置換が、配列番号 4 のインスリンポリペプチドとイヌ I g G B アイソタイプフラグメントとを含むインスリン - F c 融合タンパク質の免疫原性および反復投与時の生物活性を向上させるかどうかを評価するために、例示的なインスリン - F c 融合タンパク質（配列番号 4 3）において、インスリンポリペプチドの B 1 0 アミノ酸と A 8 アミノ酸を、以下に挙げる当該インスリンポリペプチドの天然組成であるヒスチジンおよびスレオニンにそれぞれ戻したもの（配列番号 6 3）（非天然アミノ酸には下線）を合成した。

F V N Q H L C G S H L V E A L A L V C G E R G F F Y T D P T G G G P R R G I V E  
Q C C T S I C S L Y Q L E N Y C N（配列番号 6 3）。

【 0 2 4 4 】

さらに、非グリコシル化 c N g 変異体にさらなる利点がある可能性を考慮して、配列番号 4 3 のインスリン - F c 融合タンパク質は c N g - Q 変異を含んでいる。配列番号 4 3 のインスリン - F c 融合タンパク質の全アミノ酸配列を以下に示す：

F V N Q H L C G S H L V E A L A L V C G E R G F F Y T D P T G G G P R R G I V E  
Q C C T S I C S L Y Q L E N Y C N G G G G A G G G G D C P K C P A P E M L G G P  
S V F I F P P K P K D T L L I A R T P E V T C V V V D L D P E D P E V Q I S W F  
V D G K Q M Q T A K T Q P R E E Q F Q G T Y R V V S V L P I G H Q D W L K G K Q  
F T C K V N N K A L P S P I E R T I S K A R G Q A H Q P S V Y V L P P S R E E L  
S K N T V S L T C L I K D F F P P D I D V E W Q S N G Q Q E P E S K Y R T T P P  
Q L D E D G S Y F L Y S K L S V D K S R W Q R G D T F I C A V M H E A L H N H Y  
T Q E S L S H S P G（配列番号 4 3）。

【 0 2 4 5 】

配列番号 4 3 のインスリン - F c 融合タンパク質を、実施例 1 に従って H E K 2 9 3 細胞で製造し、実施例 4 に従ってプロテイン A カラムを用いて精製した。得られたタンパク

10

20

30

40

50

質収量はわずか 21 mg / L であった。構造の確認を実施例 6 に従って非還元 C E - S D S および還元 C E - S D S で行い、さらに、配列の確認を実施例 8 に記載のグリカン除去を伴う L C - M S によって行った。実施例 10 に従って分子ふるいクロマトグラフィーによって測定されたホモ二量体率は 98.0 % であり、このタンパク質には比較的凝集体がないことが示された。

#### 【0246】

ホモ二量体力価は 21 mg / L と比較的低かったが、配列番号 43 のインスリン - F c 融合タンパク質を、イヌにおいて、インビボにおける生物活性および免疫原性について、実施例 22、実施例 23、および実施例 24 の手順にそれぞれ従って、評価した。図 10 から明らかなように、配列番号 43 のインスリン - F c 融合タンパク質において、B10D 変異および A8H 変異を天然アミノ酸（すなわち、B10H および A8T）に戻すことで、親化合物（配列番号 36）の免疫原性が顕著に低減した。

10

#### 【0247】

しかしながら、図 11 に示されているように、天然の B10 アミノ酸および A8 アミノ酸を含む配列番号 43 のインスリン - F c 融合タンパク質は、生物活性を示さなかった（すなわち、N A O C が実質的にゼロであった）。

#### 【0248】

実施例 39：イヌ I g G B - F c フラグメントを含むインスリン - F c 融合タンパク質会合体の生物活性を向上させるために、配列番号 63 のインスリンポリペプチドにさらなる B 鎖変異および A 鎖変異を組み込む試み

20

配列番号 36 のインスリン - F c 融合タンパク質（実施例 33）と比べて、配列番号 43 のインスリン - F c 融合タンパク質が抗薬物抗体を発生させなかったこと（実施例 38）は、配列番号 4 のインスリンポリペプチドにおける B10D 変異および A8H 変異が、抗薬物抗体産生の原因となる、免疫原性のエピトープである可能性があるという説の強力な証拠である。しかし、配列番号 36 のものと比較して、配列番号 43 のインスリン - F c 融合タンパク質はインビボにおける効力が欠如しており、このことは、これら 2 つのアミノ酸変異が、許容できる生物活性レベルの達成にも関与していることを示している。配列番号 43 のインスリン - F c 融合タンパク質のインビボにおける効力の欠如は、実施例 12 の方法に従ってインスリン受容体結合アッセイで測定された、その高い I C 50（以下の表 9 に示す）と関連がある。よって、インスリンポリペプチドにおける天然の B10 アミノ酸および A8 アミノ酸を保持することで免疫原性の程度を低く維持しながら、インスリン - F c 融合タンパク質の生物活性を増加させる（すなわち、インスリン受容体結合アッセイにおける I C 50 値を 5000 nM 未満、より好ましくは 4000 nM 未満、さらにより好ましくは 3000 nM 未満に減少させる）ための、さらなる試みが必要であった。

30

#### 【0249】

I R に対する強力な結合には、インスリンの B 鎖および A 鎖の各種部分が必要であることが知られている（Hubbard S. R.、"Structural biology : Insulin meets its receptor"、Nature.、2013 年；493 巻（7431 号）：pp171 - 172）。よって、B10 および A8 を天然インスリンにおけるものと同じに、且つ、C 鎖およびペプチドリンカーを一定に維持しながら、B 鎖または A 鎖の一部を改変した。これらのインスリン - F c 融合タンパク質のいくつかを、実施例 1 に従って H E K 293 細胞で製造し、実施例 4 に従ってプロテイン A カラムを用いて精製した。構造の確認を実施例 6 に従って非還元 C E - S D S および還元 C E - S D S で行い、さらに、配列の確認を実施例 8 に記載のグリカン除去を伴う L C - M S によって行った。ホモ二量体含有率を実施例 10 に従って分子ふるいクロマトグラフィーで測定し、インスリン受容体結合親和性を実施例 12 に従って測定した。これらの配列を以下に示し、配列番号 43 に対して得られた配列アラインメントを図 12 に示す（クラスタルオメガ）。

40

F V N Q H L C G S H L V Q A L Y L V C G E R G F F Y T D P T G G G P R R G I V E

50

Q C C T S I C S L Y Q L E N Y C G G G G A G G G G D C P K C P A P E M L G G P S  
V F I F P P K P K D T L L I A R T P E V T C V V V D L D P E D P E V Q I S W F V  
D G K Q M Q T A K T Q P R E E Q F S G T Y R V V S V L P I G H Q D W L K G K Q F  
T C K V N N K A L P S P I E R T I S K A R G Q A H Q P S V Y V L P P S R E E L S  
K N T V S L T C L I K D F F P P D I D V E W Q S N G Q Q E P E S K Y R T T P P Q  
L D E D G S Y F L Y S K L S V D K S R W Q R G D T F I C A V M H E A L H N H Y T  
Q E S L S H S P G ( 配列番号 4 4 )

F V N Q H L C G S E L V E A L A L V C G E R G F F Y T D P T G G G P R R G I V E  
Q C C T S I C S L Y Q L E N Y C G G G G A G G G G D C P K C P A P E M L G G P S  
V F I F P P K P K D T L L I A R T P E V T C V V V D L D P E D P E V Q I S W F V  
D G K Q M Q T A K T Q P R E E Q F S G T Y R V V S V L P I G H Q D W L K G K Q F  
T C K V N N K A L P S P I E R T I S K A R G Q A H Q P S V Y V L P P S R E E L S  
K N T V S L T C L I K D F F P P D I D V E W Q S N G Q Q E P E S K Y R T T P P Q  
L D E D G S Y F L Y S K L S V D K S R W Q R G D T F I C A V M H E A L H N H Y T  
Q E S L S H S P G ( 配列番号 4 5 )

10

F V N Q H L C G S H L V E A L A L V C G E A G F F Y T D P T G G G P R R G I V E  
Q C C T S I C S L Y Q L E N Y C G G G G A G G G G D C P K C P A P E M L G G P S  
V F I F P P K P K D T L L I A R T P E V T C V V V D L D P E D P E V Q I S W F V  
D G K Q M Q T A K T Q P R E E Q F S G T Y R V V S V L P I G H Q D W L K G K Q F  
T C K V N N K A L P S P I E R T I S K A R G Q A H Q P S V Y V L P P S R E E L S  
K N T V S L T C L I K D F F P P D I D V E W Q S N G Q Q E P E S K Y R T T P P Q  
L D E D G S Y F L Y S K L S V D K S R W Q R G D T F I C A V M H E A L H N H Y T  
Q E S L S H S P G ( 配列番号 4 6 )

20

F V N Q H L C G S H L V E A L A L V C G E R G F F Y T D P T G G G P R R G I V E  
Q C C T S I C S L Y Q L E N Y C G G G G A G G G G D C P K C P A P E M L G G P S  
V F I F P P K P K D T L L I A R T P E V T C V V V D L D P E D P E V Q I S W F V  
D G K Q M Q T A K T Q P R E E Q F S G T Y R V V S V L P I G H Q D W L K G K Q F  
T C K V N N K A L P S P I E R T I S K A R G Q A H Q P S V Y V L P P S R E E L S  
K N T V S L T C L I K D F F P P D I D V E W Q S N G Q Q E P E S K Y R T T P P Q  
L D E D G S Y F L Y S K L S V D K S R W Q R G D T F I C A V M H E A L H N H Y T  
Q E S L S H S P G ( 配列番号 4 7 )

30

F V N Q H L C G S H L V E A L A L V C G E R G F F Y T D P T G G G P R R G I V E  
Q C C T S I C S L Y Q L E N Y C G G G G A G G G G D C P K C P A P E M L G G P S  
V F I F P P K P K D T L L I A R T P E V T C V V V D L D P E D P E V Q I S W F V  
D G K Q M Q T A K T Q P R E E Q F S G T Y R V V S V L P I G H Q D W L K G K Q F  
T C K V N N K A L P S P I E R T I S K A R G Q A H Q P S V Y V L P P S R E E L S  
K N T V S L T C L I K D F F P P D I D V E W Q S N G Q Q E P E S K Y R T T P P Q  
L D E D G S Y F L Y S K L S V D K S R W Q R G D T F I C A V M H E A L H N H Y T  
Q E S L S H S P G ( 配列番号 4 8 )

40

【表 9】

表 9：各種配列番号の、ホモ二量体率%、ホモ二量体力価、および I R I C 5 0 値			
配列番号	ホモ二量体率%	HEKホモ二量体力価 (mg/L)	I R I C 5 0 (nM)
配列番号 4 3	9 8 . 0 %	2 1	> 5 0 0 0
配列番号 4 4	9 7 . 6 %	9	2 6 2 4
配列番号 4 5	8 1 . 4 %	1 7	6 3 3
配列番号 4 6	9 9 . 1 %	2 2	> 5 0 0 0
配列番号 4 7	9 6 . 6 %	2 5	2 4 0 2
配列番号 4 8	9 8 . 0 %	6	> 5 0 0 0

10

## 【 0 2 5 0 】

配列番号 4 3 と比べて、提唱された変異が I R 結合を向上させた（すなわち、I C 5 0 値を低下させた）のは、3 つの場合（配列番号 4 4、配列番号 4 5、および配列番号 4 7）でだけであった。しかし、いずれの変異でも、5 0 m g / L より大きいホモ二量体力価という製造設計目標を達成する化合物は得られず、また、場合によっては、変異により製造性が顕著に低減する（例えば、2 0 m g / L 未満のホモ二量体力価）こともあった。

## 【 0 2 5 1 】

20

実施例 4 0：イヌ I g G B F c フラグメントを含むインスリン - F c 融合タンパク質会合体の生物活性を向上させるために、配列番号 6 3 のインスリンポリペプチドに C 鎖変異を組み込む試み

実施例 3 9 で得られた結果は、配列番号 6 3 のインスリンポリペプチドの A 鎖および B 鎖を変異させる試みが全て、関連インスリン - F c 融合物の H E K ホモ二量体力価が許容できないほどに低い（すなわち、2 5 m g / L 以下のホモ二量体力価）結果となったことを示している。そのため、さらなる実験が必要となった。本実施例では、配列番号 6 3 のインスリンポリペプチドの C 鎖組成を、より長くすることで、あるいは可動性を増加させることで、変異させた。天然インスリン（例えばヒトインスリン）は、インスリン受容体に結合する際に、B 鎖および A 鎖両方の折り畳みの移動を含む、顕著な立体構造変化を起こすことが示されている（例えば、M e n t i n g ら、N a t u r e、2 0 1 3 年；4 9 3 巻（7 4 3 1 号）：p p 2 4 1 ~ 2 4 5 によって説明されている）。本発明のインスリンポリペプチドと異なり、天然インスリンは、天然型では 2 鎖ポリペプチドであり、2 本のジスルフィド結合だけで接続され、A 鎖と B 鎖の可動性を制限する C 鎖は存在しないため、インスリン受容体においてこの立体構造変化を自由に起こすことができる。特定の理論に束縛されるものではないが、配列番号 6 3 のインスリンポリペプチド内に含まれる C 鎖が、柔軟でなさ過ぎる（例えば、B 鎖と A 鎖の間での動きを容易なものにしないアミノ酸組成およびアミノ酸配列）、且つ/または、短過ぎる（例えば、B 鎖の C 末端と A 鎖の N 末端との間のアミノ酸が十分ではない）ために、インスリンポリペプチドが、インスリン受容体への強力な結合に必要な分子形状変化を起こすことが妨げられると仮定した。よって、以下に示すように、配列番号 4 3 のインスリン - F c 融合タンパク質をベースとして、インスリンポリペプチド C 鎖を変化させて、いくつかのインスリン - F c 融合タンパク質を合成した。配列番号 4 3 に対して得られた配列アラインメントを図 1 3 に示す（クラスタルオメガ）。

30

40

```

F V N Q H L C G S H L V Q A L Y L V C G E R G F F Y T D P T Q R G G G G G Q R G
I V E Q C C T S I C S L Y Q L E N Y C G G G G A G G G G D C P K C P A P E M L G
G P S V F I F P P K P K D T L L I A R T P E V T C V V V D L D P E D P E V Q I S
W F V D G K Q M Q T A K T Q P R E E Q F S G T Y R V V S V L P I G H Q D W L K G
K Q F T C K V N N K A L P S P I E R T I S K A R G Q A H Q P S V Y V L P P S R E
E L S K N T V S L T C L I K D F F P P D I D V E W Q S N G Q Q E P E S K Y R T T

```

50

P P Q L D E D G S Y F L Y S K L S V D K S R W Q R G D T F I C A V M H E A L H N  
 H Y T Q E S L S H S P G ( 配列番号 4 9 )  
 F V N Q H L C G S H L V E A L A L V C G E R G F F Y T D P T G G G G G G S G G G  
 G G I V E Q C C T S I C S L Y Q L E N Y C G G G G A G G G G D C P K C P A P E M  
 L G G P S V F I F P P K P K D T L L I A R T P E V T C V V V D L D P E D P E V Q  
 I S W F V D G K Q M Q T A K T Q P R E E Q F S G T Y R V V S V L P I G H Q D W L  
 K G K Q F T C K V N N K A L P S P I E R T I S K A R G Q A H Q P S V Y V L P P S  
 R E E L S K N T V S L T C L I K D F F P P D I D V E W Q S N G Q Q E P E S K Y R  
 T T P P Q L D E D G S Y F L Y S K L S V D K S R W Q R G D T F I C A V M H E A L  
 H N H Y T Q E S L S H S P G ( 配列番号 5 0 )  
 F V N Q H L C G S H L V E A L A L V C G E R G F F Y T D P G G G G G G G G G I V  
 E Q C C T S I C S L Y Q L E N Y C G G G G A G G G G D C P K C P A P E M L G G P  
 S V F I F P P K P K D T L L I A R T P E V T C V V V D L D P E D P E V Q I S W F  
 V D G K Q M Q T A K T Q P R E E Q F S G T Y R V V S V L P I G H Q D W L K G K Q  
 F T C K V N N K A L P S P I E R T I S K A R G Q A H Q P S V Y V L P P S R E E L  
 S K N T V S L T C L I K D F F P P D I D V E W Q S N G Q Q E P E S K Y R T T P P  
 Q L D E D G S Y F L Y S K L S V D K S R W Q R G D T F I C A V M H E A L H N H Y  
 T Q E S L S H S P G ( 配列番号 5 1 )  
 F V N Q H L C G S H L V E A L A L V C G E R G F F Y T P G G G G G G G G G I V E  
 Q C C T S I C S L Y Q L E N Y C G G G G A G G G G D C P K C P A P E M L G G P S  
 V F I F P P K P K D T L L I A R T P E V T C V V V D L D P E D P E V Q I S W F V  
 D G K Q M Q T A K T Q P R E E Q F S G T Y R V V S V L P I G H Q D W L K G K Q F  
 T C K V N N K A L P S P I E R T I S K A R G Q A H Q P S V Y V L P P S R E E L S  
 K N T V S L T C L I K D F F P P D I D V E W Q S N G Q Q E P E S K Y R T T P P Q  
 L D E D G S Y F L Y S K L S V D K S R W Q R G D T F I C A V M H E A L H N H Y T  
 Q E S L S H S P G ( 配列番号 5 2 )

【表 1 0】

表 1 0 : 各種配列番号の、ホモ二量体率%、ホモ二量体力価、および I R I C 5 0 値			
配列番号	ホモ二量体率%	HEKホモ二量体力価 (m g / L)	I R I C 5 0 (nM)
配列番号 4 3	9 8 . 0 %	2 1	> 5 0 0 0
配列番号 4 9	9 4 . 0 %	8	4 1 7 6
配列番号 5 0	9 9 . 6 %	3 7	1 6 0 9
配列番号 5 1	9 8 . 3 %	4 2	> 5 0 0 0
配列番号 5 2	9 8 . 6 %	3 3	4 7 2 0

## 【 0 2 5 2 】

インスリン - F c 融合タンパク質を、実施例 1 に従って H E K 2 9 3 細胞で製造し、実  
 施例 4 に従ってプロテイン A カラムを用いて精製した。構造の確認を実施例 6 に従って非  
 還元 C E - S D S および還元 C E - S D S で行い、さらに、配列の確認を実施例 8 に記載  
 のグリカン除去を伴う L C - M S によって行った。ホモ二量体含有率を実施例 1 0 に従っ  
 て分子ふるいクロマトグラフィーで測定し、インスリン受容体結合親和性を実施例 1 2 に  
 従って測定した。結果を表 1 0 に示す。配列番号 4 3 のインスリン - F c 融合タンパク質  
 のものとの比較において、C 鎖変異がインスリン受容体結合親和性を顕著に向上させた (   
 3 0 0 0 n M 未満の I C 5 0 ) のは、最も長い C 鎖 ( G G G G G G S G G G G : 配列番号  
 7 1 ) を含む 1 例 ( 配列番号 5 0 ) でだけであった。しかし、これらの C 鎖変異型インス  
 リン - F c 融合タンパク質のいずれも、5 0 m g / L という製造設計目標を超えるホモ二  
 量体力価を示さなかった。実際に、1 つの例 ( 配列番号 4 9 ) では、C 鎖変異は予想外に  
 も、顕著に低いホモ二量体力価をもたらした。

## 【 0 2 5 3 】

実施例 4 1 : 生物活性を向上させるために、配列番号 6 3 のインスリンポリペプチドとイヌ I g G B F c フラグメントとを含むインスリン - F c 融合タンパク質にペプチドリンカー変異を組み入れる試み

特定の理論に束縛されるものではないが、配列番号 4 3 のインスリン - F c 融合タンパク質のインスリン受容体結合が不十分であることの、別の考えられる理由として、はるかに大きい F c フラグメント分子がペプチドリンカーを介してインスリンポリペプチドに極めて近接して結合していることから生じる、インスリンポリペプチドとインスリン受容体との間の立体障害が関係していると考えられていた。ペプチドリンカーがより短かったり、ペプチドリンカーの折り畳みがより密であると、この問題が悪化する可能性があると考えられ、一方、ペプチドリンカーがより長かったり、ペプチドリンカーが自ら折り返しを起こしにくい（例えば、リンカーの分子剛性がより高い）場合、インスリンポリペプチドと F c フラグメントとの間により多くの空間がつくられることで、この問題が緩和されることがある。インスリンポリペプチドと F c フラグメントとの間の空間の増加は、インスリン受容体と F c フラグメントとの間の距離も増加させ、インスリン受容体結合中の干渉が少なくなる。配列番号 4 3 のインスリン - F c 融合タンパク質の構築に用いられた配列番号 1 1（すなわち、G G G G A G G G G）のペプチドリンカーは、当該リンカーを構成するアミノ酸が側鎖を含まないものである（すなわち、グリシンとアラニンというアミノ酸しか含んでいない）ため、短過ぎ、且つ / または可動性があり過ぎる可能性がある、という仮説が立てられた。よって、この仮説を検証するため、配列番号 4 3 のインスリン - F c 融合タンパク質とは別の 2 つのインスリン - F c 融合タンパク質バリエーションを合成した。配列番号 4 8 のインスリン - F c 融合タンパク質は、配列番号 4 3 のインスリン - F c 融合タンパク質の構築に用いられたものと同じペプチドリンカーを含むが、A 鎖の N 末端から 2 1 番目の位置（すなわち、A 2 1）のアスパラギンが存在しない（すなわち、d e s - A 2 1）インスリンポリペプチドを含む。この特定の変異を組み込むことにより、A 鎖とペプチドリンカーとの間の接合部が、タンパク質収量および / または上記分子の生物活性に影響しているかどうかを確かめた。もう一方の配列番号 5 3 のインスリン - F c 融合タンパク質は、この d e s - A 2 1 N A 鎖変異と、配列番号 4 3 のインスリン - F c 融合タンパク質の構築に用いられたものの長さの 2 倍より長いペプチドリンカーと、を含む。このより長いペプチドリンカーにおいては、アラニンは好ましくなく、代わりに、極性アミド側鎖を含むグルタミンと置き換わっている。このグルタミン置換は、このペプチドリンカーの親水性を増強し、場合によってはリンカーが折れ返ることを妨げることが期待された。これらの配列を以下に示し、配列番号 4 3 に対する配列アラインメントを図 1 4 に示す（クラスタルオメガ）：

```
F V N Q H L C G S H L V E A L A L V C G E R G F F Y T D P T G G G P R R G I V E
Q C C T S I C S L Y Q L E N Y C G G G G G Q G G G G Q G G G G G D C P
K C P A P E M L G G P S V F I F P P K P K D T L L I A R T P E V T C V V V D L D
P E D P E V Q I S W F V D G K Q M Q T A K T Q P R E E Q F S G T Y R V V S V L P
I G H Q D W L K G K Q F T C K V N N K A L P S P I E R T I S K A R G Q A H Q P S
V Y V L P P S R E E L S K N T V S L T C L I K D F F P P D I D V E W Q S N G Q Q
E P E S K Y R T T P P Q L D E D G S Y F L Y S K L S V D K S R W Q R G D T F I C
A V M H E A L H N H Y T Q E S L S H S P G ( 配列番号 5 3 )
F V N Q H L C G S H L V E A L A L V C G E R G F F Y T D P T G G G P R R G I V E
Q C C T S I C S L Y Q L E N Y C G G G G A G G G G D C P K C P A P E M L G G P S
V F I F P P K P K D T L L I A R T P E V T C V V V D L D P E D P E V Q I S W F V
D G K Q M Q T A K T Q P R E E Q F S G T Y R V V S V L P I G H Q D W L K G K Q F
T C K V N N K A L P S P I E R T I S K A R G Q A H Q P S V Y V L P P S R E E L S
K N T V S L T C L I K D F F P P D I D V E W Q S N G Q Q E P E S K Y R T T P P Q
L D E D G S Y F L Y S K L S V D K S R W Q R G D T F I C A V M H E A L H N H Y T
Q E S L S H S P G ( 配列番号 4 8 )
```

【表 1 1】

表 1 1 : 各種配列番号のホモ二量体率%、ホモ二量体力価、および I R I C 5 0 値			
配列番号	ホモ二量体率%	HEKホモ二量体力価 (mg/L)	I R I C 5 0 (nM)
配列番号 4 3	9 8 . 0 %	2 1	> 5 0 0 0
配列番号 4 8	9 8 . 0 %	6	> 5 0 0 0
配列番号 5 3	9 9 . 6 %	1 1	1 2 8 1

## 【 0 2 5 4 】

2 種のインスリン - F c 融合タンパク質を、実施例 1 に従って H E K 2 9 3 細胞で製造し、実施例 4 に従ってプロテイン A カラムを用いて精製した。構造の確認を実施例 6 に従って非還元 C E - S D S および還元 C E - S D S で行い、さらに、配列の確認を実施例 8 に記載のグリカン除去を伴う L C - M S によって行った。ホモ二量体含有率を実施例 1 0 に従って分子ふるいクロマトグラフィーで測定し、インスリン受容体結合親和性を実施例 1 2 に従って測定した。結果を表 1 1 に示す。組成の異なる（配列番号 5 3 の場合では G G G G G Q G G G G Q G G G G Q G G G G G（配列番号 1 3）、対して、配列番号 4 3 の場合では G G G G A G G G G（配列番号 1 1））より長いペプチドリンカーを組み込んだ場合、I C 5 0 値の顕著な低減によって評価される、インスリン受容体結合の向上が生じ、リンカーを長くすることが、他のインスリン - F c 融合タンパク質の、インスリン受容体結合を増加させるための戦略になり得ることが示された。しかし、より長いリンカーを組み込んだ場合、ホモ二量体力価は、5 0 m g / L 超という製造設計目標を超えては向上しなかった。

## 【 0 2 5 5 】

実施例 4 2 : イヌ I g G B F c フラグメントを含むインスリン - F c 融合タンパク質会合体のホモ二量体力価を向上させるために、配列番号 6 3 のインスリンポリペプチドの B 鎖の一部を欠失させる試み

実施例 4 1 の結果は、ペプチドリンカーを改変することで、天然の B 1 0 アミノ酸と A 8 アミノ酸を含む配列番号 4 3 のインスリン - F c 融合タンパク質のインスリン受容体に対する結合親和性を増加させることができることを示している。しかし、このペプチドリンカーの変異では、ホモ二量体力価を、製造設計目標を達成するのに十分なほどに増加させることはできなかった。ホモ二量体力価は、細胞内合成および細胞内プロセッシングを含むいくつかの特性の関数であるため、インスリン - F c 分子は、合成中および合成後、2 つのホモ二量体モノマー間で分子内で、または、2 以上の別々のホモ二量体間で分子間で、自己会合（すなわち、凝集）していたかもしれないという仮説を立てた。この凝集によって、実施例 1、実施例 4、および実施例 1 0 に記載された製造工程中に細胞培養上清から得られたホモ二量体力価は許容できないほどに低いものであった。このインスリン - F c 融合タンパク質分子間の相互作用の可能性は、部分的には、自己会合し凝集体を形成するインスリンの周知の傾向によるものであり得る。インスリンの自己会合する傾向を低減するための当該技術分野において公知の 1 つの方法は、B 鎖の C 末端付近のアミノ酸を変異させることを含む。例えば、インスリンリスプロ（B 2 8 K 変異；B 2 9 P 変異）およびインスリンアスパルト（B 2 8 D 変異）は、会合と凝集を防ぐことで、主に単量体型のインスリンを溶液中に生じさせる非天然型の B 鎖変異を含む、周知の市販 2 鎖インスリンである。凝集を防ぐための別のアプローチは、アミノ酸の構造的な欠失を含む。例えば、デスペンタペプチドインスリンとして知られている 2 鎖インスリン（despentapeptide insulin）（DPPPI；Brange J.、Dodson G. G.、Edwards J.、Holden P. H.、Whittingham J. L.、1997 年 b.、"A model of insulin fibrils derived from the x-ray crystal structure of a monomeric insulin（despentapeptide insulin

）”、Proteins、27巻、pp507～516を参照）は、B鎖の5個のC末端アミノ酸（YTPKT）が除去されている以外は、天然型の2鎖ヒトインスリンと同一である。DPPⅠは、天然型2鎖ヒトインスリンと比べて、インスリン受容体に対する結合親和性が低い、溶液中で完全に単量体の状態であり、これは、DPPⅠ分子間では会合も凝集もほとんど起こらないことを意味している。よって、分子内および分子間の自己会合の可能性を低減し、インスリン-Fc融合タンパク質のホモ二量体力価を向上させる試みでは、DPPⅠ、インスリンリスプロ、およびインスリンアスパルトについて上記したような、部分的なB鎖アミノ酸切断およびB鎖アミノ酸変異を用いて、配列番号43のインスリン-Fc融合タンパク質のいくつかのバリエーションを構築した。これらの配列を以下に示し、配列番号43に対する配列アラインメントを図15に示す（クラスタルオメガ）：

FVNQHLCGSHLVEALALVCGERGFFYTDPGGGGGGGGGGGIV  
EQCCTSI C SLYQLENYCGGGGAGGGGDCPKCPAPEMLGGP  
SVFIFPPKPKDTLLIARTPEVTCVVVDLDPEDPEVQISWV  
VDGKQMQTAKTQPREEQFSGTYRVVSVLPIGHQDWLKGKQ  
FTCKVNNKALPSPPIERTISKARGQAHQPSVYVLPSPREEL  
SKNTVSLTCLIKDFFPPDIDVEWQSNQGQEPESKYRTTTPP  
QLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQRGDTFICAVMHEALHNHY  
TQESLSHSPG（配列番号51）

FVNQHLCGSHLVEALALVCGERGFFYTDPGGGGGGGGGGGIVE  
QCCTSI C SLYQLENYCGGGGAGGGGDCPKCPAPEMLGGPS  
VFIFPPKPKDTLLIARTPEVTCVVVDLDPEDPEVQISWV  
VDGKQMQTAKTQPREEQFSGTYRVVSVLPIGHQDWLKGKQF  
TCKVNNKALPSPPIERTISKARGQAHQPSVYVLPSPREELS  
KNTVSLTCLIKDFFPPDIDVEWQSNQGQEPESKYRTTTPPQ  
LDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQRGDTFICAVMHEALHNHYT  
QESLSHSPG（配列番号52）

FVNQHLCGSHLVEALALVCGERGFFYTQGGGGGGGGGGGIVE  
QCCTSI C SLYQLENYCGGGGAGGGGDCPKCPAPEMLGGPS  
VFIFPPKPKDTLLIARTPEVTCVVVDLDPEDPEVQISWV  
VDGKQMQTAKTQPREEQFSGTYRVVSVLPIGHQDWLKGKQF  
TCKVNNKALPSPPIERTISKARGQAHQPSVYVLPSPREELS  
KNTVSLTCLIKDFFPPDIDVEWQSNQGQEPESKYRTTTPPQ  
LDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQRGDTFICAVMHEALHNHYT  
QESLSHSPG（配列番号54）

【表12】

表12：各種配列番号のホモ二量体率%、ホモ二量体力価、およびIR IC50値			
配列番号	ホモ二量体率%	HEKホモ二量体力価 (mg/L)	IR IC50 (nM)
配列番号43	98.0%	21	>5000
配列番号51	98.3%	42	1915
配列番号54	99.4%	22	2195
配列番号52	98.6%	33	1930

## 【0256】

インスリン-Fc融合タンパク質を、実施例1に従ってHEK293細胞で製造し、実施例4に従ってプロテインAカラムを用いて精製した。構造の確認を実施例6に従って非還元CE-SDSおよび還元CE-SDSで行い、さらに、配列の確認を実施例8に記載のグリカン除去を伴うLC-MSによって行った。ホモ二量体含有率を実施例10に従って分子ふるいクロマトグラフィーで測定し、インスリン受容体結合親和性を実施例12に従って測定した。結果を表12に示す。得られた化合物のホモ二量体力価は1例（配列番

号 5 1 ) で顕著に増加しただけであったが、予想外にも、変異型化合物 ( 配列番号 5 1 、配列番号 5 4 、および配列番号 5 2 ) の全てにおいて、インスリン受容体親和性が向上した。

【 0 2 5 7 】

実施例 4 3 : ホモ二量体力価および生物活性をさらに向上させるための、配列番号 4 3 のインスリン - F c 融合タンパク質に対する、B鎖変異、C鎖変異、およびA鎖変異、B鎖切断、並びにリンカー変異を組み合わせる試み

実施例 3 9、実施例 4 0、実施例 4 1、および実施例 4 2 で示されたように、単一の戦略で、非免疫原性の天然型の B 1 0 アミノ酸および A 8 アミノ酸を含むインスリンポリペプチドと、イヌ I g G B F c フラグメントを組み込んで、許容できるインスリン受容体活性およびホモ二量体力価を有するインスリン - F c 融合タンパク質を形成することに成功したものはない。そこで、C鎖をより長くし、ペプチドリナーをより長くし、B鎖の C 末端アミノ酸を切断するというコンセプトを組み合わせた。さらに、自己会合や凝集の傾向をさらに低減する可能性があるため、生理的 pH で負または正に帯電する側基を有するアミノ酸といった、疎水性の低いアミノ酸を用いて、天然型インスリンの疎水性アミノ酸残基部位にさらなる点変異を導入した。変異の例としては、チロシンからアラニン、チロシンからグルタミン酸、イソロイシンからスレオニン、およびフェニルアラニンからヒスチジンの変異が挙げられる。さらに、解析を単純にするため、全ての場合で、イヌ I g G B F c フラグメントの c N g 部位を天然型であるアスパラギンに戻した。これらのインスリン - F c 融合タンパク質バリエーションの配列を以下に示し、配列番号 4 3 に対して得られた配列アラインメントを図 1 6 に示す ( クラスタルオメガ ) :

F V N Q H L C G S H L V E A L E L V C G E R G F F Y T P K T G G S G G G G G I V  
E Q C C T S T C S L D Q L E N Y C G G G G G Q G G G G Q G G G G Q G G G G G D C  
P K C P A P E M L G G P S V F I F P P K P K D T L L I A R T P E V T C V V V D L  
D P E D P E V Q I S W F V D G K Q M Q T A K T Q P R E E Q F N G T Y R V V S V L  
P I G H Q D W L K G K Q F T C K V N N K A L P S P I E R T I S K A R G Q A H Q P  
S V Y V L P P S R E E L S K N T V S L T C L I K D F F P P D I D V E W Q S N G Q  
Q E P E S K Y R T T P P Q L D E D G S Y F L Y S K L S V D K S R W Q R G D T F I  
C A V M H E A L H N H Y T Q E S L S H S P G ( 配列番号 5 5 )

F V N Q H L C G S H L V E A L E L V C G E R G F H Y G G G G G G S G G G G G I V  
E Q C C T S T C S L D Q L E N Y C N H G G G G Q G G G G Q G G G G Q G G G G G D  
C P K C P A P E M L G G P S V F I F P P K P K D T L L I A R T P E V T C V V V D  
L D P E D P E V Q I S W F V D G K Q M Q T A K T Q P R E E Q F N G T Y R V V S V  
L P I G H Q D W L K G K Q F T C K V N N K A L P S P I E R T I S K A R G Q A H Q  
P S V Y V L P P S R E E L S K N T V S L T C L I K D F F P P D I D V E W Q S N G  
Q Q E P E S K Y R T T P P Q L D E D G S Y F L Y S K L S V D K S R W Q R G D T F  
I C A V M H E A L H N H Y T Q E S L S H S P G ( 配列番号 5 6 )

F V N Q H L C G S H L V E A L E L V C G E R G F H Y G G G G G G S G G G G G I V  
E Q C C T S T C S L D Q L E N Y C N G G G G G Q G G G G Q G G G G Q G G G G G D  
C P K C P A P E M L G G P S V F I F P P K P K D T L L I A R T P E V T C V V V D  
L D P E D P E V Q I S W F V D G K Q M Q T A K T Q P R E E Q F N G T Y R V V S V  
L P I G H Q D W L K G K Q F T C K V N N K A L P S P I E R T I S K A R G Q A H Q  
P S V Y V L P P S R E E L S K N T V S L T C L I K D F F P P D I D V E W Q S N G  
Q Q E P E S K Y R T T P P Q L D E D G S Y F L Y S K L S V D K S R W Q R G D T F  
I C A V M H E A L H N H Y T Q E S L S H S P G ( 配列番号 2 8 )

F V N Q H L C G S H L V E A L E L V C G E R G F H Y G G G G G G S G G G G G I V  
E Q C C T S T C S L D Q L E N Y C G G G G G Q G G G G Q G G G G Q G G G G G D C  
P K C P A P E M L G G P S V F I F P P K P K D T L L I A R T P E V T C V V V D L  
D P E D P E V Q I S W F V D G K Q M Q T A K T Q P R E E Q F N G T Y R V V S V L  
P I G H Q D W L K G K Q F T C K V N N K A L P S P I E R T I S K A R G Q A H Q P

10

20

30

40

50

SVYVLPSPSEELSKNTVSLTCLIKDFFPPDIDVEWQSNQG  
 QEPESKYRTTTPPQLDEEDGSYFLYSKLSVDKSRWQRGDTFI  
 CAVMHEALHNNHYTQESLSHSPG (配列番号26)  
 FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFFYGGGGGGSGGGGGIV  
 EQCCTSTCSDLQLENYCGGGGGQGQGGGGQGQGGGGGDC  
 PKCPAPEMLGGPSVFIFFPKPKDTHLLIARTPEVTCVVVDL  
 DPEDPEVQISWFDGKQMKTAKTQPREEQFNGTYRVVSVL  
 PIGHQDWLKGKQFTCKVNNKALPSPPIERTISKARGQAHQP  
 SVYVLPSPSEELSKNTVSLTCLIKDFFPPDIDVEWQSNQG  
 QEPESKYRTTTPPQLDEEDGSYFLYSKLSVDKSRWQRGDTFI  
 CAVMHEALHNNHYTQESLSHSPG (配列番号57)

10

【表13】

表13：各種配列番号のホモ二量体率%、ホモ二量体力価、およびIR IC50値			
配列番号	ホモ二量体率%	HEKホモ二量体力価 (mg/L)	IR IC50 (nM)
配列番号43	98.0%	21	>5000
配列番号55	97.9%	69	3869
配列番号56	99.5%	101	554
配列番号28	99.7%	107	1247
配列番号57	99.7%	128	2043
配列番号26	99.4%	187	2339

20

## 【0258】

インスリン-Fc融合タンパク質を、実施例1に従ってHEK293細胞で製造し、実施例4に従ってプロテインAカラムを用いて精製した。構造の確認を実施例6に従って非還元CE-SDSおよび還元CE-SDSで行い、さらに、配列の確認を実施例8に記載のグリカン除去を伴うLC-MSによって行った。ホモ二量体含有率を実施例10に従って分子ふるいクロマトグラフィーで測定し、インスリン受容体結合親和性を実施例12に従って測定した。結果を表13に示す。結果に示されているように、特定のB鎖アミノ酸およびA鎖アミノ酸の疎水性を低減すること、より長くより可動性が高いCペプチド配列を使用すること、いくつかのC末端B鎖アミノ酸を切断すること、並びにより長いペプチドリンカーを用いること、を組み合わせることで、ホモ二量体力価およびインスリン受容体結合活性の設計基準を最低限達成する有用なインスリン-Fc融合タンパク質がいくつか得られた。配列番号56、配列番号28、配列番号26、および配列番号57は、配列番号43または配列番号55のいずれよりも、より好ましいインスリン受容体IC50値(3000nM未満)と、より好ましいHEKホモ二量体力価(100mg/L超)を示した。驚くべきことに、わずか数個のアミノ酸を変えるだけで、元の配列番号43のインスリン-Fc融合タンパク質に対して、インスリン受容体親和性が数倍に向上し、配列番号26のインスリン-Fc融合タンパク質の場合では、ホモ二量体力価が劇的に増加している。

30

40

## 【0259】

実施例44：配列番号7のインスリンポリペプチドと配列番号13のペプチドリンカーと配列番号15のイヌIgGB Fcフラグメントとから構築されたインスリン-Fc融合タンパク質のインビボ生物活性、反復投与生物活性、および免疫原性

実施例43より得られた肯定的なホモ二量体力価およびインスリン受容体結合活性の結果から、2種の最も有望なインスリン-Fc融合タンパク質(配列番号26および配列番号28)を、イヌにおいて、反復投与生物活性および免疫原性を評価する試験にかけた。それぞれの化合物は、より長く、より親水性が高い配列番号13のペプチドリンカーと、より製造性が高く、より凝集性が低い配列番号15のイヌIgGB Fcフラグメントと

50

、を含む。最も重要なこととして、どちらのインスリン - F c 融合タンパク質も、免疫原性が低いと推定される天然型の B 1 0 アミノ酸および A 8 アミノ酸（すなわち、一般配列番号 6）を有するインスリンポリペプチドを含んでいる。配列番号 2 8 のインスリン - F c 融合タンパク質の場合、A 2 1 位にアスパラギンが存在する（すなわちインスリンポリペプチドは配列番号 8 を含む）。配列番号 2 6 のインスリン - F c 融合タンパク質の場合、A 2 1 位にアスパラギンが存在しない（すなわちインスリンポリペプチドは配列番号 7 を含む）。

#### 【 0 2 6 0 】

配列番号 2 8 のインスリン - F c 融合タンパク質のインビボ生物活性を、実施例 2 1 の手順に従って N = 1 のイヌで試験した。単回皮下投与の図 1 7 に示される結果は、配列番号 2 8 のインスリン - F c 融合タンパク質が、実施例 2 2 の手順に従って算出された N A O C が 1 0 7 6 % F B G L ・ 日 ・ k g / m g であり、インビボにおいて確かに生物活性を示すことが示された。配列番号 2 8 のインスリン - F c 融合タンパク質の薬物動態プロファイルを、E L I S A を使用する実施例 2 3 の方法で測定し、2 コンパートメントモデルをそのデータに適合し、その排出半減期を求めたところ、約 3 . 5 日であった。

#### 【 0 2 6 1 】

次いで、実施例 1 5 の手順に従って、配列番号 2 8 のインスリン - F c 融合タンパク質の皮下投与を、N = 1 のイヌに、最初の注射後の 1 4 日目、2 8 日目、および 4 2 日目に続けることで、反復投与時の生物活性を評価した。イヌの % F B G L が低下し過ぎた場合、そのイヌに餌を与えて、血糖を安全なレベルまで上昇させた。それ以降の各投与については、実施例 2 2 の一般手順に従って、N A O C および N A O C R の測定を行い、投与を施行した時間から次の投与を施行する直前までを算出した。表 1 4 に示される N A O C および N A O C R は、配列番号 2 8 のインスリン - F c 融合タンパク質が、4 回の投与中、0 . 8 よりも大きな N A O C R を維持することから、反復投与時の生物活性の設計目標を達成していることを示している。

#### 【 表 1 4 】

表 1 4 : 配列番号 2 8 の反復投与の投与毎の N A O C

注射番号	投与日	N A O C (%FBGL・日・kg/mg)	N A O C R
1	0	1 0 7 6	1 . 0
2	1 4	1 0 0 5	0 . 9
3	2 8	9 0 0	0 . 8
4	4 2	8 3 8	0 . 8

#### 【 0 2 6 2 】

配列番号 2 8 のインスリン - F c 融合タンパク質の免疫原性を、実施例 2 4 の手順に従って試験した。図 1 8 に示されているように、配列番号 2 8 のインスリン - F c 融合タンパク質は、反復投与と実験を通してインビボ生物活性が維持されたことと一致して、インビボにおける免疫原性を見かけ上示していない。

#### 【 0 2 6 3 】

インスリンポリペプチド鎖の A 2 1 のアスパラギンが存在しない、配列番号 2 6 のインスリン - F c 融合タンパク質についても、イヌにおける反復投与時の生物活性成績を評価した。上記化合物を、N = 1 のイヌに、0 日目、1 4 日目、2 8 日目、および 4 2 日目に、実施例 2 2 の手順に従って皮下投与した。イヌの % F B G L が低下し過ぎた場合、そのイヌに餌を与えて、血糖を安全なレベルまで上昇させた。1 回目注射の N A O C は堂々の 2 2 7 8 % F B G L ・ 日 ・ k g / m g であり、配列番号 2 6 のインスリン - F c 融合タンパク質が、配列番号 2 8 のインスリン - F c 融合タンパク質のほぼ 2 倍の効力で、インビボにおいて十分な生物活性を示すことが示された。インスリン - F c 融合タンパク質の薬物動態プロファイルを、E L I S A を使用する実施例 2 3 の方法で測定し、2 コンパート

メントモデルをそのデータに適合し、その排出半減期を求めたところ、 $4.1 \pm 0.7$  日であった。図 19 および図 20 は、動物に配列番号 26 のホモ二量体を投与する場合の、単回投与による血糖調節と、複数回投与による複数週に亘る血糖調節を示している。それ以降の各投与についても、実施例 22 の一般手順に従って、NAOC および NAOCR の測定を行い、投与を施行した時間から次の投与を施行する直前までを算出した。表 15 に示される NAOC および NAOCR は、配列番号 26 のインスリン - Fc 融合タンパク質が、4 回の投与中、1.0 以上の NAOCR を維持することから、実施例 29 に記載の反復投与時の生物活性の設計目標を達成していることを示している。

#### 【0264】

配列番号 26 のインスリン - Fc 融合タンパク質の免疫原性を、実施例 24 の手順に従って試験した。図 21 に示されているように、配列番号 26 のインスリン - Fc 融合タンパク質は、反復投与実験を通してインビボ生物活性が維持されたことと一致して、インビボにおける免疫原性を見かけ上示していない。

#### 【表 15】

表 15：配列番号 26 の反復投与の投与毎の NAOC			
注射番号	投与日	NAOC (%FBGL・日・kg/mg)	NAOCR
1	0	2278	1.0
2	14	4029	1.8
3	28	3450	1.5
4	42	3257	1.4

#### 【0265】

発明を実施するための形態で論じたように、アスパラギン - グリシン結合間には既知の酵素的切断部位が存在する (Vlasak, J., Ionescu, R., (2011 年) Mabs, 3 巻、3 号、pp 253 ~ 263)。配列番号 13 のペプチドリンカーを有する配列番号 26 のインスリン - Fc 融合タンパク質に含まれる配列番号 7 のインスリンポリペプチドの、A 鎖の 21 番目のアミノ酸 (すなわち、A21) にあるアスパラギンを取り除くことで、A 鎖の C 末端とペプチドリンカーの N 末端との間のアスパラギン - グリシン結合が酵素的に切断される可能性が排除される。しかし、配列番号 28 のインスリン - Fc 融合タンパク質は、配列番号 13 のペプチドリンカーと、A21 にアスパラギンを保持する配列番号 8 のインスリンポリペプチドと、を含んでいる。そのため、配列番号 28 のインスリン - Fc 融合タンパク質は、合成中または皮下投与後のインビボで、酵素による消化を受けるであろうと予想されていた。しかし、かなり予想外なことに、配列番号 28 のインスリン - Fc 融合タンパク質は、許容できるホモ二量体力価を伴って HEK 細胞で製造可能であり、また、その生物活性を損なう酵素消化の徴候もなく、許容できるインビボ生物活性を示した。

#### 【0266】

実施例 45：好ましい配列番号 7 のインスリンポリペプチドと好ましい配列番号 13 のペプチドリンカーとを含むインスリン - Fc 融合タンパク質の製造性およびインビボ効力を最適とするための、イヌ IgGB アイソタイプ Fc フラグメントの確認

実施例 43 および実施例 44 に記載されたように、免疫原性がなく、収量が多く、純度が高く、生物活性が高いインスリン - Fc 融合タンパク質が得られる、インスリンポリペプチドとペプチドリンカーの新規組み合わせが発見されたことから、イヌ IgGB Fc フラグメントが、実施例 32 および実施例 33 でのインスリン - Fc 融合タンパク質の場合では事実であったように、ホモ二量体力価および生物活性の観点で好ましいアイソタイプであるかどうかに関する疑問が、残った。そこで、配列番号 26 のインスリン - Fc 融合タンパク質のインスリンポリペプチド (配列番号 7) とペプチドリンカー (配列番号 13) は維持し、配列番号 15 のイヌ IgGB Fc フラグメントを配列番号 14 のイヌ Ig

G A F c フラグメント、配列番号 16 のイヌ I g G C F c フラグメント、または配列番号 17 のイヌ I g G D F c フラグメントに置き換えた、さらなるインスリン - F c 融合タンパク質を設計した。これらの得られたインスリン - F c 融合タンパク質バリエーションの配列を以下に示す：

F V N Q H L C G S H L V E A L E L V C G E R G F H Y G G G G G G S G G G G G I V  
E Q C C T S T C S L D Q L E N Y C G G G G G Q G G G G Q G G G G G Q G G G G G D C  
P K C P A P E M L G G P S V F I F P P K P K D T L L I A R T P E V T C V V D L  
D P E D P E V Q I S W F V D G K Q M Q T A K T Q P R E E Q F N G T Y R V V S V L  
P I G H Q D W L K G K Q F T C K V N N K A L P S P I E R T I S K A R G Q A H Q P  
S V Y V L P P S R E E L S K N T V S L T C L I K D F F P P D I D V E W Q S N G Q  
Q E P E S K Y R T T P P Q L D E D G S Y F L Y S K L S V D K S R W Q R G D T F I  
C A V M H E A L H N H Y T Q E S L S H S P G ( 配列番号 26 )

10

F V N Q H L C G S H L V E A L E L V C G E R G F H Y G G G G G G S G G G G G I V  
E Q C C T S T C S L D Q L E N Y C G G G G G Q G G G G Q G G G G G Q G G G G G R C  
T D T P P C P V P E P L G G P S V L I F P P K P K D I L R I T R T P E V T C V V  
L D L G R E D P E V Q I S W F V D G K E V H T A K T Q S R E Q Q F N G T Y R V V  
S V L P I E H Q D W L T G K E F K C R V N H I D L P S P I E R T I S K A R G R A  
H K P S V Y V L P P S P K E L S S S D T V S I T C L I K D F Y P P D I D V E W Q  
S N G Q Q E P E R K H R M T P P Q L D E D G S Y F L Y S K L S V D K S R W Q Q G  
D P F T C A V M H E T L Q N H Y T D L S L S H S P G ( 配列番号 58 )

20

F V N Q H L C G S H L V E A L E L V C G E R G F H Y G G G G G G S G G G G G I V  
E Q C C T S T C S L D Q L E N Y C G G G G G Q G G G G Q G G G G G Q G G G G G C N  
N C P C P G C G L L G G P S V F I F P P K P K D I L V T A R T P T V T C V V V D  
L D P E N P E V Q I S W F V D S K Q V Q T A N T Q P R E E Q S N G T Y R V V S V  
L P I G H Q D W L S G K Q F K C K V N N K A L P S P I E E I I S K T P G Q A H Q  
P N V Y V L P P S R D E M S K N T V T L T C L V K D F F P P E I D V E W Q S N G  
Q Q E P E S K Y R M T P P Q L D E D G S Y F L Y S K L S V D K S R W Q R G D T F  
I C A V M H E A L H N H Y T Q I S L S H S P G ( 配列番号 59 )

30

F V N Q H L C G S H L V E A L E L V C G E R G F H Y G G G G G G S G G G G G I V  
E Q C C T S T C S L D Q L E N Y C G G G G G Q G G G G Q G G G G G Q G G G G G C I  
S P C P V P E S L G G P S V F I F P P K P K D I L R I T R T P E I T C V V L D L  
G R E D P E V Q I S W F V D G K E V H T A K T Q P R E Q Q F N S T Y R V V S V L  
P I E H Q D W L T G K E F K C R V N H I G L P S P I E R T I S K A R G Q A H Q P  
S V Y V L P P S P K E L S S S D T V T L T C L I K D F F P P E I D V E W Q S N G  
Q P E P E S K Y H T T A P Q L D E D G S Y F L Y S K L S V D K S R W Q Q G D T F  
T C A V M H E A L Q N H Y T D L S L S H S P G ( 配列番号 60 )。

#### 【 0 2 6 7 】

インスリン - F c 融合タンパク質を、実施例 1 に従って H E K 2 9 3 細胞で製造し、実施例 4 に従ってプロテイン A カラムまたはプロテイン G カラムを用いて精製した。構造の確認を実施例 6 に従って非還元 C E - S D S および還元 C E - S D S で行い、さらに、配列の確認を実施例 8 に記載のグリカン除去を伴う L C - M S によって行った。ホモ二量体含有率を実施例 10 に従って分子ふるいクロマトグラフィーで測定し、インスリン受容体結合親和性を実施例 12 に従って測定した。さらに、インスリン - F c 融合タンパク質のイヌ F c R n 受容体に対する親和性を、実施例 15 に従って測定した。表 16 に示されているように、イヌ I g G B F c フラグメントを含む配列番号 26 のインスリン - F c 融合タンパク質は、これらの配列の中で最も高いホモ二量体力価を示した。イヌ I g G A F c フラグメントを含む配列番号 58 のインスリン - F c 融合タンパク質は、プロテイン A カラムを用いて精製された場合は不十分なホモ二量体力価しか示さなかったが、プロテイン G カラムを用いて精製された場合では、ホモ二量体力価は顕著に向上し、50 mg / L 超という設計目標を上回った。イヌ I g G C F c フラグメントを含む配列番号 59 の

40

50

インスリン - F c 融合タンパク質についても同じであった。イヌ I g G D F c フラグメントを含む配列番号 60 のインスリン - F c 融合タンパク質は、プロテイン A またはプロテイン G カラムのどちらで精製した場合も、化合物が得られなかった。以上から、異なるインスリンポリペプチド (配列番号 4) およびペプチドリンカー (配列番号 11) を含む配列番号 36 のインスリン - F c 融合タンパク質で示されたように、イヌ I g G B はホモ二量体力価の観点で好ましい F c フラグメントであった (実施例 32 参照)。

【表 16】

表 16 : 天然型のイヌ I g G A F c フラグメント、イヌ I g G B F c フラグメント、イヌ I g G C F c フラグメント、およびイヌ I g G D F c フラグメントを利用する配列の、ホモ二量体力価、I R 結合、および F c R n 結合							
配列番号	F c フラグメントの I g G アイソタイプ	タンパク質収量 : プロテイン A / (プロテイン G) (mg/L)	ホモ二量体率 % : プロテイン A / (プロテイン G)	ホモ二量体力価 (mg/L)	I R 結合 I C 50 (nM)	F c R n 結合、E C 50 (ng/mL)	初回投与時の N A O C (% F B G L ・ 日 ・ kg/mg)
配列番号 26	I g G B	187 / (DNM)	99% / (DNM)	185	2339	599	2278
配列番号 58	I g G A	10 / (69)	45% / (91%)	62 <sup>†</sup>	2586 <sup>#</sup>	1610	174
配列番号 59	I g G C	0 / (86)	0% / (94%)	81 <sup>†</sup>	2084 <sup>†</sup>	>200000	39
配列番号 60	I g G D	0 / (0)	(DNM) / (DNM)	0	DNM	DNM	DNM

DNM=未測定 ; # = プロテイン A で精製 ; <sup>†</sup> = プロテイン G で精製。

#### 【0268】

プロテイン G を介して精製されたイヌ I g G A F c フラグメントを含む配列番号 58 のインスリン - F c 融合タンパク質のインビボ生物活性を、実施例 21 の手順に従って試験した。図 22 に示される結果は、配列番号 58 のインスリン - F c 融合タンパク質が、実施例 22 に従って算出された N A O C がわずかに 174 % F B G L ・ 日 ・ k g / m g であり、インビボにおいてある程度の生物活性しか示さないことが示された。

#### 【0269】

プロテイン G を介して精製されたイヌ I g G C F c フラグメントを含む配列番号 59 のインスリン - F c 融合タンパク質のインビボ生物活性を、実施例 21 の手順に従って試験した。図 23 に示される結果は、配列番号 59 のインスリン - F c 融合タンパク質が、実施例 22 に従って算出された N A O C がわずかに 39 % F B G L ・ 日 ・ k g / m g であり、インビボにおいてある程度の生物活性しか示さないことが示された。

#### 【0270】

以上から、異なるインスリンポリペプチド (配列番号 4) およびペプチドリンカー (配列番号 11) を含む配列番号 36 のインスリン - F c 融合タンパク質で示されたように、イヌ I g G B は生物活性の観点で好ましい F c フラグメントであった (実施例 32 および実施例 33、並びに上記の表 16 を参照)。

#### 【0271】

実施例 46 : 潜在的な免疫原性リスクを低減するための、配列番号 8 のインスリンポリペプチドと、配列番号 13 のペプチドリンカーと、イヌ I g G B F c フラグメントとを含む非グリコシル化インスリン - F c 融合タンパク質

配列番号 26 のインスリン - F c 融合タンパク質は設計目標の全てを達成しているが (実施例 28)、治療が長期に亘った場合 (例えば、6 か月、1 年、2 年、またはそれ以上) に免疫原性リスクが生じる恐れがあり、これが起こった場合、糖尿病治療における本インスリン - F c 融合タンパク質の使用が損なわれる可能性がある。発明を実施するための形態、実施例 34 および実施例 35 に記載したように、反復投与後の生物活性を低減させる、考えられる原因の 1 つは、イヌ I g G B F c フラグメントがイヌの免疫系と望まし

くない相互作用を起こすことによる、中和抗薬物抗体の産生である。しかし、実施例 4 5 で示された結果は、予想外にも、イヌ Ig G B アイソタイプが、4 種のイヌ Ig G アイソタイプの中で、所望の製造性および生物活性をもたらす唯一の選択肢であったことを示している。そこで、Fc RI 受容体結合性が低く、長期の慢性的な免疫原性リスクが低減されるはずの、非グリコシル化インスリン - Fc 融合タンパク質を得るための、さらなる Fc 変異を探索した。

#### 【0272】

発明を実施するための形態に記載したように、Fc RI 相互作用を低減するための 1 つの方法には、Fc フラグメントの c Ng 部位を変異させることで、宿主細胞内で合成される際のグリコシル化を妨げることが行われる。すなわち、c Ng 部位の変異を配列番号 26 の Fc フラグメント領域に対して行ったことで、実施例 15 に記載のインビトロヒト Fc RI アッセイにおける結合性によって評価される、インビボにおける Fc 受容体に対する Fc フラグメントの結合親和性が低減された。配列番号 26 のインスリン - Fc 融合タンパク質における c Ng 部位の位置は c Ng - NB 151 である。配列番号 26 に対する変異として、配列番号 62 には c Ng - NB 151 - S 変異が含まれ、配列番号 61 には同じ c Ng - NB 151 - S 変異に加えて NB 119 - A 変異が含まれた。Lo, M. ら、"Effector attenuating substitutions that maintain antibody stability and reduce toxicity in mice"、J. Biol. Chem.、(2017 年)、pp. 1 ~ 20 により、マウス抗体での使用しか記載されていないが、NB 119 - A は、Fc RI との相互作用を低減させるさらなる試みにおいて組み込まれたものである。得られたインスリン - Fc 融合タンパク質の完全アミノ酸配列を以下に挙げ（明確にするために NB 119 部位および NB 151 部位には下線）、さらに、これらの配列アラインメント（クラスタルオメガ）を図 24 に示す：

```
FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFGHYGGGGGGSGGGGGGIV
EQCCTSTCSDLQLENYCGGGGGGQGGGGGQGGGGGQGGGGGGDC
PKCPAPEMLGGPSVFIFFPKPKDTLLIARTPEVTCVVVAL
DPEDPEVQISWFDGKQMKTAKTQPREEQFSGTYRVVSVL
PIGHQDWLKGKQFTCKVNNKALPSPPIERTISKARGQAHQP
SVYVLPSPREELSKNTVSLTCLIKDFFPPDIDVEWQSNQG
QEPESKYRTTTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQRGDTFI
CAVMHEALHNHYTQESLSHSPG (配列番号 61)
```

```
FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFGHYGGGGGGSGGGGGGIV
EQCCTSTCSDLQLENYCGGGGGGQGGGGGQGGGGGQGGGGGGDC
PKCPAPEMLGGPSVFIFFPKPKDTLLIARTPEVTCVVVDL
DPEDPEVQISWFDGKQMKTAKTQPREEQFSGTYRVVSVL
PIGHQDWLKGKQFTCKVNNKALPSPPIERTISKARGQAHQP
SVYVLPSPREELSKNTVSLTCLIKDFFPPDIDVEWQSNQG
QEPESKYRTTTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQRGDTFI
CAVMHEALHNHYTQESLSHSPG (配列番号 62)。
```

#### 【0273】

インスリン - Fc 融合タンパク質を、実施例 1 に従って HEK 293 細胞で製造し、実施例 4 に従ってプロテイン A カラムを用いて精製した。構造の確認を実施例 6 に従って非還元 CE - SDS および還元 CE - SDS で行い、さらに、配列の確認を実施例 8 に記載のグリカン除去を伴う LC - MS によって行った。ホモ二量体含有率を実施例 10 に従って分子ふるいクロマトグラフィーで測定し、インスリン受容体結合親和性を実施例 12 に従って測定した。表 17 に示されているように、Fc フラグメントに対して c Ng - NB 151 - S 変異を組み込むと、ホモ二量体率が減少し、許容できないほどに高い凝集レベルを示した（すなわち、ホモ二量体率が 70 % 強まで低下した）。

10

20

30

40

50

【表 17】

表 17：配列番号 61 および配列番号 104 の各非グリコシル化インスリン-Fc 融合タンパク質のホモ二量体力価						
配列番号	I g G フラグメント	関連する変異	タンパク質収量 (mg/L)	ホモ二量体率%	ホモ二量体力価 (mg/L)	I R 結合、I C 50 (nM)
配列番号 26	I g G B	c N g - N B - 1 5 1 - N	1 8 7	9 9 %	1 8 5	2 3 3 9
配列番号 61	I g G B	c N g - N B - 1 5 1 - S、N B 1 1 9 - A	7 8	7 3 %	5 7	3 0 9 3
配列番号 62	I g G B	c N g - N B 1 5 1 - S	1 3 0	7 1 %	9 3	2 3 0 2

## 【0274】

配列番号 61 および配列番号 62 のインスリン - Fc 融合タンパク質のインビボ生物活性を、実施例 21 の手順に従って  $N = 1$  のイヌで試験した。単回皮下投与についての図 25 に示される結果は、両化合物が、配列番号 26 のインスリン - Fc 融合タンパク質よりもインビボ生物活性が顕著に低かったことを示している（配列番号 62 の  $NAOC = 57.4\% \text{ FBGL} \cdot \text{日} \cdot \text{kg} / \text{mg}$ ；配列番号 61 の  $NAOC = 92.1\% \text{ FBGL} \cdot \text{日} \cdot \text{kg} / \text{mg}$ ）。これらの結果は、Fc フラグメントに対して cNg - NB151 - S 変異を組み込んで、配列番号 26 のインスリン - Fc 融合タンパク質の非グリコシル化型を作製したところ、予想外にも、得られる化合物のインビボ生物活性が低減されたことを示している。

## 【0275】

cNg - NB151 - S 部位の変異を含む配列番号 62 のインスリン - Fc 融合タンパク質の凝集度を減らし、生物活性を向上させる試みにおいて、凝集に関与すると考えられている領域に変異を含む、各種インスリンポリペプチド B 鎖バリエーションを検討した。インスリン - Fc 融合タンパク質を、実施例 1 に従って HEK293 細胞で製造し、実施例 4 に従ってプロテイン A カラムを用いて精製した。構造の確認を実施例 6 に従って非還元 CE - SDS および還元 CE - SDS で行い、さらに、配列の確認を実施例 8 に記載のグリカン除去を伴う LC - MS によって行った。ホモ二量体含有率は実施例 10 に従って分子ふるいクロマトグラフィーで測定した。試験された B 鎖バリエーションの中で、B 鎖の N 末端から 16 番目のアミノ酸（すなわち、B16）にチロシンからアラニンへの置換を含む 1 つのインスリン Fc 融合タンパク質（配列番号 30）が、予想外にも、ホモ二量体力価が高く（ $105 \text{ mg} / \text{L}$ ）、凝集が少なく（ $99\%$  ホモ二量体）、 $104 \text{ mg} / \text{L}$  というホモ二量体力価が得られることが分かった。実施例 12 に従って測定されたインスリン受容体結合は許容できるものであり、IC50 は  $2040 \text{ nM}$  であった。実施例 16 に従って測定された FcRn 受容体結合親和性 EC50 値は  $1194 \text{ ng} / \text{mL}$  であった。配列番号 30 のインスリン - Fc 融合タンパク質の薬物動態プロファイルを、ELISA を使用する実施例 23 の方法で測定し、2 コンパートメントモデルをそのデータに適合し、その排出半減期を求めたところ、 $4.1 \pm 0.7$  日であった。配列番号 30 の配列を以下に示す（明確にするために B16A 変異および cNg - NB151 - S 変異には下線）。

FVNQHLCGSHLVEALALVCGERGFHYGGGGGGSGGGGGGIV  
EQCCCTSTCSLDQLENYCGGGGGGQGGGGGQGGGGGQGGGGGDC  
PKCPAPEMLGGPSVFIFFPKPKDTLLIARTPEVTCVVVDL  
DPEDPEVQIISWFDGKQMKTAKTQPREEQFSGTYRVVSVL  
PIGHQDWLKGKQFTCKVNNKALPSP<sup>1</sup>IER<sup>2</sup>TISKARGQAHP  
SVYVLPSPREELSKNTVSLTCLIKDFFPPDIDVEWQSNQG  
QEPESKYRTTPPQLDEEDGSYFLYSKLSVDKSRWQRGDTFI

C A V M H E A L H N H Y T Q E S L S H S P G ( 配列番号 30 )。

【 0276 】

次に、配列番号 30 のインスリン - F c 融合タンパク質を、イヌにおいて、反復投与時の生物活性成績について評価した。上記化合物を、N = 1 のイヌに、0 日目、7 日目、14 日目、および 28 日目に、実施例 22 の手順に従って皮下投与した。イヌの % F B G L が低下し過ぎた場合、そのイヌに餌を与えて、血糖を安全なレベルまで上昇させた。予想外にも、配列番号 62 のインスリン - F c 融合タンパク質と比較して、B16A 変異を含む配列番号 30 のインスリン - F c 融合タンパク質の 1 回目注射の N A O C は、顕著に高かった ( 1185 % F B G L ・日・k g / m g )。1 回目投与のインビボ生物活性のグラフを図 26 に示す。また、当該化合物の薬物動態プロファイルを、E L I S A を使用する実施例 23 の方法で測定し、2 コンパートメントモデルをそのデータに適合し、当該化合物の排出半減期を求めたところ、3.5 日であった。それ以降の各投与についても、実施例 22 の一般手順に従って、N A O C および N A O C R の測定を行い、投与を施行した時間から次の投与を施行する直前までを算出した。表 18 に示される N A O C および N A O C R は、配列番号 30 のインスリン - F c 融合タンパク質が、4 回の投与中、0.6 以上の N A O C R を維持することから、反復投与時の生物活性の設計目標を達成していることを示している。まとめると、これらの結果は、好適な、配列番号 26 の非グリコシル化 c N g - S バリエーションを得るには、インスリン B 鎖配列を変異することが必要であったことを示している。よって、配列番号 10 のインスリンポリペプチドは、c N g 変異型イヌ I g G B F c フラグメントを含む非グリコシル化インスリン - F c 融合タンパク質に好適であった。

【表 18】

表 18：配列番号 30 の反復投与の投与毎の N A O C			
注射番号	投与日	N A O C (% F B G L ・日・k g / m g)	N A O C R
1	0	1185	1.0
2	7	954	0.8
3	14	764	0.6
4	28	991	0.8

【 0277 】

最後に、選択された化合物の、免疫系との相互作用のしやすさを、実施例 15 の手順に従ってその F c 受容体結合活性を測定することにより、調べた。表 19 は、これらのインスリン - F c 融合タンパク質の F c 受容体 I 結合と、配列番号 36 のインスリン - F c 融合タンパク質の F c 受容体結合とを比較している。非グリコシル化インスリン - F c 融合タンパク質 ( c N g - S 変異によって達成 ) が、最も低い、配列番号 36 に対する F c 受容体結合比を示したことが分かる。

【表 19】

表 19：配列番号 36 の c N g 変異体の F c $\gamma$ 受容体結合					
配列番号	種／F c アイソタイプ	グリコシル化変異	F c $\gamma$ R I 濃度が 3000 (ng/mL) となる OD 450 nm	OD 450 nm - アッセイバックグラウンド	配列番号 36 に対する比
配列番号 36	イヌ／I g G B	天然型 c N g	0.428	0.371	1.00
配列番号 26	イヌ／I g G B	天然型 c N g	0.368	0.311	0.84
配列番号 58	イヌ／I g G A	天然型 c N g	0.253	0.196	0.53
配列番号 62	イヌ／I g G B	c N g - S	0.175	0.118	0.32
配列番号 61	イヌ／I g G B	c N g - S および NB119-A	0.166	0.109	0.29
配列番号 30	イヌ／I g G B	c N g - S および B16A	0.177	0.120	0.32

10

## 【0278】

実施例 47：安定にトランスフェクトされた C H O 細胞株を介して作製されたイヌ I g G B 由来の F c フラグメントを含む好ましいインスリン - F c 融合タンパク質を用いた、例示的な C H O ベースのプロダクションラン

20

配列番号 26 または配列番号 30 をコードするベクターで安定にトランスフェクトされた別々の C H O 細胞株を、実施例 2 に記載されたように構築した。フェッドバッチ式振盪フラスコ 14 日間プロダクションラン (0.5 ~ 2.0 L の培地規模) の播種を、37、5 % 二酸化炭素に設定された振盪恒温器内で、 $0.5 \times 10^6$  細胞 / mL となるように行った。増殖培地として C D O p t i C H O を D y n a m i s (サーモフィッシャー社) に置き換え、フィードとして E f f i c i e n t F e e d C (サーモフィッシャー社) を用いた以外は、上記実施例 2 に記載したように、ランを実行した。3 % v / v のフィードの添加をプロダクションラン 3 日目から開始して、さらに 4 日目にも添加を行い、振盪フラスコ温度を 32 に調整し、振盪恒温器内の二酸化炭素濃度を 5 % から 2 % に下げた。このランの間に、細胞は  $8 \sim 14 \times 10^6$  細胞 / mL まで増加し、14 日目に、プロダクションランを回収して細胞を取り除き、実施例 4、実施例 6、実施例 8、および実施例 10 に記載されたように培養上清の精製と試験を行って、インスリン - F c 融合タンパク質を得た。表 20 には、安定にトランスフェクトされた C H O 細胞株を含むプロダクションランから得られた製造データが記載されている。

30

【表 20】

表 20：配列番号 26 および配列番号 30 の非グリコシル化インスリン - F c 融合タンパク質のホモ二量体力価			
配列番号	タンパク質収量 (mg/L)	ホモ二量体率 %	ホモ二量体力価 (mg/L)
配列番号 26	485	99.3 %	482
配列番号 30	260	99.0 %	257

40

## 【0279】

実施例 48：安定にトランスフェクトされた C H O 細胞株を介して作製されたイヌ I g G B 由来の F c フラグメントを含む好ましいインスリン - F c 融合タンパク質を用いた、例示的な C H O ベースのプロダクションラン

配列番号 28 をコードするベクターで安定にトランスフェクトされた C H O 細胞株を、

50

実施例 2 に記載されたように構築する。フェッドバッチ式振盪フラスコ 14 日間プロダクションラン (0.5 ~ 2.0 L の培地規模) の播種を、37、5 % 二酸化炭素に設定された振盪恒温器内で、 $0.5 \times 10^6$  細胞 / mL となるように行う。増殖培地として CDOptiCHO を Dynamis (サーモフィッシャー社) に置き換え、フィードとして Efficient Feed C (サーモフィッシャー社) を用いる以外は、実施例 2 に記載したように、ランを実行する。3 % v/v のフィードの添加をプロダクションラン 3 日目から開始して、さらに 4 日目にも添加を行い、振盪フラスコ温度を 32 に調整し、振盪恒温器内の二酸化炭素濃度を 5 % から 2 % に下げる。14 日目に、プロダクションランを回収して細胞を取り除き、実施例 4、実施例 6、実施例 8、および実施例 10 に記載されたように培養上清の精製と試験を行って、インスリン - Fc 融合タンパク質を得る。得られるプロダクションランからは、配列番号 28 の、200 mg / L を超えるタンパク質収量、95 % を超えるホモ二量体、および 190 mg / L を超えるホモ二量体力価が得られると期待される。

10

結果：ヒト Fc フラグメントを含むインスリン - Fc 融合タンパク質

【0280】

実施例 49：ヒト Fc IgG1 アイソタイプの Fc フラグメントを含むインスリン - Fc 融合タンパク質、およびヒト Fc IgG2 アイソタイプの Fc フラグメントを含むインスリン - Fc 融合タンパク質

配列番号 7 のインスリンポリペプチド配列とヒト IgG2 アイソタイプの Fc フラグメント (配列番号 74) とを含み、配列番号 13 のペプチドリンカーを用いる、インスリン - Fc 融合タンパク質の作製を試みた。得られたインスリン - Fc 融合タンパク質の完全アミノ酸配列は以下の通りである：

20

FVNQHLCGSHLVEAELVCGERGFHYGGGGGGSGGGGGGIV  
EQCCTSTCSLDQLENYCGGGGGGQGGGGGQGGGGGQGGGGGEC  
PPCPAPPVAGPSVFLFPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDV  
HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLT  
VVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQ  
VY TLP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP  
ENNYKTTTPMLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV  
MHEALHNHYTQKSLSLSPG (配列番号 75)。

30

【0281】

さらに、配列番号 7 のインスリンポリペプチド配列とヒト IgG1 アイソタイプの Fc フラグメント (配列番号 73) とを含み、配列番号 13 のペプチドリンカーを用いる、インスリン - Fc 融合タンパク質の作製を試みた。得られたインスリン - Fc 融合タンパク質の完全アミノ酸配列は以下の通りである：

FVNQHLCGSHLVEAELVCGERGFHYGGGGGGSGGGGGGIV  
EQCCTSTCSLDQLENYCGGGGGGQGGGGGQGGGGGQGGGGGDK  
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPKPKD TLMISRTPEVTCV  
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV  
VSVLT VLVHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ  
PREPQVY TLP PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE  
SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNV  
FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG (配列番号 76)。

40

【0282】

配列番号 75 および配列番号 76 のインスリン - Fc 融合タンパク質の構成は、実施例 1 に従って HEK 細胞で合成し、実施例 4 に従って精製した。それぞれのインスリン - Fc 融合タンパク質の構成について、2 つの別々の合成工程およびプロテイン A 精製工程を経て、総タンパク質収量から、表 21 に示されるような平均ホモ二量体力価が得られた。インスリン - Fc 融合タンパク質の構成の構造は実施例 6 に従って非還元 CE - SDS および還元 CE - SDS で確認し、さらに、実施例 8 に記載のグリカン除去を伴う LC - M

50

Sによって配列の確認を行った。実施例10に従って分子ふるいクロマトグラフィーでホモ二量体率を測定したところ、以下の表21に示すように求められた。まとめると、HEK細胞における配列番号76のインスリン-Fc融合タンパク質の製造では、凝集レベルとホモ二量体力価レベルが許容できるものであり、150mg/Lよりも大きいホモ二量体力価という設計目標が達成されたが、その一方、HEK細胞における配列番号75のインスリン-Fc融合タンパク質の製造では、ホモ二量体力価設計目標が達成されなかった。

【0283】

次に、配列番号76のインスリン-Fc融合タンパク質を、インビボで生物活性を示す可能性があるかについて評価した。まず、配列番号76のインスリン-Fc融合タンパク質のIR結合を実施例12に従って測定したところ、IC50値は1799nMという結果となり、当該化合物がインビボで生物活性を示す可能性があることが示された（すなわち、IC50が2400nM未満）。FcRnアッセイにおけるEC50値は578ng/mLであり、イヌでのスクリーニング研究（例えば、実施例28に記載のもの）やヒト糖尿病患者において測定された場合に、長期のインビボ生物活性プロファイルを有する可能性が高いことが示された。

【0284】

次に、望ましくない免疫原性の傾向について、実施例14の方法および実施例16の方法により、各化合物のインビトロにおけるFcRI結合およびC1q結合を測定することで、スクリーニングを行った。配列番号75のインスリン-Fc融合タンパク質の、FcRIアッセイにおけるOD450比およびC1qアッセイにおけるOD450比（OD450比の参照インスリン-Fc融合タンパク質は配列番号76）は、それぞれ0.045および0.309であることが明らかとなり、配列番号75のホモ二量体が、FcRI結合の設計目標（アッセイOD450比が0.50未満）およびC1q結合の設計目標（アッセイOD450比が0.35未満）（実施例29）を達成したことが示された。しかし、上記のように、HEK細胞における配列番号75のインスリン-Fc融合タンパク質の収量は、ホモ二量体力価の設計目標を達成しなかった。

【表21】

表21：IgG1アイソタイプまたはIgG2アイソタイプのFcフラグメントを利用する配列の、ホモ二量体力価データおよび受容体結合データ								
候補ID	種/Fcアイソタイプ	一過性にトランスフェクトされたHEK293の収量(mg/L)	ホモ二量体率%	ホモ二量体力価(mg/L)	IRアッセイにおけるIC50(nM)	ヒトFcRnアッセイにおけるEC50(ng/mL)	ヒトFcγRIアッセイにおける3,000ng/mLビオチン化FcγRIでのOD450比	ヒトC1qアッセイにおける1,000ng/mLビオチン化C1qでのOD450比
配列番号75	ヒト/IgG2	118#	99.5	117#	1726	462	0.045	0.309
配列番号76	ヒト/IgG1	181#	99.5	180#	1799	578	1.000*	1.000*

# = 2つの独立した実験から平均。

^ = 3つの独立した実験から平均。

\* = 参照インスリン-Fc融合タンパク質のそれ自体に対する比。

【0285】

実施例50：ヒトIgG1アイソタイプを含むインスリン-Fc融合タンパク質のFcフラグメント領域のcNg変異

配列番号76のインスリン-Fc融合タンパク質の、ホモ二量体含有率、IR結合親和性、および許容できるFcRn受容体に対する結合親和性を維持する試みの中で、FcRIに対する結合およびC1qに対する結合を低減しようと、cNg-S変異をFcフラ

グメントのCH<sub>3</sub>領域に挿入したところ、以下のような配列番号91のインスリン-Fc融合タンパク質の構成が得られた：

FVNQHLCGSHLVEALEDLVCGERGFGHYGGGGGGSGGGGGGIV  
EQCCTSTCSLDQLENYCGGGGGGQGGGGGQGGGGGQGGGGGDK  
THTCPCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV  
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYSSTYRV  
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKISKAKGQ  
PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE  
SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNV  
FSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSPG(配列番号91)。

【0286】

配列番号91の非グリコシル化インスリン-Fc融合タンパク質の構成を、実施例1に従ってHEK細胞において合成し、実施例4に従って精製し、実施例6、実施例8、実施例10、実施例12、実施例14、および実施例16に従って試験を行った。表22に示される結果は、配列番号76の親グリコシル化インスリン-Fc融合タンパク質の構成の結果と共に、総タンパク質収量、ホモ二量体率、およびホモ二量体力価を示している。これらの結果は、配列番号76のヒトIgG1-Fcフラグメント内のcNg-S変異により得られた、配列番号91のインスリン-Fc融合タンパク質の構成が、FcRI親和性およびC1q親和性の望ましい低減を示したことを示している。配列番号91のインスリン-Fc融合タンパク質の構成のホモ二量体力価は、配列番号76のインスリン-Fc融合タンパク質の構成のホモ二量体力価と比べて、顕著に増加していた。ホモ二量体力価は向上したが、配列番号91のインスリン-Fc融合タンパク質の構成は、IRアッセイにおけるIC<sub>50</sub>値が、2400nMよりも大きく(2400nM未満という設計基準の外)、且つ、配列番号76のものよりもかなり高く(すなわち、IR親和性がより低い)、このインスリン-Fc融合タンパク質の構成が、許容できる効力を示したり、設計目標(実施例29)を達成する可能性が低いことが示された。

【表22】

表22：IgG1のFcフラグメントとcNg変異を含む配列のホモ二量体力価データおよび受容体結合データ								
候補ID	Fcアイソタイプ/変異	一過性にトランスフェクトされたHEK293の収量(mg/L)	ホモ二量体率%	ホモ二量体力価(mg/L)	IRアッセイにおけるIC <sub>50</sub> (nM)	ヒトFcRnアッセイにおけるEC <sub>50</sub> (ng/mL)	ヒトFcγRIアッセイにおける3,000ng/mLビオチン化FcγRIでのOD450比	ヒトC1qアッセイにおける1,000ng/mLビオチン化C1qでのOD450比
配列番号76	hIgG1/cNg-NB155	181#	99.5	180	1799	578	1.000	1.000
配列番号91	hIgG1/cNg-NB155-S	193	98.1	189	2937	943	0.199	0.102

#=2つの独立した実験から平均。

DNT=未試験。

【0287】

実施例51：変異型インスリンポリペプチド(配列番号10)、リンカー(配列番号13)、およびcNg-S変異を含むIgG1アイソタイプFcを用いたヒトインスリン-Fc融合タンパク質

上記のように、I g G 1 アイソタイプ F c フラグメントにおける c N g - S 変異では、F c R I および C 1 q に対する親和性が顕著に低減した、インスリン - F c 融合タンパク質の構成が得られたが、このインスリン - F c 融合タンパク質の構成は、許容できないほどに低い I R 受容体親和性を有している（すなわち、I C 5 0 値が 2 4 0 0 n M より大きい）。そこで、インスリンポリペプチドに変異を加え、その変異が I R 親和性を改善させるかどうかを確かめる目的で、得られた物質を I R アッセイにおける I C 5 0 に対するスクリーニングにかけた。B 鎖の N 末端から 1 6 番目のアミノ酸をチロシンからアラニンにかえた（すなわち、B 1 6 A）ところ、配列番号 1 0 のインスリンポリペプチドが得られた。配列番号 1 0 の変異型インスリンポリペプチドおよび配列番号 1 3 のペプチドリンカーを、X<sub>1</sub> が S である配列番号 7 7 の c N g 変異型 F c フラグメントと共に用いたところ、配列番号 7 8 のインスリン - F c 融合タンパク質の構成が得られた。インスリン - F c 融合タンパク質の構成における c N g - S 変異を、F c フラグメント領域に対して行うことで、実施例 1 5 に記載のインビトロヒト F c R I アッセイにおける結合性によって評価される、インビボにおける当該 F c フラグメントの F c 受容体に対する結合親和性が低減された。配列番号 7 8 のインスリン - F c 融合タンパク質における c N g - S 部位の位置は、c N g 部位における「N」から「S」への変異を含む c N g - N B 1 5 5 である。

#### 【 0 2 8 8 】

配列番号 7 8 のインスリン - F c 融合タンパク質の構成を、実施例 1 に従って H E K 2 9 3 細胞で製造し、実施例 4 に従ってプロテイン A カラムを用いて精製した。配列番号 7 8 のインスリン - F c 融合タンパク質の構造は実施例 6 に従って非還元 C E - S D S および還元 C E - S D S で確認し、さらに、実施例 8 に記載のグリカン除去を行わない L C - M S によって配列の確認を行った。配列番号 7 8 の化合物の分子量を、酵素による糖鎖除去を行わない実施例 8 の L C - M S 法で測定した。配列番号 7 8 のターゲット質量は 6 5 0 4 6 . 9 D a であり、実測質量は 6 5 0 4 6 . 7 D a であり、配列番号 7 8 の化合物のアミノ酸組成およびホモ二量体構造が正しいことが確認された。

#### 【 0 2 8 9 】

ホモ二量体率は実施例 1 0 に従って分子ふるいクロマトグラフィーで測定した。c N g 変異型インスリン - F c 融合タンパク質の完全アミノ酸配列を以下に挙げる（N B 1 5 5 位には下線）：

F V N Q H L C G S H L V E A L A L V C G E R G F H Y G G G G G G S G G G G G I V  
E Q C C T S T C S L D Q L E N Y C G G G G G Q G G G G Q G G G G Q G G G G G D K  
T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V  
V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y S S T Y R V  
V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q  
P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E  
S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V  
F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G ( 配列番号 7 8 ) 。

#### 【 0 2 9 0 】

配列番号 7 8 のインスリン - F c 融合タンパク質の構成の総タンパク質収量、ホモ二量体率、およびホモ二量体力価の結果が表 2 3 に示され、配列番号 7 6 および配列番号 9 1 の結果と比較されている。インスリンポリペプチド配列の B 1 6 A 変異を非グリコシル化 c N g - S 変異型インスリン - F c 融合タンパク質に含めたところ、配列番号 7 6 と比較してホモ二量体力価が向上した。配列番号 7 8 のインスリン - F c 融合タンパク質のインビトロ I R 結合を、実施例 1 2 の手順に従って試験した。配列番号 1 0 のインスリンポリペプチドへの B 1 6 A 変異を配列番号 7 8 のインスリン - F c 融合タンパク質に含めたところ、インスリンポリペプチド（配列番号 7）が B 1 6 E 変異を含む配列番号 9 1 と比較して、I R 親和性が著しく向上した（すなわち、I R I C 5 0 測定値が低くなった）。この B 1 6 A 変異を別のインスリン - F c 融合タンパク質で行った際（米国特許第 1 0 , 5 9 7 , 4 3 5 号の配列番号 3）、I R I C 5 0 測定値が 5 0 0 0 n M よりも大きくな

10

20

30

40

50

り、インビボにおいてグルコースを低下させる生物活性を示さなかったことを考えると、これは特に驚くべきことである。アミノ酸配列の相違を強調した、配列番号76、配列番号78、および配列番号91の配列アラインメントを、図27に示す。「\*」は、所与の配列位置において全ての配列間で完全に相同であることを示しており、一方、「:」、「.」、空白は、それぞれ、所与の配列位置における配列間のアミノ酸変異が保存的であること、中程度であること、または全く異なるものであること、を示している。

【表23】

表23: IgG1 Fcフラグメント、cNg変異およびB16A変異を含む配列の、ホモ二量体力価および受容体結合のデータ								
候補ID	Fcアイソタイプ/変異	一過性にトランスフェクトされたHEK293の収量(mg/L)	ホモ二量体率%	ホモ二量体力価(mg/L)	IRアッセイにおけるIC50(nM)	ヒトFcRnアッセイにおけるEC50(ng/mL)	ヒトFcγRIアッセイにおけるEC3,000 ng/mLヒオチン化FcγRIでのOD450比	ヒトC1qアッセイにおける1,000 ng/mLヒオチン化C1qでのOD450比
配列番号76	hIgG1/cNg-NB155	181 <sup>#</sup>	99.5	180	1799	578	1.000	1.000
配列番号91	hIgG1/cNg-NB155-S	193	98.1	189	2937	943	0.199	0.102
配列番号78	hIgG1/B16A/cNg-NB155-S	189	93.2	176	1162	825	0.197	0.169

## 【0291】

さらに、配列番号78のインスリン-Fc融合タンパク質のインスリンポリペプチドにB16A変異を含めた(配列番号10が得られる)ところ、実施例19の手順で測定される、FcRn結合が許容できるものとなり、このインスリン-Fc融合タンパク質の、インビボにおける薬物動態学的半減期が延長され、インビボにおけるグルコース低減生物活性プロファイルが延長される可能性があることが示された。なお、配列番号78のFcRn結合親和性は、B16A変異を含まない類似のインスリン-Fc融合タンパク質(配列番号91)のそれよりも大きく(FcRn結合アッセイにおいてEC50測定値がより小さいことによって示される)、B16A変異を含めることが、IR受容体親和性に加えて、予想外にもFcRn受容体親和性に影響を与えることがさらに明らかとなった。FcRn親和性が高くなるほど、それに相関して、治療薬のインビボにおける薬物動態学的半減期が長くなる場合が多いことから、このようにFcRn受容体親和性を徐々に増加させることは、望ましいことであろうと考えられる。

## 【0292】

配列番号78のインスリン-Fc融合タンパク質の、FcRI結合特性およびC1q結合特性を、実施例14の方法および実施例16の方法で測定したところ、許容できるものであることが示された。また、配列番号78のインスリン-Fc融合タンパク質のC1q結合親和性ははるかに低く、配列番号76のインスリン-Fc融合タンパク質に対して80%超のC1q結合の低減を示した。以上から、配列番号78のインスリン-Fc融合タンパク質は、製造性、インビボ効力、インビボ生物活性の延長、および免疫原性の可能性の低さについての各設計目標(実施例29)を達成した。

## 【0293】

実施例 52：ヒト IgG1 アイソタイプを含むインスリン - Fc 融合タンパク質の Fc フラグメント領域の他の cNg 変異

インビボ生物活性が延長され、免疫原性を示す可能性が低く、配列番号 76 のインスリン - Fc 融合タンパク質と同様のホモ二量体含有率と IR 結合親和性を維持し、FcRn 受容体に対する結合親和性が許容できるものである、インスリン - Fc 融合タンパク質の構成を作製するさらなる試みにおいて、Fc RI 結合および C1q 結合を低減しようと、他の cNg 変異を Fc フラグメントの CH3 領域に挿入し、配列番号 92、配列番号 93、配列番号 94、および配列番号 95 を得た。インスリン - Fc 融合タンパク質の実施形態を、実施例 1 に従って HEK 細胞で合成し、実施例 4 に従って精製し、実施例 6、実施例 8、実施例 10、実施例 12、実施例 14、および実施例 16 に従って試験した。結果は表 24 に示す。配列番号 75、配列番号 76、および配列番号 91 に対しての、配列番号 92、配列番号 93、配列番号 94、および配列番号 95 の配列アラインメントを、アミノ酸配列の相違を強調表示して、図 28 に示す（クラスタルオメガ）。「\*」は、所与の配列位置において全ての配列間で完全に相同であることを示しており、一方、「:」、「.」、空白は、それぞれ、所与の配列位置における配列間のアミノ酸変異が保存的であること、中程度であること、または全く異なるものであること、を示している。

【0294】

インスリン - Fc 融合タンパク質の実施形態の完全アミノ酸配列を以下に示し、cNg 変異には下線を引く。

```
FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFGHYGGGGGGSGGGGGGIV
EQCCTSTCSDLQLENYCGGGGGGQGGGGGQGGGGGQGGGGGDK
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYDSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (配列番号 92)
FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFGHYGGGGGGSGGGGGGIV
EQCCTSTCSDLQLENYCGGGGGGQGGGGGQGGGGGQGGGGGDK
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (配列番号 93)
FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFGHYGGGGGGSGGGGGGIV
EQCCTSTCSDLQLENYCGGGGGGQGGGGGQGGGGGQGGGGGDK
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYRSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (配列番号 94)
FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFGHYGGGGGGSGGGGGGIV
EQCCTSTCSDLQLENYCGGGGGGQGGGGGQGGGGGQGGGGGDK
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
```

10

20

30

40

50

F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G (配列番号 95)。

# 【0295】

X1がD、A、R、Qである、配列番号77のヒトIgG1Fcフラグメントを含む、上記のインスリン-Fc融合タンパク質の実施形態を、配列番号76と共に、表24に挙げ、表24は対応する総タンパク質収量、ホモ二量体率、およびホモ二量体力価を示している。これらの結果は、cNg部位への各種変異をヒトIgG1Fcフラグメント内に含めて、配列番号92、配列番号93、配列番号94、および配列番号95を得た結果、望ましいFcRI親和性およびC1q親和性の低減がもたらされたことを示している。配列番号92、配列番号93、および配列番号94のホモ二量体力価は、配列番号76に比べて顕著に増加した。配列番号95のホモ二量体力価が、設計目標(実施例29)を達成するには低すぎたため、インスリン受容体結合は測定しなかった。ホモ二量体力価は向上したが、配列番号92、配列番号93、および配列番号94は、IRアッセイにおけるIC50値が、全ての場合で2400nMよりも大きく、配列番号76のそれよりもかなり高かった(すなわち、IR親和性がより低い)。全ての場合で、IRアッセイにおけるIC50値は設計基準である2400nM未満よりも大きく、これらのインスリン-Fc融合タンパク質の実施形態が、許容できる効力と商品原価を示しそうにないことが示された。配列番号91、配列番号92、配列番号93、配列番号94、および配列番号95のいずれも、設計目標(実施例29)を達成していない。

# 【表24】

表24：IgG1FcフラグメントおよびcNg変異を含む配列のホモ二量体力価および受容体結合のデータ								
候補ID	Fcアイソタイプ/変異	一過性にトランスフェクトされたHEK293の収量(mg/L)	ホモ二量体率%	ホモ二量体力価(mg/L)	IRアッセイにおけるIC50(nM)	ヒトFcRnアッセイにおけるEC50(ng/mL)	ヒトFcγRIアッセイにおける3,000ng/mLバイオチン化FcγRIでのOD450比	ヒトC1qアッセイにおける1,000ng/mLバイオチン化C1qでのOD450比
配列番号76	hIgG1/cNg-NB155	181 <sup>#</sup>	99.5	180	1799	578	1.000	1.000
配列番号92	hIgG1/cNg-NB155-D	243	97.8	238	2438	883	0.379	0.116
配列番号93	hIgG1/cNg-NB155-A	228	96.7	220	2852	900	0.245	0.151
配列番号94	hIgG1/cNg-NB155-R	219	94.7	207	3767	913	0.150	0.127
配列番号95	hIgG1/cNg-NB155-Q	139	97.6	136	DNT	775	0.192	0.222

<sup>#</sup> = 2つの独立した実験から平均。

DNT = 未試験。

# 【0296】

実施例53：インスリンポリペプチド(配列番号10)、リンカー(配列番号13)、および各種cNg変異を含むIgG1アイソタイプFcを用いたヒトインスリン-Fc融合タンパク質

上記のように、IgG1アイソタイプFcフラグメントのcNg部位における変異では、FcRIおよびC1qに対する親和性が顕著に低減した、インスリン-Fc融合タン

パク質が得られたが、これらの化合物は、許容できないほどに低い I R 受容体親和性を有している（すなわち、I C 5 0 値が 2 4 0 0 n M より大きい）。そこで、配列番号 7 8 中のインスリンポリペプチドに同じ変異をなして（B 鎖の N 末端から 1 6 番目のアミノ酸をチロシンからアラニンにかえ（すなわち、B 1 6 A）ところ、配列番号 1 0 のインスリンポリペプチドが得られた）、I R 親和性を向上させた変異型インスリンポリペプチドがあるかどうかを確かめるために、得られたインスリン - F c 融合タンパク質の構成を、I R アッセイにおける I C 5 0 に対するスクリーニングにかけた。配列番号 1 0 の変異型インスリンポリペプチドおよび配列番号 1 3 のペプチドリンカーを用いて、以下に示すような、配列番号 8 0、配列番号 8 2、配列番号 8 4、および配列番号 8 6 のインスリン - F c 融合タンパク質の構成を作製した。これらのインスリン - F c 融合タンパク質の構成はそれぞれ、実施例 1 5 に記載のインビトロヒト F c R I アッセイにおける結合性によって評価される、インビボにおける F c フラグメントの F c 受容体に対する結合親和性を低減させするために F c フラグメント領域に対して行われた、c N g 部位変異を含む。配列番号 8 0、配列番号 8 2、配列番号 8 4、および配列番号 8 6 のインスリン - F c 融合タンパク質の構成における c N g 部位の位置は c N g - N B 1 5 5 である。配列番号 8 0 のインスリン - F c 融合タンパク質は、c N g 部位に「N」から「D」への変異を含む。配列番号 8 2 のインスリン - F c 融合タンパク質は、c N g 部位に「N」から「A」への変異を含む。配列番号 8 4 のインスリン - F c 融合タンパク質は、c N g 部位に「N」から「R」への変異を含む。配列番号 8 6 のインスリン - F c 融合タンパク質は、c N g 部位に「N」から「Q」への変異を含む。

#### 【0297】

タンパク質製造は実施例 1 に従って H E K 2 9 3 細胞で行った。驚くべきことに、c N g - N B 1 5 5 - Q 変異と B 1 6 A 変異とを一緒に含む配列番号 8 6 のインスリン - F c 融合タンパク質の構成のホモ二量体力価は、ホモ二量体力価の設計目標を達成するのに必要なものよりも著しく低かった。次に、配列番号 8 0、配列番号 8 2、および配列番号 8 4 のインスリン - F c 融合タンパク質の構成を、実施例 4 に従ってプロテイン A カラムを用いて精製した。インスリン - F c 融合タンパク質の構成の構造は実施例 6 に従って非還元 C E - S D S および還元 C E - S D S で確認し、さらに、実施例 8 に記載のグリカン除去を行わない L C - M S によって配列の確認を行った。配列番号 8 0 のインスリン - F c 融合タンパク質の化合物分子量を、酵素による糖鎖除去を行わない実施例 8 の L C - M S 法で測定した。配列番号 8 0 のターゲット質量は 6 5 1 0 2 . 9 D a であり、実測質量は 6 5 1 0 2 . 8 D a であり、配列番号 8 0 の化合物のアミノ酸組成およびホモ二量体構造が正しいことが確認された。配列番号 8 2 のインスリン - F c 融合タンパク質の化合物分子量を、酵素による糖鎖除去を行わない実施例 8 の L C - M S 法で測定した。配列番号 8 2 のターゲット質量は 6 5 0 1 4 . 9 D a であり、実測質量は 6 5 0 1 4 . 9 D a であり、配列番号 8 2 の化合物のアミノ酸組成およびホモ二量体構造が正しいことが確認された。配列番号 8 4 のインスリン - F c 融合タンパク質の化合物分子量を、酵素による糖鎖除去を行わない実施例 8 の L C - M S 法で測定した。配列番号 8 4 のターゲット質量は 6 5 1 8 5 . 1 D a であり、実測質量は 6 5 1 8 4 . 8 D a であり、配列番号 8 4 の化合物のアミノ酸組成およびホモ二量体構造が正しいことが確認された。

#### 【0298】

ホモ二量体率は実施例 1 0 に従って分子ふるいクロマトグラフィーで測定した。c N g 変異型インスリン - F c 融合タンパク質の構成の完全アミノ酸配列を以下に挙げ（配列番号 8 0、配列番号 8 2、配列番号 8 4、および配列番号 8 6；N B 1 5 5 位には下線）、配列番号 7 6 および配列番号 7 8 に対して得られた配列アラインメントを図 2 9 に示す（クラスタルオメガ）。「\*」は、所与の配列位置において全ての配列間で完全に相同であることを示しており、一方、「:」、「.」、空白は、それぞれ、所与の配列位置における配列間のアミノ酸変異が保存的であること、中程度であること、または全く異なるものであること、を示している。

F V N Q H L C G S H L V E A L A L V C G E R G F H Y G G G G G G S G G G G G I V

EQCCTSTCSDLQLENYCGGGGGQGGGGQGGGGQGGGGGDK  
 THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCV  
 VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYDSTYRV  
 VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ  
 PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE  
 SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNV  
 FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (配列番号 80)

FVNQHLCGSHLVEALALVCGERGFHYGGGGGGSGGGGGIV  
 EQCCTSTCSDLQLENYCGGGGGQGGGGQGGGGQGGGGGDK  
 THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCV  
 VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRV  
 VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ  
 PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE  
 SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNV  
 FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (配列番号 82)

FVNQHLCGSHLVEALALVCGERGFHYGGGGGGSGGGGGIV  
 EQCCTSTCSDLQLENYCGGGGGQGGGGQGGGGQGGGGGDK  
 THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCV  
 VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYRSTYRV  
 VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ  
 PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE  
 SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNV  
 FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (配列番号 84)

FVNQHLCGSHLVEALALVCGERGFHYGGGGGGSGGGGGIV  
 EQCCTSTCSDLQLENYCGGGGGQGGGGQGGGGQGGGGGDK  
 THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCV  
 VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRV  
 VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ  
 PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE  
 SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNV  
 FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (配列番号 86)。

#### 【0299】

得られた総タンパク質収量、ホモ二量体率、およびホモ二量体力価を表25に示す。上記のような配列番号86を除いて、インスリンポリペプチド配列のB16A変異を非グリコシル化cNg変異型インスリン-Fc融合タンパク質の実施形態に含めたところ、配列番号76と比較してホモ二量体力価が向上した。cNg-NB155-D組成物は、222mg/Lにおいて最も高いホモ二量体力価を示した。インスリン-Fc融合タンパク質のインビトロIR結合を、実施例12の手順に従って試験した。配列番号78の場合のように、配列番号80、配列番号82、および配列番号84のインスリン-Fc融合タンパク質の実施形態のインスリンポリペプチドにB16A変異を含めたところ、インスリンポリペプチドがB16E変異を含む配列番号92、配列番号93、および配列番号94のインスリン-Fc融合タンパク質の構成と比べて、IR親和性が著しく向上した(すなわち、IRアッセイにおけるIC50値が低かった)。

#### 【0300】

さらに、配列番号80、配列番号82、および配列番号84のインスリン-Fc融合タンパク質のインスリンポリペプチドにB16A変異を含めたところ、実施例19の手順で測定される、これらのインスリン-Fc融合タンパク質の実施形態のFcRn結合が許容できるものとなり、これらの化合物の、インビボにおける薬物動態学的半減期が延長され、インビボにおけるグルコース低減生物活性プロファイルが延長される可能性があることが示された。なお、B16A変異を含むインスリン-Fc融合タンパク質の構成(配列番

10

20

30

40

50

号 8 0、配列番号 8 2、および配列番号 8 4) の F c R n 結合親和性は、B 1 6 A 変異を含まない類似のインスリン - F c 融合タンパク質の構成 (配列番号 9 2、配列番号 9 3、および配列番号 9 4) のそれよりも顕著に大きく、B 1 6 A 変異を含めることが、I R 受容体親和性に加えて、予想外にも F c R n 受容体親和性に影響を与えることがさらに明らかとなった。F c R n 親和性が高くなるほど、それに相関して、治療薬のインビボにおける薬物動態学的半減期が長くなる場合が多いことから、これらのように F c R n 受容体親和性を徐々に増加させることは、望ましいことであろうと考えられる。

【 0 3 0 1 】

配列番号 8 0、配列番号 8 2、および配列番号 8 4 のインスリン - F c 融合タンパク質の構成の、F c R I 結合特性および C 1 q 結合特性を、実施例 1 4 の方法および実施例 1 6 の方法で測定したところ、許容できるものであることが示された。さらに、c N g - N B 1 5 5 - R (配列番号 8 4) 変異に伴って F c R I 結合親和性が非常に顕著に低減し、配列番号 7 6 のインスリン - F c 融合タンパク質に対して 8 0 % 超の F c R I 結合低減を示した。配列番号 8 0、配列番号 8 2、および配列番号 8 4 のインスリン - F c 融合タンパク質は、C 1 q 結合親和性についてもかなり低く、これらのインスリン - F c 融合タンパク質の実施形態はいずれも、配列番号 7 6 のインスリン - F c 融合タンパク質に対して 8 0 % 超の C 1 q 結合低減を示した。以上から、配列番号 8 0、配列番号 8 2、および配列番号 8 4 のインスリン - F c 融合タンパク質は、製造性、インビボ効力、インビボ生物活性の延長、および免疫原性の可能性の低さについての各設計目標 (実施例 2 9) を達成した。

10

20

30

40

50

【表 2 5】

表 2 5 : I g G 1 の F c フラグメントを含む配列のホモ二量体力価および受容体結合のデータ								
候補 ID	F c アイソタイプ/変異	一過性にトランスフェクトされた HEK 2 9 3 の収量 (mg/L)	ホモ二量体率%	ホモ二量体力価 (mg/L)	I R アッセイにおける I C 5 0 (nM)	ヒト F c R n アッセイにおける E C 5 0 (ng/mL)	ヒト F c γ R I アッセイにおける 3, 0 0 0 ng/mL ビオチン化 F c γ R I での OD 4 5 0 比	ヒト C 1 q アッセイにおける 3, 0 0 0 ng/mL ビオチン化 F c γ R I での OD 4 5 0 比
配列番号 7 6	h I g G 1 / c N g - N B 1 5 5	1 8 1 #	9 9 . 5	1 8 0	1 7 9 9	5 7 8	1 . 0 0 0	1 . 0 0 0
配列番号 8 0	h I g G 1 / B 1 6 A / c N g - N B 1 5 5 - D	2 3 4	9 4 . 9	2 2 2	8 8 1	7 8 8	0 . 3 4 6	0 . 1 0 9
配列番号 8 2	h I g G 1 / B 1 6 A / c N g - N B 1 5 5 - A	2 2 7	9 3 . 1	2 1 1	1 1 2 5	6 9 0	0 . 2 6 7	0 . 1 8 1
配列番号 8 4	h I g G 1 / B 1 6 A / c N g - N B 1 5 5 - R	1 9 3	9 6 . 1	1 8 5	9 1 1	6 9 6	0 . 1 6 7	0 . 1 7 3
配列番号 8 6	h I g G 1 / B 1 6 A / c N g - N B 1 5 5 - Q	1 1 4	9 7 . 1	1 1 1	DNT	7 5 0	0 . 1 9 2	0 . 3 1 1

# = 2 つの独立した実験から平均。

DNT = 未試験。

## 【 0 3 0 2 】

実施例 5 4 : 配列番号 1 0 のインスリンポリペプチドと、c N g - S 変異を含む I g G 1 アイソタイプ F c と、各種リンカーと、を含むヒトインスリン - F c 融合タンパク質

上記のように、I g G 1 アイソタイプ F c フラグメントの c N g 部位における変異と、インスリンポリペプチド上の変異は、I R、F c R n、F c R I (受容体) 結合、および C 1 q 結合といった物性に予想外の変化をもたらした。リンカー組成物がこれらの特性にどのような影響を与えたかをさらに深く理解するため、配列番号 1 0 の B 1 6 A 変異型インスリンポリペプチドと、c N g - S 変異を有する非グリコシル化 h I g G 1 F c フラグメント (配列番号 7 7 ; X<sub>1</sub> は S) と、配列番号 1 3 のリンカー配列と、を含む特定のインスリン - F c 融合タンパク質の構成 (配列番号 7 8) を出発点として選び、そこから、リンカーの長さや組成を以下の表 2 6 に示すように変更した。

10

20

30

40

50

【表 2 6】

表 2 6 : 配列番号およびリンカーアミノ酸組成、並びに c N g - S 部位の位置		
候補 I D	リンカーアミノ酸配列	c N g 部位の位置
配列番号 9 6	G G G G G Q G G G G Q G G G G Q G G G G G Q G G G G (配列番号 9 9)	c N g - N B 1 6 0 - S
配列番号 7 8	G G G G G Q G G G G Q G G G G Q G G G G G (配列番号 1 3)	c N g - N B 1 5 5 - S
配列番号 9 7	G G G G Q G G G G (配列番号 1 9)	c N g - N B 1 4 3 - S
配列番号 9 8	<リンカーなし>	c N g - N B 1 3 6 - S
配列番号 8 7	G G G G G A G G G G A G G G G A G G G G G (配列番号 6 7)	c N g - N B 1 5 5 - S
配列番号 8 9	G G G G A G G G G (配列番号 1 1)	c N g - N B 1 4 3 - S

10

## 【 0 3 0 3】

配列番号 9 6、配列番号 9 7、配列番号 9 8、配列番号 8 7、および配列番号 8 9 のインスリン - F c 融合タンパク質の実施形態を、実施例 1 に従って H E K 2 9 3 細胞で製造した。次いで、インスリン - F c 融合タンパク質の構成を、実施例 4 に従ってプロテイン A カラムを用いて精製した。インスリン - F c 融合タンパク質の構成の構造は実施例 6 に従って非還元 C E - S D S および還元 C E - S D S で確認し、さらに、実施例 8 に記載のグリカン除去を行わない L C - M S によって配列の確認を行った。グリカンを持たないことの確認は、実施例 8 の L C - M S 法を用いて行い、ただし、P N G アーゼ F 処理工程は省略した。配列番号 8 7 のインスリン - F c 融合タンパク質の構成の化合物分子量を、酵素による糖鎖除去を行わない実施例 8 の L C - M S 法で測定した。ターゲット質量は 6 4 7 0 4 . 6 D a であり、実測質量は 6 4 7 0 4 . 4 D a であり、配列番号 8 7 の化合物のアミノ酸組成およびホモ二量体構造が正しいことが確認された。配列番号 8 9 のインスリン - F c 融合タンパク質の構成の化合物分子量を、酵素による糖鎖除去を行わない実施例 8 の L C - M S 法で測定した。ターゲット質量は 6 3 2 7 9 . 2 D a であり、実測質量は 6 3 2 7 8 . 8 D a であり、配列番号 8 9 の化合物のアミノ酸組成およびホモ二量体構造が正しいことが確認された。

20

30

## 【 0 3 0 4】

ホモ二量体率は実施例 1 0 に従って分子ふるいクロマトグラフィーで測定した。インビトロにおける I M - 9 I R 結合の I C 5 0 は実施例 1 2 に記載されようように測定し、F c 受容体結合親和性は実施例 1 5 に記載されたようなインビトロヒト F c R I アッセイを用いて測定し、C 1 q 結合親和性は実施例 1 6 に記載されたようように測定し、ヒト F c R n 受容体に対する親和性は実施例 1 9 に記載されたようように測定した。結果を表 2 7 に示す。

40

50

【表 27】

表 27 : B16A、IgG1のFcフラグメント、cNg-S変異、および各種リンカー組成を含む配列のホモ二量体力価および受容体結合のデータ							
候補 ID	一過性にトランスフェクトされた HEK293 力価 (mg/L)	ホモ二量体率%	ホモ二量体力価 (mg/L)	IRアッセイにおける IC50 (nM)	ヒトFcRnアッセイにおける EC50 (ng/mL)	ヒトFcγRIアッセイにおける 3,000 ng/mL ビオチン化FcγRIでのOD 450比	ヒトC1qアッセイにおける 1,000 ng/mL ビオチン化C1qでのOD 450比
配列番号 96	227	94.2	214	760	672	0.216	0.166
配列番号 78	189	93.2	176	1162	825	0.197	0.169
配列番号 97	187	95.5	179	954	679	0.208	0.314
配列番号 98	40	94.8	38	526	401	0.146	0.311
配列番号 87	224	95.2	213	789	701	0.193	0.204
配列番号 89	193	94.5	182	1265	657	0.192	0.305

得られたインスリン - Fc融合タンパク質の完全アミノ酸配列を以下に挙げる (cNg-S位には下線) (クラスタルオメガ)。図30 (クラスタルオメガ) は、配列番号87、配列番号96、配列番号78、配列番号97、配列番号89、および配列番号98の並列配列比較を示している。「\*」は、所与の配列位置において全ての配列間で完全に相同であることを示しており、一方、「:」、「.」、空白は、それぞれ、所与の配列位置における配列間のアミノ酸変異が保存的であること、中程度であること、または全く異なるものであること、を示している。

FVNQHLCGSHLVEALALVCGERGFHYGGGGGGSGGGGGGIV  
EQCCTSTCSDLQLENYCGGGGGGAGGGGAGGGGAGGGGGGDK  
THTCPCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV  
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYSSTYRV  
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ  
PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE  
SNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNV  
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (配列番号87)

FVNQHLCGSHLVEALALVCGERGFHYGGGGGGSGGGGGGIV  
EQCCTSTCSDLQLENYCGGGGGGQGGGGGQGGGGGQGGGGGQ  
GGGDKTHTCPCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE  
VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYS  
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK  
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA  
VEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRW  
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (配列番号96)

FVNQHLCGSHLVEALALVCGERGFHYGGGGGGSGGGGGGIV  
EQCCTSTCSDLQLENYCGGGGGQGGGGGDKTHTCPCPCPAPELL  
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK  
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYSSTYRVVSVLTVLHQDWL  
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS  
RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT  
PPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN

HYTQKSLSLSPG (配列番号 97)

FVNQHLCGSHLVEALALVCGERGFHYGGGGGGSGGGGGGIV  
EQCCTSTCSDLQLENYCGGGGAGGGGDKTHTCPCPAPPELL  
LGGPSVFLFPKPKDTLMISRTPETCVVVDVSHEDPEVK  
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYSSTYRVVSVLTVLHQDWL  
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS  
RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT  
PPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHN  
HYTQKSLSLSPG (配列番号 89)

FVNQHLCGSHLVEALALVCGERGFHYGGGGGGSGGGGGGIV  
EQCCTSTCSDLQLENYCDKTHTCPCPAPPELLGGPSVFLF  
PKPKDTLMISRTPETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE  
VHNAKTKPREEQYSSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV  
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV  
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGS  
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSL  
SPG (配列番号 98)。

#### 【0305】

これらの結果は、インスリンポリペプチドのC末端がFcフラグメントのN末端に直接連結している、リンカーを含まないインスリン-Fc融合タンパク質の構成 (配列番号 98) において、ホモ二量体力価が許容できないほどに低い (すなわち、38 mg/L) ことを示している。少なくとも9アミノ酸長のグリシン-グルタミンリンカー組成物を有するインスリン-Fc融合タンパク質の構成 (配列番号 97、配列番号 78、および配列番号 96) では、生理化学的性質に、リンカー長によって変化する重要な傾向はないように思われた。グリシン-アラニン組成物リンカーを含む配列番号 87 のインスリン-Fc融合タンパク質の構成を、グリシン-グルタミン組成物リンカーを含む配列番号 78 のインスリン-Fc融合タンパク質の構成と比較したところ、リンカー長が同じく21アミノ酸である場合、配列番号 87 のインスリン-Fc融合タンパク質の構成が、ホモ二量体力価の向上、IR結合の増強、およびFcRn結合の増強を示すが、FcRI結合特性とC1q結合特性はほぼ同じであることが示された。よって、配列番号 96、配列番号 97、配列番号 87、および配列番号 89 のインスリン-Fc融合タンパク質の構成の全てが設計目標 (実施例 29) を達成したが、配列番号 87 のホモ二量体が好ましい実施形態である。

#### 【0306】

実施例 55: B16A変異型インスリンポリペプチドと、cNg-NB155-X部位変異を有するヒトIgG1アイソタイプFcフラグメントと、リンカー (配列番号 13) とを含むインスリン-Fc融合タンパク質のインビボ効力

実施例 53 の有望なホモ二量体力価、IR活性、およびFcRn活性の結果を考慮して、配列番号 78、配列番号 80、配列番号 82、および配列番号 84 のインスリン-Fc融合タンパク質を、およそ10 kgの重さのN=3の健常な抗体未処置ビーグル犬のそれぞれに皮下注射後、実施例 22 に従ってインビボ生物活性について試験する。配列番号 78、配列番号 80、配列番号 82、および配列番号 84 の各インスリン-Fc融合タンパク質を単回皮下投与した場合の、時間に対する%FBGLのプロットを作成する。この時間に対する%FBGLのデータは、配列番号 78、配列番号 80、配列番号 82、および配列番号 84 のインスリン-Fc融合タンパク質が、イヌにおいて顕著な生物活性を有することを示すと期待される。

#### 【0307】

実施例 56: B16A変異型インスリンポリペプチドと、cNg-NB155-S変異を有するヒトIgG1アイソタイプFcフラグメントと、リンカー (配列番号 11) とを含むインスリン-Fc融合タンパク質のインビボ効力

実施例 5 4 の有望なホモ二量体力価、I R 活性、および F c R n 活性の結果を考慮して、配列番号 8 9 のインスリン - F c 融合タンパク質を、およそ 1 0 k g の重さの N = 3 の健常な抗体未処置ビーグル犬のそれぞれに皮下注射後、実施例 2 2 に従ってインビボ生物活性について試験する。配列番号 8 9 のインスリン - F c 融合タンパク質を単回皮下投与した場合の、時間に対する % F B G L のプロットを作成する。この時間に対する % F B G L のデータは、配列番号 8 9 のインスリン - F c 融合タンパク質が、イヌにおいて顕著な生物活性を有することを示すと期待される。

#### 【 0 3 0 8 】

実施例 5 7 : B 1 6 A 変異型インスリンポリペプチドと、c N g - N B 1 5 5 - S 変異を有するヒト I g G 1 アイソタイプ F c フラグメントと、リンカー ( 配列番号 6 7 ) とを含むインスリン - F c 融合タンパク質のインビボ効力

10

実施例 5 4 の有望なホモ二量体力価、I R 活性、および F c R n 活性の結果を考慮して、配列番号 8 7 のインスリン - F c 融合タンパク質を、およそ 1 0 k g の重さの N = 3 の健常な抗体未処置ビーグル犬のそれぞれに皮下注射後、実施例 2 2 に従ってインビボ生物活性について試験する。配列番号 8 7 のインスリン - F c 融合タンパク質を単回皮下投与した場合の、時間に対する % F B G L のプロットを作成する。この時間に対する % F B G L のデータは、配列番号 8 7 のインスリン - F c 融合タンパク質が、イヌにおいて顕著な生物活性を有することを示すと期待される。

#### 【 0 3 0 9 】

実施例 5 8 : 安定にトランスフェクトされた C H O 細胞株を介して作製されたヒト I g G 1 由来の F c フラグメントを含む好ましいインスリン - F c 融合タンパク質を用いた、例示的な C H O ベースのプロダクションラン

20

配列番号 7 8、配列番号 8 0、配列番号 8 2、配列番号 8 4、配列番号 8 7、および配列番号 8 9 のインスリン - F c 融合タンパク質の構成をコードするベクターで安定にトランスフェクトされた別々の C H O 細胞株を、実施例 2 に記載されたように作製する。フェッドバッチ式振盪フラスコ 1 4 日間プロダクションラン ( 0 . 5 ~ 2 . 0 L の培地規模 ) の播種を、3 7 °C、5 % 二酸化炭素に設定された振盪恒温器内で、 $0.5 \times 10^6$  細胞 / m L となるように行う。増殖培地として C D O p t i C H O を D y n a m i s ( サーマフィッシャー社 ) に置き換え、フィードとして E f f i c i e n t F e e d C ( サーマフィッシャー社 ) を用いる以外は、実施例 2 に記載したように、ランを実行する。3 % v / v のフィードの添加をプロダクションラン 3 日目から開始して、さらに 4 日目にも添加を行い、振盪フラスコ温度を 3 2 °C に調整し、振盪恒温器内の二酸化炭素濃度を 5 % から 2 % に下げる。このランの間に、細胞密度は  $8 \sim 1.4 \times 10^6$  細胞 / m L まで増加し、1 4 日目に、プロダクションランを回収して細胞を取り除き、実施例 4、実施例 6、実施例 8、および実施例 1 0 に記載されたように培養上清の精製と試験を行って、インスリン - F c 融合タンパク質を得る。安定にトランスフェクトされた C H O 細胞株を用いた配列番号 7 8、配列番号 8 0、配列番号 8 2、配列番号 8 4、配列番号 8 7、および配列番号 8 9 のインスリン - F c 融合タンパク質の構成の別々のプロダクションランからの、製造およびインビトロ試験データは、ホモ二量体力価が一過性にトランスフェクトされた H E K 2 9 3 細胞で得られたものよりも大きく、I R、F c R n 受容体、F c R I 受容体結合特性、および C 1 q 結合特性が設計目標 ( 実施例 2 9 ) を達成することを示すと期待される。

30

40

#### 【 0 3 1 0 】

実施例 5 9 : マウスにヒトインスリン F c 融合タンパク質を単回投与した後のインビボ薬物動態 ( P D )

空腹時血糖値に対する作用について、以下のように、インスリン - F c 融合タンパク質を評価した。1 群当たり N = 3 の b a l b / c マウスまたは糖尿病の w t N O D マウス ( ジャクソン・ラボラトリーズ社 ) からデータを収集した。実験の 1 時間前に動物を絶食させ、その後、0 時間の時点で、マウスに、インスリン F c 融合タンパク質ホモ二量体を含む医薬組成物の単回皮下投与を、1 0 ~ 5 0 m M のリン酸水素ナトリウム、5 0 ~

50

150 mMの塩化ナトリウム、0.005～0.05 % v/vのTween-80、および所望により濃度0.02～1.00 mg/mLの静菌剤（例えばフェノール、m クレゾール、またはメチルパラベン）の溶液中、300 µg/kgのインスリン-Fc融合タンパク質濃度で、最終的な溶液pHは水酸化ナトリウムおよび/または塩酸を用いて7.0～8.0に調整して、実施した。

#### 【0311】

各時点において、血液試料を採取し、グルコース計（AlphaTRAK（登録商標）2 ペット用グルコース計）を用いて直ちにグルコースレベルの読み取りを行い、これにはおよそ1滴の血液が必要であった。0時間から9時間までの平均空腹時血糖値%（%FBGL）をプロットし、所与のインスリン-Fc融合タンパク質の構成の生物活性を評価した。配列番号87および配列番号89を単回皮下投与した場合の、図38に示される結果は、両方の化合物がマウスにおいて顕著な生物活性を示したことを示している。

10

#### 【0312】

実施例60：マウスにヒトインスリンFc融合タンパク質を単回投与した後のインビボ薬物動態（PD）

空腹時血糖値に対する作用について、以下のように、インスリン-Fc融合タンパク質を評価する。1群当たりN=3のb a l b / cマウスまたは糖尿病w t N O Dマウス（ジャクソン・ラボラトリーズ社）からデータを収集する。実験の1時間前に動物を絶食させ、その後、0時間の時点で、マウスに、インスリンFc融合タンパク質ホモ二量体を含む医薬組成物の単回皮下投与を、10～50 mMのリン酸水素ナトリウム、50～150 mMの塩化ナトリウム、0.005～0.05 % v/vのTween-80、および所望により濃度0.02～1.00 mg/mLの静菌剤（例えばフェノール、m クレゾール、またはメチルパラベン）の溶液中、300 µg/kgのインスリン-Fc融合タンパク質濃度で、最終的な溶液pHは水酸化ナトリウムおよび/または塩酸を用いて7.0～8.0に調整して、実施する。

20

#### 【0313】

各時点において、血液試料を採取し、グルコース計（AlphaTRAK（登録商標）2 ペット用グルコース計）を用いて直ちにグルコースレベルの読み取りを行い、これにはおよそ1滴の血液が必要である。0時間から9時間までの平均空腹時血糖値%（%FBGL）をプロットし、所与のインスリン-Fc融合タンパク質の構成の生物活性を評価する。配列番号78、配列番号80、配列番号82、または配列番号84の単回皮下投与によって、これらのインスリン-Fc融合タンパク質がマウスにおいて顕著な生物活性を示すことが明らかになると期待される。

30

#### 【0314】

実施例61：例示的なインスリン-Fc融合タンパク質のドメインおよび配列

上記の実施例で使用された例示的なインスリン-Fc融合タンパク質のアミノ酸配列および対応するDNA配列を、図31、図32、図33、図34、図35、図36、および図37に示す。

均等論

#### 【0315】

クレームにおいて、「a」、「an」、および「the」などの冠詞は、反対の趣旨が示されていない限り、または文脈から明らかでない限り、1つを意味する場合も2つ以上を意味する場合もある。ある群の1または複数の要素の間に「または」を含むクレームまたは記述は、反対の趣旨が示されていない限り、または文脈から明らかでない限り、前記群の要素の1、2以上、または全てが、所与の製品または工程に存在していれば、それに使用されていれば、またはそれに関連していれば、満たされているものとする。本開示は、前記群の厳密に1つの要素が所与の製品または工程に存在している、それに使用されている、またはそれに関連している、実施形態を包含する。本開示は、前記群の要素のうちの2以上または全てが所与の製品または工程に存在している、それに使用されている、またはそれに関連している、実施形態を包含する。

40

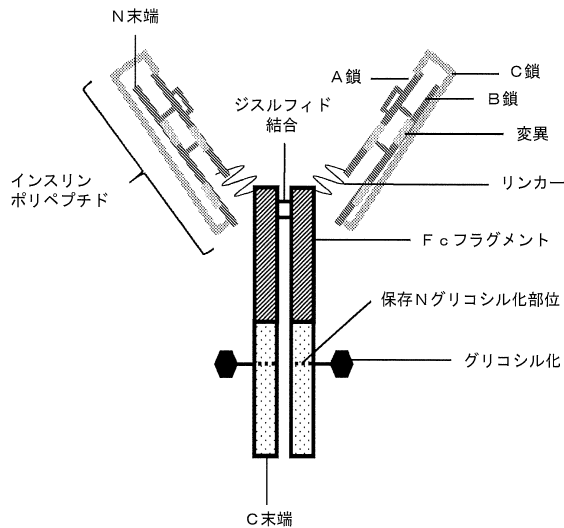
50

## 【 0 3 1 6 】

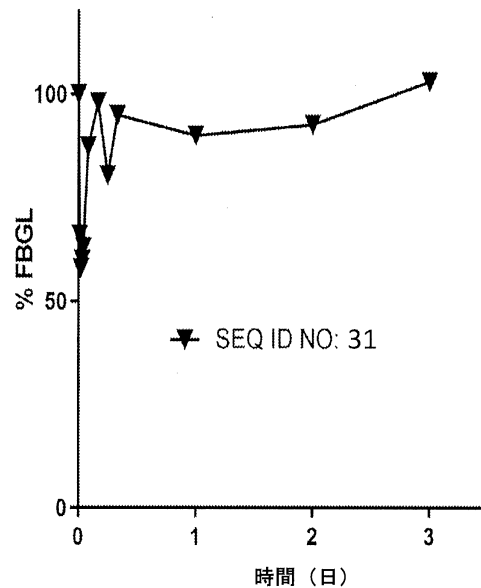
さらに、本開示は、列挙されたクレームのうちの1または複数からの1または複数の制限、要素、節、および記述用語が別のクレームに導入された、全ての変形、組み合わせ、および入れ替えを包含する。例えば、別のクレームに従属する任意のクレームを、同じ基本クレームに従属する任意の他のクレームに存在する1または複数の制限を含むように修正することができる。要素がリストとして、例えばマーカッシュ群形式で提示されている場合、要素の各部分群を開示し、任意の要素を当該群から除外することもできる。一般的に、本開示または本開示の側面が、特定の要素および/または特徴を含むものとして言及される場合、本開示または本開示の側面のある実施形態は、かかる要素および/または特徴からなるか、またはこれらから本質的になることが、理解されるべきである。簡潔さのために、これらの実施形態は、本明細書において、特にこの通りの言葉では記載されていない。また、用語「含む (comprise)」、「含むこと (comprising)」、「含有する (contain)」、および「含有すること (containing)」は、オープンであることを意図され、その使用は、さらなる要素または工程の包含を許容することに留意する。範囲が示される場合、端点が含まれる。さらに、別段に示されるかまたは別段に文脈および当業者の理解から明らかでない限り、範囲として表される値は、本開示の異なる実施形態において記述される範囲内の任意の特定の値または部分範囲を、文脈によって特に明示されない限り、当該範囲の下限の単位の10分の1まで想定し得る。

## 【 図 面 】

## 【 図 1 】



## 【 図 2 】



10

20

30

40

50

## 【 図 3 】

```
SEQ ID NO: 32 FVNQHLGSDLVEALALVCGERGFFYTDPTGGGPRRGIVEQCCHSICSLYQLENYCNGGG 60
SEQ ID NO: 33 FVNQHLGSDLVEALALVCGERGFFYTDPTGGGPRRGIVEQCCHSICSLYQLENYCNGGG 60
SEQ ID NO: 34 FVNQHLGSDLVEALALVCGERGFFYTDPTGGGPRRGIVEQCCHSICSLYQLENYCNGGG 60
SEQ ID NO: 31 FVNQHLGSDLVEALALVCGERGFFYTDPTGGGPRRGIVEQCCHSICSLYQLENYCNGGG 60
SEQ ID NO: 35 FVNQHLGSDLVEALALVCGERGFFYTDPTGGGPRRGIVEQCCHSICSLYQLENYCNGGG 60
*****

SEQ ID NO: 32 GAGGGGRCCTDTPPCPVPEPLGGPSVLIFPPKPKDILAITRTPEVTCVVDLGRDPEVQI 120
SEQ ID NO: 33 GAGGGGRCCTDTPPCPVPEPLGGPSVLIFPPKPKDILAITRTPEVTCVVDLGRDPEVQI 120
SEQ ID NO: 34 GAGGGGRCCTDTPPCPVPEPLGGPSVLIFPPKPKDILAITRTPEVTCVVDLGRDPEVQI 120
SEQ ID NO: 31 GAGGGGRCCTDTPPCPVPEPLGGPSVLIFPPKPKDILAITRTPEVTCVVDLGRDPEVQI 120
SEQ ID NO: 35 GAGGGGRCCTDTPPCPVPEPLGGPSVLIFPPKPKDILAITRTPEVTCVVDLGRDPEVQI 120
*****

SEQ ID NO: 32 SNFVQKGVHTAKTQSRQQFNCTYRVVSVLPTEHQDLWGKEFKCRVNHIDLPSPERT 180
SEQ ID NO: 33 SNFVQKGVHTAKTQSRQQFNCTYRVVSVLPTEHQDLWGKEFKCRVNHIDLPSPERT 180
SEQ ID NO: 34 SNFVQKGVHTAKTQSRQQFNCTYRVVSVLPTEHQDLWGKEFKCRVNHIDLPSPERT 180
SEQ ID NO: 31 SNFVQKGVHTAKTQSRQQFNCTYRVVSVLPTEHQDLWGKEFKCRVNHIDLPSPERT 180
SEQ ID NO: 35 SNFVQKGVHTAKTQSRQQFNCTYRVVSVLPTEHQDLWGKEFKCRVNHIDLPSPERT 180
*****

SEQ ID NO: 32 ISKARGRAHKPSVYVLPSPKELSSSDTVSITCLIKDFYPPDIDVEWQSNQQQEPERKHR 240
SEQ ID NO: 33 ISKARGRAHKPSVYVLPSPKELSSSDTVSITCLIKDFYPPDIDVEWQSNQQQEPERKHR 240
SEQ ID NO: 34 ISKARGRAHKPSVYVLPSPKELSSSDTVSITCLIKDFYPPDIDVEWQSNQQQEPERKHR 240
SEQ ID NO: 31 ISKARGRAHKPSVYVLPSPKELSSSDTVSITCLIKDFYPPDIDVEWQSNQQQEPERKHR 240
SEQ ID NO: 35 ISKARGRAHKPSVYVLPSPKELSSSDTVSITCLIKDFYPPDIDVEWQSNQQQEPERKHR 240
*****

SEQ ID NO: 32 MTFPQLDEDGSYFLYSLKSLVDKSRWQGGDFTCAVLHEALHSHYTQKSLSLSPG 294
SEQ ID NO: 33 MTFPQLDEDGSYFLYSLKSLVDKSRWQGGDFTCAVLHEALHSHYTQKSLSLSPG 294
SEQ ID NO: 34 MTFPQLDEDGSYFLYSLKSLVDKSRWQGGDFTCAVLHEALHSHYTQKSLSLSPG 294
SEQ ID NO: 31 MTFPQLDEDGSYFLYSLKSLVDKSRWQGGDFTCAVLHEALHSHYTQKSLSLSPG 294
SEQ ID NO: 35 MTFPQLDEDGSYFLYSLKSLVDKSRWQGGDFTCAVLHEALHSHYTQKSLSLSPG 294
*****
```

## 【 図 4 】

```
SEQ ID NO: 31 FVNQHLGSDLVEALALVCGERGFFYTDPTGGGPRRGIVEQCCHSICSLYQLENYCNGGG 60
SEQ ID NO: 38 FVNQHLGSDLVEALALVCGERGFFYTDPTGGGPRRGIVEQCCHSICSLYQLENYCNGGG 60
SEQ ID NO: 36 FVNQHLGSDLVEALALVCGERGFFYTDPTGGGPRRGIVEQCCHSICSLYQLENYCNGGG 60
SEQ ID NO: 37 FVNQHLGSDLVEALALVCGERGFFYTDPTGGGPRRGIVEQCCHSICSLYQLENYCNGGG 60
*****

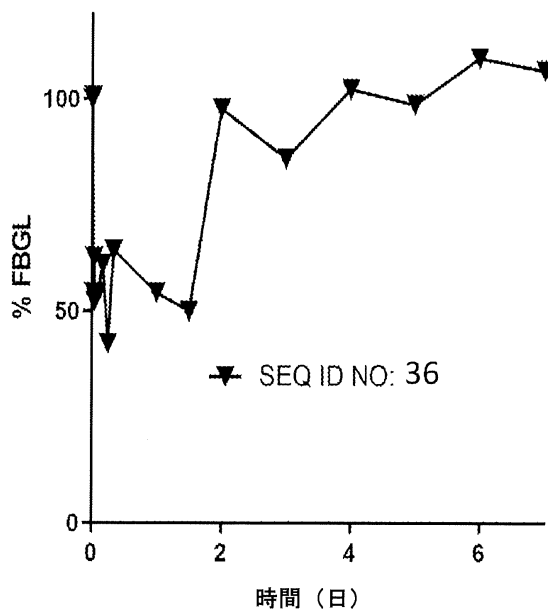
SEQ ID NO: 31 GAGGGGRCCTDTPPCPVPEPLGGPSVLIFPPKPKDILAITRTPEVTCVVDLGRDPEVQI 120
SEQ ID NO: 38 GAGGGGRCCTDTPPCPVPEPLGGPSVLIFPPKPKDILAITRTPEVTCVVDLGRDPEVQI 117
SEQ ID NO: 36 GAGGGGRCCTDTPPCPVPEPLGGPSVLIFPPKPKDILAITRTPEVTCVVDLGRDPEVQI 117
SEQ ID NO: 37 GAGGGGRCCTDTPPCPVPEPLGGPSVLIFPPKPKDILAITRTPEVTCVVDLGRDPEVQI 118
*****

SEQ ID NO: 31 SNFVQKGVHTAKTQSRQQFNCTYRVVSVLPTEHQDLWGKEFKCRVNHIDLPSPERT 180
SEQ ID NO: 38 SNFVQKGVHTAKTQSRQQFNCTYRVVSVLPTEHQDLWGKEFKCRVNHIDLPSPERT 177
SEQ ID NO: 36 SNFVQKGVHTAKTQSRQQFNCTYRVVSVLPTEHQDLWGKEFKCRVNHIDLPSPERT 177
SEQ ID NO: 37 SNFVQKGVHTAKTQSRQQFNCTYRVVSVLPTEHQDLWGKEFKCRVNHIDLPSPERT 178
*****

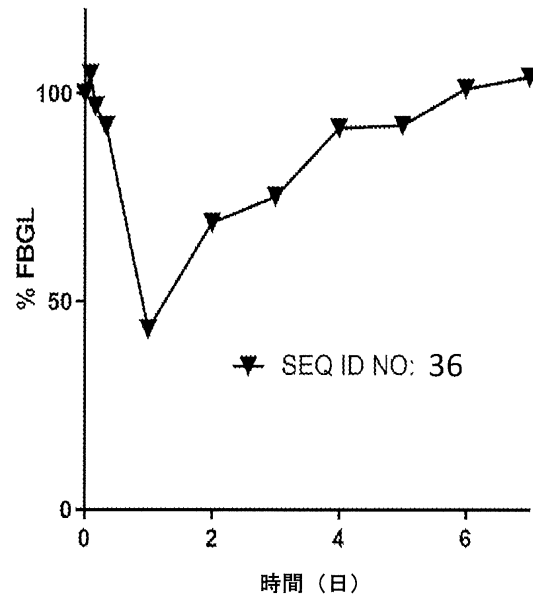
SEQ ID NO: 31 ISKARGRAHKPSVYVLPSPKELSSSDTVSITCLIKDFYPPDIDVEWQSNQQQEPERKHR 240
SEQ ID NO: 38 ISKARGRAHKPSVYVLPSPKELSSSDTVSITCLIKDFYPPDIDVEWQSNQQQEPERKHR 237
SEQ ID NO: 36 ISKARGRAHKPSVYVLPSPKELSSSDTVSITCLIKDFYPPDIDVEWQSNQQQEPERKHR 237
SEQ ID NO: 37 ISKARGRAHKPSVYVLPSPKELSSSDTVSITCLIKDFYPPDIDVEWQSNQQQEPERKHR 237
*****

SEQ ID NO: 31 MTFPQLDEDGSYFLYSLKSLVDKSRWQGGDFTCAVLHEALHSHYTQKSLSLSPG 294
SEQ ID NO: 38 MTFPQLDEDGSYFLYSLKSLVDKSRWQGGDFTCAVLHEALHSHYTQKSLSLSPG 291
SEQ ID NO: 36 MTFPQLDEDGSYFLYSLKSLVDKSRWQGGDFTCAVLHEALHSHYTQKSLSLSPG 290
SEQ ID NO: 37 MTFPQLDEDGSYFLYSLKSLVDKSRWQGGDFTCAVLHEALHSHYTQKSLSLSPG 291
*****
```

## 【 図 5 】



## 【 図 6 】



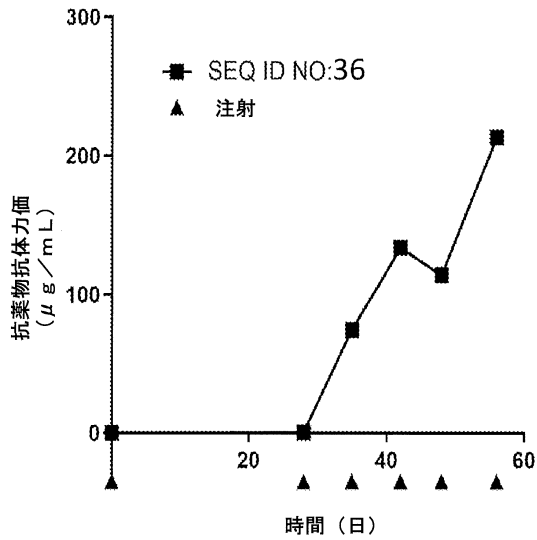
10

30

40

50

【図 7】

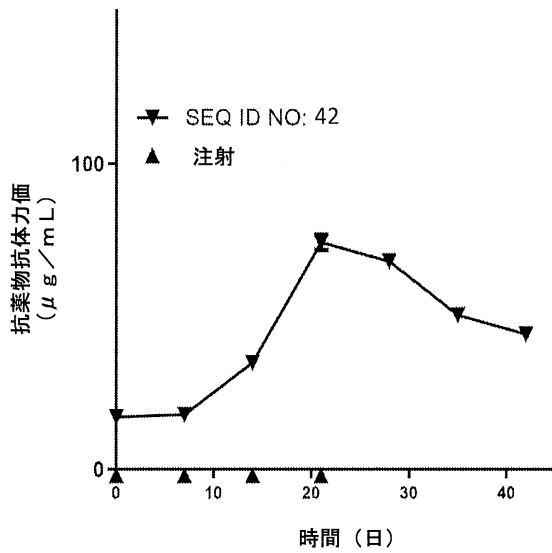


【図 8】

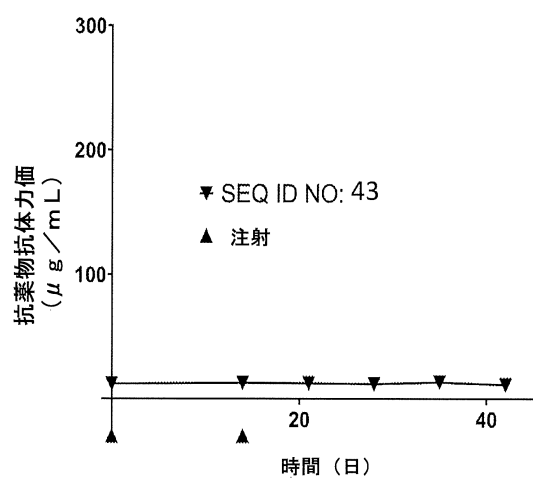
SEQ ID NO: 39	FVNQHLGSDILVEALALVCGERFFYTDPGGPRRGIVEQCCHSICSISLYQLENYCNGGG	60
SEQ ID NO: 40	FVNQHLGSDILVEALALVCGERFFYTDPGGPRRGIVEQCCHSICSISLYQLENYCNGGG	60
SEQ ID NO: 41	FVNQHLGSDILVEALALVCGERFFYTDPGGPRRGIVEQCCHSICSISLYQLENYCNGGG	60
SEQ ID NO: 42	FVNQHLGSDILVEALALVCGERFFYTDPGGPRRGIVEQCCHSICSISLYQLENYCNGGG	60
*****		
SEQ ID NO: 39	GAGGGGDCPCPCAPFEMLGGSVFIFPPKPKDTLLIARTPEVTCVVVDLPEDPEVQISWF	120
SEQ ID NO: 40	GAGGGGDCPCPCAPFEMLGGSVFIFPPKPKDTLLIARTPEVTCVVVDLPEDPEVQISWF	120
SEQ ID NO: 41	GAGGGGDCPCPCAPFEMLGGSVFIFPPKPKDTLLIARTPEVTCVVVDLPEDPEVQISWF	120
SEQ ID NO: 42	GAGGGGDCPCPCAPFEMLGGSVFIFPPKPKDTLLIARTPEVTCVVVDLPEDPEVQISWF	120
*****		
SEQ ID NO: 39	VDGKQMQTAKTQPREEQFGQTYRVVSVLPIGHQDWLKGKQFTCKVNNKALPSPIERTISK	180
SEQ ID NO: 40	VDGKQMQTAKTQPREEQFGQTYRVVSVLPIGHQDWLKGKQFTCKVNNKALPSPIERTISK	180
SEQ ID NO: 41	VDGKQMQTAKTQPREEQFGQTYRVVSVLPIGHQDWLKGKQFTCKVNNKALPSPIERTISK	180
SEQ ID NO: 42	VDGKQMQTAKTQPREEQFGQTYRVVSVLPIGHQDWLKGKQFTCKVNNKALPSPIERTISK	180
*****		
SEQ ID NO: 39	ARGQAHQPSVTVLPFSREELSKNTVSLTCLIKDFFPPDIDVWQSNQGEPEPKYRTTTP	240
SEQ ID NO: 40	ARGQAHQPSVTVLPFSREELSKNTVSLTCLIKDFFPPDIDVWQSNQGEPEPKYRTTTP	240
SEQ ID NO: 41	ARGQAHQPSVTVLPFSREELSKNTVSLTCLIKDFFPPDIDVWQSNQGEPEPKYRTTTP	240
SEQ ID NO: 42	ARGQAHQPSVTVLPFSREELSKNTVSLTCLIKDFFPPDIDVWQSNQGEPEPKYRTTTP	240
*****		
SEQ ID NO: 39	QLDEGGSYFLYSKLSVDKSRWQGDFTICAVMEALNNHYTQESLSHSPG	290
SEQ ID NO: 40	QLDEGGSYFLYSKLSVDKSRWQGDFTICAVMEALNNHYTQESLSHSPG	290
SEQ ID NO: 41	QLDEGGSYFLYSKLSVDKSRWQGDFTICAVMEALNNHYTQESLSHSPG	290
SEQ ID NO: 42	QLDEGGSYFLYSKLSVDKSRWQGDFTICAVMEALNNHYTQESLSHSPG	290
*****		

10

【図 9】



【図 10】



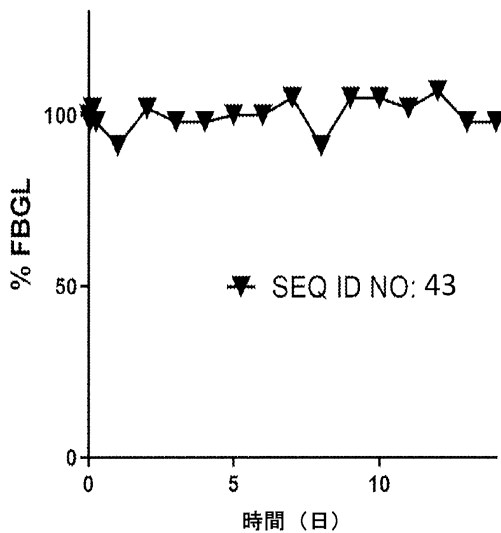
20

30

40

50

【 図 1 1 】



【 図 1 2 】

```

SEQ ID NO: 43      FVNHQLCGSHVEALVALLCGRGFFTYDPTGGGPRGRIVEQCTTSCISLYQLENYCGGG 60
SEQ ID NO: 44      FVNHQLCGSHVEALVALLCGRGFFTYDPTGGGPRGRIVEQCTTSCISLYQLENYCGG 69
SEQ ID NO: 45      FVNHQLCGSHVEALVALLCGRGFFTYDPTGGGPRGRIVEQCTTSCISLYQLENYCGG 69
SEQ ID NO: 46      FVNHQLCGSHVEALVALLCGRGFFTYDPTGGGPRGRIVEQCTTSCISLYQLENYCGG 69
SEQ ID NO: 47      FVNHQLCGSHVEALVALLCGRGFFTYDPTGGGPRGRIVEQCTTSCISLYQLENYCGG 69
SEQ ID NO: 48      FVNHQLCGSHVEALVALLCGRGFFTYDPTGGGPRGRIVEQCTTSCISLYQLENYCGG 69
*****
SEQ ID NO: 43      GAGGGGCKCPKAPMELGGSVFIPFPEKDKTLIIARTFEVTCVVLDPEDEPQISWF 120
SEQ ID NO: 44      GAGGGGCKCPKAPMELGGSVFIPFPEKDKTLIIARTFEVTCVVLDPEDEPQISWF 119
SEQ ID NO: 45      GAGGGGCKCPKAPMELGGSVFIPFPEKDKTLIIARTFEVTCVVLDPEDEPQISWF 119
SEQ ID NO: 46      GAGGGGCKCPKAPMELGGSVFIPFPEKDKTLIIARTFEVTCVVLDPEDEPQISWF 119
SEQ ID NO: 47      GAGGGGCKCPKAPMELGGSVFIPFPEKDKTLIIARTFEVTCVVLDPEDEPQISWF 119
SEQ ID NO: 48      GAGGGGCKCPKAPMELGGSVFIPFPEKDKTLIIARTFEVTCVVLDPEDEPQISWF 119
*****
SEQ ID NO: 43      VDGKQMKTAKTQREBQSGTYRVSRLVPIGQDMLKRGQCTCKVNKALPSPERTISK 180
SEQ ID NO: 44      VDGKQMKTAKTQREBQSGTYRVSRLVPIGQDMLKRGQCTCKVNKALPSPERTISK 179
SEQ ID NO: 45      VDGKQMKTAKTQREBQSGTYRVSRLVPIGQDMLKRGQCTCKVNKALPSPERTISK 179
SEQ ID NO: 46      VDGKQMKTAKTQREBQSGTYRVSRLVPIGQDMLKRGQCTCKVNKALPSPERTISK 179
SEQ ID NO: 47      VDGKQMKTAKTQREBQSGTYRVSRLVPIGQDMLKRGQCTCKVNKALPSPERTISK 179
SEQ ID NO: 48      VDGKQMKTAKTQREBQSGTYRVSRLVPIGQDMLKRGQCTCKVNKALPSPERTISK 179
*****
SEQ ID NO: 43      ARGQAQBPQSVTVLPSPREELSKNTVSLTCLIKDFPPDIDVWSGSGQGPESKQRTTP 240
SEQ ID NO: 44      ARGQAQBPQSVTVLPSPREELSKNTVSLTCLIKDFPPDIDVWSGSGQGPESKQRTTP 239
SEQ ID NO: 45      ARGQAQBPQSVTVLPSPREELSKNTVSLTCLIKDFPPDIDVWSGSGQGPESKQRTTP 239
SEQ ID NO: 46      ARGQAQBPQSVTVLPSPREELSKNTVSLTCLIKDFPPDIDVWSGSGQGPESKQRTTP 239
SEQ ID NO: 47      ARGQAQBPQSVTVLPSPREELSKNTVSLTCLIKDFPPDIDVWSGSGQGPESKQRTTP 239
SEQ ID NO: 48      ARGQAQBPQSVTVLPSPREELSKNTVSLTCLIKDFPPDIDVWSGSGQGPESKQRTTP 239
*****
SEQ ID NO: 43      QLDEDSGYFLYSKLSDVKSQWGGDTFCAMWHEALHNHYQELSHSGP 290
SEQ ID NO: 44      QLDEDSGYFLYSKLSDVKSQWGGDTFCAMWHEALHNHYQELSHSGP 289
SEQ ID NO: 45      QLDEDSGYFLYSKLSDVKSQWGGDTFCAMWHEALHNHYQELSHSGP 289
SEQ ID NO: 46      QLDEDSGYFLYSKLSDVKSQWGGDTFCAMWHEALHNHYQELSHSGP 289
SEQ ID NO: 47      QLDEDSGYFLYSKLSDVKSQWGGDTFCAMWHEALHNHYQELSHSGP 289
SEQ ID NO: 48      QLDEDSGYFLYSKLSDVKSQWGGDTFCAMWHEALHNHYQELSHSGP 289
*****

```

10

【 図 1 3 】

SEQ ID NO: 43	FVNHGHCGLSHVLEALVLCGRGFFYTDPTGGG-----GPRRGIVGGQCTTSCISLYQENY	55
SEQ ID NO: 49	CGG-GAAGGGGCGCKPAPRMLGGSVTFPPFKPKDILLIARTETVCVYVDDPDEP	115
SEQ ID NO: 50	FVNHGHCGLSHVLEALVLCGRGFFYTDPTGGGGGGGGGGIVGGQCTTSCISLYQENY	60
SEQ ID NO: 51	FVNHGHCGLSHVLEALVLCGRGFFYTDPTGGGG-----GGGGIVGGQCTTSCISLYQENY	56
SEQ ID NO: 52	FVNHGHCGLSHVLEALVLCGRGFFYTDPTGGGG-----GGGGIVGGQCTTSCISLYQENY	55
	*****	
SEQ ID NO: 43	CNMGGAGGGGGCGCKPAPRMLGGSVTFPPFKPKDILLIARTETVCVYVDDPDEP	115
SEQ ID NO: 49	CGG-GAAGGGGCGCKPAPRMLGGSVTFPPFKPKDILLIARTETVCVYVDDPDEP	115
SEQ ID NO: 50	CGG-GAAGGGGCGCKPAPRMLGGSVTFPPFKPKDILLIARTETVCVYVDDPDEP	115
SEQ ID NO: 51	CGG-GAAGGGGCGCKPAPRMLGGSVTFPPFKPKDILLIARTETVCVYVDDPDEP	115
SEQ ID NO: 52	CGG-GAAGGGGCGCKPAPRMLGGSVTFPPFKPKDILLIARTETVCVYVDDPDEP	114
	* *	
SEQ ID NO: 43	QISWVDKGQMGTAKTQPREGFGSOTRVSVSLVIGHQWLKGGQCTCKVKNKALSPST	175
SEQ ID NO: 49	QISWVDKGQMGTAKTQPREGFGSOTRVSVSLVIGHQWLKGGQCTCKVKNKALSPST	175
SEQ ID NO: 50	QISWVDKGQMGTAKTQPREGFGSOTRVSVSLVIGHQWLKGGQCTCKVKNKALSPST	179
SEQ ID NO: 51	QISWVDKGQMGTAKTQPREGFGSOTRVSVSLVIGHQWLKGGQCTCKVKNKALSPST	175
SEQ ID NO: 52	QISWVDKGQMGTAKTQPREGFGSOTRVSVSLVIGHQWLKGGQCTCKVKNKALSPST	174
	*****	
SEQ ID NO: 43	RTISKARGAQHGSVTVLPFSREELSNKNTSLCLIKDFPPFDIVWGGSNQGPQESKY	235
SEQ ID NO: 49	RTISKARGAQHGSVTVLPFSREELSNKNTSLCLIKDFPPFDIVWGGSNQGPQESKY	235
SEQ ID NO: 50	RTISKARGAQHGSVTVLPFSREELSNKNTSLCLIKDFPPFDIVWGGSNQGPQESKY	239
SEQ ID NO: 51	RTISKARGAQHGSVTVLPFSREELSNKNTSLCLIKDFPPFDIVWGGSNQGPQESKY	235
SEQ ID NO: 52	RTISKARGAQHGSVTVLPFSREELSNKNTSLCLIKDFPPFDIVWGGSNQGPQESKY	234
	*****	
SEQ ID NO: 43	RTTTPQLDESGFYLSKLKSVKSKRWGRDTCIVAMHEALHNHYTQSLSHSPG	290
SEQ ID NO: 49	RTTTPQLDESGFYLSKLKSVKSKRWGRDTCIVAMHEALHNHYTQSLSHSPG	292
SEQ ID NO: 50	RTTTPQLDESGFYLSKLKSVKSKRWGRDTCIVAMHEALHNHYTQSLSHSPG	294
SEQ ID NO: 51	RTTTPQLDESGFYLSKLKSVKSKRWGRDTCIVAMHEALHNHYTQSLSHSPG	290
SEQ ID NO: 52	RTTTPQLDESGFYLSKLKSVKSKRWGRDTCIVAMHEALHNHYTQSLSHSPG	289

【 図 1 4 】

SEQ ID NO: 43	FVNQHCGSHVEALALVCGERGFYTPDGGGPRGIVQGCSTISCSLYENLYCNGGG	60
SEQ ID NO: 53	FVNQHCGSHVEALALVCGERGFYTPDGGGPRGIVQGCSTISCSLYENLYCNGGG	60
SEQ ID NO: 48	FVNQHCGSHVEALALVCGERGFYTPDGGGPRGIVQGCSTISCSLYENLYCNGGG	60
*****		
SEQ ID NO: 43	GA-----GGGGCKPKCAEMLGGSVIFPPKPKDTLLIARFETVTCVVDLD	109
SEQ ID NO: 53	GGGGGGGGGGGGGGGGGGCKPKCAEMLGGSVIFPPKPKDTLLIARFETVTCVVDLD	120
SEQ ID NO: 48	A-----GGGGCKPKCAEMLGGSVIFPPKPKDTLLIARFETVTCVVDLD	108
*****		
SEQ ID NO: 43	PDDEPVEISFNVGDKGMQITAKTPQREBQSGTTRYVSVLPIGHQDWLKGQKTCVKYNA	169
SEQ ID NO: 53	PDDEPVEISFNVGDKGMQITAKTPQREBQSGTTRYVSVLPIGHQDWLKGQKTCVKYNA	180
SEQ ID NO: 48	PDDEPVEISFNVGDKGMQITAKTPQREBQSGTTRYVSVLPIGHQDWLKGQKTCVKYNA	168
*****		
SEQ ID NO: 43	LPSPTERTISKARGAQHGVSIVLPSPREELSKNVTSLCLCKDFPPDIDVWGNSGQG	229
SEQ ID NO: 53	LPSPTERTISKARGAQHGVSIVLPSPREELSKNVTSLCLCKDFPPDIDVWGNSGQG	240
SEQ ID NO: 48	LPSPTERTISKARGAQHGVSIVLPSPREELSKNVTSLCLCKDFPPDIDVWGNSGQG	228
*****		
SEQ ID NO: 43	EPESKYRTTPFLQDDEGSGFLYSKSVDSKRWQRGDTFICAVMGEALNHHTYQBSLSHSP	289
SEQ ID NO: 53	EPESKYRTTPFLQDDEGSGFLYSKSVDSKRWQRGDTFICAVMGEALNHHTYQBSLSHSP	300
SEQ ID NO: 48	EPESKYRTTPFLQDDEGSGFLYSKSVDSKRWQRGDTFICAVMGEALNHHTYQBSLSHSP	288
*****		
SEQ ID NO: 43	G 290	
SEQ ID NO: 53	G 301	
SEQ ID NO: 48	G 289	

20

30

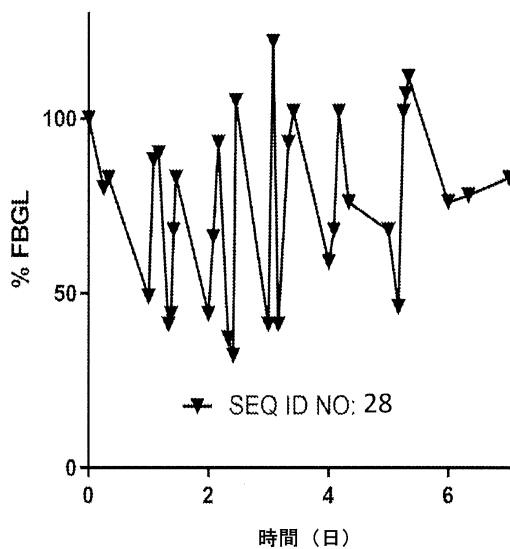
【 図 1 5 】

SEQ ID NO: 43	FVNHGJCSHLVEALALVGERGFYTPDGGGGG-PRGIVGEQCTICSJLYENLYCG-	59
SEQ ID NO: 51	FVNHGJCSHLVEALALVGERGFYTPDGGGGG-PRGIVGEQCTICSJLYENLYCG-	59
SEQ ID NO: 54	FVNHGJCSHLVEALALVGERGFYTPG-GGGGGGGIVGEQCTICSJLYENLYCG-	58
SEQ ID NO: 52	FVNHGJCSHLVEALALVGERGFYTPG-GGGGGGGIVGEQCTICSJLYENLYCG-	58
*****		
SEQ ID NO: 43	GAGGGGGGCPKCAPAMELGGVSVIPFPKPKDTLLIARTEPVCVVLDLDEPEVQISN	119
SEQ ID NO: 51	GAGGGGGGCPKCAPAMELGGVSVIPFPKPKDTLLIARTEPVCVVLDLDEPEVQISN	119
SEQ ID NO: 54	GAGGGGGGCPKCAPAMELGGVSVIPFPKPKDTLLIARTEPVCVVLDLDEPEVQISN	118
SEQ ID NO: 52	GAGGGGGGCPKCAPAMELGGVSVIPFPKPKDTLLIARTEPVCVVLDLDEPEVQISN	118
*****		
SEQ ID NO: 43	FVDGQMKTAKTQREBQSGYRNVSVLP LGHQWIKGKQCTCKNNKALSP IERTIS	179
SEQ ID NO: 51	FVDGQMKTAKTQREBQSGYRNVSVLP LGHQWIKGKQCTCKNNKALSP IERTIS	179
SEQ ID NO: 54	FVDGQMKTAKTQREBQSGYRNVSVLP LGHQWIKGKQCTCKNNKALSP IERTIS	178
SEQ ID NO: 52	FVDGQMKTAKTQREBQSGYRNVSVLP LGHQWIKGKQCTCKNNKALSP IERTIS	178
*****		
SEQ ID NO: 43	KARGAQBFQSVTVLPPSRELSKNTVSLTCLIKFFPPDIDVEMQSNQKPBKSKRTTP	239
SEQ ID NO: 51	KARGAQBFQSVTVLPPSRELSKNTVSLTCLIKFFPPDIDVEMQSNQKPBKSKRTTP	239
SEQ ID NO: 54	KARGAQBFQSVTVLPPSRELSKNTVSLTCLIKFFPPDIDVEMQSNQKPBKSKRTTP	238
SEQ ID NO: 52	KARGAQBFQSVTVLPPSRELSKNTVSLTCLIKFFPPDIDVEMQSNQKPBKSKRTTP	238
*****		
SEQ ID NO: 43	PQLDEDSGYFLYSKSDVSKRQWRGDTICAMVEALHNNHTQESLSHSG	290
SEQ ID NO: 51	PQLDEDSGYFLYSKSDVSKRQWRGDTICAMVEALHNNHTQESLSHSG	290
SEQ ID NO: 54	PQLDEDSGYFLYSKSDVSKRQWRGDTICAMVEALHNNHTQESLSHSG	289
SEQ ID NO: 52	PQLDEDSGYFLYSKSDVSKRQWRGDTICAMVEALHNNHTQESLSHSG	289

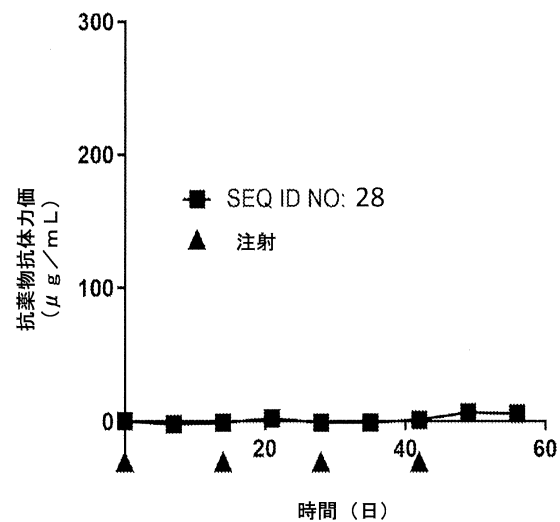
【 図 1 6 】

SEQ ID NO: 43	FVNGHLCGSHLEALIVCGERFFFTDPTGG-GRAGIVQCQTCISCLSYQLENYCGG	59
SEQ ID NO: 55	FVNGHLCGSHLEALIVCGERFFFTDPTGG-GRAGIVQCQTCISCLSYQLENYCGG	59
SEQ ID NO: 56	FVNGHLCGSHLEALIVCGERHYGGGGGGGGGGIVQCQTCISCLSYQLENYCGG	60
SEQ ID NO: 28	FVNGHLCGSHLEALIVCGERHYGGGGGGGGGGIVQCQTCISCLSYQLENYCGG	60
SEQ ID NO: 26	FVNGHLCGSHLEALIVCGERHYGGGGGGGGGGIVQCQTCISCLSYQLENYCGG	59
SEQ ID NO: 57	FVNGHLCGSHLEALIVCGERFFYGGGGGGGGGGIVQCQTCISCLSYQLENYCGG	59
	*****	
SEQ ID NO: 43	GC-----AGGGGCKPKCAPMLGGSVFFPPKPKDTLLIARTEVTCVVD	107
SEQ ID NO: 55	GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGCKPKCAPMLGGSVFFPPKPKDTLLIARTEVTCVVD	109
SEQ ID NO: 56	GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGCKPKCAPMLGGSVFFPPKPKDTLLIARTEVTCVVD	110
SEQ ID NO: 28	GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGCKPKCAPMLGGSVFFPPKPKDTLLIARTEVTCVVD	112
SEQ ID NO: 26	GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGCKPKCAPMLGGSVFFPPKPKDTLLIARTEVTCVVD	119
SEQ ID NO: 57	GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGCKPKCAPMLGGSVFFPPKPKDTLLIARTEVTCVVD	119
	*****	
SEQ ID NO: 43	LDPEDEVGISFNVGKQMTAKTQREBQGTGYRVVSLVIGHQWLKQKPTCKVNN	167
SEQ ID NO: 55	LDPEDEVGISFNVGKQMTAKTQREBQGTGYRVVSLVIGHQWLKQKPTCKVNN	168
SEQ ID NO: 56	LDPEDEVGISFNVGKQMTAKTQREBQGTGYRVVSLVIGHQWLKQKPTCKVNN	170
SEQ ID NO: 28	LDPEDEVGISFNVGKQMTAKTQREBQGTGYRVVSLVIGHQWLKQKPTCKVNN	170
SEQ ID NO: 26	LDPEDEVGISFNVGKQMTAKTQREBQGTGYRVVSLVIGHQWLKQKPTCKVNN	180
SEQ ID NO: 57	LDPEDEVGISFNVGKQMTAKTQREBQGTGYRVVSLVIGHQWLKQKPTCKVNN	179
	*****	
SEQ ID NO: 43	KALPSPERTISKARQAQGSVTVLPPRELEKSNVSLTCLCKDFFPPDIVMGSG	227
SEQ ID NO: 55	KALPSPERTISKARQAQGSVTVLPPRELEKSNVSLTCLCKDFFPPDIVMGSG	228
SEQ ID NO: 56	KALPSPERTISKARQAQGSVTVLPPRELEKSNVSLTCLCKDFFPPDIVMGSG	230
SEQ ID NO: 28	KALPSPERTISKARQAQGSVTVLPPRELEKSNVSLTCLCKDFFPPDIVMGSG	230
SEQ ID NO: 26	KALPSPERTISKARQAQGSVTVLPPRELEKSNVSLTCLCKDFFPPDIVMGSG	240
SEQ ID NO: 57	KALPSPERTISKARQAQGSVTVLPPRELEKSNVSLTCLCKDFFPPDIVMGSG	239
	*****	
SEQ ID NO: 43	QQEPEKYKTTTPPLQDEGVSFLYSKLSVDKSRWQRQGTTCVAMHLEAHNYTQESLH	287
SEQ ID NO: 55	QQEPEKYKTTTPPLQDEGVSFLYSKLSVDKSRWQRQGTTCVAMHLEAHNYTQESLH	287
SEQ ID NO: 56	QQEPEKYKTTTPPLQDEGVSFLYSKLSVDKSRWQRQGTTCVAMHLEAHNYTQESLH	300
SEQ ID NO: 28	QQEPEKYKTTTPPLQDEGVSFLYSKLSVDKSRWQRQGTTCVAMHLEAHNYTQESLH	300
SEQ ID NO: 26	QQEPEKYKTTTPPLQDEGVSFLYSKLSVDKSRWQRQGTTCVAMHLEAHNYTQESLH	299
SEQ ID NO: 57	QQEPEKYKTTTPPLQDEGVSFLYSKLSVDKSRWQRQGTTCVAMHLEAHNYTQESLH	299
	*****	
SEQ ID NO: 43	SPG 290	
SEQ ID NO: 55	SPG 302	
SEQ ID NO: 56	SPG 302	
SEQ ID NO: 28	SPG 302	
SEQ ID NO: 26	SPG 302	
SEQ ID NO: 57	SPG 302	

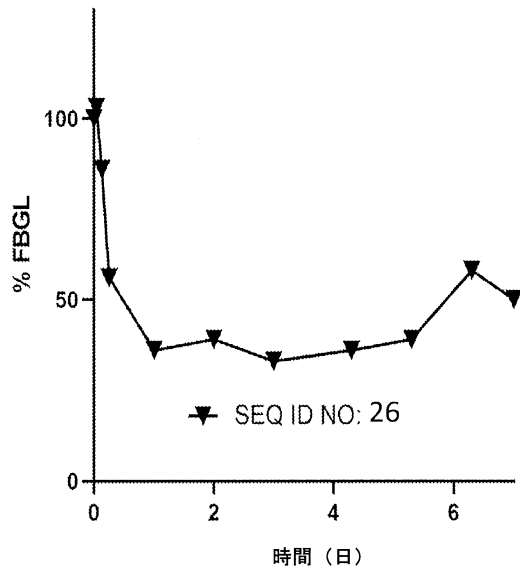
## 【 図 1 7 】



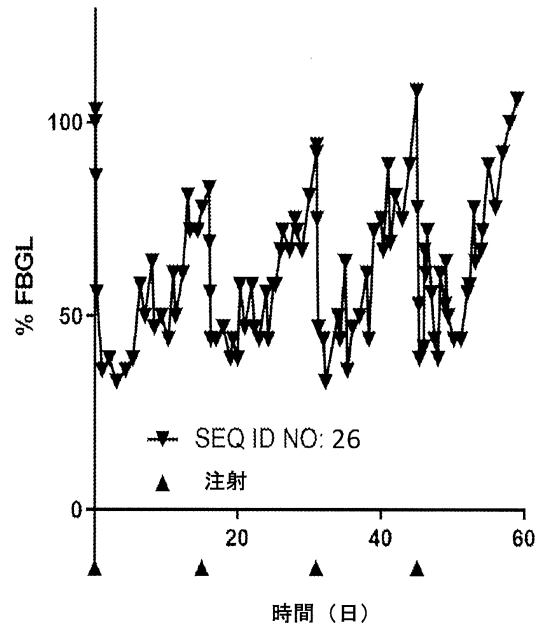
【 図 1 8 】



【図 19】



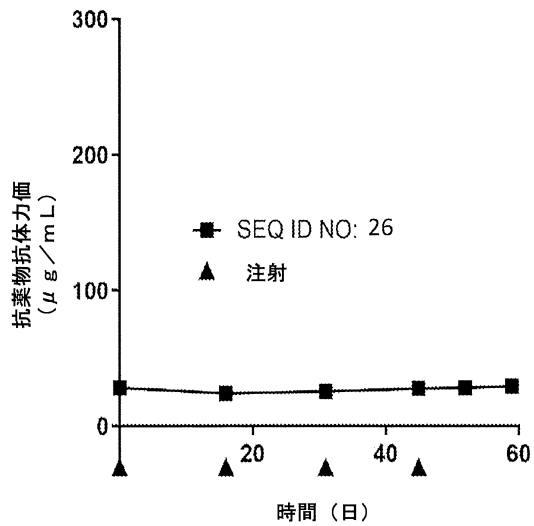
【図 20】



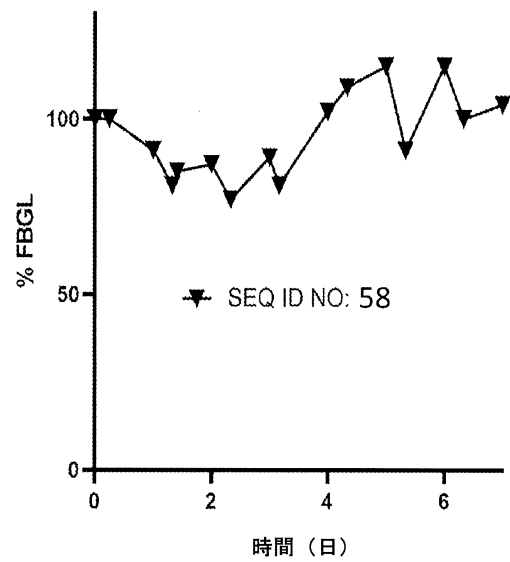
10

20

【図 21】



【図 22】

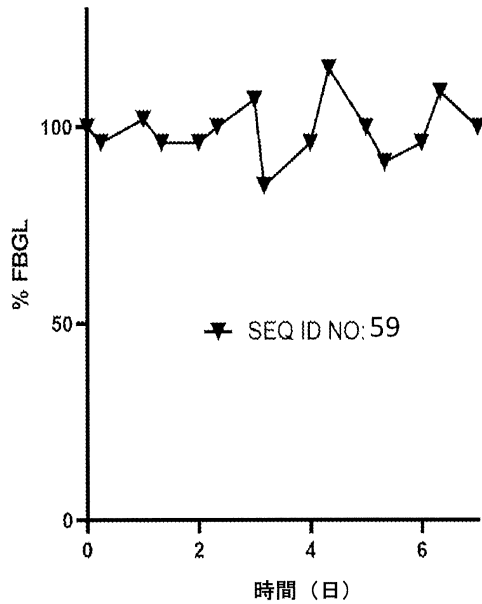


30

40

50

【図 2 3】



【図 2 4】

```
SEQ ID NO: 61 FVNQRLCGSHLVEALELVCGERGPHYGGGGGGGGGIVEQCTSTCSLDQLENYCGGG 60
SEQ ID NO: 62 FVNQRLCGSHLVEALELVCGERGPHYGGGGGGGGGIVEQCTSTCSLDQLENYCGGG 60
*****

SEQ ID NO: 61 GGGGGGGGGGGGGGGGGGGDCPKCPAPMLGGPSVFIFFPKPKDTLLIARTPEVTCVVVAL 120
SEQ ID NO: 62 GGGGGGGGGGGGGGGGGGGDCPKCPAPMLGGPSVFIFFPKPKDTLLIARTPEVTCVVVDL 120
*****

SEQ ID NO: 61 DPEDFEVQISWFDGKQMGTAKTQPREBQFSQTYRVVSVLPIGHQDLKGGQFTCKVNNK 180
SEQ ID NO: 62 DPEDFEVQISWFDGKQMGTAKTQPREBQFSQTYRVVSVLPIGHQDLKGGQFTCKVNNK 180
*****

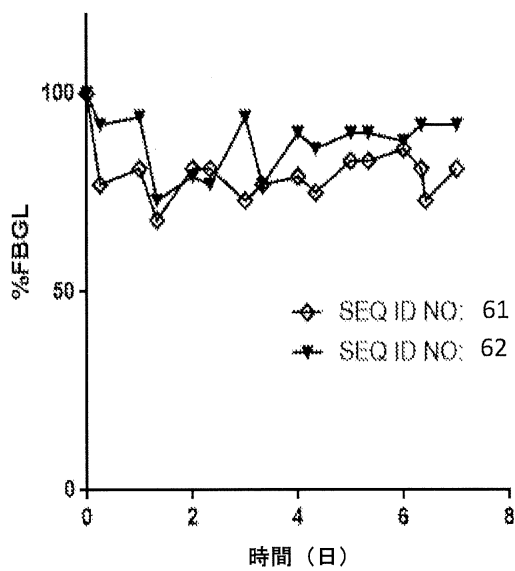
SEQ ID NO: 61 ALPSPERTISKARGQAHQPSVYVLPSPREELSKNTVSLTCLIKDFFPPDIDVWQSNQ 240
SEQ ID NO: 62 ALPSPERTISKARGQAHQPSVYVLPSPREELSKNTVSLTCLIKDFFPPDIDVWQSNQ 240
*****

SEQ ID NO: 61 QEPESKYRTTPPQDDEGGSYFLYSKLSVQKSNWQAGDTFICAVMHEALNNHTQESLSHS 300
SEQ ID NO: 62 QEPESKYRTTPPQDDEGGSYFLYSKLSVQKSNWQAGDTFICAVMHEALNNHTQESLSHS 300
*****

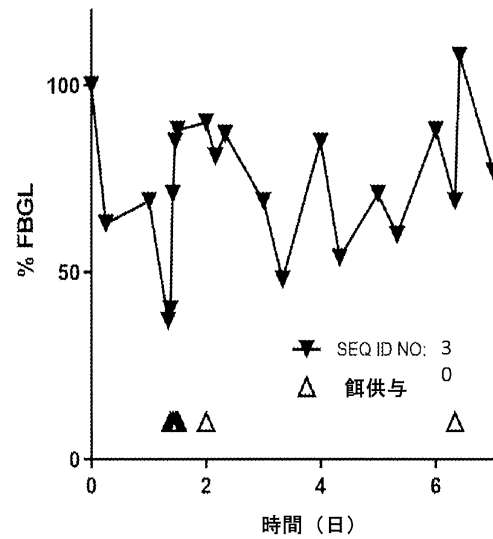
SEQ ID NO: 61 PG 302
SEQ ID NO: 62 PG 302
**
```

10

【図 2 5】



【図 2 6】



20

30

40

50

【圖 28】

```

SEQ ID NO: 75      LSPG 299
SEQ ID NO: 76      LSPG 304
SEQ ID NO: 91      LSPG 304
SEQ ID NO: 92      LSPG 304
SEQ ID NO: 93      LSPG 304
SEQ ID NO: 94      LSPG 304
SEQ ID NO: 95      LSPG 304
*****

```

10

20

【 図 3 0 】

SEQ ID NO: 87	QKSLSLSPG	304
SEQ ID NO: 96	QKSLSLSPG	309
SEQ ID NO: 78	QKSLSLSPG	304
SEQ ID NO: 97	QKSLSLSPG	292
SEQ ID NO: 89	QKSLSLSPG	292
SEQ ID NO: 98	QKSLSLSPG	283

30

40

【図 3 1】

SEQ ID NO: 79 atggaatggagctgggtctttctctctctctctcgtcagtaacgactggtgtccactccttc  
SEQ ID NO: 78 M E W S W V F L F F L S V T T G V H S F  
gtgaaccagcacctgtgcggctccacactggtggaagctctggcaactcgtgtgcggcgag  
V N Q H L C G S H L V E A L A L V C G E  
cggggcttccactacgggggtggcgaggaggttctggtggcgcgaggcatcgtggaa  
R G F H Y G G G G G G S G G G G G I V E  
cagtgctgcacctccacactgctccctggaccagctggaaaactactcggtggcgagggt  
Q C C T S T C S L D Q L E N Y C G G G G  
ggtcaaggaggcggtggacagggtggaggtggcgaggaggagcgggggagacaaaact  
G Q G G G G Q G G G G G Q G G G G G D K T  
cacacatgccacactgcccagcacctgaactcctggggggacggtcagttctctcttc  
H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F  
cccccaaaacccaaggacacccctcatgatctccggacccctgaggtcacatgcgtggtg  
P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V  
gtggacgtgagccacgaagacccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcggtggag  
V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E  
gtgcataatgccaaagcaaaagccgggaggagcagtagcacagcagcagtcacgtgtggtc  
V H N A K T K P R E E Q Y S S T Y R V V  
agcgtcctcacgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtagcaagtgcaaggtc  
S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V  
tccaaacaaagccctccagcccccatcgagaaaacatctccaaagccaaaggcgagccc  
S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P  
cgagaaccacaggtgtacacccctgcccccatcccggtgagctgacccaagaaacaggtc  
R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V  
agcctgacctgctggtcaaggctctctatccacgcgacatcgccgtggagtgaggagagc  
S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S  
aatgggcagccgggagaacaaactacaagaccacgctcccgctgctggaactccgacggctcc  
N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S  
ttcttctctacagcaagctcacgtggacaagagcaggtggcagcaggggaaagctcttc  
F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F  
tcatgtccgtgatgcagtgaggtctcgacaaacacacacagcagaagagcctctccctg  
S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L  
tctccgggttag  
S P G -

【図 3 3】

SEQ ID NO: 83 atggaatggagctgggtctttctctctctctcgtcagtaacgactggtgtccactccttc  
SEQ ID NO: 82 M E W S W V F L F F L S V T T G V H S F  
gtgaaccagcacctgtgcggctccacactggtggaagctctggcaactcgtgtgcggcgag  
V N Q H L C G S H L V E A L A L V C G E  
cggggcttccactacgggggtggcgaggaggttctggtggcgcgaggcatcgtggaa  
R G F H Y G G G G G G S G G G G G I V E  
cagtgctgcacctccacactgctccctggaccagctggaaaactactcggtggcgagggt  
Q C C T S T C S L D Q L E N Y C G G G G  
ggtcaaggaggcggtggacagggtggaggtggcgaggaggagcgggggagacaaaact  
G Q G G G G Q G G G G G Q G G G G G D K T  
cacacatgccacactgcccagcacctgaactcctggggggacggtcagttctctcttc  
H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F  
cccccaaaacccaaggacacccctcatgatctccggacccctgaggtcacatgcgtggtg  
P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V  
gtggacgtgagccacgaagacccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcggtggag  
V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E  
gtgcataatgccaaagcaaaagccgggaggagcagtagcacagcagcagtcacgtgtggtc  
V H N A K T K P R E E Q Y A S T Y R V V  
agcgtcctcacgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtagcaagtgcaaggtc  
S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V  
tccaaacaaagccctccagcccccatcgagaaaacatctccaaagccaaaggcgagccc  
S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P  
cgagaaccacaggtgtacacccctgcccccatcccggtgagctgacccaagaaacaggtc  
R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V  
agcctgacctgctggtcaaggctctctatccacgcgacatcgccgtggagtgaggagagc  
S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S  
aatgggcagccgggagaacaaactacaagaccacgctcccgctgctggaactccgacggctcc  
N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S  
ttcttctctacagcaagctcacgtggacaagagcaggtggcagcaggggaaagctcttc  
F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F  
tcatgtccgtgatgcagtgaggtctcgacaaacacacacagcagaagagcctctccctg  
S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L  
tctccgggttag  
S P G -

【図 3 2】

SEQ ID NO: 81 atggaatggagctgggtctttctctctctctcgtcagtaacgactggtgtccactccttc  
SEQ ID NO: 80 M E W S W V F L F F L S V T T G V H S F  
gtgaaccagcacctgtgcggctccacactggtggaagctctggcaactcgtgtgcggcgag  
V N Q H L C G S H L V E A L A L V C G E  
cggggcttccactacgggggtggcgaggaggttctggtggcgcgaggcatcgtggaa  
R G F H Y G G G G G G S G G G G G I V E  
cagtgctgcacctccacactgctccctggaccagctggaaaactactcggtggcgagggt  
Q C C T S T C S L D Q L E N Y C G G G G  
ggtcaaggaggcggtggacagggtggaggtggcgaggaggagcgggggagacaaaact  
G Q G G G G Q G G G G G Q G G G G G D K T  
cacacatgccacactgcccagcacctgaactcctggggggacggtcagttctctcttc  
H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F  
cccccaaaacccaaggacacccctcatgatctccggacccctgaggtcacatgcgtggtg  
P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V  
gtggacgtgagccacgaagacccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcggtggag  
V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E  
gtgcataatgccaaagcaaaagccgggaggagcagtagcacagcagcagtcacgtgtggtc  
V H N A K T K P R E E Q Y D S T Y R V V  
agcgtcctcacgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtagcaagtgcaaggtc  
S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V  
tccaaacaaagccctccagcccccatcgagaaaacatctccaaagccaaaggcgagccc  
S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P  
cgagaaccacaggtgtacacccctgcccccatcccggtgagctgacccaagaaacaggtc  
R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V  
agcctgacctgctggtcaaggctctctatccacgcgacatcgccgtggagtgaggagagc  
S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S  
aatgggcagccgggagaacaaactacaagaccacgctcccgctgctggaactccgacggctcc  
N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S  
ttcttctctacagcaagctcacgtggacaagagcaggtggcagcaggggaaagctcttc  
F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F  
tcatgtccgtgatgcagtgaggtctcgacaaacacacacagcagaagagcctctccctg  
S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L  
tctccgggttag  
S P G -

【図 3 4】

SEQ ID NO: 85 atggaatggagctgggtctttctctctctctcgtcagtaacgactggtgtccactccttc  
SEQ ID NO: 84 M E W S W V F L F F L S V T T G V H S F  
gtgaaccagcacctgtgcggctccacactggtggaagctctggcaactcgtgtgcggcgag  
V N Q H L C G S H L V E A L A L V C G E  
cggggcttccactacgggggtggcgaggaggttctggtggcgcgaggcatcgtggaa  
R G F H Y G G G G G G S G G G G G I V E  
cagtgctgcacctccacactgctccctggaccagctggaaaactactcggtggcgagggt  
Q C C T S T C S L D Q L E N Y C G G G G  
ggtcaaggaggcggtggacagggtggaggtggcgaggaggagcgggggagacaaaact  
G Q G G G G Q G G G G G Q G G G G G D K T  
cacacatgccacactgcccagcacctgaactcctggggggacggtcagttctctcttc  
H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F  
cccccaaaacccaaggacacccctcatgatctccggacccctgaggtcacatgcgtggtg  
P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V  
gtggacgtgagccacgaagacccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcggtggag  
V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E  
gtgcataatgccaaagcaaaagccgggaggagcagtagcagaagcagtagcagtggtc  
V H N A K T K P R E E Q Y R S T Y R V V  
agcgtcctcacgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtagcaagtgcaaggtc  
S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V  
tccaaacaaagccctccagcccccatcgagaaaacatctccaaagccaaaggcgagccc  
S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P  
cgagaaccacaggtgtacacccctgcccccatcccggtgagctgacccaagaaacaggtc  
R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V  
agcctgacctgctggtcaaggctctctatccacgcgacatcgccgtggagtgaggagagc  
S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S  
aatgggcagccgggagaacaaactacaagaccacgctcccgctgctggaactccgacggctcc  
N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S  
ttcttctctacagcaagctcacgtggacaagagcaggtggcagcaggggaaagctcttc  
F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F  
tcatgtccgtgatgcagtgaggtctcgacaaacacacacagcagaagagcctctccctg  
S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L  
tctccgggttag  
S P G -

10

20

30

40

50

## 【図 3 5】

SEQ ID NO: 88  
SEQ ID NO: 87  
atggaatggagctgggtctttctcttctctctgtcagtaacgactgggtccactccttc  
M E W S W V F L F F L S V T T G V H S F  
gtgaaccagcacctgtgcggtctccacctgggtggaagctctggcaactcgtgtgcgcgag  
V N Q H L C G S H L V E A L A L V C G E  
cggggtctccactacgggggtggcgaggaggttctgggtgcgcgaggagcatcgtggaa  
R G F H Y G G G G G S G G G G G I V E  
cagtgctgcacctccacctgctccctggaccagctggaaaactactgcggtggcgagggt  
Q C C T S T C S L D Q L E N Y C G G G G  
ggtgcaggaggcggtggagccggtggagggtggggctggaggaggcgggggagacaaaact  
G A G G G G G A G G G G A G G G G G D K T  
cacacatgccaccggtgccacgacactgaactcctgggggacggtcagttctctcttc  
H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F  
ccccaaaaacccaaggacacccctcatgatctcccggaacccctgaggtcacatgcgtgggtg  
P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V  
gtggacgtgagccgaagacccctgaggtcaagttcaactggtagctggacggcggtggag  
V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E  
gtgcataatgccaaagcaaacgcgggagggagcagtagacagcagcagtagcaggtggttc  
V H N A K T K P R E E Q Y S S T Y R V V  
agcgtcctcagcgtcctgcacaggagactgggtgaatggcaaggagtagcaagtgcaaggtc  
S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V  
tccaaacaaagccctccacgccccatcgagaaaacacatctccaaagccaaaggcagccc  
S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P  
cgagaacccagaggtgtacacccctgcccccaccccggtgagctgacccaagaaacaggtc  
R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V  
agcctgacctgctggtcaaaaggctctcatccagcgacatcgccgtggagtgaggagagc  
S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S  
aatggcgagccggagaaacactacaagccacgctcccggtgctggactccgacgggtcc  
N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S  
ttctctctctacagcaagctcacggtggacaagacaggtggcagcaggggaaagctcttc  
F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F  
tcatgctccgtgatgcatgaggtctcgacaaacactacacgcaagagagcctctccctg  
S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L  
tctccgggttag  
S P G -

## 【図 3 6】

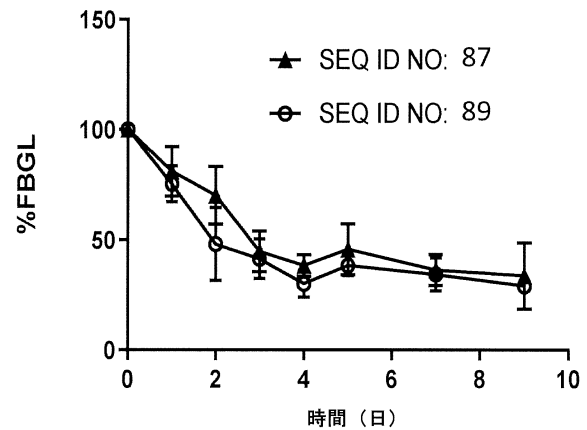
SEQ ID NO: 90  
SEQ ID NO: 89  
atggaatggagctgggtctttctcttctctctgtcagtaacgactgggtccactccttc  
M E W S W V F L F F L S V T T G V H S F  
gtgaaccagcacctgtgcggtctccacctgggtggaagctctggcaactcgtgtgcgcgag  
V N Q H L C G S H L V E A L A L V C G E  
cggggtctccactacgggggtggcgaggaggttctgggtgcgcgaggagcatcgtggaa  
R G F H Y G G G G G S G G G G G I V E  
cagtgctgcacctccacctgctccctggaccagctggaaaactactgcggtggcgagggt  
Q C C T S T C S L D Q L E N Y C G G G G  
gcccggaggcgggggagacaaaactcacacatgccacccgtgccacgacccctgaactcctg  
A G G G G D K T H T C P P C P A P E L L  
gggggacgctcagttctctctctcccccacaaacccaaggacacccctcatgatctcccg  
G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R  
accctgaggtcacatgcgtgggtggtagctgagccacgaagacccctgaggtcaagttc  
T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F  
aactggtagctggacggcggtggaggtgcataatgccaaagcaaacgcgggagggagcag  
N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q  
tacagcagcagtagcaggtggtgtagcgtcctcagcgtcctgcacccagtagcgtggaat  
Y S S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N  
ggcaaggagtagcaagtgcaaggtctccaaacaaagccctccacgccccatcgagaaaacc  
G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T  
atctccaaagccaaaggcagcccgagaaacacaggtgtacacccctgcccccaccccg  
I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R  
gatgagctgaccaaagaaacaggtcagcctgacctgctggtcaaaaggctctcatccagc  
D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S  
gacatcgccgtggagtgaggagcaatggcgagccggagaaacactacaagacacagcct  
D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P  
ccggtgctggactccgacgggtcctctctctctacagcaagctcaccgtggacaagagc  
P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S  
aggtggcagcaggggagcgtctctcatgctccgtgatgcatgaggtctcgacaaacac  
R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H  
tacacgcaagagcctctccctgctcctccgggttag  
Y T Q K S L S L S P G -

10

## 【図 3 7】

SEQ ID NO: 100  
SEQ ID NO: 86  
atggaatggagctgggtctttctcttctctctgtcagtaacgactgggtccactccttc  
M E W S W V F L F F L S V T T G V H S F  
gtgaaccagcacctgtgcggtctccacctgggtggaagctctggcaactcgtgtgcgcgag  
V N Q H L C G S H L V E A L A L V C G E  
cggggtctccactacgggggtggcgaggaggttctgggtgcgcgaggagcatcgtggaa  
R G F H Y G G G G G S G G G G G I V E  
cagtgctgcacctccacctgctccctggaccagctggaaaactactgcggtggcgagggt  
Q C C T S T C S L D Q L E N Y C G G G G  
ggtcaaggaggcggtggacaggtggaggtggcgaggaggaaggcgggggagacaaaact  
G Q G G G G Q G G G G G Q G G G G G D K T  
cacacatgccaccggtgccacgacactgaactcctgggggacggtcagttctctcttc  
H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F  
ccccaaaaacccaaggacacccctcatgatctcccggaacccctgaggtcacatgcgtgggtg  
P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V  
gtggacgtgagccgaagacccctgaggtcaagttcaactggtagctggacggcggtggag  
V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E  
gtgcataatgccaaagcaaacgcgggagggagcagtagcaaaagcagtagcaggtggttc  
V H N A K T K P R E E Q Y Q S T Y R V V  
agcgtcctcagcgtcctgcacccagtaggtggtgaatggcaaggagtagcaagtgcaaggtc  
S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V  
tccaaacaaagccctccacgccccatcgagaaaacacatctccaaagccaaaggcagccc  
S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P  
cgagaacccagaggtgtacacccctgcccccaccccggtgagctgacccaagaaacaggtc  
R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V  
agcctgacctgctggtcaaaaggctctcatccagcgacatcgccgtggagtgaggagagc  
S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S  
aatggcgagccggagaaacactacaagacccacgctcccggtgctggactccgacgggtcc  
N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S  
ttctctctctacagcaagctcacggtggacaagacaggtggcagcaggggaaagctcttc  
F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F  
tcatgctccgtgatgcatgaggtctcgacaaacactacacgcaagagagcctctccctg  
S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L  
tctccgggttag  
S P G -

## 【図 3 8】



20

30

## 【配列表】

0007405486000001.app

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

## F I

C 0 7 K	14/62 (2006.01)	C 0 7 K	14/62
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
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
A 6 1 P	3/10 (2006.01)	A 6 1 P	3/10
A 6 1 K	38/16 (2006.01)	A 6 1 K	38/16
A 6 1 K	38/28 (2006.01)	A 6 1 K	38/28
A 6 1 K	47/65 (2017.01)	A 6 1 K	47/65

## (33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(74)代理人 100137497

弁理士 大森 未知子

(74)代理人 100207907

弁理士 赤羽 桃子

(74)代理人 100217294

弁理士 内山 尚和

(72)発明者 トーマス、エム・ランカスター

アメリカ合衆国マサチューセッツ州、ウェナム、ラーチ、ロウ、166

(72)発明者 トッド、シー・ザイオン

アメリカ合衆国マサチューセッツ州、マープルヘッド、ナネッパシェメット、ストリート、72

審査官 鳥居 敬司

(56)参考文献 国際公開第2018/107117(WO, A1)

特表2015-504679(JP, A)

米国特許出願公開第2018/0340031(US, A1)

特表2018-515088(JP, A)

特表2016-510003(JP, A)

PROTEIN &amp; CELL, 2017, Vol.9, No.1, pp.63-73

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 15/00 - 15/90

C 0 7 K 16/00 - 16/46

C 0 7 K 14/00 - 14/825

C 0 7 K 19/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

Caplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

UniProt/GeneSeq