(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2018-500291
(P2018-500291A)
(43)公表日　平成30年1月11日(2018.1.11)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
A61K 47/64	***(2017.01)***	A61K	47/64	4C048
A61K 38/16	***(2006.01)***	A61K	38/16	4C050
A61K 9/08	***(2006.01)***	A61K	9/08	4C057
A61K 45/00	***(2006.01)***	A61K	45/00	4C072
A61K 38/28	***(2006.01)***	A61K	38/28	4C076

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 61 頁）　最終頁に続く

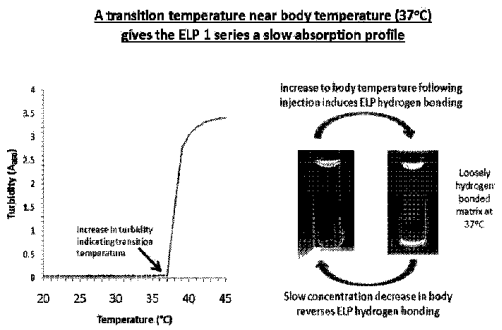
(21)出願番号　特願2017-525911 (P2017-525911)
(86)(22)出願日　平成27年11月20日 (2015.11.20)
(85)翻訳文提出日　平成29年6月26日 (2017.6.26)
(86)国際出願番号　PCT/US2015/061955
(87)国際公開番号　WO2016/081884
(87)国際公開日　平成28年5月26日 (2016.5.26)
(31)優先権主張番号　62/082,945
(32)優先日　平成26年11月21日 (2014.11.21)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　62/098,624
(32)優先日　平成26年12月31日 (2014.12.31)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　509066019
フェーズバイオ　ファーマシューティカルズ，インコーポレイテッド
アメリカ合衆国，ペンシルベニア州　１９３５５，マルベルン，ワン　グレート　バレー　パークウェイ，スイート　３０
(74)代理人　100079108
弁理士　稲葉　良幸
(74)代理人　100109346
弁理士　大貫　敏史
(74)代理人　100117189
弁理士　江口　昭彦
(74)代理人　100134120
弁理士　内藤　和彦

最終頁に続く

(54)【発明の名称】制御放出および持続的放出のためのＥＬＰ融合タンパク質

(57)【要約】
本開示は、持続的放出のための医薬製剤ならびに持続的放出および長い半減期の製剤の組合せによる治療レジメンを送達するための方法を提供する。本開示は、ペプチドおよび小分子薬物のために改善された薬物動態を提供する。



【特許請求の範囲】
【請求項１】
全身投与のための治療剤であって、活性薬剤および配列番号１～１３のいずれか１つから選択される少なくとも９０個のエラスチン様ペプチド（ＥＬＰ）構造単位を含み、Ｘは Ｖａｌ、ＧｌｙおよびＡｌａから選択され、ＥＬＰは２６℃～３７℃の間の転移温度を示す治療剤、ならびに
１つまたは複数の薬学的に許容される賦形剤
を含む持続的放出医薬製剤。
【請求項２】
投与すると注射部位からの遅い吸収を提供する、請求項１に記載の医薬製剤。
【請求項３】
可逆的マトリックスを形成するアミノ酸配列の非存在下での活性薬剤のＰＫプロファイルと比較して、投与すると平らなＰＫプロファイルを提供する、請求項２に記載の医薬製剤。
【請求項４】
前記ＰＫプロファイルが浅いＣｍａｘおよび／または低いピーク対トラフ比および／または長いＴｍａｘを有する、請求項３に記載の医薬製剤。
【請求項５】
体温での可逆的マトリックスの形成がタンパク質濃度の低下に従って反転する、請求項１～４のいずれか一項に記載の医薬製剤。
【請求項６】
前記ＥＬＰが［ＶＰＧＸＧ］$_{144}$を含み、式中、各ＸはＶ、ＧおよびＡから選択され、Ｖ：Ｇ：Ａの比は
ａ）５：３：２；
ｂ）７：２：０；
ｃ）７：０：２；
ｄ）６：０：３；および
ｅ）５：２：２
からなる群から選択される、請求項１～５のいずれか一項に記載の医薬製剤。
【請求項７】
前記ＥＬＰが［ＸＰＧＶＧ］$_{144}$を含み、式中、各ＸはＶ、ＧおよびＡから選択され、Ｖ：Ｇ：Ａの比は約５：０：４であってよい、請求項１～６のいずれか一項に記載の医薬製剤。
【請求項８】
対象がヒトである、請求項１～７のいずれか一項に記載の医薬製剤。
【請求項９】
対象が非ヒト哺乳動物である、請求項１～７のいずれか一項に記載の医薬製剤。
【請求項１０】
前記活性薬剤がタンパク質である、請求項１～９のいずれか一項に記載の医薬製剤。
【請求項１１】
前記治療剤が、前記タンパク質活性薬剤とＥＬＰの間の組換え融合タンパク質である、請求項１０に記載の医薬製剤。
【請求項１２】
前記タンパク質活性薬剤が約３０秒～約１０時間、または約３０秒～約１時間の範囲内の循環半減期を有する、請求項１０に記載の医薬製剤。
【請求項１３】
前記タンパク質活性薬剤が、ＧＬＰ－１受容体アゴニストもしくはその誘導体、ＶＰＡＣ２選択的アゴニストもしくはその誘導体、ＧＩＰ受容体アゴニストもしくはその誘導体、グルカゴン受容体アゴニストもしくはその誘導体、エキセンディン－４もしくはその誘導体またはインスリンもしくはその誘導体である、請求項１０に記載の医薬製剤。

【請求項１４】
ＧＬＰ１受容体アゴニスト、グルカゴン受容体アゴニスト、ＧＩＰ受容体アゴニスト、エキセンディン－４およびインスリンのうちの少なくとも２つを含む共製剤である、請求項１３に記載の医薬製剤。
【請求項１５】
前記治療剤が、前記活性薬剤とＥＬＰの間の化学的コンジュゲートである、請求項１～１０および１２～１４のいずれか一項に記載の医薬製剤。
【請求項１６】
前記活性薬剤が化学療法剤、例えばメトトレキサート、ダウノマイシン、マイトマイシン、シスプラチン、ビンクリスチン、エピルビシン、フルオロウラシル、ベラパミル、シクロホスファミド、シトシンアラビノシド、アミノプテリン、ブレオマイシン、マイトマイシンＣ、デモコルシン、エトポシド、ミトラマイシン、クロラムブシル、メルファラン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、タモキシフェン、パクリタキセル、ビンブラスチン、カンプトセシン、アクチノマイシンＤ、シタラビンおよびコンブレスタチンから選択される化学療法剤である、請求項１５に記載の医薬製剤。
【請求項１７】
前記治療剤が約０．５ｍｇ／ｍＬ～約２００ｍｇ／ｍＬの範囲内で存在する、請求項１～１６のいずれか一項に記載の医薬製剤。
【請求項１８】
前記治療剤が約３０ｍｇ／ｍＬ～約１５０ｍｇ／ｍＬの範囲内で存在する、請求項１７に記載の医薬製剤。
【請求項１９】
前記治療剤が約５０ｍｇ／ｍＬ～約１２５ｍｇ／ｍＬ、または約７５ｍｇ／ｍＬ～約１１０ｍｇ／ｍＬの範囲内で存在する、請求項１８に記載の医薬製剤。
【請求項２０】
前記治療剤が約１００ｍｇ／ｍＬの量で存在する、請求項１９に記載の医薬製剤。
【請求項２１】
前記治療剤が貯蔵条件で相転移マトリックスを形成しない、請求項１～２０のいずれか一項に記載の医薬組成物。
【請求項２２】
前記貯蔵条件が約４０℃未満、約３７℃未満、約３０℃未満、約２７℃未満、または約２５℃未満である、請求項２１に記載の医薬組成物。
【請求項２３】
前記貯蔵条件で１カ月を超えて安定している、請求項２２に記載の医薬製剤。
【請求項２４】
約２５℃で約１カ月を超えて安定している、請求項２３に記載の医薬製剤。
【請求項２５】
塩化カルシウム、塩化マグネシウム、塩化カリウム、一塩基リン酸カリウム、塩化ナトリウム、ポリソルベート２０、リン酸ナトリウム、一塩基リン酸ナトリウムおよび二塩基リン酸ナトリウムのうちの２つ以上を含む、請求項１～２４のいずれか一項に記載の医薬製剤。
【請求項２６】
リン酸ナトリウム、塩化ナトリウムおよびポリソルベート２０を含む、請求項２５に記載の医薬製剤。
【請求項２７】
１０ｍＭリン酸ナトリウム、１１０ｍＭ塩化ナトリウムおよび０．１％ポリソルベート２０を含む、請求項２６に記載の医薬製剤。
【請求項２８】
１週につき約１回、１週につき約２回または１カ月につき１～８回の投与のために前充填された(pre-dosed)ペンまたはシリンジの形で詰め込まれる、請求項１～２７のいずれ

か一項に記載の医薬製剤。
【請求項２９】
活性薬剤および［ＶＰＧＸＧ］$_{144}$または［ＸＰＧＶＧ］$_{144}$を含むＥＬＰアミノ酸配列を含む治療剤であって、上式で各ＸはＶ、ＧおよびＡから選択され、ＥＬＰは２６℃～３７℃の間の転移温度を示す治療剤、ならびに
１つまたは複数の薬学的に許容される賦形剤
を含む持続的放出医薬製剤。
【請求項３０】
投与すると注射部位からの遅い吸収を提供する、請求項２９に記載の医薬製剤。
【請求項３１】
前記アミノ酸配列の非存在下での前記活性薬剤のＰＫプロファイルと比較して、投与すると平らなＰＫプロファイルを提供する、請求項３０に記載の医薬製剤。
【請求項３２】
前記ＰＫプロファイルが浅いＣｍａｘおよび／または低いピーク対トラフ比および／または長いＴｍａｘを有する、請求項３１に記載の医薬製剤。
【請求項３３】
体温での可逆的マトリックスの形成がタンパク質濃度の低下に従って反転する、請求項２９～３２のいずれか一項に記載の医薬製剤。
【請求項３４】
Ｖ、ＧおよびＡが
ａ）５：３：２；
ｂ）７：２：０；
ｃ）７：０：２；
ｄ）６：０：３；
ｅ）５：２：２；および
ｆ）５：０：４
からなる群から選択される比である、請求項２９～３３のいずれか一項に記載の医薬製剤。
【請求項３５】
前記ＥＬＰが［ＶＰＧＸＧ］$_{144}$から選択されるＥＬＰ単位を含み、上式で各ＸはＶである、請求項２９に記載の医薬製剤。
【請求項３６】
前記活性薬剤がタンパク質である、請求項２９～３５のいずれか一項に記載の医薬製剤。
【請求項３７】
前記治療剤が、前記タンパク質活性薬剤と前記アミノ酸配列の間の組換え融合タンパク質である、請求項３６に記載の医薬製剤。
【請求項３８】
前記タンパク質活性薬剤が約３０秒～約１０時間、または約３０秒～約１時間の範囲内の循環半減期を有する、請求項３６に記載の医薬製剤。
【請求項３９】
前記活性薬剤が、ＧＬＰ－１受容体アゴニストもしくはその誘導体、ＶＰＡＣ２選択的アゴニストもしくはその誘導体、ＧＩＰ受容体アゴニストもしくはその誘導体、グルカゴン受容体アゴニストもしくはその誘導体、エキセンディン－４もしくはその誘導体またはインスリンもしくはその誘導体である、請求項３６に記載の医薬製剤。
【請求項４０】
ＧＬＰ１受容体アゴニスト、グルカゴン受容体アゴニスト、ＧＩＰ受容体アゴニスト、エキセンディン－４およびインスリンのうちの少なくとも２つを含む共製剤である、請求項３９に記載の医薬製剤。
【請求項４１】

前記治療剤が前記活性薬剤と前記アミノ酸配列の間の化学的コンジュゲートである、請求項２９～３６および３８～４０のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【請求項４２】

前記活性薬剤が、化学療法剤、例えばメトトレキサート、ダウノマイシン、マイトマイシン、シスプラチン、ビンクリスチン、エピルビシン、フルオロウラシル、ベラパミル、シクロホスファミド、シトシンアラビノシド、アミノプテリン、ブレオマイシン、マイトマイシンＣ、デモコルシン、エトポシド、ミトラマイシン、クロラムブシル、メルファラン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、タモキシフェン、パクリタキセル、ビンブラスチン、カンプトセシン、アクチノマイシンＤ、シタラビンおよびコンブレスタチンから選択される化学療法剤である、請求項４１に記載の医薬製剤。

【請求項４３】

前記治療剤が約０．５ｍｇ／ｍＬ～約２００ｍｇ／ｍＬの範囲内で存在する、請求項２９～４２のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【請求項４４】

前記治療剤が約３０ｍｇ／ｍＬ～約１５０ｍｇ／ｍＬの範囲内で存在する、請求項４３に記載の医薬製剤。

【請求項４５】

前記治療剤が約５０ｍｇ／ｍＬ～約１２５ｍｇ／ｍＬの範囲、または約７５ｍｇ／ｍＬ～約１１０ｍｇ／ｍＬの範囲内で存在する、請求項４４に記載の医薬製剤。

【請求項４６】

前記治療剤が約１００ｍｇ／ｍＬの範囲内で存在する、請求項４５に記載の医薬製剤。

【請求項４７】

前記治療剤が貯蔵条件でマトリックスを形成しない、請求項２９～４６のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項４８】

前記貯蔵条件が約４０℃未満、または約３７℃未満、または約３０℃未満、または約２７℃未満、または約２５℃未満である、請求項４７に記載の医薬組成物。

【請求項４９】

塩化カルシウム、塩化マグネシウム、塩化カリウム、一塩基リン酸カリウム、塩化ナトリウム、ポリソルベート２０、リン酸ナトリウム、一塩基リン酸ナトリウムおよび二塩基リン酸ナトリウムのうちの２つ以上を含む、請求項２９～４９のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【請求項５０】

リン酸ナトリウム、塩化ナトリウムおよびポリソルベート２０を含む、請求項４９に記載の医薬製剤。

【請求項５１】

１０ｍＭリン酸ナトリウム、１１０ｍＭ塩化ナトリウムおよび０．１％ポリソルベート２０を含む、請求項５０に記載の医薬製剤。

【請求項５２】

１週につき１回、１週につき２回または１カ月につき１～８回の投与のために前充填された(pre-dosed)ペンまたはシリンジの形で詰め込まれる、請求項２９～５１のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【請求項５３】

治療剤の持続的放出レジメンを送達するための方法であって、必要とする対象に請求項１～５２のいずれか一項の製剤を投与することを含み、前記製剤が１カ月につき約１～約８回投与される方法。

【請求項５４】

前記治療剤が１カ月につき約１～約８回投与される、請求項５３に記載の方法。

【請求項５５】

前記製剤が約１週ごとに投与される、請求項５３または５４に記載の方法。

【請求項５６】
前記製剤が皮下または筋肉内に投与される、請求項５３～５５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５７】
投与部位が病的部位でない、請求項５３～５５のいずれか一項に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、２０１４年１１月２１日に出願の米国特許仮出願第６２／０８２９４５号および２０１４年１２月３１日に出願の米国特許仮出願第６２／０９８６２４号の権益を主張し、それぞれの内容はあらゆる目的のために参照によりその全体が組み込まれる。
【０００２】
本開示は、持続的放出のための医薬製剤および持続的放出製剤による治療レジメンを送達するための方法に関する。
【０００３】
電子的に提出されるテキストファイルの記載
これに添えて電子的に提出されるテキストファイルの内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる：配列表のコンピュータ可読フォーマットコピー（ファイル名：PHAS_031_02WO_SEQLIST_ST25.TXT、記録日：2015年11月20日、ファイルサイズ69キロバイト）。
【背景技術】
【０００４】
ペプチドおよび小分子薬物の有効性は、循環中のそのような薬物の半減期によって、また、実質的に一定の血漿レベルを得ることの困難性によってしばしば制限される。例えば、インクレチンＧＬＰ－１は循環中のその短い半減期に対抗するために比較的高い用量で投与されなければならず、これらの高い用量は、とりわけ吐き気と関連する。ＭｕｒｐｈｙおよびＢｌｏｏｍ、Ｎｏｎｐｅｐｔｉｄｉｃ ｇｌｕｃａｇｏｎ－ｌｉｋｅ ｐｅｐｔｉｄｅ １ ｒｅｃｅｐｔｏｒ ａｇｏｎｉｓｔｓ：Ａ ｍａｇｉｃ ｂｕｌｌｅｔ ｆｏｒ ｄｉａｂｅｔｅｓ？ ＰＮＡＳ １０４（３）：６８９～６９０（２００７）。さらに、ペプチド剤血管作用性小腸ペプチド（ＶＩＰ）は、一部の推定では、１分未満の半減期を示し、この薬剤を医薬使用のために非実用的にしている。Ｄｏｍｓｃｈｋｅら、Ｖａｓｏａｃｔｉｖｅ ｉｎｔｅｓｔｉｎａｌ ｐｅｐｔｉｄｅ ｉｎ ｍａｎ：ｐｈａｒｍａｃｏｋｉｎｅｔｉｃｓ、ｍｅｔａｂｏｌｉｃ ａｎｄ ｃｉｒｃｕｌａｔｏｒｙ ｅｆｆｅｃｔｓ、Ｇｕｔ １９：１０４９～１０５３（１９７８）；ＨｅｎｎｉｎｇおよびＳａｗｍｉｌｌｅｒ、Ｖａｓｏａｃｔｉｖｅ ｉｎｔｅｓｔｉｎａｌ ｐｅｐｔｉｄｅ：ｃａｒｄｉｏｖａｓｃｕｌａｒ ｅｆｆｅｃｔｓ、Ｃａｒｄｉｏｖａｓｃｕｌａｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ４９：２７～３７（２００１）。ペプチド薬の短い血漿中半減期は、しばしば、速い腎クリアランスおよび全身循環中の酵素分解による。
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００５】
ペプチドおよび小分子薬物の薬物動態を改善するための戦略が、非常に需要がある。
【課題を解決するための手段】
【０００６】
本開示は、持続的放出のための医薬製剤および持続的放出製剤による治療レジメンを送達するための方法を提供する。それにより本開示は、ペプチドおよび小分子薬物に改善された薬物動態を提供する。
【０００７】
一部の態様では、本開示は持続的放出医薬製剤を提供する。製剤は全身投与のための治

療剤を含み、ここで、治療剤は活性薬剤および対象の体温で可逆的マトリックスを形成することが可能なアミノ酸配列を含む。可逆的マトリックスは、水素結合（例えば、分子内および／または分子間水素結合）および疎水性寄与から形成される。製剤は、１つまたは複数の薬学的に許容される賦形剤および／または希釈剤をさらに含む。マトリックスは、注射部位から循環への遅い吸収を提供する。持続的放出または注射部位からの遅い吸収は、濃度が注射部位で放散するときのマトリックスの遅い反転による。製品が循環に移動すると、製剤は長い半減期および改善された安定性を付与する。したがって、遅い吸収および長い半減期の特異な組合せが達成され、狭いピーク対トラフ比および／または長いＴｍａｘによる望ましいＰＫプロファイルをもたらす。

【０００８】

ある特定の実施形態では、対象の体温で可逆的マトリックスを形成することが可能なアミノ酸配列は、エラスチン様タンパク質（ＥＬＰ）配列である。ＥＬＰ配列は、エラスチンタンパク質に関係するかまたは模倣物である構造ペプチド単位または配列を含むかまたはそれからなる。ＥＬＰアミノ酸配列は、選択される製剤で可視的および可逆的逆相転移を示すことができる。すなわち、アミノ酸配列は転移温度（Ｔｔ）未満で製剤中で構造的に無秩序および高度に可溶性であることができるが、製剤の温度がＴｔより高いときは急激な（２～３℃の範囲）無秩序から秩序への相転移を示すことができる。一部の実施形態では、本開示は、約２６℃～約３７℃の間の転移温度を有する治療剤を提供する。温度に加えて、ＥＬＰポリマーの長さ、ＥＬＰのアミノ酸組成、イオン強度、ｐＨ、圧、選択される溶媒、有機溶質の存在およびタンパク質濃度も転移特性に影響することができ、これらは所望の吸収プロファイルのために調整することができる。一部の実施形態では、タンパク質濃度および塩濃度が転移特性（例えば転移温度）に影響する。マトリックスを形成するＥＬＰアミノ酸配列の例示的な配列または構造が、本明細書に開示される。

【０００９】

ある特定の実施形態では、全身投与のための活性薬剤は、短い循環半減期、例えば約３０秒から約１時間、約２時間または約５時間までを有することができるタンパク質またはペプチドである。一部の実施形態では、タンパク質またはペプチドは、３０秒から約１０時間までの循環半減期を有する。治療剤は、タンパク質活性薬剤と、マトリックスを形成することが可能なアミノ酸配列との間の組換え融合タンパク質であってもよい。例示的なペプチド活性薬剤には、ＧＬＰ－１受容体アゴニスト（例えば、ＧＬＰ－１またはその誘導体）、エキセンディン－４もしくはその誘導体、グルカゴン受容体アゴニスト（例えば、グルカゴン、オキシントモジュリンまたはその誘導体）、ＶＰＡＣ２選択的アゴニスト（例えば、血管作用性小腸ペプチド（ＶＩＰ）またはその誘導体）、ＧＩＰ受容体アゴニスト（例えば、グルコース依存性インスリン分泌性ペプチド（ＧＩＰ）またはその誘導体）、インスリンもしくはその誘導体、凝固因子、例えば第ＶＩＩ因子、第ＶＩＩＩ因子もしくは第ＩＸ因子、または成長ホルモン受容体アゴニスト（例えば、ヒト成長ホルモン（ｈＧＨ）またはその機能的誘導体）が含まれる。ペプチド活性薬剤には、１を超える受容体を活性化する配列、例えばＧＬＰ－１およびグルカゴン受容体の二重アゴニスト、ＧＬＰ－１およびＧＩＰ受容体の二重アゴニスト、またはＧＬＰ－１、ＧＩＰおよびグルカゴン受容体を活性化することができる三重アゴニストが含まれる。本開示による送達のための他のタンパク質および小分子薬物が、本明細書に開示される。注射部位からの遅い吸収を提供することによって、腎クリアランスおよび分解を制御し、それによって所望のＰＫプロファイルを達成することができる。

【００１０】

他の態様では、本開示は、活性薬剤の持続的放出レジメンを送達するための方法を提供する。本方法は、必要とする対象に本明細書に記載される製剤を投与することを含み、ここで、製剤は１カ月につき約１回～約８回投与される。一部の実施形態では、製剤は約１週ごとに投与され、皮下または筋肉内（例えば）に投与することができる。一部の実施形態では、投与部位は病的部位ではなく、すなわち、治療剤は意図された作用部位に直接的に投与されない。

【図面の簡単な説明】
【００１１】
【図１】３７℃以上への温度の変化によって誘導されたＥＬＰ１タンパク質の相転移（濁度の増加で示される）を示す図である。この特性は、注射部位からの遅い吸収を提供する。
【図２】２５℃以上への温度の変化によって誘導されたＥＬＰ４タンパク質の相転移（濁度の増加で示される）を示す図である。この特性は、デポー様送達を提供する。
【図３】理論によって縛られることを望まないが、ある特定の条件下で水シェルが排除されて水素結合の形成を可能にする、観察された転移のための潜在機構を例示する図である。
【図４】ＥＬＰ９量体のアミノ酸配列（アルファ、ベータＶ１、ベータＶ２およびデルタ）を示す図である。この例では、各ＥＬＰ単位は、異なる比の３つのゲスト残基アミノ酸を有するＶＰＧＸＧ　ＥＬＰ五量体モチーフまたはＸＰＧＶＧ　ＥＬＰ五量体モチーフの９コピーからなる。
【図５】ＥＬＰポリマーを作製するために使用された再帰的なライゲーション戦略を示す図である。ＥＬＰ五量体ポリマー挿入断片は、反復ライゲーションを使用してサイズを連続的に二倍にすることができる。ＰｆｌＭＩおよびＢｇｌＩ部位は同種のオーバーハングを有するが、ライゲーションされるとき、ＰｆｌＭＩ部位は破壊される。これは、同じ消化戦略を使用して、新たに構築されたＥＬＰを再び二倍にすることを可能にする。
【図６】ｐＰＥ０２４８プラスミドマップを示す図である。
【図７】ｐＰＥ０２４８リンカーを示す図である。このリンカーは、特異なＢｇｌ　Ｉ制限酵素部位を使用して、発現および終止のためのイニシエータメチオニンおよび２つの終止コドンのフレーム内のＶＰＧＸＧ反復配列ポリマーの挿入を可能にする。特異なＸｂａ　ＩおよびＡｃｃ６５ｉ部位を使用して、その後Ｎ末端融合を追加することができる。
【図８】ＥＬＰアルファ１４４量体バイオポリマーのアミノ酸配列を示す図である。
【図９】ｐＰＥ０２４９プラスミドマップを示す図である。
【図１０】ＥＬＰベータｖ１　１４４量体バイオポリマーのアミノ酸配列を示す図である。
【図１１】ｐＰＥ０２５０プラスミドマップを示す図である。
【図１２】ＥＬＰベータｖ２　１４４量体バイオポリマーのアミノ酸配列を示す図である。
【図１３】ｐＰＥ０３６２プラスミドマップを示す図である。
【図１４】ＥＬＰガンマ１４４量体バイオポリマーのアミノ酸配列を示す図である。
【図１５】ｐＰＥ０２５１プラスミドマップを示す図である。
【図１６】ＥＬＰデルタ１４４量体バイオポリマーのアミノ酸配列を示す図である。
【図１７】ｐＰＥ０２５２プラスミドマップを示す図である。
【図１８】１０ｍｇ／ｍＬでの投与の後の異なるＥＬＰバイオポリマーの生のＣａｒｙ濁度データを示す図である。
【図１９】ＰＥ０２５３（アルファ）、ＰＥ０２５４（ベータｖ１）、ＰＥ０２５５（ガンマ）またはＰＥ０２５６（デルタ）のいずれかの２０ｍｇ／ｋｇの単回の皮下注射を各々投与した、１群につき１匹の雄および１匹の雌の非ナイーブサルからのＰＫ結果を示す図である。
【図２０Ａ】雄２匹および雌２匹の４匹のタンパク質ナイーブサルへの１０ｍｇ／ｋｇのＰＥ０２５６（デルタ）の単回皮下投与のＰＫ結果を示す図である。図Ａは個々の動物からのデータを示す。
【図２０Ｂ】雄２匹および雌２匹の４匹のタンパク質ナイーブサルへの１０ｍｇ／ｋｇのＰＥ０２５６（デルタ）の単回皮下投与のＰＫ結果を示す図である。図Ｂは平均を示す。
【図２１Ａ】全て雄の３匹のタンパク質ナイーブサルへの１０ｍｇ／ｋｇのＰＥ０３１１（ベータｖ２）の単回皮下投与のＰＫ結果を示す図である。図Ａは個々の動物からのデータを示す。

【図２１Ｂ】全て雄の３匹のタンパク質ナイーブサルへの１０ｍｇ／ｋｇのＰＥ０３１１（ベータｖ２）の単回皮下投与のＰＫ結果を示す図である。図Ｂは平均を示す。
【図２２】２ｍｇ／ｋｇのＰＥ０２５６（デルタ）の単回ＩＶ注射を投与した非ナイーブサルのＰＫ結果を示す図である。
【図２３】プラスミドｐＰＥ０３６２に挿入されたｈＧＨ配列を含有するベクターｐＰＥ０４２９のプラスミドマップを示す図である。合成したｈＧＨ配列を制限酵素ＰｆｌＭＩ／Ｂｇｌ　Ｉで消化し、プラスミドｐＰＥ０３６２のＢｇｌ　Ｉ部位にサブクローニングした。
【図２４】ＥＬＰベータＶ２－１４４－ｈＧＨ融合タンパク質（配列番号１４）のアミノ酸配列を示す図である。ｈＧＨ（下線付き）は、ＥＬＰベータｖ２－１４４配列（太字）に融合している。単一のＥＬＰ五量体（イタリック）はＣ末端に残存し、Ｂｇｌ　Ｉ制限部位を保存する。この部位は、さらなるクローニング工程のために使用することができる。
【図２５】ＥＬＰ１シリーズ１２０量体をｈＧＨ配列のＮ末端に置くプラスミドｐＰＥ０４２９に挿入されたＥＬＰ１シリーズ３０量体配列を含有する、ベクターｐＰＥ０４３１のプラスミドマップを示す図である。
【図２６】ＥＬＰ１－１２０量体ｈＧＨ融合タンパク質（配列番号１５）のアミノ酸配列を示す図である。ｈＧＨ配列（下線付き）は、ＥＬＰ１シリーズ１２０量体配列（太字）に融合している。
【図２７】ＥＬＰ１シリーズ３０量体をＥＬＰベータＶ２－１４４－ｈＧＨ配列のＣ末端に置くプラスミドｐＰＥ０４２９に挿入されたＥＬＰ１シリーズ３０量体配列を含有する、ベクターｐＰＥ０４３０のプラスミドマップを示す図である。ＥＬＰ１シリーズ３０量体を付加することは、受容体媒介クリアランスを破壊し、したがって、ＥＬＰベータＶ２－１４４　ｈＧＨ融合タンパク質の循環半減期をさらに増加させる。
【図２８】ＥＬＰ１シリーズ３０量体とのＥＬＰベータＶ２－１４４－ｈＧＨ融合タンパク質のアミノ酸配列を示す図である（配列番号１６）。ｈＧＨ（下線付き）は、ＥＬＰベータｖ２－１４４配列（太字）に融合している。ＥＬＰ１シリーズ３０量体（イタリック）は、ＥＬＰベータＶ２－１４４－ｈＧＨ配列のＣ末端にある。
【図２９】ＥＬＰ１シリーズ３０量体をＥＬＰ１－１２０－ｈＧＨ配列のＣ末端に置くプラスミドｐＰＥ０４３１に挿入されたＥＬＰ１シリーズ３０量体配列を含有する、ベクターｐＰＥ０４３２のプラスミドマップを示す図である。ＥＬＰ１シリーズ３０量体を付加することは、受容体媒介クリアランスを破壊し、したがって、ＥＬＰ１シリーズｈＧＨ融合タンパク質の循環半減期をさらに増加させる。
【図３０】Ｃ末端のＥＬＰ１－３０量体とのＥＬＰ１－１２０ｈＧＨ融合タンパク質のアミノ酸配列を示す図である（配列番号１７）。ｈＧＨ配列（下線付き）は、ＥＬＰ１シリーズ１２０量体配列（太字）およびＥＬＰ１－３０配列（イタリック）に融合している。
【図３１】ベータｖ２シリーズ１４４量体配列を含有するベクターｐＰＥ０３６４のプラスミドマップを示す図である。合成したエキセンディン－４配列を制限酵素ＸｂａＩ／ＢｓｒＧＩで消化し、ＸｂａＩ／Ａｃｃ６５ｉ消化プラスミドｐＰＥ０３６２にサブクローニングした。
【図３２】Ｃ末端のＥＬＰベータＶ２－１４４量体とのエキセンディン－４ＥＬＰベータＶ２融合タンパク質のアミノ酸配列を示す図である（配列番号１８）。エキセンディン－４配列（下線付き）は、ＥＬＰベータＶ２－１４４量体配列に融合している。
【発明を実施するための形態】
【００１２】
本開示は、持続的放出のための医薬製剤および持続的放出製剤による治療レジメンを送達するための方法を提供する。ある特定の実施形態では、本明細書に開示される医薬組成物は、増強された効能、生物学的利用能、治療半減期、持続性、分解補助などを有する。それにより本開示は、ペプチドおよび小分子薬物などの活性薬剤に、ピーク対トラフの低い比による比較的平らなＰＫプロファイルおよび／または長いＴｍａｘを含む、改善され

た薬物動態を提供する。ＰＫプロファイルは、一部の実施形態では比較的まれな投与スケジュール、例えば１カ月につき１～８回の注射で維持することができる。

【００１３】

一部の態様では、本開示は持続的放出医薬製剤を提供する。製剤は全身投与のための治療剤を含み、ここで、治療剤は活性薬剤および対象の体温でマトリックスを形成することが可能なアミノ酸配列を含む。可逆的マトリックスは、水素結合（例えば、分子内および／または分子間水素結合）ならびに疎水性寄与から形成される。製剤は、１つまたは複数の薬学的に許容される賦形剤および／または希釈剤をさらに含む。マトリックスは、注射部位から循環への遅い吸収を提供する。理論によって縛られないが、この遅い吸収はタンパク質濃度が注射部位で低下するときのマトリックスの遅い反転による。遅い吸収プロファイルは、平らなＰＫプロファイルならびに便利で快適な投与レジメンを可能にする。例えば、様々な実施形態では、経過日数（例えば、２～約６０日、または約４～約３０日）の間の活性薬剤の血漿中濃度は、１０倍を超えて、または約５倍を超えて、または約３倍を超えて変化しない。一般的に、この平らなＰＫプロファイルは、複数回の（実質的に等間隔の）投与、例えば製剤の少なくとも約２回、少なくとも約５回または少なくとも約１０回の投与にわたって見られる。一部の実施形態では、遅い吸収は、約５時間を超える、約１０時間を超える、約２０時間を超える、約３０時間を超えるまたは約５０時間を超えるＴｍａｘ（最大血漿中濃度までの時間）によって示される。

【００１４】

可逆的マトリックスを形成するアミノ酸配列

注射部位からの持続的放出または遅い吸収は、対象の体温で水素結合マトリックスを形成することが可能なアミノ酸配列ならびに製剤の成分によって制御される。

【００１５】

一部の実施形態では、アミノ酸配列は、タンパク質骨格基および／または側鎖基を通して水素結合を形成する、ならびにマトリックス形成に疎水性相互作用を供与することができる構造単位を含有する。一部の実施形態では、アミノ酸側鎖は水素結合供与基を含有せず、水素結合は実質的にタンパク質骨格を通して形成される。例示的なアミノ酸には、プロリン、アラニン、バリン、グリシンおよびイソロイシン、および類似のアミノ酸が含まれる。一部の実施形態では、構造単位は、実質的に反復する構造モチーフおよび実質的に反復する水素結合能力を生成するように、実質的に反復する構造単位である。これらおよび他の実施形態では、アミノ酸配列は少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約４０％または少なくとも約５０％のプロリンを含有し、それは実質的に反復するパターンで配置することができる。この文脈において、実質的に反復するパターンは、アミノ酸配列のプロリン残基の少なくとも約５０％または少なくとも約７５％が、定義可能な構造単位の一部であることを意味する。さらに他の実施形態では、アミノ酸配列は、セリン、トレオニンおよび／またはチロシンなどの水素結合供与側鎖を有するアミノ酸を含有する。一部の実施形態では、反復する配列は、１～約４つのプロリン残基を含有することができ、残りの残基は無極性残基、例えばグリシン、アラニン、ロイシン、イソロイシンおよびバリンから独立して選択される。無極性または疎水性の残基は、マトリックスの形成に疎水性相互作用を供与することができる。

【００１６】

他の実施形態では、体温でマトリックスを形成することが可能なアミノ酸配列は、ランダムコイルまたは非球状伸長構造を含むことができる。例えば、体温でマトリックスを形成することが可能なアミノ酸配列は、各々はここに参照により組み込まれる、米国特許出願公開第２００８／０２８６８０８号、ＷＩＰＯ特許出願公開第２００８／１５５１３４号および米国特許出願公開第２０１１／０１２３４８７号に開示されるアミノ酸配列を含むことができる。

【００１７】

一部の実施形態では、アミノ酸配列は少なくとも４０アミノ酸の非構造化組換えポリマーを含む。非構造化ポリマーは、約１００を超える、約１５０、約２００またはそれを超

える連続したアミノ酸を含むことができる。一部の実施形態では、アミノ酸配列はランダムコイルドメインを形成する。特に、「ランダムコイル立体配座」を有するか形成するポリペプチドまたはアミノ酸ポリマーは、規定の二次および三次構造を実質的に欠く。一部の実施形態では、非構造化ポリマーは、グリシン（Ｇ）、アスパラギン酸（Ｄ）、アラニン（Ａ）、セリン（Ｓ）、トレオニン（Ｔ）、グルタミン酸（Ｅ）およびプロリン（Ｐ）残基の総数がポリマーの全アミノ酸の約８０％超を構成する、少なくとも４０アミノ酸を有するポリマーと規定される。一部の実施形態では、Ｃｈｏｕ－Ｆａｓｍａｎアルゴリズムによって判定したとき、アミノ酸の少なくとも５０％は二次構造が欠けている。

【００１８】

アミノ酸配列は、保存温度より高い温度での注射の結果、「ゲル様」状態を形成することができる。例示的な配列は反復するペプチド単位を有し、および／またはより低い温度で比較的非構造化されてもよく、より高い温度では水素結合した構造化状態を達成することができる。

【００１９】

エラスチン様ペプチド（ＥＬＰ）

一部の実施形態では、体温でマトリックスを形成することが可能なアミノ酸配列は、４～１０のアミノ酸の反復単位を有するペプチドである。反復単位は、マトリックスの形成で１つ、２つまたは３つの水素結合を形成することができる。ある特定の実施形態では、体温でマトリックスを形成することが可能なアミノ酸配列は、絹糸、エラスチン、コラーゲン、ケラチンもしくはその模倣物のアミノ酸配列、またはここに参照により組み込まれる米国特許第６，３５５，７７６号に開示されるアミノ酸配列である。

【００２０】

ある特定の実施形態では、アミノ酸配列はエラスチン様タンパク質（ＥＬＰ）配列である。ＥＬＰ配列は、エラスチンタンパク質に関係するかまたは模倣物である構造ペプチド単位または配列を含むかまたはそれからなる。ＥＬＰ配列は、３～約２０アミノ酸、または一部の実施形態では約４～約１０アミノ酸、例えば約４、約５または約６アミノ酸の構造単位から構築される。個々の構造単位の長さは異なることができるか、または均一であってもよい。例示的な構造単位は配列番号１～１３（下記）によって規定され、それはタンデム反復単位を含む反復構造単位として用いることができるか、または何らかの組合せで用いることができる。したがって、ＥＬＰは、下で規定される配列番号１～１３から選択される構造単位（複数可）を含むことができるか、または事実上それからなることができる。

【００２１】

構造単位がＥＬＰ単位である実施形態を含む一部の実施形態では、アミノ酸配列は、約１～約５００の構造単位、またはある特定の実施形態では約９～約２００の構造単位、またはある特定の実施形態では約１０～２００の構造単位、またはある特定の実施形態では約５０～約２００の構造単位、またはある特定の実施形態では約８０～約２００の構造単位、または約８０～約１５０の構造単位を含むかまたは事実上それからなる。一部の実施形態では、構造単位は、配列番号１～１３の１つまたは複数によって規定されるＥＬＰ単位である。一部の実施形態では、ＥＬＰは、配列番号１～１３によって規定される単位の組合せを含む。したがって、構造単位は、約５０～約２０００のアミノ酸残基、または約１００～約８００のアミノ酸残基、または約２００～約７００のアミノ酸残基、または約４００～約６００のアミノ酸残基の長さを総合的に有することができる。例示的な実施形態では、ＥＬＰ構造単位のアミノ酸配列は、約３構造単位、約７構造単位、約９構造単位、約１０構造単位、約１５構造単位、約２０構造単位、約４０構造単位、約８０構造単位、約９０構造単位、約１００構造単位、約１２０構造単位、約１４０構造単位、約１４４構造単位、約１６０構造単位、約１８０構造単位、約２００構造単位または約５００構造単位を含むかまたは事実上それからなる。例示的な実施形態では、構造単位は、約４５アミノ酸残基、約９０アミノ酸残基、約１００アミノ酸残基、約２００アミノ酸残基、約３００アミノ酸残基、約４００アミノ酸残基、約５００アミノ酸残基、約６００アミノ酸残

基、約７００アミノ酸残基、約８００アミノ酸残基または約１０００アミノ酸残基の長さを総合的に有する。

【００２２】

アミノ酸配列は、選択される製剤で可視的および可逆的逆相転移を示すことができる。すなわち、アミノ酸配列は転移温度（Ｔｔ）未満において製剤中で構造的に無秩序および高度に可溶性であることができるが、製剤の温度がＴｔより高いときは急激な（２～３℃の範囲）無秩序から秩序への相転移またはコアセルベーションを示すことができる。アミノ酸ポリマーの温度、長さに加えて、アミノ酸組成、イオン強度、ｐＨ、圧、選択される溶媒、有機溶質の存在およびタンパク質濃度も転移特性に影響することができ、これらは所望の吸収プロファイルのために製剤で調整することができる。活性薬剤の血漿中濃度または活性を経時的に判定することによって、吸収プロファイルを容易に試験することができる。

【００２３】

ある特定の実施形態では、ＥＬＰ成分（複数可）は、以下を非限定的に含む構造単位で形成することができる：

（ａ）テトラペプチドＶａｌ－Ｐｒｏ－Ｇｌｙ－ＧｌｙまたはＶＰＧＧ（配列番号１）；

（ｂ）テトラペプチドＩｌｅ－Ｐｒｏ－Ｇｌｙ－ＧｌｙまたはＩＰＧＧ（配列番号２）；

（ｃ）ペンタペプチドＶａｌ－Ｐｒｏ－Ｇｌｙ－Ｘ－Ｇｌｙ（配列番号３）またはＶＰＧＸＧ、ここでＸは任意の天然または非天然のアミノ酸残基であり、Ｘはポリマーまたはオリゴマー反復配列の間で任意選択により異なる；

（ｄ）ペンタペプチドＡｌａ－Ｖａｌ－Ｇｌｙ－Ｖａｌ－ＰｒｏまたはＡＶＧＶＰ（配列番号４）；

（ｅ）ペンタペプチドＩｌｅ－Ｐｒｏ－Ｇｌｙ－Ｘ－ＧｌｙまたはＩＰＧＸＧ（配列番号５）、ここでＸは任意の天然または非天然のアミノ酸残基であり、Ｘはポリマーまたはオリゴマー反復配列の間で任意選択により異なる；

（ｅ）ペンタペプチドＩｌｅ－Ｐｒｏ－Ｇｌｙ－Ｖａｌ－ＧｌｙまたはＩＰＧＶＧ（配列番号６）；

（ｆ）ペンタペプチドＬｅｕ－Ｐｒｏ－Ｇｌｙ－Ｘ－ＧｌｙまたはＬＰＧＸＧ（配列番号７）、ここでＸは任意の天然または非天然のアミノ酸残基であり、Ｘはポリマーまたはオリゴマー反復配列の間で任意選択により異なる；

（ｇ）ペンタペプチドＬｅｕ－Ｐｒｏ－Ｇｌｙ－Ｖａｌ－ＧｌｙまたはＬＰＧＶＧ（配列番号８）；

（ｈ）ヘキサペプチドＶａｌ－Ａｌａ－Ｐｒｏ－Ｇｌｙ－Ｖａｌ－ＧｌｙまたはＶＡＰＧＶＧ（配列番号９）；

（ｉ）オクタペプチドＧｌｙ－Ｖａｌ－Ｇｌｙ－Ｖａｌ－Ｐｒｏ－Ｇｌｙ－Ｖａｌ－ＧｌｙまたはＧＶＧＶＰＧＶＧ（配列番号１０）；

（ｊ）ノナペプチドＶａｌ－Ｐｒｏ－Ｇｌｙ－Ｐｈｅ－Ｇｌｙ－Ｖａｌ－Ｇｌｙ－Ａｌａ－ＧｌｙまたはＶＰＧＦＧＶＧＡＧ（配列番号１１）；

（ｋ）ノナペプチドＶａｌ－Ｐｒｏ－Ｇｌｙ－Ｖａｌ－Ｇｌｙ－Ｖａｌ－Ｐｒｏ－Ｇｌｙ－ＧｌｙまたはＶＰＧＶＧＶＰＧＧ（配列番号１２）；および

（ｌ）ペンタペプチドＸａａ－Ｐｒｏ－Ｇｌｙ－Ｖａｌ－ＧｌｙまたはＸＰＧＶＧ（配列番号１３）、ここでＸは任意の天然または非天然のアミノ酸残基であり、Ｘはポリマーまたはオリゴマー反復配列の間で任意選択により異なる。

【００２４】

配列番号１～１３によって規定されるそのような構造単位は構造反復単位を形成することができるか、またはＥＬＰを形成するために組合せで使用することができる。一部の実施形態では、ＥＬＰ成分は、配列番号１～１３から選択される構造単位の１つまたは組合せ（例えば、２、３、４、５、６、７、８、９または１０個）から完全に（またはほとん

ど完全に）形成される。他の実施形態では、ＥＬＰ成分の少なくとも約７５％、または少なくとも約８０％、または少なくとも約９０％は、配列番号１～１３から選択される構造単位の１つまたは組合せから形成され、それは反復単位として存在することができる。

【００２５】

ある特定の実施形態では、ＥＬＰはＶａｌ－Ｐｒｏ－Ｇｌｙ－Ｘ－Ｇｌｙ（配列番号３）のタンデム反復単位を含む反復配列単位を含有し、ここでＸは上で規定される通りであり、ＥＬＰ成分全体（ＶＰＧＸＧ（配列番号３）以外の構造単位を含むことができる）に関してとられるＶａｌ－Ｐｒｏ－Ｇｌｙ－Ｘ－Ｇｌｙ（配列番号３）単位の百分率は、ＥＬＰの約５０％超、または約７５％超、または約８５％超、または約９５％超である。ＥＬＰは配列番号３の５～１５構造単位（例えば、約９または約１０構造単位）のモチーフを含有することができ、ゲスト残基Ｘはモチーフ中の単位の少なくとも２つまたは少なくとも３つの間で異なる。ゲスト残基は、例えば、無極性または疎水性の残基、例えばアミノ酸Ｖ、Ｉ、Ｌ、Ａ、ＧおよびＷから独立して選択することができる（および、所望の逆相転移特性を保持するように選択することができる）。ある特定の実施形態では、ゲスト残基は、Ｖ、ＧおよびＡから選択される。

【００２６】

ある特定の実施形態では、ＥＬＰはＸａａ－Ｐｒｏ－Ｇｌｙ－Ｖａｌ－Ｇｌｙ（配列番号１３）のタンデム反復単位を含む反復配列単位を含有し、ここでＸは上で規定される通りであり、ＥＬＰ成分全体（ＸＰＧＶＧ（配列番号１３）以外の構造単位を含むことができる）に関してとられるＸａａ－Ｐｒｏ－Ｇｌｙ－Ｖａｌ－Ｇｌｙ（配列番号１３）単位の百分率は、ＥＬＰの約５０％超、または約７５％超、または約８５％超、または約９５％超である。ＥＬＰは配列番号１３の５～１５構造単位（例えば、約９または約１０構造単位）のモチーフを含有することができ、ゲスト残基Ｘはモチーフ中の単位の少なくとも２つまたは少なくとも３つの間で異なる。ゲスト残基は、例えば、無極性または疎水性の残基、例えばアミノ酸Ｖ、Ｉ、Ｌ、Ａ、ＧおよびＷから独立して選択することができる（および、所望の逆相転移特性を保持するように選択することができる）。ある特定の実施形態では、ゲスト残基は、ＶおよびＡから選択される。

【００２７】

ある特定の実施形態では、ＥＬＰは、配列番号１～１３のいずれかのタンデム反復単位を含む反復単位を、単独でまたは組合せで含有する。一部の実施形態では、ＥＬＰは配列番号１～１３のいずれかの２つ以上の反復配列を組合せで含有する。ある特定の実施形態では、ＥＬＰは配列番号３および配列番号１３の反復配列を含有する。一部の実施形態では、ＥＬＰは配列番号３および配列番号１３の反復配列を含有し、ここで、ゲスト残基は、例えば、無極性または疎水性の残基、例えばアミノ酸Ｖ、Ｉ、Ｌ、Ａ、ＧおよびＷから独立して選択される（および、所望の逆相転移特性を保持するように選択することができる）。ある特定の実施形態では、ゲスト残基は、Ｖ、ＧおよびＡから選択される。

【００２８】

一部の実施形態では、ＥＬＰは、本明細書に開示される１つまたは複数のＥＬＰ構造単位の９コピーを含む９量体を含む。一部の実施形態では、ＥＬＰは、本明細書に開示されるペンタペプチドの９コピーを含む９量体を含む。一部の実施形態では、ＥＬＰは、配列番号３および１３を任意の組合せで含む９量体を含む。一部の実施形態では、ＥＬＰは、配列番号３および１３が交互に並ぶ配列を含む。例えば、１８、２７、３６、４５、５４、６３、７２、８１、９０、９９、１０８、１１７、１２６、１３５、１４４、１５３、１６２、１７１または１８０コピーの９量体を有するＥＬＰを生成するために、様々な数の９量体のＥＬＰを組み合わせることができる。

【００２９】

ある特定の実施形態では、ＥＬＰは配列番号３を含む９量体を含み、ここで、ゲスト残基はＶ、ＧおよびＡから選択される。ある特定の実施形態では、ＥＬＰは配列番号３を含む９量体を含み、ここで、Ｖ、ＧおよびＡは７：２：０（アルファ）の比である。ある特定の実施形態では、ＥＬＰは配列番号３を含む９量体を含み、ここで、Ｖ、ＧおよびＡは

７：０：２（ベータｖ１）の比である。ある特定の実施形態では、ＥＬＰは配列番号３を含む９量体を含み、ここで、Ｖ、ＧおよびＡは６：０：３（ベータｖ２）の比である。ある特定の実施形態では、ＥＬＰは配列番号３を含む９量体を含み、ここで、Ｖ、ＧおよびＡは５：２：２（ガンマ）の比である。ある特定の実施形態では、ＥＬＰは配列番号１３を含む９量体を含み、ここで、ゲスト残基はＶ、ＧおよびＡから選択される。ある特定の実施形態では、ＥＬＰは配列番号１３を含む９量体を含み、ここで、Ｖ、ＧおよびＡは５：０：４（デルタ）の比である。例示的な９量体が、表１に開示される。表２は、いくつかの例示的な９量体の転移温度を示す。

【００３０】

【表１】

表 1 例示的な 9 量体でのゲスト残基比。ELP ポリマーは、ELP1 シリーズ(最も低い疎水性)および ELP4 シリーズ(最も疎水性)の間の疎水性を有する。

ELP シリーズ	五量体モチーフ	ゲスト残基比
1 シリーズ	VPG*X*G	5 Val : 3 Gly : 2 Ala
アルファ	VPG*X*G	7 Val : 2 Gly : 0 Ala
ベータ v1	VPG*X*G	7 Val : 0 Gly : 2 Ala
ベータ v2	VPG*X*G	6 Val : 0 Gly : 3 Ala
ガンマ	VPG*X*G	5 Val : 2 Gly : 2 Ala
デルタ	*X*PGVG	5 Val : 0 Gly : 4 Ala
	VPG*X*G	6 Val : 3 Gly : 0 Ala
	VPG*X*G	6 Val : 2 Gly : 1 Ala
	VPG*X*G	6 Val : 1 Gly : 2 Ala
	VPG*X*G	6 Val : 0 Gly : 3 Ala
	VPG*X*G	7 Val : 1 Gly : 1 Ala
	VPG*X*G	8 Val : 0 Gly : 1 Ala
	VPG*X*G	8 Val : 1 Gly : 0 Ala
4 シリーズ	VPG*X*G	10 Val : 0 Gly : 0 Ala

【００３１】

【表２】

表 2 例示的な 9 量体の測定した転移温度の比較。Cary 分光計を使用して測定された濁度の抑揚は、ELP バイオポリマー相転移の結果である。

ELP シリーズ (10mg/ml)	転移温度
1 シリーズ (pPB1023)	37°C
アルファ (pPE0253)	29°C
ベータ v1 (pPE0254)	28°C
ベータ v2 (pPE0311)	31°C
ガンマ (pPE0255)	29°C
デルタ (pPE0256)	35°C
4 シリーズ (pPE0002)	26°C

【００３２】

一部の実施形態では、ＥＬＰは、表１に掲載される９量体の組合せを含む。一部の実施形態では、ＥＬＰは、アルファ、ベータｖ１、ベータｖ２および／またはデルタ９量体の

組合せを含む。例えば、ガンマＥＬＰは、１４４量体が構築されるまで１６コピーのアルファ９量体およびベータｖ１　９量体を交互に並べることによって構築される。ある特定の実施形態では、ＥＬＰはアルファおよびベータｖ１　９量体の組合せを含む。ある特定の実施形態では、ＥＬＰはアルファおよびベータｖ２　９量体の組合せを含む。ある特定の実施形態では、ＥＬＰはアルファおよびデルタ９量体の組合せを含む。ある特定の実施形態では、ＥＬＰはベータｖ１およびベータｖ２　９量体の組合せを含む。ある特定の実施形態では、ＥＬＰはベータｖ１およびデルタ９量体の組合せを含む。ある特定の実施形態では、ＥＬＰはベータｖ２およびデルタ９量体の組合せを含む。ある特定の実施形態では、ＥＬＰは、アルファ、ベータｖ１およびベータｖ２　９量体の組合せを含む。ある特定の実施形態では、ＥＬＰは、アルファ、ベータｖ１およびデルタ９量体の組合せを含む。ある特定の実施形態では、ＥＬＰは、アルファ、ベータｖ２およびデルタ　９量体の組合せを含む。例えば、特定の配置では、ＥＬＰベータｖ２は、以下の配列で繰り返される構造単位の以下のゲスト残基を含むことができる：Ａ－Ｖ－Ａ－Ｖ－Ｖ－Ａ－Ｖ－Ａ－Ｖ。繰り返される配列は、ＥＬＰ中で約１０回、約１５回、約１６回、約２０回、約２５回、約３０回または約３５回以上連続して繰り返すことができる。一部の態様では、ＥＬＰは、約１０～約２０個の繰り返された配列を含有する。他の態様では、ＥＬＰは、約１５～２０個の繰り返された配列を含有する。一部の態様では、ＥＬＰは、約１６個の繰り返された配列を含有する。

【００３３】

一部の実施形態では、ＥＬＰは、本明細書に開示される１つまたは複数のＥＬＰ構造単位の１０コピーを含む１０量体を含む。一部の実施形態では、ＥＬＰは、本明細書に開示されるペンタペプチドの１０コピーを含む１０量体を含む。一部の実施形態では、ＥＬＰは、配列番号３および１３を任意の組合せで含む１０量体を含む。一部の実施形態では、ＥＬＰは、配列番号３および１３が交互に並ぶ配列を含む。様々な数の１０量体のＥＬＰを組み合わせて、例えば、２０、３０、４０、６０、９０、１００、１２０、１５０、１６０または２００コピーの１０量体を備えるＥＬＰを生成することができる。例示的な１０量体が、表３に開示される。

【００３４】

【表３】

表 3 例示的な 10 量体でのゲスト残基比。ELP ポリマーは、ELP1 シリーズ(最も低い疎水性)および ELP4 シリーズ(最も疎水性)の間の疎水性を有する。

ELP シリーズ	五量体モチーフ	ゲスト残基比
1 シリーズ	VPG<u>X</u>G	5 Val : 3 Gly : 2 Ala
	VPG<u>X</u>G	5 Val : 4 Gly : 1 Ala
	VPG<u>X</u>G	5 Val : 5 Gly : 0 Ala
	VPG<u>X</u>G	5 Val : 2 Gly : 3 Ala
	VPG<u>X</u>G	5 Val : 1 Gly : 4 Ala
	VPG<u>X</u>G	5 Val : 0 Gly : 5 Ala
	VPG<u>X</u>G	6 Val : 4 Gly : 0 Ala
	VPG<u>X</u>G	6 Val : 3 Gly : 1 Ala
	VPG<u>X</u>G	6 Val : 2 Gly : 2 Ala
	VPG<u>X</u>G	6 Val : 1 Gly : 3 Ala
	VPG<u>X</u>G	6 Val : 0 Gly : 4 Ala
	VPG<u>X</u>G	7 Val : 3 Gly : 0 Ala
	VPG<u>X</u>G	7 Val : 2 Gly : 1 Ala
	VPG<u>X</u>G	7 Val : 1 Gly : 2 Ala
	VPG<u>X</u>G	7 Val : 0 Gly : 3 Ala
	VPG<u>X</u>G	8 Val : 2 Gly : 0 Ala
	VPG<u>X</u>G	8 Val : 0 Gly : 2 Ala
	VPG<u>X</u>G	8 Val : 1 Gly : 1 Ala
	VPG<u>X</u>G	9 Val : 1 Gly : 1 Ala
	VPG<u>X</u>G	9 Val : 0 Gly : 1 Ala
4 シリーズ	VPG<u>X</u>G	10 Val : 0 Gly : 0 Ala

【００３５】

一部の実施形態では、ＥＬＰはβターン構造を形成することができる。βターン構造を形成するのに適する例示的なペプチド配列は、国際特許出願ＰＣＴ／ＵＳ９６／０５１８６に記載され、それはここに参照により完全に組み込まれる。例えば、配列ＶＰＧＸＧ（配列番号３）の第４の残基（Ｘ）は、βターンの形成を排除することなく変更することができる。

【００３６】

例示的なＥＬＰの構造は、表記ＥＬＰ$_k$［Ｘ$_i$Ｙ$_j$－ｎ］を使用して記載することができ、ここで、ｋは特定のＥＬＰ反復配列単位を指定し、括弧中の大文字は一文字アミノ酸コードであり、それらの対応する下付き文字は構造単位中の各ゲスト残基Ｘの相対比を指定し（該当する場合）、ｎはＥＬＰの全長を構造反復配列の数で記載する。例えば、ＥＬＰ１［Ｖ$_5$Ａ$_2$Ｇ$_3$－１０］は、ペンタペプチドＶＰＧＸＧ（配列番号３）の１０反復単位を含有するＥＬＰ成分を指定し、ここでＸは約５：２：３の相対比のバリン、アラニンおよびグリシンであり；ＥＬＰ１［Ｋ$_1$Ｖ$_2$Ｆ$_1$－４］は、ペンタペプチドＶＰＧＸＧ（配列番号３）の４反復単位を含有するＥＬＰ成分を指定し、ここでＸは約１：２：１の相対比のリジン、バリンおよびフェニルアラニンであり；ＥＬＰ１［Ｋ$_1$Ｖ$_7$Ｆ$_1$－９］は、ペンタペプチドＶＰＧＸＧ（配列番号３）の９反復単位を含有するポリペプチドを指定し、ここでＸは約１：７:１の相対比のリジン、バリンおよびフェニルアラニンであり；ＥＬＰ１［Ｖ－５］は、ペンタペプチドＶＰＧＸＧ（配列番号３）の５反復単位を含有するポリペプチドを指定し、ここでＸはバリンであり；ＥＬＰ１［Ｖ－２０］は、ペンタペプチドＶＰＧＸＧ（配列番号３）の２０反復単位を含有するポリペプチドを指定し、ここでＸはバリンであり；ＥＬＰ２［５］は、ペンタペプチドＡＶＧＶＰ（配列番号４）の５

反復単位を含有するポリペプチドを指定し；ＥＬＰ３［Ｖ－５］は、ペンタペプチドＩＰＧＸＧ（配列番号５）の５反復単位を含有するポリペプチドを指定し、ここでＸはバリンであり；ＥＬＰ４［Ｖ－５］は、ペンタペプチドＬＰＧＸＧ（配列番号７）の５反復単位を含有するポリペプチドを指定し、ここでＸはバリンである。

【００３７】

ＥＬＰに関して、Ｔｔはゲスト残基の疎水性の関数である。したがって、ゲスト残基（複数可）の同一性およびそれらのモル分率（複数可）を変えることによって、広い範囲にわたって逆転移を示すＥＬＰを合成することができる。したがって、ＥＬＰ配列により大きな分率の疎水性ゲスト残基を組み込むことによって、所与のＥＬＰ長のＴｔを低下させることができる。適する疎水性ゲスト残基の例には、バリン、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、トリプトファンおよびメチオニンが含まれる。中程度疎水性であるチロシンを、使用することもできる。反対に、グルタミン酸、システイン、リジン、アスパラギン酸、アラニン、アスパラギン、セリン、トレオニン、グリシン、アルギニンおよびグルタミンから選択されるものなどの残基を組み込むことによって、Ｔｔを増加させることができる。

【００３８】

分子量が１００，０００を超えるポリペプチドについては、ＰＣＴ／ＵＳ９６／０５１８６（ここに参照により完全に組み込まれる）に開示される疎水性スケールは、特定のＥＬＰ配列のおよそのＴｔを予測するための１つの手段を提供する。分子量が１００，０００未満のポリペプチドについては、Ｔｔは以下の二次関数：Ｔｔ＝Ｍ０＋Ｍ１Ｘ＋Ｍ２Ｘ２によって予測または判定することができ、ここでＸは融合タンパク質のＭＷであり、Ｍ０＝１１６．２１；Ｍ１＝－１．７４９９；Ｍ２＝０．０１０３４９である。

【００３９】

一部の実施形態では、ＥＬＰは、製剤条件で約１０～約３７℃、例えば約２０～約３７℃、または約２５℃～約３７℃の範囲のＴｔを提供するように選択または設計される。一部の実施形態では、わずかに低い末梢体温を考慮すると、生理的条件（例えば、０．９％食塩水）での転移温度は約３４℃～３６℃である。

【００４０】

ある特定の実施形態では、ＥＬＰは［ＶＰＧＸＧ］$_{m}$を含み、ここでｍは１～２００の任意の数である。ある特定の実施形態では、ＥＬＰは［ＶＰＧＸＧ］$_{m}$を含み、ここでｍは１～２００の任意の数であり、各ＸはＶ、ＧおよびＡから選択される。ある特定の実施形態では、ＥＬＰは［ＶＰＧＸＧ］$_{m}$を含み、ここでｍは１～２００の任意の数であり、各ＸはＶ、ＧおよびＡから選択され、Ｖ：Ｇ：Ａの比は約５：３：２であってよい。ある特定の実施形態では、ＥＬＰは［ＶＰＧＸＧ］$_{90}$を含み、ここで各ＸはＶ、ＧおよびＡから選択され、Ｖ：Ｇ：Ａの比は約５：３：２であってよい。例えば、体温で水素結合マトリックスを形成することが可能なアミノ酸配列は［ＶＰＧＸＧ］$_{120}$を含み、ここで各ＸはＶ、ＧおよびＡから選択され、Ｖ：Ｇ：Ａの比は約５：３：２であってよい。本明細書に示されるように、このＥＬＰの１２０の構造単位は、約５～１５ｍｇ／ｍｌ（例えば、約１０ｍｇ／ｍｌ）のタンパク質で約３７℃の転移温度を提供することができる。約５０～約１００ｍｇ／ｍＬの濃度で、相転移温度は摂氏約３５．５度（体温のすぐ下）であり、それは末梢体温が３７℃のすぐ下であることを可能にする。一部の実施形態では、ＥＬＰは［ＶＰＧＸＧ］$_{144}$を含むことができ、ここで各ＸはＶ、ＧおよびＡから選択され、Ｖ：Ｇ：Ａの比は約５：３：２であってよい。一部の実施形態では、ＥＬＰは［ＶＰＧＸＧ］$_{180}$を含み、ここで各ＸはＶ、ＧおよびＡから選択され、Ｖ：Ｇ：Ａの比は約５：３：２であってよい。

【００４１】

ある特定の実施形態では、ＥＬＰは［ＶＰＧＸＧ］$_{m}$を含み、ここでｍは１～２００の任意の数であり、各ＸはＶ、ＧおよびＡから選択され、Ｖ：Ｇ：Ａの比は約７：２：０である。ある特定の実施形態では、ＥＬＰは［ＶＰＧＸＧ］$_{90}$を含み、ここで各ＸはＶ、ＧおよびＡから選択され、Ｖ：Ｇ：Ａの比は約７：２：０である。ある特定の実施形態で

は、ＥＬＰは［ＶＰＧＸＧ］$_{120}$を含み、ここで各ＸはＶ、ＧおよびＡから選択され、Ｖ：Ｇ：Ａの比は約７：２：０である。ある特定の実施形態では、ＥＬＰは［ＶＰＧＸＧ］$_{144}$を含み、ここで各ＸはＶ、ＧおよびＡから選択され、Ｖ：Ｇ：Ａの比は約７：２：０である。ある特定の実施形態では、ＥＬＰは［ＶＰＧＸＧ］$_{180}$を含み、ここで各ＸはＶ、ＧおよびＡから選択され、Ｖ：Ｇ：Ａの比は約７：２：０である。

【００４２】

ある特定の実施形態では、ＥＬＰは［ＶＰＧＸＧ］$_{m}$を含み、ここでｍは１～２００の任意の数であり、各ＸはＶ、ＧおよびＡから選択され、Ｖ：Ｇ：Ａの比は約７：０：２である。ある特定の実施形態では、ＥＬＰは［ＶＰＧＸＧ］$_{90}$を含み、ここで各ＸはＶ、ＧおよびＡから選択され、Ｖ：Ｇ：Ａの比は約７：０：２である。ある特定の実施形態では、ＥＬＰは［ＶＰＧＸＧ］$_{120}$を含み、ここで各ＸはＶ、ＧおよびＡから選択され、Ｖ：Ｇ：Ａの比は約７：０：２である。ある特定の実施形態では、ＥＬＰは［ＶＰＧＸＧ］$_{144}$を含み、ここで各ＸはＶ、ＧおよびＡから選択され、Ｖ：Ｇ：Ａの比は約７：０：２である。ある特定の実施形態では、ＥＬＰは［ＶＰＧＸＧ］$_{180}$を含み、ここで各ＸはＶ、ＧおよびＡから選択され、Ｖ：Ｇ：Ａの比は約７：０：２である。

【００４３】

ある特定の実施形態では、ＥＬＰは［ＶＰＧＸＧ］$_{m}$を含み、ここでｍは１～２００の任意の数であり、各ＸはＶ、ＧおよびＡから選択され、Ｖ：Ｇ：Ａの比は約６：０：３である。ある特定の実施形態では、ＥＬＰは［ＶＰＧＸＧ］$_{90}$を含み、ここで各ＸはＶ、ＧおよびＡから選択され、Ｖ：Ｇ：Ａの比は約６：０：３である。ある特定の実施形態では、ＥＬＰは［ＶＰＧＸＧ］$_{120}$を含み、ここで各ＸはＶ、ＧおよびＡから選択され、Ｖ：Ｇ：Ａの比は約６：０：３である。ある特定の実施形態では、ＥＬＰは［ＶＰＧＸＧ］$_{144}$を含み、ここで各ＸはＶ、ＧおよびＡから選択され、Ｖ：Ｇ：Ａの比は約６：０：３である。ある特定の実施形態では、ＥＬＰは［ＶＰＧＸＧ］$_{180}$を含み、ここで各ＸはＶ、ＧおよびＡから選択され、Ｖ：Ｇ：Ａの比は約６：０：３である。

【００４４】

ある特定の実施形態では、ＥＬＰは［ＶＰＧＸＧ］$_{m}$を含み、ここでｍは１～２００の任意の数であり、各ＸはＶ、ＧおよびＡから選択され、Ｖ：Ｇ：Ａの比は約５：２：２である。ある特定の実施形態では、ＥＬＰは［ＶＰＧＸＧ］$_{90}$を含み、ここで各ＸはＶ、ＧおよびＡから選択され、Ｖ：Ｇ：Ａの比は約５：２：２である。ある特定の実施形態では、ＥＬＰは［ＶＰＧＸＧ］$_{120}$を含み、ここで各ＸはＶ、ＧおよびＡから選択され、Ｖ：Ｇ：Ａの比は約５：２：２である。ある特定の実施形態では、ＥＬＰは［ＶＰＧＸＧ］$_{144}$を含み、ここで各ＸはＶ、ＧおよびＡから選択され、Ｖ：Ｇ：Ａの比は約５：２：２である。ある特定の実施形態では、ＥＬＰは［ＶＰＧＸＧ］$_{180}$を含み、ここで各ＸはＶ、ＧおよびＡから選択され、Ｖ：Ｇ：Ａの比は約５：２：２である。

【００４５】

ある特定の実施形態では、ＥＬＰは［ＸＰＧＶＧ］$_{m}$を含み、ここでｍは１～２００の任意の数である。ある特定の実施形態では、ＥＬＰは［ＸＰＧＶＧ］$_{m}$を含み、ここでｍは１～２００の任意の数であり、各ＸはＶ、ＧおよびＡから選択される。ある特定の実施形態では、ＥＬＰは［ＸＰＧＶＧ］$_{m}$を含み、ここでｍは１～２００の任意の数であり、各ＸはＶ、ＧおよびＡから選択され、Ｖ：Ｇ：Ａの比は約５：０：４である。ある特定の実施形態では、ＥＬＰは［ＸＰＧＶＧ］$_{90}$を含み、ここで各ＸはＶ、ＧおよびＡから選択され、Ｖ：Ｇ：Ａの比は約５：０：４である。ある特定の実施形態では、ＥＬＰは［ＸＰＧＶＧ］$_{120}$を含み、ここで各ＸはＶ、ＧおよびＡから選択され、Ｖ：Ｇ：Ａの比は約５：０：４である。ある特定の実施形態では、ＥＬＰは［ＸＰＧＶＧ］$_{144}$を含み、ここで各ＸはＶ、ＧおよびＡから選択され、Ｖ：Ｇ：Ａの比は約５：０：４である。ある特定の実施形態では、ＥＬＰは［ＸＰＧＶＧ］$_{180}$を含み、ここで各ＸはＶ、ＧおよびＡから選択され、Ｖ：Ｇ：Ａの比は約５：０：４である。

【００４６】

ある特定の実施形態では、ＥＬＰは［ＶＰＧＶＧ］$_{m}$を含み、ここでｍは１～２００の

任意の数である。一部の実施形態では、ＥＬＰは［ＶＰＧＶＧ］$_{90}$または［ＶＰＧＶＧ］$_{120}$を含む。本明細書に示されるように、このＥＬＰの１２０構造単位は、約０．００５～約０．０５ｍｇ／ｍｌ（例えば、約０．０１ｍｇ／ｍｌ）のタンパク質で約３７℃の転移温度を提供することができる。あるいは、ＥＬＰは［ＶＰＧＸＧ］$_{144}$または［ＸＰＧＶＧ］$_{144}$を含む。本明細書に示される（表２）ように、これらのＥＬＰのいずれかの１４４構造単位は、両端を含む２８℃～３５℃の転移温度を提供することができる。

【００４７】

様々な実施形態では、意図される対象はヒトであり、体温は約３７℃であり、したがって、治療剤はこの温度（例えば約２８℃から約３７℃まで）でまたはその近くで持続的放出を提供するように設計される。水素結合および／または疎水性相互作用の反転による循環への徐放性は、体温が一定であっても、製品が注射部位で拡散するときの濃度の低下によって推進される。他の実施形態では、対象は非ヒト哺乳動物であり、治療剤は、一部の実施形態では、例えばある特定の飼いならされたペット（例えば、イヌまたはネコ）または畜産動物（例えば、ウシ、ウマ、ヒツジまたはブタ）については約３０～約４０℃であってよい哺乳動物の体温で持続的放出を示すように設計される。一般的に、治療剤が注射のために溶液のままであるように、Ｔｔは製剤の保存条件（１０～約２５℃、または１５～２２℃であってよい）より高い。

【００４８】

一部の実施形態では、ＥＬＰは、両端を含む２７℃～３６℃の範囲で、転移温度を提供することができる。一部の実施形態では、ＥＬＰは、両端を含む２８℃～３５℃の範囲で、転移温度を提供することができる。一部の実施形態では、ＥＬＰは、両端を含む２９℃～３４℃の範囲で、転移温度を提供することができる。一部の実施形態では、ＥＬＰは、両端を含む２７℃～３３℃の範囲で、転移温度を提供することができる。一部の実施形態では、ＥＬＰは、両端を含む３０℃～３３℃の範囲で、転移温度を提供することができる。一部の実施形態では、ＥＬＰは、両端を含む３１℃～３１℃の範囲で、転移温度を提供することができる。一部の実施形態では、ＥＬＰは、２７℃、２８℃、２９℃、３０℃、３１℃、３２℃、３３℃、３４℃、３５℃または３６℃の転移温度を提供することができる。一部の実施形態では、ＥＬＰは、１１０ｍＭのＮａＣｌ中に１０ｍｇ／ｍＬのタンパク質濃度で、両端を含む２８℃～３５℃の範囲で転移温度を提供することができる。

【００４９】

エラスチン様ペプチド（ＥＬＰ）タンパク質ポリマーおよび組換え融合タンパク質は、ここに参照により組み込まれる、米国特許出願公開第２０１０／００２２４５５号に記載されている通りに調製することができる。一部の実施形態では、ＥＬＰタンパク質ポリマーは、任意の配列および広範囲の分子量にわたる特定の長さの高度に反復性のポリペプチドをコードするＤＮＡを急速にクローニングするために、反復ライゲーションを通して構築される。単一のサイクルでは、各々オリゴマーのコピーを含有する親プラスミドの２つの半分を一緒にライゲーションし、それによってオリゴマーを二量体化して機能的プラスミドを再構成する。所望の数の反復配列を有するオリゴマー遺伝子を組み立てるために、この過程を反復して実行する。例えば、１つのＥＬＰ構造サブユニット（例えば、ペンタペプチドまたはペンタペプチドの９量体）がベクターに挿入される。ベクターを消化し、別のＥＬＰ構造単位（例えば、ペンタペプチドまたはペンタペプチドの９量体）を挿入する。ＥＬＰポリマーが所望の長さになるまで、以降の各回の消化およびライゲーションは、結果として生じるベクターに含有されるＥＬＰ構造単位の数を倍増する。最初の構造単位中のペンタペプチドの数を変えることによって、様々な長さのＥＬＰを容易に構築することができる。ＥＬＰの代替の長さを生成するために、構築の代替手段（すなわち、反復ライゲーション以外の）を使用することができる。

【００５０】

一部の実施形態では、ベクターは１つまたは複数の追加のアミノ酸またはＥＬＰ構造単位反復配列を含有する。例えば、ｐＰＥ０２４８（図６）は、ゲスト位置にバリンを有す

る１４４量体のＮ末端に追加の五量体反復配列を、およびゲスト残基にトリプトファンを有するＣ末端に追加の五量体を追加する。分子の吸光係数を増加させ、例えば２８０ｎｍで吸光度のより優れた測定を可能にする手段としてトリプトファンを使用することができ、そのことはタンパク濃度の判定または精製中のタンパク含有量のモニタリングのために有益である可能性がある。いずれかの末端に追加される五量体は、コードするＤＮＡがＥＬＰコード配列のいずれかの末端への融合パートナーのクローニングのための制限酵素認識部位を含有するように、設計することもできる。

【００５１】

一部の実施形態では、治療剤は活性薬剤および１つまたは複数のＥＬＰを含む。一部の実施形態では、治療剤は、Ｎ末端またはＣ末端のいずれかに１つまたは複数のＥＬＰを有する活性薬剤を含む。一部の実施形態では、治療剤は、Ｎ末端またはＣ末端の両方に１つまたは複数のＥＬＰを有する活性薬剤を含む。一部の実施形態では、ＥＬＰは概ね同じサイズである。一部の実施形態では、ＥＬＰはサイズが異なる。一部の実施形態では、一方の末端のＥＬＰは、他方の末端のＥＬＰより大きい。一部の実施形態では、Ｎ末端のＥＬＰはＣ末端のＥＬＰより大きい。一部の実施形態では、Ｃ末端のＥＬＰはＮ末端のＥＬＰより大きい。

【００５２】

活性薬剤

ペプチド活性薬剤

様々な実施形態では、活性薬剤は、それ自体で短い循環半減期、例えば約３０秒～約１時間を有することができるタンパク質またはペプチドである。治療剤は、タンパク質活性薬剤と、対象の体温で水素結合マトリックスを形成することが可能なアミノ酸配列（例えば、ＥＬＰ）との間の組換え融合タンパク質であってもよい。任意の適当なペプチド活性薬剤を、本開示の治療剤で使用することができる。例示的なペプチド活性薬剤には、ＧＩＰ受容体アゴニスト、例えばグルコース依存性インスリン分泌性ペプチド（ＧＩＰ）またはその誘導体が含まれる。さらなる例示的なペプチド活性薬剤には、ＧＬＰ１受容体アゴニスト、例えばＧＬＰ－１またはその誘導体（ＧＬＰ１　７－３６またはＧＬＰ１　７－３７を含む）またはエキセンディン－４またはその誘導体が含まれる。他の実施形態では、タンパク質またはペプチド薬剤は、グルカゴン受容体アゴニストである（グルカゴン、オキシントモジュリンまたはその誘導体を含む）。他の実施形態では、本開示は、ＧＬＰ１受容体アゴニスト、グルカゴン受容体アゴニスト、ＧＩＰ受容体アゴニスト、ＶＰＡＣ２選択的アゴニスト、例えば血管作用性小腸ペプチド（ＶＩＰ）もしくはその誘導体、凝固因子、例えば第ＶＩＩ因子、第ＶＩＩＩ因子もしくは第ＩＸ因子、インスリン（例えば、ここに参照により組み込まれる、米国特許出願公開第２０１３／０１５０２９１号に記載される、単鎖インスリンまたはＡ鎖もしくはＢ鎖融合タンパク質）、またはモノクローナル抗体もしくは単鎖抗体のうちの任意の２つの共製剤を提供する。あるいは、活性薬剤は、ここに参照により組み込まれる、米国特許出願公開第２０１１／０１２３４８７号に記載されている通りである。

【００５３】

タンパク質治療薬の半減期は、タンパク質治療薬のサイズ、したがって流体力学的な量を増加させること、改変されたか非天然のアミノ酸を追加すること、部分のコンジュゲーション（例えばペグ化）、合成配列（例えば、ＸＴＥＮ（登録商標）配列、ＰＡＳｙｌａｔｉｏｎ（登録商標））の付加、ｈＣＧからのカルボキシ末端伸長（ＣＴＰ）、アルブミン結合性配列（例えばＡｌｂｕｄＡｂ（登録商標））の付加、アルブミン結合性脂肪酸のコンジュゲーション、翻訳後修飾、例えばＮ－グリコシル化および他のペプチドへの融合、または哺乳動物の異種タンパク質、例えばアルブミン、トランスフェリンもしくは抗体Ｆｃ配列との融合を含む、様々な手段によって延長することができる。そのような配列は、米国特許第７，２３８，６６７号（特にアルブミン抱合体に関する）、米国特許第７，１７６，２７８号（特にトランスフェリンコンジュゲートに関する）および米国特許第５，７６６，８８３号に記載される。

【００５４】
一部の実施形態では、本開示は、本明細書に開示される１つまたは複数の活性ペプチド薬剤の誘導体、変異体または突然変異体を提供する。一部の実施形態では、誘導体、変異体または突然変異体は、天然の治療的ペプチド薬剤のアミノ酸配列と比較して、１つまたは複数のアミノ酸置換を含有する。一部の実施形態では、１～２０アミノ酸が置換される。一部の実施形態では、誘導体、変異体または突然変異体は、天然の治療的ペプチド薬剤のアミノ酸配列と比較して、約１つ、約２つ、約３つ、約４つ、約５つ、約６つ、約７つ、約８つ、約９つまたは約１０個のアミノ酸置換を含有する。一部の実施形態では、誘導体、変異体または突然変異体は、天然の治療的ペプチド薬剤のアミノ酸配列と比較して、１つまたは複数のアミノ酸欠失を含有する。一部の実施形態では、天然の治療的ペプチド薬剤のアミノ酸配列と比較して１～２０アミノ酸が欠失している。一部の実施形態では、誘導体、変異体または突然変異体は、天然の治療的ペプチド薬剤のアミノ酸配列と比較して、約１つ、約２つ、約３つ、約４つ、約５つ、約６つ、約７つ、約８つ、約９つまたは約１０個のアミノ酸欠失を有する。一部の実施形態では、天然の治療的ペプチド薬剤のアミノ酸配列と比較していずれかの末端で１～１０アミノ酸が欠失している。一部の実施形態では、天然の治療的ペプチド薬剤のアミノ酸配列と比較して両方の末端から１～１０アミノ酸が欠失している。一部の実施形態では、誘導体、変異体または突然変異体のアミノ酸配列は、天然のペプチド治療剤のアミノ酸配列と少なくとも約７０％同一である。一部の実施形態では、誘導体、変異体または突然変異体のアミノ酸配列は、天然の治療的ペプチド薬剤のアミノ酸配列と約７０％、約８０％、約８５％、約９０％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％または約９９％同一である。

【００５５】
同一性の判定方法は、当技術分野で周知である。同一性を判定する好ましい方法は、試験する配列の間で最良の一致を与えるように設計される。同一性および類似性を判定する方法は、公に入手できるコンピュータープログラムに体系化されている。配列アラインメントおよび同一性パーセントの計算は、「アラインメントのＣｌｕｓｔａｌ　Ｗ方法」（HigginsおよびSharp、CABIOS. 5:151-153（1989）；Higgins, D. G.ら、Comput. Appl. Biosci. 8:189-191（1992）によって記載される）を使用して実行することができ、ＬＡＳＥＲＧＥＮＥ　ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ　ｃｏｍｐｕｔｉｎｇ　ｓｕｉｔｅ（DNASTAR Inc.）のＭｅｇＡｌｉｇｎ（商標）ｖ６．１プログラムに見出される。複数のアラインメントのためのデフォルトパラメータ（GAP PENALTY=10、GAP LENGTH PENALTY=0.2、Delay Divergen Seqs（%）=30、DNA Transition Weight=0.5、Protein Weight Matrix=Gonnet Series、DNA Weight Matrix=IUB）。Ｃｌｕｓｔａｌ　Ｗプログラムを使用した配列のアラインメントの後、同じプログラムの「配列距離」表を見ることによって「同一性パーセント」を得ることが可能である。

【００５６】
一部の実施形態では、本開示は、本明細書に開示される任意の２つ以上の活性薬剤の共製剤を提供する。一部の実施形態では、共製剤は２つ以上のペプチド活性薬剤および小分子活性薬剤を含む。一部の実施形態では、共製剤は２つ以上の小分子活性薬剤を含む。一部の実施形態では、共製剤は２つ以上のペプチド活性薬剤を含む。一部の実施形態では、ペプチド活性薬剤は、インスリンまたはその誘導体、およびＧＬＰ－１受容体アゴニストまたはその誘導体である。一部の実施形態では、ペプチド活性薬剤は、インスリンまたはその誘導体、およびエキセンディン－４またはその誘導体である。一部の実施形態では、共製剤中の活性薬剤の１つまたは複数は、ＥＬＰにコンジュゲートしていない。一部の実施形態では、共製剤中の活性薬剤の全ては、ＥＬＰにコンジュゲートしている。

【００５７】
グルカゴン様ペプチド（ＧＬＰ）－１受容体アゴニスト
本開示のある特定の実施形態では、治療剤は、ＧＬＰ－１受容体アゴニスト、例えばＧＬＰ－１、エキセンディン－４またはその機能的類似体に融合またはコンジュゲートしているＥＬＰ成分を含む。

【００５８】
ヒトＧＬＰ－１は、遠位回腸、膵臓および脳のＬ細胞で合成されるプレプログルカゴンを起源とする３７アミノ酸残基ペプチドである。ＧＬＰ－１（７－３６）アミド、ＧＬＰ－１（７－３７）およびＧＬＰ－２を与えるプレプログルカゴンのプロセシングは、Ｌ細胞で主に起こる。このペプチドの断片および類似体を記載するために、単純な系が使用される。例えば、$Ｇｌｙ^{8}$－ＧＬＰ－１（７－３７）は、アミノ酸残基番号１～６を欠失させ、８位の天然に存在するアミノ酸残基（Ａｌａ）をＧｌｙによって置換することによってＧＬＰ－１から形式的に導かれるＧＬＰ－１の断片を指定する。同様に、$Ｌｙｓ^{34}$（$Ｎ^{\varepsilon}$－テトラデカノイル）－ＧＬＰ－１（７－３７）は、３４位のＬｙｓ残基のεアミノ基がテトラデカノイル化されているＧＬＰ－１（７－３７）を指定する。本文でＣ末端伸長ＧＬＰ－１類似体に言及する場合、３８位のアミノ酸残基は、別段の指示がない限りＡｒｇであり、３９位の任意選択のアミノ酸残基は、別段の指示がない限り同様にＡｒｇであり、４０位の任意選択のアミノ酸残基は、別段の指示がない限りＡｓｐである。さらに、Ｃ末端伸長類似体が４１、４２、４３、４４または４５位まで伸長する場合は、この伸長のアミノ酸配列は、別段の指示がない限りヒトプレプログルカゴン中の対応配列の通りである。

【００５９】
ＧＬＰ－１の親ペプチド、プログルカゴン（ＰＧ）は、膵臓ではグルカゴン（ＰＧ［３２－６２］）およびＧＬＰ－１［７－３６］$ＮＨ_{2}$（ＰＧ［７２－１０７］）ならびに腸のＬ細胞ではＧＬＰ－１［７－３７］（ＰＧ［７８－１０８］）およびＧＬＰ－１［７－３６］$ＮＨ_{2}$（ＰＧ［７８－１０７］）を含む、起源組織によって様々なペプチド生成物を生成するいくつかの開裂部位を有し、ここで、ＧＬＰ－１［７－３６］$ＮＨ_{2}$（７８－１０７ＰＧ）が主要生成物である。本開示によるＧＬＰ－１成分はプログルカゴンまたはその機能的類似体の任意の生物学的に活性な生成物または誘導体であってもよく、例えば以下のものが含まれる：ＧＬＰ－１（１－３５）、ＧＬＰ－１（１－３６）、ＧＬＰ－１（１－３６）アミド、ＧＬＰ－１（１－３７）、ＧＬＰ－１（１－３８）、ＧＬＰ－１（１－３９）、ＧＬＰ－１（１－４０）、ＧＬＰ－１（１－４１）、ＧＬＰ－１（７－３５）、ＧＬＰ－１（７－３６）、ＧＬＰ－１（７－３６）アミド、ＧＬＰ－１（７－３７）、ＧＬＰ－１（７－３８）、ＧＬＰ－１（７－３９）、ＧＬＰ－１（７－４０）およびＧＬＰ－１（７－４１）または上述の類似体。一般的に、一部の実施形態ではＧＬＰ－１成分はＧＬＰ－１（Ａ－Ｂ）と表すことができ、ここで、Ａは１～７の整数であり、Ｂは３８～４５の整数であり、任意選択的に、以下に規定される１つまたは複数のアミノ酸置換を有する。

【００６０】
腸Ｌ細胞でのプロセシングの後、最も注目すべきことに食事に応答して、ＧＬＰ－１が循環に放出される。ＧＬＰ－１の血漿中濃度は、概ね１５ｐｍｏｌ／Ｌの空腹時レベルから４０ｐｍｏｌ／Ｌの食後のピークレベルまで上昇する。血漿中グルコース濃度の所与の上昇に関して、血漿中インスリンの増加は、静脈内と比較して経口的にグルコースが投与されるときに概ね３倍大きい（Kreymannら、1987、Lancet 2 (8571): 1300-4）。インクレチン効果として知られるインスリン放出のこの食物性増強は主に体液性であり、現在、ＧＬＰ－１はヒトで最も強力な生理的インクレチンであると考えられている。ＧＬＰ－１は、膵臓のβ細胞で発現されることが知られているＧＬＰ－１受容体に結合することを通してインスリン生成を媒介する。インスリン分泌促進効果に加えて、ＧＬＰ－１はグルカゴン分泌を抑制し、胃内容排出を遅らせ（Wettergenら、1993、Dig Dis Sci 38: 665-73）、末梢グルコース廃棄を増強することができる（D'Alessioら、1994、J. Clin Invest 93: 2293-6）。

【００６１】
作用の組合せは、インスリン非依存性真性糖尿病（ＮＩＤＤＭ）を治療するために現在使用されている他の薬剤に比べて、ＧＬＰ－１に特異な治療的利点を与える。第１に、ＧＬＰ－１の単一の皮下投与は、ＮＩＤＤＭ患者で食後グルコースレベルを完全に正常化す

ることができる（Gutniakら、1994、Diabetes Care 17: 1039-44）。この効果は、インスリン放出の増加およびグルカゴン分泌の低減の両方が媒介することができる。第２に、ＧＬＰ－１の静脈内注入は、ＮＩＤＤＭ患者で食後の胃内容排出を遅らせることができる（Williamsら、1996、J. Clin Endo Metab 81: 327-32）。第３に、スルホニル尿素と異なって、ＧＬＰ－１のインスリン分泌作用は、血漿中グルコース濃度に依存する（Holzら、1993、Nature 361:362-5）。したがって、低い血漿中グルコース濃度でのＧＬＰ－１媒介インスリン放出の減少は、重度の低血糖から保護する。

【００６２】

健康な対象に与えられると、ＧＬＰ－１は、血糖レベルならびにインスリンおよびグルカゴン濃度に強力に影響し（Orskov、1992、Diabetologia 35:701-11）、これはグルコース依存性の影響である（Weirら、1989、Diabetes 38: 338-342）。さらに、それは糖尿病患者でも有効であり（Gutniak, M.、1992、N. Engl J Med 226: 1316-22）、２型糖尿病の対象で血糖レベルを正常化し、１型患者で血糖管理を改善する（Nauckら、1993、Diabetologia 36: 741-4、Creutzfeldtら、1996、Diabetes Care 19:580-6）。

【００６３】

しかし、ＧＬＰ－１は代謝的に不安定であり、ｉｎ　ｖｉｖｏでわずか１～２分の血漿中半減期（$t_{1/2}$）を有する。さらに、外因的に投与されたＧＬＰ－１も急速に分解される（Deaconら、1995、Diabetes 44: 1126-31）。この代謝不安定性は、天然のＧＬＰ－１の治療的潜在能力を制限してきた。

【００６４】

ＧＬＰ－１［７－３６］NH_2は、以下のアミノ酸配列：ＨＡＥＧＴＦＴＳＤＶＳＳＹＬＥＧＱＡＡＫＥＦＩＡＷＬＶＫＧＲ（配列番号３８）を有し、それは、本開示によりＧＬＰ－１成分として用いることができる。あるいは、ＧＬＰ－１成分は２位にグリシン（Ｇ）を含有することができ、例えば、配列ＨＧＥＧＴＦＴＳＤＶＳＳＹＬＥＧＱＡＡＫＥＦＩＡＷＬＶＫＧＲ（配列番号３９）を与える。ＧＬＰ－１成分は、例えばここに参照により完全に組み込まれる、ＵＳ２００７／００４１９５１に開示されるように、ＧＬＰ－１の生物学的に活性な断片であってもよい。ＧＬＰ－１の他の断片および改変配列が、当技術分野で公知である（米国特許第５，６１４，４９２号；米国特許第５，５４５，６１８号；欧州特許出願公開番号ＥＰ０６５８５６８　Ａ１；国際公開第９３／２５５７９号、これらはここに参照により完全に組み込まれる）。そのような断片および改変配列は、下に記載されるものに加えて本開示に関連して使用することができる。

【００６５】

ＧＬＰ－１のある特定の構造的および機能的類似体がアメリカドクトカゲ（Heloderma suspectumおよびHeloderma horridum）の毒から単離され、臨床有用性を示した。そのような分子は、本開示により利用できる。特に、エキセンディン－４はＨｅｌｏｄｅｒｍａ　ｓｕｓｐｅｃｔｕｍの毒から単離された３９アミノ酸残基ペプチドであり、ヒトＧＬＰ－１と概ね５２％の相同性を共有する。エキセンディン－４はインスリン放出を刺激し、それによって血糖レベルを低下させる強力なＧＬＰ－１受容体アゴニストである。エキセンディン－４は、以下のアミノ酸配列を有する：ＨＧＥＧＴＦＴＳＤＬＳＫＱＭＥＥＥＡＶＲＬＦＩＥＷＬＫＮＧＧＰＳＳＧＡＰＰＰＳ（配列番号２３）。エキセナチド（Ｂｙｅｔｔａ（登録商標）として市販される）として知られるエキセンディン－４の合成版は、２型糖尿病の治療のために承認されている。エキセナチドは天然のＧＬＰ－１に構造的に類似しているが、それは注射後のより長い半減期を有する。

【００６６】

エキセナチドは単独で血糖レベルを低下させる能力を有するが、グルコース管理を改善するために、それは他の医薬品、例えばメトホルミン、チオゾリジンジオン、スルホニル尿素、および／またはインスリンと組み合わせることもできる。エキセナチドは、前充填されたペン器具(pre-filled pen device)を用いて、１日に２回、皮下注射によって投与される。エキセナチドへの一般的なヒト応答には、内因性インスリンの初期の急速な放出の改善、β細胞成長および増殖の増加、膵臓のグルカゴン放出の抑制、胃内容排出の遅延

、および食欲の低減が含まれる－これらの全ては血糖を下げる働きをする。スルホニル尿素およびメグリチニドと異なって、エキセナチドはグルコースの存在下だけでインスリンの合成および分泌を増加させ、したがって、低血糖のリスクを少なくする。エキセナチドの治療的有用性にもかかわらず、それはある特定の望ましくない形質、例えば、１日２回の注射の必要性、胃腸副作用、および天然のＧＬＰ－１と同様の比較的短い半減期（すなわち、概ね２時間）を有する。

【００６７】

ＧＬＰ－１およびエキセンディン－４の様々な機能的類似体が公知であり、本開示により利用できる。これらには、リラグルチド（Novo Nordisk、国際公開第９８／００８８７１号）、Ｒ１５８３／タスポグルチド（Roche、国際公開第００／０３４３３１号）、ＣＪＣ－１１３１（ConjuChem、国際公開第００／０６９９１１号）、ＺＰ－１０／ＡＶＥ００１０（Zealand Pharma、Sanofi-Aventis、国際公開第０１／００４１５６号）およびＬＹ５４８８０６（Eli Lilly、国際公開第０３／０１８５１６号）が含まれる。

【００６８】

ＮＮ２２１１としても知られるリラグルチドは、１日１回の注射のために設計されたＧＬＰ－１受容体アゴニスト類似体である（Harderら、2004、Diabetes Care 27: 1915-21）。リラグルチドはいくつかの研究において２型糖尿病患者で試験され、様々な期間にわたって有効であることが示されている。１つの研究では、リラグルチドによる治療は、１週間の治療の後に、２型糖尿病患者で血糖管理を改善し、β細胞機能を改善し、内因性グルコース放出を低減した（Degn et al., 2004, Diabetes 53: 1187-94）。類似の研究で、８週間の０．６ｍｇリラグルチド療法は、プラセボの者と比較して２型糖尿病の対象で体重を増加させることなく血糖管理を有意に改善した（Harderら、2004、Diabetes Care 27: 1915-21）。

【００６９】

したがって、ある特定の実施形態では、本開示によるＧＬＰ－１受容体アゴニストは、ここに参照により完全に組み込まれる国際公開第９８／００８８７１号に記載されている通りである。ＧＬＰ－１受容体アゴニストは、天然のＧＬＰ－１に関して１つ、２つまたはそれを超えるアミノ酸置換に加えて、少なくとも１つの親油性置換基を有することができる。例えば、親油性置換基は、$CH_3(CH_2)_nCO$－から選択されるアシル基であってよく、式中、ｎは４～３８の整数、例えば４～２４の整数である。親油性置換基は、直鎖または分枝状のアルキルまたは脂肪酸のアシル基であってよい（例えば、その記載はここに参照により組み込まれる、国際公開第９８／００８８７１号に記載されているように）。

【００７０】

ある特定の実施形態では、ＧＬＰ－１成分は、Arg^{26}－ＧＬＰ－１（７－３７）、Arg^{34}－ＧＬＰ－１（７－３７）、Lys^{36}－ＧＬＰ－１（７－３７）、$Arg^{26,34}Lys^{36}$－ＧＬＰ－１（７－３７）、$Arg^{26,34}Lys^{38}$－ＧＬＰ－１（７－３８）、$Arg^{28,34}Lys^{39}$－ＧＬＰ－１（７－３９）、$Arg^{26,34}Lys^{40}$－ＧＬＰ－１（７－４０）、$Arg^{26}Lys^{36}$－ＧＬＰ－１（７－３７）、$Arg^{34}Lys^{36}$－ＧＬＰ－１（７－３７）、$Arg^{26}Lys^{39}$－ＧＬＰ－１（７－３９）、$Arg^{34}Lys^{40}$－ＧＬＰ－１（７－４０）、$Arg^{26,34}Lys^{36,39}$－ＧＬＰ－１（７－３９）、$Arg^{26,34}Lys^{36,40}$－ＧＬＰ－１（７－４０）、$Gly^{8}Arg^{26}$－ＧＬＰ－１（７－３７）；$Gly^{8}Arg^{34}$－ＧＬＰ－１（７－３７）；$Gly^{8}Lys^{38}$－ＧＬＰ－１（７－３７）；$Gly^{8}Arg^{26,34}Lys^{36}$－ＧＬＰ－１（７－３７）、$Gly^{8}Arg^{26,34}Lys^{39}$－ＧＬＰ－１（７－３９）、$Gly^{8}Arg^{26,34}Lys^{40}$－ＧＬＰ－１（７－４０）、$Gly^{8}Arg^{26}Lys^{36}$－ＧＬＰ－１（７－３７）、$Gly^{8}Arg^{34}Lys^{36}$－ＧＬＰ－１（７－３７）、$Gly^{8}Arg^{26}Lys^{39}$－ＧＬＰ－１（７－３９）；$Gly^{8}Arg^{34}Lys^{40}$－ＧＬＰ－１（７－４０）、$Gly^{8}Arg^{28,34}Lys^{36,39}$－ＧＬＰ－１（７－３９）および$Gly^{8}Arg^{26,34}Lys^{3}$

^{5,40}－ＧＬＰ－１（７－４０）であり、各々は親油性置換基を任意選択的に有する。例えば、ＧＬＰ－１受容体アゴニストは、配列／構造Ａｒｇ^{34}Ｌｙｓ^{26}－（Ｎ－ε－（γ－Ｇｌｕ（Ｎ－α－ヘキサデカノイル））－ＧＬＰ－１（７－３７）を有することができる。

【００７１】

Ｒ１５８３またはＢＩＭ５１０７７としても知られるタスポグルチドは、メトホルミンで治療した２型真性糖尿病の対象で血糖管理を改善し、体重を減量することが示されたＧＬＰ－１受容体アゴニストである（アブストラクト番号A-1604、2008年6月7日、68th American Diabetes Association Meeting、San Francisco、CA）。

【００７２】

したがって、ある特定の実施形態では、ＧＬＰ－１受容体アゴニストは、ここに参照により完全に組み込まれる国際公開第００／０３４３３１号に記載されている通りである。ある特定の例示的な実施形態では、ＧＬＰ－１受容体アゴニストは、配列［Ａｉｂ^{8,35}］ｈＧＬＰ－１（７－３６）ＮＨ$_2$（例えばタスポグルチド）を有し、ここでＡｉｂはアルファアミノイソ酪酸である。

【００７３】

ＣＪＣ－１１３１は、皮下注射の後にＧＬＰ－１が血清アルブミンと共有結合性および不可逆的結合を形成することを可能にする反応性化学的リンカー基に連結される、ＧＬＰ－１のＤＰＰ－ＩＶ耐性形からなるＧＬＰ－１類似体である（Kimら、2003、Diabetes 52: 751-9）。１２週無作為化二重盲検プラセボ対照多施設研究では、ＣＪＣ－１１３１およびメトホルミン治療は、２型糖尿病患者で空腹時血糖レベルを低減することで有効だった（Ratnerら、アブストラクト番号10-OR、2005年6月10～14日、65th American Diabetes Association Meeting、San Francisco、CA）。

【００７４】

したがって、ある特定の実施形態では、ＧＬＰ－１受容体アゴニストは、ここに参照により完全に組み込まれる国際公開第００／０６９９１１号に記載されている通りである。一部の実施形態では、ＧＬＰ－１受容体アゴニストは、血液成分の上でアミノ基、ヒドロキシル基またはチオール基と反応して安定した共有結合を形成する反応性基で改変される。ある特定の実施形態では、ＧＬＰ－１受容体アゴニストは、スクシンイミジルおよびマレイミド基からなる群から選択される反応性基で改変される。ある特定の例示的な実施形態では、ＧＬＰ－１受容体アゴニストは、配列／構造：Ｄ－Ａｌａ^{8}Ｌｙｓ^{37}－（２－（２－（２－マレイミドプロピオンアミド（エトキシ）エトキシ）アセトアミド））－ＧＬＰ－１（７－３７）（例えばＣＪＣ－１１３１）を有する。

【００７５】

ＺＰ－１０としても知られるＡＶＥ００１０は、本開示に関連して用いることができるＧＬＰ－１受容体アゴニストである。近年の二重盲検試験では、ＡＶＥ００１０の１日１回の投薬で治療された患者は、ＨｂＡ１ｃレベルの有意な低減を実証した（Ratnerら、アブストラクト番号433-P、68th American Diabetes Association Meeting、San Francisco、CA.）。研究の終わりに、ＨｂＡ１ｃ＜７％の患者の百分率は、１日１回の投薬ではプラセボの３２％と比較して４７～６９％の範囲内だった。さらに、ＡＶＥ００１０治療患者は、体重および食後血漿中グルコースの用量依存的低減を示した。

【００７６】

したがって、ある特定の実施形態では、ＧＬＰ－１受容体アゴニストは、ここに参照により完全に組み込まれる国際公開第０１／００４１５６号に記載されている通りである。例えば、ＧＬＰ－１受容体アゴニストは、配列：ＨＧＥＧＴＦＴＳＤＬＳＫＱＭＥＥＥＡＶＲＬＦＩＥＷＬＫＮＧＧＰＳＳＧＡＰＰＳＫＫＫＫＫＫ－ＮＨ２（配列番号４１）（例えばＡＶＥ００１０）を有することができる。

【００７７】

ＬＹ５４８８０６は、ジペプチダーゼ－ペプチジルＩＶ（ＤＰＰ－ＩＶ）によるタンパク質分解に耐性であるように設計されたＧＬＰ－１誘導体である（Jacksonら、アブスト

ラクト番号562、2005年6月10～14日、65th American Diabetes Association Meeting、San Francisco、CA）。高血糖の動物モデルでは、ＬＹ５４８８０６は高血糖段階の間に血糖レベルの有意な低下をもたらすことが示された（Sahaら、2006、J. Pharm. Exp. Ther. 316: 1159-64）。さらに、ＬＹ５４８８０６は、その公知の作用機構、すなわち高血糖の存在下でのインスリン放出の刺激と一貫して、インスリンレベルの有意な増加をもたらすことが示された。

【００７８】

したがって、ある特定の実施形態では、ＧＬＰ－１受容体アゴニストは、ここに参照により完全に組み込まれる国際公開第０３／０１８５１６号に記載されている通りである。一部の実施形態では、本開示の治療剤はＧＬＰ－１類似体を含み、そこで、そのような類似体または断片の骨格は８位にアラニン以外のアミノ酸を含有する（８位類似体）。骨格は、７位にＬ－ヒスチジン、Ｄ－ヒスチジンまたはヒスチジンの改変形、例えば、デスアミノ－ヒスチジン、２－アミノ－ヒスチジン、β－ヒドロキシ－ヒスチジン、ホモヒスチジン、α－フルオロメチルヒスチジンまたはα－メチルヒスチジンを含むこともできる。一部の実施形態では、これらの８位類似体は、天然ＧＬＰ－１の対応するアミノ酸と比較して、１２、１６、１８、１９、２０、２２、２５、２７、３０、３３および３７位に１つまたは複数の追加の変更を含有することができる。他の実施形態では、これらの８位類似体は、天然ＧＬＰ－１の対応するアミノ酸と比較して、１６、１８、２２、２５および３３位に１つまたは複数の追加の変更を含有することができる。ある特定の例示的な実施形態では、ＧＬＰ－１受容体アゴニストは、配列：ＨＶＥＧＴＦＴＳＤＶＳＳＹＬＥＥＱＡＡＫＥＦＩＡＷＬＩＫＧＲＧ－ＯＨ（配列番号４２）（例えばＬＹ５４８８０６）を有する。一部の実施形態では、プロセシングされると、そのような融合タンパク質の成熟形はＧＬＰのＨｉｓ^{7}から始まる。

【００７９】

したがって、本開示は、エラスチン様ペプチド（ＥＬＰ）およびＧＬＰ－１受容体アゴニストを含む治療剤を提供する。例えば、ある特定の実施形態では、ＧＬＰ－１受容体アゴニストは、ＧＬＰ－１（配列番号３７、３８または３９）またはその機能的類似体である。他の実施形態では、ＧＬＰ－１受容体アゴニストは、エキセンディン－４（配列番号２３）またはその機能的類似体である。ＧＬＰ－１またはエキセンディン－４のそのような機能的類似体は、１～１０アミノ酸、例えば１、２、３または約５までのアミノ酸（配列番号２３、３７、３８または３９に関して）がＣ末端でトランケーションされた機能的断片を含む。そのような機能的類似体は、天然の配列（例えば、配列番号２３、３７、３８または３９）に関して１～１０アミノ酸の挿入、欠失および／または置換（総合的に）を含有することができ、いずれの場合も、ペプチドの活性は保持される。例えば、ＧＬＰ－１またはエキセンディン－４の機能的類似体は、配列番号２３、３７、３８または３９に関して、１から約３つ、４つまたは５つまでの挿入、欠失および／または置換（総合的に）を有することができる。一部の実施形態では、エキセンディン－４変異体は、エキセンディン－４（９－３９）（配列番号３３）、エキセンディン－４（９－３１）（配列番号３４）またはエキセンディン－４（９－３０）（配列番号５６）である。そのような活性は、任意の利用可能なアッセイを使用して確認または検査することができる。これらまたは他の実施形態では、ＧＬＰ－１受容体アゴニスト成分は、天然の配列（配列番号２３、３７、３８または３９）と少なくとも約５０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％または９９％の同一性を有する。そのような機能的類似体は、追加の化学的修飾、例えばこのセクションに記載のものおよび／または当技術分野で公知の他のものをさらに含むことができる。

【００８０】

一部の実施形態では、ＧＬＰ－１受容体アゴニストは、ここに参照により完全に組み込まれる、米国特許出願公開第２０１１／０２５７０９２号に記載されるアミノ酸配列を有する二重アゴニストである。他の二重または多重受容体アゴニストは、特にその中に記載されるＧＬＰ－１受容体共アゴニストの構造および配列に関して、米国特許出願公開第２

０１１／０１６６０２号および米国特許出願公開第２０１０／００１９０７０１号に記載され、その各々はここに参照により組み込まれる。ＧＬＰ－１受容体共アゴニストの追加の記載は、Ｐｏｃａｉ Ａら、Ｇｌｕｃａｇｏｎ－Ｌｉｋｅ Ｐｅｐｔｉｄｅ １／Ｇｌｕｃａｇｏｎ Ｒｅｃｅｐｔｏｒ Ｄｕａｌ Ａｇｏｎｉｓｍ Ｒｅｖｅｒｓｅｓ Ｏｂｅｓｉｔｙ ｉｎ Ｍｉｃｅ、Ｄｉａｂｅｔｅｓ ５８：２２５８－２２６６（２００９）およびＰａｔｔｅｒｓｏｎ ＪＴら、Ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ ａｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ ｏｆ ｔｈｅ Ｎ－ｔｅｒｍｉｎａｌ ｒｅｓｉｄｕｅｓ ｗｉｔｈ ｔｈｅ ｃｅｎｔｒａｌ ｒｅｇｉｏｎ ｉｎ ｇｌｕｃａｇｏｎ－ｒｅｌａｔｅｄ ｐｅｐｔｉｄｅｓ、Ｊ．Ｐｅｐｔ．Ｓｃｉ．１７：６５９－６６６（２０１１）、Ｆｉｎａｎら、Ａ ｒａｔｉｏｎａｌｌｙ ｄｅｓｉｇｎｅｄ ｍｏｎｏｍｅｒｉｃ ｐｅｐｔｉｄｅ ｔｒｉａｇｏｎｉｓｔ ｃｏｒｒｅｃｔｓ ｏｂｅｓｉｔｙ ａｎｄ ｄｉａｂｅｔｅｓ ｉｎ ｒｏｄｅｎｔｓ、Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ ２１：２７－３６に見出すことができ、その各々はここに参照により完全に組み込まれる。

【００８１】

別の態様では、本開示は、２型糖尿病、障害のあるグルコース耐性、１型糖尿病、高血糖、肥満、過食症、食欲亢進、高血圧、エックス症候群、脂質異常症、認知障害、アテローム硬化症、非脂肪肝疾患、心筋梗塞、虚血性心疾患および他の心血管障害またはインスリン過剰、例えば先天性インスリン過剰もしくは胃手術、例えば肥満を治療する胃手術の後の後天性インスリン過剰を治療または予防する方法を提供する。

【００８２】

本方法は、エラスチン様ペプチド（ＥＬＰ）およびＧＬＰ－１受容体アゴニスト（上記）を含む治療剤をそのような治療を必要とする患者に投与することを含む。これらまたは他の実施形態では、本開示は、食物摂取を減少させる方法、β細胞アポトーシスを減少させる方法、β細胞機能およびβ細胞質量を増加させる方法、および／またはβ細胞にグルコース感受性を回復する方法を提供する。一般的に、患者はヒトまたはヒト以外の動物患者（例えば、イヌ、ネコ、ウシまたはウマ）であってよい。好ましくは、患者はヒトである。

【００８３】

一部の実施形態では、本開示によるＥＬＰ／ＧＬＰ－１受容体アゴニスト化合物による治療は、例えば抗糖尿病薬、肥満防止薬、食欲調節剤、血圧降下薬、糖尿病から生じるかまたはそれに伴う合併症の治療および／または予防のための薬剤、ならびに肥満から生じるかまたはそれに伴う合併症および障害の治療および／または予防のための薬剤から選択される、１つまたは複数の薬理活性物質と組み合わせることもできる。本文脈では、表現「抗糖尿病薬」は、インスリン抵抗性およびインスリン抵抗性が病態生理学的機構である疾患の治療および／または予防のための化合物を含む。

【００８４】

ＧＬＰ－１またはエキセンディン－４類似体、またはＧＬＰ－１受容体アゴニスト／ＥＬＰ化合物のＧＬＰ－１受容体に結合する能力は、標準の方法、例えばそれらの表面でＧＬＰ－１受容体を発現する適当な細胞、例えばＲＩＮｍＳＦ細胞またはＩＮＳ－１細胞などのインスリノーマ細胞系を提供することを含む、受容体結合活性スクリーニング法によって判定することができる。ラジオイムノアッセイ方法を使用して膜へのトレーサの特異的結合を測定することに加えて、ｃＡＭＰ活性またはグルコース依存性インスリン生成を測定することもできる。１つの方法では、ＧＬＰ－１受容体アゴニスト活性を測定するために、ＧＬＰ－１受容体を組換えで発現する細胞を使用することもできる。したがって、これらの方法は、疑わしいＧＬＰ－１受容体アゴニストが活性であるかどうか試験または確認するために用いることができる。

【００８５】

さらに、ＧＬＰ－１受容体アゴニストまたはＧＬＰ－１受容体アゴニスト／ＥＬＰの生物学的活性のレベルをｉｎ ｖｉｖｏで測定または予測するために、公知の方法を使用することができる（例えば、Siegelら、1999、Regul Pept 79(2-3): 93-102を参照）。特に

、ＧＬＰ－１受容体アゴニストまたはＧＬＰ－１受容体アゴニスト／ＥＬＰ化合物は、ＧＬＰ－１活性を測定するための様々な公知のアッセイを使用して、インスリンの生成をｉｎ　ｖｉｖｏで誘導するそれらの能力について調査することができる。例えば、ＥＬＰ／ＧＬＰ－１受容体アゴニスト化合物を不死化β細胞などの細胞に導入することができ、生じる細胞をグルコースと接触させることができる。グルコースに応答して細胞がインスリンを生成するならば、改変されたＧＬＰ－１はｉｎ　ｖｉｖｏで生物学的に活性であると一般的に考えられる（Fehmannら、1992、Endocrinology 130: 159-166）。例示的なアッセイが、本明細書でより詳細に記載される。

【００８６】

公知のアッセイを使用して、β細胞増殖を増強し、β細胞アポトーシスを阻害し、島成長を調節するＧＬＰ－１受容体アゴニスト／ＥＬＰ化合物の能力を測定することもできる。膵臓のβ細胞増殖は、^{3}ＨチミジンまたはＢｒｄＵ組込みアッセイによって調査することができ（例えば、Buteauら、2003、Diabetes 52: 124-32を参照）、そこでは、ＩＮＳ（８３２／１３）細胞などの膵臓のβ細胞がＥＬＰ／ＧＬＰ－１受容体アゴニスト化合物と接触させられ、^{3}ＨチミジンまたはＢｒｄＵ組込みの増加について分析される。ＥＬＰ／ＧＬＰ－１受容体アゴニスト化合物の抗アポトーシス活性は、培養されたインスリン分泌細胞および／またはベータ細胞アポトーシスの過剰な速度の結果として糖尿病が起こる動物モデルで測定することができる（例えば、Bulottaら、2004、Cell Biochem Biophys 40(3 suppl): 65-78を参照）。

【００８７】

治療的能力を増強するために、ＧＬＰ－１に加えて、このファミリーの他のペプチド、例えば、ＧＬＰ－２、ＧＩＰおよびオキシントモジュリンなどのプログルカゴン遺伝子のプロセシングに由来するものを、ＥＬＰ成分（本明細書に記載される）にコンジュゲートまたは融合することができる。

【００８８】

様々な実施形態では、本開示は、用量および／またはレジメン、例えば、患者で実質的な食欲抑制を誘導しないものおよび／または患者で実質的な吐き気を誘導しないもの、例えば、ここに参照により組み込まれる国際出願ＰＣＴ／ＵＳ１２／４４３８３に記載されるものを包含する。

【００８９】

ヒト成長ホルモン

一部の態様では、タンパク質活性薬剤は、成長ホルモンである。例示的な成長ホルモン配列には、図２４、２６、２８および３０の下線付きの配列が含まれる（例えば配列番号２２）。追加の適する配列には、Ｓｅｅｂｕｒｇら、「Ｔｈｅ　ｈｕｍａｎ　ｇｒｏｗｔｈ　ｈｏｒｍｏｎｅ　ｇｅｎｅ　ｆａｍｉｌｙ：ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ　ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ　ｓｈｏｗ　ｒｅｃｅｎｔ　ｄｉｖｅｒｇｅｎｃｅ　ａｎｄ　ｐｒｅｄｉｃｔ　ａ　ｎｅｗ　ｐｏｌｙｐｅｐｔｉｄｅ　ｈｏｒｍｏｎｅ：ＤＮＡ１（３）２３９－２４９（１９８２）に記載されるものが含まれ、それは受託番号ＡＡＡ９８６１８に関連する配列を含む。ＡＡＡ９８６１６の正確な配列に加えて、他の誘導体を使用することができる。例えば、成長ホルモンは、最高３アミノ酸、最高５アミノ酸、最高１０アミノ酸、最高１５アミノ酸、最高２０アミノ酸、最高２５アミノ酸、最高３０アミノ酸、最高３５アミノ酸または最高４０アミノ酸がＮ末端でトランケーションされてもよい。特定の態様では、約１５～約３０アミノ酸をＮ末端から欠失させることができる。他の態様では、成長ホルモンは、最高３アミノ酸、最高５アミノ酸、最高１０アミノ酸、最高１５アミノ酸、最高２０アミノ酸、最高２５アミノ酸、最高３０アミノ酸、最高３５アミノ酸または最高４０アミノ酸がＣ末端でトランケーションされてもよい。特定の態様では、約２０～約３０アミノ酸をＣ末端から欠失させることができる。

【００９０】

他の成長ホルモン誘導体には、配列番号２２とある特定の配列同一性を有するものが含まれる。例えば、成長ホルモンには、配列番号２２と少なくとも約７５％の同一性、約８

０％の同一性、約９０％の同一性、約９５％の同一性、約９６％の同一性、約９７％の同一性、約９８％の同一性または約９９％の同一性を共有するアミノ酸配列が含まれる。

【００９１】

ある特定の態様では、欠失させた部分は、メチオニンまたはグリシンなどの１つまたは複数のアミノ酸で置き換えることができ、それらは、発現の開始または空間的分離の提供などの機能を果たすことができる。ある特定の態様では、Ｎ末端およびＣ末端のトランケーションは、特定の成長ホルモンに到達するために組み合わせることができる。

【００９２】

一部の実施形態では、成長ホルモンペプチドは、１つを超えるＥＬＰ配列との融合タンパク質中にある。一部の実施形態では、成長ホルモンペプチドは、Ｎ末端およびＣ末端の両方に１つまたは複数のＥＬＰを有する。一部の実施形態では、Ｎ末端およびＣ末端の２つ以上のＥＬＰは、概ね同じサイズである。一部の実施形態では、Ｎ末端およびＣ末端の２つ以上のＥＬＰは、サイズが異なる。一部の実施形態では、成長ホルモンペプチドのＮ末端のＥＬＰは、成長ホルモンペプチドのＣ末端のＥＬＰより大きい。一部の実施形態では、成長ホルモンペプチドのＮ末端のＥＬＰは、約９０～約１２０の反復構造単位を含む。一部の実施形態では、成長ホルモンペプチドのＣ末端のＥＬＰは、約５～約２０の反復構造単位を含む。一部の実施形態では、成長ホルモンペプチドのＣ末端のＥＬＰは、成長ホルモンペプチドのＮ末端のＥＬＰより大きい。一部の実施形態では、成長ホルモンペプチドのＣ末端のＥＬＰは、約９０～約１２０の反復構造単位を含む。一部の実施形態では、成長ホルモンペプチドのＮ末端のＥＬＰは、約５～約２０の反復構造単位を含む。

【００９３】

インスリン

ヒトプロインスリンは、３１アミノ酸Ｃペプチド（配列番号４４または４６）に連結されるＡおよびＢ鎖からなる。プレプロインスリンが小胞体に到達すると、プロテアーゼがシグナルペプチドを切断してプロインスリンを形成する。具体的には、ＡとＢ鎖の間でジスルフィド結合が形成されると、プロインスリンは、トリプシン／カルボキシペプチダーゼＢ様系によるＣペプチドの除去によってｉｎ　ｖｉｖｏで成熟インスリンに変換される。ヒトインスリンは、２つのジスルフィド架橋によって連結される鎖Ａ（２１アミノ酸－ＧＩＶＥＱＣＣＴＳＩＣＳＬＹＱＬＥＮＹＣＮ）（配列番号４７）および鎖Ｂ（３０アミノ酸ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＹＬＶＣＧＥＲＧＦＦＹＴＰＫＴ）（配列番号４８）という名称のアミノ酸の２つの鎖で構成される。Ａ鎖の６番目および１１番目の残基を連結する第３のジスルフィド架橋がＡ鎖の中にある。ほとんどの種では、鎖ＡおよびＢの長さならびにアミノ酸組成は類似し、３つのジスルフィド結合の位置は高度に保存されている。この理由から、ブタインスリンは、糖尿病患者で欠損したヒトインスリンレベルを元に戻すことができる。今日、ブタのインスリンは、細菌によるヒトプロインスリンの大量生産（組換えインスリン）によってほとんど置き換えられている。

【００９４】

インスリン分子は溶液中でダイマーを形成する傾向があり、亜鉛イオンの存在下で、インスリンダイマーはヘキサマーへと結合する。インスリンのモノマーは血液を通して容易に拡散して急速な効果を及ぼすのに対して、ヘキサマーは徐々に拡散して遅延型の作用開始を有する。組換えインスリンの設計では、インスリンの構造は、ダイマーおよびヘキサマーを形成するインスリン分子の傾向を低減するが、インスリン受容体への結合を妨害しない方法で改変することができる。この方法で、短時間作用型から長時間作用型まで様々な調製物が作製される。

【００９５】

小胞体の中で、プロインスリンは、Ｃ－ペプチドを除去してインスリンの成熟したおよび活性の形態を生成するいくつかの特異的ペプチダーゼに曝露させられる。ゴルジ装置では、インスリンおよび遊離Ｃ－ペプチドは分泌顆粒に詰め込まれ、それはβ細胞の細胞質に蓄積する。顆粒のエキソサイトーシスは、ベータ細胞へのグルコースの侵入によって誘発される。インスリンの分泌は、代謝に広い影響を有する。

【００９６】
グルコースの上昇に応答して、２段階のインスリン放出がある。最初は、インスリンの即時放出である。これは、分泌顆粒に貯蔵される、予め形成されたインスリンの放出に起因する。短時間の遅れの後、新たに合成されたインスリンの第２のより長期の放出がある。
【００９７】
放出されると、インスリンは、それが酵素によって分解されるまで短時間だけ活性である。肝臓および腎臓で見出されるインスリナーゼは、血漿中を循環するインスリンを分解し、その結果としてインスリンはわずか約６分の半減期を有する。この短い作用持続時間は、インスリンの循環レベルの急変をもたらす。
【００９８】
改善された治療特性を有するインスリン類似体が開発され（Owensら、2001、Lancet 358: 739-46；Vajoら、2001、Endocr Rev 22: 706-17）、そのような類似体は本開示と関連して用いることができる。より長い持続性のインスリン類似体を生成するために、インスリンＢ鎖のＣＯＯＨ末端の伸長およびアルブミンへのかなりの親和性を有する脂肪酸アシル化インスリンの工学的操作を含む、様々な戦略が使用される。しかし、利用可能なより長い持続性のインスリン化合物によるｉｎ　ｖｉｖｏ治療は、高頻度の低血糖および高血糖暴走ならびにＨｂＡ１ｃの軽度の低減をなおもたらす。したがって、真に持続性のおよび安定したヒトインスリン類似体の開発は、なお重要な作業のままである。
【００９９】
本開示により用いることができるインスリンの機能的類似体には、インスリンリスプロ、インスリンアスパルトおよびインスリングルリシンなどの迅速作用性類似体が含まれ、それらは皮下注射の後に急速に（＜３０分）吸収され、１時間でピークに達し、比較的短い作用持続時間（３～４時間）を有する。さらに、３つの長時間作用性インスリン類似体：インスリングラルジン、インスリンデテミールおよびインスリンデグルデクが開発され、それらは本開示と関連して用いることができる。長時間作用性インスリン類似体は概ね２時間の作用開始を有し、４～６時間で生物学的作用の安定期に到達し、最高２４時間持続することができる。
【０１００】
したがって、一部の実施形態では、インスリンアミノ酸配列は、インスリンリスプロ（別名、HUMALOG、Eli Lilly）のＡおよび／またはＢ鎖を含有することができる。インスリンリスプロは、インスリンＢ鎖の２８位でのリジンによるプロリンの置換および２９位でのプロリンによるリジンの置換によってヒトインスリンと異なる。これらの改変は受容体結合を変更しないが、それらはインスリンダイマーおよびヘキサマーの形成をブロックするのを助け、活性モノマーインスリンのより多くの量が食後の注射で利用可能であることを可能にする。
【０１０１】
他の実施形態では、インスリンアミノ酸配列は、アスパルト（別名、NOVOLOG（登録商標）、Novo Nordisk）のＡおよび／またはＢ鎖を含有することができる。インスリンアスパルトは、ヒトインスリンＢ鎖の２８位でのアスパラギン酸によるアミノ酸プロリンの単一の置き換えで設計される。この改変は、インスリンヘキサマーの形成をブロックするのを助け、より速い作用のインスリンを形成する。
【０１０２】
さらに他の実施形態では、インスリンアミノ酸配列は、グルリシン（別名、APIDRA（登録商標）、Sanofi-Aventis）のＡおよび／またはＢ鎖を含有することができる。インスリングルリシンは、ヒトインスリンＢ鎖の、リジンによる３位のアスパラギンの置換およびグルタミンによる２９位のリジンの置換によって形成される短時間作用型類似体である。インスリングルリシンは、通常のヒトインスリンと比較してより迅速な作用開始およびより短い作用持続時間を有する。
【０１０３】

他の実施形態では、インスリンアミノ酸配列は、インスリングラルジン（別名、LANTUS（登録商標）、Sanofi-Aventis）のＡおよび／またはＢ鎖を含有することができる。インスリングラルジンは、中性生理的ｐＨの存在下でインスリン結晶の微小沈殿形成を引き起こすその酸性ｐＨのために、遅延型の吸収を有する。インスリングラルジンは、Ａ鎖の２１位のアミノ酸アスパラギンがグリシンによって置き換えられ、２つのアルギニンがＢ鎖のＣ末端に追加されるという点で、ヒトインスリンと異なる。就寝時中性プロタミンＨａｇｅｄｏｒｎ（ＮＰＨ）インスリン（中間作用性のインスリン）と比較して、インスリングラルジンは、２型糖尿病患者で夜間低血糖の低減と関連する。

【０１０４】

さらに他の実施形態では、インスリンアミノ酸配列は、インスリンデテミール（別名、LEVEMIR（登録商標）、Novo Nordisk）のＡおよび／またはＢ鎖を含有することができる。インスリンデテミールは可溶性（中性ｐＨで）の持続性インスリン類似体であり、そこでは、Ｂ３０のアミノ酸トレオニンが除去され、１４－炭素のミリストイル脂肪酸がＬｙｓＢ２９のイプシロン－アミノ基にアセチル化されている。皮下注射の後、デテミールは解離し、それによって、アルブミン分子への可逆的結合を可能にする遊離脂肪酸を曝露させる。したがって定常状態では、遊離の未結合のインスリンの濃度は大いに低減され、安定した血漿中グルコースレベルをもたらす。

【０１０５】

さらに他の実施形態では、インスリンアミノ酸配列は、インスリンデグルデク（別名、TRESIBA（登録商標）、Novo Nordisk）のＡおよび／またはＢ鎖を含有することができる。インスリンデグルデクは、可溶性（中性ｐＨで）の持続性インスリン類似体であり、そこでは、Ｂ３０のアミノ酸トレオニンが除去され、グルタミン酸およびＣ１６脂肪酸からなる側鎖が結合している。皮下注射の後、インスリンデグルデクは解離し、それによって、アルブミン分子への可逆的結合を可能にする脂肪酸を曝露させる。したがって定常状態では、遊離の未結合インスリンの濃度は大いに低減され、安定した血漿中グルコースレベルをもたらす。

【０１０６】

一部の実施形態では、インスリンアミノ酸配列は、単鎖インスリン類似体（ＳＩＡ）であってもよい（例えば、ここに参照により完全に組み込まれる、米国特許第６，６３０，４３８号および国際公開第２００８／０１９３６８号に記載される通り）。単鎖インスリン類似体は、ＡおよびＢ鎖がポリペプチドリンカーによって共有結合している一群の構造的に関係するタンパク質を包含する。ポリペプチドリンカーは、Ｂ鎖のＣ末端をＡ鎖のＮ末端に接続する。ＳＩＡがグルコース取り込みおよびインスリン受容体結合作用を有するのに必要な構造的立体配座をリンカーが提供する限り、リンカーは任意の長さであってよい。一部の実施形態では、リンカーは、長さが約５～１８アミノ酸である。他の実施形態では、リンカーは、長さが約９～１５アミノ酸である。ある特定の実施形態では、リンカーは約１２アミノ酸の長さである。ある特定の例示的な実施形態では、リンカーは、配列ＫＤＤＮＰＮＬＰＲＬＶＲ（配列番号５１）またはＧＡＧＳＳＳＲＲＡＰＱＴ（配列番号５２）を有する。しかし、グルコース取り込みおよびインスリン受容体結合活性における生成ＳＩＡの有効性を実質的に損なうことなく、例えばアミノ酸の長さ（付加および欠失）および置換においてこの配列の多くの変動が可能であることを理解するべきである。例えば、生成ＳＩＡの活性を実質的に減少させることなく、いくつかの異なるアミノ酸残基を追加するかまたはいずれかの末端から除去することができる。

【０１０７】

現在臨床開発中の例示的な単鎖インスリン類似体は、アルブリン（albulin）である（Duttaroyら、2005、Diabetes 54: 251-8）。アルブリンは、酵母または哺乳動物細胞が生成することができる。それは、ドデカペプチドリンカーによって連結され、天然のヒト血清アルブミンのＮＨ２末端に融合されるヒトインスリン（天然のヒトインスリンと１００％同一性）のＢおよびＡ鎖からなる。アルブリンの発現および精製のために、Ｄｕｔｔａｒｏｙらは、４つの重複するプライマーおよびＰＣＲ増幅を使用して、ドデカペプチドリ

ンカーによって連結された成熟ヒトインスリンのＢ－およびＡ－鎖を含有する単鎖インスリンをコードする合成遺伝子構築物を構築した。生じたＰＣＲ生成物は、酵母での発現のためのｐＳＡＣ３５ベクターの中に含有された、ヒト血清アルブミン（ＨＳＡ）のシグナルペプチドと成熟ＨＳＡのＮＨ２末端の間にインフレームでライゲーションした。本開示により、アルブリンのＨＳＡ成分は、本明細書に記載される持続的放出を提供するアミノ酸配列で置き換えることができる。

【０１０８】

したがって、一部の態様では、本開示は、例えばエラスチン様ペプチド（ＥＬＰ）を含む持続的放出を提供するアミノ酸配列およびインスリンアミノ酸配列を含む治療剤を提供する。例えば、ある特定の実施形態では、インスリンは哺乳動物のインスリン、例えばヒトインスリンまたはブタインスリンである。本開示により、持続的放出成分を提供するアミノ酸配列は、インスリンＡ鎖またはＢ鎖、または両方に結合することができる（例えば、組換え融合または化学的コンジュゲーションを通して）。一部の実施形態では、注射部位からの遅い吸収を提供するアミノ酸配列は、インスリンＡ鎖に共有結合している。インスリンは、鎖Ａ、ＢおよびＣ（例えば、配列番号４４または４６）の各々を含むことができるか、鎖ＡおよびＢだけを含有する加工された形を含有することができる。一部の実施形態では、単鎖インスリンを形成するために、鎖ＡおよびＢは短い連結ペプチドによって接続される。インスリンは、（鎖ＡおよびＢの一方または両方の）Ｎ末端および／またはＣ末端で１、２、３または約５アミノ酸を含む１～１０アミノ酸がトランケーションされた機能的断片を含む、ヒトインスリンの機能的類似体であってもよい。機能的類似体は、天然の配列（例えば、配列番号４４、４６、４７または４８）に関して１～１０アミノ酸の挿入、欠失および／または置換（総合的に）を含有することができ、いずれの場合も、ペプチドの活性は保持される。例えば、機能的類似体は、天然の配列（鎖ＡおよびＢまたは鎖Ａ、ＢおよびＣを含有することができる）に関して、１つ、２つ、３つ、４つまたは５つのアミノ酸の挿入、欠失および／または置換（総合的に）を有することができる。そのような活性は、本明細書に記載されるものを含む、任意の利用可能なアッセイを使用して確認または検査することができる。これらまたは他の実施形態では、インスリン成分は、鎖ＡおよびＢ（配列番号４７または４８）の天然配列の各々と、少なくとも約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、約９５％または約９８％の同一性を有する。２つの配列の間（例えば、天然配列と機能的類似体の間）の配列同一性の判定は、Ｔａｔｕｓｏｖａら、Ｂｌａｓｔ ２ ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ－ａ ｎｅｗ ｔｏｏｌ ｆｏｒ ｃｏｍｐａｒｉｎｇ ｐｒｏｔｅｉｎ ａｎｄ ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ、ＦＥＭＳ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ Ｌｅｔｔ．１７４：２４７－２５０（１９９９）を含む、任意のアラインメントツールを使用して達成することができる。インスリン成分は、当技術分野で公知の追加の化学的修飾を含有することができる。

【０１０９】

インスリン類似体または持続的放出提供アミノ酸配列含有インスリン類似体のｉｎ ｖｉｔｒｏ結合特性を特徴付けるために、インスリン受容体を発現する様々な細胞系で競合結合アッセイを実行することができる（Jehleら、1996、Diabetologia 39: 421-432）。例えば、ヒトインスリン受容体を過剰発現するＣＨＯ細胞を使用する競合結合アッセイを、用いることができる。インスリンは、インスリン受容体より低い親和性でＩＧＦ－１受容体に結合することもできる。持続的放出提供アミノ酸配列含有インスリン類似体の結合親和性を判定するために、Ｌ６細胞で^{125}Ｉ標識ＩＧＦ－１を使用して競合結合アッセイを実行することができる。

【０１１０】

インスリンの活性には、末梢グルコース廃棄の刺激および肝臓のグルコース生成の阻害が含まれる。これらの生物学的活性を媒介する持続的放出提供アミノ酸配列含有インスリン類似体の能力は、公知の方法を使用してｉｎ ｖｉｔｒｏで検査することができる。例えば、３Ｔ３－Ｌ１脂肪細胞でのグルコース取り込みに及ぼす持続的放出提供アミノ酸配列含有類似体の影響を測定し、インスリンのそれと比較することができる。生物学的に活

性な類似体による細胞の前処置は、２－デオキシグルコース取り込みの用量依存的増加を一般的にもたらす。グルコース生成を調節する持続的放出提供アミノ酸配列含有インスリン類似体の能力は、任意の数の細胞型、例えばＨ４ＩＩｅ肝癌細胞で測定することができる。このアッセイでは、生物学的に活性な類似体による前処置は、放出されるグルコースの量の用量依存的阻害を一般的にもたらす。

【０１１１】

血管作用性小腸ペプチド

血管作用性小腸ペプチド（ＶＩＰ）は、気道、小腸、精巣および膵臓を含む様々な組織で見出される、２つの受容体ＶＰＡＣ１およびＶＰＡＣ２に結合する２８アミノ酸ニューロペプチドである。ＶＩＰおよびその機能的および構造的に関係する類似体は、気道平滑筋を弛緩させ、それによって気管支拡張剤として作用すること、気道粘膜下腺で液分泌を刺激すること、ならびに腸および膵臓で水および電解質分泌を調節することを含む、多くの生理機能を有することが公知である（Wine（2007）；Wu（2011）；Derand（2004））。

【０１１２】

ＶＩＰ生産神経線維は、外分泌腺を囲むアセチルコリン分泌ニューロンと共局在化している（Lundberg（1980）；Heinz-Erian（1986））。機能的ＣＦＴＲタンパク質を有する対象からの腺では、ＶＩＰは液分泌を誘導するが、この誘導は嚢胞性線維症患者では不全または不在である（Joo（2002）；Joo（2012））。さらに、ヒトおよびブタ気道腺では、ＶＩＰおよびアセチルコリンの低濃度の投与は分泌粘液を刺激するが、この相乗作用は嚢胞性線維症患者では失われる（Choi（2007））。

【０１１３】

ＶＩＰは、ヒト気道上皮細胞でＣＦＴＲの膜挿入、安定性および機能を増加させる（Alshafie（2014））。マウスのＶＩＰノックアウトモデルでは、ＣＦＴＲは頂端細胞膜に局在化しないが、代わりに細胞内に主に残存する（ChappeおよびSaid（2012））。頂端膜からのＣＦＴＲの不在は、炎症性細胞浸潤、肺胞壁および細気管支粘膜の肥厚ならびに杯細胞過形成を有する嚢胞性線維症患者で見られるものと類似の肺病状に関連する。３週間のＶＩＰの腹腔内投与はＣＦＴＲの頂端膜局在化を回復し、長期のＶＩＰ刺激は細胞膜でＣＦＴＲチャネルの数を増加させる（Chappe（2008））。膜でのＣＦＴＲの安定化を通して起こる頂端ＣＦＴＲ密度のこの増加は、ヨウ化物流出アッセイによって測定したときのＣＦＴＲ依存性機能の増加と関連している（Chappe（2008））。

【０１１４】

一部の態様では、本開示は、１つまたは複数の様々なＶＩＰペプチドを含むことができる治療組成物を提供する。例えば、ＶＩＰペプチドは、配列番号５３、配列番号５４または配列番号５５を有するポリペプチドを含むかまたはそれからなることができる。一部の実施形態では、本開示は、Ｎ末端メチオニンなしのＶＩＰを提供する（例えば配列番号５５）。一部の実施形態では、本開示は、Ｎ末端メチオニンのあるＶＩＰを提供する（例えば配列番号５３）。

【０１１５】

成熟したヒトＶＩＰは、以下の配列を有する２８アミノ酸残基を有する：ＨＳＤＡＶＦＴＤＮＹＴＲＬＲＫＱＭＡＶＫＫＹＬＮＳＩＬＮ（配列番号５５）。ＶＩＰは、１７０アミノ酸の前駆体分子プレプロ－ＶＩＰのプロセシングからもたらされる。ＶＩＰおよび例示的な類似体の構造は、米国特許第４，８３５，２５２号、第４，９３９，２２４号、第５，１４１，９２４号、第４，７３４，４００号、第４，６０５，６４１号、第６，０８０，８３７号、第６，３１６，５９３号、第５，６７７，４１９号、第５，９７２，８８３号、第６，４８９，２９７号、第７，０９４，７５５号および第６，６０８，１７４号に記載されている。

【０１１６】

プロテアーゼなどに対するペプチドの安定性を改善するいくつかの突然変異が、文献に詳述されている（Onuneら、Physicochemical and pharmacological characterization of novel vasoactive intestinal peptide derivatives with improved stability、Eur. J

. Pharm. Biopharm. 2009を参照）。例えば、改変されたＶＩＰペプチドは、配列番号５３、５４または５５の配列を含む。一部の態様では、本開示は、これらの改変の１つまたは複数を含む改変されたＶＩＰペプチドを提供する。一部の実施形態では、本開示は、これらの改変の１つまたは複数を含み、本明細書に記載される追加のＶＩＰ改変をさらに含む、改変されたＶＩＰペプチドを提供する。

【０１１７】

様々な実施形態では、本開示は、本明細書に記載される改変されたＶＩＰ（例えば、配列番号５５を含む）または機能的類似体を提供する。一般に、ＶＩＰの機能的類似体は、１～１０アミノ酸、例えば１、２、３または約５までのアミノ酸（配列番号５５に関して）がＮまたはＣ末端でトランケーションされた機能的断片を含む。そのような機能的類似体は、天然の配列（例えば、配列番号５５）に関して１～５アミノ酸の挿入、欠失および／または置換（総合的に）を含有することができ、いずれの場合も、（例えば、VPAC2および／またはVPAC1結合を通して）天然ペプチドの活性を保持する。そのような活性は、本明細書に記載されるアッセイを含む、およびＤｅｌｇａｄｏら、Ｔｈｅ Ｓｉｇｎｉｆｉｃａｎｃｅ ｏｆ Ｖａｓｏａｃｔｉｖｅ Ｉｎｔｅｓｔｉｎａｌ Ｐｅｐｔｉｄｅ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｍｏｄｕｌａｔｉｏｎ、Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｒｅｖｉｅｗｓ ５６（２）：２４９－２９０（２００４）に記載される、活性を判定または数量化するための任意の適するアッセイを含む、任意の利用可能なアッセイを使用して確認または検査することができる。これらまたは他の実施形態では、改変されたＶＩＰのＶＩＰ成分は、天然の成熟配列（配列番号５５）と少なくとも約５０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、約９５％、約９７％の同一性、約９８％の同一性または約９９％の同一性を有する。２つの配列の間（例えば、天然配列と機能的類似体の間）の配列同一性の判定は、例えば、Ｔａｔｕｓｏｖａら、Ｂｌａｓｔ ２ ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ－ａ ｎｅｗ ｔｏｏｌ ｆｏｒ ｃｏｍｐａｒｉｎｇ ｐｒｏｔｅｉｎ ａｎｄ ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ、ＦＥＭＳ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ Ｌｅｔｔ．１７４：２４７－２５０（１９９９）に開示されるものを含む、任意のアラインメントツールを使用して達成することができる。

【０１１８】

様々な態様では、本開示は、未改変のＶＩＰ（例えば、配列番号５５のアミノ酸配列からなるペプチド）と比較して、ＶＰＡＣ２またはＶＰＡＣ１への受容体優先度(receptor preference)を有する改変されたＶＩＰ分子を提供する。例えば、改変されたＶＩＰは、ＶＰＡＣ１に対して、少なくとも約２：１、約５：１、約１０：１、約２５：１、約５０：１、約１００：１、約５００：１またはそれを超える、ＶＰＡＣ２への相対的結合優先度を有することができる。他の実施形態では、改変されたＶＩＰは、ＶＰＡＣ２に対して、少なくとも約２：１、約５：１、約１０：１、約２５：１、約５０：１、約１００：１、約５００：１またはそれを超える、ＶＰＡＣ１への相対的結合優先度を有することができる。例えば、ある特定の実施形態では、改変されたＶＩＰは、成熟した未改変のヒトＶＩＰ（配列番号５５）の約２倍の範囲内のＥＣ５０でＶＰＡＣ２受容体を活性化する。しかし、この同じ改変されたＶＩＰは、ＶＰＡＣ１受容体の活性化において、成熟した未改変のヒトＶＩＰより５０倍または１００倍またはそれを超えてより強力でない。一部の実施形態では、改変されたＶＩＰは、ＶＰＡＣ１およびＶＰＡＣ２への相対的に等力の結合優先度を有することができる。

【０１１９】

そのような改変されたＶＩＰ分子は、改変されたＮ末端領域、例えばＶＩＰのＮ末端ヒスチジンへの１～約５００アミノ酸の付加を含有することができ、それは異種哺乳動物アミノ酸配列を含むことができる。例えば、改変されたＶＩＰは、成熟ＶＩＰの天然のＮ末端ヒスチジンのＮ末端側に、単一のメチオニンを含有することができる。隣接したアミノ酸がヒスチジンである場合はメチオニンが大腸菌によって除去されないので、これは大腸菌または他の細菌発現系で調製することができる。あるいは、Ｎ末端アミノ酸は、天然に存在するアミノ酸、すなわち、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、

システイン、グルタミン酸、グルタミン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、バリンおよびプロリンのいずれかであってよい。

【０１２０】

ＶＩＰのＮ末端に追加される追加の配列は、１～約１００、１～約５０、１～約２０、１～約１０および１～約５アミノ酸の生物学的に活性および生物学的に不活性の配列を含む、任意の配列のものであってよい。

【０１２１】

改変されたＶＩＰのＮ末端は構造Ｍ－Ｎを有することができ、そこで、Ｍはメチオニンであり、ＮはＶＩＰ分子（例えば、配列番号５３）のＮ末端である。このメチオニンは、細菌または真核生物の宿主細胞でタンパク質の翻訳を補助する。したがって、改変されたＶＩＰは、細菌および酵母発現系（例えば、大腸菌）を含む生物系で作製することができる。メチオニンは細菌発現系でメチオニンアミノペプチダーゼ（ＭＡ）によって時には除去することができるが、ヒスチジン（Ｈ）はＭＡにとって２位で最も好ましくない残基の１つである。

【０１２２】

一部の実施形態では、ＶＩＰはＮ末端で改変される。一部の実施形態では、ＶＩＰはＣ末端で改変される。

【０１２３】

他の実施形態では、ＶＩＰは内因性ペプチダーゼまたはプロテアーゼなどのペプチダーゼまたはプロテアーゼによって活性化が可能である。そのような活性化可能な配列は、国際出願番号ＰＣＴ／ＵＳ２００９／０６８６５６に記載される。本明細書で用いるように、用語「ペプチダーゼ」および「プロテアーゼ」は互換性である。例えば、ＶＩＰは、ジペプチジルペプチダーゼによって活性化できるように設計することができる。例示的なジペプチジルペプチダーゼには、ジペプチジルペプチダーゼ－１（ＤＰＰ－Ｉ）、ジペプチジルペプチダーゼ－３（ＤＰＰ－ＩＩＩ）、ジペプチジルペプチダーゼ－４（ＤＰＰ－ＩＶ）、ジペプチジルペプチダーゼ－６（ＤＰＰ－ＶＩ）、ジペプチジルペプチダーゼ－７（ＤＰＰ－ＶＩＩ）、ジペプチジルペプチダーゼ－８（ＤＰＰ－ＶＩＩＩ）、ジペプチジルペプチダーゼ－９（ＤＰＰ－ＩＸ）、ジペプチジルペプチダーゼ－１０（ＤＰＰ－Ｘ）が含まれる。そのようなジペプチダーゼの基質配列は、公知である。

【０１２４】

一部の実施形態では、活性化可能なＶＩＰのＮ末端は、構造Ｚ－Ｎを有することができ、そこで、Ｚはジペプチダーゼの基質であり（例えば、ＺはジペプチダーゼＩＶ曝露によって除去される）、ＮはＶＩＰのＮ末端である。活性化可能なＶＩＰは、式Ｍ－Ｘ－ＮのＮ末端配列を有することができ、そこで、Ｍはメチオニンであり、ＸはＰｒｏ、ＡｌａまたはＳｅｒであり、ＮはＶＩＰまたはＶＩＰ類似体のＮ末端である。この方法では、ＭおよびＸは、その後、宿主細胞（例えば、大腸菌）および／またはジペプチダーゼ（例えば、ＤＰＰ－ＩＶ）に感受性であり、それによって除去される。あるいは、活性化可能なＶＩＰのＮ末端配列はＸ１－Ｘ２－Ｎであってもよく、そこで、Ｘ１はＧｌｙ、Ａｌａ、Ｓｅｒ、Ｃｙｓ、Ｔｈｒ、ＶａｌまたはＰｒｏであり；Ｘ２はＰｒｏ、ＡｌａまたはＳｅｒであり；ＮはＶＩＰのＮ末端である。Ｘ１－Ｘ２はジペプチダーゼ（例えば、ＤＰＰ－ＩＶ）の基質であり、ジペプチダーゼ消化は、Ｎ、ＶＩＰまたはＶＩＰ類似体の所望のＮ末端を曝露させる。そのような実施形態では、タンパク質は、宿主細胞（例えば、大腸菌）で、Ｍ－Ｘ１－Ｘ２－Ｎ（Ｍはメチオニンである）をコードする構築物の発現によって生成することができるが、その理由は、２位のＧｌｙ、Ａｌａ、Ｓｅｒ、Ｃｙｓ、Ｔｈｒ、ＶａｌまたはＰｒｏがＭｅｔの除去をシグナル伝達し、それによってＮ末端にＸ１－Ｘ２を残し、それはジペプチダーゼ（例えば、ＤＰＰ－ＩＶ）がｉｎ　ｖｉｖｏで活性化することができるからである。一部の実施形態では、ペプチダーゼは体内に存在することができ、注射の後に活性化可能なＶＩＰに作用することができる。

【０１２５】

他の実施形態では、改変された活性化可能なＶＩＰのＮ末端は構造Ｍ－Ｚ－Ｎを有し、そこで、Ｍはメチオニンであり、Ｚはジペプチダーゼの基質であり（例えば、Ｚはジペプチダーゼ曝露によって除去される）、Ｎは活性ＶＩＰ（改変されたＶＩＰ）の非ＨｉｓのＮ末端である。例えば、改変された活性化可能なＶＩＰは、式Ｍ－Ｘ－ＮのＮ末端配列を有することができ、そこで、Ｍはメチオニンであり、ＸはＰｒｏ、ＡｌａまたはＳｅｒであり、Ｎは活性ＶＩＰの非ＨｉｓのＮ末端である。この方法では、ＭおよびＸは、その後、宿主細胞（例えば、大腸菌）および／またはジペプチダーゼ（例えば、ＤＰＰ－ＩＶ）に感受性であり、それによって除去される。あるいは、活性化可能なＶＩＰのＮ末端配列はＸ１－Ｘ２－Ｎであってもよく、そこで、Ｘ１はＧｌｙ、Ａｌａ、Ｓｅｒ、Ｃｙｓ、Ｔｈｒ、ＶａｌまたはＰｒｏであり；Ｘ２はＰｒｏ、ＡｌａまたはＳｅｒであり；Ｎは活性ＶＩＰの非ＨｉｓのＮ末端である。Ｘ１－Ｘ２はジペプチダーゼ（例えば、ＤＰＰ－ＩＶ）の基質であり、ジペプチダーゼ消化は、Ｎ、ＶＩＰの所望の非ＨｉｓのＮ末端を曝露させる。

【０１２６】

さらに他の実施形態では、改変された活性化可能なＶＩＰのＮ末端は、構造Ｍ－Ｚ－Ｓ－Ｎを有し、そこで、Ｍはメチオニンであり、Ｚはジペプチダーゼの基質であり（例えば、Ｚはジペプチダーゼ曝露によって除去される）、Ｎは成熟ＶＩＰのＮ末端（Ｈｉｓ）であり；Ｓは、ジペプチダーゼ消化の後に曝露させられ、前述の通り改変されたＶＩＰを提供する１つまたは複数のアミノ酸である。例えば、改変された活性化可能なＶＩＰは、式Ｍ－Ｘ－Ｓ－ＮのＮ末端配列を有することができ、そこで、Ｍはメチオニンであり、Ｘは Ｐｒｏ、ＡｌａまたはＳｅｒであり、Ｎは成熟ＶＩＰのＮ末端であり；Ｓは、ジペプチダーゼ消化の後に曝露させられ、受容体優先度を提供する１つまたは複数のアミノ酸である。あるいは、活性化可能なＶＩＰのＮ末端配列はＸ１－Ｘ２－Ｓ－Ｎであってもよく、そこで、Ｘ１はＧｌｙ、Ａｌａ、Ｓｅｒ、Ｃｙｓ、Ｔｈｒ、ＶａｌまたはＰｒｏであり；Ｘ２はＰｒｏ、ＡｌａまたはＳｅｒであり；ＮはＶＩＰの非ＨｉｓのＮ末端であり；Ｓは、ジペプチダーゼ消化の後に曝露させられる１つまたは複数のアミノ酸である。Ｘ１－Ｘ２はジペプチダーゼ（例えば、ＤＰＰ－ＩＶ）の基質であり、ジペプチダーゼ消化はＳを曝露させる。

【０１２７】

一部の実施形態では、ＶＩＰのＮ末端へのＮ末端化学的修飾は、受容体優先度を提供する。タンパク質の化学的修飾およびその方法は、当技術分野で周知である。非限定的な例示的化学的修飾は、ペグ化、メチルグリオキサル化、還元アルキル化、過ギ酸酸化、スクシニル化、アミノエチル化およびリピド化である（Clifton、New Protein Techniques、New Jersey: Humana Press、1985。ISBX. 0-89603-126-8. Volume. 3 of. Methods in Molecular Biology）。システイン、メチオニン、ヒスチジン、リジン、アルギニン、トリプトファン、チロシン、カルボキシル基の改変によって結合することができる、ペグ化などの化学基が以前に記載されている（Lundblad、Techniques in Protein Modification、CRC Press、1995を参照）。

【０１２８】

ＶＩＰ活性薬剤は、中でも、制御不可もしくは抵抗性の高血圧、または肺動脈高血圧（ＰＡＨ）、または慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）、または筋ジストロフィーに続発する心筋症から選択される状態を治療する方法で利用可能である。

【０１２９】

小分子

他の実施形態では、治療剤は、活性薬剤と、対象の体温でマトリックスを形成することが可能なアミノ酸配列（例えば、ＥＬＰ）との間の化学コンジュゲートである。例えば、活性薬剤は、化学療法剤、例えばメトトレキサート、ダウノマイシン、マイトマイシン、シスプラチン、ビンクリスチン、エピルビシン、フルオロウラシル、ベラパミル、シクロホスファミド、シトシンアラビノシド、アミノプテリン、ブレオマイシン、マイトマイシンＣ、デモコルシン、エトポシド、ミトラマイシン、クロラムブシル、メルファラン、ダ

ウノルビシン、ドキソルビシン、タモキシフェン、パクリタキセル、ビンブラスチン、カンプトセシン、アクチノマイシンＤ、シタラビンおよびコンブレタスタチンから選択される化学療法剤であってよい。あるいは、薬剤は、免疫原性分子、または免疫調節物質、または抗炎症剤、例えば、ここに参照により完全に組み込まれる米国特許出願公開第２００９／０００４１０４号に記載される薬剤であってもよい。さらに、薬剤は、オピオイド分子、例えばオキシコドン、モルヒネまたはコデイン、例えば、ここに参照により組み込まれる米国特許仮出願第６１／５９７，８９８号に記載されるようなものであってもよい。化学コンジュゲートは開裂可能なリンカーを通すものであってよく、その多数のタイプが当技術分野で公知である。ここに参照により完全に組み込まれる、米国特許第６，３２８，９９６号を参照。

【０１３０】

製剤

本開示は、本明細書に開示される治療剤ならびに１つまたは複数の薬学的に許容される賦形剤および／または希釈剤を含む持続的放出製剤を提供する。例えば、そのような賦形剤には、塩および水素結合を安定させる作用をすることができる他の賦形剤が含まれる。当技術分野で公知である任意の適当な賦形剤を使用することができる。例示的な賦形剤には、限定されずに、ヒスチジン、グリシンまたはアルギニンなどのアミノ酸；グリセロール；スクロースなどの糖；ポリソルベート２０およびポリソルベート８０などの界面活性剤；クエン酸；クエン酸ナトリウム；抗酸化剤；ナトリウム、カリウムおよびカルシウムなどのアルカリ土類金属塩を含む塩；塩化物およびリン酸塩などの対イオン；糖アルコール（例えばマンニトール）；保存剤；糖アルコール（例えばマンニトール、ソルビトール）；ならびに緩衝剤が含まれる。例示的な塩には、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化マグネシウム、塩化カルシウム、二塩基リン酸ナトリウム、一塩基リン酸ナトリウム、リン酸ナトリウムおよびリン酸カリウムが含まれる。

【０１３１】

治療剤は、体温（例えば３７℃、または一部の実施形態では３４～３６℃）でマトリックスの形成を可能にするのに十分であるｐＨ、イオン強度、および一般的に賦形剤で製剤化される。治療剤は、それが貯蔵条件でマトリックスを形成しないように一般的に調製される。製剤は、冷凍、冷蔵または室温で保存することができる。貯蔵条件は、一般的に製剤の転移温度未満、例えば約３２℃未満、または約３０℃未満、約２７℃未満、約２５℃未満、または約２０℃未満、または約１５℃未満である。例えば、製剤は血液と等張性であるか、または生理的条件を模倣するイオン強度を有することができる。例えば、製剤は、少なくとも２５ｍＭ塩化ナトリウムのそれ、または少なくとも３０ｍＭ塩化ナトリウムのそれ、または少なくとも４０ｍＭ塩化ナトリウムのそれ、または少なくとも５０ｍＭ塩化ナトリウムのそれ、または少なくとも７５ｍＭ塩化ナトリウムのそれ、または少なくとも１００ｍＭ塩化ナトリウムのそれ、または少なくとも１５０ｍＭ塩化ナトリウムのそれのイオン強度を有することができる。ある特定の実施形態では、製剤は、０．９％食塩水（１５４ｍＭ塩化ナトリウム）のそれに等しいイオン強度を有する。

【０１３２】

一部の実施形態では、製剤は貯蔵条件で安定している。安定性は、当技術分野の任意の適当な手段を使用して測定することができる。一般的に、安定した製剤とは、分解生成物または不純物の５％未満の増加を示すものである。一部の実施形態では、製剤は、貯蔵条件で少なくとも約１カ月間、少なくとも約２カ月間、少なくとも約３カ月間、少なくとも約４カ月間、少なくとも約５カ月間、少なくとも約６カ月間、または少なくとも約１年以上安定している。一部の実施形態では、製剤は、２５℃において少なくとも約１カ月間、少なくとも約２カ月間、少なくとも約３カ月間、少なくとも約４カ月間、少なくとも約５カ月間、少なくとも約６カ月間、または少なくとも約１年以上安定している。

【０１３３】

一部の実施形態では、製剤は、塩化カルシウム、塩化マグネシウム、塩化カリウム、一塩基リン酸カリウム、塩化ナトリウム、二塩基リン酸ナトリウム、一塩基リン酸ナトリウ

ム、ヒスチジン、アルギニン、グリシン、グリセロール、抗微生物性保存剤（例えばメタクレゾール）、張性調整剤（例えばマンニトール）、氷酢酸、酢酸ナトリウム三水和物；スクロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、一塩基リン酸ナトリウム一水和物、二塩基リン酸ナトリウム七水和物、亜鉛、ｍ－クレゾール、フェノール、ソルビトール、ポリソルベート８０およびポリソルベート２０のうちの２つ以上を含む。一部の実施形態では、製剤は、カルボキシメチルセルロースを含まない。

【０１３４】

一部の実施形態では、製剤は、約１０ｍＭ～約１００ｍＭヒスチジンの範囲で、ヒスチジンまたは別のアミノ酸を含む。一部の実施形態では、製剤は、約１０ｍＭ～約３０ｍＭヒスチジンの範囲で、ヒスチジンまたは別のアミノ酸を含む。一部の実施形態では、製剤は、約１５ｍＭ～約２５ｍＭヒスチジンの範囲で、ヒスチジンまたは別のアミノ酸を含む。一部の実施形態では、製剤は、約１０ｍＭ～約１６５ｍＭのＮａＣｌの範囲でＮａＣｌを含む。一部の実施形態では、製剤は、約５０ｍＭ～約１６５ｍＭの間のＮａＣｌを含む。一部の実施形態では、製剤は、約５４ｍＭ～約１６２ｍＭの間のＮａＣｌを含む。一部の実施形態では、製剤は、約１１０ｍＭ～約１６２ｍＭの間のＮａＣｌを含む。一部の実施形態では、製剤は、約１ｍＭ～約２０ｍＭの範囲でリン酸ナトリウムを含む。一部の実施形態では、製剤は、約５ｍＭ～約１５ｍＭの範囲でリン酸ナトリウムを含む。一部の実施形態では、製剤は、約２ｍＭ～約１０ｍＭの範囲で一塩基リン酸ナトリウムを含む。一部の実施形態では、製剤は、約４ｍＭ～約８ｍＭの範囲で一塩基リン酸ナトリウムを含む。一部の実施形態では、製剤は、約１ｍＭ～約１０ｍＭの範囲で二塩基リン酸ナトリウムを含む。一部の実施形態では、製剤は、約２ｍＭ～約７ｍＭの範囲で二塩基リン酸ナトリウムを含む。一部の実施形態では、製剤は、約２ｍＭ～約５ｍＭの範囲で二塩基リン酸ナトリウムを含む。一部の実施形態では、製剤は、約０．０１％～約０．２％の範囲でポリソルベート２０を含む。一部の実施形態では、製剤は、約０．０１％～約０．２％の範囲でポリソルベート８０を含む。一部の実施形態では、製剤は、リン酸ナトリウム、塩化ナトリウム、一塩基リン酸ナトリウム、二塩基リン酸ナトリウムおよびポリソルベート２０を含む。一部の実施形態では、製剤は、約１０ｍＭリン酸ナトリウム（約７ｍＭ一塩基リン酸ナトリウムおよび約３ｍＭ二塩基リン酸ナトリウム）、約１１０ｍＭ塩化ナトリウムおよび約０．１％ポリソルベート２０を含む。

【０１３５】

一部の実施形態では、製剤は生理的ｐＨで製剤化される。一部の実施形態では、製剤は、約５．５～約７．５の範囲内のｐＨで製剤化される。一部の実施形態では、製剤は、約６．０～約７．０の範囲内のｐＨで製剤化される。一部の実施形態では、製剤は、約６．５～約７．０の範囲内のｐＨで製剤化される。一部の実施形態では、より低いｐＨの製剤は、より高いｐＨの製剤と比較して改善された製剤安定性を実証する。一部の実施形態では、約６．５のｐＨの製剤は、約７．０のｐＨの製剤と比較して改善された安定性を実証する。一部の実施形態では、約６．０のｐＨの製剤は、約６．５のｐＨの製剤と比較して改善された安定性を実証する。一部の実施形態では、より低いｐＨの製剤は、より高いｐＨの製剤と比較してより高い百分率のモノマーを維持する。一部の実施形態では、約６．５のｐＨの製剤は、約７．０のｐＨの製剤と比較してより高い百分率のモノマーを維持する。一部の実施形態では、約６．０のｐＨの製剤は、約６．５のｐＨの製剤と比較してより高い百分率のモノマーを維持する。

【０１３６】

製剤中の治療剤のタンパク質濃度は、投与の温度でマトリックスの形成を推進するように調整される。例えば、より高いタンパク質濃度はマトリックス形成の推進を助け、この目的のために必要なタンパク質濃度は使用されるＥＬＰシリーズによって異なる。例えば、ＥＬＰ１－１２０または同等の転移温度を有するアミノ酸配列を使用する実施形態では、タンパク質は約１ｍｇ／ｍＬ～約２００ｍｇ／ｍＬの範囲内で存在するか、または約３０ｍｇ／ｍＬ～約１５０ｍｇ／ｍＬの範囲内で存在する。ＥＬＰ４－１２０または同等の転移温度を有するアミノ酸配列を使用する実施形態では、タンパク質は約０．００５ｍｇ

／ｍＬ～約１０ｍｇ／ｍＬの範囲内で存在するか、または約０．０１ｍｇ／ｍＬ～約５ｍｇ／ｍＬの範囲内で存在する。

【０１３７】

一部の実施形態では、治療剤は約０．５ｍｇ／ｍＬ～約２００ｍｇ／ｍＬの範囲内で存在することができるか、または約３０ｍｇ／ｍＬ～約１５０ｍｇ／ｍＬの範囲内で存在する。一部の実施形態では、治療剤は約５０ｍｇ／ｍＬ～約１２５ｍｇ／ｍＬの範囲内、または約７５ｍｇ／ｍＬ～約１１０ｍｇ／ｍＬの範囲内で存在する。一部の実施形態では、治療剤は約１００ｍｇ／ｍＬの濃度で存在する。

【０１３８】

一部の態様では、本開示は、本明細書に開示される活性薬剤の持続的放出レジメンを送達するための方法を提供する。本方法は、必要とする対象に本明細書に記載される医薬組成物を投与することを含み、ここで、医薬組成物は１カ月につき約１～約８回投与される。一部の実施形態では、医薬組成物は、１カ月につき約１回、約２回、約３回および／または約４回投与される。一部の実施形態では、医薬組成物は週単位で投与される。一部の実施形態では、医薬組成物は日単位で投与される。一部の実施形態では、医薬組成物は１週につき１～３回投与される。一部の実施形態では、医薬組成物は２週おきに１回投与される。一部の実施形態では、医薬組成物は１カ月につき１～２回投与される。特定の実施形態では、医薬組成物は、１カ月につき約１回投与される。一部の実施形態では、医薬組成物は、２カ月おきに約１回、３カ月おきに約１回、４カ月おきに約１回、５カ月おきに約１回および／または６カ月おきに約１回投与される。医薬組成物は、１週につき１回、１週につき２回または１カ月につき１～８回の投与のために前充填されたペンまたはシリンジの形で詰め込むことができるか、あるいは従来のバイアルなどに充填することができる。

【０１３９】

一部の実施形態では、製剤は約１月ごとに投与され、皮下または筋肉内に投与することができる。一部の実施形態では、製剤は約１週ごとに投与され、皮下または筋肉内に投与することができる。一部の実施形態では、投与部位は病的部位ではなく、例えば、意図された作用部位でない。

【０１４０】

一部の実施形態では、本明細書に開示される医薬組成物は長期投与される。一部の実施形態では、本明細書に開示される医薬組成物は、約６カ月、約７カ月、約８カ月、約９カ月、約１０カ月、約１１カ月、約１年、約２年、約３年、約４年、約５年、約１０年以上の間投与される。医薬組成物は、本明細書に開示される任意の必要な用量および／または頻度で投与することができる。

【０１４１】

一部の実施形態では、本明細書に開示される医薬組成物は、疾患または障害の症状が改善するまで投与される。一部の実施形態では、本明細書に開示される医薬組成物は、疾患または障害の症候が寛解、遅延および／または治癒するまで投与される。

【０１４２】

一部の実施形態では、本明細書に開示される医薬組成物は、患者が１つまたは複数の疾患または障害の症状を示し始める前に投与される。一部の実施形態では、本明細書に開示される医薬組成物は、疾患または障害の症状の開始時に投与される。

【０１４３】

治療剤は一般的に「全身性送達」のために製剤化され、これは、薬剤が病的部位または作用部位に局所的に送達されないことを意味する。代わりに、薬剤は注射部位から血流中に吸収され、その場合、薬剤は全身的に作用するか、または循環を通して作用部位に輸送される。治療剤は任意の公知の経路によって、例えば、経口的、静脈内、筋肉内、経鼻的、皮下、膣内におよび直腸内に投与することができる。一部の実施形態では、製剤は、一般的に皮下投与のためのものである。一部の実施形態では、薬剤が皮下に投与されるとき、薬物動態学的（ＰＫ）パラメータは延長される。一部の実施形態では、融合タンパク質

の半減期は延長される。一部の実施形態では、他の手段（例えば静脈内）によって投与される薬剤と比較して、薬剤が皮下に投与されるときのＰＫパラメータは延長される。一部の実施形態では、他の手段（例えば静脈内）によって投与される薬剤と比較して、薬剤が皮下に投与されるときに薬剤の貯蔵は延長される。注射部位からの遅い吸収を提供することによって、腎クリアランスおよび分解を制御し、それによって所望のＰＫプロファイルを達成することができる。

【０１４４】

有利には、活性薬剤の持続的放出のために、組成物は長期の薬物動態学的曝露を提供する。特定の態様では、最大曝露レベルは、投与の約１０時間後、約２４時間後、約４８時間後または約７２時間後に達成することができる。一般的に、最大曝露レベルは、投与の約１０時間後～約４８時間後の間に達成される。最大曝露レベルが達成された後、組成物は持続的放出速度を達成することができ、それによって最大レベルのかなりの百分率がしばらくの間得られる。例えば、持続的速度は、最大曝露レベルの約５０％、約６０％、約７０％、約８０％、約９０％または約１００％達成することができる。持続的速度を維持するための例示的な期間は、最大曝露レベルが達成されてから約３日間、約４日間、約５日間、約６日間、約１週間、約２週間、約４週間、約６週間または約８週間である。その後、持続的速度は、低減された曝露速度に下がってよい。そのような低減された曝露速度は、最大曝露レベルの約５％、約１０％、約２０％、約３０％、約４０％、約５０％または約６０％であってよい。図２０Ｂは、１０００ｎｇ／ｍＬの最大曝露レベルが約１～２日以内に得られる実施形態（ＰＥ０２５６）を例示する。この期間の後、約１０～１２日目まで最大曝露レベルの約７０～１００％の持続的速度が維持され、その後、試験の残りの間に約６０％～約１０％まで低下する低減された曝露速度が得られる。

【０１４５】

様々な実施形態では、活性薬剤の血漿中濃度は、製剤の複数回の投与、例えば少なくとも２回、少なくとも約５回または少なくとも約１０回の投与の過程で、約２０倍、または約１０倍、または約５倍、または約３倍を超えて変化することはない。一部の実施形態では、活性薬剤の血漿中濃度は、各投与の間で、約２０倍、または約１０倍、または約５倍、または約３倍を超えて変化することはない。一部の実施形態では、定常状態に到達するまで（例えば、約３～約４回の投与の後）、多少の蓄積がある。投与は、実質的に等間隔、例えば、約日ごと、または約１週に１回、または１カ月につき１～約５回、または約２カ月おきに１回または約３カ月おきに１回である。他の実施形態では、用量は、５回以上の投与の後に定常状態に到達するように、数回の投与にわたって着実に増加させることができる。

【０１４６】

本明細書に開示される医薬組成物は、未融合であるか非コンジュゲート型の対応物より小さい用量および／または低い頻度で投与することができる。当業者は各場合に望ましい用量を決定することができるが、治療的恩恵の達成のための治療剤の適する用量は、例えば、１用量につきレシピエントの１キログラム体重につき約１マイクログラム（μｇ）～約１００ミリグラム（ｍｇ）の範囲内、好ましくは１用量につき１キログラム体重につき約１０μｇ～約５０ｍｇの範囲内、最も好ましくは１用量につき１キログラム体重につき約１０μｇ～約５０ｍｇの範囲内であってよい。一部の実施形態では、医薬組成物は低用量で投与される。一部の実施形態では、医薬組成物は、１用量につき体重１キログラムにつき１ｍｇから１用量につき体重１キログラムにつき約９ｍｇまでの間の用量で投与される。一部の実施形態では、医薬組成物は、１用量につき体重１キログラムにつき約１ｍｇ、１用量につき体重１キログラムにつき約３ｍｇおよび／または１用量につき体重１キログラムにつき約９ｍｇで投与される。所望の用量は、１用量または１日に適当な間隔で投与される２つ以上の下位用量として提示することができる。これらの下位用量は、例えば１単位剤形につき約１０μｇ～約１０００ｍｇ、好ましくは約５０μｇ～約５００ｍｇ、最も好ましくは約５０μｇ～約２５０ｍｇの有効成分を含有する単位剤形で投与することができる。あるいは、レシピエントの状態がそれを必要とするならば、用量は連続注入と

して投与することができる。

【０１４７】

ある特定の実施形態では対象はヒトであるが、他の実施形態では非ヒト哺乳動物、例えば家畜化されたペット（例えば、イヌまたはネコ）または家畜もしくは畜産動物（例えば、ウマ、ウシ、ヒツジまたはブタ）であってもよい。

【０１４８】

本出願全体において「ａ」、「ａｎ」および「ｔｈｅ」などの単数形は便宜上使用されるが、文脈または明示的記述が別途示す場合以外は、単数形は複数形を含むこととすることを理解するべきである。全ての数値範囲は、数値範囲の中のいずれの数値地点をも含むと理解するべきで、いずれの数値地点をも個々に列挙するものと解釈するべきである。同じ成分または特性を対象とする全ての範囲の端点は包含的であり、個々に組合せ可能であることとする。

【０１４９】

参照される数値表示に関連して使用されるとき、用語「約」は、参照数値表示プラスまたはマイナス参照数値表示の最高１０％を意味する。例えば、語「約５０」は、４５～５５の範囲を含む。

【０１５０】

本明細書で用いるように、単語「含む」およびその変異体は非限定的であることとし、そのため、リスト中のアイテムの列挙は、この技術の材料、組成物、器具および方法で同じく有益であろう他の同様のアイテムを除外するものではない。同様に、用語「することができる」および「してもよい」およびそれらの変異形は非限定的であることとし、そのため、実施形態がある特定の要素または特徴を含むことができるかまたは含んでもよいとの叙述は、それらの要素または特徴を含有しない本技術の他の実施形態を排除しない。含む、含有するまたは有するなどの用語の同義語としてのオープンエンドの用語「含む」は、本開示を記載および請求するために本明細書で使用されるが、本技術またはその実施形態は、列挙された成分「からなる」または「から事実上なる」などのより限定的な用語を使用して代わりに記載することができる。

【０１５１】

本明細書で用いるように、「半減期」（一般的に、ｉｎ　ｖｉｖｏ半減期または循環半減期を指す）は、活性薬剤の生物活性の５０％の減少が起こるために必要とされる期間である。一部の実施形態では、この用語は、延期された曝露および長い半減期の両方を含む（例えば、非コンジュゲート型のペプチドと比較した注射部位からの遅い取り込みおよびクリアランスの遅滞の両方）。

【０１５２】

特に明記されない限り、本明細書の全ての専門用語および科学用語は、この開示が属する分野の当業技術者が通常理解するのと同じ意味を有する。本明細書に記載されるそれらに類似するかまたは同等であるいかなる方法および材料も本開示の実施または試験で用いることができるが、好ましい方法および材料が本明細書に記載される。

【０１５３】

この開示は、以下の非限定的実施例でさらに例示される。

【実施例】

【０１５４】

実施例１：ＥＬＰ融合の相転移特性

ある特定のアミノ酸配列が示す相転移特性を、図１（ＥＬＰ１）および図２（ＥＬＰ４）に例示する。相転移は、濁度の増加として観察することができる。図３は、理論によって縛られることを望まないが、所与の濃度の相転移温度より高い温度での水シェルの排除および水素結合の形成によって推進される、相転移の潜在的機構を例示する。

【０１５５】

実施例２：月ごとのＥＬＰ融合ポリペプチド

ＥＬＰモチーフのＶＰＧＸＧ配列でゲスト残基位置Ｘのアミノ酸を変更することは、転

移状態のＥＬＰバイオポリマーのコアセルベートの安定性または強度を変更し、皮下に投薬したときに薬物のより遅い放出および延長された貯蔵をもたらすことができる。９つのＶＰＧＸＧ五量体（９量体）ブロック（アルファ、ベータおよびベータｖ２）で使用されるゲストアミノ酸の比を変えることによって、異なるコアセルベーション強度を有するＥＬＰバイオポリマーのコレクションを構築した。ＶＰＧＸＧのゲスト残基を置換することに加えて、モチーフＸＰＧＶＧを有する五量体も構築した（デルタ）。ＥＬＰ五量体は任意の長さに組み合わせることができるが、ＤＮＡの合成および操作の例示および容易さのために、９つのＥＬＰ五量体（９量体）のサブユニットを構築した。これらの９量体は任意の長さのポリマーを作製するために組み合わせることができるが、ゲスト残基位置のバリンと他のアミノ酸との全体的な比は同じままである。図４は、これらの９量体（アルファ、ベータ、ベータｖ２およびデルタ）のアラインメントを示す。９量体は、疎水性を有する、したがって、以前に検査したＥＬＰ１シリーズ（ＶＰＧＸＧ：Ｖ５Ａ２Ｇ３）およびＥＬＰ４シリーズ（ＶＰＧＸＧ：Ｖ－５）のバイオポリマーの間の転移温度を有するＥＬＰバイオポリマーを形成するように設計した。図１０に表されない別のＥＬＰポリマーが開発された。このポリマー（ＥＬＰガンマ）は、Ｖ５：Ａ２：Ｇ２の比でＶＰＧＸＧ五量体モチーフを含む。表１は、新しいＥＬＰシリーズと１および４シリーズの９量体の間の、ゲスト残基占有率の比を比較する。

【０１５６】

異なる長さのバイオポリマーを構築するために、反復ライゲーションを使用して９量体を繰り返した。図５は、このライゲーション技術を例示する。合成ベクターを作製するために、バックグラウンドベクター（ｐＩＤＴ）で９量体を合成した（Integrated DNA Technologies、Coralville、IA）。これらの合成ベクターをＢｇｌＩ／ＰｆｌＭＩ制限酵素で切断し、ＢｇｌＩで切断して脱リン酸化した同じ合成ベクターにサブクローニングで戻した。これは、９量体の２つのコピーを含有するベクターを与える。９量体（１４４量体）の１６コピーを含有するベクターが構築されるまで、この倍加技術を継続した。例えば、１８、２７、３６、４５、５４、６３、７２、８１、９０、９９、１０８、１１７、１２６、１３５、１４４、１５３、１６２、１７１、１８０コピーの９量体を有するＥＬＰを生成するために、様々な数の９量体のＥＬＰを組み合わせることができる。中間の特性を有する追加のＥＬＰバイオポリマーを生成するために、表１に記載される単位を様々な比で組み合わせることもできる。例えば、ガンマＥＬＰポリマーは、１４４量体が構築されるまでアルファ９量体およびベータ９量体を交互に並べることによって構築された。これらのＥＬＰ　１４４量体は、発現のためにＥＬＰ　１４４量体が正しい読み枠にクローニングされることを可能にするリンカー領域（図７）を含有する、ｐＥＴベースの中間体ベクターｐＰＥ０２４８（図６）に次にサブクローニングした。ｐＰＥ０２４８は、ゲスト位置にバリンを有する１４４量体のＮ末端に追加の五量体反復配列を、およびゲスト残基にトリプトファンを有するＣ末端に追加の五量体を追加する。分子の吸光係数を増加させ、例えば２８０ｎｍで吸光度のより優れた測定を可能にする手段としてトリプトファンを使用することができ、そのことはタンパク濃度の判定または精製中のタンパク含有量のモニタリングのために有益である可能性がある。いずれかの末端に追加される五量体は、コードするＤＮＡがＥＬＰコード配列のいずれかの末端への融合パートナーのクローニングのための制限酵素認識部位を含有するように、設計することもできる。１４４量体発現プラスミドは、ｐＰＥ０２４９（ＥＬＰアルファ－１４４）、ｐＰＥ０２５０（ＥＬＰベータＶ１－１４４）、ｐＰＥ０３６２（ＥＬＰベータＶ２－１４４）、ｐＰＥ０２５１（ＥＬＰガンマ－１４４）およびｐＰＥ０２５２（ＥＬＰデルタ－１４４）と命名された。図８～１７は、バイオポリマーのＥＬＰアミノ酸配列およびベクターのマップを含有する。

【０１５７】

ＧＬＰ－１ペプチドは、異なるＥＬＰ配列のＮ末端にクローニングされた。合成されたＧＬＰ－１遺伝子をＸｂａＩ／ＢｓｒＧＩで消化し、ＸｂａＩ／Ａｃｃ６５ｉをｐＰＥ０２４９、ｐＰＥ０２５０、ｐＰＥ０３６２、ｐＰＥ０２５１およびｐＰＥ０２５２にクロ

ーニングし、ベクターｐＰＥ０２５３（ＧＬＰ－１：ＥＬＰアルファ－１４４）、ｐＰＥ２５４（ＧＬＰ－１：ＥＬＰベータＶ１－１４４）、ｐＰＥ０３１１（ＧＬＰ－１：ＥＬＰベータＶ２－１４４）、ｐＰＥ０２５５（ＧＬＰ－１：ＥＬＰガンマ－１４４）、ｐＰＥ０２５６（ＧＬＰ－１：ＥＬＰデルタ－１４４）をそれぞれ作製した。これらのベクターは、大腸菌株ＢＬＲ（ＤＥ３）で発現された。発酵および精製の後、２０ｍＭヒスチジン、１１０ｍＭ　ＮａＣｌ中で異なるＥＬＰポリマーを含むペプチド融合を１０ｍｇ／ｍＬで製剤化し、Ｃａｒｙ３００　ＵＶ分光計を使用して転移温度を測定した。図１８および表２に示すように、ＥＬＰアルファ－１４４、ＥＬＰベータＶ１－１４４、ＥＬＰベータＶ２－１４４、ＥＬＰガンマ－１４４およびＥＬＰデルタ－１４４の転移温度は、シリーズ４のＥＬＰ（ＰＥ０００２）およびシリーズ１のＥＬＰ（ＰＢ１０２３）のための温度を含まずにそれらの間にくる。

【０１５８】

ＰＥ０２５３（アルファ）、ＰＥ０２５４（ベータｖ１）、ＰＥ０２５５（ガンマ）、ＰＥ０２５６（デルタ）およびＰＥ０３１１（ベータｖ２）のＰＫは、カニクイザルで評価された。図１９および表４は、ＰＥ０２５３、ＰＥ０２５４、ＰＥ０２５５またはＰＥ０２５６のいずれの２０ｍｇ／ｋｇの単回皮下注射を各々投与した、１群につき１匹の雄および１匹の雌の非ナイーブサルのＰＫ結果を示す。図２０および表５は、雄２匹および雌２匹の４匹のタンパク質ナイーブサルへの１０ｍｇ／ｋｇのＰＥ０２５６の単回皮下投与のＰＫ結果を示す。図２１および表６は、全て雄の３匹のタンパク質ナイーブサルへの１０ｍｇ／ｋｇのＰＥ０３１１の単回皮下投与のＰＫ結果を示す。対照的に、図２２および表７は、２ｍｇ／ｋｇのＰＥ０２５６の単回ＩＶ注射を投与した非ナイーブサルのＰＫ結果を示す。

【０１５９】

実施例３：成長ホルモンＥＬＰ構築物の調製

ヒト成長ホルモン（ｈＧＨ）配列を合成し、制限酵素ＰｆｌＭ１／ＢｇｌＩで消化し、次にプラスミドｐＥ０３６２にサブクローニングしてプラスミドｐＰＥ０４２９を提供し、ＥＬＰベータＶ２－１４４をｈＧＨ配列のＮ末端に置いた。図２３は、ｐＰＥ０４２９のプラスミドマップを示す。図２４は、融合タンパク質の配列を示す。この構築物は、ＥＬＰベータＶ２　９量体の１６個の反復配列を有するＥＬＰを提供する。

【０１６０】

さらなる融合タンパク質では、ＥＬＰ１　３０量体をｐＰＥ０４２９の融合タンパク質のＣ末端に付加してプラスミドｐＰＥ０４３０を提供した。ＥＬＰ１　３０量体を付加することは、受容体媒介クリアランスを破壊し、したがって、ｈＧＨ融合タンパク質の循環半減期をさらに増加させる。図２７は、プラスミドｐＰＥ０４３０のプラスミドマップを示す。図２８は、融合タンパク質の配列を示す。

【０１６１】

他の実験では、ｈＧＨタンパク質をシリーズ１　ＥＬＰ　１２０量体に単独で、およびＣ末端のＥＬＰ１シリーズ３０量体と一緒に融合した。図２５は、ｈＧＨをｐＰＢ１０３１に挿入し、Ｃ末端のｈＧＨ配列を有するＥＬＰ１シリーズ１２０量体を提供することによって調製した、プラスミドｐＰＥ０４３１のプラスミドマップを示す。図２６は、融合タンパク質の配列を示す。ＥＬＰ１　１２０量体タンパク質をプラスミドｐＰＥ０４３１に挿入して、ＥＬＰ１－１２０　ｈＧＨ融合タンパク質のＣ末端にＥＬＰ１　３０量体タンパク質を付加した。生じたプラスミドは、ｐＰＥ０４３２と命名した。図２９。生じたＥＬＰ１－１２０量体－ｈＧＨ－ＥＬＰ１　３０量体のアミノ酸配列を図３０に示す。

【０１６２】

実施例４：エキセンディン－４ＥＬＰ構築物の調製

エキセンディン－４コード配列を合成し、制限酵素Ｘｂａｌ／ＢｓｒＧｌで消化し、次にプラスミドｐＥ０３６２にサブクローニングしてプラスミドｐＰＥ０３６４を提供し、エキセンディン－４配列をＥＬＰベータＶ２－１４４配列のＮ末端に置いた。図３１は、ｐＰＥ０３６４のプラスミドマップを示す。図３２は、融合タンパク質の配列を示す。こ

の構築物は、ＥＬＰベータＶ２　９量体の１６個の反復配列を有するＥＬＰを提供する。
【０１６３】
参照による組込み
本明細書で参照される全ての特許および刊行物は、以下で開示される刊行物を含め、ここに参照により完全に組み込まれる。
【０１６４】
本明細書で議論される刊行物は、本出願の出願日より前のそれらの開示のためだけに提供される。本明細書のいかなるものも、先行開示のために本開示がそのような刊行物に先行する権利を有しないことを承認するものと解釈するべきではない。
【０１６５】
本出願は、以下の刊行物を全ての目的のために参照により完全に組み込む：米国特許出願公開２００１／００３４０５０　Ａ１；米国特許出願公開第２００９／０２２０４５５号；米国特許第８，３３４，２５７号；米国特許出願公開第２０１３／０３１０５３８号；米国特許出願公開第２０１３／０１７２２７４号；米国特許出願公開第２０１１／０２３６３８４号；米国特許第６，５８２，９２６号；米国特許第７，４２９，４５８号；米国特許第７，３６４，８５９号；米国特許第８，１７８，４９５号；米国特許出願公開第２０１３／００７９２７７号；米国特許出願公開第２０１３／００８５０９９号；米国特許出願公開第２０１３／０１４３８０２号；米国特許出願公開第２０１４／００２４６００号；米国特許出願公開第２０１１／０１７８０１７号；米国特許第７，７０９，２２７号；米国特許出願公開第２０１１／０１２３４８７号；米国特許第８，７２９，０１８号；米国特許出願公開第２０１４／０１７１３７０号；米国特許出願公開第２０１３／０１５０２９１号；ＷＯ／２０１４／１１３４３４；および米国特許出願公開第２０１４／０２１３５１６号。
【０１６６】

【表４－１】

表 4. PE0253(アルファ)、PE0254(ベータ v1)、PE0255(ガンマ)または PE0256(デルタ)のいずれの 20mg/kg の単回皮下注射を各々投与した、1 群につき 1 匹の雄および 1 匹の雌の非ナイーブサルからの PK 結果。

PK 結果 (ng/mL)						
	PE0253 (アルファ)			PE0254 (ベータ v1)		
時間(時間)	905	906	平均	907	908	平均
0	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
1	84.3	111	97.65	69.6	112	90.8
3	170	201	185.5	139	180	159.5
6	136	256	196	167	160	163.5
24	98.7	63.1	80.9	50.9	67.2	59.05
48	80.8	48.7	64.75	33.6	39.3	36.45
72	64.8	44.6	54.7	21.8	24.8	23.3
168	51.8	54.8	53.3	16.5	14.8	15.65
240	46.7	50.3	48.5	16.1	13.6	14.85
336	5.87	62.1	33.985	9.23	15.5	12.365
408	BLQ	61.7	61.7	10.4	13.5	11.95
504	BLQ	10.6	10.6	2.85	15	8.925
576	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	11.9	11.9
672	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	13.5	13.5
720	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	14.5	14.5
BLQ<2.44ng/mL						
BLQ<4.88ng/mL						

【０１６７】

【表４－２】

	PE0255 (ガンマ)			PE0256 (デルタ)		
時間(時間)	909	910	平均	911	912	平均
0	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
1	93.5	78	85.75	33	97.9	65.45
3	124	148	136	164	196	180
6	84.4	142	113.2	214	266	240
24	49.4	54.1	51.75	190	454	322
48	32.4	42.2	37.3	490	543	516.5
72	21.9	31.2	26.55	951	594	772.5
168	26.5	29.3	27.9	1430	754	1092
240	4.51	15.4	9.955	3490	1170	2330
336	BLQ	BLQ	BLQ	483	1450	966.5
408	BLQ	BLQ	BLQ	73.8	1350	711.9
504	BLQ	BLQ	BLQ	4.3	914	459.15
576	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	839	839
672	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	852	852
720	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	691	691
BLQ<2.44ng/mL						
BLQ<4.88ng/mL						

【０１６８】

【表５】

表 5. 雄２匹および雌２匹の４匹のタンパク質ナイーブサルへの 10mg/kg の PE0256(デルタ)の単回皮下投与の PK 結果(ng/mL)。

PK 結果 (ng/mL)					
時間	日数	M1	M2	F1	F2
0	0	blq	17	blq	blq
1	0.042	232	94	52.9	241
3	0.125	482	217	176	596
6	0.25	492	257	277	831
24	1	997	374	1030	1610
48	2	1260	677	1630	1640
72	3	1130	875	1780	1660
168	7	1230	1140	1620	1210
240	10	1540	783	1220	1030
336	14	27	617	440	758
408	17	blq	395	102	587
504	21	blq	128	16.6	383
576	24	blq	38.3	blq	348
672	28	blq	5.6	3.6	230
720	30	blq	blq	blq	97.5

【０１６９】

【表６】

表 6. 全て雄の３匹のタンパク質ナイーブサルへの 10mg/kg の PE0311(ベータ v2)の単回皮下投与の PK 結果。

PK 結果 (ng/mL)						
時間(時間)	日数	1M1	1M2	1M3	平均	SD
0	0	BLQ	BLQ	BLQ	0	0
1	0.042	230	206	181	205.7	24.5
3	0.125	826	426	368	540.0	249.4
6	0.25	1050	360	355	588.3	399.8
24	1	619	333	533	495.0	146.7
48	2	702	548	621	623.7	77.0
72	3	1340	695	799	944.7	346.3
168	7	2110	1270	1640	1673.3	421.0
240	10	1370	1130	726	1075.3	325.5
336	14	1150	224	393	589.0	493.1
408	17	1690	24.8	290	668.3	894.7
504	21	908	BLQ	133	520.5	548.0
576	24	289	BLQ	68.9	179.0	155.6
672	28	205	BLQ	38.3	121.7	117.9
720	30	137	BLQ	39.8	88.4	68.7

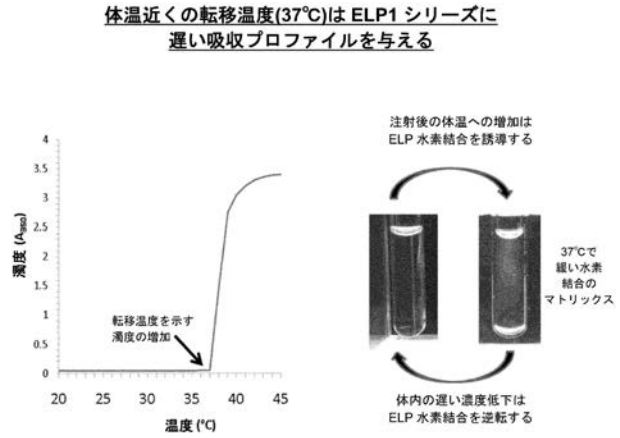
【０１７０】

【表７】

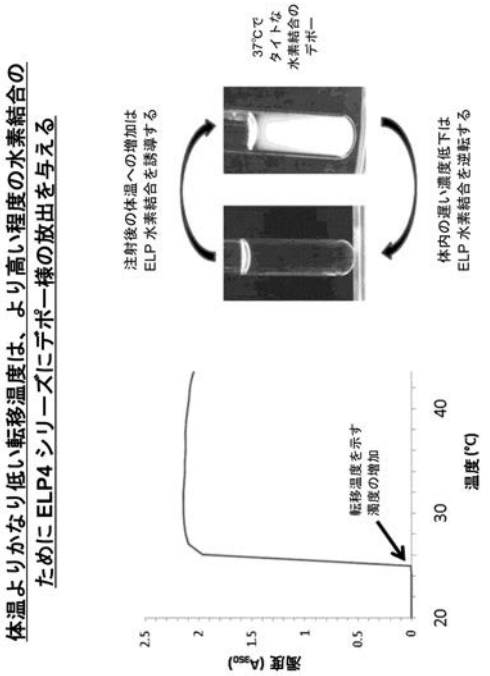
表 7. 2mg/kg の PE0256(デルタ)の単回 IV 注射を投与した非ナイーブサルの PK 結果 (ng/mL)。

PE0256 (デルタ)			
時間(時間)	**914**	**915**	**平均**
0	BLQ	BLQ	BLQ
0.083	31300	30400	30850
0.25	28600	29400	29000
0.5	30400	29000	29700
0.75	25500	26500	26000
1	25900	23600	24750
2	22200	18800	20500
3	19300	16400	17850
6	15500	12000	13750
24	4700	2960	3830
48	1120	434	777
72	334	48.6	191.3
96	57.6	5.38	31.49
120	9.81	BLQ	9.81
144	BLQ	BLQ	BLQ
168	BLQ	BLQ	BLQ

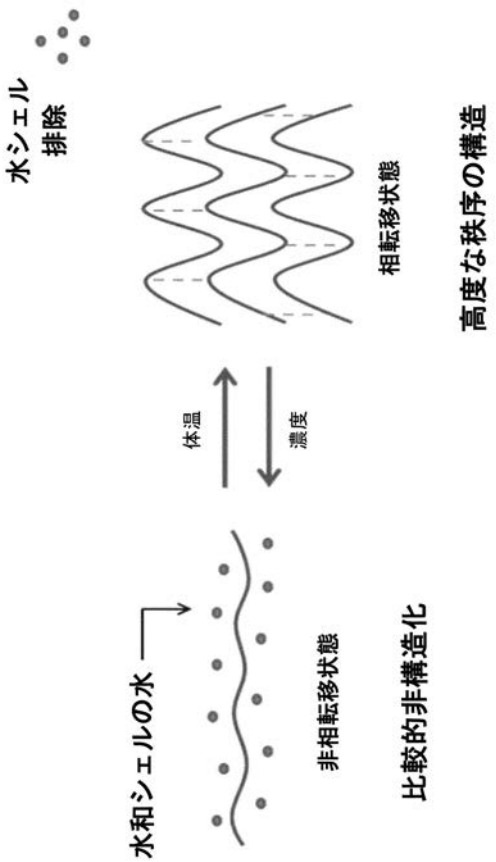
【図１】



【図２】



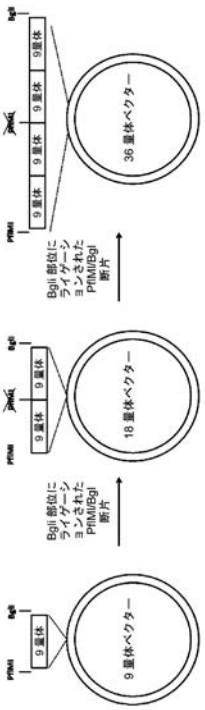
【図３】


水シェル
排除
相転移状態
高度な秩序の構造
体温
濃度
水和シェルの水
非相転移状態
比較的非構造化

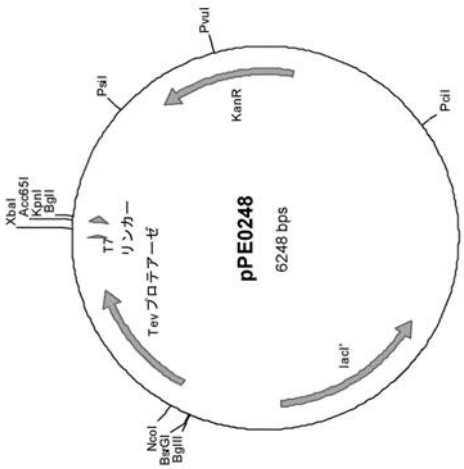
【図４】


1 VPGVGVPGGGVPGVGVPGVGVPGVGVPGGGVPGVGVPGVG
1 VPGVGVPGVGVPGAGVPGVGVPGVGVPGVGVPGAGVPGVG
1 VPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVG
1 VPGVGAPGVGVPGVGAPGVGVPGVGAPGVGVPGVGAPGVGVPGVG
アルファ
ベータ
ベータ v2
デルタ

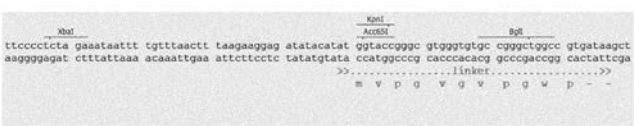
【図５】


9量体
9量体ベクター
Bgl II 部位にライゲーションされたPflMI/BglI断片
18量体ベクター
36量体ベクター

【図６】


pPE0248
6248 bps
KanR
lacI'
Tevプロテアーゼ
リンカー
XbaI
Acc65I
KpnI
BglI
PsiI
PvuI
NcoI
BsrGI
BglII

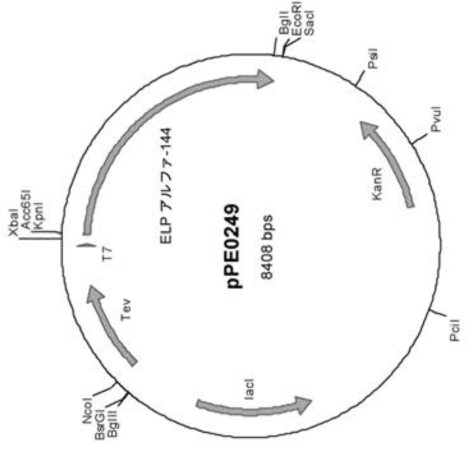
【図７】


XbaI
Acc65I
KpnI
BglI
ttccccctcta gaaataattt tgtttaactt taagaaggag atatacatat ggtaccgggc gtgggtgtgc cgggctggcc gtgataagct
aaggggagat ctttattaaa acaaattgaa attcttcctc tatatgtata ccatggcccg cacccacacg gcccgaccgg cactattcga
>>.....linker.....>>
m v p g v g v p g w p - -

【図８】

VPGVGVPGVGVPGVGVPGGGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGGGVPGVG
VPGVGVPGVGVPGGGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGGGVPGVGVPGVG
VPGVGVPGGGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGGGVPGVGVPGVGVPGVG
VPGGGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGGGVPGVGVPGVGVPGVGVPGGG
VPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGGGVPGVGVPGVGVPGVGVPGGGVPGVG
VPGVGVPGVGVPGVGVPGGGVPGVGVPGVGVPGVGVPGGGVPGVGVPGVG
VPGVGVPGVGVPGGGVPGVGVPGVGVPGVGVPGGGVPGVGVPGVGVPGVG
VPGVGVPGGGVPGVGVPGVGVPGVGVPGGGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVG
VPGGGVPGVGVPGVGVPGVGVPGGGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGGG
VPGVGVPGVGVPGVGVPGGGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGGGVPGVG
VPGVGVPGVGVPGGGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGGGVPGVGVPGVG
VPGVGVPGGGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGGGVPGVGVPGVGVPGVG
VPGGGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGGGVPGVGVPGVGVPGVGVPGGG
VPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGGGVPGVGVPGVGVPGVGVPGGGVPGVG
VPGVGVPGVGVPGVGVPGGGVPGVGVPGWP

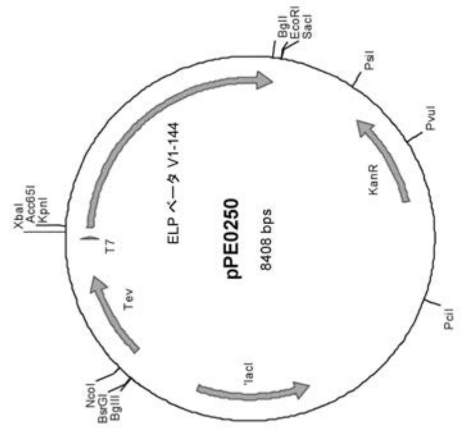
【図９】



【図１０】

VPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGAGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGAG
VPGVGVPGVGVPGVGVPGAGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGAGVPGVG
VPGVGVPGVGVPGAGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGAGVPGVGVPGVG
VPGVGVPGAGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGAGVPGVGVPGVGVPGVG
VPGAGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGAGVPGVGVPGVGVPGVGVPGAG
VPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGAGVPGVGVPGVGVPGVGVPGAGVPGVG
VPGVGVPGVGVPGVGVPGAGVPGVGVPGVGVPGVGVPGAGVPGVGVPGVG
VPGVGVPGVGVPGAGVPGVGVPGVGVPGVGVPGAGVPGVGVPGVGVPGVG
VPGVGVPGAGVPGVGVPGVGVPGVGVPGAGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVG
VPGAGVPGVGVPGVGVPGVGVPGAGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGAG
VPGVGVPGVGVPGVGVPGAGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGAGVPGVG
VPGVGVPGVGVPGAGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGAGVPGVGVPGVG
VPGVGVPGAGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGAGVPGVGVPGVGVPGVG
VPGAGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGAGVPGVGVPGVGVPGVGVPGAG
VPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGAGVPGWP

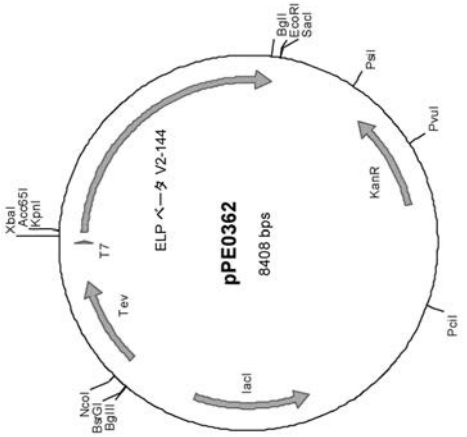
【図１１】



【図１２】

VPGVGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAG
VPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAG
VPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGAG
VPGVGVPGAGVPGVGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGVG
VPGAGVPGVGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGAG
VPGVGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAG
VPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVG
VPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAG
VPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVG
VPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAG
VPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAG
VPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVG
VPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAG
VPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVG
VPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAG
VPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVG
VPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAG
VPGVGVPGVGVPGAGVPGWP

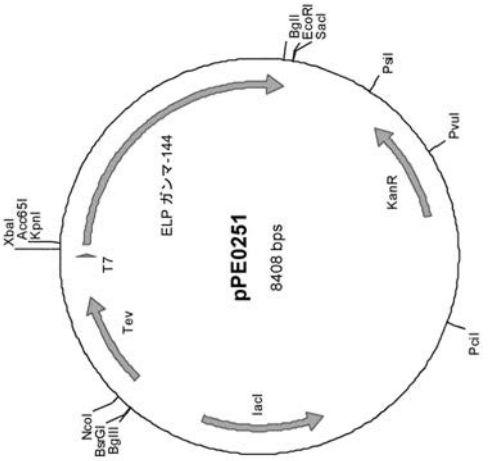
【図１３】



【図１４】

VPGVGVPGVGVPGVGVPGGGVPGVGVPGVGVPGVGGGVPGVG
VPGVGVPGVGVPGVGVPGAGVPGVGVPGVGVPGVGVPGAGVPGVG
VPGVGVPGGGVPGVGVPGVGVPGGGVPGVGVPGVGVPGVG
VPGVGVPGAGVPGVGVPGVGVPGAGVPGVGVPGVGVPGGG
VPGVGVPGVGVPGVGVPGGGVPGVGVPGVGVPGAG
VPGVGVPGVGVPGVGVPGAGVPGVGVPGVGVPGVG
VPGVGVPGVGVPGGGVPGVGVPGVGVPGVGVPGGG
VPGGGVPGVGVPGVGVPGVGVPGAGVPGVGVPGVG
VPGAGVPGVGVPGVGVPGGGVPGVGVPGVGVPGGGVPGVG
VPGVGVPGVGVPGVGVPGAGVPGVGVPGVGVPGAGVPGVG
VPGVGVPGGGVPGVGVPGVGVPGGGVPGVGVPGVGGG
VPGVGVPGAGVPGVGVPGVGVPGAGVPGVGVPGVGVPGAG
VPGVGVPGVGVPGGGVPGVGVPGVGVPGVGVPGGG
VPGVGVPGVGVPGVGVPGAGVPGWP

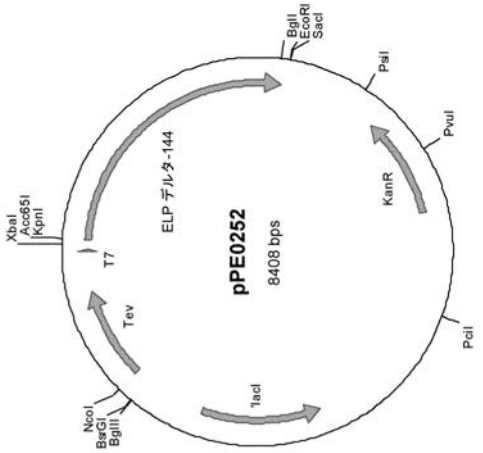
【図１５】



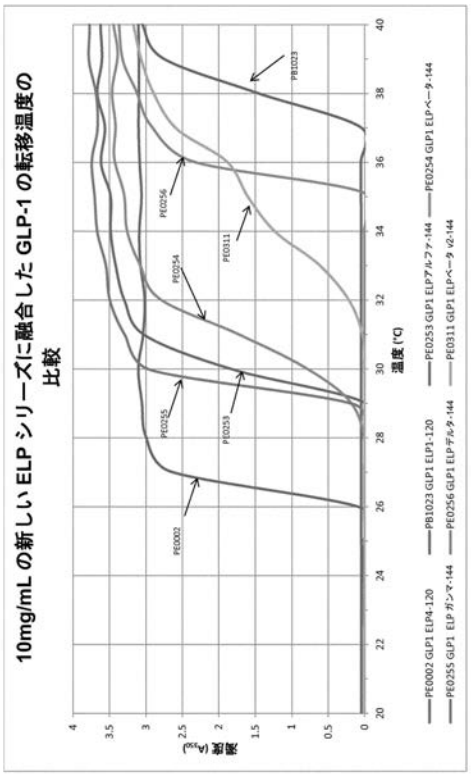
【図１６】

VPGVGVPGVGVPGVGAPGVGVPGVGAPGVGVPGVGAPGVGVPGVGAPGVG
VPGVGVPGVGAPGVGVPGVGAPGVGVPGVGAPGVGVPGVGAPGVGVPGVG
VPGVGAPGVGVPGVGAPGVGVPGVGAPGVGVPGVGAPGVGVPGVGAPGVG
APGVGVPGVGAPGVGVPGVGAPGVGVPGVGAPGVGVPGVGAPGVGVPGVG
VPGVGAPGVGVPGVGAPGVGVPGVGAPGVGVPGVGAPGVGVPGVGAPGVG
APGVGVPGVGAPGVGVPGVGAPGVGVPGVGAPGVGVPGVGAPGVGVPGVG
VPGVGAPGVGVPGVGAPGVGVPGVGAPGVGVPGVGAPGVGVPGVGAPGVG
APGVGVPGVGAPGVGVPGVGAPGVGVPGVGAPGVGVPGVGAPGVGVPGVG
VPGVGVPGVGAPGVGVPGVGAPGVGVPGVGAPGVGVPGVGAPGVGVPGVG
VPGVGAPGVGVPGVGAPGVGVPGVGAPGVGVPGVGAPGVGVPGVGAPGVG
APGVGVPGVGAPGVGVPGVGAPGVGVPGVGAPGVGVPGVGAPGVGVPGVG
VPGVGVPGVGAPGVGVPGVGAPGVGVPGVGAPGVGVPGVGAPGVGVPGVG
APGVGVPGVGAPGVGVPGVGAPGVGVPGVGAPGVGVPGVGAPGVGVPGVG

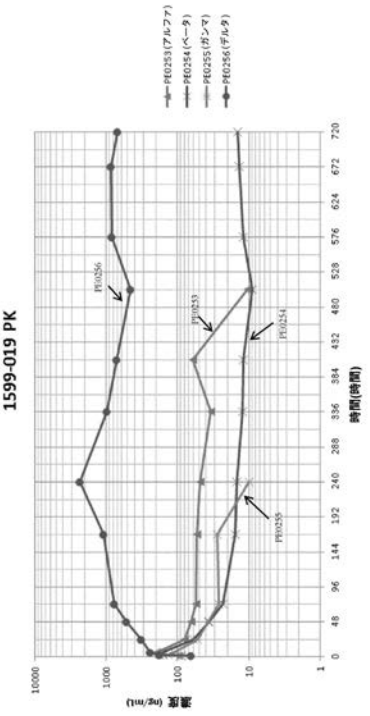
【図１７】



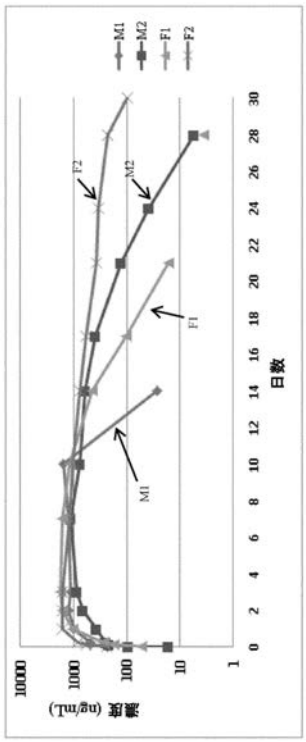
【図１８】



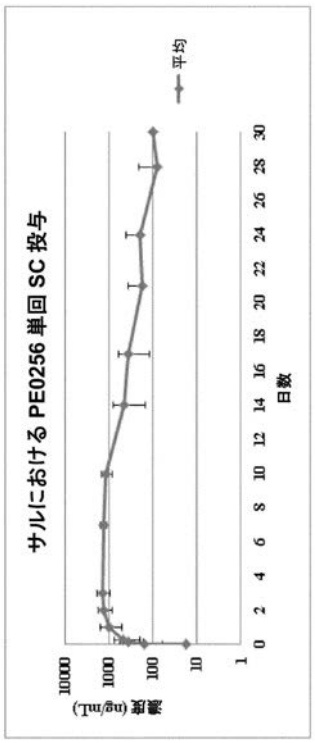
【図１９】



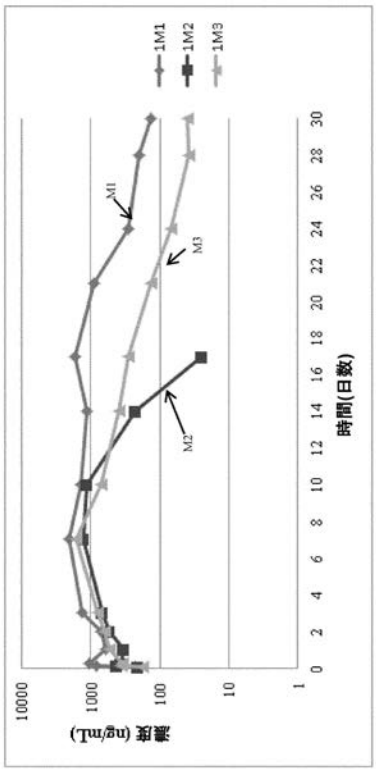
【図２０Ａ】



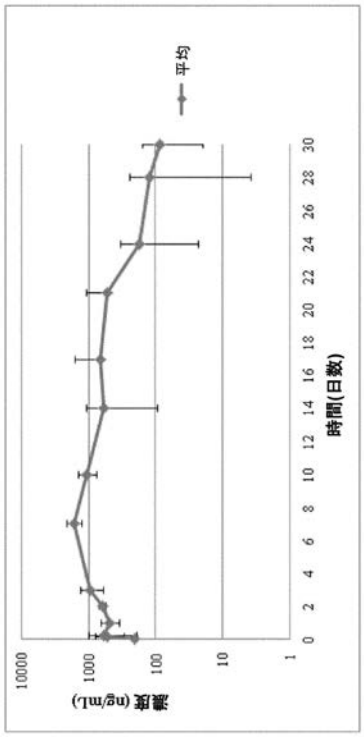
【図２０Ｂ】



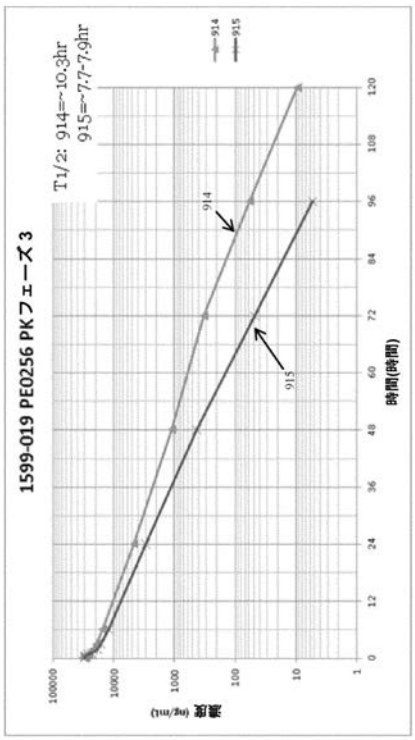
【図２１Ａ】



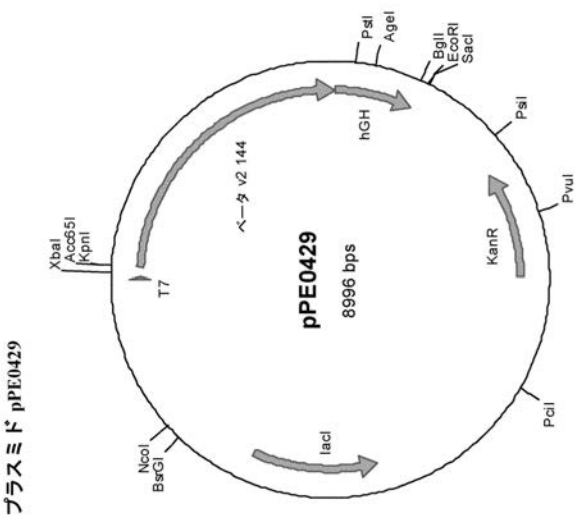
【図２１Ｂ】



【図２２】



【図２３】



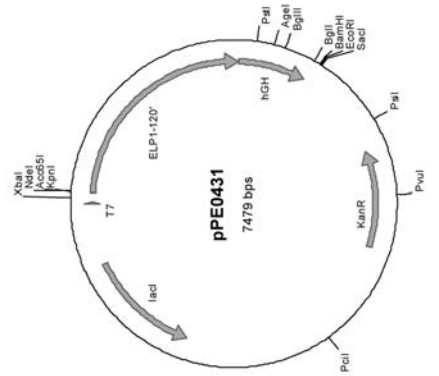
【図２４】

ELP ベータ V2hGH 融合タンパク質のアミノ酸配列

hGH(下線付き); ELP ベータ v2-144 配列(太字); 単一の ELP 五量体(イタリック)

MVPGVGVPGVGVPGAGVPGVGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPG
VGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVP
GAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGVGVPGAGV
PGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAG
VPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGV
GVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPG
AGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVP
GAGVPGVGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGV
PGVGVPGAGVPGVGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGVG
VPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGEFTPIPLSRLFDN
AMLRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVF
ANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLR
IVQCRSVEGSCGF*PGHP

【図２５】



プラスミド pPE0430　合成した hGH 配列を制限酵素 PfiMI25/BglⅠで消化し、プラスミド pPB1031 の BglⅠ部位にサブクローニングした

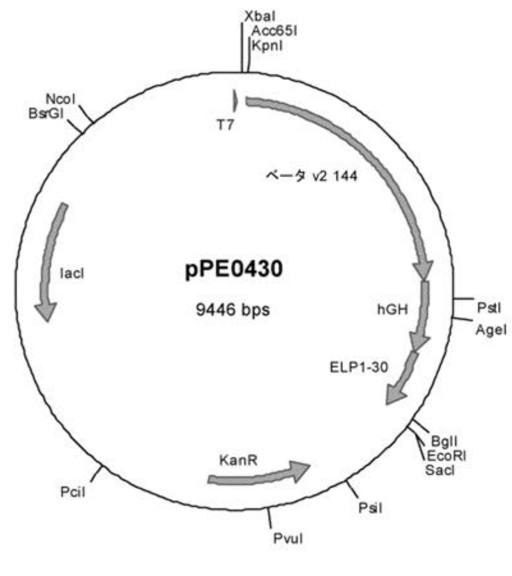
【図２６】

ELP1-120hGH 融合タンパク質のアミノ酸配列。 hGH 配列(下線付き)を 1 シリーズの 120 量体配列(太字)に融合させる。単一の ELP 五量体(イタリック)は hGH の C 末端に残り、さらなるクローニングのための Bgl I 制限部位を保存する。

**MVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGVGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGGGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPG
VGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGGGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGVGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVP
GGGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGVGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGGGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGV
PGVGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGGGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGVGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAG
VPGGGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGVGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGGGVPGVGVPGVGVPGGGVPGA
GVPGVGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGGGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGVGVPGVGVPGVGVPGGGVPG
AGVPGGGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGVGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGGGVPGVGVPGVGVPGGGVP
GAGVPGVGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGGGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGVGVPGVGVPGVGVPGGGV
PGAGVPGGGVPGVG**FPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQ
KSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHN
DDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF*VPGWP*

【図２７】

プラスミド pPE0430



【図２８】

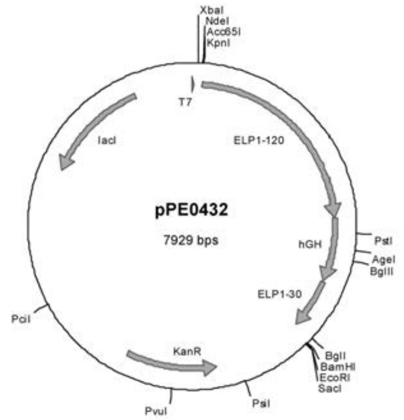
ELP ベータ V2-144-hGH-ELP1-30 融合タンパク質のアミノ酸配列

hGH(下線付き); ELP ベータ v2-144 配列(太字); ELP1 30 量体(イタリック)

**MVPGVGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPG
VGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVP
GAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGVGVPGAGV
PGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAG
VPGVGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGV
GVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGVGVPG
AGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVP
GAGVPGVGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGV
PGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGVG
VPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVG**FPTIPLSRLFDN
AMLRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVF
ANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLR
IVQCRSVEGSCGF*VPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGVGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGGGVPGVGVPGVGVPGGGVPGA
GVPGVGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGGGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGVGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGGG
VPGWP*

【図２９】

プラスミド **pPE0432。** ELP 30 量体を pPE0431 の Bgl I 制限部位にサブクローニングして、それを hGH 配列の C 末端に配置した。



【図３０】

ELP1-120hGH ELP1-30 融合タンパク質のアミノ酸配列。 hGH 配列(下線付き)を ELP1 シリーズの 120 量体配列(太字)および ELP1-30 配列(イタリック)の両方に融合させる。

MVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGGGVPGVGVPGGGVPGAGVPG
VGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGGGVPGVGVPGGGVPGAGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVP
GGGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGGGVPGVGVPGVGVPGAGV
PGVGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGGGVPGVGVPGGGVPGAGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAG
VPGGGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGGGVPGVGVPGVGVPGA
GVPGVGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGGGVPGAGVPGVGVPGVGVPGGGVPG
AGVPGGGVPGVGVPGGGVPGAGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGGGVPGVGVPGVGVPGGGVP
GAGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGGGVPGVGVPGVGVPGAGVPGVGVPGVGVPGGGV
PGAGVPGGGVPGVGFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQ
KSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHN
DDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGFPVGVGPVGIVPGAGIVPGAGIVPGAGIVPGAGIVPGAGIVP
GAGIVPGGGIPGIGIPGIGIPGGGIPGAGIPGIGIPGVGIPGGGIPGAGIPGGGIPGIGIPGIGIPGGGIPGAGIVPG
VGIPGVGIPGIGIPGGGIPGAGIPGGGIVPGWP

【図３１】

プラスミド pPE0364-合成したエキセンディン-4 配列を制限酵素 XbaI/BsrGI で消化し、XbaI/Acc65i 消化プラスミド pPE0362 にサブクローニングした。

【図３２】

エキセンディン-4 ELP ベータ V2 融合タンパク質のアミノ酸配列。

HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGV
PGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGV
GVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVP
GVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAG
VPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPG
AGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGAGV
PGVGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGA
GVPGVGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGVGVP
GAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGVGVPGVG
VPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGVGVPGAGVPGAGVPGVGVPGAGVPGWP

【配列表】
2018500291000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2015/061955

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - A61K 38/00 (2016.01)
CPC - A61K 38/00 (2016.02)
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC(8) - A61K 38/00, 38/16; C07K 14/00 (2016.01)
CPC - A61K 9/0002, 38/00, 38/16, 47/48246; C07K 14/00 (2016.02)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC - 424/486; 514/1.1, 12
CPC - A61K 9/0002, 38/00, 38/16, 47/48246; C07K 14/00 (2016.02) (keyword delimited)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
PatBase, Google Patents, Google Scholar, PubMed

Search terms used: Elastin-like peptide ELP sustained release slow absorption

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2013/0150291 A1 (JOWETT et al) 23 June 2013 (13.06.2013) entire document	1-5, 29-33, 35
A	US 2014/0213516 A1 (CHILKOTI) 31 July 2014 (31.07.2014) entire document	1-5, 29-33, 35
A	US 2014/0171370 A1 (PHASEBIO PHARMACEUTICALS, INC) 19 June 2014 (19.06.2014) entire document	1-5, 29-33, 35
A	US 2013/0178416 A1 (PHASEBIO PHARMACEUTICALS, INC) 11 June 2013 (11.06.2013) entire document	1-5, 29-33, 35
A	US 2011/0236384 A1 (SETTON et al) 29 September 2011 (29.07.2011) entire document	1-5, 29-33, 35

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
08 February 2016	30 JUN 2016
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2015/061955

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. ☒ forming part of the international application as filed:

      ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      ☐ on paper or in the form of an image file.

   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).

      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

SEQ ID NOs: 1-22 were searched.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2015/061955

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 6-28, 34, 36-57
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

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

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
A61K 31/519	*(2006.01)*	A61K	31/519		4C084
A61K 31/704	*(2006.01)*	A61K	31/704		4C086
A61K 31/407	*(2006.01)*	A61K	31/407		4C206
A61K 33/24	*(2006.01)*	A61K	33/24		4H045
A61K 31/475	*(2006.01)*	A61K	31/475		
A61K 31/513	*(2006.01)*	A61K	31/513		
A61K 31/277	*(2006.01)*	A61K	31/277		
A61K 31/675	*(2006.01)*	A61K	31/675		
A61K 31/196	*(2006.01)*	A61K	31/196		
A61K 31/337	*(2006.01)*	A61K	31/337		
A61K 31/4745	*(2006.01)*	A61K	31/4745		
A61K 47/02	*(2006.01)*	A61K	47/02		
A61K 47/14	*(2006.01)*	A61K	47/14		
A61P 3/10	*(2006.01)*	A61P	3/10		
A61P 3/04	*(2006.01)*	A61P	3/04		
A61P 25/00	*(2006.01)*	A61P	25/00	101	
A61P 9/12	*(2006.01)*	A61P	9/12		
A61P 25/28	*(2006.01)*	A61P	25/28		
A61P 9/10	*(2006.01)*	A61P	9/10	101	
A61P 1/16	*(2006.01)*	A61P	1/16		
C07K 14/78	*(2006.01)*	A61P	9/10		
C12N 15/09	*(2006.01)*	C07K	14/78	ZNA	
C07D 475/08	*(2006.01)*	C12N	15/00	A	
C07H 15/252	*(2006.01)*	C07D	475/08		
C07D 487/14	*(2006.01)*	C07H	15/252		
C07D 519/04	*(2006.01)*	C07D	487/14		
C07D 239/553	*(2006.01)*	C07D	519/04		
C07D 305/14	*(2006.01)*	C07D	239/553	A	
C07D 491/22	*(2006.01)*	C07D	305/14		
		C07D	491/22		

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(72)発明者 ジョエット，ジェームス
アメリカ合衆国，ペンシルベニア州 １９３５５，マルベルン，ワン グレート バレー パークウェイ，スイート ３０，フェーズバイオ ファーマシューティカルズ，インコーポレイテッド内
(72)発明者 バランス，デイヴット ジェームス
アメリカ合衆国，ペンシルベニア州 １９３５５，マルベルン，ワン グレート バレー パークウェイ，スイート ３０，フェーズバイオ ファーマシューティカルズ，インコーポレイテッド内

Ｆターム(参考) 4C048 TT08 UU01 XX01
4C050 AA01 AA07 BB01 BB04 CC04 CC07 DD01 DD02 EE02 FF02

	GG03	HH01								
4C057	BB02	CC04	DD01	JJ50						
4C072	QQ00	UU01								
4C076	AA11	AA94	BB11	CC29	DD23	DD26	DD46	FF11	FF31	FF32
	FF63									
4C084	AA02	AA03	AA17	BA41	BA44	DB34	MA05	MA16	MA66	NA03
	NA12	ZA03	ZA16	ZA36	ZA42	ZA45	ZA70	ZA75	ZC33	ZC35
4C086	AA01	AA02	BA02	BC43	CB03	CB09	CB21	CB22	DA35	EA10
	FA06	HA12	HA24	HA26	HA28	MA02	MA05	MA16	MA66	NA03
	NA12	ZA03	ZA16	ZA36	ZA42	ZA45	ZA70	ZA75	ZC33	ZC35
4C206	AA01	AA02	FA31	HA13	KA01	MA02	MA05	MA36	MA86	NA03
	NA12	ZA03	ZA16	ZA36	ZA42	ZA45	ZA70	ZA75	ZC33	ZC35
4H045	BA10	BA41	CA40	DA31	EA20	FA74				