

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6412183号
(P6412183)

(45) 発行日 平成30年10月24日 (2018.10.24)

(24) 登録日 平成30年10月5日 (2018.10.5)

(51) Int.Cl.	F I
C O 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00 Z N A
C O 7 K 14/47 (2006.01)	C O 7 K 14/47
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62
A 6 1 K 38/16 (2006.01)	A 6 1 K 38/16
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/16

請求項の数 11 外国語出願 (全 127 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-36849 (P2017-36849)	(73) 特許権者	513079971
(22) 出願日	平成29年2月28日 (2017.2.28)		アエグリオン ファーマシューティカルズ
(62) 分割の表示	特願2013-531789 (P2013-531789)		, インコーポレイテッド
原出願日	平成23年9月28日 (2011.9.28)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ケ
(65) 公開番号	特開2017-141232 (P2017-141232A)		ンブリッジ メイン ストリート 101
(43) 公開日	平成29年8月17日 (2017.8.17)	(74) 代理人	100108453
審査請求日	平成29年2月28日 (2017.2.28)		弁理士 村山 靖彦
(31) 優先権主張番号	61/387,402	(74) 代理人	100110364
(32) 優先日	平成22年9月28日 (2010.9.28)		弁理士 実広 信哉
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100133400
(31) 優先権主張番号	61/422,091		弁理士 阿部 達彦
(32) 優先日	平成22年12月10日 (2010.12.10)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 作用持続時間が増した改変ポリペプチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アルブミン結合ドメインポリペプチド (A B D)、第一のペプチドホルモンドメイン (H D 1)、および前記 H D 1 に共有結合で連結された第一のリンカー (L 1) を含む改変ポリペプチドであって、配列番号 53、54、56-64、67-69 および 104-107 から選択されたアミノ酸配列を含む改変ポリペプチド。

【請求項 2】

前記改変ポリペプチドが、配列番号 54 および配列番号 61 から選択されたアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の改変ポリペプチド。

【請求項 3】

対象の疾患または障害を処置することにおける使用のための、請求項 1 または 2 に記載の改変ポリペプチド。

【請求項 4】

リポジストロフィー、脂質異常症、高脂血症、肥満、視床下部性無月経、アルツハイマー病、レプチン欠損症、脂肪性肝疾患、糖尿病 (I 型および II 型を含む)、非アルコール性脂肪性肝炎 (N A S H)、非アルコール性脂肪性肝疾患 (N A F L D)、メタボリックシンドローム X およびハンチントン病から選択された疾患または障害を処置することにおける使用のための、請求項 1 または 2 に記載の改変ポリペプチド。

【請求項 5】

前記疾患または障害が、リポジストロフィー、脂質異常症、高脂血症、肥満、視床下部

10

20

性無月経、アルツハイマー病、レプチン欠損症、脂肪性肝疾患または糖尿病である、請求項4に記載の使用のための改変ポリペプチド。

【請求項6】

請求項1または2に記載の改変ポリペプチドと医薬的に許容し得る賦形剤とを含む医薬組成物。

【請求項7】

注射用医薬組成物である、請求項6に記載の医薬組成物。

【請求項8】

持続放出性または長期持続性医薬組成物である、請求項6または7に記載の医薬組成物。

【請求項9】

リポジストロフィー、脂質異常症、高脂血症、肥満、視床下部性無月経、アルツハイマー病、レプチン欠損症、脂肪性肝疾患、糖尿病（I型およびII型を含む）、非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）、非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）またはメタボリックシンドロームXの処置における使用のための、請求項6から8のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項10】

対象の肥満を処置することにおける使用のための少なくとも二つの異なる抗肥満薬の組み合わせであって、少なくとも一つの抗肥満薬が、ポリエチレングリコール（PEG）にコンジュゲートされているアミリンであり、および少なくとも一つの抗肥満薬が、請求項1または2に記載の改変ポリペプチドである、組み合わせ。

【請求項11】

対象の体重を低減させることにおける使用のための少なくとも二つの異なる抗肥満薬の組み合わせであって、少なくとも一つの抗肥満薬が、ポリエチレングリコール（PEG）にコンジュゲートされているアミリンであり、および少なくとも一つの抗肥満薬が、請求項1または2に記載の改変ポリペプチドである、組み合わせ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2010年9月28日出願の米国特許出願第61/387,402号および2010年12月10日出願の米国特許出願第61/422,091号の優先権を主張するものであり、前記特許出願の開示は出典明示により本明細書に援用されている。

【背景技術】

【0002】

本願は、良好な作用持続時間、高い効力および／または適便な用法（経口投与を含む）を有する化合物、ならびにそれらの使用方法に関する。アルブミン結合ドメインと生物活性ポリペプチドを併せ持つ改変ポリペプチドを本明細書において提供する。いずれの理論にも拘束されることを望まないが、本明細書に記載する改変ポリペプチドはアルブミンを結合できるため、本化合物は循環している間に捕捉され（例えば、アルブミンに結合され）、その結果、例えば腎クリアランスおよび／または分解に起因して作用持続時間増加をもたらすことができると考えられる。かかる処置によって治療可能な疾患としては、リポジストロフィー、脂質異常症、高脂血症、過体重、肥満、視床下部性無月経、アルツハイマー病、レプチン欠損症、脂肪性肝疾患、糖尿病（I型およびII型を含む）、非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）、非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）、メタボリックシンドロームXおよびハンチントン病、またはこれらの組み合わせが挙げられる。

【0003】

上記代謝性疾患、容態および障害に有用なポリペプチドの開発が依然として必要とされている。したがって、本発明の一つの目的は、上記容態の処置に有用な、半減期が延長された改変ポリペプチドおよびそれらの製造および使用方法を提供することである。

【0004】

本明細書に引用する各特許、特許出願および出版物は、その全体があらゆる目的のために出典明示により本明細書に援用されている。

【発明の概要】

【0005】

アルブミンに対する結合親和性およびさらなる治療有用性を有する改変ポリペプチド化合物を提供する。これらの化合物は、アルブミンを結合できるアルブミン結合ドメイン（ABD）ポリペプチドと、該ABDと共有結合で連結されている、生物活性であることができ、有益な生物学的応答を惹起することができるホルモンドメイン（HD）ポリペプチドを含む、改変ポリペプチドである。本明細書に記載するABDまたはHDポリペプチドの中には、前記改変ポリペプチド内でリンカーL、例えば本明細書に記載するようなL1、によって所望により共有結合することができるものもある。いずれの理論にも拘束されることを望まないが、本明細書に記載する改変ポリペプチドはアルブミンを結合できるため、本化合物は対象内で捕捉され、その結果、該対象内での作用持続時間増加をもたらすことができると考えられる。

10

【0006】

第一の態様では、本明細書に記載の改変ポリペプチドを提供する。この改変ポリペプチドは、アルブミン結合ドメイン（ABD）およびホルモンドメイン（HD1）を含む。前記ホルモンドメインは、レプチン、レプチンの類似体またはそれらの活性断片であるポリペプチドを含む。

20

【0007】

別の態様では、処置を必要とする対象の疾患または障害を処置する方法を提供する。この方法は、本明細書に記載の改変ポリペプチドをその対象に投与することを含む。

【0008】

さらに別の態様では、本明細書に記載する改変ポリペプチド化合物を医薬的に許容し得る賦形剤と併せて含む医薬組成物を提供する。

【0009】

さらに別の態様には、前記改変ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドおよびそれらの中間体、かかるポリヌクレオチドを担持する発現ベクター、かかるポリヌクレオチドを発現する宿主細胞、ならびにそれらの発現、合成、翻訳後修飾および単離のための手段がある。

30

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】図1A-1Bは、実施例3において説明する痩せたラットへの投与時における、本明細書に記載の改変ポリペプチドの単回投与の食物摂取量および体重に対する効果を示す図である。図1A：食物摂取量。図1B：体重の変化（%ビヒクル補正）。記号説明：ビヒクル（四角）；2.6mg/kgでの化合物1（上向き三角）；2.7mg/kgでの化合物2（下向き三角）；2.7mg/kgでの化合物4（菱形）；10mg/kgでの化合物C2（丸）。

【0011】

【図2】図2A-2Bは、実施例4において説明する痩せたラットへの投与時における、本明細書に記載の改変ポリペプチドの単回投与の食物摂取量および体重に対する効果を示す図である。図2A：食物摂取量。図2B：体重の変化（%ビヒクル補正）。記号説明：ビヒクル（四角）；0.3mg/kgでの化合物2（上向き三角）；1.0mg/kgでの化合物2（下向き三角）；3.0mg/kgでの化合物2（菱形）。

40

【0012】

【図3】図3A-3Bは、実施例5において説明する痩せたラットへの投与時における、本明細書に記載の改変ポリペプチドの単回投与の食物摂取量および体重に対する効果を示す図である。図3A：食物摂取量。図3B：体重の変化（%ビヒクル補正）。記号説明：ビヒクル（四角）；1.1mg/kgでの化合物C2（丸）；3.3mg/kgでの化合物C2（四角）；11.1mg/kgでの化合物C2（上向き三角）。

50

【0013】

【図4】図4A-4Bは、実施例6において説明する痩せたラットへの投与時における、本明細書に記載する改変ポリペプチドおよび対照化合物の単回投与の食物摂取量および体重に対する効果を示す図である。図4A：食物摂取量。図4B：体重の変化（%ビヒクル補正）。記号説明：ビヒクル（四角）；2.2mg/kgでの化合物C6（下向き三角）。

【0014】

【図5】図5は、実施例7において説明するDIOラットへの投与時における、配列番号54の週1回投与の体重（%ベースライン）に対する効果を示す図である。記号説明：ビヒクル（四角）；注射1回につき1.3mg/kgでの化合物2（上向き三角）。

【0015】

【図6】図6A-6Bは実施例8において説明するDIOラットへの投与時における、配列番号33（図6A）および配列番号54（図6B）の血漿中レベルの検出および定量を示す図である。

【0016】

【図7】図7は、実施例9において説明する痩せたラットへの投与時における、示されている本明細書記載の改変ポリペプチドの単回投与の体重変化（%ビヒクル補正）に対する効果を示す図である。

【0017】

【図8】図8は、実施例10において説明する痩せたラットへの投与時における、示されている本明細書記載の改変ポリペプチドの単回投与の体重変化（%ビヒクル補正）に対する効果を示す図である。

【0018】

【図9】図9A-9Bは、実施例11において説明するラットへの投与時における、示されている本明細書記載の改変ポリペプチドの単回投与の食物摂取量および体重の変化（%ビヒクル補正）に対する効果を示す図である。図9A：食物摂取量。図4B：体重の変化（%ビヒクル補正）。

【0019】

【図10】図10は、実施例12において説明する痩せたラットへの投与時における、示されている本明細書記載の改変ポリペプチドの単回投与の食物摂取量および体重の変化（%ビヒクル補正）に対する効果を示す図である。

【0020】

【図11A】図11Aから11Bは、実施例13において説明する痩せたラットへの投与時における、示されている本明細書記載の改変ポリペプチドの単回投与の累積摂取量に対する効果（図11A）および体重の変化率に対する効果（図11Bおよび11C）を示す図である。

【図11B-11C】図11Aから11Bは、実施例13において説明する痩せたラットへの投与時における、示されている本明細書記載の改変ポリペプチドの単回投与の累積摂取量に対する効果（図11A）および体重の変化率に対する効果（図11Bおよび11C）を示す図である。

【0021】

【図12】図12は、実施例15において説明するアルブミンの存在下で化合物2が生じさせたレプチン機能活性を示す図である。

【0022】

【図13】図13は、実施例16による皮下注射後のラットにおける化合物2の持続型血漿中濃度対時間プロファイルを説明する図である。

【0023】

【図14】図14は、実施例16による皮下注射後のラットにおける化合物15の持続型血漿中濃度対時間プロファイルを説明する図である。

【0024】

【図15】図15は、実施例17において説明する痩せたラット（図15A）およびZDFラット（図15B）への投与時における、示されている本明細書記載の改変ポリペプチドの単回投与の体重変化（%ビヒクル補正）に対する効果を示す図である。

【0025】

【図16】図16は、実施例18において説明する痩せたラットへの投与時における、化合物2の週1回投与の体重（%ベースライン）に対する用量節約効果を示す図である。

【0026】

【図17】図17は、一方は非常に肥満したラットの群であり、もう一方は中等度肥満範囲にカロリー制限した群である二つのラット群における、レプチン（125 μ g/kg/日）およびアミリン（1500 μ g/kg/日）の単独または併用での投与の体重に対する効果を示すグラフである。

【0027】

【図18】図18Aは、化合物2（120nmol/kg）および注入ラットアミリン（50 μ g/kg/日）の単独または併用での4週間にわたる投与の体重に対する効果を示すグラフである。図18Bは、化合物2（120nmol/kg）およびPEGーラットアミリン（Des-Lys1-[Lys26（mPEG40K）]ーラットアミリン（125nmol/kg）の単独または併用での4週間にわたる投与の体重に対する効果を示すグラフである。

10

【0028】

【図19】図19は、化合物15（120nmol/kg）およびアミリン（50 μ g/kg/日）の単独または併用での4週間にわたる投与の食物摂取量（図19A）および体重（図19B）に対する効果を示す図である。

【0029】

【図20】図20は、化合物15（120nmol/kg）およびPEGーラットアミリン（Des-Lys1-[Lys26（mPEG40K）]ーラットアミリン（125nmol/kg）の単独または併用での4週間にわたる投与の体重に対する効果を示すグラフである。

20

【0030】

【図21】図21Aは、中等度肥満ラットにおけるレプチンおよびアミリンの単独または併用での4週間にわたる投与の体重に対する効果を示す図である。図21Bは、重度肥満ラットにおけるレプチンおよびアミリンの単独または併用での4週間にわたる投与の体重に対する効果の欠如を示す図である。図21Cは、重度肥満ラットにおける化合物2（120nmol/kg）およびPEGーラットアミリン（Des-Lys1-[Lys26（mPEG40K）]ーラットアミリン（125nmol/kg）の単独または併用での4週間にわたる投与の体重に対する効果を示す図である。

【0031】

30

【図22】図22は、重度肥満ラットにおける（A）化合物15（120nmol/kg）または（B）化合物2（120nmol/kg）およびアミリン（50 μ g/kg/日）の単独または併用での4週間にわたる投与の体重に対する効果を示す図である。

【0032】

【図23】図23は、実施例30において説明するSTZ誘導T1DMマウスへの投与時における、示されている本明細書記載の改変ポリペプチドの血糖に対する効果を示す図である。

【0033】

【図24】図24は、実施例30において説明するSTZ誘導T1DMマウスへの投与時における、示されている本明細書記載の改変ポリペプチドのヘモグロビンA1Cに対する効果を示す図である。

40

【0034】

【図25】図25は、実施例30において説明するSTZ誘導T1DMマウスへの投与時における、示されている本明細書記載の改変ポリペプチドの食物摂取量および体重に対する効果を示す図である。

【0035】

【図26】図26は、実施例30において説明するSTZ誘導T1DMマウスへの投与時における、低用量のインスリンを伴うおよび伴わない場合の、示されている本明細書記載の改変ポリペプチドの血糖に対する効果を示す図である。

【0036】

【図27】図27は、実施例30において説明するSTZ誘導T1DMマウスへの投与時における、

50

低用量のインスリンを伴うおよび伴わない場合の、示されている本明細書記載の改変ポリペプチドのヘモグロビンA1Cに対する効果を示す図である。

【0037】

【図28】図28は、実施例30において説明するSTZ誘導T1DMマウスへの投与時における、低用量のインスリンを伴うおよび伴わない場合の、示されている本明細書記載の改変ポリペプチドの食物摂取量（%ビヒクル補正）および体重の変化（%ビヒクル補正）に対する効果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0038】

I. 定義

【0039】

「肥満」および「過体重」は、通常予測される体重より重い体重を有する哺乳動物を指し、例えば、外見、当該技術分野において公知のボディーマス指数（BMI）、ウエスト周囲径とヒップ周囲径の比、皮下脂肪厚、ウエスト周囲径などによって判定することができる。米国疾病管理予防センター（The Centers for Disease Control and Prevention：CDC）は、過体重を25から29.9のBMIを有する成人と定義しており、肥満を30以上のBMIを有する成人と定義している。肥満判定のためのさらなる測定基準が存在する。例えば、CDCは、1.0より大きいウエスト対ヒップ比を有する人は過体重であると述べている。

【0040】

「除脂肪体重」は、脂肪なしの体質量であり、すなわち、全体重から体脂肪重量を引いたのが除脂肪体重である。除脂肪体重は、当該技術分野において公知である水中体重秤量法、コンピュータ化チャンバ、二重エネルギーX線吸収測定法、スキんキャリパー、磁気共鳴画像診断法（MRI）および生体電気インピーダンス分析（BIA）などの方法によって測定することができる。

【0041】

「哺乳動物」は、一般に毛皮または毛髪を有し、子孫を出産し、子孫に乳を与える、温血動物を指す。哺乳動物としては、ヒト；伴侶動物（例えば、イヌ、ネコ）；家畜（例えば、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ）；野生動物；およびこれらに類するものが挙げられる。一つの実施形態において、哺乳動物は雌である。一つの実施形態において、哺乳動物は、女性のヒトである。一つの実施形態において、哺乳動物は、ネコまたはイヌである。一つの実施形態において、哺乳動物は、糖尿病哺乳動物、例えば、2型糖尿病を有するヒトである。一つの実施形態において、哺乳動物は、肥満した糖尿病の哺乳動物、例えば、2型糖尿病を有する肥満した哺乳動物である。本明細書に記載する方法の文脈での用語「対象」は、哺乳動物を指す。

【0042】

ポリペプチドの文脈での「断片」は、本明細書では通例の化学的意味でポリペプチドの一部分を指す。例えば、断片は、親ポリペプチドの一つ以上の残基のN末端もしくはC末端欠失の結果として得られることがあり、および／または親ポリペプチドの一つ以上の残基の内部欠失の結果として得られることもある。抗体の文脈での「断片」は、生物活性分子に連結させて溶解度、対象内での分布およびこれらに類するものを調節することができる、抗体の一部分を指す。例えば、本明細書に記載するレプチンA200は、当該技術分野において公知の、Fc抗体断片とレプチンのコンジュゲートである。例えば、国際公開第98/28427号パンフレットおよび米国特許出願公開第2007/002084号明細書を参照のこと。ポリペプチドの文脈での用語「親」は、通例の意味で、修飾、例えば挿入、欠失および／または置換、前の基準構造としての役割を果たすポリペプチドポリペプチドを指す。本明細書に記載する改変ポリペプチドの文脈での用語「コンジュゲート」は、成分ポリペプチド、例えばABD、HD1およびこれらに類するものの間の共有結合性連結を指す。本明細書に記載する改変ポリペプチドの文脈での用語「融合」は、ペプチド主鎖の末端アミノ官能基または末端カルボキシ官能基のいずれかまたは両方を介した成分ポリペプチド、例えばABD、HD1およびこれらに類するもの、の間の共有結合性連結を指す。改変ポリペプチドは、合成に

10

20

30

40

50

より作製することもでき、または組換えにより作製することもできる。典型的に、融合は、組換えバイオテクノロジーを用いて行われるが、当該技術分野において公知の化学合成およびコンジュゲーション法によって行うこともできる。

【0043】

本明細書においてポリペプチドの文脈で用いる場合の「類似体」は、親化合物を基準にしてアミノ酸の挿入、欠失および／または置換を有する化合物を指す。類似体は、優れた安定性、溶解性、有効性、半減期およびこれらに類するものを有し得る。一部の実施形態において、類似体は、親化合物と少なくとも50%、例えば、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%またはさらにそれ以上の配列同一性を有する化合物である。

10

【0044】

二つ以上の核酸またはポリペプチド配列を比較する文脈での「同一性」、「配列同一性」などは、当該技術分野において公知の配列比較アルゴリズム、例えばBLASTまたはBLAST 2.0を使用して測定される、同じである二つ以上の配列もしくは部分配列、または同じであるアミノ酸残基もしくはヌクレオチドの特定百分率（すなわち、比較ウィンドウもしくは指定領域にわたって最大一致について比較し、整列させたとき、特定領域にわたって約50%の同一性、好ましくは、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはさらに高い同一性）を有する二つ以上の配列もしくは部分配列を指す。この定義は、欠失および／または付加を有する配列、ならびに置換を有する配列、ならびに天然に存在する、例えば多型もしくは対立遺伝子変異体、および人工変異体を含む。好ましいアルゴリズムでは、当該技術分野において公知のように、ギャップおよびこれらに類するものについて考慮される。配列比較については、典型的には、1つの配列が基準配列としての役割を果たし、それと試験配列を比較する。配列比較アルゴリズムを使用する場合、被験配列および基準配列をコンピュータに入力し、必要に応じて部分配列座標を指定し、配列アルゴリズムプログラムパラメータを指定する。好ましくは、デフォルトプログラムパラメータを使用することができ、または代替パラメータを指定することができる。その後、配列比較アルゴリズムが、プログラムパラメータに基づき、基準配列に対する被験配列についての配列同一性パーセントを計算する。例えば、SmithおよびWaterman、1981、Adv. Appl. Math. 2:482の局所相同性アルゴリズムにより、NeedlemanおよびWunsch、1970、J. Mol. Biol. 48:443の相同性アラインメントアルゴリズムにより、Pearson & Lipman、1988、Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444の類似性検索法により、これらのアルゴリズムのコンピュータでの実施（ウィスコンシン、マディソン、575サイエンス・ドライブのthe Wisconsin Genetics Software Package、Genetics Computer GroupにおけるGAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTA）により、または手動アラインメントおよび目視検査により、比較のための最適配列アラインメントを行うことができる。例えば、Current Protocols in Molecular Biology (Ausubelら編、1995 補遺)を参照のこと。配列同一性パーセントおよび配列類似性パーセントの判定に好適であるアルゴリズムの好ましい例としては、BLASTおよびBLAST 2.0アルゴリズムが挙げられ、これらは、Altschulら、1977、Nuci. Acids Res. 25:3389-3402およびAltschulら、1990、J. Mol. Biol. 215:403-410に記載されている。BLASTおよびBLAST 2.0を当該技術分野において公知のとおり使用して、本発明の核酸およびタンパク質についての配列同一性パーセントを判定する。BLAST解析を行うためのソフトウェアは、米国国立生物工学情報センター（the National Center for Biotechnology Information）のウェブサイトを通して公的に入手することができる。このアルゴリズムでは、まず、データベース配列内の同じ長さのワードと整列させたときに何らかの正の値の閾値スコアTとマッチするか該Tを満たす、クエリー配列内の長さWの短いワードを同定することによって、高スコア配列ペア（HSP）を同定する。Tは、隣接ワードスコア閾値と呼ばれる（Altschulら、同上）。これらの初期隣接ワードヒットは、それらを含むより長いHSPを見つけるための検索を開始するための種としての役割を果たす。その累積アラインメントスコアを増加させることができる限り、これらのワードヒットを各配列に沿って両方向に伸長

20

30

40

50

する。例えばヌクレオチド配列については、パラメータM（マッチ残基の対についての報酬スコア；常に>0）およびN（ミスマッチ残基についてのペナルティスコア；常に<0）を用いて、累積スコアを計算する。アミノ酸配列については、スコア行列を用いて累積スコアを計算する。各方向へのワードヒットの伸長は、累積アラインメントスコアが、その最大到達値から量Xだけ低下したとき；一つ以上の負のスコアを持つ残基のアラインメントの蓄積により、累積スコアがゼロ以下になったとき；またはいずれかの配列の末端が達したとき、停止する。BLASTアルゴリズムパラメータW、TおよびXがアラインメントの感度および速度を決める。BLASTNプログラム（ヌクレオチド配列用）は、デフォルトとしてワード長（W）11、期待値（E）10、M=5、N=-4、および両鎖の比較を用いる。アミノ酸配列用のBLASTPプログラムは、デフォルトとしてワード長3、期待値（E）10、BLOSUM62スコア

10

【0045】

数値の文脈での用語「約」は、別の明確な指示がない限り、数値の+/-10%を指す。

【0046】

本明細書に記載する改変ポリペプチドの成分の文脈での用語「ペプチド」および「ポリペプチド」は、同義である。

II. 化合物

【0047】

第一の態様では、アルブミン結合ドメイン（ABD）ポリペプチドと少なくとも一つのポリペプチドホルモンドメイン（HD1）とを含む改変ポリペプチド化合物を提供する。用語「アルブミン結合ドメイン」、「ABD」およびこれらに類するものは、本明細書に記載するようなアルブミンを結合できるポリペプチドを指す。用語「ホルモンドメイン」、「ホルモンドメインポリペプチド」およびこれらに類するものは、対象において生物学的応答を惹起できるポリペプチドを指す。例示的ホルモンドメインとしては、レプチン、レプチンの類似体またはそれらの活性断片が挙げられるがそれらに限定されず、PEG化誘導体などのレプチン誘導体であってもよい。

20

【0048】

驚くべきことに、レプチン、レプチン類似体、活性レプチン断片またはそれらのレプチン誘導体は、十分なレプチン生物活性を保持し、延長された作用持続時間、例えば、齧歯動物において少なくとも3日、さらには5日の作用持続時間（ヒト対象では少なくとも1週間以上の持続時間になる）を有しながらも、本明細書に記載するような細菌タンパク質のアルブミン結合ドメインに由来する超高親和性アルブミン結合ドメイン（ABD）に融合され得ることを発見した。これは、一つには、かかるABDペプチドが治療用タンパク質担体として頑丈なプラットフォームであることが詳細には実証されておらず、かかるペプチドが、比較的疎水性であって、結合された治療用ペプチドと有害な形で相互作用する可能性があり、ペプチドホルモンの少なくとも一つのファミリーのための担体としての役割を果たすことができないことから、驚くべきことであった。例えば、ラットアミリン化合物（例えば配列番号108）は、本明細書に記載するABDとコンジュゲートまたは融合させたとき、本発明の様々なレプチン改変ポリペプチド構築物が、活性であり、長い作用持続時間を有すると判明した同じ齧歯動物モデルにおいて、顕著なまたは長期作用性のインビボ活性を一切示さなかった。

30

40

【0049】

生物活性成分。本明細書に記載する化合物および方法での使用が考えられる生物活性化合物成分としては、レプチンが挙げられる。用語「生物活性化合物」およびこれらに類するものは、通例の意味で、生物学的応答を惹起することができる化合物、例えばポリペプチドおよびこれらに類するものを指す。

【0050】

レプチン類。「レプチン（複数）」および「レプチン（単数）」は、レプチン（複数）、レプチン活性断片（複数）、レプチン類似体（複数）、およびレプチン誘導体（複数）

50

；ならびにレプチン（単数）、レプチン活性断片（単数）、レプチン類似体（単数）、およびレプチン誘導体（単数）をそれぞれ指す。したがって、別に特記しない限り、「レプチン（複数）」と言え、本明細書に開示するとおりのレプチン（複数）、レプチン活性断片（複数）、レプチン類似体（複数）およびレプチン誘導体（複数）を意味するものとする。同様に別に特記しない限り、「レプチン（単数）」と言え、本明細書に開示するとおりのレプチン（単数）、レプチン活性断片（単数）、レプチン類似体（単数）およびレプチン誘導体（単数）を包含するものとする。本明細書に開示する改変ポリペプチドの設計、調製および使用に用いることができる例示的なかかるレプチンとしては、レプチンを対象に投与したときに惹起されることが当該技術分野において公知の一つ以上の生物学的応答（例えば、米国特許出願公開第2007/0020284号および同第2008/0207512号明細書、
10
米国特許第6,309,853号および同第7,183,254号明細書、ならびにPCT公開出願番号国際公開第96/005309号、同第98/28427号および同第2009/064298号パンフレット参照）、例えば、食物摂取量の低減、体重の低減、体重増加の低減、満腹の誘導、カロリー利用能の低減、カロリー効率の低減、代謝プラトーの低減、インスリン感受性の増加、高脂血症の軽減、脂質代謝異常の補正、高トリグリセリド血症の軽減、肥満の改善、過体重の改善、真性糖尿病（I型糖尿病、II型糖尿病、および妊娠糖尿病を含む）の改善、インスリン抵抗性の改善、それに関連したリポジストロフィー容態の改善、ならびにレプチン投与に惹起されることが当該技術分野において公知の他の生物学的応答（例えば、米国特許出願公開第2007/0020284号および同第2008/0207512号明細書、
20
米国特許第6,309,853号および同第7,183,254号明細書、ならびにPCT公開出願番号国際公開第96/005309号、同第98/28427号および同第2009/064298号パンフレット参照）を惹起するものが挙げられる。

【0051】

本明細書に記載する改変ポリペプチドの設計、調製および使用に好適な例示的レプチンとしては、米国特許第5,594,101号、同第5,851,995号、同第5,691,309号、同第5,580,954号、同第5,554,727号、同第5,552,523号、同第5,559,208号、同第5,756,461号および同第6,309,853号明細書、米国特許出願公開第2007/0020284号明細書、ならびにPCT公開出願番号国際公開第96/23517号、同第96/005309号、同第98/28427号、同第2004/039832号、同第98/55139号、同第98/12224号および同第97/02004号パンフレットに記載されている化合物が挙げられるが、これらに限定されない（前記各参考文献は、そちら全体があらゆる目的のために本明細書に援用されている）。満腹、食物摂取抑制活性および体重減少活性をは
30
じめとする、インビトロおよびインビボでのレプチン活性および生物学的応答についてのアッセイ方法は、当分野において公知であり、本明細書に記載されており、ならびに上記参考文献および本明細書に引用する他の参考文献にも記載されている。

【0052】

本明細書を通して開示する改変ポリペプチドを調製し、使用するために、当該技術分野において公知の任意のレプチン、レプチン類似体、レプチン活性断片またはレプチン誘導体を利用することができる。本明細書に記載する改変ポリペプチドおよび方法での使用が考えられる代表的なレプチン、レプチン類似体、レプチン活性断片およびレプチン誘導体には、下記のものも含まれる：

【0053】

成熟ネズミレプチン：

VPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHT-Xaa-SVSSKQKVLTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQI
SNDLENLRDLLHVLAFSKSKSLPQASGLTLESGLGVLEASGYSTEVVALSRLQGSQDMLQQDLSPGC（この式中
の位置28のXaaは、Qであるかまたは存在しない）（配列番号1）。

【0054】

成熟ネズミレプチン形態1：

VPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSAKQRTGLDFIPGLHPILSLKMDQTLAVYQQVLTSLPSQNVLIANDL
ENLRDLLHLLAFSKSKSLPQTSGLQKPESLDGVLEASLYSTEVVALSRLQGSQDILQQLDVSP（配列番号143）。

【0055】

成熟ネズミレプチン形態2：

VP IQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTSVSAKQRTGLDFIPGLHPILSLSKMDQTLAVYQQVLTSLPSQNVLQIANDLE
NLRDLLHLLAFSKSCSLPQTSGLQKPESLDGVLEASLYSTEVALSRLQGSQDILQQLDVSPEC (配列番号144)

。

【0056】

N末端メチオニンを有する成熟ネズミレプチン：

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHT-Xaa-SVSSKQKV TGLDFIPGLHPILTSLSKMDQTLAVYQQILTSMPSRNV IQ
ISNDLENLRDLLHVLAFSKSCHLPQASGLETLES LGGVLEASGYSTEVALSRLQGSQDMLQQDLSPGC (この式
中の位置29のXaaは、Qであるかまたは存在しない) (配列番号2)。

【0057】

N末端メチオニンを有する成熟ネズミレプチン形態1：

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSAKQRTGLDFIPGLHPILSLSKMDQTLAVYQQVLTSLPSQNVLQIAND
LENLRDLLHLLAFSKSCSLPQTSGLQKPESLDGVLEASLYSTEVALSRLQGSQDILQQLDVSPEC (配列番号145
)。

【0058】

N末端メチオニンを有する成熟ネズミレプチン形態2：

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTSVSAKQRTGLDFIPGLHPILSLSKMDQTLAVYQQVLTSLPSQNVLQIANDL
ENLRDLLHLLAFSKSCSLPQTSGLQKPESLDGVLEASLYSTEVALSRLQGSQDILQQLDVSPEC (配列番号146
)。

【0059】

成熟ブタレプチン：

VPIWRVQDDTKTLIKTIVTRISDISHMQSVSSKQRTGLDFIPGLHPVLSLSKMDQTLAIYQQILTSLPSRNV IQISNDL
ENLRDLLHLLASSKSCPLPQARALETLES LGGVLEASLYSTEVALSRLQGALQDMLRQLDLSPGC (配列番号3)

。

【0060】

N末端メチオニンを有する成熟ブタレプチン：

MVPIWRVQDDTKTLIKTIVTRISDISHMQSVSSKQRTGLDFIPGLHPVLSLSKMDQTLAIYQQILTSLPSRNV IQISNDL
LENLRDLLHLLASSKSCPLPQARALETLES LGGVLEASLYSTEVALSRLQGALQDMLRQLDLSPGC (配列番号4)

。

【0061】

成熟ウシレプチン：

VPICKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHT-Xaa-SVSSKQRTGLDFIPGLHPLL SLSKMDQTLAIYQQILTSLPSRNVVQ I
SNDLENLRDLLHLLAASKSCPLPQVRALESLES LGGVLEASLYSTEVALSRLQGSQDMLRQLDLSPGC (この式
中の位置28のXaaは、Qであるかまたは存在しない) (配列番号5)。

【0062】

N末端メチオニンを有する成熟ウシレプチン：

MVPICKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHT-Xaa-SVSSKQRTGLDFIPGLHPLL SLSKMDQTLAIYQQILTSLPSRNVVQ
ISNDLENLRDLLHLLAASKSCPLPQVRALESLES LGGVLEASLYSTEVALSRLQGSQDMLRQLDLSPGC (この式
中の位置29のXaaは、Qであるかまたは存在しない) (配列番号6)。

【0063】

プロセッシングされていない完全長ヒトレプチン (すなわち、21酸基N末端シグナル配
列を含む)：

MHWGTL CGFLWLWPYLFYVQAVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKV TGLDFIPGLHPILTSLSKMDQTLA
VYQQILTSMPSRNV IQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCHLPWASGLETDSLGGVLEASGY STEVALSRLQGSQDMLW
QLDLSPGC (配列番号7)

【0064】

成熟ヒトレプチン (N末端21アミノ酸シグナル配列が除去されている)：

VP IQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISH-Xaa-Xaa-SVSSKQKV TGLDFIPGLHPILTSLSKMDQTLAVYQQILTSMPSRNV
IQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCHLPWASGLETDSLGGVLEASGYSTEVALSRLQGSQDMLWQLDLSPGC (この
式中の位置27のXaaは、TまたはAであり；および位置28のXaaは、Qであるかまたは存在し

10

20

30

40

50

ない) (配列番号8)。

【0065】

N末端メチオニンを有する成熟ヒトレプチン：

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISH-Xaa-Xaa-SVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMP SRN
VIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCHLPWASGLETLDSLGGVLEASGYSTEVALSRLQGSLQDMLWQLDLSPGC (この
式中の位置28のXaaは、TまたはAであり；および位置29のXaaは、Qであるかまたは存在し
ない) (配列番号9)。

【0066】

成熟アカゲザルレプチン：

VPIQKVQSDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPVLTLSQMDQTLAIYQQILINLPSRNVIQISNDL 10
ENLRDLLHLLAFSKSCHLPLASGLETTLES LGDVLEASLYSTEVALSRLQGSLQDMLWQLDLSPGC (配列番号10)

【0067】

N末端メチオニンを有する成熟アカゲザルレプチン：

MVPIQKVQSDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPVLTLSQMDQTLAIYQQILINLPSRNVIQISND
LENLRDLLHLLAFSKSCHLPLASGLETTLES LGDVLEASLYSTEVALSRLQGSLQDMLWQLDLSPGC (配列番号11
)。

【0068】

成熟ラットレプチン：

VPIHKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSARQKVTGLDFIPGLHPILSLKMDQTLAVYQQILTSLP SQNVLQIAHDL 20
ENLRDLLHLLAFSKSCSLPQTRGLQKPESLDGVLEASLYSTEVALSRLQGSLQDILQQLDLSPEC (配列番号12)

【0069】

N末端メチオニンを有する成熟ラットレプチン：

MVPIHKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSARQKVTGLDFIPGLHPILSLKMDQTLAVYQQILTSLP SQNVLQIAHD
LENLRDLLHLLAFSKSCSLPQTRGLQKPESLDGVLEASLYSTEVALSRLQGSLQDILQQLDLSPEC (配列番号13
)。

【0070】

成熟カモノハシレプチン：成熟カモノハシレプチン配列は以下である：

ISIEKIQADTKTLTKTIITRIIQLSTQNGVSTDQRVSGLDIPGNQQFQNLADMDQTLAVYQQILSSLPMPDRTQISNDL 30
ENLRSLFALLATLKNCPFTRSDGLDTMEIWGGIVEESLYSTEVVTLDR LRKSLKNIEKQLDHIQG (配列番号14)

【0071】

プロセッシングされていない完全長カモノハシレプチン (すなわち、21酸基N末端シグ
ナル配列を含む)：21残基N末端シグナル配列を含む、カモノハシレプチンの完全長配列
は以下である：

MRCILLYGFLCVWQHLYYSHPISEKIQADTKTLTKTIITRIIQLSTQNGVSTDQRVSGLDIPGNQQFQNLADMDQTLA
VYQQILSSLPMPDRTQISNDLENLRSLFALLATLKNCPFTRSDGLDTMEIWGGIVEESLYSTEVVTLDR LRKSLKNIEKQ
LDHIQG (配列番号15)。

【0072】

成熟ヒトレプチン形態1：

VPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMP SRNVIQISNDL 40
ENLRDLLHVLAFSKSCHLPWASGLETLDSLGGVLEASGYSTEVALSRLQGSLQDMLWQLDLSPGC (配列番号16)

【0073】

成熟ヒトレプチン形態2：

VPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHAQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMP SRNVIQISNDL
ENLRDLLHVLAFSKSCHLPWASGLETLDSLGGVLEASGYSTEVALSRLQGSLQDMLWQLDLSPGC (配列番号17)

【0074】

成熟ヒトレプチン形態3：

VPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISNDLE
NLRDLLHVLAFAFSK SCHLPWASGLETLDLGGVLEASGYSTEVALSRLQGSQDMLWQLDLSPGC（配列番号18）

。

【0075】

成熟ヒトレプチン形態4：

VPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHASVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISNDLE
NLRDLLHVLAFAFSK SCHLPWASGLETLDLGGVLEASGYSTEVALSRLQGSQDMLWQLDLSPGC（配列番号19）

。

【0076】

N末端メチオニンを有する成熟ヒトレプチン形態1（メトレレプチンまたはA100としても公知）：

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISNDLE
NLRDLLHVLAFAFSK SCHLPWASGLETLDLGGVLEASGYSTEVALSRLQGSQDMLWQLDLSPGC（配列番号20）

）。

【0077】

N末端メチオニンを有する成熟ヒトレプチン形態2：

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHAQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISNDLE
NLRDLLHVLAFAFSK SCHLPWASGLETLDLGGVLEASGYSTEVALSRLQGSQDMLWQLDLSPGC（配列番号21）

）。

【0078】

N末端メチオニンを有する成熟ヒトレプチン形態3：

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISNDLE
ENLRDLLHVLAFAFSK SCHLPWASGLETLDLGGVLEASGYSTEVALSRLQGSQDMLWQLDLSPGC（配列番号22）

。

【0079】

N末端メチオニンを有する成熟ヒトレプチン形態4：

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHASVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISNDLE
ENLRDLLHVLAFAFSK SCHLPWASGLETLDLGGVLEASGYSTEVALSRLQGSQDMLWQLDLSPGC（配列番号23）

。

【0080】

アザラシレプチン：

PIQRVQDDTKTLIKTIITRINDISPPQGVCSRPRVAGLDFIPRVQSVRTLSGMDQILATYQQILTSLSRSVVQIANDLA
NLRALLRLLASAKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRASVHSTEVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC（配列番号24）

。

【0081】

アミノ酸71-92がメトレレプチンのアミノ酸73-94（ヘリックス3）でそれぞれ置換されているアザラシレプチン：

PIQRVQDDTKTLIKTIITRINDISPPQGVCSRPRVAGLDFIPRVQSVRTLSGMDQILATYQQILTSLSRNVIQISNDLE
NLRDLLHVLAFAFSKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRASVHSTEVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC（配列番号25）

。

【0082】

アミノ酸30および71-92がメトレレプチンのアミノ酸32および73-94（ヘリックス3）でそれぞれ置換されているアザラシレプチン：

PIQRVQDDTKTLIKTIITRINDISPPQGVSSRPRVAGLDFIPRVQSVRTLSGMDQILATYQQILTSLSRNVIQISNDLE
NLRDLLHVLAFAFSKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRASVHSTEVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC（配列番号26）

。

【0083】

N末端メチオニンを有するアザラシレプチン：

MPIQRVQDDTKTLIKTIITRINDISPPQGVCSRPRVAGLDFIPRVQSVRTLSGMDQILATYQQILTSLSRSVVQIANDL

10

20

30

40

50

ANLRALLRLLASAKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRASVHSTEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (配列番号27)

。

【0084】

N末端メチオニンを有し、およびアミノ酸71-92がメトレプレチンのアミノ酸73-94 (ヘリックス3) でそれぞれ置換されている、アザラシレプチン:

MPPIQRVQDDTKTLIKTIITRINDISPPQGVCSRPRVAGLDFIPRVQSVRTLSGMDQILATYQQILTSLSQSRNVIQISNDL
ENLRDLLHVLAFAFSKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRASVHSTEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (配列番号28)

。

【0085】

N末端メチオニンを有し、およびアミノ酸30および71-92がメトレプレチンのアミノ酸32および73-94 (ヘリックス3) でそれぞれ置換されている、アザラシレプチン:

MPPIQRVQDDTKTLIKTIITRINDISPPQGVSSRPRVAGLDFIPRVQSVRTLSGMDQILATYQQILTSLSQSRNVIQISNDL
ENLRDLLHVLAFAFSKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRASVHSTEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (配列番号29)

。

【0086】

レプチンA200: レプチンA200は、当該技術分野において公知のとおり、レプチンとFc抗体断片の縮合生成物である。例えば、Loら、2005、Protein Eng. Design & Selection、18: 1-10参照。A200のアミノ酸配列は、次のとおりである:

MDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGKVPPIQKVQDDTKT
LIKTIIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTL SKMDQTLAVYQQILTSMP SRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFA
SKSCHLPWASGLETLDLGGVLEASGYSTEVALSRLQGS LQDMLWQLDLSPGC (配列番号30)

【0087】

レプチンA300: レプチンA300は、置換W101QおよびW139Q (N末端¹Metを残基1としてカウント) を有するメトレプレチンである:

MVPIQKVQDDTKTLIKTIIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTL SKMDQTLAVYQQILTSMP SRNVIQISND
LENLRDLLHVLAFAFSK SCHLPQASGLETLDLGGVLEASGYSTEVALSRLQGS LQDMLQQLDLSPGC (配列番号31)

。

【0088】

レプチンA400: レプチンA400は、次に示すような、位置78のセリン残基がシステイン残基で置換されているメトレプレチンである:

MVPIQKVQDDTKTLIKTIIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTL SKMDQTLAVYQQILTSMP SRNVIQICND
LENLRDLLHVLAFAFSK SCHLPWASGLETLDLGGVLEASGYSTEVALSRLQGS LQDMLWQLDLSPGC (配列番号32)

; これに20キロダルトン (kDa) PEG部分が位置78のシステイン残基を介して結合している。

【0089】

レプチンA500: 本発明者らを含む多数の研究者による研究は、レプチンにおける残基置換の凝集に対する効果に主眼を置いてきた。例えば、Ricciら、2006、「Mutational approach to improve physical stability of protein therapeutics susceptible to aggregation: Role of altered conformation in irreversible precipitation」、Book Chapter. In: MISBEHAVING PROTEINS: PROTEIN (MIS) FOLDING, AGGREGATION, AND STABILITY、Murphy RM、Tsai AM編、New York. Springer. pp. 331-350参照 (これは、出典明示によりあらゆる目的のために本明細書に援用されている)。したがって、以下の配列を有するレプチンA500を、本明細書に記載する一定の化合物および方法に使用した:

MVPIQKVQDDTKTLIKTIIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLEFIPGLHPILTL SKMDQTLAVYQQILTSMP SRNVIQISND
LENLRDLLHVLAFAFSK SCHLPQASGLETLES LGGVLEASGYSTEVALSRLQGS LQDMLQQLDLSPGC (配列番号33)

。

【0090】

レプチンA100変異体: 下記の残基置換を有するレプチンA100の変異体を、以下に述べる

- :
- D41E、H98S、W101Q、D109E、G113E、M137I、W139QおよびG146E
MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISND
LENLRDLLHVLAFAFSKSCSLPQASGLETLDSLGEVLEASGYSTEVALSRLQGSQDILQQDLDSPEC（配列番号664）。
- H98S、W101Q、A102T、G113E、M137I、W139Q、およびG146E：
MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISND
LENLRDLLHVLAFAFSKSCSLPQASGLETLDSLGGVLEASGYSTEVALSRLQGSQDILQQDLDSPEC（配列番号665）。
- H98S、W101Q、G113E、M137I、W139Q、およびG146E：10
MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISND
LENLRDLLHVLAFAFSKSCSLPQASGLETLDSLGEVLEASGYSTEVALSRLQGSQDILQQDLDSPEC（配列番号666）。
- W101Q、G113E、M137I、W139Q、およびG146E：
MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISND
LENLRDLLHVLAFAFSKSCSLPQASGLETLDSLGEVLEASGYSTEVALSRLQGSQDILQQDLDSPEC（配列番号667）。
- H98S、W101Q、M137I、W139Q、およびG146E：20
MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISND
LENLRDLLHVLAFAFSKSCSLPQASGLETLDSLGGVLEASGYSTEVALSRLQGSQDILQQDLDSPEC（配列番号668）。
- W101Q、G113E、M137I、W139Q、L143V、およびG146E：
MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISND
LENLRDLLHVLAFAFSKSCSLPQASGLETLDSLGEVLEASGYSTEVALSRLQGSQDILQQDLVSPEC（配列番号669）。
- H98S、W101Q、A102T、M137I、W139Q、およびG146E：
MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISND
LENLRDLLHVLAFAFSKSCSLPQTSGLETLDSLGGVLEASGYSTEVALSRLQGSQDILQQDLDSPEC（配列番号670）。
- H98S、W101Q、D109E、G113E、およびG146E：30
MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISND
LENLRDLLHVLAFAFSKSCSLPQASGLETLDSLGEVLEASGYSTEVALSRLQGSQDMLWQLDLDSPEC（配列番号671）。
- W101Q、M137I、W139Q、およびG146E：
MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISND
LENLRDLLHVLAFAFSKSCSLPQASGLETLDSLGGVLEASGYSTEVALSRLQGSQDILQQDLDSPEC（配列番号672）。
- W101Q、M137I、W139Q、L143V、およびG146E：40
MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISND
LENLRDLLHVLAFAFSKSCSLPQASGLETLDSLGGVLEASGYSTEVALSRLQGSQDILQQDLVSPEC（配列番号673）。
- H98S、W101Q、A102T、M137I、W139Q、L143V、およびG146E：
MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISND
LENLRDLLHVLAFAFSKSCSLPQTSGLETLDSLGGVLEASGYSTEVALSRLQGSQDILQQDLVSPEC（配列番号674）。
- H98S、W101Q、A102T、G113E、およびG146E：
MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISND
LENLRDLLHVLAFAFSKSCSLPQTSGLETLDSLGEVLEASGYSTEVALSRLQGSQDMLWQLDLDSPEC（配列番号675）。
- W101Q、G113E、およびW139Q：50

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISND
LENLRDLLHVLAFSKSKCHLPQASGLETLDSLGEVLEASGYSTEVALSRLQGSQDMLQQLDLSPGC（配列番号676）。

W101Q、G113E、W139Q、およびG146E：

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISND
LENLRDLLHVLAFSKSKCHLPQASGLETLDSLGEVLEASGYSTEVALSRLQGSQDMLQQLDLSPEC（配列番号677）。

【0091】

上記レプチン、レプチン類似体またはそれらの活性断片、ならびに下記のレプチンの中には、ABDへのリンカーと共にまたはなしで、本改変ポリペプチドでの使用に好適なものもある。

10

【0092】

アルブミン結合ドメイン（ABD）ペプチド。本発明で使用するためのアルブミン結合ドメイン（ABD）ペプチドは、アルブミンに対する同等に高い親和性を有するものであり、連鎖球菌（Streptococcus）株G148の細菌プロテインGのアルブミン結合ドメインに由来する。然るが故に、本明細書に記載する改変ポリペプチドについて考えられるABDペプチドとしては、Jonssonら（Protein Eng. Design & Selection、2008、21：515-527）によって記載されているようなアルブミン結合モチーフを有するものはもちろん、そこに記載されているABDペプチド、ならびにPCT公開出願番号国際公開第2009/016043号パンフレットにさらに記載されているモチーフおよびABDペプチドはもちろん、それらの類似体、特に、少なくとも85%のアミノ酸同一性を有するものも挙げられる。一つの実施形態において、ABDペプチドは、次のアミノ酸配列から成るアルブミン結合モチーフ（「ABM」）を含むことができる：

20

GVSD X_5 YK X_8 X_9 I X_{11} X_{12} A X_{14} TVEGV X_{20} AL X_{23} X_{24} X_{25} I（配列番号34）

（式中、互いに独立して、

X_5 は、YおよびFから選択され；

X_8 は、N、RおよびSから選択され；

X_9 は、V、I、L、M、FおよびYから選択され；

X_{11} は、N、S、EおよびDから選択され；

X_{12} は、R、KおよびNから選択され；

30

X_{14} は、KおよびRから選択され；

X_{20} は、D、N、Q、E、H、S、RおよびKから選択され；

X_{23} は、K、IおよびTから選択され；

X_{24} は、A、S、T、G、H、LおよびDから選択され；ならびに

X_{25} は、H、EおよびDから選択される）。

【0093】

ある実施形態において、 X_5 は、Yである。ある実施形態において、 X_8 は、Nである。ある実施形態において、 X_{23} は、Tである。ある実施形態において、 X_{23} は、Iである。ある実施形態において、 X_{24} は、Sである。ある実施形態において、 X_{24} は、Lである。ある実施形態において、 X_{25} は、Eである。ある実施形態において、 X_{25} は、Hである。ある実施形態において、互いに独立して、 X_5 は、Yであり、および／または X_8 は、Nであり、および／または X_{23} は、TもしくはIであり、および／または X_{24} は、SもしくはLであり、および／または X_{25} は、Eである。ある実施形態において、アルブミン結合モチーフ（「ABM」）は、GVSDYKYNLINKAKTVEGVREALTLHI（配列番号114）である。ある実施形態において、アルブミン結合モチーフ（「ABM」）は、GVSDYYKNLINKAKTVEGVREALISEI（配列番号115）である。

40

【0094】

好ましくは、ABDペプチドは、最大で 1×10^{-6} M、およびさらに好ましくは最大で 1×10^{-9} M（よりいっそう強い親和性）である相互作用のK値で、アルブミンに結合する。さらに好ましくは、最大で 1×10^{-10} Mである、さらに好ましくは最大で 1×10^{-11} Mである、さらにいっそう好ましくは最大で 1×10^{-12} Mである、およびまたさらには最大で $1 \times 10^{-$

50

10^{-13} Mである相互作用のK値である。例えば、 1×10^{-14} Mの K_D 値は、最大で 1×10^{-13} Mである相互作用のK値である。PCT公開出願番号国際公開第2009/016043号パンフレットに記載されているように、K値、好ましくは、ヒト血清アルブミンに対するK値を決定することができる。一つの実施形態において、上の種類は、アミノ酸配列がGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEI（配列番号35）でないという条件で考えられる。

【0095】

本明細書および引用参考文献中で実証されているように、ABDペプチドのアルブミン結合能は、アミノ酸変化にかかわらず、かかる変化が該ABDペプチドの十分な第三級構造を保持する限り、保持され得る。かかる変化は、例えば、アミノ酸残基の一定の機能性分類（例えば、疎水性、親水性、極性など）に属するアミノ酸残基が同じ機能性グループからの別のアミノ酸残基に交換される置換を含む。したがって、ABDペプチドの一つのかかる実施形態において、モチーフ X_5 は、Yである。ABDの一つの実施形態において、 X_8 は、NおよびRから選択され、特にRであり得る。一つの実施形態において、 X_9 は、Lである。一つの実施形態において、 X_{11} は、NおよびSから選択され、特にNであり得る。一つの実施形態において、 X_{12} は、RおよびKから選択され、例えば、 X_{12} はRであり、または X_{12} はKである。一つの実施形態において、 X_{14} は、Kである。一つの実施形態において、 X_{20} は、D、N、Q、E、H、SおよびRから選択され、および特に、Eであり得る。一つの実施形態において、 X_{23} は、KおよびIから選択され、特にKであり得る。一つの実施形態において、 X_{24} は、A、S、T、G、HおよびLから選択される。より具体的な実施形態において、 X_{24} はLである。よりいっそう具体的な実施形態において、「 $X_{23} X_{24}$ 」は、KLである。もう一つのよりいっそう具体的な実施形態において、「 $X_{23} X_{24}$ 」は、TLである。一つの実施形態において、 X_{24} は、A、S、T、GおよびHから選択される。より具体的な実施形態において、 X_{24} は、A、S、T、GおよびHから選択され、ならびに X_{23} は、Iである。一つの実施形態において、 X_{25} は、Hである。

【0096】

上の式中の個々のアルブミン結合モチーフの配列は、出典明示により本明細書に援用されているPCT公開出願番号国際公開第2009/016043号パンフレットに配列番号1-257として提示されているものを含む。アルブミン結合ポリペプチドのある実施形態において、アルブミン結合モチーフは、配列番号1-257から選択されたアミノ酸配列から成る。本発明のこの態様のより具体的な実施形態において、前記モチーフ配列は、PCT公開出願番号国際公開第2009/016043号パンフレットの配列番号2、配列番号3、配列番号9、配列番号15、配列番号25、配列番号27、配列番号46、配列番号49、配列番号53、配列番号54、配列番号55、配列番号155、配列番号239、配列番号240、配列番号241、配列番号242、配列番号243、配列番号244および配列番号245から選択される。本発明のこの態様のより具体的な実施形態において、前記モチーフ配列は、PCT公開出願番号国際公開第2009/016043号パンフレットの配列番号3、配列番号53および配列番号239から選択される。アルブミン結合モチーフを含有する、したがって本明細書に記載のホルモンドメインとのコンジュゲーションまたは融合に好適である、アルブミン結合ポリペプチドを本明細書中および下記でさらに説明し、ならびに表1および実施例において例示する。理論に拘束されないが、前記アルブミン結合モチーフは、3ヘリックスバンドルタンパク質ドメインの一部を形成し得ると考えられる。例えば、前記モチーフは、前記3ヘリックスバンドルタンパク質ドメイン内の、相互接続ループを伴う二つの α ヘリックスの部分を実質的に構成または形成し得る。したがって、本発明の特定の実施形態において、かかる3ヘリックスバンドルタンパク質ドメインは、連鎖球菌株G148からの細菌受容体プロテインGの3ヘリックスドメインから成る群より選択される。この実施形態の種々の変形では、前記モチーフが一部を形成する3ヘリックスバンドルタンパク質ドメインは、連鎖球菌株G148からのプロテインGのドメインGA1、ドメインGA2およびドメインGA3から成る群より選択され、特にドメインGA3である。

【0097】

本発明の実施形態において、前記モチーフが「3ヘリックスバンドルタンパク質ドメインの一部を形成する」場合、これは、そのアルブミン結合モチーフの配列が、天然に存在

する（または別様に原型の）3ヘリックスバンドルドメインの配列に、そのモチーフがその原型ドメイン内の類似構造モチーフを置換するように、「挿入されている」または「グラフトされている」または「融合されている」ことを意味すると解釈される。例えば、また理論により拘束されることを望まないが、前記モチーフは、3ヘリックスバンドルの3つのヘリックスのうちの2つを構成すると考えられ、任意の3ヘリックスバンドル内のかかる2ヘリックスモチーフを置換することができる。本明細書に開示する2モチーフヘリックスによる3ヘリックスバンドルドメインの2つのヘリックスの置換は、そのポリペプチドの基本構造に影響を及ぼさないように行われる。すなわち、本発明のこの実施形態によるポリペプチドの主鎖の全フォールディングは、それが一部分を形成する3ヘリックスバンドルタンパク質ドメインのものと、例えば二次構造の同じ要素を同じ順序で有するなど、実質的に同じとなる。したがって、ここでの改変ポリペプチドに有用なモチーフは、この実施形態によるポリペプチドが原型ドメインと同じフォールディングを有するならば、3ヘリックスバンドルドメインの一部を形成することができ、これは、基本構造特性、例えば同様のCDスペクトルを生じさせる特性、を共有することを含意する。

【0098】

したがって、一つの実施形態において、前記アルブミン結合ドメインポリペプチドは、上で定義したとおりのアルブミン結合モチーフと、3ヘリックス立体配置の残部を構成する追加の配列とを含む3ヘリックスバンドルタンパク質ドメインである。かかるアルブミン結合ドメインポリペプチドをレプチン、レプチン類似体、レプチン活性断片、またはこれらのレプチン誘導体に融合させて、本明細書に記載の改変ポリペプチドを作ることができる。レプチン、レプチン類似体、レプチン活性断片、またはこれらのレプチン誘導体へのコンジュゲーションまたは融合に好適なアルブミン結合ドメインポリペプチドは、次のアミノ酸配列を含み得る：

LAEAK X_a X_b A X_c X_d EL X_e KY -[ABM]- LAALP（配列番号36）

（式中、

[ABM] は、上で定義したとおりのアルブミン結合モチーフであり、ならびに

互いに独立して、

X_aは、VおよびEから選択され；

X_bは、L、EおよびDから選択され；

X_cは、N、LおよびIから選択され；

X_dは、RおよびKから選択され；および

X_eは、DおよびKから選択される）。

【0099】

ある実施形態において、X_aは、Eである。ある実施形態において、X_bは、Dである。ある実施形態において、X_cは、Iである。ある実施形態において、X_dは、Kである。ある実施形態において、X_aは、独立してEであり、および／または独立してX_bは、Dであり、および／または独立してX_cは、Iであり、および／または独立してX_dは、Kである。ある実施形態において、位置45のロイシンは、存在するか、または存在しない。ある実施形態において、位置46のプロリンは存在しない。ある実施形態において、前記アルブミン結合ドメインポリペプチドは、LAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALTLHILAALP（配列番号50）である。ある実施形態において、前記アルブミン結合ドメインポリペプチドは、LAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALISEILAALP（配列番号51）である。

【0100】

さらなる実施形態において、前記ABDは、一つ以上のN末端ヘリックスキャッピングアミノ酸を含み、さらなる実施形態において、前記ヘリックスキャッピングアミノ酸は、セリンであり得、またはグリシンーセリンであり得る。したがって、図面および配列表中のものを含めて、本明細書において開示する各アルブミン結合ドメイン配列に関して、アルブミン結合ドメイン、それらのSer-ABD、Gly-Ser-ABD、Gly-ABD、Ala-ABDおよびそれらの脱C末端プロリン配列が改変ポリペプチド内にあることも本明細書に開示のすべての態様について特に考えられる。

【0101】

アルブミン結合モチーフの存在のため、ABDペプチドは、最大で 1×10^{-6} M、およびさらに好ましくは最大で 1×10^{-9} M（より強い親和性）である相互作用のK値で、アルブミンに結合する。さらに好ましくは、最大で 1×10^{-10} Mである、さらに好ましくは最大で 1×10^{-11} Mである、さらにいっそう好ましくは最大で 1×10^{-12} Mである、およびまたさらには最大で 1×10^{-13} Mである相互作用のK値である。

【0102】

このアルブミン結合ポリペプチドの一つの実施形態において、 X_a はVである。このポリペプチドの一つの実施形態において、 X_b はLである。このポリペプチドの一つの実施形態において、 X_c はNである。このポリペプチドの一つの実施形態において、 X_d はRである。このポリペプチドの一つの実施形態において、 X_e はDである。

【0103】

本明細書記載の活性ホルモンドメインペプチドとの融合に好適な個々のアルブミン結合ドメインポリペプチドの配列は、Jonssonら（同上）に、および配列番号258-514としてPCT公開出願番号国際公開第2009/016043号パンフレットに提示されており、これらの参考文献は出典明示により本明細書に援用されている。選択された化合物を下の表1に開示する。配列番号258-514から選択された配列と85%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有するアルブミン結合ポリペプチドも本発明に包含される。特定の実施形態において、前記アルブミン結合ポリペプチドの配列は、PCT公開出願番号国際公開第2009/016043号パンフレットにおける配列番号259、配列番号260、配列番号266、配列番号272、配列番号282、配列番号284、配列番号303、配列番号306、配列番号310、配列番号311、配列番号312、配列番号412、配列番号496、配列番号497、配列番号498、配列番号499、配列番号500、配列番号501および配列番号502、およびこれらと85%以上の同一性を有する配列から選択される。なおさらなる実施形態において、前記アルブミン結合ポリペプチドの配列は、PCT公開出願番号国際公開第2009/016043号パンフレットにおける配列番号260、配列番号270、配列番号272、配列番号291、配列番号294、配列番号298、配列番号299、配列番号300、配列番号400、配列番号484、配列番号485、配列番号486、配列番号487、配列番号488、配列番号489および配列番号490、ならびにこれらと85%以上の同一性を有する配列から選択される。なおさらなる実施形態において、前記アルブミン結合ポリペプチドの配列は、PCT公開出願番号国際公開第2009/016043号パンフレットにおける配列番号260、配列番号310、配列番号496および配列番号511、ならびにこれらと85%以上の同一性を有する配列から選択される。

【0104】

一つの実施形態において、前記アルブミン結合ポリペプチドは、配列番号36で定義される配列のNおよび／またはC末端に位置する一つ以上の追加のアミノ酸残基をさらに含む。これらの追加のアミノ酸残基は、ポリペプチドによるアルブミンの結合を強化すること、およびフォールディングされたアルブミン結合ドメインの立体配座安定性を向上させることに一定の役割を果たすことができるが、同じく、例えば、ポリペプチドの生産、精製、インビボもしくはインビトロの安定性、カップリング、標識または検出のうちの一つ以上およびこれらの任意の組み合わせに関する他の目的にも十分かなうことができる。かかる追加のアミノ酸残基は、化学的カップリング、例えばHD1への化学的カップリングのために加えられた一つ以上のアミノ酸残基を含み得る。

【0105】

すなわち一つの実施形態では、配列番号36におけるアミノ酸配列のNまたはC末端の α ヘリックスの直前または直後のアミノ酸が立体配座安定性に影響を及ぼし得る。立体配座安定性向上に寄与し得るアミノ酸残基の一例は、上で定義した配列番号36のN末端に位置するセリン残基である。前記N末端セリン残基は、場合によってセリン側鎖のガンマ酸素とグルタミン酸残基のポリペプチド主鎖NHとの間の水素結合を伴うことにより、カノニカルS-X-X-Eキャッピングボックスを形成することがあり得る。このN末端キャッピングは、本開示の第一の態様によるアルブミン結合ポリペプチドを構成する3ヘリックスドメイ

ンの第一の α ヘリックスの安定性に寄与することができる。

【0106】

したがって、一つの実施形態において、前記追加のアミノ酸は、前記ポリペプチドのN末端に少なくとも一つのセリン残基を含む。言い換えると、前記アミノ酸配列に対し、一つ以上のセリン残基が先行する。前記アルブミン結合ポリペプチドのもう一つの実施形態において、前記追加のアミノ酸は、該ポリペプチドのN末端にグリシン残基を含む。配列番号36のアミノ酸配列に対し、一つ、二つ、三つ、四つまたは任意の好適な数のアミノ酸残基が先行し得ることが理解される。すなわち、前記アミノ酸配列に対し、単一のセリン残基、単一のグリシン残基またはこれら二つの組み合わせ、例えばグリシンーセリン (GS) の組み合わせもしくはグリシンーセリンーセリン (GSS) の組み合わせが先行し得る。さらにもう一つの実施形態において、前記追加のアミノ酸残基は、配列番号36の配列によって定義されるポリペプチドのN末端にグルタミン酸を含む。

10

【0107】

例示的ABD種としては、下記の表1および実施例に示す化合物が挙げられるが、これらに限定されない。PCT公開出願番号国際公開第2009/016043号パンフレットも参照（この参考文献は、その全体があらゆる目的のために出典明示により本明細書に援用されている）。本明細書に記載する化合物、方法および医薬組成物に有用なABDペプチドは、本明細書に開示されているかまたは当該技術分野において公知のABDペプチドの断片または類似体であってもよいが、該断片または類似体が、アルブミン結合モチーフを含有し、本明細書に記載する親和性でアルブミンに結合する場合に限る。

20

【0108】

【表1】

表1. 選択されたABDペプチド

ABDペプチド配列	配列番号
LAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAALP	37
LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKSYINRAKTVEGVHTLIGHILAALP	38
LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVNALTHILAALP	39
LAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINRARTVEGVHALIDHILAALP	40
LAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP	41
LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKNLINRAKTVEGVSSLKGHILAALP	42
LAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALTLHILAALP	43
LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKNLINRAKTVEGVDAIAHILAALP	44
LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKSLINRAKTVEGVDAITSHILAALP	45
LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKNLINRAKTVEGVNSLTSHILAALP	46
LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKNVINKAKTVEGVEALIADILAALP	47
LAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVQALIAHILAALP	48
LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP	49
LAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALTLHILAALP	50
LAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALISEILAALP	51
LAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKRLISKAKTVEGVKALISEILAALP	52

30

40

【0109】

アルブミンへの結合。血清アルブミンは、哺乳動物血清中に最も豊富にあるタンパク質であり（40g/L；ヒトの場合はおよそ0.7mM）、脂質およびビリルビンをはじめとする（しかしこれに限定されない）様々な分子に結合している（Peters T、1985、Advances in Protein Chemistry 37：161）。血清アルブミンの半減期は、動物の大きさに正比例し、例えば、ヒト血清アルブミン（HSA）は、19日の半減期を有し、ウサギ血清アルブミンは、約5日の半減期を有すると言われている（McCurdy TRら、J. Lab. Clin. Med. 143：115、2004）。ヒト血清アルブミンは、体中いたるところに、特に、腸および血液区画に広く分布しており、そこで主としてモル浸透圧濃度の維持に関与する。構造的には、アル

50

ブミンは、三つの相同ドメインおよび合計584または585のアミノ酸を含む一本鎖タンパク質である (Dugaiczky Lら、1982、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:71)。アルブミンは、17のジスルフィド架橋および単一の反応性チオール、C34、を含有するが、Nに連結されたおよびOに連結された炭水化物部分はない (Peters、1985、同上; Nicholson JPら、2000、Br J Anaesth 85:599)。このグリコシル化の欠如が、アルブミンの組換え発現を単純にする。アルブミンのこの特性は、その三次元構造が公知である (例えば、He XMおよびCarter DC、1992、Nature 358:209参照) ことにより、アルブミンは、組換え融合タンパク質での使用の魅力的な候補になっている。かかる融合タンパク質は、一般に、(そのタンパク質自体を投与すると迅速に体から除去されることとなる) 治療用タンパク質と (自然なゆっくりとしたクリアランスを呈す) 血漿タンパク質とを1本のポリペプチド鎖内に併せ持つ。例えば、Sheffield WP、2001、Curr. Drug Targets Cardiovasc. Haematol. Disord. 1:1参照。かかるタンパク質は、必要とする注射頻度がより少なく、治療用タンパク質のインビボレベルがより多いことで臨床的有用性をもたらすことができる。しかし、本明細書における改変ポリペプチドは、アルブミンにコンジュゲートしておらず、その代り、アルブミンへの非共有結合を可能にするモチーフを含有する。

【0110】

さらなる実施形態。本明細書に開示する各ポリペプチドはまた、それらの天然に存在する第一のアミノ酸を有するフレーム内のN末端にメチオニンを (所望により) 含むと考えられる。例えば、メトレブレチン (レブレチンA100) は、配列番号20に開示するように、N末端メチオニンが付加された成熟ヒトレブレチンから成る。同様に、本明細書を通して開示するアミノ酸配列および式のいずれかのN末端にメチオニン残基が含まれていることがある。さらに、本明細書に示す改変ポリペプチド配列中にC末端Glyが出現する場合、この残基が後のアミド化中に失われることがあることは言うまでもない。

【0111】

一部の実施形態において、レブレチン、レブレチン類似体、レブレチン活性断片、またはレブレチン誘導体は、親レブレチンに対して少なくとも50%、例えば、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%またはさらにそれ以上の配列同一性を有することができる。一部の実施形態において、前記親レブレチンは、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号143 (ID NO:143)、配列番号144、配列番号145または配列番号146に示すレブレチンである。したがって、一部の実施形態において、レブレチン、レブレチン類似体、レブレチン活性断片、またはレブレチン誘導体は、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22および配列番号23から成る群より選択された任意のレブレチンに対して少なくとも50%、例えば、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%またはさらにそれ以上の配列同一性を有することができる。一部の実施形態において、レブレチン、レブレチン類似体、レブレチン活性断片、またはレブレチン誘導体は、配列番号20に示すレブレチンに対して少なくとも50%、例えば、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%またはさらにそれ以上の配列同一性を有することができる。一部の実施形態において、レブレチン、レブレチン類似体、レブレチン活性断片、またはレブレチン誘導体は、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28または配列番号29から成る群より選択された任意のレブレチンに対して少なくとも50%、例えば、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%またはさらにそれ以上の配列同一性を有することができる。一部の実施形態において、レブレチン類似体は、配列番号20に示すレブレチンに対して少なくとも90%の配列同一性を有することができる。一部の実施形態において、レブレチン類似体は、配列番号1、配列番号2、配列番号143 (ID NO:143)、配列番号144、配列番号145、または配列番号146に示す

レプチンに対して少なくとも50%の配列同一性を有することができる。一部の実施形態において、レプチン類似体は、配列番号1、配列番号2、配列番号143 (ID NO:143)、配列番号144、配列番号145、または配列番号146に示すレプチンに対して少なくとも90%の配列同一性を有することができる。一部の実施形態において、レプチン類似体は、配列番号14または配列番号15に示すレプチンに対して少なくとも50%の配列同一性を有することができる。一部の実施形態において、レプチン類似体は、配列番号14または配列番号15に示すレプチンに対して少なくとも90%の配列同一性を有することができる。一部の実施形態において、レプチン類似体は、配列番号32に示すレプチンに対して少なくとも50%の配列同一性を有することができる。一部の実施形態において、レプチン類似体は、配列番号32に示すレプチンに対して少なくとも90%の配列同一性を有することができる。一部の実施形態において、レプチン類似体は、配列番号33に示すレプチンに対して少なくとも50%の配列同一性を有することができる。一部の実施形態において、レプチン類似体は、配列番号33に示すレプチンに対して少なくとも90%の配列同一性を有することができる。一部の実施形態において、レプチン類似体は、配列番号10または配列番号11に示すレプチンに対して少なくとも50%の配列同一性を有することができる。一部の実施形態において、レプチン類似体は、配列番号10または配列番号11に示すレプチンに対して少なくとも90%の配列同一性を有することができる。一部の実施形態において、レプチン類似体は、配列番号12または配列番号13に示すレプチンに対して少なくとも50%の配列同一性を有することができる。一部の実施形態において、レプチン類似体は、配列番号12または配列番号13に示すレプチンに対して少なくとも90%の配列同一性を有することができる。加えて、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号143、配列番号144、配列番号145および配列番号146から成る群より選択されたレプチンの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20またはさらに21のアミノ酸が、別のアミノ酸、例えば保存的アミノ酸もしくは非保存的アミノ酸、で置換されている、または別様に変更されているレプチンを、本発明に従って設計、調製および使用することができる。当該技術分野では通例であるように、アミノ酸置換の文脈での用語「保存的」は、電荷タイプ（例えば、アニオン性、カチオン性、中性、極性およびこれらに類するもの）、疎水性もしくは親水性、嵩（例えば、ファンデルワールス接触およびこれらに類するもの）、および／または官能性（例えば、ヒドロキシ、アミン、スルフヒドリル (sulfhydryl)）およびこれらに類するもの）の特性を維持する置換を指す。用語「非保存的」は、保存的でないアミノ酸置換を指す。

【0112】

加えて、当該技術分野において理解されているように、例えば、ネズミレプチン、ラットレプチン、ウシレプチン、ブタレプチンおよびアカゲザルレプチン、例えば本明細書に開示するもの、は、それぞれヒトレプチンと実質的に相同であり；特に、成熟形態のこれらのレプチンは、成熟レプチンと実質的に相同であり、およびさらに、特に該タンパク質のN末端部分付近で実質的に相同である。成熟ヒトレプチン形態1（配列番号16）およびメトレプチン（配列番号20）などのかかるレプチン類似体は、例えば、対応する成熟マウス、ラット、ウシ、ブタまたはアカゲザルレプチンにおいて相違が認められるかかる配列中の一つ以上の位置のアミノ酸残基の置換または別様の変更によって調製することができる。例えば、成熟ヒトレプチン（例えば、配列番号20）は、例えばマウス、ラットおよびサルにおいて生物学的応答を惹起する。例えば、国際公開第98/28427号および同第2009/064298号パンフレット、米国特許出願公開第2007/0020284号および同第2008/0207512号明細書、ならびにMurakamiら、1995、Biochem. Biophys. Res. Comm. 209: 944-952参照。ヒト成熟レプチンは、例えばかかる種において生物活性を有するので、かかる種のうちの一種以上からのレプチン中の対応する位置（複数可）が相違する位置の一つ以上のアミノ

10

20

30

40

50

酸が、かかる対応する相違位置のアミノ酸（複数可）で置換されているレプチンを設計し、調製することができる。

【0113】

例えば、第一のアミノ酸がバリンであり、位置146のアミノ酸がシステインである配列番号16によるヒト成熟レプチンタンパク質を使用して、位置32、35、50、64、68、71、74、77、89、97、100、101、105、106、107、108、111、118、136、138、142および145のアミノ酸のうちの一つ以上を別のアミノ酸で（対応するアミノ酸（複数可）は配列番号143における対応する位置（単数または複数）で見いだされる）置換して、本発明による改変ポリペプチドを設計、調製および使用することができる。加えて、例えば配列番号16の位置32、35、50、64、68、71、74、77、89、97、100、101、105、106、107、108、111、118、136、138、142および145のうち1カ所以上に別のアミノ酸、例えば保存的アミノ酸または非保存的アミノ酸を代入して、本発明による改変ポリペプチドを設計、調製および使用することもできる。

【0114】

さらに、成熟ラットレプチンタンパク質配列（配列番号12）に基づいた追加のレプチンを調製することができる。例えば、国際公開第98/28427号パンフレット、米国特許出願公開第2007/0020284号明細書、およびMurakamiら、1995、同上を参照のこと（これらの参考文献は、それら全体があらゆる目的のために出典明示により本明細書に援用されている）。成熟ラットレプチンは、次の位置が成熟ヒトレプチン形態1（配列番号16）と異なる：4、32、33、35、50、68、71、74、77、78、89、97、100、101、102、105、106、107、108、111、118、136、138および145。したがって、配列番号16におけるかかる位置の1カ所以上で、成熟ラットレプチン（配列番号12）において見いだされる対応する位置（単数または複数）で見いだされるアミノ酸を代入して、本発明による改変ポリペプチドを設計、調製および使用することができる。さらに、例えば配列番号16の位置4、32、33、35、50、68、71、74、77、78、89、97、100、101、102、105、106、107、108、111、118、136、138および145の1カ所以上に、別のアミノ酸、例えば保存的アミノ酸または非保存的アミノ酸を代入して、本発明による改変ポリペプチドを設計、調製および使用することができる。

【0115】

成熟ヒトレプチン形態1（配列番号16）とは相違する、成熟ラットレプチン（配列番号12）および成熟ネズミレプチン形態1（配列番号143）の両方からの位置は、4、32、33、35、50、64、68、71、74、77、78、89、97、100、102、105、106、107、108、111、118、136、138、142および145である。したがって、配列番号16におけるかかる位置の1カ所以上で、成熟ラットレプチン配列（配列番号12）または成熟ネズミ形態1配列（配列番号143）において見いだされる対応する位置（単数または複数）で見いだされるアミノ酸を代入して、本発明による改変ポリペプチドを設計、調製および使用することができる。加えて、位置4、32、33、35、50、64、68、71、74、77、78、89、97、100、102、105、106、107、108、111、118、136、138、142および145の1カ所以上に、別のアミノ酸、例えば保存的アミノ酸または非保存的アミノ酸を代入して、本発明による改変ポリペプチドを設計、調製および使用することもできる。

【0116】

加えて、成熟ヒトレプチン形態1（配列番号16）とは相違するアカゲザル成熟レプチン（配列番号10）において見いだされるアミノ酸は、（アミノ酸残基を1文字アミノ酸略号でカッコ内に示す）：8（S）、35（R）、48（V）、53（Q）、60（I）、66（I）、67（N）、68（L）、89（L）、100（L）、108（E）、112（D）および118（L）である。ヒト成熟レプチンは、サルにおいて生物学的応答を惹起するので、カッコ内のアミノ酸などの別のアミノ酸で置換された異なるアカゲザルアミノ酸の一つ以上を有する成熟ヒトレプチン形態1（配列番号16）などのレプチンを、本発明による改変ポリペプチドの設計、調製および使用に用いることができる。ある種の異なるアカゲザルアミノ酸が、例えば上記の成熟ネズミレプチン形態1（位置35、68、89、100および112）において見いだされるものでも

あることに留意するべきである。したがって、例えば成熟ヒトレプチン形態1（配列番号16）の位置4、8、32、33、35、48、50、53、60、64、66、67、68、71、74、77、78、89、97、100、102、105、106、107、108、111、112、118、136、138、142および145の一つ以上のアミノ酸が、ネズミまたはアカゲザルレプチン（例えば、配列番号143および／または配列番号10）におけるかかる位置（単数または複数）の対応するアミノ酸（単数または複数）によって置換されているレプチンを調製することができる。

【0117】

他のレプチンをレプチンアミノ酸配列の一部を欠失させることによって調製することができるが、但し、かかるレプチンアミノ酸配列が生物学的応答を惹起できることを条件とする。かかるレプチンアミノ酸配列は、レプチン活性断片である。例えば、成熟ネズミレ
10
プチン、成熟アカゲザルレプチン、成熟ヒトレプチンおよび成熟ラットレプチンならびに他のレプチンすべてに、プロセッシングされてない完全長形態のかかるレプチンに存在するN末端21アミノ酸シグナル配列がない。

【0118】

かかる成熟レプチンの以下の活性レプチン断片を調製することができる：

- (a) アミノ酸98－146
- (b) アミノ酸1－32
- (c) アミノ酸40－116
- (d) アミノ酸1－99および（接続されている）112－146
- (e) アミノ酸99と112の間に位置するアミノ酸100－111の一つ以上を有する、アミノ酸
20
1－99および（接続されている）112－146。

【0119】

加えて、例えば成熟ヒトレプチン形態1の位置のアミノ酸の一つ以上が、例えば上で開示したようなラット、ネズミ、サル、ブタおよび／またはウシ成熟レプチンにおいて見いだされる対応する位置（単数または複数）で見いだされるアミノ酸で置換されている、かかる活性レプチン断片を調製することができる。さらに、いずれの置換または変更も、ペプチドミメティクスまたはD-アミノ酸などの改変アミノ酸形態であり得る。

【0120】

加えて、本発明は、レプチン、レプチン類似体、レプチン活性断片、またはレプチン誘導体が以下のものから選択される、上で説明したレプチン、レプチン類似体、レプチン活
30
性断片、またはレプチン誘導体を含む改変ポリペプチドを包含する：

(a) 配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号5、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号13、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号143および配列番号144から成る群より選択されたレプチンのアミノ酸配列1－146であって、異なるアミノ酸が、位置4、32、33、35、50、64、68、71、74、77、78、89、97、100、102、105、106、107、108、111、118、136、138、142および145のうちの1カ所以上で置換されており、（位置28のグルタミル残基が存在しない場合でさえ）同じナンバリングを保持している、アミノ酸配列；

(b) 位置28のグルタミル残基が存在しない、サブパート（a）のアミノ酸配列；

(c) メチオニル残基がN末端に付加されている、サブパート（a）または（b）のアミノ
40
酸配列；

(d) （a）、（b）または（c）のアミノ酸配列の断片から成るレプチンであって、該断片が、

(i) アミノ酸98－146

(ii) アミノ酸1－32

(iii) アミノ酸40－116

(iv) アミノ酸1－99および112－146

(v) アミノ酸100－111のうちの一つ以上がアミノ酸99と112の間に位置する、アミノ酸
1－99および112－146； および、

(vi) アミノ酸100、102、105、106、107、108、111、118、136、138、142および145の
50

うちの一つ以上が別のアミノ酸で置換されている、サブパート (i) のアミノ酸配列；

(vii) アミノ酸4、8および32のうちの一つ以上が別のアミノ酸で置換されているサブパート (ii) のアミノ酸配列；

(viii) アミノ酸50、53、60、64、66、67、68、71、74、77、78、89、97、100、102、105、106、107、108、111および112のうちの一つ以上が別のアミノ酸で置換されている、サブパート (iii) のアミノ酸配列；

(ix) アミノ酸4、8、32、33、35、48、50、53、60、64、66、67、68、71、74、77、78、89、97、112、118、136、138、142および145のうちの一つ以上が別のアミノ酸で置換されている、サブパート (iv) のアミノ酸配列；および

(x) アミノ酸4、32、33、35、50、64、68、71、74、77、78、89、97、100、102、105、106、107、108、111、118、136、138、142、および145のうちの一つ以上が別のアミノ酸で置換されている、サブパート (v) のアミノ酸配列；

(xi) メチオニンがN末端に付加されている、(i) - (x) のいずれかのサブパートのレプチン

から成る群より選択されたものであるレプチン；ならびに

(e) 化学部分が結合している、(a) から (e) のいずれかのサブパートのレプチン；

(f) 前記化学部分が水溶性ポリマー部分である、サブパート (g) のレプチン；

(g) 前記水溶性ポリマー部分がポリエチレングリコールである、サブパート (f) のレプチン；

(h) 前記水溶性ポリマー部分がポリアミノ酸部分である、サブパート (f) のレプチン；および

(i) 前記部分が前記タンパク質部分のN末端だけに結合している、(e) から (h) のいずれか一つのサブパートのレプチン。

【0121】

上記に関して、化学部分が結合しているレプチンは、レプチン誘導体である。一つ以上の化学部分を結合することによるレプチンの誘導体化は、一定の状況下で何らかの利点、例えば、治療用タンパク質の安定性および循環時間の増加、ならびに免疫原性の低下、ならびに例えば中和抗体産生および／または注射部位反応の発生率についての性向の低下をもたらすことが分かっている。例えば、国際公開第98/28427号パンフレット、米国特許出願公開第2007/0020284号明細書、1979年12月18日付のDavisらの米国特許第4,179,337号明細書参照。総説については、Abuchowskiら、ENZYMES AS DRUGS (J. S. HolcerbergおよびJ. Roberts編、pp. 367-383 (1981))；Francisら、同上を参照のこと。したがって、誘導体化レプチンおよびABMまたはABDを用いると、有利なことに、両者によって提供される利点を有する本発明の改変ポリペプチドを生成することができる。

【0122】

レプチン誘導体は、化学修飾がそのアミノ酸側基、 α -炭素原子、末端アミノ基または末端カルボン酸基の一つ以上から成るレプチンを構成し得る。化学修飾としては、一つ以上の化学部分を結合すること、新たな結合を作ること、および一つ以上の化学部分を除去することが挙げられるが、これらに限定されない。アミノ酸側基の修飾としては、限定ではないが、アルキル化、アシル化、エステル形成、アミド形成、マレイミドカップリング、リシン ϵ -アミノ基のアシル化、アルギニン、ヒスチジンまたはリシンのN-アルキル化、グルタミン酸またはアスパラギン酸カルボン酸基 (glutamic or aspartic carboxylic acid groups) のアルキル化、およびグルタミンまたはアスパラギンの脱アミド化が挙げられる。末端アミノの修飾としては、限定ではないが、脱アミノ、N-低級アルキル、N-ジ-低級アルキル、およびN-アシル修飾が挙げられる。末端アミノの修飾としては、限定ではないが、脱アミノ、N-低級アルキル、N-ジ-低級アルキル、およびN-アシル修飾、例えば、アルキルアシル、分岐アルキルアシル、アルキルアリールアシルが挙げられる。末端カルボキシ基の修飾としては、限定ではないが、アミド、低級アルキルアミド、ジアルキルアミド、アリールアミド、アルキルアリールアミドおよび低級アルキルエステル修飾が挙げられる。低級アルキルは、 C_1 - C_4 アルキルである。さらに、一つ以上の

側基または末端基を、通常技能の合成化学者に公知の保護基によって保護することができる。アミノ酸の α -炭素をモノまたはジメチル化することもできる。

【0123】

かかる誘導体には、ポリアミノ酸、例えばポリ-his、ポリ-arg、ポリ-lysおよびポリ-alaの付加によって、または短鎖アルキルおよび拘束アルキル（例えば、分岐、環式、縮合、アダマンチル）をはじめとする小分子置換基、ならびに芳香族基の付加によって、一つ以上の水溶性ポリマー分子、例えばポリエチレングリコール（「PEG」）または様々な鎖長の脂肪酸鎖（例えば、ステアリル、パルミトイル、オクタノイル）にコンジュゲートされたレプチンが含まれる。一部の実施形態において、前記水溶性ポリマー分子は、約500ダルトンから約60,000ダルトンの範囲の分子量を有することになる。

10

【0124】

かかるポリマー・コンジュゲーションを、本明細書に開示するレプチンの配列内のアミノ酸残基のN末端またはC末端または側鎖で単独に行うことができる。あるいは、かかるレプチンのアミノ酸配列に沿って多数の誘導体化部位が存在することもある。リシン、アスパラギン酸、グルタミン酸またはシステインでの一つ以上のアミノ酸の置換により、追加の誘導体化部位を得ることができる。例えば、米国特許第5,824,784号および同第5,824,778号明細書参照。一部の実施形態では、レプチンを一つ、二つまたは三つのポリマー分子にコンジュゲートさせることができる。

【0125】

一部の実施形態では、水溶性ポリマー分子をアミノ、カルボキシルまたはチオール基に連結させ、おおよびリシン、アスパラギン酸、グルタミン酸またはシステインのNもしくはC末端によりまたは側鎖で連結させることができる。あるいは、水溶性ポリマー分子をジアミンおよびジカルボン酸基と連結させることができる。一部の実施形態では、レプチンをリシンアミノ酸上の ϵ アミノ基によって一つ、二つまたは三つのPEG分子とコンジュゲートさせる。

20

【0126】

レプチン誘導体には、一つ以上のアミノ酸残基が化学的に変更されたレプチンも含まれる。かかる化学的変更としては、アミド化、グリコシル化、アシル化、硫酸化、リン酸化、アセチル化および閉環が挙げられる。前記化学的変更を、レプチンの配列内のアミノ酸残基のN末端またはC末端または側鎖で単独に行うことができる。一つの実施形態において、これらのペプチドのC末端は、遊離-OHまたは-NH₂基を有し得る。もう一つの実施形態では、前記N末端部を、イソブチルオキシカルボニル基、イソプロピルオキシカルボニル基、n-ブチルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基、イソカプロイル基（「イソキャップ (isocap)」）、オクタニル基、オクチルグリシニ基（「G (Oct)」または「オクチルGly」と表示する）、8-アミノオクタン酸基、ダンシル、および/またはFmoc基でキャップすることができる。一部の実施形態において、閉環は、ジスルフィド架橋の形成により行われ得る。あるいは、レプチンアミノ酸配列に沿って多数の化学的変更部位が存在することもある。

30

【0127】

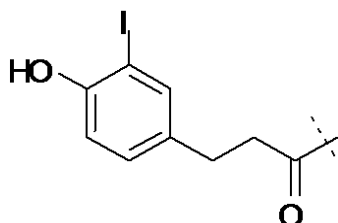
ある実施形態では、ボルトン・ハンター基を含めるようにレプチンを化学的に変更する。ボルトン・ハンター試薬は、当該技術分野において公知であり（「Radioimmunoassay and related methods」、A. E. BoltonおよびW. M. Hunter、HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY、第I巻、第26章、Immunochemistry、D. M. Weir編、Blackwell Scientific Publications、1986）、リシンのアミノ末端 α -アミノ基または ϵ -アミノ基により、中性連結を有するチロシン様部分を導入するために使用され得る。一部の実施形態では、レプチンのN末端部をボルトン・ハンター基で修飾する。一部の実施形態では、内部リシン残基をボルトン・ハンター基で修飾する。一部の実施形態では、レプチンアミノ酸配列に沿って多数のボルトン・ハンター修飾部位が存在することがある。ポリペプチド修飾に使用するボルトン・ハンター試薬は市販されており、それらとしては、水溶性ボルトン・ハンター試薬、スルホスクシンイミジル-3-[4-ヒドロフェニル]プロピオネート（Pierce

40

50

Biotechnology, Inc.、イリノイ州ロックフォード) およびボルトン・ハンター試薬-2、N-スクシンイミジル3-(4-ヒドロキシ-3-ヨードフェニル)プロピオネート(和光純薬工業株式会社(Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)、日本国、カタログ番号199-09341)が挙げられるが、これらに限定されない。レプチンにアミド連結によってコンジュゲートさせた例示的ボルトン・ハンター基を下に示す(式中の点線は、アミド結合を通過する)：

【化1】



【0128】

ボルトン・ハンター修飾前または後にレプチンをヨウ素化(例えば、 ^{125}I で放射性標識)してもよい。

【0129】

本発明に従って改変ポリペプチドを調製するために、かかる調製で使用するためのレプチン誘導体は、「非必須」アミノ酸残基の一つ以上の修飾を含むことがある。本発明の文脈で「非必須」アミノ酸残基は、レプチンの活性(例えば、アゴニスト活性)を無効にするまたは実質的に低下させることなく、変更することができる、例えば誘導体化することができる残基である。本発明の改変ポリペプチドは、そのレプチン部分の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上のアミノ酸残基の誘導体化を含み得、これらのうち、一つ以上のアミノ酸残基が非必須アミノ酸残基であり得る。加えて、本発明のポリペプチドを、該ペプチドの活性を無効にするまたは実質的に低下させることなく、そのレプチン部分の少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上のアミノ酸の付加を含むように誘導体化することができる。加えて、かかる非必須アミノ酸残基を、全体を通して記載された誘導体化を受けやすいアミノ酸残基で置換することができる。

【0130】

全体を通して用いている「アミノ酸」、「アミノ酸残基」およびこれらに類するものは、天然アミノ酸、非天然アミノ酸、および修飾アミノ酸を指す。相反する言明がない限り、一般にまたは具体的に名前によるアミノ酸へのいずれの言及も、D立体異性体とL立体異性体の両方への言及を、それらの構造がかかる立体形態を許すならば含む。天然アミノ酸としては、アラニン(Ala)、アルギニン(Arg)、アスパラギン(Asn)、アスパラギン酸(Asp)、システイン(Cys)、グルタミン(Gln)、グルタミン酸(Glu)、グリシン(Gly)、ヒスチジン(His)、イソロイシン(Ile)、ロイシン(Leu)、リシン(Lys)、メチオニン(Met)、フェニルアラニン(Phe)、プロリン(Pro)、セリン(Ser)、トレオニン(Thr)、トリプトファン(Trp)、チロシン(Tyr)およびバリン(Val)が挙げられる。非天然アミノ酸としては、ホモリシン、ホモアルギニン、ホモセリン、アゼチジンカルボン酸、2-アミノアジピン酸、3-アミノアジピン酸、 β -アラニン、アミノプロピオン酸、2-アミノ酪酸、4-アミノ酪酸、6-アミノカプロン酸、2-アミノヘプタン酸、2-アミノイソ酪酸、3-アミノイソ酪酸、2-アミノピメリン酸、tert-ブチルグリシン、2,4-ジアミノイソ酪酸、デスモシン、2,2'-ジアミノピメリン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、N-エチルグリシン、N-エチルアスパラギン、ホモプロリン、ヒドロキシリシン、アローヒドロキシリシン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン、イソデスモシン、アローイソロイシン、N-メチルアラニン、N-メチルグリシン、N-メチルイソロイシン、N-メチルペンチルグリシン、N-メチルバリン、ナフトアラニン(naphthalanine)、ノルバリン、ノルロイシン、オルニチン、ペンチルグリシン、ピペコリン酸およびチオプロリンが挙げられるが、これらに限定されない。追加の非天然アミノ酸としては、可逆的にもしくは不可逆的に、化学的にブロックされているか、それらのN末

10

20

30

40

50

端アミノ基もしくはそれらの側鎖基が化学的に修飾されている修飾アミノ酸残基、例えば、N-メチル化DおよびLアミノ酸もしくは側鎖官能基が化学的に修飾されて別の官能基になっている残基が挙げられる。例えば、修飾アミノ酸としては、メチオニンスルホキシド；メチオニンスルホン；アスパラギン酸の修飾アミノ酸であるアスパラギン酸-（ β -メチルエステル）；グリシンの修飾アミノ酸であるN-エチルグリシン；またはアラニンの修飾アミノ酸であるアラニンカルボキサミドが挙げられる。組み込むことができる追加の残基は、Sandbergら、J. Med. Chem. 41:2481-91、1998に記載されている。

【0131】

上で述べたように、レプチンおよび他のポリペプチドのかかる誘導体化に好適な化学部分は、例えば、様々な水溶性ポリマーを含む。好ましくは、最終製品調製物の治療使用目的のために、前記ポリマーは、医薬的に許容し得るものである。当業者であれば、望ましいポリマーを、そのポリマー／タンパク質コンジュゲートが治療目的で使用されるか否か、ならびに治療目的で使用される場合、所望の投薬量、循環時間、タンパク質分解に対する耐性、および他の考慮事項に基づいて選択することができるはずである。前記改変ポリペプチドおよびレプチンについて、その誘導体化の有効性は、該誘導体化レプチンまたは該誘導体化改変ポリペプチドを所望の形態で（すなわち、浸透圧ポンプによって、またはさらに好ましくは注射もしくは注入によって、または例えば経口、肺もしくは鼻送達用にさらに製剤して）投与し、本明細書に記載するような生物学的効果および生物学的応答を観察することによって確認することができる。

【0132】

かかる水溶性ポリマーは、例えば、ポリエチレングリコール、エチレングリコール／プロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ-1, 3-ジオキソラン、ポリ-1, 3, 6-トリオキサン、エチレン／無水マレイン酸コポリマー、ポリアミノ酸（ホモポリマーまたはランダムコポリマーのいずれか）およびデキストランまたはポリ（n-ビニルピロリドン）ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド／エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオールおよびポリビニルアルコールから成る群より選択することができる。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは、水中でのその安定性のため、製造の際に有利であり得る。また、スクシネートおよびスチレンを使用してもよい。

【0133】

本発明による改変ポリペプチドの設計および調製に使用するレプチン誘導体は、レプチン部分にポリアミノ酸または分岐点アミノ酸を結合することによって調製することができる。例えば、前記ポリアミノ酸は、ABMまたはABDの結合によって達成される利点に加えて、前記レプチンまたは前記改変ポリペプチドの循環半減期を増加させることにも役立ち得る追加の担体タンパク質、例えばFc部分であり得る。加えて、かかるポリアミノ酸は、血清アルブミン（album）（例えば、ヒト血清アルブミン）、追加の抗体もしくはその一部分（例えば、Fc領域）、または他のポリアミノ酸、例えばポリリシンから成る群より選択することができる。下に示すように、ポリアミノ酸の結合位置は、レプチン部分のN末端、またはC末端、または間の他の箇所であり得、およびまた、化学的「リンカー」部分、例えばペプチドリンカーまたは非ペプチドリンカーによってレプチンに接続されることもある。

【0134】

前記ポリマーは、任意の分子量のものであってよく、および分岐していることも、または分岐していないこともあり得る。ポリエチレングリコールについて、好ましい分子量は、取扱いおよび製造の容易さのために約2キロダルトン（kDa）と約100kDaの間である（この用語「約」は、ポリエチレングリコールの調製中に、言明した分子量より重くなる分子もあり、軽くなる分子もあることを示す）。ある実施形態において、前記ポリエチレングリコールは、約2kDaと約60kDaの間である。ある実施形態において、前記ポリエチレングリコールは、約2kDaと約40kDaの間である。ある実施形態において、前記ポリエチレング

リコールは、約5kDaと約40kDaの間である。ある実施形態において、前記ポリエチレングリコールは、約10kDaと約40kDaの間である。ある実施形態において、前記ポリエチレングリコールは、約5kDaと約30kDaの間である。ある実施形態において、前記ポリエチレングリコールは、約5kDaと約20kDaの間である。ある実施形態において、前記ポリエチレングリコールは、約10kDaと約20kDaの間である。所望の治療プロファイル（例えば、本発明のレプチンおよび／または改変ポリペプチドに結合されたポリエチレングリコールについての、所望される持続放出の継続時間、溶解度特性、生物活性に対する効果（もしあれば）、取扱いの容易さ、または抗原性の程度または欠如、および他の公知の効果）によっては、他のサイズを用いてもよい。本発明に従ってレプチン誘導体を生成するためにレプチンに結合され得る特定分子量のPEGの選択に影響を及ぼし得るさらなる考慮事項としては、かかる分子量のPEGが、医薬的に許容し得る組成物もしくは製剤中に存在するとき、または対象への（例えば注射による）投与時に生理液もしくは組織に曝露されたとき、前記レプチンおよび／または改変ポリペプチドの凝集を軽減および／またはその溶解度を増加させることができる程度；注射による対象への投与時に前記レプチンまたは改変ポリペプチドの投与によって引き起こされる注射部位反応の発生を軽減することができる程度；対象へのかかるレプチンまたは改変ポリペプチドの投与の結果として該レプチンまたは改変ポリペプチドに対して産生され得る中和抗体の産生を軽減することができる程度；ならびにこれらに類することが挙げられる。

10

【0135】

そのようにして結合されるポリマー分子の数は様々であり、機能に対するその結果として生ずる効果を当業者は確認することができるだろう。モノ誘導体化することができ、または同じか異なる化学部分（例えば、ポリマー、例えば異なる重量のポリエチレングリコール）で、ジ誘導体化、トリ誘導体化、テトラ誘導体化もしくは誘導体化のいくつかの組み合わせに備えることもできる。誘導体化すべきレプチン分子または改変ポリペプチド分子に対するポリマー分子の割合は様々であろうし、反応混合物中のそれらの濃度も様々であろう。一般に、過剰な未反応レプチン（もしくは場合により改変ポリペプチド）またはポリマーがない反応の効率の点で最適な比率は、所望の誘導体化度（例えば、モノー、ジー、トリーなど）、選択されたポリマーの分子量、ポリマーが分岐しているか、分岐していないか、および反応条件などの要因によって決まるだろう。

20

【0136】

化学部分は、レプチンおよび／または改変ポリペプチドの機能性または抗原性ドメインに対する効果に配慮して、レプチンおよび／または改変ポリペプチドに結合されるべきである。当業者には利用できる多くの結合方法がある。例えば、出典明示により本明細書に援用されている、欧州特許第0 401 384号（PEGのG-CSFへのカップリング）参照；Malikら、1992、Exp. Hematol. 20：1028-1035（トレシルクロリドを使用するGM-CSFのPEG化を報告）も参照。例えば、ポリエチレングリコールを反応性基、例えば遊離アミノまたはカルボキシル基を介してアミノ酸残基によって共有結合させることができる。反応性基は、活性化ポリエチレングリコール分子を結合させ得るものである。遊離アミノ基を有するアミノ酸残基としては、リシン残基およびN-末端アミノ酸残基を挙げることができる。遊離カルボキシル基を有するものとしては、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、およびC末端アミノ酸残基を挙げることができる。ポリエチレングリコール分子（単数または複数）を結合するための反応性基としてスルフヒドリル基を使用することができる。アミノ基に結合すること、例えば、N末端またはリシン基に結合することが、治療のために好ましい。受容体結合を所望する場合には、受容体結合にとって重要な残基での結合を避けるべきである。

30

40

【0137】

本発明の改変ポリペプチドの調製に使用するために、N末端化学修飾レプチンの設計および調製が特に所望されることがある。ポリエチレングリコールを本組成物の実例として用いると、（分子量、分岐などが）様々なポリエチレングリコール分子から選択することができ、反応混合物中のポリエチレングリコール分子のレプチン分子に対するまたは場合

50

により改変ポリペプチド分子に対する割合、行うPEG化反応のタイプ、および選択したN末端PEG化タンパク質を得るための方法を選択することができる。N末端PEG化調製物を得る（すなわち、この部分を必要に応じて他のモノPEG化部分から分離する）方法は、PEG化タンパク質分子集団からのN末端PEG化材料の精製による方法であり得る。選択的N末端化学修飾は、特定のタンパク質における誘導体化に利用できる種々のタイプの第一級アミノ基の示差反応性（リシン対N末端）を活用する還元的アルキル化によって遂行することができる。適切な反応条件下で、カルボニル基含有ポリマーを用いてタンパク質のN末端での実質的に選択的な誘導体化が達成される。例えば、タンパク質のリシン残基のε-アミノ基のpKaとN末端残基のα-アミノ基のpKaの差を利用することができるpHで反応を行うことによって、該タンパク質を選択的にN末端PEG化することができる。かかる選択的誘導体化により、水溶性ポリマーのタンパク質への結合を制御する：ポリマーとのコンジュゲーションは、主としてそのタンパク質のN末端で起こり、他の反応性基、例えば、リシン側鎖アミノ基の顕著な修飾は行われぬ。還元的アルキル化を用いる場合、水溶性ポリマーは、上記のタイプのものであってよいが、タンパク質とのカップリングのために単一の反応性アルデヒドを有するべきである。単一の反応性アルデヒドを含有するポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドを使用することができる。

10

【0138】

一部の実施形態では、ポリペプチドホルモンドメインとABDペプチドを共有結合で連結している本明細書に記載のリンカー、例えばL1を有する化合物を提供する。一部の実施形態において、第一のリンカー（L1）は、改変ポリペプチド内のHD1を共有結合で連結する。一部の実施形態では、本明細書に記載のポリペプチドホルモンドメイン（例えば、HD1）を、ペプチドリリンカーを介してABDペプチドに共有結合で連結させることができる。いずれのリンカーも自由選択である、すなわち、いずれのリンカーも単に結合であり得る。存在する場合、リンカーは主にスペーサー機能を果たすものなので、リンカーの化学構造は重要ではない。一つの実施形態において、リンカーは、ペプチド結合によって連結された1から30以下のアミノ酸を含む。それらのアミノ酸を20の天然に存在するアミノ酸から選択することができる。あるいは、非天然アミノ酸を化学合成、翻訳後化学修飾によって組み込むこともでき、または宿主細胞での組換え発現によるインビボ組み込みによって組み込むこともできる。これらのアミノ酸の一部は、グリコシル化されていることがある。

20

【0139】

ある実施形態において、前記1から30以下のアミノ酸は、グリシン、アラニン、プロリン、アスパラギン、グルタミン、リシン、アスパルテートおよびグルタメートから選択される。さらなる実施形態において、前記リンカーは、立体障害のない大多数のアミノ酸、例えばグリシン、アラニンおよび／またはセリンで構成されている。ポリグリシンは特に有用で、例えば、(Gly)₃、(Gly)₄（配列番号116）、(Gly)₅（配列番号117）があり、ポリアラニンとして、ポリ(Gly-Ala)、ポリ(Gly-Ser)、ポリ(Gly-Glu)、ポリ(Gly-Lys)、ポリ(Gly-Asp)およびポリ(Gly-Arg)モチーフも有用である。リンカーの他の具体的な例は、(Gly)₃Lys(Gly)₄（配列番号118）；(Gly)₃AsnGlySer(Gly)₂（配列番号119）；(Gly)₃Cys(Gly)₄（配列番号120）；およびGlyProAsnGlyGly（配列番号121）である。GlyとAlaの組み合わせは特に有用であり、GlyとSerの組み合わせも有用である。したがって、さらなる実施形態において、前記ペプチドリリンカーは、グリシンリッチペプチド、例えば、Gly-Gly-Gly；配列[Gly-Ser]_n（配列番号122）、[Gly-Gly-Ser]_n（配列番号123）、[Gly-Gly-Gly-Ser]_n（配列番号124）および[Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]_n（配列番号125）（これらの式中、nは、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10である）、例えば[Gly-Gly-Gly-Ser]₁、[Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]₁、[Gly-Gly-Gly-Ser]₄、または[Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]₃から成る群より選択される。

30

40

【0140】

ある実施形態では、荷電リンカーを使用することがある。かかる荷電リンカーは、かなりの数の酸性残基（例えば、Asp、Gluおよびこれらに類するもの）を含有することもあり

50

、またはかなりの数の塩基性残基（例えば、Lys、Argおよびこれらに類するもの）を含有することもあるので、該リンカーは、それぞれ、7未満のまたは7より大きいpIを有する。当業者には理解されるように、またすべての他のことも同等であるように、所与のリンカー中の酸性または塩基性残基の相対量が多いほど、該リンカーのpIは、それぞれ、低くまたは高くなる。かかるリンカーは、本明細書に開示する改変ポリペプチドに、特定のpH、例えば、生理pH（例えば、pH7.2とpH7.6の間（両端の値を含む））、またはかかるポリペプチドを含む医薬組成物のpHで、かかるポリペプチドの溶解性および／もしくは安定性を向上させるなどの利点を付与することができる。

【0141】

例えば、「酸性リンカー」は、7未満；6と7の間（両端の値を含む）；5と6の間（両端の値を含む）；4と5の間（両端の値を含む）；3と4の間（両端の値を含む）；2と3の間（両端の値を含む）；または1と2の間（両端の値を含む）のpIを有するリンカーである。同様に、「塩基性リンカー」は、7より大きい；7と8の間（両端の値を含む）；8と9の間（両端の値を含む）；9と10の間（両端の値を含む）；10と11の間（両端の値を含む）；11と12の間（両端の値を含む）；または12と13の間（両端の値を含む）のpIを有するリンカーである。ある実施形態において、酸性リンカーは、 $[\text{Gly-Glu}]_n$ （配列番号126）； $[\text{Gly-Gly-Glu}]_n$ （配列番号127）； $[\text{Gly-Gly-Gly-Glu}]_n$ （配列番号128）； $[\text{Gly-Gly-Gly-Gly-Glu}]_n$ （配列番号129）、 $[\text{Gly-Asp}]_n$ （配列番号130）； $[\text{Gly-Gly-Asp}]_n$ （配列番号131）； $[\text{Gly-Gly-Gly-Asp}]_n$ （配列番号132）； $[\text{Gly-Gly-Gly-Gly-Asp}]_n$ （配列番号133）（これらの式中、nは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上である）から成る群より選択される配列、例えば $[\text{Gly-Gly-Glu}]_6$ を含有する。ある実施形態において、塩基性リンカーは、 $[\text{Gly-Lys}]_n$ （配列番号134）； $[\text{Gly-Gly-Lys}]_n$ （配列番号135）； $[\text{Gly-Gly-Gly-Lys}]_n$ （配列番号136）； $[\text{Gly-Gly-Gly-Gly-Lys}]_n$ （配列番号137）、 $[\text{Gly-Arg}]_n$ （配列番号138）； $[\text{Gly-Gly-Arg}]_n$ （配列番号139）； $[\text{Gly-Gly-Gly-Arg}]_n$ （配列番号140）； $[\text{Gly-Gly-Gly-Gly-Arg}]_n$ （配列番号141）（これらの式中、nは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上である）から成る群より選択される配列、例えば $[\text{Gly-Gly-Lys}]_6$ を含有する。

【0142】

加えて、一定の構造モチーフまたは構造的特徴、例えば α ヘリックスを有するリンカーを調製することができる。例えば、かかるリンカーは、 $[\text{Glu-Ala-Ala-Ala-Lys}]_n$ （配列番号142）（式中、nは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上である）から成る群より選択される配列、例えば、 $[\text{Glu-Ala-Ala-Ala-Lys}]_3$ 、 $[\text{Glu-Ala-Ala-Ala-Lys}]_4$ 、または $[\text{Glu-Ala-Ala-Ala-Lys}]_5$ を含有し得る。

【0143】

加えて、本明細書に記載する改変ポリペプチドのL1部分としての役割を果たす非ペプチドリリンカーを用いることができる。例えば、当該技術分野において理解されているように、例示的非ペプチドリリンカー、例えばPEGリンカーをそのように用いることができる。例えば国際公開第2000/024782号パンフレット参照。ある実施形態において、かかるPEGリンカーは、100Daから1000kDaの分子量を有する。ある実施形態において、かかるPEGリンカーは、100Daから500kDaの分子量を有する。ある実施形態において、かかるPEGリンカーは、100Daから100kDaの分子量を有する。ある実施形態において、かかるPEGリンカーは、100Daから50kDaの分子量を有する。ある実施形態において、かかるPEGリンカーは、100Daから10kDaの分子量を有する。ある実施形態において、かかるPEGリンカーは、100Daから5kDaの分子量を有する。ある実施形態において、かかるPEGリンカーは、100Daから1kDaの分子量を有する。ある実施形態において、かかるPEGリンカーは、100Daから500Daの分子量を有する。

【0144】

本発明による使用に好適なリンカーが、上で記載した特徴およびモチーフの一つ以上を有し得ることも理解されるはずである。例えば、リンカーは、酸性リンカーはもちろん、

α ヘリックスなどの構造モチーフも含むことがある。同様に、リンカーは、塩基性リンカーと、 α ヘリックスなどの構造モチーフとを含むことがある。リンカーは、酸性リンカーと、塩基性リンカーと、 α ヘリックスなどの構造モチーフとを含むことがある。加えて、本発明による改変ポリペプチドが、一つより多くのリンカーを有することがあり得、それぞれのかかるリンカーが、上に記載した特徴の一つ以上を有し得ることも理解されるはずである。

【0145】

本明細書に記載するリンカーは例示的であり、本発明の範囲内のリンカーは、さらにかなり長いものであり得、他の残基を含む含むこともある。一つの実施形態において、レプチン化合物がリンカーなしでABDに直接連結されている改変ポリペプチドは、明白に除外

10

【0146】

一部の実施形態において、前記改変ポリペプチドは、N末端にABDを、およびC末端にHD1を含む。逆に、一部の実施形態において、前記改変ポリペプチドは、C末端にABDを、およびN末端にHD1を含む。一部の実施形態では、N末端またはC末端のいずれかがレプチン、レプチン断片、またはレプチン類似体である。好ましくは、前記ABDは、レプチン化合物のN末端にある。さらにABDおよびHD1を含む実施形態に対して、前記改変ポリペプチドは、構造ABD-HD1またはHD1-ABD（両方ともN末端からC末端に向かって読まれる）を有することができる。

【0147】

20

本明細書に示す改変ポリペプチドのN末端および／またはC末端について明確な指示がなければ、その改変ポリペプチドをN末端からC末端に向かって読むべきであることは言うまでもない。例えば、HD1がレプチンまたはその類似体である場合、用語HD1-ABD、HD1-L1-ABD、HD1-ABD、およびこれらに類するものは、N末端および／またはC末端について明確な指示がない場合、レプチン化合物がその改変ポリペプチドのN末端に存し、ABDがC末端に存することを意味する。逆に、N末端および／またはC末端が明確に指示されている場合には、その末端についての明確な指示に従ってその改変ポリペプチド読むべきである。例えば、HD1_{C末端}-ABD、HD1-L1-ABD_{N末端}、およびこれらに類する語は、ABDがその改変ポリペプチドのN末端に存し、HD1がC末端に存することを意味する。

【0148】

30

上記改変ポリペプチドの一部の実施形態において、HD1は、ヒトレプチンまたはメトレプチンである。一部のさらなる実施形態において、HD1は、本明細書に記載するようなレプチン類似体である。一部の実施形態において、前記レプチン類似体は、レプチンA100、A300またはA500である。

【0149】

一部の実施形態において、本明細書に記載する改変ポリペプチドは、ABDポリペプチドのみの、すなわちコンジュゲートしたホルモンドメインの非存在下での、親和性とは異なる、血清アルブミンに対する親和性を有する。有効な会合を達成するために、前記改変ポリペプチドは、解離定数 K_D が、例えば約 $10^{-6}M$ 、 $10^{-7}M$ 、 $10^{-8}M$ 、 $10^{-9}M$ 、 $10^{-10}M$ 、 $10^{-11}M$ 、 $10^{-12}M$ 、 $10^{-13}M$ 、 $10^{-14}M$ またはさらに $10^{-15}M$ 未満であるような、血清アルブミンに対する結合親和性を有し得る。一部の実施形態において、前記親和性は、過度に強くないので、前記改変ポリペプチドは、アルブミンから解離することでき、生物学的応答、例えば、受容体、例えばレプチン受容体への結合を惹起することができる。前記親和性、好ましくはヒト血清アルブミンに対する親和性は、PCT公開出願番号国際公開第2009/016043号パンフレットに記載されている要領で測定され得る。

40

【0150】

一部の実施形態において、本明細書に記載する改変ポリペプチドは、ホルモンドメイン（単数または複数）とコンジュゲートしている、血漿半減期を延長することができる異なる部分（例えば、PEGまたはFcまたはアルブミン）を有する対応する化合物より優れている。この文脈で、用語「優れている」は、疾患または障害の処置の評価に重きが置かれ得

50

る様々な機能的特性を指す。例えば、本明細書に記載する改変ポリペプチドは、ホルモンドメイン（単数または複数）とコンジュゲートしている異なる部分を有する対応する化合物より少ない、例えば1倍未満、2分の1、3分の1、4分の1、5分の1またはさらにそれ以下の生物活性（ホルモンドメイン）成分を必要とし得る。さらなる例については、本明細書に記載する改変ポリペプチドは、より高い効力、例えば1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、50倍またはさらにそれ以上の効力を有し得る。

【0151】

ここで考えられる改変ポリペプチド化合物としては、次の表2に示すような化合物が挙げられる。

【0152】

【表2-1】

表2. 選択された改変ポリペプチド

化合物	配列	分子量
1	MLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAAL PTGGGGASVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGL EFIPGLHPILTLISKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISNDLENLRDLL HVLAFSKSCHLPQASGLETLES LGGVLEASGYSTEVALSRLQGSL QDMLQQDLSPGC (配列番号53)	21647.2
2	MLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAAL PTGGGGSGGGSGGGSGGGASVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISH TQSVSSKQKVTGLEFIPGLHPILTLISKMDQTLAVYQQILTSMPSRN VIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCHLPQASGLETLES LGGVLEASGY STEVALSRLQGSLQDMLQQDLSPGC (配列番号54)	22509.0
3	MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLEFIPGLHP ILTLISKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSK SCHLPQASGLETLES LGGVLEASGYSTEVALSRLQGSLQDMLQQ LDLSPGCTGGGGASLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKT VEGVEALKLHILAALP (配列番号55)	21734.3
4	MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLEFIPGLHP ILTLISKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSK SCHLPQASGLETLES LGGVLEASGYSTEVALSRLQGSLQDMLQQ LDLSPGCTGGGGSGGGSGGGSGGGASLAEAKVLANRELDKYGVSD DFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (配列番号56)	22509.0
9	MLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAAL PTGGGGSGGGSGGGSGGGASISIEKIQADTKTLTKTIITRIIQLSTQ NGVSTDQRVSGLD FIPGNQQFQNLADMDQTLAVYQQILSSLPMPD RTQISNDLENLRSLFALLATLKNCPFTRSDGLDTMEIWGGIVEESLY STEVVTLDRRLRKSLEKQDLHIQGC (配列番号57)	22984.4
12	MLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAAL PTGGGGSGGGSGGGSGGGASVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISH TQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLISKMDQTLAVYQQILTSMPSRN VIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCHLPWASGLETLDLGGVLEASG YSTEVALSRLQGSLQDMLWQLDLSPGC (配列番号58)	22597.1
13	MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLH PILTLISKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFS KSCHLPWASGLETLDLGGVLEASGYSTEVALSRLQGSLQDMLW QLDLSPGCTGGGGSGGGSGGGSGGGASLAEAKVLANRELDKYG VSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (配列番号59)	22597.1

【0153】

【表 2 - 2】

14	MLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAAL PTGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSASPIQRVQDDTKTLIKTIITRINDISPPQ GVCSPRVAGLDFIPRVQSVRTLSGMDQILATYQQILTSLSQSRNVIQ ISNDLENLRDLLHVLAFSKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRASVHSTE VVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (配列番号60)	22592.9
15	MLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAAL PTGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSASPIQRVQDDTKTLIKTIITRINDISPPQ GVSSRPVAGLDFIPRVQSVRTLSGMDQILATYQQILTSLSQSRNVIQ SNDLENLRDLLHVLAFSKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRASVHSTE VVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (配列番号61)	22576.7
16	MLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAAL PTGPIQRVQDDTKTLIKTIITRINDISPPQGVCSPRVAGLDFIPRVQSV RTLSGMDQILATYQQILTSLSQSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKS CPVPARGSDTIKGLGNVLRASVHSTEVALSRLKAALQDMLRQL DRNPGC (配列番号62)	21332.7
17	MLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAAL PTGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSASVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISH TQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRN VIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCHLPWASGLETLDLGGVLEASG YSTEVALSRLQGSLQDMLWQLDLSPGC (配列番号63)	22624.7
18	MLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAAL PTGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSASVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISH TQSVSSKQKVTGLEFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRN VIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCHLPQASGLETLESLLGGVLEASGY STEVALSRLQGSLQDMLQQLDLSPGC (配列番号64)	22536.6
19	MLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAAL PTGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSASVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISH TQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRN VIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCHLPQASGLETLDLGGVLEASGY STEVALSRLQGSLQDMLQQLDLSPGC (配列番号65)	22480.95
20	MLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAAL PTGLAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKAAAASVPIQKVQDD TKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLEFIPGLHPILTLKMDQT LAVYQQILTSMPSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCHLPQASGL ETLESLLGGVLEASGYSTEVALSRLQGSLQDMLQQLDLSPGC (配 列番号66)	24224.6

10

20

30

【 0 1 5 4】

【表 2 - 3】

21	MLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAAL PTGGEGGEGGEGGEGGEGGEASVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDI SHTQSVSSKQKVTGLEFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMP SRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFAFSKCHLPQASGLETLES LGGVLEASGYSTEVALSRLQGSLQDMLQQDLSPGC (配列番号67)	22876.9
22	MLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAAL PTGGKGGKGGKGGKGGKGGKASVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDI SHTQSVSSKQKVTGLEFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMP SRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFAFSKCHLPQASGLETLES LGGVLEASGYSTEVALSRLQGSLQDMLQQDLSPGC (配列番号68)	22871.2
23	MLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAAL PTGGGGSGGGSGGGSGGGSASVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDI SH TQSVSSKQKVTGLEFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMP SRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFAFSKCHLPQASGLETLES LGGVLEASGYSTEVALSRLQGSLQDMLQQDLSPGC (配列番号69)	22583.6
24	MLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALTLHILAAL PTGGGGASVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISH TQSVSSKQKVTGL EFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMP SRNVIQISNDLENLRDLL HVLAFAFSKCHLPQASGLETLES LGGVLEASGYSTEVALSRLQGSL QDMLQQDLSPGC (配列番号70)	21597.02
25	MLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALTLHILAAL PTGGGGSGGGSGGGSGGGSASVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDI SH TQSVSSKQKVTGLEFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMP SRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFAFSKCHLPQASGLETLES LGGVLEASGYSTEVALSRLQGSLQDMLQQDLSPGC (配列番号71)	22458.80
26	MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISH TQSVSSKQKVTGLEFIPGLHP ILTLKMDQTLAVYQQILTSMP SRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFAFSK SCHLPQASGLETLES LGGVLEASGYSTEVALSRLQGSLQDMLQQ LDLSPGCTGGGGSASLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTV EGVEALTLHILAALP (配列番号72)	21684.10

10

20

30

【 0 1 5 5 】

【表 2 - 4】

27	MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLEFIPGLHP ILTL SKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSK SCHLPQASGLETLES LGGVLEASGYSTEVALSRLQGSLQDMLQQ LDLSPGCTGGGGSGGGSGGGSGGGSASLAEAKEDAIKELDKYGV DYKYNLINKAKTVEGVEALTLHILAALP (配列番号73)	22458.80
28	MLAEAKEDAIKELDKYGVSDYKYNLINKAKTVEGVEALTLHILAAL PTGGGGSGGGSGGGSGGGSASISIEKIQADTKTLTKTITRIQLSTQ NGVSTDQRVSGLD FIPGNQQFQNLADMDQTLAVYQQILSSLPMPD RTQISNDLENLRSLFALLATLKNCPFTRSDGLDTMEIWGGIVEESLY STEVTLDRLRSLKNIKQLDHIQGC (配列番号74)	22934.18
29	MLAEAKEDAIKELDKYGVSDYKYNLINKAKTVEGVEALTLHILAAL PTGGGGSGGGSGGGSGGGSASVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISH TQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTL SKMDQTLAVYQQILTSMPSRN VIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCHLPWASGLETLDLGGVLEASG YSTEVALSRLQGSLQDMLWQLDLSPGC (配列番号75)	22546.92
30	MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLH PILTL SKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFS KSCHLPWASGLETLDLGGVLEASGYSTEVALSRLQGSLQDMLW QLDLSPGCTGGGGSGGGSGGGSGGGSASLAEAKEDAIKELDKYGV SDYKYNLINKAKTVEGVEALTLHILAALP (配列番号76)	22546.92
31	MLAEAKEDAIKELDKYGVSDYKYNLINKAKTVEGVEALTLHILAAL PTGGGGSGGGSGGGSGGGSASPIQRVQDDTKTLIKTITRINDISPQ GVCSRPRVAGLDFIPRVQSVRTL SGMDQILATYQQILTSLQSRNVIQ ISNDLENLRDLLHVLAFSKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRASVHSTE VVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (配列番号77)	22544.03
32	MLAEAKEDAIKELDKYGVSDYKYNLINKAKTVEGVEALTLHILAAL PTGGGGSGGGSGGGSGGGSASPIQRVQDDTKTLIKTITRINDISPQ GVSSRPRVAGLDFIPRVQSVRTL SGMDQILATYQQILTSLQSRNVIQ ISNDLENLRDLLHVLAFSKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRASVHSTE VVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (配列番号78)	22527.96

10

20

30

【 0 1 5 6 】

【表 2 - 5】

33	MLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALTLHILAAL PTGPIQRVQDDTKTLIKTIITRINDISPQGVCSRVAGLDFIPRVQSV RTLSGMDQILATYQQILTSLSQSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKS CPVPRARGSDTIKGLGNVLRASVHSTEVVALSRLKAALQDMLRQL DRNPGC (配列番号79)	21196.74
34	MLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALTLHILAAL PTGGGGSGGGSGGGSGGGSSASVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISH TQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRN VIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCHLPWASGLETLDLGGVLEASG YSTEVALSRLQGSLQDMLWQLDLSPGC (配列番号80)	22546.92
35	MLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALTLHILAAL PTGGGGSGGGSGGGSGGGSSASVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISH TQSVSSKQKVTGLEFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRN VIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCHLPQASGLETLESLLGGVLEASGY STEVALSRLQGSLQDMLQQLDLSPGC (配列番号81)	22458.80
36	MLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALTLHILAAL PTGGGGSGGGSGGGSGGGSSASVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISH TQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRN VIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCHLPQASGLETLDLGGVLEASGY STEVALSRLQGSLQDMLQQLDLSPGC (配 列番号82)	22430.75
37	MLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALTLHILAAL PTGLAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAASVPIQKVQDD TKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLEFIPGLHPILTLKMDQT LAVYQQILTSMPSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCHLPQASGL ETLESLLGGVLEASGYSTEVALSRLQGSLQDMLQQLDLSPGC (配 列番号83)	24175.99
38	MLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALTLHILAAL PTGGEGGEGGEGGEGGEGGEASVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDI SHTQSVSSKQKVTGLEFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSR NVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCHLPQASGLETLESLLGGVLEASG YSTEVALSRLQGSLQDMLQQLDLSPGC (配列番号84)	22828.13

10

20

30

【 0 1 5 7 】

【表 2 - 6】

39	MLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALTLHILAAL PTGGKGGKGGKGGKGGKGGKASVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDI SHTQSVSSKQKVTGLEFIPGLHPILTLSKMDQTLAVYQQILTSMP SRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCHLPQASGLETLES LGGVLEASGYSTEVALSRLQGSLQDMLQQDLSPGC (配列番号85)	22836.51
40	MLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALTLHILAAL PTGGGGSGGGSGGGSGGGSGGSASVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDI SH TQSVSSKQKVTGLEFIPGLHPILTLSKMDQTLAVYQQILTSMP SRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCHLPQASGLETLES LGGVLEASGYSTEVALSRLQGSLQDMLQQDLSPGC (配列番号86)	22534.83
41	MLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALISEILAALP TGGGGASVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLE FIPGLHPILTLSKMDQTLAVYQQILTSMP SRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCHLPQASGLETLES LGGVLEASGYSTEVALSRLQGSLQDMLQQDLSPGC (配列番号87)	21574.96
42	MLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALISEILAALP TGGGGSGGGSGGGSGGGSGGSASVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDI SH TQSVSSKQKVTGLEFIPGLHPILTLSKMDQTLAVYQQILTSMP SRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCHLPQASGLETLES LGGVLEASGYSTEVALSRLQGSLQDMLQQDLSPGC (配列番号88)	22436.75
43	MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLEFIPGLHP ILTLSKMDQTLAVYQQILTSMP SRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCHLPQASGLETLES LGGVLEASGYSTEVALSRLQGSLQDMLQQDLSPGCTGGGG SASLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALISEILAALP (配列番号89)	21662.04
44	MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLEFIPGLHP ILTLSKMDQTLAVYQQILTSMP SRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCHLPQASGLETLES LGGVLEASGYSTEVALSRLQGSLQDMLQQDLSPGCTGGGG SGGGSGGGSGGGSGGSASLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALISEILAALP (配列番号90)	22436.75

10

20

30

【表 2 - 7】

45	MLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALISEILAALP TGGGGSGGGSGGGSGGGSSASISIEKIQADTKTLTKTIITRIIQLSTQN GVSTDQRVSGLDIFIPGNQQFQNLADMDQTLAVYQQILSSLPMPDR TQISNDLENLRSLFALLATLKNCPFTRSDGLDTMEIWGGGIVEESLYS TEVVTLDRRLRSLKNIEKQLDHIQGC (配列番号91)	22912.13
46	MLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALISEILAALP TGGGGSGGGSGGGSGGGSSASVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHT QSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVI QISNDLENLRDLLHVLAFFSKSCHLPWASGLETLDLGGVLEASGYS TEVVALSRLQGSQDMLWQLDLSPGC (配列番号92)	22524.86
47	MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLH PILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFFS KSCHLPWASGLETLDLGGVLEASGYSTEVALSRLQGSQDMLW QLDLSPGCTGGGGSGGGSGGGSGGGSSASLAEAKEDAIKELDKYGV SDYYKNLINKAKTVEGVEALISEILAALP (配列番号93)	22524.86
48	MLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALISEILAALP TGGGGSGGGSGGGSGGGSSASPIQRVQDDTKTLIKTIITRINDISPPQ GVCSRPRVAGLDFIPRVQSVRTLSGMDQILATYQQILTSLSQSRNVIQ ISNDLENLRDLLHVLAFFSKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRASVHSTE VVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (配列番号94)	22521.97
49	MLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALISEILAALP TGGGGSGGGSGGGSGGGSSASPIQRVQDDTKTLIKTIITRINDISPPQ GVSSRPRVAGLDFIPRVQSVRTLSGMDQILATYQQILTSLSQSRNVIQ SNDLENLRDLLHVLAFFSKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRASVHSTE VVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (配列番号95)	22505.91
50	MLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALISEILAALP TGPIQRVQDDTKTLIKTIITRINDISPPQGVCSRPRVAGLDFIPRVQSV RTLSGMDQILATYQQILTSLSQSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFFSKS CPVPARGSDTIKGLGNVLRASVHSTEVALSRLKAALQDMLRQL DRNPGC (配列番号96)	21174.68

10

20

30

【 0 1 5 9 】

【表 2 - 8】

51	MLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALISEILAAP TGGGGSGGGSGGGSGGGSSASVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHT QSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVI QISNDLENLRDLLHVLAFSKSCHLPWASGLETLDLGGVLEASGYS TEVVALSRLQGSLQDMLWQLDLSPGC (配列番号97)	22524.86
52	MLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALISEILAAP TGGGGSGGGSGGGSGGGSSASVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHT QSVSSKQKVTGLEFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVI QISNDLENLRDLLHVLAFSKSCHLPQASGLETLES�GGVLEASGYS TEVVALSRLQGSLQDMLQQLDLSPGC (配列番号98)	22436.75
53	MLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALISEILAAP TGGGGSGGGSGGGSGGGSSASVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHT QSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVI QISNDLENLRDLLHVLAFSKSCHLPQASGLETLDLGGVLEASGYS TEVVALSRLQGSLQDMLQQLDLSPGC (配列番号99)	22408.70
54	MLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALISEILAAP TGLAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAASVPIQKVQDDT KTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLEFIPGLHPILTLKMDQTL AVYQQILTSMPSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCHLPQASGLE TLES�GGVLEASGYSTEVALSRLQGSLQDMLQQLDLSPGC (配列 番号100)	24153.93
55	MLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALISEILAAP TGGE GEGEGEGEGEGEGEGEASVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDIS HTQSVSSKQKVTGLEFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSR NVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCHLPQASGLETLES�GGVLEASG YSTEVALSRLQGSLQDMLQQLDLSPGC (配列番号101)	22806.08
56	MLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALISEILAAP TGKGKGGKGGKGGKGGKASVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDIS HTQSVSSKQKVTGLEFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSR NVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCHLPQASGLETLES�GGVLEASG YSTEVALSRLQGSLQDMLQQLDLSPGC (配列番号102)	22800.43

10

20

30

【 0 1 6 0 】

【表 2 - 9】

58	MLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALISEILAAP TGGGGSGGGSGGGSGGGSASVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHT QSVSSKQKVTGLEFIPGLHPILTLISKMDQTLAVYQQILTSMPSRNV QISNDLENLRDLLHVLAFSKSCSLPQASGLETLESLEGEVLEASGYST EVVALSRLQGSLQDILQQLDLSPEC (配列番号103)	22512.78
59	MLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALTLHILAAL PTGGGGSGGGSGGGSGGGSASVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISH TQSVSSKQKVTGLEFIPGLHPILTLISKMDQTLAVYQQILTSMPSRN VIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCHLPQASGLETLESLEGGVLEASGY STEVVALSRLQGSLQDMLQQLDLSPGC (配列番号104)	22455.85
60	MLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKRLISKAKTVEGVKALISEILAAP TGGGGSGGGSGGGSGGGSASVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHT QSVSSKQKVTGLEFIPGLHPILTLISKMDQTLAVYQQILTSMPSRNV QISNDLENLRDLLHVLAFSKSCHLPQASGLETLESLEGGVLEASGYS TEVVALSRLQGSLQDMLQQLDLSPGC (配列番号105)	22450.87
61	MLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALTLHILAAL PTGGGGSGGGSGGGSGGGSASVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISH TQSVSSKQKVTGLEFIPGLHPILTLISKMDQTLAVYQQILTSMPSRN VIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCHLPQASGLETLESLEGGVLEASGY STEVVALSRLQGSLQDMLQQLDLSPGC (配列番号106)	22458.80
62	MLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALISEILAAP TGGGGSGGGSGGGSGGGSASVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHT QSVSSKQKVTGLEFIPGLHPILTLISKMDQTLAVYQQILTSMPSRNV QISNDLENLRDLLHVLAFSKSCHLPQASGLETLESLEGGVLEASGYS TEVVALSRLQGSLQDMLQQLDLSPGC (配列番号107)	22436.75

10

20

【0161】

具体的には、N末端メチオニンが存在しない上記配列の化合物、例えば、レプチン化合物については、例えば、N末端がVPIQKVまたはLAELAKで始まる化合物が考えられる。N末端メチオニンは、主として、細菌発現に適便なものとして存在する。しかし、本発明のコン

ジュゲートペプチドを真核宿主細胞（例えば酵母（例えば、ピチア属（*Pichia*））、哺乳動物、バキュロウイルス）または翻訳後N末端タンパク質分解性プロセッシングを有する他の宿主細胞で発現させて、所望のホルモンまたはABD配列の天然に存在する成熟ペプチド対応物中で見いだされるようなN末端アミノ酸を生じさせることができる。あるいは、発現および／または分泌に使用されるN末端配列は、例えばTEVなどのプロテアーゼの使用などにより、翻訳後に除去することができるものであり得る。

30

III. 設計および生産方法

【0162】

構築物の設計。本明細書に記載する改変ポリペプチドをアミノ酸レベルで設計することができる。その後、当該技術分野において公知の様々なソフトウェア製品を使用して、これらの配列を、そのヌクレオチド配列を所望の発現宿主、例えば所望の発現宿主ベースのタンパク質発現、コドン最適化、制限部位内容物について最適化するように、逆翻訳することができる。例えば、ヌクレオチド配列を大腸菌（*E. coli*）ベースのタンパク質発現についておよび制限部位内容物について最適化することができる。対象となるヌクレオチド配列に基づき、オーバーラップしているオリゴヌクレオチドを当該技術分野において公知であるような多段階PCRに付すことができる。当該技術分野において周知の条件下での多重PCR反応においてこれらのオリゴヌクレオチドを用いて、対象となるタンパク質をコードするcDNAを構築することができる。一例については、1X Amplitaq Buffer、1.3mM MgCl₂、200uM dNTP、4U Amplitaq Gold、0.2 uMの各プライマー（Amplitaq Gold、ABI）で、サイクリングパラメータ：（94C：30秒、58C：1分、72C：1分）、35サイクルである。

40

50

【0163】

当該技術分野において公知であるようなベクターライゲーションに用いるためにPCR産物の端部に制限部位を付加することができる。具体的な部位としては、cNDAがそのときpET45b発現ベクター（Novagen）の正しいリーディングフレーム内にあることができるように、NdeIおよびXhoIを挙げることができる。これらの部位を使用することにより、このベクター内にあるいずれのN末端His Tagも、翻訳開始部位がこの場合このタグの下流になるので、除去することができる。発現構築物が完成したら、例えば当該技術分野において公知であるようなT7プロモータープライマー、T7ターミネータープライマーおよび標準ABI BigDye Term v3.1プロトコルを使用するシークエンシングによって検証を行うことができる。配列情報を例えばABI 3730 DNA Analyzerから得ることができ、Vector NTI v.10ソフトウェア（Invitrogen）を使用して解析することができる。当該技術分野において公知であるように、リンカー配列を容易に切り取ったり変えたりできるようにモジュラー様式で、発現構築物を設計することができる。

10

【0164】

当該技術分野において公知のまたは本明細書に記載するプロテアーゼ認識部位を、本明細書に記載する組換え改変するポリペプチドの設計、構築、操作および生産に有用な構築物に組み込むことができる。

【0165】

一般的生産方法。本明細書に記載する改変ポリペプチドは、当該技術分野において公知である生物学的、化学的および／または組換えDNA技術を用いて調製することができる。例示的方法は、本明細書に、および米国特許第6,872,700号明細書；国際公開第2007/139941号、同第2007/140284号、同第2008/082274号および同第2009/011544号パンフレット；ならびに米国特許出願公開第2007/0238669号明細書に記載されており、前記参考文献の開示は、それら全体があらゆる目的のため出典明示により本明細書に援用されている。前記化合物の他の調製方法をここで述べる。

20

【0166】

本明細書に記載する改変ポリペプチドは、標準的な固相ペプチド合成技術、例えば、自動式または半自動式ペプチド合成装置を使用して調製することができる。典型的には、かかる技術を用いて、 α -N-カルバモイル保護アミノ酸と樹脂上の成長ペプチド鎖に結合しているアミノ酸とを、室温で、不活性溶媒（例えば、ジメチルホルムアミド、N-メチルピロリジノン、塩化メチレン、およびこれらに類するもの）中、カップリング剤（例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミド、1-ヒドロキシベンゾートリアゾール、およびこれらに類するもの）の存在下、塩基（例えば、ジイソプロピルエチルアミン、およびこれに類するもの）の存在下でカップリングさせる。得られたペプチド樹脂から、試薬（例えば、トリフルオロ酢酸、ピペリジン、およびこれらに類するもの）を使用して α -N-カルバモイル保護基を除去し、このカップリング反応を次の所望のN-保護アミノ酸で繰り返して、そのペプチド鎖に付加させる。好適なN-保護基は当該技術分野において周知であり、例えば、t-ブチルオキシカルボニル（tBoc）、フルオレニルメトキシカルボニル（Fmoc）、およびこれらに類するものがある。前記ペプチド合成装置において使用する溶媒、アミノ酸誘導体および4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂は、Applied Biosystems Inc.（カリフォルニア州フォスターシティー）から購入することができる。

30

40

【0167】

化学的合成については、固相ペプチド合成を前記改変ポリペプチドに用いることができる。一般に、固相合成は、商業規模への優れた拡張性を有する簡単なアプローチであり、および一般に、比較的長い改変ポリペプチドと適合性であるからである。固相ペプチド合成は、自動ペプチド合成装置（Model 430A、Applied Biosystems Inc.、カリフォルニア州フォスターシティー）により、NMP/HOBt（Option 1）系、およびカップリングを伴うtBocまたはFmoc化学作用（ABI 430A Peptide Synthesizer用のApplied Biosystems User's Manual、バージョン1.3B、1988年7月1日、第6節、pp. 49-70、Applied Biosystems, Inc.（カリフォルニア、フォスターシティー）参照）を用いて行うことができる。HF（-5°

50

Cから0°C、1時間）により、Boc-ペプチド樹脂を開裂することができる。水と酢酸を交互に用いて樹脂からペプチド抽出し、濾液を凍結乾燥させ得る。標準的な方法（例えば、Introduction to Cleavage Techniques、Applied Biosystems, Inc.、1990、pp. 6-12）に従って、Fmoc-ペプチド樹脂を開裂し得る。Advanced Chem Tech Synthesizer (Model MPS 350、ケンタッキー州ルイヴィル) を使用してペプチドを組み立てることもできる。

【0168】

本明細書に記載する化合物を、Sambrookら、1989、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harborなどの当該技術分野において公知の方法を用いる組換えDNA技術を用いて調製することもできる。非ペプチド化合物を当該記述分野公知の方法によって調製することができる。例えば、Bartlettら、1986、Biorg. Chem. 14: 356-377に記載されているものなどの当該技術分野において公知の方法を用いて、リン酸塩含有アミノ酸およびかかるアミノ酸を含有するペプチドを調製することができる。

10

【0169】

あるいは当該技術分野において公知の組換え技術によって前記改変ポリペプチドを生産することができる。例えば、Sambrookら、1989（同上）参照。組換え技術によって生産されたこれらの改変ポリペプチドをポリヌクレオチドから発現させることができる。コドン縮重の利用を考慮に入れて野生型cDNA、例えばヒトレプチンから、かかる改変ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（DNAおよびRNAを含む）を得ることができ、さらに所望に応じて改変して、指示された置換を組み込むことができることは、当業者には理解されるであろう。これらのポリヌクレオチド配列をコドンに組み込んで、微生物宿主におけるmRNAの転写および翻訳を助長することができる。当該技術分野において周知の方法に従って、かかる製造的配列を容易に構築することができる。例えば、国際公開第83/04053号パンフレット参照（この参考文献は、その全体があらゆる目的のため出典明示により本明細書に援用されている）。上記ポリヌクレオチドは、所望によりN末端メチオニル残基をコードすることもある。本発明において有用な非ペプチド化合物を当該技術分野公知の方法によって調製することができる。例えば、リン酸塩含有アミノ酸、およびかかるアミノ酸を含有するペプチドを、当該技術分野において公知の方法を用いて調製することができる。例えば、BartlettおよびLanden、1986、Bioorg. Chem. 14: 356-77参照。

20

【0170】

改変ポリペプチドコーディング配列を含ませ、発現させるのに様々な発現ベクター／宿主系を利用することができる。これらとしては、微生物、例えば、組換えバクテリオファージ、プラスミドもしくはコスミドDNA発現ベクターで形質転換された細菌；酵母発現ベクターで形質転換された酵母；ウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）に感染させた昆虫細胞系；ウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV；タバコモザイクウイルス、TMV）でトランスフェクトされた、もしくは細菌発現ベクター（例えば、TiまたはpBR322プラスミド）で形質転換された植物細胞系；または動物細胞系が挙げられるが、これらに限定されない。組換えタンパク質生産に有用である哺乳動物細胞としては、VERO細胞、HeLa細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞系統、COS細胞（例えば、COS-7）、WI 38、BHK、HepG2、3T3、RIN、MDCK、A549、PC12、K562および293細胞が挙げられるが、これらに限定されない。タンパク質の組換え発現の例示的プロトコルは、本明細書の中で説明しており、および／または当該技術分野において公知である。

30

40

【0171】

然るが故に、ポリヌクレオチド配列は、新規の有用なウイルスおよびプラスミドDNAベクターの生成に有用であり、新規の有用な形質転換およびトランスフェクション原核および真核宿主細胞（培養で増殖させた細菌、酵母および哺乳動物細胞を含む）の生成に有用であり、ならびに本改変ポリペプチドを発現できるかかる宿主細胞の新規の有用な培養増殖方法に有用である。本明細書における改変ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列は、改変ポリペプチドの生産不足が緩和されるか、または改変ポリペプチドの生産のレベル上昇の必要性が満たされる場合における遺伝子療法に有用であり得る。

50

【0172】

本発明はまた、本改変ポリペプチドの組換えDNA生産方法を提供する。本改変ポリペプチドをコードする核酸を含有する宿主細胞から本改変ポリペプチドを生産する方法であって、(a) 本改変ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有する宿主細胞を、前記DNA分子の発現を助長する条件下で培養する工程；および (b) 本改変ポリペプチドを得る工程を含む方法を提供する。

【0173】

宿主細胞は、原核細胞であってもよいし、または真核細胞であってもよく、細菌、哺乳動物細胞（例えば、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、サル細胞、ベビーハムスター腎臓細胞、癌細胞または他の細胞）、酵母細胞、および昆虫細胞を含む。

10

【0174】

組換えタンパク質発現のための哺乳動物宿主系もまた当業者に周知である。発現されたタンパク質をプロセッシングするか、またはタンパク質活性の提供に有用となる一定の翻訳後修飾を生じさせる特別な能力について、宿主細胞株を選択することができる。ポリペプチドのかかる修飾としては、アセチル化、カルボキシル化、グリコシル化、リン酸化、脂質化およびアシル化が挙げられるが、これらに限定されない。「プレプロ」形態のタンパク質を開裂する翻訳後プロセッシングも、正確な挿入、フォールディングおよび／または機能に重要であり得る。種々の宿主細胞、例えば、CHO、HeLa、MDCK、293、WI38およびこれらに類するものは、かかる翻訳後活性のための特異的細胞機構および特徴的なメカニズムを有するので、それらの宿主を選択して、導入された外来タンパク質の正確な修飾およびプロセッシングを確保することができる。

20

【0175】

あるいは、酵母系を利用して、本発明の改変ポリペプチドを生成することができる。本改変ポリペプチドDNAのコーディング領域をPCRによって増幅する。 α 接合因子遺伝子のヌクレオチド1-20を含有する一つのプライマーおよびこの遺伝子のヌクレオチド255-235に相補的な別のプライマーを使用するPCR反応で、酵母ゲノムDNAから、酵母プレープロ α リーダー配列をコードするDNAを増幅する（KurjanおよびHerskowitz、1982、Cell、30：933-43）。前記プレープロ α リーダーコーディング配列および改変ポリペプチドコーディング配列断片を、酵母アルコールデヒドロゲナーゼ（ADH2）プロモーターを含有するプラスミドに、該プロモーターが、該成熟改変ポリペプチドに融合したプレープロ α 因子から成る融合タンパク質の発現を命ずるようにライゲートする。RoseおよびBroach、Meth. Enz. 185：234-79、Goeddel編、Academic Press、Inc.、サンディエゴ、カリフォルニア（1990）によって教示されているように、前記ベクターは、クローニング部位の下流のADH2転写ターミネーターと、酵母「2ミクロン」複製起点と、酵母leu-2d遺伝子と、酵母REP1およびREP2遺伝子と、大腸菌 β -ラクタマーゼ遺伝子と、大腸菌複製起点とをさらに含む。前記 β -ラクタマーゼおよびleu-2d遺伝子は、それぞれ、細菌および酵母での選択に備えるものである。前記leu-2d遺伝子はまた、酵母内のプラスミドのコピー数増加を助長して、より高い発現レベルを誘導する。前記REP1およびREP2遺伝子は、プラスミドコピー数の調節に関与するタンパク質をコードする。

30

【0176】

前の段落で説明したDNA構築物を、公知の方法、例えば、酢酸リチウム処理（Steamsら、1990、Meth. Enz. 185：280-297）を用いて、酵母細胞に形質転換する。増殖培地のグルコースが枯渇すると、ADH2プロモーターが誘導される（Priceら、1987、Gene 55：287）。プレープロ α 配列により、細胞からの融合タンパク質の分泌が果たされる。付随して、酵母KEX2タンパク質により、成熟改変ポリペプチドからプレープロ配列が切断される（Bitterら、1984、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81：5330-5334）。

40

【0177】

本発明の改変ポリペプチドは、市販の発現系、例えば、Pichia Expression System（Invitrogen、カリフォルニア州サンディエゴ）をその製造業者の指示書に従って使用して、酵母、例えば、ピチア属（Pichia）において組換え発現させることもできる。この系もま

50

たプレーブローα配列に依存して分泌を命ずるが、挿入物の転写は、メタノールによる誘導時にアルコールオキシダーゼ(AOX1)プロモーターによって駆動される。例えば、細菌および哺乳動物細胞上清から該改変ポリペプチドを精製するために用いられる方法によって、その分泌された改変ポリペプチドを酵母増殖培地から精製する。

【0178】

あるいは、改変ポリペプチドをコードするDNAをバキュロウイルス発現ベクター、例えば、pVL1393(PharMingen、カリフォルニア州サンディエゴ)にクローニングすることができる。その後、この改変ポリペプチドをコードするベクターを、製造業者の指図書(PharMingen)または公知の技術に従って、例えば、sF9タンパク質不含培地で増殖させたツマヨウジクサヨトウ(*Spodoptera frugiperda*)細胞を感染させるためにおよび組換えタンパク質を生産するために使用する。そのタンパク質を、当該技術分野において公知の方法、例えばヘパリンセファロースカラム(Pharmacia、ニュージャージー州ピスカタウェイ)および逐次分子サイジングカラム(Amicon、マサチューセッツ州ベヴァリー)を用いて培地から精製および濃縮し、そして適切な溶液、例えばPBS、に再懸濁させる。SDS-PAGE解析を用いて、例えば所望の改変ポリペプチドのサイズを確認する単一のバンドを明らかにすることにより、タンパク質の特性確認をすることができ、同じく完全アミノ酸アミノ酸配列解析、例えばProton 2090 Peptide Sequencerでのエドマン分解法(Edman sequencing)、またはそのN末端配列の確認も用いることができる。

【0179】

例えば、予測される成熟改変ポリペプチドをコードするDNA配列を、所望のプロモーターと場合によりリーダー配列とを含有するプラスミドにクローニングすることができる(例えば、Betterら、1988、Science 240:1041-1043参照)。この構築物の配列を自動シーケンシングによって確認することができる。その後、そのプラスミドを大腸菌MC1061株に、該細菌のCaCl₂インキュベーションおよび熱ショック処理を利用する手順を用いて形質転換する(Sambrookら、同上)。形質転換された細菌を、カルベニシリンを補足したLB培地で増殖させ、好適な培地での増殖によって発現タンパク質の生産を誘導する。存在する場合には、リーダー配列は、成熟改変ポリペプチドの分泌に作用し、分泌中に切断されることとなる。分泌された組換え改変ポリペプチドを、本明細書に記載する方法によって細菌培養培地から精製する。

【0180】

あるいは、改変ポリペプチドを昆虫系で発現させることができる。タンパク質発現のための昆虫系は、当業者に周知である。一つのかかる系では、オートグラファ・カリフォルニカ(*Autographa californica*)核多角体病ウイルス(AcNPV)をベクターとして使用して、ツマヨウジクサヨトウ(*Spodoptera frugiperda*)細胞においてまたはトリコプルシア属(*Trichoplusia*)幼虫において外来遺伝子を発現させる。改変ポリペプチドコーディング配列をそのウイルスの非必須領域、例えばポリヘドリン遺伝子にクローニングし、ポリヘドリンプロモーターの制御下に置く。改変ポリペプチドの挿入成功により、ポリヘドリン遺伝子が不活性にされ、コートタンパク質コートを欠く組換えウイルスを生産がされることとなる。その後、それらの組換えウイルスを使用して、ツマヨウジクサヨトウ(*S. frugiperda*)細胞またはトリコプルシア属(*Trichoplusia*)幼虫を感染させ、該細胞または幼虫において本発明の改変ポリペプチドを発現させる(Smithら、1983、J. Virol. 46:584; Engelhardら、1994、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3224-3227)。

【0181】

別の例では、改変ポリペプチドをコードするDNA配列をPCRによって増幅し、適切なベクター、例えばpGEX-3X(Pharmacia、ニュージャージー州ピスカタウェイ)にクローニングし得る。pGEXベクターは、該ベクターによってコードされたグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)を含む融合タンパク質と、該ベクターのクローニング部位に挿入されたDNA断片によってコードされたタンパク質とを生産するように設計されている。例えば適切な切断部位を含むようにPCR用のプライマーを生成することができる。その後、組換え融合タンパク質を、該融合タンパク質のGST部分から切断することができる。pGEX-3

X／改変ポリペプチド構築物を大腸菌XL-1 Blue細胞（Stratagene、カリフォルニア州ラホーヤ）に形質転換し、個々の形質転換体を単離し、37℃でLB培地（カルベニシリンを補足したもの）において波長600 nmで0.4の光学密度になるまで増殖させ、その後、0.5mMのイロプロピルβ-D-チオガラクトピラノシド（Sigma Chemical Co.、ミズーリ州セントルイス）の存在下で4時間、さらにインキュベートする。個々の形質転換体からのプラスミドDNAを精製し、自動シークエンサーを使用して部分的に配列決定して、正しい配向で所望の改変ポリペプチドをコードする遺伝子挿入物の存在を確認する。

【0182】

融合タンパク質が、細菌において不溶性封入体として生産されると予測される場合、上で説明したようにまたは下記のように精製することができる。細胞を遠心分離によって回収し；0.15M NaCl、10mM Tris、pH8、1mM EDTAで洗浄し；0.1mg/mLのリゾチーム（Sigma Chemical Co.）で15分間、室温で処理する。ライゼートを超音波処理によって清澄化し、細胞屑を10分間、12,000xgでの遠心分離によって沈降させる。その融合タンパク質含有ペレットを50mM Tris、pH 8、および10mM EDTAに再懸濁させ、50%グリセリン上に重ね、30分間、6000xgで遠心分離する。Mg++およびCa++不含の標準リン酸緩衝食塩液（PBS）にそのペレットを再懸濁させる。その再懸濁ペレットを変性SDSポリアクリルアミドゲルで分画すること（Sambrookら、同上）により、融合タンパク質をさらに精製する。そのゲルを0.4M KClに浸漬してタンパク質を可視化し、そのタンパク質を切除し、SDS不含のゲル泳動用緩衝液で電気溶出する。GST／改変ポリペプチド融合タンパク質が、細菌において可溶性タンパク質として生産される場合、GST Purification Module（Pharmacia Biotech）を使用してそれを精製することができる。

【0183】

その融合タンパク質を消化に付して、GSTを成熟改変ポリペプチドから切断することができる。この消化反応物（20～40 μg 融合タンパク質、20～30単位ヒトロニン（0.5 mL PBS中の4000U/mg（Sigma））を16～48時間、室温でインキュベートし、変性SDS-PAGEゲルに負荷して反応生成物を分画する。そのゲルを0.4M KClに浸漬して、タンパク質バンドを可視化する。改変ポリペプチドの予想分子量に対応するタンパク質バンドの同定を、自動シークエンサー（Applied Biosystems Model 473A、カリフォルニア州フォスターシティ）を使用する部分アミノ酸配列解析により確認することができる。

【0184】

本発明の改変ポリペプチドの組換え発現の特に模範的な方法では、リン酸カルシウム法により、pCMVベクター（5' CMVプロモーター、3' HGHポリA配列）中の改変ポリペプチドcDNAとpSV2neo（neo耐性遺伝子を含む）とを含むプラスミドで293細胞をコトランスフェクトすることができる。一つの実施形態では、前記ベクターをトランスフェクション前にScaIで線形化するべきである。同様に、neo遺伝子が組み込まれている類似したpCMVベクターを使用する代替構築物を使用することができる。0.5mg/mL G418（ネオマイシン様抗生物質）を含む増殖培地中での10～14日間の制限希釈により、単細胞クローンから安定した細胞系統を選択する。ELISAまたはウエスタンブロットによって改変ポリペプチド発現について細胞系統をスクリーニングし、高発現細胞系統を大規模増殖用に拡大する。

【0185】

前記形質転換細胞を長期、高収率タンパク質生産のために使用することが好ましく、それ故、安定した発現が望ましい。かかる細胞を、所望の発現カセットと共に選択マーカーを含むベクターで形質転換したら、それらの細胞を強化培地中で1～2日間、放置して増殖させ、その後、その培地を選択培地に切り替える。選択に対する耐性を付与するように選択マーカーを設計し、その存在により、導入配列を首尾よく発現する細胞の増殖および回収が可能になる。安定的に形質転換された細胞の耐性集塊を、その細胞に適した組織培養技術を用いて増殖させることができる。

【0186】

組換えタンパク質生産のために形質転換された細胞を回収するために、多数の選択系を

使用することができる。かかる選択系としては、tk-、hgp^{rt}-またはap^{rt}-細胞に関して、それぞれ、HSVチミジンキナーゼ、ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼおよびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子が挙げられるが、これらに限定されない。また、メトトレキサートに対する耐性を付与するdhfr；ミコフェノール酸に対する耐性を付与するgpt；アミノグリコシド（G418）に対する耐性を付与する、またクロルスルフロニに対する耐性を付与する、neo；およびハイグロマイシンに対する耐性を付与するhygroについての選択の基礎として、代謝拮抗物質耐性を用いることができる。有用であり得るさらなる選択可能遺伝子としては、細胞にトリプトファンの代わりにインドールを利用させ得るtrpB、または細胞にヒスチジンの代わりにヒスチノールを利用させ得るhisDが挙げられる。形質転換体の同定のために視覚的指標を与えるマーカーとしては、アントシアニン、β-グルクロニダーゼおよびその基質（GUS）、ならびにルシフェラーゼおよびその基質（ルシフェリン）が挙げられる。

10

【0187】

自動ペプチド合成と組換え技術を併用して、本発明の改変ポリペプチドを生産することができる。例えば、本明細書に開示するような改変ポリペプチドの調製に利用する、レプチン、レプチン類似体、活性レプチン断片またはレプチン誘導体およびABDのいずれかまたは両方、ならびに所望によりリンカーを合成によりまたは組換えにより作製し、その後、当該技術分野において公知の方法、例えば、「ネイティブ・ケミカル・ライゲーション」、およびアミド結合を形成して親化合物を接合するその公知変法を用いて、それらを互いにライゲートすることができる。例えば、米国特許第6,326,468号明細書参照（この参考文献は、あらゆる目的のため出典明示により本明細書に援用されている）。あるいは、例えば、本発明の改変ポリペプチドは、欠失、置換、挿入およびPEG化による誘導体化（または他の部分、例えば、ポリマー、脂肪アシル鎖、C末端アミド化）をはじめとする修飾の組み合わせを含有することがある。かかる改変ポリペプチドを段階的に生産することができる。第一の段階では、欠失、置換、挿入およびこれらの任意の組み合わせの修飾を含有する中間体改変ポリペプチドを、説明したような組み換え技術によって生産することができる。次に、本明細書中で説明するような所望による精製工程の後、その中間体改変ポリペプチドを、適切なPEG化試薬（例えば、NeKtar Transforming Therapeutics、カリフォルニア州サンカルロスからのもの）での化学修飾によってPEG化して（または他の化学的誘導体化、例えば、アシル化、C末端アミド化に付して）、所望の改変ポリペプチド誘導体を生じさせる。欠失、置換、挿入、誘導体化、ならびに当該技術分野において周知のおよび本発明によって考えられる他の修飾手段から選択された修飾の組み合わせを含有する改変ポリペプチドに適用するために上記の手順を一般化し得ることは、当業者には理解されるであろう。

20

30

【0188】

C末端アミド化をグリシンアミノ酸-C末端伸長前駆体の使用により達成することができる。この前駆体は、例えば酵母（例えばピチア属（*Pichia*））においてα因子融合タンパク質として合成され、培地に分泌されることとなる。精製後、その改変ポリペプチド前駆体のC末端グリシンを、酵素的アミド化、例えばペプチジルグリシンα-アミド化モノオキシゲナーゼ（PAM）によってアミドに変換させることができる。例えば、Cooperら、1989、*Biochem. Biophys. Acta*、1014：247-258参照。タンパク質1mgあたり少なくとも約25mUの比活性を呈するほどにα-アミド化酵素が純粋である、および天然源から精製されたまたは組換えDNA技術によって生産された基質と共に使用するのに好適なほどにタンパク質分解性不純物がない、ラットからのα-アミド化酵素を含めて、酵素的アミド化方法を教示している、米国特許第6,319,685号明細書も参照のこと（この参考文献は、その全体があらゆる目的のため出典明示により本明細書に援用されている）。

40

【0189】

本明細書に記載のものを含めて、ペプチドを精製し得る当該技術分野において公知の方法はいくらでもある。一つの方法では、Waters Delta Prep 3000システムを使用してRP-HPLC（分取用および分析用）によりペプチドを精製する。C4、C8またはC18分取カラム

50

(10 μ 、2.2X25cm; Vydac、カリフォルニア州ヘスペリア) を使用してペプチドを単離し得、C4、C8またはC18分析カラム (5 μ 、0.46X25cm; Vydac) を使用して純度を判定し得る。溶媒 (A=0.1%TFA/水およびB=0.1%TFA/CH₃CN) を分析カラムに1.0mL/分の流量でおよび分取カラムに15mL/分の流量で供給することができる。アミノ酸分析をWaters Pico Tagシステムで行い、Maximaプログラムを使用して処理し得る。ペプチドを気相酸加水分解 (115°C、20~24時間) によって加水分解することができる。標準的な方法 (Cohenら、The Pico Tag Method: A Manual of Advanced Techniques for Amino Acid Analysis、pp. 11-52、Millipore Corporation、ミルフォード、マサチューセッツ (1989)) によって、加水分解物を誘導体化し、分析し得る。M-Scan, Incorporated (ペンシルバニア州ウエストチェスター) により、高速原子衝突分析を行うことができる。ヨウ化セシウムまたはヨウ化セシウム/グリセリンを使用して質量較正を行うことができる。飛行時間型検出を用いるプラズマ脱離イオン化解析をApplied Biosystems Bio-Ion 20質量分析計で行うことができる。

【0190】

改変ポリペプチド発現アッセイ。宿主細胞によるタンパク質発現レベルをアッセイするための方法を利用することができる。宿主細胞によるタンパク質発現レベルをアッセイするために有用な手順を、以下の典型的プロトコルで例示する。約25 μ LのBL21大腸菌細胞を2uLプラスミドDNA (改変ポリヌクレオチド用の発現ベクター) で形質転換する。細胞をプレーティングし、一晚、37°Cで、または室温 (RT) で48時間にわたってインキュベートすることができる。単一コロニーを選択し、それを使用して、適切な抗生物質を含有する4mL LB培地中で約6時間、スターター培養物を増殖させることができる。100uL 80%滅菌グリセリンを900uLストックに添加することによってグリセリンストックを調製することができ、その後、それを穏やかに混合し、-80°Cで保存することができる。TCP非誘導試料用に250 μ Lの試料を除去することができる。例えば、2mL分量の適切な抗生物質を含有するマジック (Magic) 培地に、5 μ Lのスターター培養物を接種し、その後、一晚 (24時間以下)、37°C、300rpmでインキュベートすることができる。当該技術分野において公知であるように、マジック培地は、自己誘導性である。あるいは、適切な抗生物質を含有する60mLのマジック培地に、250mLまたは125mLトンプソン (Thompson) フラスコ中で60 μ Lのスターター培養物を接種し、その後、それを一晚 (24時間以下)、30°C、300rpmでインキュベートすることができる。インキュベーション後、250 μ Lの培養物を各チューブから除去し、細胞を沈降させることができる。その細胞を1mLの50mM Tris pH8、150mM NaClに再懸濁させ、それに0.1容量 (100uL) のPOP培養試薬および1 μ Lのr-リゾチーム (r-リゾチーム緩衝液中、1:750希釈) を添加することができる。その混合物を十分に混合し、少なくとも10分、室温でインキュベートすることができる。その後、その調製物を10分間、14000 x Gで遠心分離することができる。上清 (可溶性画分) を除去し、確保することができる。および試料 (15 μ L + 5 μ L LDS) をゲル分析用に調製することができる。残りの封入体ペレットを、超音波処理しながら1mLの1%SDSに再懸濁させることができる。ゲル分析用の試料 (15uL + 5 μ L LDS) を調製することができる。非誘導試料については、1.0容量のPOP培養試薬および1 μ Lのr-リゾチーム (r-リゾチーム緩衝液中、1:750希釈) を添加することができる。その混合物を十分に混合し、少なくとも10分、室温でインキュベートすることができる。これらの試料は、遠心分離する必要があると思われる。その後、ゲル分析用の試料 (15 μ L + 5 μ L LDS) を調製することができる。1X MES緩衝液中の非還元NU-PAGEゲル (4~12%) を泳動させ、SimplyBlueマイクロ波プロトコルで染色することができる。当該技術分野において公知であるように脱染を一晚行うことができる。ゲル画像を保持し、解析して、タンパク質発現レベルを判定することができる。

【0191】

封入体調製。封入体画分中で見いだされる改変ポリペプチドについては、以下の手順が有益であり得る。50mL培養物それぞれについて最少100mLの溶解緩衝液に細胞ペレットを再懸濁させ得る。30mLを添加するときには10mLピペットを使用して再懸濁させ得、その後、そのチューブを追加の70mLで洗浄することができる。全プロセスを通して氷水中でチ

10

20

30

40

50

ャンバーを維持するように注意ながら、100PSI（分）でマイクロフルイダイザーにその再懸濁細胞溶液を何度も通す、例えば、4回通過させることができる。その流動化スラリーを14000xgで20分、遠心分離（例、250mL Nalgene（登録商標）ボトルを使用して、JLA 10.5、10,000rpm）することができる。その封入体ペレットをピペット先端での粉碎後、攪拌棒および攪拌プレートを用いて1時間、4℃で冷却溶解緩衝液に氷上で再懸濁させることができる。そのペレットを、再度、ピペット先端で粉碎後、4℃で1時間攪拌棒および攪拌プレートを用いて蒸留H₂Oに再懸濁させ、その後、14000xgで15分、遠心分離することができる。上清を除去して廃棄することができる。得られたものを-80℃で保存することができる。

【0192】

タンパク質精製。本明細書に記載するように、発現されたポリペプチドを単離するための非常に多数の方法が公知である。以下は一例である。封入体ペレットを、適切な容量の可溶化緩衝液（8M尿素または8Mグアニジン、50mM Tris、10mM DTT、pH7.75）に1時間室温で可溶化することができる。可溶化されたペレットを20分間、27000gで遠心分離することができる。濾過した（例えば、0.4μm）上清を室温で適切な容量のリフォールディング緩衝液（50mM Tris-HCl、1M尿素、0.8Mアルギニン、4mMシステイン、1mMシスタミン；pH8）に1滴ずつ移入することができる。その後、その得られたものを4℃で一晩以上、穏やかに混合しながら放置させ得る。試料を濃縮し、GE Healthsciences AKTAFPLC（商標）を使用して4℃環境で、1~2mL/分でゲル濾過カラム（Superdex（商標）75 26/60）にかけることができる。適切なタンパク質含有画分をSDS-PAGEによって同定し、プールし、第二のゲル濾過カラムに通すことができる。その後、プールしたタンパク質をAmiconフィルターで適切な濃度に濃縮し、当該技術分野において公知であるように、例えばEndosafe（登録商標）PTS Reader（Charles River）を使用して、エンドトキシンレベルについてアッセイすることができる。タンパク質試料がエンドトキシン基準に合格したら、それを滅菌濾過し、アリコートに分配し、品質管理アッセイにかけることができる。品質管理アッセイは、適切な質量を得るために、分析HPLC-SEC、非還元的SDS PAGEおよびRP HPLC-MSを含み得る。1x PBS（137mM塩化ナトリウム、2.7mM塩化カリウム、4.3mMリン酸二ナトリウム、1.4mMリン酸一カリウム、pH7.2）中のタンパク質を得、アリコートに分配し、-70から-80℃での貯蔵用に急速冷凍することができる。

IV. 使用方法および疾患処置方法

【0193】

適応症。様々な疾患および障害が、本明細書に記載するポリペプチド化合物および方法によって有益に処置されると考えられる。

【0194】

肥満および過体重。肥満、および過体重を含むその関連疾患は、米国および世界中で一般的かつ深刻な公衆衛生問題である。上体肥満は、2型真性糖尿病についての公知最強危険因子であり、心血管疾患についての強い危険因子である。肥満は、高血圧、アテローム性動脈硬化症、うっ血性心不全、卒中、胆嚢疾患、変形性関節症、睡眠時無呼吸症、生殖障害、例えば多嚢胞性卵巣症候群、乳癌、前立腺癌、大腸癌、および全身麻酔の合併症発生増加について認知されている危険因子である。例えば、Kopelman、2000、Nature 404：635-43参照。

【0195】

肥満は寿命を縮め、上に列挙した共存症の深刻なリスクを伴うばかりでなく、感染症、静脈瘤、黒色表皮腫、湿疹、運動不耐性、インスリン抵抗性、高血圧、高コレステロール血症、胆石症、整形外科的損傷および血栓塞栓性疾患などの障害の深刻なリスクも伴う。例えば、Rissanenら、1990、Br. Med. J.、301：835-7参照。肥満は、インスリン抵抗性症候群、または「シンドロームX」およびメタボリックシンドロームと呼ばれる容態の群の危険因子でもある。肥満および関連障害の世界規模での医療費は、莫大である。

【0196】

肥満の病因は、多因子性であると考えられる。問題は、肥満対象の場合、脂肪組織過剰

10

20

30

40

50

になるまで栄養素利用能とエネルギー消費のバランスが取れないことである。中枢神経系（CNS）は、エネルギーバランスを制御し、様々な行動的、自律神経系および内分泌系の活動を動物の代謝状態に適するように調整する。これらの活動を制御するメカニズムまたは系は、前脳（例えば、視床下部）、後脳（例えば、脳幹）および脊髄にわたって広く分布している。最終的に、これらの系からの代謝情報（すなわち、燃料利用率）および認知情報（すなわち、学習性嗜好）を統合し、欲求（食物探求）および完了行動（摂食）に携わる決定をオンにする（食事調達および開始）か、オフにする（食事停止）。視床下部は、これらのシグナルの統合および次いで脳幹への命令の発信を主として担当すると考えられる。脳幹核は、完了運動制御系の要素（例えば、咀嚼および嚥下に関与する筋肉）を制御する。それ故、これらのCNS核は、事実上、摂食行動についての「最終共通経路」を構成していると言われている。

10

【0197】

神経解剖学および薬理学的証拠により、エネルギーのシグナルと栄養恒常性のシグナルは前脳核内で統合されることが、および完了運動制御系は、脳幹核内のおそらく三叉神経運動核周囲の領域に存することが裏付けられている。視床下部と脳幹との間には広範な相互結合が存在する。様々なCNS指向型抗肥満治療薬（例えば、小分子およびペプチド）は、主に、視床下部に存する前脳基質および／または脳幹に存する後脳基質に着目したものである。

【0198】

肥満は、依然として、不完全にしか処置できない慢性の本質的に難治性の代謝障害である。したがって、対象の体重低下および／または体重維持に有用な新規な治療薬が必要とされている。かかる治療薬は、対象の健康に対して著しく有益な効果をもたらすことだろう。本明細書に開示する改変ペプチドを単独で用いる、または他の抗肥満薬（例えば、国際公開第2009/064298号パンフレットおよび米国特許出願公開第2008/0207512号明細書参照）と併用する方法および治療法により、かかる有益な効果を得ることができる。

20

【0199】

レプチン欠損症。レプチン欠損症が結果として肥満を生じさせることは証明されている。レプチン欠損症の一つの形態は、先天性レプチン欠損症であり、これは稀な遺伝子障害である。Montagueら、1997、Nature 387: 903-908参照。重症レプチン欠損症は、インスリンを分泌するβ細胞の破壊に起因する無制御インスリン欠損型真性糖尿病の結果であり得る。インスリンの欠如は、脂肪組織内でのトリグリセリドの合成および貯蔵につながり、これが体重増加を妨げ、そしてまた、レプチンは脂肪組織内で合成されるので血漿レプチンレベルを劇的に低下させると理論づけられている。これらおよび他のレプチン欠損症、ならびにかかる欠損症に起因する疾患および障害を、レプチン補充療法で、例えば毎日のレプチンまたはレプチンアゴニスト注射により、処置することができる。本明細書に記載する改変ポリペプチドは、かかる疾患および障害のより適便で有利な治療的処置をもたらすことができる。

30

【0200】

糖尿病および心血管疾患。真性糖尿病は、複合性慢性疾患として認知されており、糖尿病患者の全症例の致死率の60%から70%が心血管性合併症の結果である。糖尿病は、冠動脈性心疾患リスク等価と見なされているばかりでなく、再発性心筋梗塞、うっ血性心不全、および心血管インシデント後の死亡をはじめとする、有害事象の独立した予測因子と目されてもいる。より厳重なグルコース管理および心血管危険因子の積極的処置の採用は、冠動脈性心疾患合併症のリスクを低下させることおよび糖尿病患者間での全生存率を向上させることが期待された。しかし、糖尿病患者は、非糖尿病患者より急性心筋梗塞を2から3倍多く経験する可能性が高く、糖尿病患者は、非糖尿病患者より寿命が8から13年短い。

40

【0201】

糖尿病／急性心筋梗塞患者の高リスクの性質を理解して、不安定狭心症または非ST上昇型心筋梗塞（総称して「ACS」と呼ばれる）を有する入院患者の管理についての米国心臓

50

病学会 (American College of Cardiology) / 米国心臓協会 (American Heart Association) (「ACC/AHA」) 臨床診療ガイドラインは、最近、入院糖尿病患者は、高血糖の積極的管理を必要とする特別な集団であることを認めた。具体的には、前記ガイドラインは、入院糖尿病/ACS患者に対する血糖降下療法は、10mg/dL未満の食前の血糖値、180mg/dL 1日の最大目標値、および7%未満の退院後のヘモグロビンA1cを達成することを目標にするべきであると述べている。

【0202】

老人ACS患者の全国的サンプルにおいて、糖尿病患者の30日死亡率の増加は、入院時により高い血糖値を有する患者に対応することが実証された。「Diabetic Coronary Artery Disease & Intervention」、Coronary Therapeutics 2002、オークブルック、イリノイ、2002年9月20日参照。入院時の一過性血糖上昇ではなく持続性高血糖を重篤な有害事象に関連づける証拠が増えている。患者の高血糖および血管リスクについての理想的計量法は容易には分からないが、入院期間中の平均血糖値は、死亡率の最良の予測因子となると思われる。米国の40を超える病院からのACS患者の独立した研究において、持続性高血糖は、入院時のランダムな血糖値とは対照的に、院内死亡率のより良い予測因子となることが判明した。Acute Coronary Syndrome Summit: A State of the Art Approach、カンザスシティー、ミズーリ、2002年9月21日参照。入院時の血糖値と比較して、全入院期間にわたる血糖管理のロジスティック回帰モデルは、死亡率の最良の予測因子となった。入院期間中の死亡リスクは、120mg/dLを超えて血糖が10mg/dL増加するごとにほぼ倍増した。続発性糖尿病/ACS患者のより小さいコホートでは、入院時の血糖値の増加に伴って1年での死亡率が漸増した。病院環境では、ACC/AHAガイドラインは、入院期間中により低血糖を達成するために、積極的インスリン療法の開始を提唱している。

【0203】

レプチンは、肥満を伴うまたは伴わない、およびさらに特定すれば低血清レプチン状態にある糖尿病、特にI型糖尿病およびII型糖尿病の処置に直接的な恩恵を有し得ることが報告されている。レプチン補給は、肥満を随伴するまたはしない1および2型糖尿病の様々な動物モデルにおいて高インスリン血症、インスリン抵抗性および高血糖を軽減または予防することが報告されている。例えば、レプチンの薬理学的投与によってまたはアデノウイルス遺伝子療法に伴って生じた高いレプチン血漿中レベルは、持続する低いインスリンレベルにもかかわらず、STZ誘導糖尿病において高血糖および随伴する血漿中グルカゴン

【0204】

脂質調節疾患 (lipid regulation disease)。当該技術分野において公知であるように、リポジストロフィーは、体の脂肪組織の異常または変性状態を特徴とする。脂質異常症は、血液中の正常脂質成分の乱れである。長期インスリンレベル上昇は、脂質異常症につながり得ると考えられる。高脂血症は、血液中の上昇したまたは異常な脂質および/またはリポタンパク質レベルの存在である。視床下部性無月経は、視床下部にかかわる問題により数ヶ月わたって月経が停止する容態である。視床下部性無月経の女性におけるレプチン補充療法は、有害作用を生じさせることなく、生殖、甲状腺および成長ホルモン軸、ならびに骨形成のマーカーを向上させることが判明した。例えば、Oralら、N Engl J Med. 2004; 351: 959-962、987-997参照。脂肪性肝疾患、例えば非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) は、単純脂肪肝 (脂肪症) から、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) に、そして肝硬変 (肝臓の不可逆的、進行性瘢痕化) に及ぶ広い範囲の肝臓疾患を指す。NAFLDのすべての病期は、共通して肝臓細胞 (肝細胞) 内の脂肪蓄積 (脂肪浸潤) を有する。レプチンは、NASHをはじめとする様々な慢性肝臓疾患における炎症および線維化進行の重要なレギュレーターの一つであると考えられる。例えば、Ikejimaら、Hepatology Res. 33: 151-154参照。

【0205】

加えて、いずれの理論にも拘束されることを望まないが、2型糖尿病における相対的インスリン不足、糖毒性、および門脈経由での腹腔内脂肪からの高送達による肝臓遊離脂肪

酸負荷量増加は、脂肪肝障害の潜在的原因として関連づけられる。実際、摂食行動は、NA SHを含めて、その多くの帰結を伴う肥満体のメタボリックシンドロームを駆動する重要な要因であると仮定されている。したがって、2型糖尿病で既に実証されているように、食物摂取量減少および少量頻食を目的とした処置により、NASHを有効に処置および予防することができる。インスリン分泌および体重減少を促進する薬物ならびに胃内容排出を遅らせる薬物も耐糖能向上に有効であり、したがって、脂肪肝とその随伴高インスリン血症を改善することができる。それ故、レプチン、レプチン類似体、例えばメトレプチン、またはそれらの活性断片の使用は、この状態の治療法 (treatment modality) として十分好適であり得る。したがって、レプチン、レプチン類似体またはそれらの活性断片を含む本明細書に記載する改変ポリペプチドは、脂肪肝障害の処置に有用であり得る。

10

【0206】

アルツハイマー病。アルツハイマー病 (AD) は、当該技術分野において公知であるように、 $A\beta$ タンパク質の調節不全を含む脳内の斑および濃縮体に関連づけられている。脳脂質は、 $A\beta$ 関連病原経路に複雑に関与しており、脂質恒常性の重要なモジュレーターはレプチンであると考えられる。したがって、レプチンは、二方向性 $A\beta$ キネシス (bidirectional A-beta kinesis) を修飾して、その細胞外レベルを低減させることができる。実際、AD-トランスジェニック動物へのレプチンの長期投与が脳 $A\beta$ 負荷量を低減させることは実証されており、このことがその治療可能性の基礎をなしている。Fewlassら、2004、FAS EB J.、18:1870-1878参照。加えて、2型真性糖尿病およびADは、両方が、線維状立体配置-2型DM膵島内のアミリン、およびAD脳内の $A\beta$ を有する不溶性タンパク質凝集物を特徴と点で、疫学および生化学的特徴を共有する。いずれの理論にも拘束されることを望まないが、同様の毒性メカニズムにより2型DMおよびADを特徴し得ると考えられる。Limら、FEBS Lett.、582:2188-2194参照。

20

【0207】

メタボリックシンドロームX。メタボリックシンドロームXは、インスリン抵抗性、脂質異常症、高血圧、および脂肪組織の内臓分布を特徴とし、2型糖尿病の病態生理に枢要な役割を果たす。NASH、線維症および肝硬変との強い相関関係も判明している。したがって、本明細書に記載する改変ポリペプチドは、メタボリックシンドロームXの処置に有用であり得る。

【0208】

ハンチントン病。ハンチントン病は、常染色体優性、神経変性疾患である。この疾患の特徴としては、運動障害、認知症、精神医学的問題、および意図したものでない体重減少が挙げられる。本明細書に記載するキメラポリペプチドは、ハンチントン病の処置に有用であり得る。

30

【0209】

したがって、一つの態様において、対象の疾患または障害を処置するための方法を提供する。前記対象は、前記疾患または障害の処置を必要としている。前記疾患または障害は、リポジストロフィー、脂質異常症、高脂血症、過体重、肥満、視床下部性無月経、アルツハイマー病、レプチン欠損症、脂肪性肝疾患または糖尿病 (I型およびII型を含む) であり得る。本明細書に記載する化合物および方法によって処置することができるさらなる疾患および障害としては、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) および非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD)、メタボリックシンドロームXならびにハンチントン病が挙げられる。前記処置方法は、前記疾患または障害の処置に有効な量での本明細書に記載の改変ポリペプチドの前記対象への投与を含む。前記改変ポリペプチドは、DH1としてレプチン、レプチン断片またはレプチン類似体を含むであろう。したがって、前記改変ポリペプチドは、次の構造のうちの一つを有し得る: ABD-HD1、HD1-ABD、ABD-L1-HD1またはHD1-L1-ABD。

40

【0210】

本明細書に記載するすべての処置実施形態において、レプチンは、ヒトレプチンまたはメトレプチンであり得る。一部の実施形態において、前記レプチン類似体は、ヒトレプ

50

チンと少なくとも50%、例えば、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%の、またはさらにそれ以上の同一性を有する。一部の実施形態において、前記レプチン類似体は、マウスレプチンと少なくとも50%、例えば、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%の、またはさらにそれ以上の同一性を有する。一部の実施形態において、前記レプチン類似体は、ラットレプチンと少なくとも50%、例えば、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%の、またはさらにそれ以上の同一性を有する。一部の実施形態において、前記レプチン類似体は、カモノハシレプチンと少なくとも50%、例えば、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%の、またはさらにそれ以上の同一性を有する。一部の実施形態において、前記レプチン類似体は、アザラシレプチンと少なくとも50%、例えば、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%の、またはさらにそれ以上の同一性を有する。一部の実施形態において、前記レプチン類似体は、レプチンA100、A300またはA500である。

10

V. アッセイ

【0211】

本明細書に記載する改変ポリペプチドの生産およびアッセイ方法は、一般に、当業者にとって利用可能なものである。さらに、具体的な方法は、本明細書はもちろん、本明細書に引用する、このさらなる目的のために出典明示により本明細書に援用されている、特許公報および他の参考文献にも記載されている。

【0212】

20

食物摂取量。いずれの理論にも拘束されることを望まないが、食物摂取量は、本明細書に記載の化合物の有用性の評価に有用であると考えられる。例えば、多数の代謝病態（例えば、糖尿病、肥満）が食物摂取量と関係づけられることは公知である。したがって、初期スクリーニングを行って、本明細書に記載する化合物の投与により食物摂取量が調節される程度を判定することができ、正の初期スクリーニングは、化合物のその後の開発に有用であり得る。

【0213】

様々な食物摂取量アッセイを当業者は利用することができる。例えば、食物摂取量のいわゆる「ホームケージモデル」では、対象（例えばラット）をホームケージで飼育し、被験化合物の注射後に対象の食物摂取量を全重量と共に測定する。食物摂取量アッセイのいわゆる「摂食パターンモデル」では、対象（例えばラット）を試験前に給餌室および注射に馴化させる。被験化合物投与後、対象を直ちに給餌室に入れ、食物摂取量を時間の関数として（例えば1分間隔で）自動的に判定する。両方の試験のための餌は、標準固形飼料または当該技術分野において公知の様々な固形飼料（例えば高脂肪）のいずれかである。いわゆる「マウス食物摂取量」アッセイでは、被験化合物を食餌誘導肥満（DIO）マウスにおいて食欲抑制についてまたは体重増加量に対する効果について試験することができる。典型的なマウス食物摂取量アッセイでは、06:00に点灯する12時間:12時間の昼夜サイクルで雌NIH/Swissマウス（8~24週齢）を群居飼育する。注記のある場合を除き、水および標準ペレット状マウス固形飼料を自由に入手できる。実験1日前、おおよそ15:00時に開始してマウスを絶食させる。実験の朝、マウスを実験群に分ける。典型的な研究では、3マウス/ケージで、 $n=4$ ケージ。時間=0分で、すべてのマウスに、典型的には約10nmol/kgから75nmol/kgの範囲の量のビヒクルまたは化合物の腹腔内注射を施し、予め計量しておいた量（10~15g）の標準固形飼料を直ちに与える。様々な時点、例えば、30、60および120分の時点で餌を取り出し、計量して、消費された餌の量を判定する。例えば、Morleyら、1994、Am. J. Physiol. 267:R178-R184参照。時間=0で最初に供給した餌の重量から、例えば30、60、120、180および/または240分時点で残っている餌の重量を引くことによって、食物摂取量を計算する。有意な処置効果をANOVA ($p<0.05$) によって特定する。有意差が存在した場合、ダンネット検定 (Prism v. 2.01, GraphPad Software Inc., カリフォルニア州サンディエゴ) を用いて試験平均を対照平均と比較する。本明細書に記載するいずれの試験についても、被験化合物の投与は、注射（例えば、皮下注射、腹

30

40

50

腔内注射およびこれらに類するもの）、経口または当該技術分野において公知の他の投与方法をはじめとする任意の手段による投与であり得る。

【0214】

インビトロアッセイ。いずれの理論または作用メカニズムにも拘束されることを望まないが、インビトロ（例えば受容体）アッセイの結果と代謝性疾患および障害の処置のための薬剤の有用性との間に相関関係が存在すると考えられる。したがって、インビトロアッセイ（例えば、細胞ベースのアッセイ）は、可能性のある代謝作用薬、例えば本明細書に記載するものについてのスクリーニング戦略として有用である。様々なインビトロアッセイは、以下に説明するものを含めて、当該技術分野において公知である。

【0215】

レプチン結合アッセイ。32D OBECA細胞系統によって提示されたキメラレプチン（Hu）-EPO（Mu）受容体を発現する表面膜から¹²⁵I-組換えレプチン（ネズミ）を外すことに関する被験化合物の効力によってレプチン結合を測定することができる（J Biol Chem 1998; 273 (29) : 18365-18373）。32D OBECA細胞の採取された集密細胞培養物からのホモジネート化によって精製細胞膜を調製することができる。膜を96ウェルポリスチレンプレートにおいて¹²⁵I-rec-ネズミレプチンおよび漸増濃度の被験化合物と共に3時間、周囲温度でインキュベートすることができる。その後、0.5% PEI（ポリエチレンジイミン）で少なくとも60分間予備ブロックした96ウェルGF/Bプレート上への急速濾過によって、結合リガンド画分と非結合リガンド画分を分離することができる。その後、ガラス繊維プレートを乾燥させ、シンチラントを添加し、放射性標識ヨウ素を読み取ることができるマルチウェルシンチレーションカウンターで読み取ることによってCPMを判定することができる。

【0216】

レプチン機能アッセイ。キメラHu-レプチン/Mu-EPO受容体を異所発現する32D-Keptin細胞の被験化合物での処理後に、リン酸化STAT5（シグナル伝達兼転写活性化因子5（Signal Transducer and Activator of Transcription 5））の増加レベルを測定することができる。32D-Keptin細胞（32D-OBECA細胞と同一だが、レプチンを伴う培養で維持したもの）を一晩レプチンから引き離し、その後、96ウェルプレートにおいて被験化合物で30分間、37℃で処理し、その後、細胞抽出を行い得る。384ウェル形式のPerkin Elmer AlphaScreen（登録商標）SureFire（登録商標）pSTAT5アッセイキット（Proxiplate（商標）384 Plus）を使用して、細胞ライゼート中のpSTAT5レベルを判定することができる。ヒトレプチンで処理した細胞からの細胞ライゼート中の最大シグナルを基準にして被験化合物の有効性を判定することができる。

VI. 医薬組成物

【0217】

一つの態様において、本明細書に記載する化合物を医薬的に許容し得る賦形剤（例えば担体）と併せて含む医薬組成物を提供する。用語「医薬的に許容し得る担体」は、本明細書において用いる場合、製薬用賦形剤、例えば、活性薬剤と有害反応しない、経腸または非経口適用に好適な医薬的に生理学的に許容し得る有機または無機担体物質を指す。好適な医薬的に許容し得る担体としては、水、塩類溶液（例えば、リンガー溶液およびこれらに類するもの）、アルコール、油、ゼラチン、および炭水化物、例えばラクトース、アミロースまたはデンプン、脂肪酸エステル、ヒドロキシメチルセルロース、ならびにポリビニルピロリドンが挙げられる。かかる調製物を滅菌することができ、必要に応じて、助剤、例えば、滑沢剤、保存剤、安定剤、湿潤剤、乳化剤、浸透圧に影響を及ぼすための塩、緩衝液、着色剤および／または芳香物質、ならびに本発明の化合物と有害反応しないこれらに類するものと混合することができる。

【0218】

さらなる態様において、本明細書に記載の改変ポリペプチド化合物を医薬的に許容し得る賦形剤と併せて含む医薬組成物を提供する。一つの実施形態において、前記医薬組成物は、本明細書に記載するような経口医薬組成物である。一部の実施形態において、前記医

10

20

30

40

50

薬組成物は、長期持続性医薬組成物である。医薬組成物の投与についての文脈での用語「長期持続性」は、作用持続時間を指す。したがって、長期持続性医薬組成物を、例えば、1時間、2時間、4時間、8時間、12時間、1日、2日、3日、4日、5日、6日、1週間、2週間、3週間、1ヶ月またはさらにそれ以上の間隔で投与し得る。好ましい実施形態において、投与は、1日に1回（すなわち、「1日1回」）である。好ましい実施形態において、投与は、1週間に1回（すなわち、「週1回」）である。

A. 方法

【0219】

本明細書に記載する改変ポリペプチドを対象に単独で投与することができ、または共投与することができる。共投与は、個々にまたは併用（一つより多くの化合物）での化合物の同時または逐次的投与を含むことを意図したものである。例えば、レプチン（例えば、メトレプチン）およびある種の他の抗肥満化合物を含む併用療法で肥満を有益に処置できることが判明した。例えば、米国特許出願公開第2008/0207512号明細書参照。したがって、ABDとレプチンとを含む本明細書に記載する改変ポリペプチドは、肥満の処置に有用であり得る。あるいは、個々の改変ポリペプチドを、他の抗肥満薬、例えばエクセナチドまたはリラグルチドと共投与することができる。

10

【0220】

前記調製物を、所望される場合には、当該技術分野において公知であるような他の活性物質（例えば、代謝分解を低減させるために）または他の治療活性薬剤と共投与することもできる。

20

【0221】

アミリン。アミリンは、栄養摂取量に応じてインスリンと共分泌される、膵臓β細胞によって合成されるペプチドホルモンである。アミリンの配列は、哺乳動物種全体にわたって高度に保存され、当該技術分野において公知であるようにカルシトニン遺伝子関連ペプチド（CGRP）、カルシトニン、インテルメジンおよびアドレノメジュリンと構造類似性を有する。アミリンの血糖調節作用は、栄養刺激グルカゴン分泌の抑制により循環系中の糖出現速度を調節することおよび胃内容物排出を遅速させることによって、インスリンの血糖調節作用を補足する。インスリンで処置される糖尿病患者において、ヒトアミリンの合成、等効力類似体であるプラムリンチドは、不適切に上昇した食後グルカゴン分泌を抑制することおよび胃内容物排出を遅速させることにより、食後血糖変動幅を低減させる。ラットアミリン、ヒトアミリンおよびプラムリンチドの配列は、以下である：

30

ラットアミリン：

KCNTATCATQRLANFLVRSSNNLGPVLPPTNVGSNTY（配列番号108）；

ヒトアミリン：

KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGAILSSSTNVGSNTY（配列番号109）；

プラムリンチド：

KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGPILPPTNVGSNTY（配列番号110）。

【0222】

ダバリンチド。「AC-2307」としても公知のダバリンチドは、様々な疾患の適応症の処置に有用な強力なアミリンアゴニストである。国際公開第2006/083254号および同第2007/114838号パンフレット参照（これらの各参考文献は、それらの全体があらゆる目的のために出典明示により本明細書に援用されている）。ダバリンチドは、アミリンまたはカルシトニンおよびその類似体のN末端ループ領域、カルシトニンもしくはその類似体のαヘリックス領域の少なくとも一部分のαヘリックス領域、またはアミリンαヘリックス領域の一部分およびカルシトニンαヘリックス領域もしくはその類似物を有するαヘリックス領域と、アミリンまたはカルシトニンのC末端テール領域とを有する、キメラペプチドである。ヒトカルシトニン、サケカルシトニンおよびダバリンチドの配列は、以下である：

40

ヒトカルシトニン：

CGNLSTCMLGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAP（配列番号111）；

サケカルシトニン：

50

CSNLSTCVLGKLSQELHKLQTYPRNTGSGTP（配列番号112）；

ダバリンチド；

KCNTATCVLGRLSQELHRLQTYPRNTGSNTY（配列番号113）。

【0223】

いずれの理論にも拘束されることを望まないが、アミリンおよびダバリンチド、ならびにそれらの断片および類似体は、完全な生物学的応答を惹起するためにC末端アミド化を必要とし得ると考えられる。アミリンおよび／またはダバリンチドならびにそれらの断片および類似体を含むアミリン化合物、例えば本明細書に記載するもの、のC末端をアミド化することができることは言うまでもない。

【0224】

「アミリンアゴニスト化合物」には、天然アミリンペプチド、アミリン類似体ペプチド、およびアミリンアゴニスト活性を有する他の化合物（例えば、小分子）が含まれる。「アミリンアゴニスト化合物」は、天然源から誘導され得るか、合成され得るか、または組換えDNA技術から誘導され得る。アミリンアゴニスト化合物は、アミリンアゴニスト受容体結合活性を有し、ならびにアミノ酸（例えば、天然アミノ酸、非天然アミノ酸またはそれらの組み合わせ）、ペプチドミメティクス、化学部分、およびこれらに類するものを含み得る。当業者であれば、アミリン受容体結合アッセイを用いて、またはヒラメ筋アッセイでアミリンアゴニスト活性を測定することによって、アミリンアゴニスト化合物を認識するはずである。一実施形態において、アミリンアゴニスト化合物は、例えば米国特許第5,686,411号明細書および米国特許出願公開第2008/0176804号明細書（これらの参考文献は、それら全体があらゆる目的のために出典明示により本明細書に援用されている）に記載されているものなどのアミリン受容体結合アッセイにおいて約200nM以下、約100nM以下、または約50nM以下の IC_{50} を有するであろう。一つの実施形態において、アミリンアゴニスト化合物は、本明細書に記載する、および米国特許第5,686,411号明細書に記載されているものなどのヒラメ筋アッセイにおいて約20nM以下、約15nM以下、約10nM以下、または約5nM以下の EC_{50} を有するであろう。一つの実施形態において、前記アミリンアゴニスト化合物は、²⁵, ²⁸, ²⁹Pro-ヒトアミリンと少なくとも90%または100%の配列同一性を有する。一つの実施形態において、前記アミリンアゴニスト化合物は、アミリン（例えば、ヒトアミリン、ラットアミリン、およびこれらに類するもの）とカルシトニン（例えば、ヒトカルシトニン、サケカルシトニン、およびこれらに類するもの）のペプチドキメラである。好適な例示的アミリンアゴニスト化合物は、米国特許出願公開第2008/0274952号明細書にも記載されており、この参考文献の開示は、その全体があらゆる目的のために出典明示により本明細書に援用されている。

【0225】

「アミリン類似体」とは、本明細書において用いる場合、ラットまたはヒトまたは任意の他の種からの天然に存在する形態のアミリンと少なくとも50%の配列同一性、好ましくは少なくとも70%の配列同一性を有し、前記天然に存在する形態のアミリンから、基準アミノ酸配列の挿入、置換、伸長および／または欠失をはじめとする修飾によって誘導されるアミリンアゴニストを意味する。

【0226】

前記アミリン類似体配列は、基準アミリンと少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、90%または95%のアミノ酸配列同一性を有することができる。一つの態様において、前記類似体は、基準化合物を基準にして0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15またはさらに16のアミノ酸置換、挿入、伸長および／または欠失を有する。一つの実施形態において、前記アミリン類似体は、保存的または非保存的アミノ酸置換（非天然アミノ酸ならびにLおよびD形を含む）を含み得る。これらの類似体は、好ましくはペプチド、ペプチド誘导体またはペプチドミメティクスである。典型的なアミリン類似体は、特にアミノ酸数32～37、例えば27から45、特に28から38、およびさらには31～36のペプチドである。

【0227】

ラットおよびヒトアミリンと同一性を有するアミリン類似体としては、²⁵, ²⁸, ²⁹Pro-h-アミリン（プラムリンチド）；des-¹Lys-h-アミリン；²⁵Pro, ²⁶Val, ²⁸, ²⁹Pro-h-アミリン；¹⁸Arg, ²⁵, ²⁸Pro-h-アミリン；des-¹Lys, ¹⁸Arg, ²⁵, ²⁸Pro-h-アミリン；¹⁸Arg, ²⁵, ²⁸, ²⁹Pro-h-アミリン；des-¹Lys, ¹⁸Arg, ²⁵, ²⁸, ²⁹Pro-h-アミリン；des-¹, Lys²⁵, ²⁸, ²⁹Pro-h-アミリン；²⁵Pro, ²⁶Val, ²⁸, ²⁹Pro-h-アミリン；²⁸Pro-h-アミリン, 2, 7-シクロ-[²Asp, ⁷Lys]-h-アミリン；²⁻³⁷h-アミリン；¹Ala-h-アミリン；²Ala-h-アミリン；², ⁷Ala-h-アミリン；¹Ser-h-アミリン；²⁹Pro-h-アミリン；²⁵, ²⁸Pro-h-アミリン；des-¹Lys, ²⁵, ²⁸Pro-h-アミリン；²³Leu, ²⁵Pro, ²⁶Val, ²⁸, ²⁹Pro-h-アミリン；²³Leu²⁵Pro²⁶Val²⁸Pro-h-アミリン；des-¹Lys, ²³Leu, ²⁵Pro, ²⁶Val, ²⁸Pro-h-アミリン；¹⁸Arg, ²³Leu, ²⁵Pro, ²⁶Val, ²⁸Pro-h-アミリン；¹⁸Arg, ²³Leu, ²⁵, ²⁸, ²⁹Pro-h-アミリン；¹⁸Arg²³Leu, ²⁵, ²⁸Pro-h-アミリン；¹⁷Ile, ²³Leu, ²⁵, ²⁸, ²⁹Pro-h-アミリン；¹⁷Ile, ²⁵, ²⁸, ²⁹Pro-h-アミリン；des-¹Lys, ¹⁷Ile, ²³Leu, ²⁵, ²⁸, ²⁹Pro-h-アミリン；¹⁷Ile, ¹⁸Arg, ²³Leu-h-アミリン；¹⁷Ile, ¹⁸Arg, ²³Leu, ²⁶Val, ²⁹Pro-h-アミリン；¹⁷Ile, ¹⁸Arg, ²³Leu, ²⁵Pro, ²⁶Val, ²⁸, ²⁹Pro-h-アミリン；¹³Thr, ²¹His, ²³Leu, ²⁶Ala, ²⁸Leu, ²⁹Pro, ³¹Asp-h-アミリン；¹³Thr, ²¹His, ²³Leu, ²⁶Ala, ²⁹Pro, ³¹Asp-h-アミリン；des-¹Lys, ¹³Thr, ²¹His, ²³Leu, ²⁶Ala, ²⁸Pro, ³¹Asp-h-アミリン；¹³Thr, ¹⁸Arg, ²¹His, ²³Leu, ²⁸, ²⁹Pro, ³¹Asp-h-アミリン；および¹³Thr, ¹⁸Arg, ²¹His, ²³Leu, ²⁵Pro, ²⁶Ala, ²⁸, ²⁹Pro, ³¹Asp-h-アミリンが挙げられる。

10

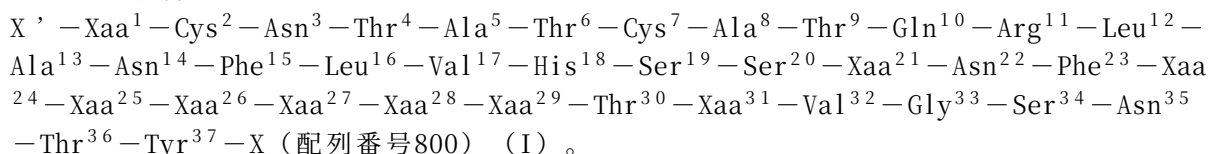
20

【0228】

好適な例示的アミリンアゴニスト化合物は、PCT特許公開国際公開第2010/085700号パンフレットにも記載されている。

【0229】

アミリン類似体は、下記の式（I）の残基1-37のアミノ酸配列を含み、式（I）に示すアミノ酸の25%以下が欠失していることがあり、または異なるアミノ酸で置換されていることがあり得る：



30

式（I）中、X' は、水素、N末端キャッピング基、または持続時間向上部分へのリンカーである。Xaa¹は、Lysまたは結合であり、Xaa²¹は、Lys、CysまたはAsnであり、Xaa²⁴は、Lys、CysまたはGlyであり、Xaa²⁵は、Lys、CysまたはProであり、Xaa²⁶は、Lys、CysまたはIleであり、Xaa²⁷は、Lys、CysまたはLeuであり、Xaa²⁸は、Lys、CysまたはProであり、Xaa²⁹は、Lys、CysまたはProであり、およびXaa³¹は、Lys、CysまたはAsnである。さらに式（I）に関して、変数Xは、C末端官能基（例えば、C末端キャップ）を表す。Xは、置換もしくは非置換アミノ、置換もしくは非置換アルキルアミノ、置換もしくは非置換ジアルキルアミノ、置換もしくは非置換シクロアルキルアミノ、置換もしくは非置換アリールアミノ、置換もしくは非置換アラールキルアミノ、置換もしくは非置換アルキルオキシ、置換もしくは非置換アリールオキシ、置換もしくは非置換アラールキルオキシ、またはヒドロキシルである。式（I）の残基1-37の配列を有するポリペプチド成分のC末端が官能基Xでキャップされている場合には、Xは、好ましくはアミンであり、その結果、C末端アミドを形成する。一部の実施形態において、式（I）によるポリペプチド成分の中で、式（I）の残基1-37のアミノ酸の5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%またはさらに50%以下は、欠失または置換されている。一部の態様において、前記アミリン類似体成分は、式（I）に示すアミノ酸配列を基準にして0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15またはさらに16のアミノ酸置換を有する。一部の実施形態において、前記アミリン類似体は、式（I）によるアミノ酸配列の残基1-37に対して定義された配列同一性を有する配列を有する。一部の実施形態において、本明細書に記載するアミリン類

40

50

似体 (analog) と式 (I) の残基1-37の間の配列同一性は、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%またはさらにそれ以上である。一部の実施形態において、式 (I) の残基1-37で示すアミノ酸の50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%またはさらにそれ以下が欠失していることがあり、または異なるアミノ酸で置換されていることがある。一部の実施形態において、配列同一性は、75%~100%の範囲内である。一部の実施形態において、配列同一性は、75%~90%の範囲内である。一部の実施形態において、配列同一性は、80%~90%の範囲内である。一部の実施形態において、配列同一性は、少なくとも75%である。一部の実施形態において、前記アミリン類似体は、式 (I) の残基1-37の配列を有する。

【0230】

10

一部の実施形態において、式 (I) のものを含むアミリン類似体は、アミリンポリペプチドコンジュゲートを形成するために一つ以上の持続時間向上部分が、所望によりリンカーによって、連結されるポリペプチド成分の基礎を成す。したがって、前記ポリペプチド成分は、テンプレート (「ポリペプチドテンプレート」) としての役割を果たし、それに一つ以上の持続時間向上部分を、好ましくは共有結合によって結合させる。前記ポリペプチド成分への持続時間向上部分の連結は、本明細書に記載のリンカーによる連結であり得る。あるいは、前記ポリペプチド成分への持続時間向上部分の連結は、直接共有結合による連結であり得る。前記持続時間向上部分は、本明細書に記載の水溶性ポリマーであり得る。一部の実施形態では、複数の持続時間向上部分を前記ポリペプチド成分に結合させ、この場合、各持続時間向上部分への各リンカーは、本明細書に記載するリンカーから独立して選択される。

20

【0231】

本明細書に記載するポリペプチド成分として有用なアミリン類似体としては、下の表3に提供する式 (I) の残基1-37で示される化合物が挙げられるが、これらに限定されない。相反する指示がない限り、明確に提供された配列を有するペプチドを含めて、本明細書に記載するすべてのペプチドは、遊離カルボキシレートおよびアミド化形態で考えられる。

【0232】

【表 3】

表3. 本明細書に記載する化合物に有用な成分ポリペプチド。

化合物	解説 (配列)
101	KCNTATCATQRLANFLVRSSNNLGPVLPPTNVGSNTY-NH ₂ (配列番号110)
102	CNTATCATQRLANFLVRSSNNLGPVLPPTNVGSNTY-NH ₂ (配列番号801) ([desLys ¹] -化合物101)
103	KCNTATCATQRLANFLVRSSKNLGPVLPPTNVGSNTY-NH ₂ (配列番号802)
104	CNTATCATQRLANFLVRSSKNLGPVLPPTNVGSNTY-NH ₂ (配列番号803) ([desLys ¹] -化合物103)
105	KCNTATCATQRLANFLVRSSNNLGPKLPTNVGSNTY-NH ₂ (配列番号804)
106	CNTATCATQRLANFLVRSSNNLGPKLPTNVGSNTY-NH ₂ (配列番号805) ([desLys ¹] -化合物105)
107	KCNTATCATQRLANFLVRSSNNLGPVLPPTKVGSNTY-NH ₂ (配列番号806)
108	CNTATCATQRLANFLVRSSNNLGPVLPPTKVGSNTY-NH ₂ (配列番号807) ([desLys ¹] -化合物107)
109	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGPILPPTNVGSNTY-NH ₂ (配列番号808)
110	CNTATCATQRLANFLVHSSNNFGPILPPTNVGSNTY-NH ₂ (配列番号809) ([desLys ¹] -化合物109)
111	CNTATCATQRLANFLVHSSKNFGPILPPTNVGSNTY-NH ₂ (配列番号810)
112	CNTATCATQRLANFLVHSSNNFGPKLPPTNVGSNTY-NH ₂ (配列番号811)
113	CNTATCATQRLANFLVHSSNNFGPILPPTKVGSNTY-NH ₂ (配列番号812)
114	CNTATCATQRLANFLVHSSNNFKPILPPTNVGSNTY-NH ₂ (配列番号813)
115	CNTATCATQRLANFLVHSSNNFGKILPPTNVGSNTY-NH ₂ (配列番号814)
116	CNTATCATQRLANFLVHSSNNFGPIKPPTNVGSNTY-NH _{2x} (配列番号815)
117	CNTATCATQRLANFLVHSSNNFGPILKPTNVGSNTY-NH ₂ (配列番号816)
118	CNTATCATQRLANFLVHSSNNFGPILPKTNVGSNTY-NH ₂ (配列番号817)

【0233】

本明細書に記載するアミリンポリペプチドコンジュゲート中のポリペプチド成分への持続時間向上部分の結合の文脈での用語「リンカー」およびこれに類するものは、結合に利用できる原子価を有するポリペプチド成分へ、および結合に利用できる原子価を有する持続時間向上部分へ順次共有結合される二価の化学種（-L-）を意味する。前記ポリペプチド成分上の利用可能な結合部位は、適便には側鎖残基（例えば、リシン、システイン、

10

20

30

40

50

アスパラギン酸、およびそれらの同族体)である。一部の実施形態において、前記ポリペプチド成分上の利用可能な結合部位は、リシンまたはシステイン残基の側鎖である。一部の実施形態において、前記ポリペプチド成分上の利用可能な結合部位は、N末端アミンである。一部の実施形態において、前記ポリペプチド成分上の利用可能な結合部位は、C末端カルボキシルである。一部の実施形態において、前記ポリペプチド成分上の利用可能な結合部位は、その主鎖原子である。本明細書において用いる場合、用語「連結しているアミノ酸残基」は、持続時間向上部分が、所望によりリンカーによって結合されてもよい、式(I)の残基1-37の中のアミノ酸を意味する。

【0234】

一部の実施形態において、ポリペプチド成分と持続時間向上成分を共有結合で連結するリンカーを有する化合物を提供する。前記リンカーは、所望によるものである；すなわち、いずれのリンカーも単に結合であり得る。一部の実施形態では、前記リンカーを前記ポリペプチド成分の側鎖に結合させる。一部の実施形態では、前記リンカーを前記ポリペプチド成分の主鎖原子に結合させる。

【0235】

もう一つの態様において、配列番号110を有するプラムリンチドの誘導体またはその類似体であるアミリンポリペプチドコンジュゲートであって、位置1のアミノ酸残基が存在せず(すなわち、des-Lys¹)、位置2から37のアミノ酸残基がリシン残基またはシステイン残基で置換されており、前記リシン残基またはシステイン残基が、所望によりリンカーによって、ポリエチレングリコールポリマーに連結されているものである(この場合のアミノ酸ナンバリングは、配列番号110におけるアミノ酸番号に準拠する)アミリンポリペプチドコンジュゲートを提供する。

【0236】

もう一つの態様において、本発明は、配列番号110を有するプラムリンチドの誘導体またはその類似体であるアミリンポリペプチドコンジュゲートであって、位置1のアミノ酸残基が存在せず(すなわち、des-Lys¹)、位置2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、31、32、33、34、35、36または37のうちのいずれか一つのアミノ酸残基がリシン残基で置換されており、前記リシン残基が、所望によりリンカーによって、ポリエチレングリコールポリマーに連結されているものであるアミリンポリペプチドコンジュゲートに関する。

【0237】

もう一つの態様において、本発明は、配列番号110を有するプラムリンチドの誘導体またはその類似体であるアミリンポリペプチドコンジュゲートであって、位置1のアミノ酸残基が存在せず(すなわち、des-Lys¹)、位置21、24-29、または31のうちのいずれか一つのアミノ酸残基がリシン残基で置換されており、前記リシン残基が、所望によりリンカーによって、ポリエチレングリコールポリマーに連結されているものであるアミリンポリペプチドコンジュゲートに関する。

【0238】

もう一つの態様において、本発明は、配列番号110を有するプラムリンチドの誘導体またはその類似体であるアミリンポリペプチドコンジュゲートであって、位置1のアミノ酸残基が存在せず(すなわち、des-Lys¹)、位置21のアミノ酸残基がリシン残基で置換されており、前記リシン残基が、所望によりリンカーによって、ポリエチレングリコールポリマーに連結されているものであるアミリンポリペプチドコンジュゲートに関する。

【0239】

もう一つの態様において、本発明は、配列番号110を有するプラムリンチドの誘導体またはその類似体であるアミリンポリペプチドコンジュゲートであって、位置1のアミノ酸残基が存在せず(すなわち、des-Lys¹)、位置24のアミノ酸残基がリシン残基で置換されており、前記リシン残基が、所望によりリンカーによって、ポリエチレングリコールポリマーに連結されているものであるアミリンポリペプチドコンジュゲートに関する。

【0240】

もう一つの態様において、本発明は、配列番号110を有するプラムリンチドの誘導体またはその類似体であるアミリンポリペプチドコンジュゲートであって、位置1のアミノ酸残基が存在せず（すなわち、des-Lys¹）、位置25のアミノ酸残基がリシン残基で置換されており、前記リシン残基が、所望によりリンカーによって、ポリエチレングリコールポリマーに連結されているものであるアミリンポリペプチドコンジュゲートに関する。

【0241】

もう一つの態様において、本発明は、配列番号110を有するプラムリンチドの誘導体またはその類似体であるアミリンポリペプチドコンジュゲートであって、位置1のアミノ酸残基が存在せず（すなわち、des-Lys¹）、位置26のアミノ酸残基がリシン残基で置換されており、前記リシン残基が、所望によりリンカーによって、ポリエチレングリコールポリマーに連結されているものであるアミリンポリペプチドコンジュゲートに関する。

10

【0242】

もう一つの態様において、本発明は、配列番号110を有するプラムリンチドの誘導体またはその類似体であるアミリンポリペプチドコンジュゲートであって、位置1のアミノ酸残基が存在せず（すなわち、des-Lys¹）、位置27のアミノ酸残基がリシン残基で置換されており、前記リシン残基が、所望によりリンカーによって、ポリエチレングリコールポリマーに連結されているものであるアミリンポリペプチドコンジュゲートに関する。

【0243】

もう一つの態様において、本発明は、配列番号110を有するプラムリンチドの誘導体またはその類似体であるアミリンポリペプチドコンジュゲートであって、位置1のアミノ酸残基が存在せず（すなわち、des-Lys¹）、位置28のアミノ酸残基がリシン残基で置換されており、前記リシン残基が、所望によりリンカーによって、ポリエチレングリコールポリマーに連結されているものであるアミリンポリペプチドコンジュゲートに関する。

20

【0244】

もう一つの態様において、本発明は、配列番号110を有するプラムリンチドの誘導体またはその類似体であるアミリンポリペプチドコンジュゲートであって、位置1のアミノ酸残基が存在せず（すなわち、des-Lys¹）、位置29のアミノ酸残基がリシン残基で置換されており、前記リシン残基が、所望によりリンカーによって、ポリエチレングリコールポリマーに連結されているものであるアミリンポリペプチドコンジュゲートに関する。

【0245】

もう一つの態様において、本発明は、配列番号110を有するプラムリンチドの誘導体またはその類似体であるアミリンポリペプチドコンジュゲートであって、位置1のアミノ酸残基が存在せず（すなわち、des-Lys¹）、位置31のアミノ酸残基がリシン残基で置換されており、前記リシン残基が、所望によりリンカーによって、ポリエチレングリコールポリマーに連結されているものであるアミリンポリペプチドコンジュゲートに関する。

30

【0246】

一部の実施形態において、前記持続時間向上部分は、水溶性ポリマーである。「水溶性ポリマー」は、例えば、当該技術分野において公知であるような温度、イオン濃度およびこれらに類するものなどの生理条件下で、本明細書に記載する方法に有用であるために十分に水に可溶であるポリマーを意味する。水溶性ポリマーは、かかる水溶性ポリマーが結合しているペプチドまたは他の生体分子の溶解度を増加させることができる。実際、かかる結合は、投与したタンパク質の循環寿命、水溶性および／または抗原性をインビボで向上させるための手段として提案されている。例えば、米国特許第4,179,337号明細書；米国特許出願公開第2008/0032408号明細書参照。多くの異なる水溶性ポリマーおよび結合化学成分、例えば、ポリエチレングリコール、エチレングリコール／プロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ-1, 3-ジオキソラン、ポリ-1, 3, 6-トリオキサン、エチレン／無水マレイン酸コポリマー、ポリアミノ酸（ホモポリマーまたはランダムコポリマーのいずれか）、およびこれらに類するものが、この目的に用いられている。

40

【0247】

50

一部の実施形態において、連結される持続時間向上部分は、ポリエチレングリコールを含む。ポリエチレングリコール（「PEG」）は、治療使用可能なポリペプチドを得るための研究で使用されている。例えば、Zalipsky, S., 1995, *Bioconjugate Chemistry*, 6: 150-165; Mehvar, R., 2000, *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, 3: 125-136参照。当業者には理解されるように、PEG主鎖 $[(CH_2CH_2-O)]_n$, n : 繰り返しモノマーの数] は、可撓性であり、両親媒性である。いずれの理論または作用メカニズムにも拘束されることを望まないが、長い鎖様のPEG分子または部分は、水性媒質中にあるとき重度に水和され、高速運動していると考えられる。この高速運動は、PEGから大容積を一掃させると考えられ、他の分子の接近および干渉を防止する。結果として、別の化学物質（例えばペプチド）に結合させたとき、PEGポリマー鎖は、かかる化学物質を免疫応答および他のクリアランスメカニズムから保護することができる。結果として、PEG化は、薬物動態の最適化、バイオアベイラビリティの増加、ならびに免疫原性および投薬頻度の減少により、向上した薬効および薬物安全性をもたらすことができる。「PEG化」は、通例の意味で、PEG部分と別の化合物のコンジュゲーションを指す。例えば、PEGの結合は、タンパク質分解からタンパク質を保護することが証明されている。例えば、Blomhoff, H. K.ら、1983, *Biochim Biophys Acta*, 757: 202-208参照。相反する明確な指示がない限り、用語「PEG」、「ポリエチレングリコールポリマー」およびこれらに類するものは、ポリエチレングリコールポリマーおよびその誘導体（メトキシ-PEG (mPEG) を含む）を指す。

10

【0248】

タンパク質上で見いだされる反応性基にポリマー部分、例えばPEGおよび関連ポリマーを結合させるために様々な手段が用いられている。例えば、米国特許第4,179,337号および同第4,002,531号明細書; Abuchowskiら、1981, 「Enzymes as Drugs」、J. S. HolcbergおよびJ. Roberts（編集）、pp. 367-383; Zalipsky, S., 1995, *Bioconjugate Chemistry*, 6: 150-165参照。タンパク質を修飾するためのPEGおよび他のポリマーの使用も論じられている。例えば、Cheng, T.-L.ら、1999m, *Bioconjugate Chem.*, 10: 520-528; Belcheva, N.ら、1999, *Bioconjugate Chem.*, 10: 932-937; Bettinger, T.ら、1998, *Bioconjugate Chem.*, 9: 842-846; Huang, S.-Y.ら、1998, *Bioconjugate Chem.*, 9: 612-617; Xu, B.ら、1998, *Langmuir*, 13: 2447-2456; Schwarz, J. B.ら、1999, *J. Amer. Chem. Soc.*, 121: 2662-2673; Reuter, J. D.ら、1999, *Bioconjugate Chem.*, 10: 271-278; Chan, T.-H.ら、1997, *J. Org. Chem.*, 62: 3500-3504参照。タンパク質中の典型的な結合部位としては、第一級アミノ基、例えば、リシン残基上またはN末端のもの; チオール基、例えば、システイン側鎖上のもの; およびカルボキシル基、例えば、グルタメートもしくはアスパルテート残基上またはC末端のものが挙げられる。一般的な結合部位は、糖たんぱく質の糖残基、システインへ、または標的ポリペプチドのN末端およびリシンへのものである。用語「PEG化」およびこれに類するものは、ポリペプチドまたは他の生体分子へのポリエチレングリコールの、所望により本明細書に記載するようなおよび/または当該技術分野において公知であるようなリンカーによる、共有結合を指す。

20

30

【0249】

一部の実施形態において、本明細書に記載するアミリンポリペプチドコンジュゲート中のPEG部分は、特定範囲内の公称分子量を有する。当該技術分野において通例であるように、PEG部分のサイズは、典型的にキロダルトン (kD) で提供される公称分子量への言及により示される。分子量は、数、重量、粘度および「Z」平均分子量を含め、当該技術分野において公知の様々な方法で計算される。PEGなどのポリマーが公称平均値付近の分子量分布として存在することは言うまでもない。

40

【0250】

PEGの分子量についての用語法具体例としての用語「mPEG40KD」は、40キロダルトンの公称分子量を有するメトキシポリエチレングリコールポリマーを指す。他の分子量のPEGへの言及は、この規則に従う。一部の実施形態において、前記PEG部分は、10-100KD、20-80KD、20-60KD、または20-40KDの範囲の公称分子量を有する。一部の実施形態において、前記PEG部分は、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80

50

、85、90、95またはさらに100KDの公称分子量を有する。好ましくは、前記PEG部分は、20、25、30、40、60または80KDの分子量を有する。

【0251】

ポリペプチドの誘導体化に有用なPEG分子は、典型的には、当該技術分野において公知であるような直鎖状、分岐およびWarwick（すなわち、PolyPEG（登録商標））クラスに分類される。相反する明確な指示がない限り、本明細書に記載するPEG部分は、直鎖状PEGである。さらに、用語「2アーム分岐」、「Y形」およびこれらに類するものは、当該技術分野において公知であるような分岐PEG部分を指す。「櫛」または「櫛型」PEGとしても公知の、PEGの文脈での用語「Warwick」は、当該技術分野において公知であるような、主鎖、典型的にはポリ（メタクリレート）に結合されている様々なマルチアームPEGを指す。本明細書に提供する表中で用いている規則を含めて、命名法に関しては、相反する指示がなければPEG部分はペプチドの主鎖に結合されている。例えば、化合物119は、化合物101のN末端窒素へのmPEG40KDのコンジュゲーションの結果である。同様に、化合物120は、化合物102のN末端窒素へのmPEG40KDのコンジュゲーションの結果である。アミノ酸についての標準一文字略号を用いる場合があり、標準三文字略号を用いる場合もある。例えば、化合物124は、化合物109の位置26の残基がリシンに置換されており、リシン26のペンダントアミン官能基（すなわち、K²⁶）がPEG40DK部分とコンジュゲートしている、化合物110の類似体である。例示的化合物を下の表4に提供する。

【0252】

【表4】

表4. PEG化化合物

化合物	解説
119	mPEG40KD—化合物101
120	mPEG40KD—化合物102
121	[K ²¹ (mPEG40KD)] —化合物103
122	[K ²¹ (mPEG40KD)] —化合物104
123	[K ²⁶ (mPEG40KD)] —化合物105
124	[K ²⁶ (mPEG40KD)] —化合物106
125	[K ³¹ (mPEG40KD)] —化合物107
126	[K ³¹ (mPEG40KD)] —化合物108
127	[K ²⁶ (Y形mPEG40KD)] —化合物105
128	[K ²¹ (mPEG40KD)] —化合物111
129	[K ²⁶ (mPEG40KD)] —化合物112
130	[K ³¹ (mPEG40KD)] —化合物113
131	[K ²⁶ (Y形mPEG40KD)] —化合物112
132	[K ²⁴ (mPEG40KD)] —化合物114
133	[K ²⁵ (mPEG40KD)] —化合物115
134	[K ²⁷ (mPEG40KD)] —化合物116
135	[K ²⁸ (mPEG40KD)] —化合物117
136	[K ²⁹ (mPEG40KD)] —化合物118

【0253】

化学部分が結合されているアミリンおよびアミリン類似体は、アミリン誘導体である。アミリン誘導体は、化学修飾がそのアミノ酸側基、α-炭素原子、末端アミノ基または末端カルボン酸基の一つ以上から成るアミリンを構成し得る。化学修飾としては、一つ以上の化学部分を結合すること、新たな結合を作ること、および一つ以上の化学部分を除去することが挙げられるが、これらに限定されない。アミノ酸側基の修飾としては、限定ではないが、アルキル化、アシル化、エステル形成、アミド形成、マレイミドカップリング、リシンε-アミノ基のアシル化、アルギニン、ヒスチジンまたはリシンのN-アルキル化、グルタミン酸またはアスパラギン酸カルボン酸基 (glutamic or aspartic carboxylic

acid groups) のアルキル化、およびグルタミンまたはアスパラギンの脱アミド化が挙げられる。末端アミノの修飾としては、限定ではないが、脱アミノ、N-低級アルキル、N-ジー低級アルキル、およびN-アシル修飾が挙げられる。末端アミノの修飾としては、限定ではないが、脱アミノ、N-低級アルキル、N-ジー低級アルキル、およびN-アシル修飾、例えば、アルキルアシル、分岐アルキルアシル、アルキルアリールアシルが挙げられる。末端カルボキシ基の修飾としては、限定ではないが、アミド、低級アルキルアミド、ジアルキルアミド、アリールアミド、アルキルアリールアミドおよび低級アルキルエステル修飾が挙げられる。低級アルキルは、 C_1-C_4 アルキルである。さらに、一つ以上の側基または末端基を、通常技能の合成化学者に公知の保護基によって保護することができる。アミノ酸の α -炭素をモノまたはジメチル化することもできる。

10

【0254】

アミリン誘導体には、ポリアミノ酸、例えばポリ-his、ポリ-arg、ポリ-lysおよびポリ-alaの付加によって、または短鎖アルキルおよび拘束アルキル（例えば、分岐、環式、縮合、アダマンチル）をはじめとする小分子置換基、ならびに芳香族基の付加によって、一つ以上の水溶性ポリマー分子、例えば、上で説明したようなポリエチレングリコール（「PEG」）、または様々な鎖長の脂肪酸鎖（例えば、ステアシル、パルミトイル、オクタノイル）にコンジュゲートされているアミリンが含まれる。一部の実施形態において、前記水溶性ポリマー分子は、約500ダルトンから約60,000ダルトンの範囲の分子量を有するであろう。抗肥満薬として本発明の改変ポリペプチドとの併用に好適なアミリン誘導体については、PCT特許公開・国際公開第2007/104789号、同第2009/034119号および同第2010/046357号パンフレットを参照のこと。

20

【0255】

かかるポリマー・コンジュゲーションを、本明細書に開示するようなアミリンまたはアミリン類似体の配列内のアミノ酸残基のN末端またはC末端または側鎖において単独で行うことができる。あるいは、かかるアミリンまたはアミリン類似体のアミノ酸配列に沿って多数の誘導体化部位が存在することもあり得る。リシン、アスパラギン酸、グルタミン酸またはシステインの一つ以上のアミノ酸の置換により、追加の誘導体化部位を得ることができる。一部の実施形態において、アミリンまたはアミリン類似体を一つ、二つまたは三つのポリマー分子にコンジュゲートさせることができる。

【0256】

一部の実施形態では、水溶性ポリマー分子をアミノ、カルボキシルまたはチオール基に連結させることができ、およブリシン、アスパラギン酸、グルタミン酸またはシステインのNもしくはC末端によりまたは側鎖で連結させることができる。あるいは、水溶性ポリマー分子をジアミンおよびジカルボン酸基と連結させることができる。一部の実施形態では、アミリンまたはアミリン類似体をリシンアミノ酸上の ϵ アミノ基によって一つ、二つまたは三つのPEG分子にコンジュゲートさせる。

30

【0257】

驚くべきことに、本発明の改変ポリペプチドは、ある種の他の抗肥満化合物と併用で投与したとき、有益な相乗的抗肥満効果を中等度肥満（30以上のBMI）と重度肥満（35以上のBMI）の両方にもたらすことを発見した。以前に米国特許出願公開第2008/0207512号に記載されているように、肥満対象にはレプチン抵抗性状態が存在することが分かっている。例えば、Tenenbaum, D., HHMI Bulletin, pp. 25-27 (2003年3月) ; Chicurel, M., Nature, 第404巻, pp. 538-540 (2000) ; Scarpacciaら, Diabetologia, 第48巻, pp. 1075-1083 (2005) ; およびBaysら, Obesity Research, 第12巻, (8), pp. 1197-1211 (2004) も参照のこと。少なくとも一つには肥満対象における異常に高い血清レプチンレベルの存在を特徴とするこのレプチン抵抗性により、これらの対象は、内的に投与されようと、または外的に投与されようと、レプチンに対して有効に応答することができなくなる。中等度肥満対象の場合はレプチン（例えばメトレプチン）とある種の他の抗肥満化合物を含む併用療法でこのレプチン抵抗性を克服できることが以前に判明している。例えば、米国特許出願公開第2008/0207512号明細書参照。重度肥満、高BMI対象の場合は、おそらく

40

50

重度のレプチン抵抗性のため、このレプチン併用療法の相乗的抗肥満効果がないことが、さらに判明している。本発明者らは、驚くべきことにある種の他の抗肥満化合物と併用で投与したとき、本発明の改変化合物が重度のレプチン抵抗性でさえ克服できることを発見した。したがって、本発明は、高BMI対象を含めて、対象の肥満ならびに肥満関連容態、障害および疾患を処置する方法であって、一方の抗肥満薬が本発明の改変ポリペプチドであり、もう一方の抗肥満薬がアミリン、アミリン類似体、アミリンアゴニストまたはアミリン誘導体（すなわち、アミリン剤）である、少なくとも二つの異なる抗肥満薬の投与による方法も提供する。

【0258】

ある実施形態において、本発明は、処置を必要とする対象の肥満を処置する方法であって、アミリン、アミリン類似体、アミリンアゴニストまたはアミリン誘導体から選択された第二の抗肥満薬と併用での本発明の改変ポリペプチドから選択された第一の抗肥満薬の投与を含み、これらの薬剤の投与が、いずれかの薬剤単独での投与と比較して相乗的効果を生じさせる結果となる方法を提供する。

10

【0259】

一つの態様において、本発明の方法は、投与された薬剤間の相乗的抗肥満効果をもたらす。したがって、ある実施形態において、抗肥満薬の組み合わせの投与は、抗肥満薬の単独での投与（単剤療法）の結果の組み合わせより大きい効果、例えば、栄養素利用能の低減、体重の低下、食物摂取量の低減、代謝の増加を生じさせる結果となる。

【0260】

20

「低減（された）栄養素利用能」は、身体が利用できる栄養素を身体が脂肪として蓄えさせる任意の手段を含むことを意図したものである。言い換えると、栄養素利用能を低減させることは、食欲を低下させること、満腹度を増すこと、食物選択／味覚嫌悪に影響を及ぼすこと、代謝を増すこと、および／または食物吸収を減少もしくは阻害することを含む（しかしこれらに限定されない）手段によるものであり得る。影響を受け得る例示的メカニズムとしては、胃内容排出遅延または腸内での食物の吸収減少が挙げられる。

【0261】

本明細書において用いる場合、「それ（処置など）を必要とする対象」は、過体重である対象、肥満である対象、または体重減少を望んでいる対象を含む。肥満対象は、中等度肥満、低BMI集団と、重度肥満、高BMI集団の両方を含む。加えて、インスリン抵抗性である、グルコース不耐性である、または真性糖尿病のいずれかの形態（例えば、1型、2型もしくは妊娠糖尿病）を有する対象は、本発明の方法の恩恵を受けることができる。

30

【0262】

「代謝率」とは、単位時間あたりの発散される／消費されるエネルギーの量を意味する。単位時間あたりの代謝は、食物消費量、熱として放出されたエネルギー、または代謝プロセスで使用された酸素によって推定することができる。一般に、体重減少を望む場合、より高い代謝率を有するほうが望ましい。例えば、高い代謝率を有する人は、活動を行うために、その活動について低い代謝率を有する人より多くのエネルギーを消費（例えば、身体が多くのカロリーを燃やす）できるはずである。

【0263】

40

本明細書において用いる場合、「除脂肪量」または「除脂肪体重」は、筋肉および骨を指す。除脂肪体重は、必ずしも無脂肪量を示すとは限らない。除脂肪体重は、中枢神経系（脳および脊髄）、骨髄および内臓内に小率（大体3%）の脂肪を含有する。除脂肪体重は、密度によって測定される。脂肪量および除脂肪量を測定する方法としては、水中秤量法、空気置換プレチスモグラフ、X線、DEXAスキャン、MRIおよびCTスキャンが挙げられるが、これらに限定されない。ある実施形態では、当該技術分野において公知であるような水中秤量法を用いて脂肪量および除脂肪量を測定する。

【0264】

「脂肪分布」は、体内の脂肪沈着物の位置を意味する。かかる脂肪沈着位置は、例えば、皮下、内臓および異所脂肪貯留場所を含む。

50

【0265】

「皮下脂肪」とは、皮膚表面の直下の脂質沈着物を意味する。皮下脂肪の測定に利用できる任意の方法を用いて対象の皮下脂肪の量を測定することができる。皮下脂肪の測定方法は、当該技術分野において公知であり、例えば米国特許第6,530,886号明細書に記載されているものである（この参考文献全体が出典明示により本明細書に援用されている）。

【0266】

「内臓脂肪」とは、腹腔内脂肪組織としての脂肪沈着物を意味する。内臓脂肪は、生命の維持に必要な臓器を包囲するものであり、肝臓によって代謝されて血中コレステロールを生産することができる。内臓脂肪は、多嚢胞性卵巣症候群、メタボリックシンドロームおよび心血管疾患などの容態のリスク増加に関連づけられている。

10

【0267】

「異所性脂肪貯蔵」とは、除脂肪体重に寄与する組織および臓器（例えば、骨格筋、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、血管）内および周囲の脂質沈着物を意味する。一般に、異所性脂肪貯蔵は、体内の古典的脂肪組織貯留場所外の脂質の蓄積である。

【0268】

本明細書において用いる場合の、および当該技術分野において十分に了解されているような「処置」は、臨床結果を含めて有益なまたは所望の結果を得るためのアプローチである。疾患、障害または容態を「処置すること」または「緩和すること」は、容態、障害または疾患状態の程度および／または望ましくない臨床病態を、その障害を処置していない場合と比較して、減らすことおよび／またはその進行の時間経過を遅速もしくは延長することを意味する。例えば、肥満を処置する場合、体重の減少、例えば、体重の少なくとも5%の減少は、望ましい治療結果の一例である。本発明のために、有益なまたは望ましい臨床結果としては、一つ以上の症状の軽減または改善、疾患の程度の減少、安定化された（すなわち、悪化しない）疾患状態、疾患進行の遅延または遅速、疾患状態の改善または緩和、および検出可能であろうと、検出不能であろうと、（部分的であろうと、完全であろうと）寛解が挙げられるが、これらに限定されない。「処置」は、処置を受けない場合に予想される生存と比較して生存を延長することも意味し得る。さらに、処置は、必ずしも1用量の投与によって行われるとは限らず、多くの場合、一連の用量の投与によって行われる。したがって、治療有効量、すなわち、疾患、障害または容態の緩和に十分な量または処置に十分な量が1回以上の投与で投与されることがある。

20

30

【0269】

本明細書において用いる場合、用語「治療有効量」は、研究者、獣医、医師または他の臨床関係者が探求し続ける、組織、系、対象またはヒトの生物学的または医学的応答（処置する障害の症状の軽減を含む）を惹起するであろう組成物中の活性化合物の量を意味する。本発明の新規処置方法は、当業者に公知の障害のためのものである。

【0270】

本明細書において用いる場合、用語「予防有効量」は、研究者、獣医、医師または他の臨床家が探求し続ける、組織、系、対象またはヒトの生物学的または医学的応答を惹起するであろう組成物中の活性化合物の量であって、肥満または肥満関連障害、容態もしくは疾患の危険性のある対象の肥満または肥満関連障害、容態もしくは疾患の開始を予防するための量を意味する。

40

【0271】

本発明のもう一つの態様では、代謝障害の発現のリスクを低下させるための方法であって、抗肥満薬の組み合わせを対象の体重の低下に有効な量で該対象に投与することを含む方法を提供する。

【0272】

一部の実施形態において、本発明は、対象の代謝率を増加させるために、対象の代謝率低下を減少させるために、または対象の代謝率を保つために用いられる。ある実施形態において、前記代謝率は、エネルギー源としての除脂肪体組織に対する体脂肪の優先使用を含み得る。一つの態様において、抗肥満薬の前記組み合わせの投与後、除脂肪体重は低減

50

化されない。もう一つの態様において、除脂肪体重の低下は、抗肥満薬の前記組み合わせの投与後、低減化または防止される。さらにもう一つの態様では、除脂肪体重は、抗肥満薬の前記組み合わせの投与後、増加する。エネルギー源としての脂肪にかかる優先性は、脂肪組織量と除脂肪体組織量を比較することによって判定することができ、処置期間の開始時および終了時に全体重および脂肪含有量を測定することによって確認することができる。代謝率の増加は、一定の期間の対象によるカロリーまたは別のエネルギー源の使用についての、抗肥満薬の前記組み合わせの投与のない実質的に同様のまたは同一の条件下での別の期間の該対象によるカロリーまたは他のエネルギー源の使用レベルと比較して、高いレベルである。ある実施形態では、対象における代謝率が、抗肥満薬の前記組み合わせの投与のない実質的に同様のまたは同一の条件下での別の期間の該対象によるカロリーまたは他のエネルギー源の使用レベルと比較して、少なくとも約5%増加し、他の実施形態では、対象における代謝率が、少なくとも約10%、15%、20%、25%、30%または35%増加する。代謝率の増加は、例えば呼吸熱量計を使用して測定することができる。これらの実施形態において使用する場合の抗肥満薬の有効量は、該薬剤を受けていないまたは該薬剤の一方しかを受けていない対象と比較して、併用で投与したときに対象の代謝率を増加させるのに有効なそれぞれの薬剤の量である。

10

【0273】

もう一つの実施形態では、対象の代謝率減少を低減する方法を提供する。代謝率のかかる減少は、例えば減カロリー食、制限食または体重減少に起因して代謝率低下をもたらす任意の条件または栄養もしくは身体的レジメンの結果であり得る。制限食は、必ずしもカロリーに基づかない、ダイエット中に許される食物のタイプもしくは食物の量または両方に対する許可もしくは禁止または両方を含む。例えば、個人的ダイエットの場合のように、身体は、そのより低いカロリーの摂取量に基づいて低減された代謝率で埋め合わせをする。本質的に、身体は食物の要求量を下方調整し、それによってより少ない食物でもなんとか生きていく。ダイエットを続けると、カロリー摂取量の閾値が低減化される。ダイエットを終了したとき、低下したカロリー摂取量閾値およびより低い基礎代謝率のため、その個体は、典型的には、普通食を食していても太る (NIH Technology Assessment Conference Panel (1992)、Ann. Intern. Med., 116: 942-949; Wadden (1993)、Ann. Intern. Med., 119: 688-693)。一つの態様では、代謝率の減損が減カロリー食または体重減少の結果である場合の、対象の代謝率の減損を低下させる方法を提供する。かかる方法を用いることにより、対象の代謝率低下は、ある対象では少なくとも約10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%低減化される。かかる方法については、代謝率の減損または低下をもたらす条件または栄養もしくは身体的レジメンを開始する時点で、抗肥満薬の前記組み合わせを投与することが望ましいことであり得る。しかし、前記条件または栄養もしくは身体的レジメンを開始する前に、前記薬剤の投与を開始することも考えられる。一例では、呼吸熱量計を使用して代謝率を測定する。この実施形態において使用する抗肥満薬の有効量は、併用で投与したときに対象の代謝率低下を減少させるのに有効なそれぞれの薬剤の量である。

20

30

【0274】

もう一つの態様では、代謝プラトーを低減させる方法であって、対象に有効量の抗肥満薬を併用で投与することを含む方法を提供する。ある実施形態において、前記対象は、減カロリー食、運動増加またはこれらの組み合わせのため体重が減少し続けている、または体重が減少した。「代謝プラトー」とは、身体がカロリーまたはエネルギーインプットの変化に適応している間の、安定した代謝率の平均時間間隔を意味する。カロリーインプットまたはカロリー消費の変化は、例えば減カロリー食または身体活動増加の結果であり得る。例えば、体重減少レジメン中、体重減少が遅速または停止したときに、かかるプラトーを観察することができる。ある実施形態において、本発明の方法は、対象の代謝プラトーの継続時間を、抗肥満薬の前記組み合わせの投与のない実質的に同様のまたは同一の条件下で同じ期間にわたって他の点では同一の対象の代謝プラトーの継続時間と比較して、短縮する。他の実施形態において、本発明の方法は、代謝プラトーの頻度を、抗肥満薬の

40

50

前記組み合わせの投与のない実質的に同様のまたは同一の条件下で同じ期間にわたって他の点では同一の対象の代謝プラトーの頻度と比較して、低減させる。さらに他の実施形態において、本発明の方法は、代謝プラトーの開始を、抗肥満薬の前記組み合わせの投与のない実質的に同様のまたは同一の条件下で同じ期間にわたって他の点では同一の対象の代謝プラトーの開始と比較して、遅らせる。ある実施形態において、代謝プラトーは、体重減少が低減されるまたはない病歴記録期間によって特定される。ある実施形態では、少なくとも一つの代謝プラトーを低減させる。他の実施形態では、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9または10の代謝プラトーを低減させる。もう一つの態様では、同一または同様の条件下で抗肥満薬の前記組み合わせを投与しない対象と比較して代謝プラトーを1日遅らせる。他の態様では、対象の代謝プラトーを2日、3日、4日、5日、6日、1週間、10日、2週間または3週間遅らせる。

10

【0275】

さらに他の実施形態では、対象の代謝率を保つ方法を提供する。ある実施形態において、前記対象は、例えば減カロリー食、制限食または予測された体重減少のため、代謝率を減損するリスクがあり得る。代謝率の保持は、一定の期間の対象によるカロリーまたは別のエネルギー源の使用レベルを、抗肥満薬の前記組み合わせの投与のない実質的に同様のまたは同一の条件下で同じ期間の他の点では同一の対象によるカロリーまたは他のエネルギー源の使用レベルと比較して、維持することである。一つの態様では、代謝率の減少を生じさせる結果となる事象の開始前の対象の代謝率の15%以内に代謝率を維持する。他の態様では、前記対象の代謝率の10%以内、7%以内、5%以内、3%以内、またはそれ以下に代謝率を維持する。一つの態様では、抗肥満薬の前記組み合わせを、減カロリー食、制限食または運動レジメンの開始時点で投与する。

20

【0276】

代謝率は、かかる率を判定するために利用できる任意の方法を用いて、例えば、呼吸熱量計を使用することにより評定することができる。代謝率をアッセイするためのかかる方法および装置は、当該技術分野において公知であり、例えば、米国特許第4,572,208号、同第4,856,531号、同第6,468,222号、同第6,616,615号、同第6,013,009号および同第6,475,158号明細書に記載されている。あるいは、ダイエット期間後に動物によって異化される脂肪組織に対する除脂肪組織の量を測定することによって、動物の代謝率を評定することができる。したがって、全体重および脂肪含有量をダイエット期間終了時に測定することができる。ラットの場合、全体脂肪を判定するためによく用いられる方法は、腹膜後脂肪パッド、腹膜後腔に位置する脂肪体、後腹壁と後壁側腹膜の間の領域の外科的除去および計量である。前記パッド重量は、ラットの体脂肪率に正比例すると考えられる。ラットの体重と体脂肪との関係は比例関係であるので、肥満したラットは、相応じて高い体脂肪率および腹膜後脂肪パッド重量を有する。

30

【0277】

本発明のもう一つの態様では、対象の代謝率を増加させることにより脂肪量を低下させる方法であって、抗肥満薬の前記組み合わせを、該対象の代謝率を増加させることにより脂肪量を低下させるのに有効な量で投与することを含む方法を提供する。脂肪量は、全体重に対する百分率として表すことができる。一部の態様では、脂肪量は、治療コースの間に少なくとも1%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%または少なくとも25%低減化される。一つの態様では、対象の除脂肪量は、治療コースの間に減少されない。もう一つの態様では、対象の除脂肪量は、治療コースの間に維持または増加される。もう一つの態様では、対象は、減カロリー食または制限食を実施している。

40

「減カロリー食」とは、対象が、同対象の普通食と比較してそれより少ない1日当たりのカロリーを摂取していることを意味する。一例では、対象は、1日あたり少なくとも50カロリー少ないカロリーを消費している。他の例では、対象は、1日あたり100、150、200、250、300、400、500、600、700、800、900または1000カロリー少ないカロリーを消費している。

【0278】

50

ある実施形態において、対象の脂肪分布を変更する方法であって、抗肥満薬の前記組み合わせを、該対象の脂肪分布を変えるのに十分な量で投与することを含む方法を提供する。一つの態様において、前記変更は、前記対象の内臓脂肪もしくは異所性脂肪または両方の代謝増加の結果として生ずる。一部の実施形態において、前記方法は、皮下脂肪より少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%または50%高い率での内臓脂肪もしくは異所性脂肪または両方の代謝を伴う。一つの態様において、前記方法は好適な脂肪分布を生じさせる結果となる。ある実施形態において、好適な脂肪分布は、皮下脂肪の内臓脂肪、異所性脂肪または両方に対する比率増加である。一つの態様において、前記方法は、例えば、筋肉細胞量の増加の結果として、除脂肪体重の増加を伴う。

【0279】

10

他の実施形態において、対象の皮下脂肪量を低下させる方法であって、それを必要とする対象に、抗肥満薬の組み合わせを、該対象の皮下脂肪量を低下させるのに有効な量で投与することを含む方法を提供する。一例では、皮下脂肪量は、対象において少なくとも約5%低下される。他の例では、皮下脂肪量は、抗肥満薬の投与前の前記対象と比較して少なくとも約10%、15%、20%、25%、30%、40%または50%低減化される。

【0280】

本明細書に記載する方法を用いて、対象の内臓脂肪量を低下させることができる。一例では、対象の内臓脂肪は、少なくとも約5%低減化される。他の例では、内臓脂肪は、抗肥満薬の前記組み合わせの投与前の前記対象と比較して少なくとも約10%、15%、20%、25%、30%、40%または50%低減化される。対象の内臓脂肪量を判定するために利用できる任意の手段により、内臓脂肪を測定することができる。かかる方法としては、例えば、CTスキニングおよびMRIによる腹部断層撮影法が挙げられる。内臓脂肪の他の判定方法は、例えば米国特許第6,864,415号、同第6,850,797号および同第6,487,445号明細書に記載されている。

20

【0281】

ある実施形態において、対象の異所性脂肪の蓄積を予防するまたは異所性脂肪量を低下させる方法であって、その必要がある対象に、抗肥満薬の組み合わせを該対象の異所性脂肪の蓄積を予防するのにまたは異所性脂肪量を低下させるのに有効な量で投与することを含む方法を提供する。一例では、対象の異所性脂肪は、抗肥満薬の前記組み合わせの投与前の該対象と比較して少なくとも約5%低減化される。他の例では、対象の異所性脂肪量は、少なくとも約10%、または少なくとも約15%、20%、25%、30%、40%もしくは50%低減化される。あるいは、異所性脂肪量は、前記対象の皮下脂肪と比較して、比例的に5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%または100%低減化される。異所性脂肪の測定に利用できる任意の方法を用いて対象の異所脂肪を測定することができる。

30

【0282】

他の実施形態では、対象においてより好適な脂肪分布を生じさせる方法であって、対象に抗肥満薬の組み合わせを、好適な脂肪分布を生じさせるのに有効な量で投与することを含む方法を提供する。ある実施形態において、抗肥満薬の組み合わせの投与は、対象の内臓脂肪もしくは異所性脂肪または両方の量を低下させる。例えば、抗肥満薬の組み合わせ（食物摂取量もしくは体重調節または両方に関連する後脳構造に対して作用する少なくとも一つの抗肥満薬の投与との組み合わせで、食物摂取量もしくは体重調節または両方に関連する前脳構造に対して作用する少なくとも一つの抗肥満薬）の投与。ある実施形態において、前記方法は、皮下脂肪の低下より優先的に内臓もしくは異所性脂肪または両方の組み合わせの量を低下させる。かかる方法は、より高い皮下脂肪対内臓脂肪または異所性脂肪比を生じさせる結果となる。かかる比率向上は、結果として、心血管疾患、多嚢胞性卵巣症候群、メタボリックシンドローム、またはこれらの任意の組み合わせの発現リスクを低下させることができる。ある実施形態において、異所性または内臓脂肪は、皮下脂肪より5%高い率で代謝される。他の実施形態では、異所性または内臓脂肪は、皮下脂肪より少なくとも10%、15%、20%、25%、30%、50%、60%、70%、80%、90%または100%

40

50

高い率で代謝される。

【0283】

もう一つの態様において、本発明は、糖質コルチコステロイドと併用で投与される、治療有効量の、抗肥満薬の組み合わせの使用を含む。糖質コルチコステロイドは、脂肪量を増加させ除脂肪量を減少させる有害作用を有する。したがって、前記抗肥満薬の組み合わせを、糖質コルチコステロイド使用が有益である条件下で糖質コルチコステロイドと併用することができると考えられる。

【0284】

さらにもう一つの態様において、本発明の方法は、オルリスタット、フェンテルミン、トピラマート、CONTRAVEおよびQNEXAから選択された治療薬と併用で投与される治療有効量の一つの抗肥満薬または抗肥満薬の組み合わせの使用を含む。一部の実施形態において、本発明の方法は、治療有効量の本発明の改変ポリペプチドとオルリスタット、フェンテルミン、トピラマート、CONTRAVEおよびQNEXAから選択された治療薬との併用を含む。他の実施形態において、本発明の方法は、治療有効量のアミリン、アミリン類似体、アミリンアゴニストまたはアミリン誘導体とオルリスタット、フェンテルミン、トピラマート、CONTRAVEおよびQNEXAから選択された治療薬との併用を含む。他の実施形態において、本発明の方法は、治療有効量の本発明の改変化合物と、アミリン、アミリン類似体、アミリンアゴニストまたはアミリン誘導体と、オルリスタット、フェンテルミン、トピラマート、CONTRAVEおよびQNEXAから選択された治療薬との併用を含む。

【0285】

病的に肥満している対象の体重を低下させる方法であって、まず、該対象の体重を病的に肥満しているレベルより下のレベルに低下させること、次に、抗肥満薬の組み合わせを該対象の体重をさらに低下させるのに有効な量で該対象に投与することによる方法も提供する。対象の体重を病的肥満体重より下に低下させる方法としては、カロリー摂取量を低減させること、身体活動量を増加させること、薬物療法、肥満外科手術、例えば胃バイパス手術、または前述の方法の任意の組み合わせが挙げられる。一つの態様において、抗肥満薬の前記組み合わせの投与は、前記対象の体重をさらに低下させる。他の実施形態では、40以下のボディーマス指数を有する対象のボディーマス指数を低下させる方法であって、抗肥満薬の組み合わせを、前記対象の体重をさらに低下させるのに有効な量で投与することによる方法を提供する。

【0286】

体重を低下させるとは、対象が、治療コースの間に、該治療コースが数日であろうと、数週間であろうと、数ヶ月であろうと、または数年であろうと、彼／彼女の全体重の一部分を喪失することを意味する。あるいは、体重を低下させることは、脂肪量の除脂肪量に対する割合の減少と定義することができる（言い換えると、対象は、脂肪量を喪失したが、除脂肪量を維持または増しており、必ずしも全体重の損失量に対応しない）。これらの実施形態において併用で投与される抗肥満薬の有効量は、治療コースの間に対象の体重を低下させるのに有効な量であるか、あるいは治療コースの間に対象の脂肪量の百分率を低下させるのに有効な量である。ある実施形態において、対象の体重は、治療コースの間に、少なくとも約1%、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、または少なくとも約20%低減化される。あるいは、対象の脂肪量の百分率は、治療コースの間に、少なくとも1%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%または少なくとも25%低減化される。

【0287】

ある実施形態において、体重を低下させる方法は、体重維持の遵守の向上を含む。いずれの理論にも拘束されることを望まないが、本明細書に記載するような抗肥満薬の投与によって達成されるレプチン応答性の回復により、肥満対象にとって重要な課題が克服される。以前の体重減少法では、体重が低下していてもレプチンレベルが依然として正常レベルより高いことがあり、そのため対象は体重減少を維持することが難しい。本明細書に記載する方法は、体重を低下させる方法ばかりでなく、体重維持の遵守向上の概念も含む。

【0288】

ある実施形態において、対象の栄養素利用能を低減する、例えば体重を低下させる方法は、該対象に有効量の抗肥満薬を大量瞬時投与で1日に1回以上投与することを含む。大量瞬時投与は、（持続注入とは対照的に）医薬品の間欠的投薬である。対象に1日あたり1回以上の大量瞬時投与を施すことができる。大量瞬時投与量は、いつ対象に投与するかにかかわらず同じであり得、またはその日のある時点で他の時点と比べて多い大量瞬時投与量を対象に投与するように調整され得る。ある種の製剤、例えば徐放性製剤での薬剤の投与、大量瞬時投与を、より少ない頻度で、例えば、3日に1回、週に1回、月に2回、毎月1回施すことができる。さらに、大量瞬時投与間の時間は、好ましくは、前の大量瞬時投与量で投与された薬物が対象の血流を通過し得るのに十分な長さである。

10

【0289】

他の実施形態において、対象の栄養素利用能を低減させる、例えば体重を低下させる方法は、該対象に有効量の抗肥満薬を持続投与で投与することを含む。持続投与とは、例えば静脈内注射または経皮パッチによる、薬物の持続注入を意味するものとする。あるいは、ある一定期間にわたって対象の系に薬物を放出する制御放出カプセルまたは錠剤の形態で持続投与を経口的に施すことができる。持続投与によって投与した場合、薬物は、約1時間の期間にわたって放出され、場合によっては、薬物は、約2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、18または24時間の期間にわたって放出される。

【0290】

「併用で投与される」とは、抗肥満薬が単回投与として投与される、別用量で同時に投与される、または同様に逐次投与されることを意味する。逐次投与は、前記抗肥満薬のうちの一つを、ある抗肥満薬の前または後に投与することを指す。ある実施形態では、第一の抗肥満薬が、少なくとも一つの他の抗肥満薬の約30分前または後に投与され、他の実施形態では、少なくとも一つの他の抗肥満薬の約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11または12時間前または後に投与される。いずれの投与される抗肥満薬も、大量瞬時投与として投与することができ、または持続投与として投与することができる。

20

【0291】

さらに、ある実施形態において、併用での体重増加誘導（weight-inducing）剤の投与は、本発明の態様のいずれかにおいて相乗的効果を生じさせる結果となる。加えて、ある実施形態において、併用での体重増加誘導剤の投与は、同じ効果でありながら、該薬剤の少なくとも一つについての投薬必要量を低下させる結果となる。

30

【0292】

したがって、一つの実施形態には処置等を必要とする対象の肥満を処置するまたは体重を低下させる方法があり、この方法は、治療有効量の少なくとも二つの異なる抗肥満薬を予防的に投与することを含み、この場合の少なくとも一つの抗肥満薬は、アミリン、アミリン類似体、アミリンアゴニストまたはアミリン誘導体であり、および少なくとも一つの抗肥満薬は、アルブミン結合ドメインポリペプチド（ABD）と、レプチン、レプチン類似体またはその活性断片から選択された第一のペプチドホルモンドメイン（HD1）とを含む改変ポリペプチドであり、ならびに前記対象は、体重を少なくとも10%、12%、15%、20%、30%、40%またはさらに50%低下させる。

40

【0293】

さらなる実施形態には以下のものが含まれる。

【0294】

実施形態1. 対象の肥満を処置する方法であって、治療有効量の少なくとも二つの異なる抗肥満薬を末梢投与することを含み、少なくとも一つの抗肥満薬が、アミリン、アミリン類似体、アミリンアゴニストまたはアミリン誘導体（すなわち、アミリン剤）であり、および少なくとも一つの抗肥満薬が、アルブミン結合ドメインポリペプチド（ABD）とレプチン、レプチン類似体またはそれらの活性断片から選択された第一のペプチドホルモンドメイン（HD1）とを含む改変ポリペプチドである方法。

【0295】

50

実施形態2. 対象の体重を低減させる方法であって、治療有効量の少なくとも二つの異なる抗肥満薬を末梢投与することを含み、少なくとも一つの抗肥満薬が、アミリン、アミリン類似体、アミリンアゴニストまたはアミリン誘導体（すなわち、アミリン剤）であり、および少なくとも一つの抗肥満薬が、アルブミン結合ドメインポリペプチド（ABD）とレプチン、レプチン類似体またはそれらの活性断片から選択された第一のペプチドホルモンドメイン（HD1）とを含む改変ポリペプチドである方法。

【0296】

実施形態3. 前記少なくとも一つの抗肥満アミリン剤が、アミリンアゴニストである、実施形態1または2のいずれか一方に記載の方法。

【0297】

実施形態4. 前記アミリンアゴニストが、アミリン類似体または誘導体を含む、実施形態1から3のいずれか一つに記載の方法。

【0298】

実施形態5. 前記アミリン類似体または誘導体がプラムリンチドを含む、実施形態1から4のいずれか一つに記載の方法。

【0299】

実施形態6. 前記アミリン類似体または誘導体が、表4に開示する化合物を含む、実施形態1から5のいずれか一つに記載の方法。

【0300】

実施形態7. 前記アミリン類似体または誘導体が、Des-Lys1-[Lys26 (mPEG40K)]-プラムリンチドを含む、実施形態1から6のいずれか一つに記載の方法。

【0301】

実施形態8. 前記ABDが、以下のものから成る群より選択されたペプチドのいずれか一つを含む、実施形態1から7のいずれか一つに記載の方法：

LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKSYINRAKTVEGVHTLIGHILAALP（配列番号38）、
 LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVNALTHHILAALP（配列番号39）、
 LAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINRARTVEGVHALIDHILAALP（配列番号40）、
 LAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP（配列番号41）、
 LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKNLINRAKTVEGVSSSLKGHILAALP（配列番号42）、
 LAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALTLHILAALP（配列番号43）、
 LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKNLINRAKTVEGVDALIAHILAALP（配列番号44）、
 LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKSLINRAKTVEGVDALTSHILAALP（配列番号45）、
 LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKNLINRAKTVEGVNSLTSHILAALP（配列番号46）、
 LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKNVINKAKTVEGVEALIADILAALP（配列番号47）、
 LAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVQALIAHILAALP（配列番号48）、
 LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP（配列番号49）、
 LAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALTLHILAALP（配列番号50）、
 LAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALISEILAALP（配列番号51）、および
 LAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKRLISKAKTVEGVKALISEILAALP（配列番号52）。

【0302】

実施形態9. 前記HD1が、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号143、配列番号144、配列番号145、配列番号146、配列番号664、配列番号665、配列番号666、配列番号667、配列番号668、配列番号669、配列番号670、配列番号671、配列番号672、配列番号673、配列番号674、配列番号675、配列番号676および配列番号677から成る群より選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から8のいずれか一つに記載の方法。

10

20

30

40

50

【0303】

実施形態10. 前記HD1が配列番号29である、実施形態1から9のいずれか一つに記載の方法。

【0304】

実施形態11. 前記改変ポリペプチドが、表2に開示する化合物を含む、実施形態1から10のいずれか一つに記載の方法。

【0305】

実施形態12. 前記改変ポリペプチドが、配列番号53、配列番号54、配列番号55、配列番号56、配列番号57、配列番号58、配列番号59、配列番号60、配列番号61、配列番号62、配列番号63、配列番号64、配列番号65、配列番号66、配列番号67、配列番号68、配列番号69、配列番号70、配列番号71、配列番号72、配列番号73、配列番号74、配列番号75、配列番号76、配列番号77、配列番号78、配列番号79、配列番号80、配列番号81、配列番号82、配列番号83、配列番号84、配列番号85、配列番号86、配列番号87、配列番号88、配列番号89、配列番号90、配列番号91、配列番号92、配列番号93、配列番号94、配列番号95、配列番号96、配列番号97、配列番号98、配列番号99、配列番号100、配列番号101、配列番号102、配列番号103、配列番号104、配列番号105、配列番号106および配列番号107から成る群より選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から11のいずれか一つに記載の方法。

10

【0306】

実施形態13. 前記改変ポリペプチドが、配列番号54のアミノ酸配列を含む、実施形態1から12のいずれか一つに記載の方法。

20

【0307】

実施形態14. 前記改変ポリペプチドが、配列番号61のアミノ酸配列を含む、実施形態1から12のいずれか一つに記載の方法。

【0308】

実施形態15. 前記アミリン剤の有効量および前記改変ポリペプチドの有効量が、前記アミリン剤を前記改変ポリペプチドと併用で前記対象に投与したときに、いずれかの薬剤を単独で投与したときに達成される体重減少量より大きな体重減少量が達成されるような量を含む、実施形態1から14のいずれか一つに記載の方法。

【0309】

実施形態16. 前記二つの薬剤が同時に投与される、実施形態1から15のいずれか一つに記載の方法。

30

【0310】

実施形態17. 前記二つの薬剤が混合される、実施形態1から16のいずれか一つに記載の方法。

【0311】

実施形態18. 前記対象のBMIが25より大きい、実施形態1から17のいずれか一つに記載の方法。

【0312】

実施形態19. 前記対象のBMIが25から35である、実施形態1から18のいずれか一つに記載の方法。

40

【0313】

実施形態20. 前記対象のBMIが25から40である、実施形態1から19のいずれか一つに記載の方法。

【0314】

実施形態21. 前記対象のBMIが25から45である、実施形態1から20のいずれか一つに記載の方法。

【0315】

実施形態22. 前記対象のBMIが35から45である、実施形態1から21のいずれか一つに記載の方法。

【0316】

50

実施形態23. 前記対象のBMIが30未満に低減される、実施形態1から22のいずれか一つに記載の方法。

【0317】

実施形態24. 前記対象のBMIが25未満に低減される、実施形態1から23のいずれか一つに記載の方法。

【0318】

実施形態25. 前記対象のBMIが正常値に低減される、実施形態1から24のいずれか一つに記載の方法。

【0319】

実施形態26. 体重減少が、4週間以内の処置で達成される、実施形態1から25のいずれか一つに記載の方法。 10

【0320】

実施形態27. 体重減少が、8週間以内の処置で達成される、実施形態1から26のいずれか一つに記載の方法。

【0321】

実施形態28. 体重減少が、12週間以内の処置で達成される、実施形態1から27のいずれか一つに記載の方法。

【0322】

実施形態29. 体重減少が、20週間以内の処置で達成される、実施形態1から28のいずれか一つに記載の方法。 20

【0323】

実施形態30. 体重減少が、24週間以内の処置で達成される、実施形態1から29のいずれか一つに記載の方法。

【0324】

実施形態31. 前記対象がヒトである、実施形態1から30のいずれか一つに記載の方法。

【0325】

実施形態32. 前記対象が、肥満したヒトである、実施形態1から31のいずれか一つに記載の方法。

【0326】

実施形態33. 前記体重減少が、少なくとも10%低減される、実施形態1から32のいずれか一つに記載の方法。 30

【0327】

実施形態34. 前記体重減少が、少なくとも12%低減される、実施形態1から33のいずれか一つに記載の方法。

【0328】

実施形態35. 前記体重減少が、少なくとも15%低減される、実施形態1から34のいずれか一つに記載の方法。

B. 製剤

【0329】

本発明の医薬化合物は、Remington's Pharmaceutical SciencesにE. W. Martinによって開示されているものなどの慣用的技術に従って、医薬的に許容し得る担体または希釈剤ならびに任意の他の公知のアジュバントおよび賦形剤を用いて製剤することができる。Wangら、(1988) J. of Parenteral Sci. and Tech., Technical Report No. 10、補遺42: 2 Sも参照のこと。 40

【0330】

一般に、前記改変ポリペプチドを患者への投与のために安定した安全な医薬組成物に製剤化することができる。本発明の方法での使用が考えられる医薬製剤は、おおよそ0.01から1.0% (w/v)、一定の場合には0.05から1.0%の前記改変ポリペプチドと、最終組成物のpHを約3.0から約7.0にさせ得るおおよそ0.02から0.5% (w/v) の酢酸、リン酸、クエン酸またはグルタミン酸緩衝液と、おおよそ1.0から10% (w/v) の炭水化物または多価アル 50

コール等張化剤と、所望により、*m*-クレゾール、ベンジルアルコール、メチル、エチル、プロピルおよびブチルパラベンならびにフェノールから成る群より選択されたおおよそ0.005から1.0% (w/v) の保存剤を含み得る。一般に、製剤化したペプチドを多用途製品に含めることとなる場合に、かかる保存剤を含める。

【0331】

特定の実施形態において、本改変ポリペプチドの医薬製剤は、これらの実施形態において、一定の範囲の濃度、例えば、約0.01%から約98%w/wの間、または約1から約98%w/wの間、または好ましくは80%と90%w/wの間、または好ましくは約0.01%から約50%w/wの間、またはさらに好ましくは約10%から約25%w/wの間の前記化合物（単数または複数）を含有し得る。所望の濃度の溶液を得るために十分な量の注射用蒸留水を使用し得る。

10

【0332】

追加の等張化剤、例えば塩化ナトリウム、ならびに他の公知の賦形剤も必要に応じて存在することがある。場合により、かかる賦形剤は、前記化合物の全体的な張性の維持に有用である。今説明している製剤に賦形剤を様々な濃度で含めることができる。例えば、賦形剤を約0.02%から約20%w/w、好ましくは約0.02%と0.5%w/wの間、約0.02%から約10%w/v、または約1%から約20%w/wの濃度範囲で含めることができる。加えて、本製剤自体と同様、固体（粉末状を含む）、液体、半固体またはゲル形態の賦形剤を含めることができる。

【0333】

前記医薬製剤を様々な形態、例えば固体、液体、半固体または液体で構成し得る。用語「固体」は、本明細書において用いる場合、例えば粉末および凍結乾燥製剤を含めて、この用語のすべての通常の使用を包含することを意図したものである。今説明している製剤を、凍結乾燥させることができる。

20

【0334】

用語緩衝液、緩衝剤溶液および緩衝溶液は、水素イオン濃度またはpHに関連して用いるとき、酸もしくはアルカリの添加によるまたは溶媒での希釈によるpHの変化に耐える系の能力、特に水溶液の能力を指す。酸または塩基の添加により小さなpH変化を被る緩衝溶液の特徴は、弱酸および弱酸の塩、または弱塩基および弱塩基の塩のいずれかの存在である。前者の系の一例は、酢酸および酢酸ナトリウムである。添加されるヒドロニウムまたはヒドロキシルイオンの量が、それを中和する緩衝系の能力を超えない限り、pHの変化はわずかである。

30

【0335】

本明細書に記載するような様々な液体ビヒクル、例えば水または水性／有機溶媒混合物もしくは懸濁液は、改変ポリペプチドの製剤における使用に好適である。

【0336】

本明細書に記載するような使用に対する改変ポリペプチド製剤の安定性は、当該技術分野において公知の方法によって決定される範囲内に製剤のpHを維持することにより強化される。一定の実施形態では、前記製剤のpHを約3.5から5.0、または約3.5から6.5、一部の実施形態では、約3.7から4.3、または約3.8から4.2の範囲に維持する。一部の実施形態でのpHは、約4.0、約5.0、約6.0、約7.0、約8.0、約9.0、またはさらにそれ以上であり得る。一部の実施形態でのpHは、生理的範囲、pH6-8、好ましくはpH7-7.6であり得る。

40

【0337】

一定の実施形態において、前記改変ポリペプチドに伴う緩衝液は、酢酸緩衝液（好ましくは、約1-5から約60mMの最終製剤濃度で）、リン酸緩衝液（好ましくは、約1-5から約30mMの最終製剤濃度で）またはグルタミン酸緩衝液（好ましくは、約1-5から約60mMの最終製剤濃度で）である。一部の実施形態において、前記緩衝液は、酢酸緩衝液（好ましくは、約5から約30mMの最終製剤濃度で）である。

【0338】

安定剤を前記製剤に含めてもよいが、必ずしも必要であるとは限らない。しかし、含める場合、本発明の実施に有用な安定剤は、炭水化物または多価アルコールである。本発明

50

の実施に有用な、好適な安定剤は、おおよそ1.0から10% (w/v) の炭水化物または多価アルコールである。前記多価アルコールおよび炭水化物は、それらの主鎖に同じ特徴、すなわち—CHOH—CHOH—を共有しており、これがタンパク質の安定化に関与する。前記多価アルコールとしては、ソルビトール、マンニトール、グリセリンおよびポリエチレングリコール (PEG) のような化合物が挙げられる。これらの化合物は、直鎖分子である。一方、前記炭水化物、例えば、マンノース、リボース、スクロース、フルクトース、トレハロース、マルトース、イノシトールおよびラクトースは、ケトまたはアルデヒド基を含有し得る環状分子である。これら二クラスの化合物は、高温および冷凍—解凍または凍結乾燥プロセスにより引き起こされる変性に対してタンパク質を安定させることに有効であることが実証されている。好適な炭水化物としては、ガラクトース、アラビノース、ラクトース、または糖尿病患者に対して悪影響を及ぼさない任意の他の炭水化物、すなわち、代謝されて許容しがたく高い血糖濃度を形成することのない炭水化物が挙げられる。かかる炭水化物は、当該技術分野では糖尿病患者に好適であると周知である。スクロースおよびフルクトースは、非糖尿病用途 (例えば、肥満の処置) で前記化合物と共に使用するのに好適である。

10

【0339】

一定の実施形態において、安定剤を含める場合、多価アルコール、例えばソルビトール、マンニトール、イノシトール、グリセリン、キシリトールおよびポリプロピレン／エチレングリコールコポリマー、ならびに分子量200、400、1450、3350、4000、6000、8000およびさらにそれ以上の様々なポリエチレングリコール (PEG) で前記化合物を安定させる。一部の実施形態では、マンニトールが好ましい多価アルコールである。本発明の凍結乾燥製剤のもう一つの有用な特徴は、本明細書に記載する凍結乾燥製剤の、該製剤の安定性を維持するのに役立つ同製剤成分での張性の維持である。一部の実施形態では、マンニトールがこの目的に用いられる好ましい多価アルコールである。

20

【0340】

米国薬局方 (USP) には、複数回投与用容器に収容される調製物には静菌または静真菌濃度の抗微生物剤を添加しなければならないと述べられている。それらは、皮下注射針および注射器で内容物の一部分を取り出している間にまたは他の観血的送達手段、例えばペン型注射器を使用している間に不注意に調製物に導入される微生物の増殖を予防するために、使用時に妥当な濃度で存在しなければならない。製剤の他のすべての成分との適合性を保証するために抗微生物薬を評価すべきであり、およびある製剤では有効である特定の薬剤が別の製剤では効果のないことを確実にするために全製剤に関して抗微生物薬の活性を評価すべきである。特定の抗微生物薬がある製剤には有効であるが、別の製剤では有効ではないと判明することは珍しくない。

30

【0341】

保存剤は、一般的な製剤学的意味で、微生物の増殖を防止または阻害する物質であって、医薬製剤に、微生物による該製剤の必然的腐敗を回避するために、微生物の増殖を防止または阻害する目的で添加することができる物質である。保存剤の量は多くはないが、それでもやはり保存剤はペプチドの全安定性に影響を及ぼし得る。

【0342】

前記医薬組成物に使用するための保存剤は、0.005から1.0% (w/v) の範囲であり得るが、一部の実施形態における単独でのまたは他のものと併用での各保存剤についての範囲は、ベンジルアルコール (0.1—1.0%)、またはm-クレゾール (0.1—0.6%)、またはフェノール (0.1—0.8%)、またはメチルパラベン (0.05—0.25%) とエチルもしくはプロピルもしくはブチルパラベン (0.005%—0.03%) の組み合わせである。パラベンは、パラ-ヒドロキシ安息香酸の低級アルキルエステルである。各保存剤の詳細な説明は、Remington's Pharmaceutical Sciences (同上) に示されている。

40

【0343】

改変ポリペプチドは、液体形態のとき、ガラス容器中でガラスに吸着する傾向を有さないことがあり得、したがって、医薬製剤をさらに安定させるために界面活性剤を必要とし

50

ないことがある。しかし、液体形態のときにかかる傾向を有する化合物に関しては、界面活性剤をそれらの製剤に使用すべきである。その後、これらの製剤を凍結乾燥させ得る。界面活性剤は、多くの場合、疎水分解のタンパク質の変性と塩架橋分離によるタンパク質の変性の両方の原因となる。比較的低濃度の界面活性剤が、界面活性剤部分とタンパク質の反応性部位との強い相互作用のため、強い変性活性を発揮し得る。しかし、この相互作用の賢明な使用により、タンパク質を界面または表面変性に対して安定させることができる。前記改変ポリペプチドをさらに安定させることができる界面活性剤は、所望により、全製剤の約0.001から0.3% (w/v) の範囲で存在し得、該界面活性剤としては、ポリソルベート80 (すなわち、ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノオレエート)、CHAPS (登録商標) (すなわち、3- [(3-コラミドプロピル) ジメチルアンモニオ] 1-プロパンスルホネート)、Brij (登録商標) (例えば、Brij (登録商標) 35、これは、(ポリオキシエチレン (23) ラウリルエーテル) である)、ポロキサマー、または別の非イオン性界面活性剤が挙げられる。

10

【0344】

選択する等張化剤によっては、塩化ナトリウムまたは他の塩を添加して医薬製剤の張性を調整することが望ましいこともある。しかし、これは任意のものであり、選択する特定の製剤に左右される。非経口製剤は、好ましくは、等張性または実質的に等張性であり得る。

【0345】

非経口製品用の好ましいビヒクルは水である。非経口投与に好適な質の水を、蒸留または逆浸透のいずれかによって調製することができる。注射用蒸留水は、医薬製剤での使用に好ましい水性ビヒクルである。

20

【0346】

他の成分が医薬製剤中に存在し得る可能性がある。かかる追加の成分としては、例えば、湿潤剤、乳化剤、油、酸化防止剤、充填剤、張性調節剤、キレート剤、金属イオン、油性ビヒクル、タンパク質 (例えば、ヒト血清アルブミン、ゼラチンまたはタンパク質) および双性イオン (例えば、アミノ酸、例えばベタイン、タウリン、アルギニン、グリシン、リシンおよびヒスチジン) を挙げることができる。加えて、ポリマー溶液、またはポリマーとの混合物は、ペプチドの制御放出の機会をもたらす。かかる追加の成分は、もちろん、本発明の医薬製剤の全体的安定性に悪影響を及ぼすべきではない。

30

【0347】

容器は、注射の製剤の不可欠部分であり、容器を一成分と見なし得る。完全に不活性である容器はない、すなわち、収容する液体に、特にその液体が水性である場合に、なんらかの点で影響を及ぼさない容器はないからである。したがって、特定の注射用の容器の選択は、容器の組成、その溶液、およびそれが付される処置を考慮した結果に基づかなければならない。必要に応じて、ホウケイ酸ガラス、例えばWheaton Type Iホウケイ酸ガラス #33 (Wheaton Type I-33) またはその等価物 (Wheaton Glass Co.) の使用により、バイアルのガラス表面へのペプチドの吸着を最小にすることもできる。製造に適格な同様のホウケイ酸ガラスバイアルおよびカートリッジの他の供給業者としては、Kimbel Glass Co.、West Co.、Bunder Glas GMBHおよびForm a Vitrumが挙げられる。Wheaton Type I-33血清用ホウケイ酸バイアルの中で5% マンニトールおよび0.02% Tween 80の存在下、化合物を製剤化し、0.1mg/mLおよび10mg/mLの化合物最終濃度に凍結乾燥させることによって、化合物の生物学的および化学的特性を安定させ得る。

40

【0348】

注射により送達すべき製剤については、皮下注射器からの針の複数回投与用バイアルへの導入を可能にし、針を抜き次第再密封するために、好ましくは、アルミニウムバンドにより適所に保持されたゴム栓閉鎖キャップによって各バイアルの開放端を密封する。

【0349】

ガラスバイアル用の栓、例えば、West 4416/50、4416/50 (テフロン面付き) および4406/40、Abbott 5139または任意の均等内容の栓を注射用の医薬のための閉鎖キャップ (clo

50

sure)として使用することができる。ペプチド抗肥満薬を含む製剤用のこれらの栓は、該ペプチドはもちろん、該製剤の他の成分とも適合性である。本発明者らは、患者使用パターンを用いて試験した時にこれらの栓が栓完全性試験に合格する、例えば、栓が少なくとも約100回の注射に耐えることができることも発見した。あるいは、前記ペプチドを、後の再構成のためのバイアル、注射器またはカートリッジ内で凍結乾燥させることができる。本発明の液体製剤を1もしくは2チャンバー式カートリッジ、または1もしくは2チャンバー注射器に充填することができる。

【0350】

上で説明した医薬製剤の各成分は、当該技術分野において公知であり、およびPHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS: PARENTERAL MEDICATIONS、第1巻、第2版、Avisら編、Merck & Co. Inc.、ニューヨーク、ニューヨーク 1992に記載されており、前記参考文献は、その全体があらゆる目的のために出典明示により本明細書に援用されている。

10

【0351】

上記液体製剤の製造プロセスは、一般に、配合、滅菌濾過および充填工程を含む。配合手順は、特定の順序での成分の溶解（保存剤、続いて安定剤／等張化剤、緩衝液そしてペプチド）または同時の溶解を含む。

【0352】

代替製剤、例えば非経口製剤は、滅菌を必要としないことがある。しかし、本発明のペプチド医薬製剤の開発の際、滅菌が望まれるまたは必要である場合には、任意の適する滅菌プロセスを用いることができる。典型的な滅菌プロセスとしては、濾過、スチーム（湿式加熱）、乾式加熱、ガス（例えば、エチレンオキシド、ホルムアルデヒド、二酸化塩素、プロピレンオキシド、 β -プロピオラクトン (beta-propiolactone)、オゾン、クロロピクリン、過酢酸、臭化メチルおよびこれらに類するもの）、放射線源への曝露、および無菌操作が挙げられる。濾過は、本発明の液体製剤のための好ましい滅菌法である。滅菌濾過は、連続して接続され得る0.45 μ mおよび0.22 μ m（1または2）による濾過である。濾過後、溶液を適切なバイアルまたは容器に充填する。

20

【0353】

一定の実施形態では、本明細書に記載する改変ポリペプチドを対象に末梢投与する。一部の実施形態において、本発明の液体医薬製剤は、非経口投与を意図したものである。好適な投与経路としては、筋肉内経路、静脈内経路、皮下経路、皮内経路、関節内経路、髄腔内経路およびこれらに類するものが挙げられる。一部の実施形態では、皮下投与経路が好ましい。一定の実施形態では、経粘膜送達も好ましい。これらの経路としては、液体、半固体または固体形態のペプチドの投与を含み得る経口、鼻、舌下、肺および頬側経路が挙げられるが、それらに限定されない。改変ポリペプチドを含む製剤について、これらの経路による投与は、非経口送達と比較してバイオアベイラビリティが減少するため、所望の生物学的効果を得るために実質的により多くの化合物を必要とし得る。加えて、ポリマーマイクロカプセル、マトリックス、溶液、インプラントおよびデバイス形成し、それらを非経口的にまたは外科的手段により投与することによって、非経口制御放出送達を果たすことができる。制御放出製剤の例は、米国特許第6,368,630号、同第6,379,704号および同第5,766,627号明細書に記載されており、これらの参考文献は出典明示により本明細書に援用されている。これらの剤形は、ペプチドの一部がポリマーマトリックスまたはデバイス内に捕捉されるため、より低いバイオアベイラビリティを有し得る。例えば、米国特許第6,379,704号、同第6,379,703号および同第6,296,842号明細書参照（これらの各参考文献は、それらの全体があらゆる目的のために出典明示により本明細書に援用されている）。

30

40

【0354】

1回投与または複数回投与で有効となる量の改変ポリペプチドを含有する投薬単位形で前記化合物を提供することができる。

【0355】

当業者には理解されるであろうが、前記改変ポリペプチドの有効量は、対象の年齢およ

50

び体重、対象の体調、処置すべき容態、ならびに当該技術分野において公知の他の要因をはじめとする多くの要因によって変わる。前記改変ポリペプチドの有効量は、投与される特定の組みあわせによっても変わる。本明細書の中で説明するように、改変ポリペプチドの併用投与により、投与する改変ポリペプチドのいずれかの低減量が有効量になり得る。

【0356】

前記改変ポリペプチドの長い作用持続時間は、1日1回または週1回投与などの所望の作用持続時間延長をもたらすことができる。例えば、ABDの選択、およびアルブミンに対するその親和性によって、作用持続時間を選択することができる。理論により拘束されることを望まないが、アルブミンに対する親和性が高いほど、長い循環時間が生じることとなり、その結果、長い作用持続時間が得られると考えられる。薬力学（治療効果）および薬物動態（薬物の特性）〔例えば、薬物血漿中レベル、急性もしくは慢性グルコースおよび／もしくはHbA1c低下、インスリン血漿中レベル、食物摂取阻害または体重減少〕のいずれかまたは両方を、送達後に経時的に測定することができる。

10

C. 有効投薬量

【0357】

本明細書で提供する医薬組成物は、活性成分が治療有効量で、すなわち、その所期の目的を果たすのに有効な量で含有される組成物を含む。特定の用途に有効な実際の量は、なにかんずく、処置されている容態に左右される。例えば、糖尿病を処置するための方法で投与される場合、かかる組成物は、所望の結果（例えば、対象の空腹時血糖減少）を達成するのに有効な量の有効成分を含有することとなる。例えば、肥満を処置するための方法で投与される場合、かかる組成物は、所望の結果を達成する（例えば、体重を減少させる）のに有効な量の有効成分を含有することとなる。

20

【0358】

投与する化合物の投薬量および頻度（単回または複数回投与）は、投与経路；レシピエントの大きさ、年齢、性別、健康状態、体重、ボディーマス指数および食事；処置されている疾患（例えば、本明細書に記載する化合物に応答する疾患）の症状の性質および程度；他の疾患または他の健康関係の問題の存在；併用処置の種類；ならびに任意の疾患または処置レジメンからの合併症をはじめとする、様々な要因によって変わり得る。他の治療レジメンまたは治療薬を本発明の方法および化合物と併用することができる。

【0359】

ヒトでの使用のための治療有効量は、動物モデルから判定することができる。例えば、動物で有効であることが判明した濃度を達成するように、ヒトのための用量を処方することができる。上で説明したように、および当該技術分野において公知であるように、血糖および体重をはじめとする（しかしこれに限定されない）1つ以上の生理学的パラメータをモニターし、投薬量を上方または下方調整することによって、ヒトでの投薬量を調整することができる。

30

【0360】

投薬量は、患者の必要条件および使用されている化合物によって異なり得る。本発明の明細書において、患者に投与される用量は、ある期間にわたって患者における有益な治療応答に作用するのに十分なものとするべきである。用量のサイズは、有害副作用の存在、性質および程度にも左右される。一般に、化合物の至適用量未満である、より少ない投薬量から処置を開始する。その後、状況下で至適作用が達成されるまで少しずつ投薬量を増加させる。本発明の一つの実施形態において、投薬量範囲は、0.001%から10%w/vである。別の実施形態において、投薬量範囲は、0.1%から5%w/vである。

40

【0361】

しかし、典型的な用量は、1日あたり約0.1mgの下限から約200mgの上限までの医薬化合物を含有し得る。他の用量範囲、例えば、1回の用量として1mgから100mgの化合物、および1回の用量として3mgから70mgも考えられる。典型的に、長い作用持続時間を有する改変ポリペプチドの用量を、例えば、毎日およびさらには週1回投与する。1日あたりの用量を、24時間のうちにまたはその24時間の任意の部分の中で連続して提供される個別単位用量

50

で供給してもよい。

【0362】

投薬量および間隔を個々に調整して、処置されている特定の臨床適応症に有効な投与化合物レベルを提供することができる。これにより、個体の疾患状態の重症度に見合った治療レジメンが提供されることとなる。

【0363】

本明細書に提供する教示を利用して、実質的な毒性をもたらさず、その上、特定の患者が示す臨床症状の処置に全面的に有効である、有効な予防的および治療的処置レジメンを計画することができる。この計画は、化合物の効力、相対的バイオアベイラビリティ、患者の体重、有害副作用の存在および重症度、好ましい投与方式、ならびに選択薬剤の毒性プロファイルなどの要因を考慮することにより活性化化合物を注意深く選択することを含むべきである。

【0364】

本明細書に記載する改変ポリペプチドの驚くべき用量節約特性と共に、該改変ペプチドの驚くほど長い血漿半減期および薬理作用持続時間により、優れた医薬品であると規定される。用量節約をはじめとするこの優れた特性により、親化合物だけでは目下達成されない、より少ない投薬、したがってより少ない副作用もしくはより重症度の低い副作用、および改善された製品費用、ならびに／または1日1回もしくは週1回投与用のより対費用効果が高く、より単純な製剤が可能となる。

D. 毒性

【0365】

特定の化合物についての毒性と治療効果間の比がその治療指数であり、LD₅₀（集団の50%において致死的な化合物の量）とED₅₀（集団の50%において有効な化合物の量）間の比として表すことができる。高い治療指数を呈示する化合物が好ましい。細胞培養アッセイおよび／または動物試験から得られた治療指数データを、ヒトで使用するための投薬量範囲の処方用いることができる。かかる化合物の投薬量は、好ましくは、毒性が殆どまたは全くないED₅₀を含む血漿中濃度範囲内に存する。前記投薬量は、利用する剤形および利用する投与経路によってこの範囲内で変動し得る。例えば、Finglら、THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS、第1章、p.1、1975を参照のこと。正確な製剤、投与経路、および投薬量を、患者の容態、および化合物を使用する特定の方法にかんがみて、個々の医師が選択できる。

【0366】

いずれの理論にも拘束されることを望まないが、本明細書に記載するようなABDアルブミン結合ドメインとホルモンドメインのコンジュゲーションは、ABDコンジュゲーションを伴わないホルモンドメインに対する免疫応答の低下によって判断されるように、免疫原性減少を生じさせ得ると考えられる。例えば、国際公開第2009/016043号パンフレット参照（この参考文献は、その全体があらゆる目的のために出典明示により本明細書に援用されている）。

【実施例】

【0367】

VII. 実施例

【実施例1】

【0368】

改変ポリペプチド回収量

大腸菌発現ベクターへのクローニングのために、市販のソフトウェアを使用してタンパク質配列を設計し、DNA配列に逆翻訳した。配列をオリゴヌクレオチドとして得、標準PCR増幅法を用いて互いに縫い合わせたか、標準的な制限酵素を使用して既存の発現構築物からそれらを消化し、その後、互いに元どおりにライゲートした。対象となるタンパク質を発現する配列を、誘導発現のためのT7プロモーターと共に、pET45に配置した。構築物をシーケンシングによって検証した後、ベクターDNAを精製し、発現宿主、典型的にはBL2

10

20

30

40

50

1 (DE3) に形質転換した。単一コロニーを選択して、スターター培養物を4mL LB培地で約6時間増殖させた。900uLストックに100uLの80%グリセリンを添加することによってグリセリンストックを調製し、-80Cで保存した。所望により、500uLの非誘導試料をゲル分析用に確保した。125mL トンプソンフラスコの中で60uLのスターター培養物を使用して60mLの培養物（マジック培地）を接種し、30Cで一晩インキュベートした。250uLの試料を分析用に除去した。回転沈降させ、細胞ペレットを後のプロセッシングのために冷凍した。

【0369】

細菌細胞を採取し、その後、溶解して封入体を単離した。タンパク質が封入体内に存在したので、これらを可溶化し、タンパク質を4Cでリフォールディングした。その後、単一のバンドのみが残り、エンドトキシンレベルがインビボ試験に許容可能になるまで、サイズ排除クロマトグラフィーを使用してタンパク質を分離した。分析HPLC、RP-LC-MSおよびSDS-PAGEゲルを最終タンパク質に関する品質管理尺度として実行した。タンパク質を所定アリコートに分配し、-80Cで保存した。

【0370】

ここで説明した方法についての改変ポリペプチドの典型的な回収量を次の表5に提供する。驚くべきことに、上で説明した化合物および生産方法について観察された回収量は、以前に報告されたコンジュゲート種、例えばFc-レプチンおよびこれらに類するもので観察された回収量より顕著に高いものであり得る。さらに、特にレプチンコンジュゲートについて、レプチンの回収および取り扱いに関して一般に認識されている困難にもかかわらず、外来ABDドメインは、回収された改変ポリペプチドの発現、回収量、リフォールディング、収率または溶解度に悪影響を及ぼさなかった。

【表5】

表5. 改変ポリペプチドの回収量

化合物	回収量、mg/50mL 培養物
1	26.2
2	53.5
3	11.2
4	33.6

【実施例2】

【0371】

レプチンインビトロ機能活性。

方法。このアッセイは、修飾レプチン受容体を発現する細胞の処理後の受容体シグナル伝達を測定するものである。被験試料を純度100%と仮定し、再び溶媒和させて刺激緩衝液中10Xアッセイ濃度にした。合計で90uLの各10X化合物を深ウェルppプレートに移入し、Perkin Elmer Multiprobe（登録商標）IIおよびプログラム「MSV_Lep_Func_3-Fold_Dil-Deepwell_96.MPT」を使用して刺激緩衝液で系列（3倍系列）希釈した。200uLの各希釈化合物を移し、細胞を混合するMultiMek試験プログラム「MSV_Lep_Func_200ul_Transfer」を使用して、その系列希釈プレートを、当該技術分野において公知であるように、18時間レプチンから引き離したKeptin細胞の 2.5×10^5 細胞ペレットを含有する96刺激ウェルプレートに配合した。この時点で、プレートを接着プレートカバーで密封し、30分間、37Cで置いて、pSTAT5の刺激を可能にした。例えば、Crouseら、1998、J. Biol. Chem.、273:18365-18373参照。インキュベーション後、その刺激プレートを遠心分離して細胞を再沈降させ、上清を除去し、残存細胞ペレットを-80Cで（>30分）冷凍した。周囲室温で20分間、回転させながら100uLの1xライゼートを解凍した細胞ペレットに添加すること（Perkin Elmer pSTAT5アッセイキット）により、細胞ライゼートを作製した。ライゼートを2500rpmで20分間、清澄化し、製造業者の指示書に従ってpSTAT5アッセイキットで384ウェルProxiplate（商標）中の4uL/ウェルとして検査した。Alpha読み出しパラメータに設定したPackard Fusion α -FP HTプレートリーダーを使用して、pSTAT5シグナル（RFU）を判定

した。384ウェルProxiplate（商標）プレートにおいて11 μ Lの全容量でアッセイを完了し、値は、1用量点につきn=4アッセイウェルの平均を表す。

【0372】

下記の表6を参照すると、化合物C1-C6は、本明細書に記載の例示的レプチン、レプチン類似体およびレプチン誘導体である。具体的には、化合物C1は、本明細書に記載の配列番号20である。化合物2は、配列番号30（すなわち、A200）である。化合物C3は、位置78のシステイン残基を介して単一20kDaのポリエチレングリコール（PEG）部分が結合されている配列番号32である。当該技術分野において公知であるようなペプチドおよびタンパク質とPEGのコンジュゲーション方法。化合物C4は、配列番号20のN末端を介して単一の20kDa PEGが結合されている、配列番号20のPEG化誘導体である。化合物C5は、位置78のシステイン残基を介して単一の20kDa PEGが結合され、およびN末端を介して単一の20kDa PEGが結合されている、配列番号32の二重PEG化PEG誘導体である。化合物C6は、N末端を介して単一の40kDa PEGが結合されているPEG化誘導体である。

【0373】

結果。以下の表6に示すように、本明細書に記載する改変ポリペプチド（例えば、化合物1-4）は、Obeca STAT5アッセイにおいて、様々なコンジュゲートレプチンと比較して、同等の、およびさらには優れた機能活性を有する。

【表6】

表6：レプチンについてのインビトロ機能活性

化合物	分子または改変ポリペプチドのタイプ	EC ₅₀ nM (Obeca STAT5アッセイ)
C1	配列番号20	0.038
C2	配列番号30	0.855
C3	配列番号32-78Cを介して単一の20kDa PEG	0.319
C4	配列番号20-N末端を介して単一の20kDa PEG	0.275
C5	配列番号32二重PEG化（78Cを介して20kDa PEGおよびN末端を介して20kDa PEG）	2.262
C6	配列番号20-N末端を介して単一のPEG40kDa	0.355
1	配列番号53	0.628
2	配列番号54	0.530
3	配列番号55	0.095
4	配列番号56	0.103
9	配列番号57	0.185
12	配列番号58	1.052
13	配列番号59	0.116
14	配列番号60	0.406
15	配列番号61	0.427
16	配列番号62	0.411
17	配列番号63	0.468
18	配列番号64	0.322

【実施例3】

【0374】

単回投与後の体重の変化。

方法。この研究中、痩せたSprague Dawleyラットを低脂肪食で飼育した。研究開始時の

平均体重は319グラムであった。ラットを6群（n=6/群）に分けた。各群を次のうちのひとつを受けるように割り当てた：ビヒクル；ビヒクル中2.6mg/kgの化合物1；ビヒクル中2.7mg/kgの化合物2；ビヒクル中2.7mg/kgの化合物4；ビヒクル中10mg/kgの化合物2。各被験ラットは、時間=0に1回の皮下注射を受けた。食物摂取量および体重変化（%ビヒクル補正）を14日間モニターし、示すとおり（図1Aから1B）の結果を記録した。投与化合物：ビヒクル（四角）；2.6mg/kgの化合物1（上向き三角）；2.7mg/kgの化合物2（下向き三角）；2.7mg/kgの化合物4（菱形）；10mg/kgの化合物C2（丸）。

【0375】

結果。図1Aから1Bに示すように、各改変ポリペプチドの投与は、食物摂取量および体重を低下させる結果となった。すべての化合物を全化合物重量に基づいて当モル用量で与えた；化合物をすべて120nmol/kg（すなわち、化合物1を2.6mg/kg；化合物2および化合物4を2.7mg/kg；化合物C2を10mg/kg）で与えた。化合物2（すなわち、A200）は、各部分が、ヒトレプチンに融合したIgG1のFc領域から成る、2つの部分の二量体であることに留意すべきである。化合物1および化合物2は、化合物C2と同様の活性を有する。化合物C2は二量体であり、実際、1分子あたり2つのレプチンを有するからである。有効性（最低体重）は同様に見えるが、両方の改変ポリペプチドが化合物C2より好まれる傾向は明瞭である。1モルあたりのレプチンベースで見ると、化合物C2は各Fc-レプチン二量体複合体中に2モルのレプチンを有するが、ABD-レプチンの各1モルは1モルのレプチンしか有さないので、前記改変ポリペプチドのほうが食物摂取の抑制についても、体重の抑制についても優れている。

【0376】

以前の結果は、痩せたラットに持続注入によって与えたとき7日で9-10%体重減少を果たすためにおおよそ500ug/kg/日のA500化合物を必要とすることを示した。これは、5日で2.5mgのA500レプチン化合物、そして7日で3.5mgの化合物という結果になる。A500化合物自体は、16067.68gm/molであり、化合物2の分子量は、約22,510gm/molであるので、5日にわたってABD融合タンパク質のさらに1.4Xを必要とすると予想される。そうではなく、さらに1.08倍（2.7mg/2.5mg）の化合物しか与えられておらずこれは、驚くべき用量節約特性を示す。

【実施例4】

【0377】

化合物2の単回投与後の体重の変化。

方法。この研究中、痩せたSprague Dawleyラットを低脂肪食で飼育した。研究開始時の平均体重は324グラムであった。ラットを4群（n=6/群）に分けた。各群を次のうちのひとつを受けるように割り当てた：ビヒクル；ビヒクル中0.3mg/kgの化合物2；ビヒクル中1.0mg/kgの化合物2；ビヒクル中3.0mg/kgの化合物2。各被験ラットは、時間=0に1回の皮下注射を受けた。食物摂取量および体重変化（%ビヒクル補正）を14日間モニターし、示すとおり（図2Aから2B）の結果を記録した。投与化合物：ビヒクル（四角）；0.3mg/kgの化合物2（上向き三角）；1.0mg/kgの化合物2（下向き三角）；3.0mg/kgの化合物2（菱形）。

【0378】

結果。図2Aから2Bに示すように、改変ポリペプチド化合物2の各濃度での投与は、食物摂取量および体重を低下させる結果となった。用量応答が図2Bにおいて認められる。

【実施例5】

【0379】

化合物C2の単回投与後の体重の変化。

方法。この研究中、痩せたSprague Dawleyラットを低脂肪食で飼育した。研究開始時の平均体重は324グラムであった。ラットを4群（n=6/群）に分けた。各群を次のうちのひとつを受けるように割り当てた：ビヒクル；ビヒクル中の1.1mg/kgの化合物C2；ビヒクル中の3.3mg/kgの化合物C2；ビヒクル中の11.1mg/kgの化合物C2。各被験ラットは、時間=0に1回の皮下注射を受けた。食物摂取量および体重変化（%ビヒクル補正）を14日間モニタ

一し、示すとおり（図3Aから3B）の結果を記録した。投与化合物：ビヒクル（四角）；1.1mg/kgの化合物C2（丸）；3.3mg/kgの化合物C2（四角）；11.1mg/kgの化合物C2（上向き三角）。

【0380】

結果。図3Aから3Bに示すように、対照化合物C2の各濃度での投与は、食物摂取量および体重を低下させる結果となった。

【実施例6】

【0381】

化合物C6の単回投与後の体重の変化。

方法。この研究中、痩せたSprague Dawleyラットを低脂肪食で飼育した。研究開始時の平均体重は324グラムであった。ラットを2群（n=6/群）に分けた。各群を次のうちのひとつを受けるように割り当てた：ビヒクル；ビヒクル中2.2mg/kgの化合物C6。各被験ラットは、時間=0に1回の皮下注射を受けた。食物摂取量および体重変化（%ビヒクル補正）をモニターし、示すとおり（図4Aから4B）の結果を記録した。投与化合物：ビヒクル（四角）；2.2mg/kgでの化合物C6（下向き三角）。

10

【0382】

結果。図4Aから4Bに示すように、対照化合物C6の各濃度での投与は、食物摂取量および体重を低下させる結果となった。

【実施例7】

【0383】

20

DIOラットの体重の変化：

方法。平均おおよそ500グラムの食事誘導肥満（DIO）易発症Sprague Dawleyラットに被験化合物および対照化合物を第0日および第7日にIP注射した（1化合物につきn=6）。被験化合物は、配列番号54であり、それをビヒクル中1.3mg/kg/週で与えた。体重と食物摂取量の両方を研究期間の多数の時点（第0、4、7、12および14日）で測定した。投与化合物：ビヒクル（四角）；ビヒクル中の1.3mg/kgでの配列番号54（上向き三角）。

【0384】

結果。図5に示す結果は、週1回間隔でのIP注射がこの用量で前に見られたような3%体重減少を7日後に生じさせる結果となることを明示している。第二の注射により、ラットは体重を減少し続け、その結果、14日で約7-8%の累積体重減少（ビヒクル補正）となった。対照的に、また驚くべきことに、FC-レプチン（レプチンA200）での前の研究は、結果として、同様のDIOモデルにおいて第0日および第7日での注射で5mg/kg/週の投薬後14日でおおよそ4%体重減少しか生じさせなかった。

30

【実施例8】

【0385】

血漿中の改変ポリペプチドの検出

方法。平均おおよそ483グラムの食事誘導肥満（DIO）Sprague Dawleyラットを5群に分け、そのうちの2群に浸透圧ポンプを埋め込んだ。浸透圧ポンプを有する2群のうちの一方は、ビヒクルのみの持続皮下注入（CSI）を受け；他方は、ビヒクル中の配列番号33（すなわち、A500）のCISを250 μg/kg/日の用量で受けた。他の3群は、次のように処置した：一つの群は、ビヒクルのみの週1回の皮下注射をこの研究の第0、7、14および21日に受け；もう一つの群は、配列番号54（ABD-A500改変ポリペプチド）の週1回の皮下注射をこの研究の第0、7、14および21日に1.3mg/kgの用量で受け；残りの群は、配列番号54の週1回の皮下注射をこの研究の第0、7、14および21日に3.0mg/kgの用量で受けた。血液試料を各ラットから第27日に採取し、この日を研究終了日とした。

40

【0386】

結果。図6に示す結果は、1.3mg/kgでの配列番号54の週1回の注射が、配列番号33の持続注入によって達成されるものよりわずかに低い血漿中レベルを生じさせる結果となり；3.0mg/kgでの配列番号54の週1回の注射が配列番号33の持続注入によって達成されるものより顕著に高い血漿レベルを生じさせる結果となったことを明示している（左パネルと右パ

50

ネルを比較；各パネルのY軸の縮尺の差に注意）。

【実施例 9】

【0387】

改変ポリペプチドの単回投与後の体重の変化

方法。この研究中、痩せたSprague Dawleyラットを低脂肪食で飼育した。研究開始時の平均体重は330グラムであった。各被験ラット（ $n=5$ /群）は、時間=0に単回皮下注射を受けた。ラットを5群に分けた。各群を次のうちの一つを受けるように割り当てた：ビヒクル；ビヒクル中の配列番号54；ビヒクル中の配列番号56；ビヒクル中の配列番号58；ビヒクル中の配列番号59。配列番号54、56、58および59を、それぞれ、120nmol/kgの用量で供給した。各群についての体重の変化率を14日間モニターし、示すとおり（図7）の結果を記録した。

10

【0388】

結果。図7に示すように、試験した配列番号のうちの一つの単回注射を受けたラットの各群は、14日の長さの研究を通してビヒクルのみを受けた群に対して顕著で持続的な体重減少を呈示した。

【実施例 10】

【0389】

改変ポリペプチドの単回投与後の体重の変化

方法。この研究中、痩せたSprague Dawleyラットを低脂肪食で飼育した。研究開始時の平均体重は330グラムであった。ラットを6群（ $n=5$ /群）に分けた。各被験ラットは、時間=0に単回皮下注射を受けた。各群を次のうちの一つを受けるように割り当てた：ビヒクル；ビヒクル中の配列番号54；ビヒクル中の配列番号57；ビヒクル中の配列番号60；ビヒクル中の配列番号61；ビヒクル中の配列番号62。配列番号54、57、60、61および62を、それぞれ、120nmol/kgの用量で供給した。各群についての体重の変化率を14日間モニターし、示すとおり（図8）の結果を記録した。

20

【0390】

結果。図8に示すように、試験した配列番号のうちの一つの単回注射を受けたラットの各群は、ビヒクルのみを受けた群に対して顕著で持続的な体重の低下を呈示した。

【実施例 11】

【0391】

改変ポリペプチドの単回投与後の体重および食物摂取量の変化

方法。この研究中、痩せたSprague Dawleyラットを低脂肪食で飼育した。研究開始時の平均体重は317グラムであった。各被験ラット（ $n=7$ /群）は、時間=0に単回皮下注射を受けた。ラットを4群に分けた。各群を次のうちの一つを受けるように割り当てた：ビヒクル；ビヒクル中の配列番号54；ビヒクル中の配列番号63；ビヒクル中の配列番号64。配列番号54、63および64を、それぞれ、120nmol/kgの用量で供給した。各群についての食物摂取量および体重の変化率を14日間モニターし、示すとおり（それぞれ図9および9B）の結果を記録した。

30

【0392】

結果。図9Aおよび9Bに示すように、試験した配列番号のうちの一つの単回注射を受けたラットの各群は、ビヒクルのみを受けた群に対して食物摂取量（図9A）および体重（図9B）の顕著で持続的な低下を呈示した。

40

【実施例 12】

【0393】

改変ポリペプチドの単回投与後の体重の変化

方法。この研究中、痩せたSprague Dawleyラットを低脂肪食で飼育した。研究開始時の平均体重は330gであった。ラットを6群に分けた。各被験ラット（ $n=5$ /群）は、時間=0に単回皮下注射を受けた。各群を次のうちの一つを受けるように割り当てた：ビヒクル；ビヒクル中の配列番号54；ビヒクル中の配列番号67；ビヒクル中の配列番号68；ビヒクル中の配列番号69。配列番号54、67、68および69を、それぞれ、120nmol/kgの用量で供給し

50

た。各群についての体重の変化率を10日間モニターし、示すとおり（図10）の結果を記録した。

【0394】

結果。図10に示すように、試験した配列番号のうちの一つの単回注射を受けたラットの各群は、ビヒクルのみを受けた群に対して顕著で持続的な体重の低下を呈示した。

【実施例13】

【0395】

改変ポリペプチドの単回投与後の体重の変化

方法。この研究中、痩せたSprague Dawleyラットを低脂肪食で飼育した。研究開始時の平均体重は320グラムであった。ラットを6群に分けた。各被験ラット（n=5/群）は、時間=0に単回皮下注射を受けた。各群を次のうちの一つを受けるように割り当てた：ビヒクル；ビヒクル中の配列番号54；ビヒクル中の配列番号104；ビヒクル中の配列番号105；ビヒクル中の配列番号106；ビヒクル中の配列番号107。配列番号54、104、105、106および107を、それぞれ、120nmol/kgの用量で供給した。各群についての体重の変化率を9日間モニターし、示すとおり（図11Aから11C）の結果を記録した。

【0396】

結果。図11に示すように、試験した配列番号のうちの一つの単回注射を受けたラットの各群は、ビヒクルのみを受けた群に対して食物摂取量（図11A）および体重（図11Bおよび11C）の顕著で持続的な低下を呈示した。

【実施例14】

【0397】

アルブミン結合ポリペプチドに対する親和性判定

この実施例では、化合物2および化合物15を、アルブミンの種々の変異体に対する親和性について特性評価した。

材料および方法

【0398】

すべての研究を、BioRad ProteOn XPR36システムを用い、GLCセンサーチップを使用して25℃で行った。アミンカップリングのために、下で示すように水中の最初のストックから30倍希釈したスルホ-NHS/EDCの1：1混合物を使用して5分間、GLCチップを活性化した。各アルブミン試料を10mM 酢酸Na pH5.0中25ug/mLに希釈して、離れたセンサー表面に5分間注入した。その後、各表面を1Mエタノールアミン pH8.5でブロックした。各アルブミンをレゾナンスユニットでの2000-5000の密度でカップリングした。

【0399】

3倍希釈系列で5nMを最高濃度として使用して、改変ポリペプチドの結合を試験した。泳動緩衝液は、10mM HEPES pH7.4、150 mM NaCl、3 mM EDTAおよび0.005% tween-20を含有した。3倍希釈系列を用いてすべての試料を試験した。各濃度系列を二重反復で試験した。最高濃度についての解離相を3時間、モニターした。

結果。

【0400】

前記改変ポリペプチドについて測定された相対 K_D を下の表7に提示する。結果は、前記アルブミン結合ポリペプチドが高親和性で血清アルブミン（SA）と会合することを示す。

【表7】

表7：アルブミン変異体に対するアルブミン結合ポリペプチドの K_D

化合物名	ラットSA	ヒトSA	サルSA	イヌSA	マウスSA	単位
ABD00239（配列番号49）	18	16	123	201	1,240	pM
化合物2	33	56	158	358	1,970	
化合物15	<2	12	17	40	277	

【実施例15】

【0401】

アルブミンの存在下でのレプチンインビトロ機能活性。

このアッセイでは、アルブミンを刺激緩衝液に添加して、アルブミンの存在下で化合物2のレプチン機能を試験したことを除き、実施例2で説明した方法を用いた。試験したアルブミンは、0.1%または1%ウシ血清アルブミン（BSA）、1%ラット血清アルブミン（RSA）、または1%ヒト血清アルブミン（HSA）を含んだ。対照試料は、0.1%BSAを伴うA100レプチンであった。

【0402】

結果。図12に示すように、レプチン機能アッセイにおいて化合物2によって生成されたEC50活性に対して1%ウシ/ラット/ヒトアルブミンの影響はなかった。これらの結果は、
10

【実施例16】

【0403】

ラットにおける皮下注射後に改変ポリペプチドによってもたらされる持続型薬物動態プロファイル

この研究は、ラットにおいて化合物2および化合物15を、それらの血中濃度対時間プロファイル、すなわち薬物動態プロファイルを比較することにより評価するために行った。

【0404】

ラットを処置群に分けた。化合物2を30nmol/kg、60nmol/kg、または120nmol/kgで皮下投与した。投与前、ならびに投与後12、24、48、96および144時間の時点で外側尾静脈から血液試料を採取した。血漿中の化合物2の濃度を免疫酵素測定アッセイ（immunoenzymetric assay）法によって測定した。
20

【0405】

化合物15を120nmol/kgで皮下投与した。投与前、ならびに投与後0.5、1、2、4、6、24、48、72、96、120および144時間の時点で外側尾静脈から血液試料を採取した。血漿中の化合物15の濃度を免疫酵素測定アッセイ法によって測定した。

【0406】

化合物2（図13）および化合物15（図14）の両方が、持続型血漿体時間プロファイルを呈示した。
30

【実施例17】

【0407】

レプチン受容体によって伝達される改変ポリペプチドの効果

方法。痩せたSprague DawleyラットおよびZDFラットをこの研究に使用した。ZDFラットは、レプチンと有効に相互作用しない短縮されたレプチン受容体を生じさせる結果となる突然変異（fa）を有する。研究開始時の平均体重は225グラムであった。ラットを2群（n=5/群）に分けた。各群を次のうちのの一つを受けると割り当てた：ビヒクル；ビヒクル中2.7mg/kgの化合物2。各被験ラットは、時間=0に単回皮下注射を受けた。体重の変化（%ビヒクル補正）をモニターし、示すとおり（図15A、15B）の結果を記録した。投与化合物：ビヒクル（黒丸）；2.7mg/kgでの化合物2（黒四角）。
40

【0408】

結果。図15Aおよび15Bに示すように、化合物2はZDFラットにおいて意図した効果を生じず、これは、その効果がレプチン受容体によって伝達されることを示す。

【実施例18】

【0409】

改変ポリペプチドでの用量節約

この研究は、痩せたレプチン感受性ラットにおいて同様の体重減少量を達成するために必要とされるA500（配列番号33）の用量と化合物2（配列番号54）の用量を比較するものである。結果を図16に示す。120nmol/kg/週で投与した化合物2は、約18%体重減少（ビヒクル補正）を達成した。A500で同じ体重減少量を達成するのに、120nmol/kg/日のBID用量
50

、すなわち1週間の間に1680nmol/kg（1回の注射につき120×BIDのため2×7日）を必要とした。いずれの理論にも拘束されることを望まないが、この「用量節約」は、化合物2についてのA-500に比べて改善されたPKプロファイルに少なくとも一部は起因し得る。

【実施例 19】

【0410】

改変ポリペプチドの溶解度

下記の表8に示すように、本明細書に記載する改変ポリペプチドは、驚くべきことに、中性pHで高い溶解度を有する。

【0411】

溶解度は、次のアッセイで測定した：6–10mgの精製タンパク質を4℃で遠心式フィルターユニット（MWカットオフが3kDaである、Amicon Ultra-15またはUltra-4；Millipore）で0.5mL未満の体積に濃縮した。それらを14,000rpmで10分間、4℃で遠心分離して沈殿を除去し、上清を新たなチューブに移した。それらのタンパク質を一晩、室温で暗所にて放置して平衡させ、その後、0.22ミクロンシリンジフィルター（Milex GV；Millipore）で濾過して沈殿を除去した。OD280での吸光度をNanoDrop分光光度計で測定し、タンパク質の理論モル吸光係数を用いて濃度を算出した。

【表 8】

表8. 改変ポリペプチドの溶解度

化合物	pI*	pH 7.4での正味電荷*	PBS、pH 7.4への溶解度 (mg/mL) **
A100	6.2	-2.8	2.1
ABD1-A100 (配列番号147)	7.1	-0.7	8
A-500	6.2	-2.8	42.9
ABD1-A500 (化合物2)	7.1	-0.7	10.8
ABD1-HuSeal (化合物15)	10.0	+9.1	> 80

【実施例 20】

【0412】

改変ポリペプチドの安定性

下記の表9に示すように、本明細書に記載する改変ポリペプチドは、化学的に安定である。異なるpHの緩衝液中1mg/mLで化合物を製剤化した。表9に示すように、逆相高速液体クロマトグラフィー（HPLC）によって判定したところ、キメラポリペプチドは、40℃で2週間後に良好な効力（表9A）および純度（表9B）を有する。

【表 9】

表9A. 改変ポリペプチドの効力

化合物	逆相HPLCによる効力*、40℃で14日間							
	pH 3.0	pH 4.0	pH 5.0	pH 6.0	pH 7.0	pH 8.0	pH 9.0	PBS、pH 7.4
ABD1-HuSeal (化合物15)	102.7	107.2	104.9	108.5	107.3	100.1	90.7	104.5
ABD1-A500 (化合物2)	95.9	95.9	97.3	91.7	87.3	90.8	72.1	92.0
ABD1-A100 (配列番号147)	72.3	82.0	88.8	86.1	83.3	85.8	69.6	89.2

10

* 効力＝主ピーク面積／基準標準面積

【表 10】

表9B. 改変ポリペプチドの純度

化合物	逆相HPLCによる純度*、40℃で14日間							
	pH 3.0	pH 4.0	pH 5.0	pH 6.0	pH 7.0	pH 8.0	pH 9.0	PBS、pH 7.4
ABD1-HuSeal	96.7	98.0	98.5	99.8	97.6	93.8	95.1	97.1
ABD1-A500	94.9	96.2	96.8	97.3	96.9	97.5	82.7	97.4
ABD1-A100	70.0	79.4	85.4	86.5	86.8	86.8	70.9	87.8

20

【実施例 21】

【0413】

改変ポリペプチドの安定性

下記の表10に示すように、本明細書に記載する改変ポリペプチドは、化学的に安定である。次の緩衝液：10mM グルタミン酸、2%グリシン、1%スクロース、0.01% Tween 20、pH4.25、中の三つの異なる濃度で化合物15を製剤化し、5℃、15℃、または25℃で保存した。図10に示すように、HPLCによって判定したところ、化合物15は、10、20および30mg/mLで少なくとも1ヶ月間、5-25℃で化学的に安定している。

30

【表 1 1】

表10. 改変ポリペプチドの安定性

濃度 (mg/mL)	保存条件 (℃)	下記時点 (週) でRP-HPLCによる%効力		
		0	2	4
10	5	103.1	103.6	103.1
	15	103.1	102.7	102.0
	25	103.1	103.8	104.0
20	5	102.0	103.6	103.7
	15	102.0	103.6	104.1
	25	102.0	103.2	103.8
30	5	104.1	104.1	103.3
	15	104.1	103.7	104.0
	25	104.1	102.6	103.4

10

20

濃度 (mg/mL)	保存条件 (℃)	下記時点 (週) でSCX-HPLCによる%純度		
		0	2	4
10	5	97.6	97.3	97.7
	15	97.6	97.6	97.5
	25	97.6	97.4	96.0
20	5	97.9	97.7	97.6
	15	97.9	97.6	97.7
	25	97.9	97.4	96.4
30	5	97.7	97.6	97.7
	15	97.7	97.7	97.6
	25	97.7	97.3	97.2

30

【実施例 2 2】

【0 4 1 4】

改変ポリペプチドの安定性

40

下記の表11に示すように、本明細書に記載する改変ポリペプチドは、物理的に安定である。次の緩衝液：10mM グルタミン酸、2%グリシン、1%スクロース、0.01% Tween 20、pH4.25中の三つの異なる濃度で化合物15を製剤化し、37℃で保存した。図11に示すように、視覚分析によって判定したところ、化合物15は、10、20および30mg/mLで少なくとも1ヶ月間、物理的に安定している。

【表 1 2】

表11. 改変ポリペプチドの安定性

濃度 (mg/mL)	保存条件 (°C)	下記時点 (週) でのFiberLiteのもとでの外観			
		0	2	4	8
10	5	透明	透明	透明	透明
	15	透明	透明	透明	透明
	25	透明	透明	透明	透明
20	5	透明	透明	透明	透明
	15	透明	透明	透明	透明
	25	透明	透明	透明	透明
30	5	透明	透明	透明	透明
	15	透明	透明	透明	透明
	25	透明	透明	透明	わずかな濁りあり

10

【実施例 2 3】

【0 4 1 5】

改変ポリペプチドの安定性

本明細書に記載する改変ポリペプチドは、物理的に安定している。表12は、A100、ABD1-HuSeal、およびABD1-A500で行ったサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) の結果を示すものである。前記改変ポリペプチドは、A100と比較して、二量体／オリゴマーの自己会合を殆どまたは全く示さない。

20

【表 1 3】

表12. 改変ポリペプチドの安定性

化合物	Pk 1 (%)	Pk 2 (%)	Pk 3 (%)
ABD1-HuSeal	99.22	0.78	該当なし
ABD1-A500	96.73	3.27	該当なし
A100	88.21	11.15	0.65

30

Pk1＝単量体

Pk2＝二量体

Pk3＝オリゴマー（三量体／四量体）

SEC法：

カラム-Tosoh TSK Gel G3000 SWxl 7.8mmx30cm (#08541)

移動相-10mM リン酸Na、pH 7.4+238mM NaCl+ 2.7mM KCl

実行時間-22分

流量-0.8mL/分

カラム温度-25℃

試料温度-5℃

試料負荷量-40ug

検出-214nm

40

【実施例 2 4】

【0 4 1 6】

アミリンとレプチンの相乗作用が高BMI対象では存在しない

前の研究により、体重500-550グラムのラットでアミリン／レプチン相乗作用が説明された。有効性とBMIの逆相関に気付いた後、本発明者らは、非常に肥満したラット（750グラム）において、および薬物での処置を開始する前に中等度肥満範囲（500-550 g）範囲に餌を制限した非常に肥満したラットにおいて、前記組み合わせの効果を評価した。

50

【0417】

この研究では、非常に肥満したラット（750g）の一群に自由に餌を食べさせ、アミリン、レプチン、またはアミリン+レプチンの組み合わせで処置した。アミリンは有効であったが、レプチンの追加での明らかな相乗作用はなかった。非常に肥満したラット（750g）の第二群は、相乗作用が以前に実証された500–550g範囲に、カロリーを制限した。その後、これらのラットのアミリン/レプチン処置を開始し、餌を自由に食べさせた。図17は、この研究の結果を示す。ビヒクルおよびレプチン単剤療法処置ラットでの急速な体重増加が明白であった。多少の体重維持がアミリン単剤療法で達成された。前記組み合わせでさらなる体重維持は達成されなかった。これらの所見は、「高BMI」齧歯動物での相乗作用の欠如は、ダイエット導入（diet-lead in）によって簡単に救うことができないことを示唆している。

10

【実施例25】

【0418】

改変ポリペプチドとアミリンアゴニストの相乗作用

この研究により、ABD1–A500（化合物2）と共投与したときにPEG–ラットアミリン（Des–Lys1–[Lys26（mPEG40K）]–ラットアミリン、化合物124）の週1回投与が相乗作用に十分なものであるかどうかを検査した。比較のため、ABD1–A500を注入ラットアミリンとも共投与した（図18A）。図18Bは、PEG–ラットアミリンによって誘導される体重減少のほうが、多少遅く、小規模ではあるが、全体重減少量（および相乗作用）は、注入ラットアミリンによって達成されるものと質的に同様であることを示す。平均体重500gの雄食

20

【実施例26】

【0419】

改変ポリペプチドとアミリンアゴニストの相乗作用

この研究は、注入ラットアミリンと共投与したときにABD1–HuSeal（化合物15）の週1回の投与が相乗作用に十分なものであることを明らかにしている。図19は、前記改変ポリペプチドと注入アミリンの組み合わせが、結果として、それぞれの薬剤単独で観察された結果より低い食物摂取量（図19A）および大きい体重減少（図19B）を生じさせたことを示す。平均体重500gの雄DIO HSDラットに、ABD1–HuSealを120nmol/kgで投与し、アミリンを50 μ g/kg/日でSC浸透圧ミニポンプによって投与した。

30

【実施例27】

【0420】

改変ポリペプチドとアミリンアゴニストの相乗作用

この研究は、PEG–ラットアミリン（Des–Lys1–[Lys26（mPEG40K）]–ラットアミリン、化合物124）と共投与したときにABD1–HuSeal（化合物15）の週1回の投与が相乗作用に十分なものであることを明らかにしている。図20は、前記改変ポリペプチドとPEG–アミリンの組み合わせが、結果として、それぞれの薬剤単独で観察された結果より大きい体重減少を生じさせたことを示す。平均体重500gの雄DIO HSDラットに、ABD1–HuSealを120

40

【実施例28】

【0421】

高BMI集団における改変ポリペプチドとアミリンアゴニストの相乗作用

図21Aは、体重500–550グラムのラットにおけるアミリン/レプチン相乗作用を説明した前の研究の結果を示すものである。図21Bは、この相乗作用が、ラット（700gの平均体重）の高BMI集団では観察されないことを示す。図21Cは、高BMIラットにおいてPEG–ラットアミリン（Des–Lys1–[Lys26（mPEG40K）]–ラットアミリン、化合物124）の週2回の投与と共投与したときにABD1–A500（化合物15）の週1回の投与が相乗作用に十分なものであることを示す。平均体重700gの雄DIO HSDラットに、ABD1–A500を120nmol/kgで投

50

与し、PEG-アミリンを125nmol/kgで投与した。

【実施例 29】

【0422】

高BMI集団における改変ポリペプチドとアミリンアゴニストの相乗作用

この研究は、高BMIラットに注入ラットアミリンと共投与したときにABD1-HuSeal（化合物15）またはABD1-A500（化合物2）の週1回投与が相乗作用に十分なものであることを明らかにしている。平均体重700gの雄DIO HSDラットに、ABD1-HuSeal（図22A）またはABD1-A500（図22B）を120nmol/kgで投与し、アミリンを50 μg/kg/日でSC浸透圧ミニポンプによって投与した。

【実施例 30】

【0423】

非肥満、1型糖尿病マウスにおける改変ポリペプチドの抗糖尿病効果

この研究の目的は、1型真性糖尿病（T1DM）の高用量STZマウスモデルにおいて重要な糖尿病および代謝エンドポイントに対する改変ポリペプチドのインビボ効果を評価することであった。C57 BL/6雄マウスに200mg/kgのSTZの単回腹腔内注射を施して、1型糖尿病を誘導した。化合物を週2回、120nmol/kgで2週間、皮下投与した。測定エンドポイントには、HbA1c レベル、血糖値、体重および食物摂取量が含まれた。

【0424】

図23は、化合物15と化合物2の両方が、STZ誘導糖尿病マウスにおいて血糖を正規化したことを示す。両方の改変ポリペプチドは、図24に示すようにヘモグロビンA1cレベルも低下させ、図25に示すように体重および累積食物摂取量も低下させた。

【0425】

治療法の血糖降下効果が、インスリン効果に起因しないことを保証するために、低用量のインスリンでのレプチン療法を併用するもう一つの研究を行った。T1DMの高用量STZマウスモデルにおいて、0.05U/日の用量のインスリンを追加してまたはせずに、化合物15を投与した。C57 BL/6雄マウスに175mg/kgでのSTZの単回腹腔内注射を施して、1型糖尿病を誘導した。化合物を2週間にわたって週2回、60nmol/kgで皮下投与した。測定エンドポイントには、HbA1c レベル、血糖値、体重および食物摂取量が含まれた。

【0426】

図26は、化合物15についての相加的様式で低用量のインスリンで強化された血糖降下効果を示す。これは、図27に示すようにヘモグロビンA1cレベルも低下させ、図28に示すように、体重および累積食物摂取量も低下させた。

VIII. 実施形態

【0427】

本明細書に記載する改変ポリペプチド、それらの使用方法、および医薬組成物のさらなる実施形態を以下に示す：

【0428】

実施形態1. アルブミン結合ドメインポリペプチド（ABD）と、レプチン、レプチン類似体またはそれらの活性断片から選択された第一のペプチドホルモンドメイン（HD1）とを含む、改変ポリペプチド。

【0429】

実施形態2. 前記HD1に共有結合で連結された第一のリンカー（L1）をさらに含む、実施形態1に記載の改変ポリペプチド。

【0430】

実施形態3. 前記改変ポリペプチドが、前記ABDをN末端部分として、および前記HD1をC末端部分として含む、実施形態1または2に記載の改変ポリペプチド。

【0431】

実施形態4. 前記改変ポリペプチドが、前記ABDをC末端部分として、および前記HD1をN末端部分として含む、実施形態1または2に記載の改変ポリペプチド。

【0432】

10

20

30

40

50

実施形態5. 構造：ABD-HD1を含む、実施形態3に記載の改変ポリペプチド。

【0433】

実施形態6. 構造：ABD-L1-HD1を含む、実施形態3に記載の改変ポリペプチド。

【0434】

実施形態7. 構造：HD1-ABDを含む、実施形態4に記載の改変ポリペプチド。

【0435】

実施形態8. 構造：HD1-L1-ABDを含む、実施形態4に記載の改変ポリペプチド。

【0436】

実施形態9. 前記HD1が、前記レプチン、レプチン類似体、レプチン活性断片、またはレプチン誘導体である、実施形態1から8のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

10

【0437】

実施形態10. 前記HD1が、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、および配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号143、配列番号144、配列番号145および配列番号146から成る群より選択されたアミノ酸配列と少なくとも50%の同一性を有する、実施形態1から9のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0438】

20

実施形態11. 前記HD1が、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、および配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号143、配列番号144、配列番号145および配列番号146から成る群より選択されたアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有する、実施形態1から9のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0439】

実施形態12. 前記HD1が、ヒトレプチンと少なくとも50%の同一性を有する、実施形態1から11のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

30

【0440】

実施形態13. 前記HD1が、ヒトレプチンと少なくとも90%の同一性を有する、実施形態1から12のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0441】

実施形態14. 前記HD1が、配列番号20と少なくとも50%の同一性を有する、実施形態1から13のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0442】

実施形態15. 前記HD1が、配列番号20と少なくとも90%の同一性を有する、実施形態1から14のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

40

【0443】

実施形態16. 前記HD1が、カモノハシレプチンと少なくとも50%の同一性を有する、実施形態1から15のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0444】

実施形態17. 前記HD1が、アザラシレプチンと少なくとも50%の同一性を有する、実施形態1から16のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0445】

実施形態18. 前記HD1が、挿入、欠失、付加および置換のいずれか一つまたは組み合わせから独立して選択された1から5のアミノ酸修飾を有する、実施形態1から17のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

50

【0446】

実施形態19. 前記HD1が、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号143、配列番号144、配列番号145および配列番号146から成る群より選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から18のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0447】

10

実施形態20. 前記HD1が、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号143、配列番号144、配列番号145および配列番号146から成る群より選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態1から19のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0448】

実施形態21. 前記HD1が配列番号1である、実施形態1から20のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

20

【0449】

実施形態22. 前記HD1が配列番号2である、実施形態1から20のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0450】

実施形態23. 前記HD1が配列番号3である、実施形態1から20のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0451】

実施形態24. 前記HD1が配列番号4である、実施形態1から20のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

30

【0452】

実施形態25. 前記HD1が配列番号5である、実施形態1から20のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0453】

実施形態26. 前記HD1が配列番号6である、実施形態1から20のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0454】

実施形態27. 前記HD1が配列番号7である、実施形態1から20のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0455】

40

実施形態28. 前記HD1が配列番号8である、実施形態1から20のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0456】

実施形態29. 前記HD1が配列番号9である、実施形態1から20のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0457】

実施形態30. 前記HD1が配列番号10である、実施形態1から20のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0458】

実施形態31. 前記HD1が配列番号11である、実施形態1から20のいずれか一つに記載の改

50

変ポリペプチド。

【0459】

実施形態32. 前記HD1が配列番号12である、実施形態1から20のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0460】

実施形態33. 前記HD1が配列番号13である、実施形態1から20のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0461】

実施形態34. 前記HD1が配列番号14である、実施形態1から20のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

10

【0462】

実施形態35. 前記HD1が配列番号15である、実施形態1から20のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0463】

実施形態36. 前記HD1が配列番号16である、実施形態1から20のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0464】

実施形態37. 前記HD1が配列番号17である、実施形態1から20のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0465】

20

実施形態38. 前記HD1が配列番号18である、実施形態1から20のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0466】

実施形態39. 前記HD1が配列番号19である、実施形態1から20のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0467】

実施形態40. 前記HD1が配列番号20である、実施形態1から20のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0468】

実施形態41. 前記HD1が配列番号21である、実施形態1から20のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

30

【0469】

実施形態42. 前記HD1が配列番号22である、実施形態1から20のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0470】

実施形態43. 前記HD1が配列番号23である、実施形態1から20のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0471】

実施形態44. 前記HD1が配列番号24である、実施形態1から20のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

40

【0472】

実施形態45. 前記HD1が配列番号25である、実施形態1から20のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0473】

実施形態46. 前記HD1が配列番号26である、実施形態1から20のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0474】

実施形態47. 前記HD1が配列番号27である、実施形態1から20のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0475】

50

実施形態48. 前記HD1が配列番号28である、実施形態1から20のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0476】

実施形態49. 前記HD1が配列番号29である、実施形態1から20のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0477】

実施形態50. 前記HD1が配列番号30である、実施形態1から20のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0478】

実施形態51. 前記HD1が配列番号31である、実施形態1から20のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。 10

【0479】

実施形態52. 前記HD1が配列番号32である、実施形態1から20のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0480】

実施形態53. 前記HD1が配列番号33である、実施形態1から20のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0481】

実施形態54. 前記ABDが、アミノ酸配列：

GVSD X₅ YK X₈ X₉ I X₁₁ X₁₂ A X₁₄ TVEGV X₂₀ AL X₂₃ X₂₄ X₂₅ I (配列番号34) 20

(式中、互いに独立して、

X₅は、YおよびFから選択され；

X₈は、N、RおよびSから選択され；

X₉は、V、I、L、M、FおよびYから選択され；

X₁₁は、N、S、EおよびDから選択され；

X₁₂は、R、KおよびNから選択され；

X₁₄は、KおよびRから選択され；

X₂₀は、D、N、Q、E、H、S、RおよびKから選択され；

X₂₃は、K、IおよびTから選択され；

X₂₄は、A、S、T、G、H、LおよびDから選択され；ならびに 30

X₂₅は、H、EおよびDから選択される)

から成るアルブミン結合モチーフ (ABM) を含む、実施形態1から53のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0482】

実施形態55. 互いに独立して

X₅が、Yであり；

X₈が、Nであり；

X₂₃が、TまたはIであり；

X₂₄がSまたはLであり；および

X₂₅が、EまたはHである、 40

実施形態1から54のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0483】

実施形態56. 前記アルブミン結合モチーフが、GVSDYYKNLINKAKTVEGV EALTLHI (配列番号114) およびGVSDYYKNLINKAKTVEGV EALISEI (配列番号115) から成る群より選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態1から55のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0484】

実施形態57. 前記ABDが、GVSDYYKNLINNAKTVEGV KALIDEI (配列番号35) ではないアルブミン結合モチーフ (ABM) を含む、実施形態1から56のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0485】

実施形態58. 前記ABDが、表1に開示するABMを含む、実施形態1から57のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0486】

実施形態59. 前記ABDが、アミノ酸配列：

LAEAK X_a X_b A X_c X_d EL X_e KY — [ABM] — LAALP (配列番号36)

(式中、

[ABM] は、アルブミン結合モチーフであり、ならびに

互いに独立して、

X_aは、VおよびEから選択され；

X_bは、L、EおよびDから選択され；

X_cは、N、LおよびIから選択され；

X_dは、RおよびKから選択され；

X_eは、DおよびKから選択され；

位置45のロイシンは、存在し、または存在せず；ならびに

位置46のプロリンは、存在する、または存在しない)

を含む、実施形態1から58のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0487】

実施形態60. 互いに独立して

X_aがEであり；

X_bがDであり；

X_cがIであり；および

X_dがKである、

実施形態1から59のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0488】

実施形態61. 前記アルブミン結合ドメインポリペプチド (ABD) が、

LAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALTLHILAALP (配列番号50)；およびLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALISEILAALP (配列番号51)

から成る群より選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態1から60のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0489】

実施形態62. 前記ABDが、アミノ酸配列：

LAEAK X_a X_b A X_c X_d EL X_e KY — [ABM] — LAALP (配列番号36)

(式中、

[ABM] は、アルブミン結合モチーフであり、ならびに

互いに独立して、

X_aは、VおよびEから選択され；

X_bは、L、EおよびDから選択され；

X_cは、N、LおよびIから選択され；

X_dは、RおよびKから選択され；

X_eは、DおよびKから選択され；

位置45のロイシンは、存在し、または存在せず；

位置46のプロリンは、存在し、または存在せず；ならびに

ABMは、アミノ酸配列：

GVSD X₅ YK X₈ X₉ I X₁₁ X₁₂ A X₁₄ TVEGV X₂₀ AL X₂₃ X₂₄ X₂₅ I (配列番号34)

から成り、この式中、互いに独立して、

X₅は、YおよびFから選択され；

X₈は、N、RおよびSから選択され；

X₉は、V、I、L、M、FおよびYから選択され；

X₁₁は、N、S、EおよびDから選択され；

X₁₂は、R、KおよびNから選択され；

10

20

30

40

50

X₁₄は、KおよびRから選択され；
X₂₀は、D、N、Q、E、H、S、RおよびKから選択され；
X₂₃は、K、IおよびTから選択され；
X₂₄は、A、S、T、G、H、LおよびDから選択され；ならびに
X₂₅は、H、EおよびDから選択される）

を含む、実施形態1から61のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0490】

実施形態63. 前記ABDが、配列番号 37、配列番号 38、配列番号39、配列番号40、配列番号41、配列番号42、配列番号43、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号49、配列番号50、配列番号51、および配列番号52から成る群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態1から62のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

10

【0491】

実施形態64. 前記ABDが、以下のものから成る群より選択されたペプチドのいずれか一つを含む、実施形態1から63のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド：

LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKSYINRAKTVEGVHTLIGHILAALP（配列番号38）、
LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVNALTHHILAALP（配列番号39）、
LAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINRARTVEGVHALIDHILAALP（配列番号40）、
LAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP（配列番号41）、
LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKNLINRAKTVEGVSSLKGHILAALP（配列番号42）、
LAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALTLHILAALP（配列番号43）、
LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKNLINRAKTVEGVDALIAHILAALP（配列番号44）、
LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKSLINRAKTVEGVDALTSHILAALP（配列番号45）、
LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKNLINRAKTVEGVNSLTSHILAALP（配列番号46）、
LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKNVINKAKTVEGVEALIADILAALP（配列番号47）、
LAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVQALIAHILAALP（配列番号48）、
LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP（配列番号49）、
LAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALTLHILAALP（配列番号50）、
LAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALISEILAALP（配列番号51）、およびLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKRLISKAKTVEGVKALISEILAALP（配列番号52）。

20

30

【0492】

実施形態65. 前記リンカーL1が、アミノ酸数1から30またはアミノ酸数30未満のペプチドである、実施形態1から64のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0493】

実施形態66. 前記リンカーL1が、20の天然に存在するアミノ酸から選択される、実施形態1から65のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0494】

実施形態67. 前記リンカーL1が、化学合成、翻訳後化学修飾によって、または宿主細胞での組換え発現によるインビボ組み込みによって組み込まれた非天然アミノ酸である、実施形態1から66のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

40

【0495】

実施形態68. 前記リンカーL1アミノ酸が、セリン、グリシン、アラニン、プロリン、アスパラギン、グルタミン、グルタメート、アスパルテートおよびリシンから選択される、実施形態1から67のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0496】

実施形態69. 前記リンカーL1が、立体障害のない大多数のアミノ酸を含む、実施形態1から68のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0497】

実施形態70. 前記リンカーL1が、酸性リンカー、塩基性リンカーおよび構造モチーフのうちの一つ以上を含む、実施形態1から69のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

50

【0498】

実施形態71. 前記リンカーL1が、ポリグリシン、ポリアラニン、ポリ (Gly-Ala)、またはポリ (Gly-Ser) を含む、実施形態1から70のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0499】

実施形態72. 前記リンカーL1が、(Gly)₃、(Gly)₄または(Gly)₅のポリグリシンを含む、実施形態1から71のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0500】

実施形態73. 前記リンカーL1が、(Gly)₃Lys (Gly)₄; (Gly)₃AsnGlySer (Gly)₂; (Gly)₃Cys (Gly)₄; およびGlyProAsnGlyGlyを含む、実施形態1から72のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

10

【0501】

実施形態74. 前記リンカーL1が、GlyとAlaの組み合わせを含む、実施形態1から73のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0502】

実施形態75. 前記リンカーL1が、GlyとSerの組み合わせを含む、実施形態1から74のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0503】

実施形態76. 前記リンカーL1が、GlyとGluの組み合わせを含む、実施形態1から75のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

20

【0504】

実施形態77. 前記リンカーL1が、GlyとLysの組み合わせを含む、実施形態1から76のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0505】

実施形態78. 前記リンカーL1が、[Gly-Ser]_n、[Gly-Gly-Ser]_n、[Gly-Gly-Gly-Ser]_nおよび[Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]_n (これらの式中、nは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10である) から成る群より選択された配列を含む、実施形態1から77のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0506】

実施形態79. 前記リンカーL1が、[Gly-Glu]_n; [Gly-Gly-Glu]_n; [Gly-Gly-Gly-Glu]_n; [Gly-Gly-Gly-Gly-Glu]_n; [Gly-Asp]_n; [Gly-Gly-Asp]_n; [Gly-Gly-Gly-Asp]_n; [Gly-Gly-Gly-Gly-Asp]_n (これらの式中、nは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10である) から成る群より選択された配列を含む、実施形態1から78のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

30

【0507】

実施形態80. 前記リンカーL1が、[Gly-Glu]_n; [Gly-Gly-Glu]_n; [Gly-Gly-Gly-Glu]_n; [Gly-Gly-Gly-Gly-Glu]_n; [Gly-Asp]_n; [Gly-Gly-Asp]_n; [Gly-Gly-Gly-Asp]_n; [Gly-Gly-Gly-Gly-Asp]_n (これらの式中、nは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10である) から成る群より選択された配列を含む、実施形態1から79のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

40

【0508】

実施形態81. 前記リンカーL1が、[Gly-Lys]_n; [Gly-Gly-Lys]_n; [Gly-Gly-Gly-Lys]_n; [Gly-Gly-Gly-Gly-Lys]_n; [Gly-Arg]_n; [Gly-Gly-Arg]_n; [Gly-Gly-Gly-Arg]_n; [Gly-Gly-Gly-Gly-Arg]_n (これらの式中、nは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10である) から成る群より選択された配列を含む、実施形態1から80のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0509】

実施形態82. 前記リンカーL1が、[Glu-Ala-Ala-Ala-Lys]_n (これらの式中、nは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10である) から成る群より選択された配列を含む、実施形態1から81のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

50

【0510】

実施形態83. 前記リンカーL1が、[Gly-Gly-Glu]₆、[Gly-Gly-Lys]₆、[Glu-Ala-Ala-Ala-Lys]₃、[Glu-Ala-Ala-Ala-Lys]₄、または[Glu-Ala-Ala-Ala-Lys]₅から成る群より選択された配列を含む、実施形態1から81のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0511】

実施形態84. 前記リンカーL1が、N末端TGジペプチドを含む、実施形態1から83のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0512】

実施形態85. 前記リンカーL1が、C末端ASジペプチドを含む、実施形態1から84のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

10

【0513】

実施形態86. 前記リンカーL1が、N末端TGジペプチドおよびC末端ASジペプチドを含む、実施形態1から85のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0514】

実施形態87. 前記リンカーL1が、TG-(GGGS)₁、TG-(GGGS)₂、TG-(GGGS)₃、TG-(GGGS)₄、TG-(GGGS)₅、(GGGS)₁-AS、(GGGS)₂-AS、(GGGS)₃-AS、(GGGS)₄-AS、(GGGS)₅-AS、TG-(GGGS)₁-AS、TG-(GGGS)₂-AS、TG-(GGGS)₃-AS、TG-(GGGS)₄-AS、およびTG-(GGGS)₅-ASから成る群より選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態1から86のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

20

【0515】

実施形態88. 前記TGジペプチドTGおよび／または前記ジペプチドASが、存在しないか、またはT、A、SおよびGから選択された一对のアミノ酸によって置換されている、実施形態1から87のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0516】

実施形態89. 前記ポリペプチドが、一つ以上の追加のリンカーをさらに含む、実施形態1から88のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0517】

実施形態90. 配列番号53、配列番号54、配列番号55、配列番号56、配列番号57、配列番号58、配列番号59、配列番号60、配列番号61、配列番号62、配列番号63、配列番号64、配列番号65、配列番号66、配列番号67、配列番号68、配列番号69、配列番号70、配列番号71、配列番号72、配列番号73、配列番号74、配列番号75、配列番号76、配列番号77、配列番号78、配列番号79、配列番号80、配列番号81、配列番号82、配列番号83、配列番号84、配列番号85、配列番号86、配列番号87、配列番号88、配列番号89、配列番号90、配列番号91、配列番号92、配列番号93、配列番号94、配列番号95、配列番号96、配列番号97、配列番号98、配列番号99、配列番号100、配列番号101、配列番号102、配列番号103、配列番号104、配列番号105、配列番号106および配列番号107から成る群より選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から89のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

30

【0518】

実施形態91. 配列番号53で示される選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から90のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

40

【0519】

実施形態92. 配列番号54で示される選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から90のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0520】

実施形態93. 配列番号55で示される選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から90のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0521】

実施形態94. 配列番号56で示される選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から90のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

50

【0522】

実施形態95. 配列番号57で示される選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から90のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0523】

実施形態96. 配列番号58で示される選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から90のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0524】

実施形態97. 配列番号59で示される選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から90のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0525】

実施形態98. 配列番号60で示される選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から90のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0526】

実施形態99. 配列番号61で示される選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から90のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0527】

実施形態100. 配列番号62で示される選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から90のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0528】

実施形態101. 配列番号63で示される選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から90のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0529】

実施形態102. 配列番号64で示される選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から90のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0530】

実施形態103. 配列番号65で示される選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から90のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0531】

実施形態104. 配列番号66で示される選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から90のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0532】

実施形態105. 配列番号67で示される選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から90のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0533】

実施形態106. 配列番号68で示される選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から90のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0534】

実施形態107. 配列番号69で示される選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から90のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0535】

実施形態108. 配列番号70で示される選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から90のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0536】

実施形態109. 配列番号71で示される選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から90のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0537】

実施形態110. 配列番号72で示される選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から90のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0538】

実施形態111. 配列番号73で示される選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から90

10

20

30

40

50

のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0539】

実施形態112. 配列番号74で示される選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から90のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0540】

実施形態113. 配列番号75で示される選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から90のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0541】

実施形態114. 配列番号76で示される選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から90のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

10

【0542】

実施形態115. 配列番号77で示される選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から90のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0543】

実施形態116. 配列番号78で示される選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から90のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0544】

実施形態117. 配列番号79で示される選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から90のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0545】

20

実施形態118. 配列番号80で示される選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から90のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0546】

実施形態119. 配列番号81で示される選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から90のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0547】

実施形態120. 配列番号82で示される選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から90のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0548】

実施形態121. 配列番号83で示される選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から90のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

30

【0549】

実施形態122. 配列番号84で示される選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から90のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0550】

実施形態123. 配列番号85で示される選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から90のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0551】

実施形態124. 配列番号86で示される選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から90のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

40

【0552】

実施形態125. 配列番号87で示される選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から90のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0553】

実施形態126. 配列番号88で示される選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から90のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0554】

実施形態127. 配列番号89で示される選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から90のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0555】

50

実施形態128. 配列番号90で示される選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から90のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0556】

実施形態129. 配列番号91で示される選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から90のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0557】

実施形態130. 配列番号92で示される選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から90のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0558】

実施形態131. 配列番号93で示される選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から90のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。 10

【0559】

実施形態132. 配列番号94で示される選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から90のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0560】

実施形態133. 配列番号95で示される選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から90のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0561】

実施形態134. 配列番号96で示される選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から90のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。 20

【0562】

実施形態135. 配列番号97で示される選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から90のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0563】

実施形態136. 配列番号98で示される選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から90のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0564】

実施形態137. 配列番号99で示される選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から90のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0565】

実施形態138. 配列番号100で示される選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から90のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。 30

【0566】

実施形態139. 配列番号102で示される選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から90のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0567】

実施形態140. 配列番号102で示される選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から90のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0568】

実施形態141. 配列番号103で示される選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から90のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。 40

【0569】

実施形態142. 配列番号104で示される選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から90のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0570】

実施形態143. 配列番号105で示される選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から90のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0571】

実施形態144. 配列番号106で示される選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から90のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。 50

【0572】

実施形態145. 配列番号107で示される選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から90のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0573】

実施形態146. 解離定数が約 10^{-6} mol/L未満の血清アルブミンに対する親和性を有する、実施形態1から145のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0574】

実施形態147. 解離定数が約 10^{-9} mol/L未満の血清アルブミンに対する親和性を有する、実施形態1から146のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0575】

実施形態148. 解離定数が約 10^{-12} mol/L未満の血清アルブミンに対する親和性を有する、実施形態1から147のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0576】

実施形態149. 少なくとも1日の作用持続時間を有する、実施形態1から148のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0577】

実施形態150. 少なくとも3日の作用持続時間を有する、実施形態1から149のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0578】

実施形態151. 少なくとも5日の作用持続時間を有する、実施形態1から150のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0579】

実施形態152. ヒト対象において少なくとも5日の作用持続時間を有する、実施形態1から151のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0580】

実施形態153. 対象の疾患または障害を処置するための方法であって、それを必要とする対象に実施形態1から152および170から192のいずれか一つに記載の改変ポリペプチドを該疾患または障害の処置に有効な量で投与することを含む方法。

【0581】

実施形態154. 前記疾患または障害が、リポジストロフィー、脂質異常症、高脂血症、過体重、肥満、視床下部性無月経、アルツハイマー病、レプチン欠損症、脂肪性肝疾患、糖尿病（I型およびII型を含む）、非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）、非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）およびメタボリックシンドロームXであり得る疾患または障害である、実施形態153に記載の方法。

【0582】

実施形態155. 前記疾患または障害が、リポジストロフィー、脂質異常症、高脂血症、過体重、肥満、視床下部性無月経、アルツハイマー病、レプチン欠損症、脂肪性肝疾患または糖尿病である、実施形態153または実施形態154に記載の方法。

【0583】

実施形態156. 前記疾患または障害が、I型糖尿病またはII型糖尿病である、実施形態153から155のいずれか一つに記載の方法。

【0584】

実施形態157. 前記疾患または障害が肥満である、実施形態153から155のいずれか一つに記載の方法。

【0585】

実施形態158. 前記疾患または障害が、リポジストロフィーまたはレプチン欠損症である、実施形態153から155のいずれか一つに記載の方法。

【0586】

実施形態159. 実施形態1から152のいずれか一つに記載の改変ポリペプチドと医薬的に許容し得る賦形剤とを含む医薬組成物。

10

20

30

40

50

【0587】

実施形態160. 注射用医薬組成物である、実施形態159に記載の医薬組成物。

【0588】

実施形態161. 持続放出性または長期持続性医薬組成物である、実施形態159から160のいずれか一つに記載の医薬組成物。

【0589】

実施形態162. 1日1回用医薬組成物である、実施形態159から161のいずれか一つに記載の医薬組成物。

【0590】

実施形態163. 週1回用医薬組成物である、実施形態159から161のいずれか一つに記載の医薬組成物。

10

【0591】

実施形態164. 対象の疾患または障害を処置するための、実施形態159から163のいずれか一つに記載の医薬組成物。

【0592】

実施形態165. 前記疾患または障害が、リポジストロフィー、脂質異常症、高脂血症、過体重、肥満、視床下部性無月経、アルツハイマー病、レプチン欠損症、脂肪性肝疾患、糖尿病（I型およびII型を含む）、非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）、非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）およびメタボリックシンドロームXである、実施形態159から164のいずれか一つに記載の医薬組成物。

20

【0593】

実施形態166. 前記疾患または障害が、リポジストロフィー、脂質異常症、高脂血症、過体重、肥満、視床下部性無月経、アルツハイマー病、レプチン欠損症、脂肪性肝疾患または糖尿病である、実施形態164または実施形態165に記載の方法。

【0594】

実施形態167. 前記疾患または障害が、I型糖尿病またはII型糖尿病である、実施形態164から166のいずれか一つに記載の方法。

【0595】

実施形態168. 前記疾患または障害が肥満である、実施形態164から166のいずれか一つに記載の方法。

30

【0596】

実施形態169. 前記疾患または障害が、リポジストロフィーまたはレプチン欠損症である、実施形態164から166のいずれか一つに記載の方法。

【0597】

実施形態170. 前記HD1が、以下のものから成る群より選択される、実施形態1から18のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド：

(a) 配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号143、配列番号144、配列番号145および配列番号146から成る群より選択されたレプチンのアミノ酸配列1-146であって、異なるアミノ酸が、位置4、32、33、35、50、64、68、71、74、77、78、89、97、100、102、105、106、107、108、111、118、136、138、142および145のうちの1カ所以上で置換されており、（位置28のグルタミル残基が不存在の場合でさえ）同じナンバリングを保持している、アミノ酸配列；

40

(b) 位置28のグルタミル残基が存在しない、サブパート（a）のアミノ酸配列；

(c) メチオニル残基がN末端に付加されている、サブパート（a）または（b）のアミノ酸配列；

(d)

50

- (i) アミノ酸98-146；
 - (ii) アミノ酸1-32；
 - (iii) アミノ酸40-116；
 - (iv) アミノ酸1-99および112-146；
 - (v) アミノ酸100-111のうちの一つ以上がアミノ酸99と112の間に位置する、アミノ酸1-99および112-146；
 - (vi) アミノ酸100、102、105、106、107、108、111、118、136、138、142および145のうちの一つ以上が別のアミノ酸で置換されている、サブパート (i) のアミノ酸配列；
 - (vii) アミノ酸4、8および32のうちの一つ以上が別のアミノ酸で置換されているサブパート (ii) のアミノ酸配列；
 - (viii) アミノ酸50、53、60、64、66、67、68、71、74、77、78、89、97、100、102、105、106、107、108、111および112のうちの一つ以上が別のアミノ酸で置換されている、サブパート (iii) のアミノ酸配列；
 - (ix) アミノ酸4、8、32、33、35、48、50、53、60、64、66、67、68、71、74、77、78、89、97、112、118、136、138、142および145のうちの一つ以上が別のアミノ酸で置換されている、サブパート (iv) のアミノ酸配列；および
 - (x) アミノ酸4、32、33、35、50、64、68、71、74、77、78、89、97、100、102、105、106、107、108、111、118、136、138、142、および145のうちの一つ以上が別のアミノ酸で置換されている、サブパート (v) のアミノ酸配列；
 - (xi) メチオニンがN末端に付加されている、サブパート (i) - (x) のいずれかのアミノ酸配列；
- から成る群より選択された (a)、(b) または (c) のアミノ酸配列の断片から成るレプチン；
- (e) サブパート (a) から (d) のいずれかのアミノ酸配列であって、化学部分に結合されているアミノ酸配列；
- (f) 前記化学部分が水溶性ポリマー部分である、サブパート (e) のアミノ酸配列；
- (g) 前記水溶性ポリマー部分が、ポリエチレングリコール、エチレングリコール／プロピレングリコールコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ-1, 3-ジオキソラン、ポリ-1, 3, 6-トリオキサン、エチレン／無水マレイン酸コポリマー、ポリアミノ酸ホモポリマー、ポリアミノ酸ランダムコポリマー、アルブミン、Fcタンパク質、ポリ(n-ビニルピロリドン) ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド／エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒド (polyethylene glycolpropionadehyde)、スクシネートおよびスチレンから成る群より選択される、サブパート (f) のアミノ酸配列；
- (h) 前記水溶性ポリマー部分がポリエチレングリコールである、サブパート (g) のアミノ酸配列；および
- (i) 前記水溶性ポリマーが、アルブミン、抗体、Fcタンパク質およびポリリシン部分から成る群より選択されたポリアミノ酸である、サブパート (g) のアミノ酸配列。

【0598】

実施形態171. 前記HD1が、一つ以上のアミノ酸置換が施された、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号143、配列番号144、配列番号145および配列番号146から成る群より選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から18および170のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0599】

【 0 6 0 0 】

10

20

30

40

50

【 0 6 0 5 】

10

【 0 6 0 6 】

20

【 0 6 0 7 】

30

【 0 6 0 8 】

【 0 6 0 9 】

實施形態1

40

【 0 6 1 0 】

50

【 0 6 1 1 】

10

【 0 6 1 2 】

20

【 0 6 1 3 】

30

【 0 6 1 4 】

40

【 0 6 1 5 】

50

および配列番号146から成る群より選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から18および171のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0616】

実施形態189. 前記HD1が、18のアミノ酸置換が施された、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号143、配列番号144、配列番号145および配列番号146から成る群より選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から18および171のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

10

【0617】

実施形態190. 前記HD1が、19のアミノ酸置換が施された、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号143、配列番号144、配列番号145および配列番号146から成る群より選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から18および171のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

20

【0618】

実施形態191. 前記HD1が、20のアミノ酸置換が施された、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号143、配列番号144、配列番号145および配列番号146から成る群より選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から18および171のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0619】

30

実施形態192. 前記HD1が、21のアミノ酸置換が施された、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号143、配列番号144、配列番号145および配列番号146から成る群より選択されたアミノ酸配列を含む、実施形態1から18および171のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0620】

実施形態193. 前記HD1が配列番号143である、実施形態1から20のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

40

【0621】

実施形態194. 前記HD1が配列番号144である、実施形態1から20のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0622】

実施形態195. 前記HD1が配列番号145である、実施形態1から20のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0623】

実施形態196. 前記HD1が配列番号146である、実施形態1から20のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

50

【0624】

上記説明は、例証を目的として提供する実施例と共に、本発明を開示するものであるが、本発明の実施が、請求項記載の本発明の範囲内である通常の変型、適応または修飾のすべてを包含することは言うまでもない。したがって、説明および実施例は、添付の請求項によって明確に記述されている本発明の範囲を限定するものと解釈すべきではない。

IX. 非公式配列表

【0625】

本明細書に開示する配列の非公式配列表は、以下のとおりである：

- VPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHT-Xaa-SVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTL SKM DQTLAVYQQILTSMPSRNV IQ
ISNDLENLRDLLHVLA FSKSCHLPQASGLETLES LGVLEASGYSTE VVALSRLQGS LQDMLQQLDLSPGC（式中、
位置28のXaaは、Qであるか存在しない）（配列番号1）； 10
- MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHT-Xaa-SVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTL SKMDQTLAVYQQILTSMPSRNV IQ
ISNDLENLRDLLHVLA FSKSCHLPQASGLETLES LGVLEASGYSTE VVALSRLQGS LQDMLQQLDLSPGC、（式中
、位置29のXaaは、Qであるか存在しない）（配列番号2）；
- VPIWRVQDDTKTLIKTIVTRISDISHMQSVSSKQRTGLDFIPGLHPVLSLSKMDQTLAIYQQILTS LPSRNV IQISNDL
ENLRDLLHLLASSKSCPLPQARALETLES LGVLEASLYSTE VVALSRLQGA LQDMLRQLDLSPGC（配列番号3）
；
- MVPIWRVQDDTKTLIKTIVTRISDISHMQSVSSKQRTGLDFIPGLHPVLSLSKMDQTLAIYQQILTS LPSRNV IQISND
LENLRDLLHLLASSKSCPLPQARALETLES LGVLEASLYSTE VVALSRLQGA LQDMLRQLDLSPGC（配列番号4） 20
；
- VPICKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHT-Xaa-SVSSKQRTGLDFIPGLHPLLSLSKMDQTLAIYQQILTS LPSRNVVQ I
SNDLENLRDLLHLLAASKSCPLPQVRALESLES LGVLEASLYSTE VVALSRLQGS LQDMLRQLDLSPGC、（式中、
位置28のXaaは、Qであるか存在しない）（配列番号5）；
- MVPICKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHT-Xaa-SVSSKQRTGLDFIPGLHPLLSLSKMDQTLAIYQQILTS LPSRNVVQ
ISNDLENLRDLLHLLAASKSCPLPQVRALESLES LGVLEASLYSTE VVALSRLQGS LQDMLRQLDLSPGC、（式中
、位置29のXaaは、Qであるか存在しない）（配列番号6）；
- mhwgtl c g f l w p y l f y v q a p i q k v q d d t k t l i k t i v t r i n d i s h t q s v s s k q k v t g l d f i p g l h p i l t l s k m d q t l a
v y q q i l t s m p s r n v i q i s n d l e n r d l l h v l a f s k s c h l p w a s g l e t l d s l g v l e a s g y s t e v v a l s r l q g s l q d m l w
q l d l s p g c（配列番号7）；
- VPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISH-Xaa-Xaa-SVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTL SKMDQTLAVYQQILTSMPSRNV 30
IQISNDLENLRDLLHVLA FSKSCHLPWASGLETDSLGGVLEASGYSTE VVALSRLQGS LQDMLWQLDLSPGC、（式
中、位置27のXaaは、TまたはAであり；および位置28のXaaは、Qであるか存在しない）（
配列番号8）；
- MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISH-Xaa-Xaa-SVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTL SKMDQTLAVYQQILTSMPSRN
VIQISNDLENLRDLLHVLA FSKSCHLPWASGLETDSLGGVLEASGYSTE VVALSRLQGS LQDMLWQLDLSPGC、（式
中、位置28のXaaは、TまたはAであり；および位置29のXaaは、Qであるか存在しない）（
配列番号9）；
- VPIQKVQSDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQRTGLDFIPGLHPVLTLSQMDQTLAIYQQILINLPSRNV IQISNDL
ENLRDLLHLLAFSKSCHLPASGLETLES LGDVLEASLYSTE VVALSRLQGS LQDMLWQLDLSPGC（配列番号10）
； 40
- MVPIQKVQSDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQRTGLDFIPGLHPVLTLSQMDQTLAIYQQILINLPSRNV IQISND
LENLRDLLHLLAFSKSCHLPASGLETLES LGDVLEASLYSTE VVALSRLQGS LQDMLWQLDLSPGC（配列番号11
）；
- VPIHKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSARQRTGLDFIPGLHPILSL SKMDQTLAVYQQILTS LPSQNV LQIAHDL
ENLRDLLHLLAFSKSCSLPQTRGLQKPESLDGVLEASLYSTE VVALSRLQGS LQDILQQLDLSPEC（配列番号12）
；
- MVPIHKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSARQRTGLDFIPGLHPILSL SKMDQTLAVYQQILTS LPSQNV LQIAHD
LENLRDLLHLLAFSKSCSLPQTRGLQKPESLDGVLEASLYSTE VVALSRLQGS LQDILQQLDLSPEC（配列番号13
）；
- ISIEKIQADTKTLTKTIIITRIIQLSTQNGVSTDQRVSGLD FIPGNQQFQNLADMDQTLAVYQQILSSLPMPDRTQISNDL 50

ENLRSLFALLATLKNCPFTRSDGLDTMEIWGGIVEESLYSTEVVTLDRLRKSLKNIEKQLDHIQG (配列番号14)

;

MRCILLYGFLCVWQHLYYSHPISEKIQADTKTLTKTIITRIIQLSTQNGVSTDQRVSGLDIFIPGNQQFQNLADMDDTLA
VYQQILSSLPMPDRTQISNDLENLRSLFALLATLKNCPFTRSDGLDTMEIWGGIVEESLYSTEVVTLDRLRKSLKNIEKQ
LDHIQG (配列番号15) ;

VPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISNDL
ENLRDLLHVLAFAFSKCHLPWASGLETLDLGGVLEASGYSTEVALSRLQGSQDMLWQLDLSPGC (配列番号16)

;

VPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHAQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISNDL
ENLRDLLHVLAFAFSKCHLPWASGLETLDLGGVLEASGYSTEVALSRLQGSQDMLWQLDLSPGC (配列番号17)

10

;

VPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISNDL
NLRDLLHVLAFAFSKCHLPWASGLETLDLGGVLEASGYSTEVALSRLQGSQDMLWQLDLSPGC (配列番号18)

;

VPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHASVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISNDL
NLRDLLHVLAFAFSKCHLPWASGLETLDLGGVLEASGYSTEVALSRLQGSQDMLWQLDLSPGC (配列番号19)

;

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISND
LENLRDLLHVLAFAFSKCHLPWASGLETLDLGGVLEASGYSTEVALSRLQGSQDMLWQLDLSPGC (配列番号20
) ;

20

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHAQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISND
LENLRDLLHVLAFAFSKCHLPWASGLETLDLGGVLEASGYSTEVALSRLQGSQDMLWQLDLSPGC (配列番号21
) ;

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISNDL
ENLRDLLHVLAFAFSKCHLPWASGLETLDLGGVLEASGYSTEVALSRLQGSQDMLWQLDLSPGC (配列番号22)

;

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHASVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISNDL
ENLRDLLHVLAFAFSKCHLPWASGLETLDLGGVLEASGYSTEVALSRLQGSQDMLWQLDLSPGC (配列番号23)

;

PIQRVQDDTKTLIKTIITRINDISPPQGVCSRPRVAGLDFIPRVQSVRTLSGMDQILATYQQILTSQSRVSVQIANDLA
NLRALLRLASAKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRASVHSTEVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (配列番号24)

30

;

PIQRVQDDTKTLIKTIITRINDISPPQGVCSRPRVAGLDFIPRVQSVRTLSGMDQILATYQQILTSQSRNVIQISNDL
NLRDLLHVLAFAFSKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRASVHSTEVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (配列番号25)

;

PIQRVQDDTKTLIKTIITRINDISPPQGVSSRPRVAGLDFIPRVQSVRTLSGMDQILATYQQILTSQSRNVIQISNDL
NLRDLLHVLAFAFSKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRASVHSTEVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (配列番号26)

;

MPIQRVQDDTKTLIKTIITRINDISPPQGVCSRPRVAGLDFIPRVQSVRTLSGMDQILATYQQILTSQSRVSVQIANDL
ANLRALLRLASAKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRASVHSTEVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (配列番号27)

40

;

MPIQRVQDDTKTLIKTIITRINDISPPQGVCSRPRVAGLDFIPRVQSVRTLSGMDQILATYQQILTSQSRNVIQISNDL
ENLRDLLHVLAFAFSKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRASVHSTEVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (配列番号28)

;

MPIQRVQDDTKTLIKTIITRINDISPPQGVSSRPRVAGLDFIPRVQSVRTLSGMDQILATYQQILTSQSRNVIQISNDL
ENLRDLLHVLAFAFSKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRASVHSTEVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (配列番号29)

;

MDKTHTCPPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVHLQDNLGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKVPPIQKVQDDTKT

50

L I K T I V T R I N D I S H T Q S V S S K Q K V T G L D F I P G L H P I L T L S K M D Q T L A V Y Q Q I L T S M P S R N V I Q I S N D L E N L R D L L H V L A F S K S C H L P W A S G L E T L D S L G G V L E A S G Y S T E V V A L S R L Q G S L Q D M L W Q L D L S P G C (配列番号30) ;

M V P I Q K V Q D D T K T L I K T I V T R I N D I S H T Q S V S S K Q K V T G L D F I P G L H P I L T L S K M D Q T L A V Y Q Q I L T S M P S R N V I Q I S N D L E N L R D L L H V L A F S K S C H L P Q A S G L E T L D S L G G V L E A S G Y S T E V V A L S R L Q G S L Q D M L Q Q L D L S P G C (配列番号31) ;

M V P I Q K V Q D D T K T L I K T I V T R I N D I S H T Q S V S S K Q K V T G L D F I P G L H P I L T L S K M D Q T L A V Y Q Q I L T S M P S R N V I Q I C N D L E N L R D L L H V L A F S K S C H L P W A S G L E T L D S L G G V L E A S G Y S T E V V A L S R L Q G S L Q D M L W Q L D L S P G C (配列番号32) ; これに20キルダルトン (kDa) PEG部分が位置78のシステイン残基を介して結合されている ;

M V P I Q K V Q D D T K T L I K T I V T R I N D I S H T Q S V S S K Q K V T G L E F I P G L H P I L T L S K M D Q T L A V Y Q Q I L T S M P S R N V I Q I S N D L E N L R D L L H V L A F S K S C H L P Q A S G L E T L E S L G G V L E A S G Y S T E V V A L S R L Q G S L Q D M L Q Q L D L S P G C (配列番号33) ;

10

G V S D X₅ Y K X₈ X₉ I X₁₁ X₁₂ A X₁₄ T V E G V X₂₀ A L X₂₃ X₂₄ X₂₅ I (配列番号34) (式中、X₅、X₈、X₉、X₁₁、X₁₂、X₁₄、X₂₀、X₂₃、X₂₄およびX₂₅は、本明細書に記載のとおりである) ;

G V S D Y Y K N L I N N A K T V E G V K A L I D E I (配列番号35) ;

L A E A K X_a X_b A X_c X_d E L X_e K Y - [A B M] - L A A L P (配列番号36) (式中、A B M、X_a、X_b、X_c、X_dおよびX_eは、本明細書に記載のとおりである) ;

L A E A K V L A N R E L D K Y G V S D Y Y K N L I N N A K T V E G V K A L I D E I L A A L P (配列番号37) ;

L A E A K V L A N R E L D K Y G V S D F Y K S Y I N R A K T V E G V H T L I G H I L A A L P (配列番号38) ;

20

L A E A K V L A N R E L D K Y G V S D F Y K R L I N A K T V E G V N A L T H H I L A A L P (配列番号39) ;

L A E A K V L A N R E L D K Y G V S D Y Y K N L I N R A T V E G V H A L I D H I L A A L P (配列番号40) ;

L A E A K V L A N R E L D K Y G V S D Y Y K N I I N R A K T V E G V R A K L H I L A A L P (配列番号41) ;

L A E A K V L A N R E L D K Y G V S D F Y K N L I N R A K T V E G V S S L K G H I L A A L P (配列番号42) ;

L A E A K V L A N R E L D K Y G V S D Y Y K N L I N A K T V E G V E A L T L H I L A A L P (配列番号43) ;

L A E A K V L A N R E L D K Y G V S D F Y K N L I N R A K T V E G V D A L I A H I L A A L P (配列番号44) ;

L A E A K V L A N R E L D K Y G V S D F Y K S L I N R A K T V E G V D A L T S H I L A A L P (配列番号45) ;

L A E A K V L A N R E L D K Y G V S D F Y K N L I N R A K T V E G V N S L T S H I L A A L P (配列番号46) ;

L A E A K V L A N R E L D K Y G V S D F Y K N V I N A K T V E G V E A L I A D I L A A L P (配列番号47) ;

L A E A K V L A N R E L D K Y G V S D Y Y K N L I N A K T V E G V Q A L I A H I L A A L P (配列番号48) ;

30

L A E A K V L A N R E L D K Y G V S D F Y K R L I N A K T V E G V E A K L H I L A A L P (配列番号49) ;

L A E A K E D A I K E L D K Y G V S D Y Y K N L I N A K T V E G V E A L T L H I L A A L P (配列番号50) ;

L A E A K E D A I K E L D K Y G V S D Y Y K N L I N A K T V E G V E A L I S E I L A A L P (配列番号51) ;

L A E A K E D A I K E L D K Y G V S D Y Y K R L I S A K T V E G V K A L I S E I L A A L P (配列番号52) ;

M L A E A K V L A N R E L D K Y G V S D F Y K R L I N A K T V E G V E A K L H I L A A L P T G G G G A S V P I Q K V Q D D T K T L I K T I V T R I N D I S H T Q S V S S K Q K V T G L E F I P G L H P I L T L S K M D Q T L A V Y Q Q I L T S M P S R N V I Q I S N D L E N L R D L L H V L A F S K S C H L P Q A S G L E T L E S L G G V L E A S G Y S T E V V A L S R L Q G S L Q D M L Q Q L D L S P G C (配列番号53) ;

M L A E A K V L A N R E L D K Y G V S D F Y K R L I N A K T V E G V E A K L H I L A A L P T G G G G S G G G S G G G S G G G S A S V P I Q K V Q D D T K T L I K T I V T R I N D I S H T Q S V S S K Q K V T G L E F I P G L H P I L T L S K M D Q T L A V Y Q Q I L T S M P S R N V I Q I S N D L E N L R D L L H V L A F S K S C H L P Q A S G L E T L E S L G G V L E A S G Y S T E V V A L S R L Q G S L Q D M L Q Q L D L S P G C (配列番号54) ;

40

M V P I Q K V Q D D T K T L I K T I V T R I N D I S H T Q S V S S K Q K V T G L E F I P G L H P I L T L S K M D Q T L A V Y Q Q I L T S M P S R N V I Q I S N D L E N L R D L L H V L A F S K S C H L P Q A S G L E T L E S L G G V L E A S G Y S T E V V A L S R L Q G S L Q D M L Q Q L D L S P G C T G G G S A S L A E A K V L A N R E L D K Y G V S D F Y K R L I N A K T V E G V E A K L H I L A A L P (配列番号55) ;

M V P I Q K V Q D D T K T L I K T I V T R I N D I S H T Q S V S S K Q K V T G L E F I P G L H P I L T L S K M D Q T L A V Y Q Q I L T S M P S R N V I Q I S N D L E N L R D L L H V L A F S K S C H L P Q A S G L E T L E S L G G V L E A S G Y S T E V V A L S R L Q G S L Q D M L Q Q L D L S P G C T G G G S G G G S G G G S G G G S A S L A E A K V L A N R E L D K Y G V S D F Y K R L I N A K T V E G V E A K L H I L A A L P (配列番号56) ;

M L A E A K V L A N R E L D K Y G V S D F Y K R L I N A K T V E G V E A K L H I L A A L P T G G G G S G G G S G G G S G G G S A S I S I E K I Q A D T K T L T K T I I T R I I Q L S T Q N G V S T D Q R V S G L D F I P G N Q Q F Q N L A D M D Q T L A V Y Q Q I L S S L P M P D R T Q I S N D L E N L R S L F A L L A T L K N C P F T R S D G L D T M E I W G G I V E E S L Y S T E V V T L D R L R K S L K N I E K Q L D H I Q G C (配列番号57) ;

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

50

IKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTL SKMDQTLAVYQQILTSMP SRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFS
K SCHLPWASGLETLD SLGGVLEASGYSTE VVALSRLQGS LQDMLWQLDLSPGC (配列番号58) ;
MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTL SKMDQTLAVYQQILTSMP SRNVIQISND
LENLRDLLHVLAFSK SCHLPWASGLETLD SLGGVLEASGYSTE VVALSRLQGS LQDMLWQLDLSPGCTGGGSGGGSGGG
SGGGSASLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKHLILAALP (配列番号59) ;
MLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKHLILAALPTGGGSGGGSGGGSGGGSASPIQRVQDDTKTLI
KTIIITRINDISP PQGVCSRPRVAGLDFIPRVQSVRTLSGMDQILATYQQILTSLQSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSK
SCPVPARGSDTIKGLGNVLRASVHSTE VVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (配列番号60) ;
MLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKHLILAALPTGGGSGGGSGGGSGGGSASPIQRVQDDTKTLI
KTIIITRINDISP PQGVSSRPRVAGLDFIPRVQSVRTLSGMDQILATYQQILTSLQSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSK
SCPVPARGSDTIKGLGNVLRASVHSTE VVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (配列番号61) ;
MLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKHLILAALPTGPIQRVQDDTKTLIKTIIITRINDISP PQGVCS
PRVAGLDFIPRVQSVRTLSGMDQILATYQQILTSLQSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCPVPARGSDTIKGLGNV
LRASVHSTE VVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (配列番号62) ;
MLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKHLILAALPTGGGSGGGSGGGSGGGSASVPIQKVQDDTKTL
IKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTL SKMDQTLAVYQQILTSMP SRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFS
K SCHLPWASGLETLD SLGGVLEASGYSTE VVALSRLQGS LQDMLWQLDLSPGC (配列番号63) ;
MLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKHLILAALPTGGGSGGGSGGGSGGGSASVPIQKVQDDTKTL
IKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLEFIPGLHPILTL SKMDQTLAVYQQILTSMP SRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFS
K SCHLPQASGLETLES LGGVLEASGYSTE VVALSRLQGS LQDMLQQLDLSPGC (配列番号64) ;
MLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKHLILAALPTGGGSGGGSGGGSGGGSASVPIQKVQDDTKTL
IKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTL SKMDQTLAVYQQILTSMP SRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFS
K SCHLPQASGLETLD SLGGVLEASGYSTE VVALSRLQGS LQDMLQQLDLSPGC (配列番号65) ;
MLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKHLILAALPTGLAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKAAAA
SVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLEFIPGLHPILTL SKMDQTLAVYQQILTSMP SRNVIQISND
LENLRDLLHVLAFSK SCHLPQASGLETLES LGGVLEASGYSTE VVALSRLQGS LQDMLQQLDLSPGC (配列番号66
) ;
MLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKHLILAALPTGGEGEGEGEGEGEGEGEGEASVPIQKVQDDTKT
LIKTIIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLEFIPGLHPILTL SKMDQTLAVYQQILTSMP SRNVIQISNDLENLRDLLHVLA
FSK SCHLPQASGLETLES LGGVLEASGYSTE VVALSRLQGS LQDMLQQLDLSPGC (配列番号67) ;
MLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKHLILAALPTGGKGGKGGKGGKGGKGGKASVPIQKVQDDTKT
LIKTIIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLEFIPGLHPILTL SKMDQTLAVYQQILTSMP SRNVIQISNDLENLRDLLHVLA
FSK SCHLPQASGLETLES LGGVLEASGYSTE VVALSRLQGS LQDMLQQLDLSPGC (配列番号68) ;
MLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKHLILAALPTGGGSGGGSGGGSGGGSASVPIQKVQDDTKTL
IKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLEFIPGLHPILTL SKMDQTLAVYQQILTSMP SRNVIQISNDLENLRDLLHVLA
FSK SC SLPQASGLETLES LGEVLEASGYSTE VVALSRLQGS LQDILQQLDLSPEC (配列番号69) ;
MLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALTLHILAALPTGGGGASVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISH
TQSVSSKQKVTGLEFIPGLHPILTL SKMDQTLAVYQQILTSMP SRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSK SCHLPQASGLET
LES LGGVLEASGYSTE VVALSRLQGS LQDMLQQLDLSPGC (配列番号70) ;
MLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALTLHILAALPTGGGSGGGSGGGSGGGSASVPIQKVQDDTKTL
IKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLEFIPGLHPILTL SKMDQTLAVYQQILTSMP SRNVIQISNDLENLRDLLHVLA
FSK SCHLPQASGLETLES LGGVLEASGYSTE VVALSRLQGS LQDMLQQLDLSPGC (配列番号71) ;
MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLEFIPGLHPILTL SKMDQTLAVYQQILTSMP SRNVIQISND
LENLRDLLHVLAFSK SCHLPQASGLETLES LGGVLEASGYSTE VVALSRLQGS LQDMLQQLDLSPGCTGGGSGGGSGGG
SGGGSASLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALTLHILAALP (配列番号72) ;
MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLEFIPGLHPILTL SKMDQTLAVYQQILTSMP SRNVIQISND
LENLRDLLHVLAFSK SCHLPQASGLETLES LGGVLEASGYSTE VVALSRLQGS LQDMLQQLDLSPGCTGGGSGGGSGGG
SGGGSASLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALTLHILAALP (配列番号73) ;
MLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALTLHILAALPTGGGSGGGSGGGSGGGSASISIEKIQADTKTL
TKTIIITRIIQLSTQNGVSTDQRVSGLDFIPGNQQFQNLADMQTLAVYQQILSSLPMPDRTQISNDLENLRSLFALLATL

10

20

30

40

50

KNCPFTRSDGLDTMEIWGGIVEESLYSTEVVTLDRRLKSLKNIKQLDHIQGC (配列番号74) ;

MLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALTHILAALPTGGGGSGGGSGGGSGGGSSASVPIQKVQDDTKTL
IKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFS
KSCHLPWASGLETLDLGGVLEASGYSTEVALSRLQGSQDMLWQLDLSPGC (配列番号75) ;

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISND
LENLRDLLHVLAFSKSCHLPWASGLETLDLGGVLEASGYSTEVALSRLQGSQDMLWQLDLSPGCTGGGGSGGGSGGG
SGGGSSASLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALTHILAALP (配列番号76) ;

MLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALTHILAALPTGGGGSGGGSGGGSGGGSSASPIQRVQDDTKTLI
KTIITRINDISPQGVCSRPRVAGLDFIPRVQSVRTLSGMDQILATYQQILTSLSQSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSK
SCVPARGSDTIKGLGNVLRASVHSTEVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (配列番号77) ;

MLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALTHILAALPTGGGGSGGGSGGGSGGGSSASPIQRVQDDTKTLI
KTIITRINDISPQGVSSRPRVAGLDFIPRVQSVRTLSGMDQILATYQQILTSLSQSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSK
SCVPARGSDTIKGLGNVLRASVHSTEVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (配列番号78) ;

MLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALTHILAALPTGPIQRVQDDTKTLIKTIITRINDISPQGVCS
PRVAGLDFIPRVQSVRTLSGMDQILATYQQILTSLSQSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCVPARGSDTIKGLGNV
LRASVHSTEVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (配列番号79) ;

MLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALTHILAALPTGGGGSGGGSGGGSGGGSSASVPIQKVQDDTKTL
IKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFS
KSCHLPWASGLETLDLGGVLEASGYSTEVALSRLQGSQDMLWQLDLSPGC (配列番号80) ;

MLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALTHILAALPTGGGGSGGGSGGGSGGGSSASVPIQKVQDDTKTL
IKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLEFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFS
KSCHLPQASGLETLESLLGGVLEASGYSTEVALSRLQGSQDMLQQLDLSPGC (配列番号81) ;

MLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALTHILAALPTGGGGSGGGSGGGSGGGSSASVPIQKVQDDTKTL
IKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFS
KSCHLPQASGLETLDLGGVLEASGYSTEVALSRLQGSQDMLQQLDLSPGC (配列番号82) ;

MLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALTHILAALPTGLAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAA
SVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLEFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISND
LENLRDLLHVLAFSKSCHLPQASGLETLESLLGGVLEASGYSTEVALSRLQGSQDMLQQLDLSPGC (配列番号83
) ;

MLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALTHILAALPTGGEGGEGGEGGEGGEGGEASVPIQKVQDDTKT
LIKTIIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLEFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISNDLENLRDLLHVLA
FSKSCHLPQASGLETLESLLGGVLEASGYSTEVALSRLQGSQDMLQQLDLSPGC (配列番号84) ;

MLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALTHILAALPTGGKGGKGGKGGKGGKGGKASVPIQKVQDDTKT
LIKTIIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLEFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISNDLENLRDLLHVLA
FSKSCHLPQASGLETLESLLGGVLEASGYSTEVALSRLQGSQDMLQQLDLSPGC (配列番号85) ;

MLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALTHILAALPTGGGGSGGGSGGGSGGGSSASVPIQKVQDDTKTL
IKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLEFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISNDLENLRDLLHVLA
FSKSCSLPQASGLETLESLLGEVLEASGYSTEVALSRLQGSQDILQQLDLSPGC (配列番号86) ;

MLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALiseILAALPTGGGGASVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISH
TQSVSSKQKVTGLEFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCHLPQASGLET
LESLLGGVLEASGYSTEVALSRLQGSQDMLQQLDLSPGC (配列番号87) ;

MLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALiseILAALPTGGGGSGGGSGGGSGGGSSASVPIQKVQDDTKTL
IKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLEFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISNDLENLRDLLHVLA
FSKSCHLPQASGLETLESLLGGVLEASGYSTEVALSRLQGSQDMLQQLDLSPGC (配列番号88) ;

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLEFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISND
LENLRDLLHVLAFSKSCHLPQASGLETLESLLGGVLEASGYSTEVALSRLQGSQDMLQQLDLSPGCTGGGGSSASLAEAK
EDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALiseILAALP (配列番号89) ;

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLEFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISND
LENLRDLLHVLAFSKSCHLPQASGLETLESLLGGVLEASGYSTEVALSRLQGSQDMLQQLDLSPGCTGGGGSGGGSGGG
SGGGSSASLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALiseILAALP (配列番号90) ;

MLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALiseILAALPTGGGGSGGGSGGGSGGGSSASISIEKIQADTKTL
TKTIITRIIQLSTQNGVSTDQRVSGLDIFIPGNQQFQNLADMDQTLAVYQQILSSLPMPDRTQISNDLENLRSLFALLATL
KNCPFTRSDGLDTMEIWGGIVEESLYSTEVVTLDRLRSLKNIKQLDHIQGC (配列番号91) ;

MLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALiseILAALPTGGGGSGGGSGGGSGGGSSASVPIQKVQDDTKTL
IKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFS
KSCHLPWASGLETLDLGGVLEASGYSTEVVALSRLQGSQDMLWQLDLSPGC (配列番号92) ;

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISND
LENLRDLLHVLAFS KSCHLPWASGLETLDLGGVLEASGYSTEVVALSRLQGSQDMLWQLDLSPGCTGGGGSGGGSGGG
SGGGSSASLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALiseILAALP (配列番号93) ;

MLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALiseILAALPTGGGGSGGGSGGGSGGGSSASPIQRVQDDTKTLI
KTIITRINDISPQGVCSRPRVAGLDIFIPRVQSVRTLSGMDQILATYQQILTSLSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSK
SCVPARGSDTIKGLGNVLRASVHSTEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (配列番号94) ;

MLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALiseILAALPTGGGGSGGGSGGGSGGGSSASPIQRVQDDTKTLI
KTIITRINDISPQGVSSRPRVAGLDIFIPRVQSVRTLSGMDQILATYQQILTSLSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSK
SCVPARGSDTIKGLGNVLRASVHSTEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (配列番号95) ;

MLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALiseILAALPTGPIQRVQDDTKTLIKTIITRINDISPQGVCS
PRVAGLDIFIPRVQSVRTLSGMDQILATYQQILTSLSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCVPARGSDTIKGLGNV
LRASVHSTEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (配列番号96) ;

MLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALiseILAALPTGGGGSGGGSGGGSGGGSSASVPIQKVQDDTKTL
IKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFS
KSCHLPWASGLETLDLGGVLEASGYSTEVVALSRLQGSQDMLWQLDLSPGC (配列番号97) ;

MLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALiseILAALPTGGGGSGGGSGGGSGGGSSASVPIQKVQDDTKTL
IKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLEFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFS
KSCHLPQASGLETLESLLGGVLEASGYSTEVVALSRLQGSQDMLQQLDLSPGC (配列番号98) ;

MLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALiseILAALPTGGGGSGGGSGGGSGGGSSASVPIQKVQDDTKTL
IKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFS
KSCHLPQASGLETLDLGGVLEASGYSTEVVALSRLQGSQDMLQQLDLSPGC (配列番号99) ;

MLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALiseILAALPTGLAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAKAAAA
SVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLEFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISND
LENLRDLLHVLAFSKSCHLPQASGLETLESLLGGVLEASGYSTEVVALSRLQGSQDMLQQLDLSPGC (配列番号100
) ;

MLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALiseILAALPTGGEGGEGGEGGEGGEGGEGGEASVPIQKVQDDTKT
LIKTIIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLEFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAF
SKSCHLPQASGLETLESLLGGVLEASGYSTEVVALSRLQGSQDMLQQLDLSPGC (配列番号101) ;

MLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALiseILAALPTGGKGGKGGKGGKGGKGGKASVPIQKVQDDTKT
LIKTIIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLEFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAF
SKSCHLPQASGLETLESLLGGVLEASGYSTEVVALSRLQGSQDMLQQLDLSPGC (配列番号102) ;

MLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALiseILAALPTGGGGSGGGSGGGSGGGSSASVPIQKVQDDTKTL
IKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLEFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFS
KSCSLPQASGLETLESLLGEVLEASGYSTEVVALSRLQGSQDILQQLDLSPGC (配列番号103) ;

MLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALTHILAALPTGGGGSGGGSGGGSGGGSSASVPIQKVQDDTKTL
IKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLEFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFS
KSCHLPQASGLETLESLLGGVLEASGYSTEVVALSRLQGSQDMLQQLDLSPGC (配列番号104) ;

MLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKRLISKAKTVEGVKALISEILAALPTGGGGSGGGSGGGSGGGSSASVPIQKVQDDTKTL
IKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLEFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFS
KSCHLPQASGLETLESLLGGVLEASGYSTEVVALSRLQGSQDMLQQLDLSPGC (配列番号105) ;

MLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALTHILAALPTGGGGSGGGSGGGSGGGSSASVPIQKVQDDTKTL
IKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLEFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFS
KSCHLPQASGLETLESLLGGVLEASGYSTEVVALSRLQGSQDMLQQLDLSPGC (配列番号106) ;

MLAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVEALISEILAALPTGGGGSGGGSGGGSGGGSSASVPIQKVQDDTKTL

10

20

30

40

50

IKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLEFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFS
KSCHLPPQASGLTLESGLGGVLEASGYSTEVALSRLQGSQDMLQQDLSPGC（配列番号107）；

KCNTATCATQRLANFLVRSSNNLGPVLPPTNVGSNTY（配列番号108）；

KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFMAILSSTNVGSNTY（配列番号109）；

KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGPILPPTNVGSNTY（配列番号110）。

CGNLSTCMLGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAP（配列番号111）；

CSNLSTCVLGKLSQELHKLQTYPRNTGSGTP（配列番号112）；

KCNTATCVLGRLSQELHRLQTYPRNTGSGTY（配列番号113）。

GVSDYYKNLINKAKTVEGVEALTLHI（配列番号114）；

GVSDYYKNLINKAKTVEGVEALiseI（配列番号115）；

10

GGGG（配列番号116）；

GGGGG（配列番号117）；

GGGKGGGG（配列番号118）；

GGNGSGG（配列番号119）；

GGGCGGGG（配列番号120）；

GPNGG（配列番号121）；

[GS]_n（配列番号122）（式中、nは、2－10である）；

[GGS]_n（配列番号123）（式中、nは、2－10である）；

[GGGS]_n（配列番号124）（式中、nは、1－10である）；

[GGGGS]_n（配列番号125）（式中、nは、1－10である）；

20

[GE]_n（配列番号126）（式中、nは、2－10である）；

[GGE]_n（配列番号127）（式中、nは、2－10である）；

[GGGE]_n（配列番号128）（式中、nは、1－10である）；

[GGGGE]_n（配列番号129）（式中、nは、1－10である）；

[GD]_n（配列番号130）（式中、nは、2－10である）；

[GGD]_n（配列番号131）（式中、nは、2－10である）；

[GGGD]_n（配列番号132）（式中、nは、1－10である）；

[GGGGD]_n（配列番号133）（式中、nは、1－10である）；

[GK]_n（配列番号134）（式中、nは、2－10である）；

[GGK]_n（配列番号135）（式中、nは、2－10である）；

30

[GGGK]_n（配列番号136）（式中、nは、1－10である）；

[GGGGK]_n（配列番号137）（式中、nは、1－10である）；

[GR]_n（配列番号138）（式中、nは、2－10である）；

[GGR]_n（配列番号139）（式中、nは、2－10である）；

[GGGR]_n（配列番号140）（式中、nは、1－10である）；

[GGGGR]_n（配列番号141）（式中、nは、1－10である）；

[GAAAK]_n（配列番号142）（式中、nは、1－10である）；

VPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSAKQRTGLDFIPGLHPILSLKMDQTLAVYQQVLTSLPSQNVLQIANDL
ENLRDLLHLLAFSKSCSLPQTSGLQKPESLDGVLEASLYSTEVALSRLQGSQDILQQLDVSPEC（配列番号143）

40

VPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTSVSAKQRTGLDFIPGLHPILSLKMDQTLAVYQQVLTSLPSQNVLQIANDL
NLRDLLHLLAFSKSCSLPQTSGLQKPESLDGVLEASLYSTEVALSRLQGSQDILQQLDVSPEC（配列番号144）

；
MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSAKQRTGLDFIPGLHPILSLKMDQTLAVYQQVLTSLPSQNVLQIANDL
LENLRDLLHLLAFSKSCSLPQTSGLQKPESLDGVLEASLYSTEVALSRLQGSQDILQQLDVSPEC（配列番号145）

）；および
MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTSVSAKQRTGLDFIPGLHPILSLKMDQTLAVYQQVLTSLPSQNVLQIANDL
ENLRDLLHLLAFSKSCSLPQTSGLQKPESLDGVLEASLYSTEVALSRLQGSQDILQQLDVSPEC（配列番号146）

）。
MLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKHLILAALPTGGGGSGGGSGGGSGGGSSASVPIQKVQDDTKTL

50

IKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFS
KSchLPWASGLETLDSLGGVLEASGYSTEVALSRLQGSQDMLWQLDLSPGC (配列番号147)。

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLEFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISND
LENLRDLLHVLAFSKSCSLPQASGLETLDSLGEVLEASGYSTEVALSRLQGSQDILQQLDLSPEC (配列番号664
)。

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISND
LENLRDLLHVLAFSKSCSLPQASGLETLDSLGGVLEASGYSTEVALSRLQGSQDILQQLDLSPEC (配列番号665
)。

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISND
LENLRDLLHVLAFSKSCSLPQASGLETLDSLGEVLEASGYSTEVALSRLQGSQDILQQLDLSPEC (配列番号666
)。

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISND
LENLRDLLHVLAFSKSchLPQASGLETLDSLGEVLEASGYSTEVALSRLQGSQDILQQLDLSPEC (配列番号667
)。

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISND
LENLRDLLHVLAFSKSCSLPQASGLETLDSLGGVLEASGYSTEVALSRLQGSQDILQQLDLSPEC (配列番号668
)。

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISND
LENLRDLLHVLAFSKSchLPQASGLETLDSLGEVLEASGYSTEVALSRLQGSQDILQQLDVSPEC (配列番号669
)。

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISND
LENLRDLLHVLAFSKSCSLPQTSGLETLDSLGGVLEASGYSTEVALSRLQGSQDILQQLDLSPEC (配列番号670
)。

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISND
LENLRDLLHVLAFSKSCSLPQASGLETLDSLGEVLEASGYSTEVALSRLQGSQDMLWQLDLSPEC (配列番号671
)。

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISND
LENLRDLLHVLAFSKSchLPQASGLETLDSLGGVLEASGYSTEVALSRLQGSQDILQQLDLSPEC (配列番号672
)。

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISND
LENLRDLLHVLAFSKSchLPQASGLETLDSLGGVLEASGYSTEVALSRLQGSQDILQQLDVSPEC (配列番号673
)。

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISND
LENLRDLLHVLAFSKSCSLPQTSGLETLDSLGGVLEASGYSTEVALSRLQGSQDILQQLDVSPEC (配列番号674
)。

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISND
LENLRDLLHVLAFSKSCSLPQTSGLETLDSLGEVLEASGYSTEVALSRLQGSQDMLWQLDLSPEC (配列番号675
)。

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISND
LENLRDLLHVLAFSKSchLPQASGLETLDSLGEVLEASGYSTEVALSRLQGSQDMLQQLDLSPGC (配列番号676
)。

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISND
LENLRDLLHVLAFSKSchLPQASGLETLDSLGEVLEASGYSTEVALSRLQGSQDMLQQLDLSPEC (配列番号677
)。

X' -Xaa¹-Cys²-Asn³-Thr⁴-Ala⁵-Thr⁶-Cys⁷-Ala⁸-Thr⁹-Gln¹⁰-Arg¹¹-Leu¹²-Ala¹³-Asn¹⁴-P
he¹⁵-Leu¹⁶-Val¹⁷-His¹⁸-Ser¹⁹-Ser²⁰-Xaa²¹-Asn²²-Phe²³-Xaa²⁴-Xaa²⁵-Xaa²⁶-Xaa²⁷-Xaa²⁸-Xaa²⁹-Thr³⁰-Xaa³¹-Val³²-Gly³³-Ser³⁴-Asn³⁵-Thr³⁶-Tyr³⁷-X (配列番号800
)

CNTATCATQRLANFLVRSSNNLGPVLPPTNVGSNTY-NH₂ (配列番号801)

10

20

30

40

50

KCNTATCATQRLANFLVRSSKNLGPVLPPTNVGSNTY-NH₂ (配列番号802)
 CNTATCATQRLANFLVRSSKNLGPVLPPTNVGSNTY-NH₂ (配列番号803)
 KCNTATCATQRLANFLVRSSNNLGPKLPTNVGSNTY-NH₂ (配列番号804)
 CNTATCATQRLANFLVRSSNNLGPKLPTNVGSNTY-NH₂ (配列番号805)
 KCNTATCATQRLANFLVRSSNNLGPVLPPTKVGSTY-NH₂ (配列番号806)
 CNTATCATQRLANFLVRSSNNLGPVLPPTKVGSTY-NH₂ (配列番号807)
 KCNTATCATQRLANFLVHSSNFGPILPPTNVGSNTY-NH₂ (配列番号808)
 CNTATCATQRLANFLVHSSNFGPILPPTNVGSNTY-NH₂ (配列番号809)
 CNTATCATQRLANFLVHSSKNFGPILPPTNVGSNTY-NH₂ (配列番号810)
 CNTATCATQRLANFLVHSSNFGPKLPPTNVGSNTY-NH₂ (配列番号811)
 CNTATCATQRLANFLVHSSNFGPILPPTKVGSTY-NH₂ (配列番号812)
 CNTATCATQRLANFLVHSSNFKPILPPTNVGSNTY-NH₂ (配列番号813)
 CNTATCATQRLANFLVHSSNFGKILPPTNVGSNTY-NH₂ (配列番号814)
 CNTATCATQRLANFLVHSSNFGPIKPPTNVGSNTY-NH₂ (配列番号815)
 CNTATCATQRLANFLVHSSNFGPILKPTNVGSNTY-NH₂ (配列番号816)
 CNTATCATQRLANFLVHSSNFGPILPKTNVGSTY-NH₂ (配列番号817)

10

【図 1】

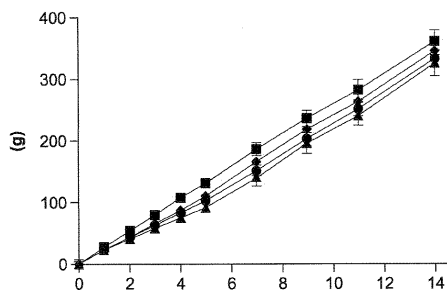


FIG. 1A

【図 2】

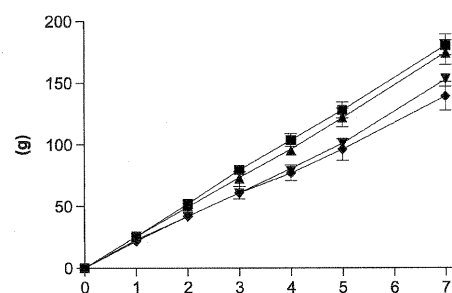


FIG. 2A

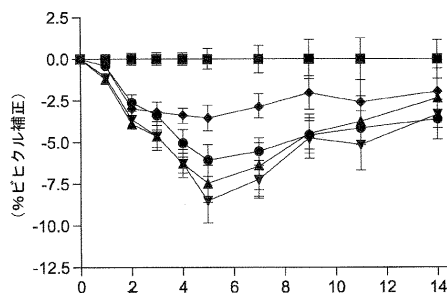


FIG. 1B

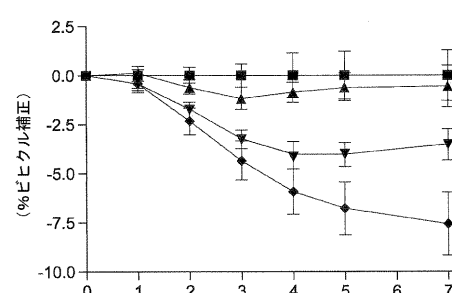


FIG. 2B

【図 3】

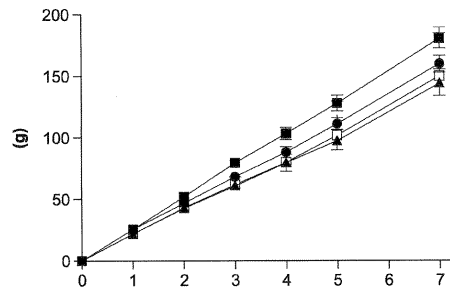


FIG. 3A

【図 4】

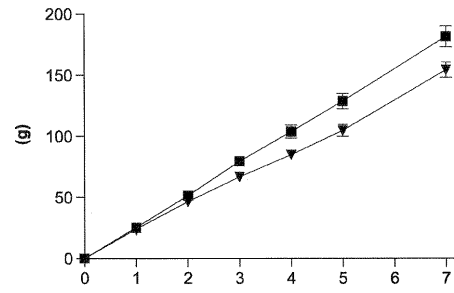


FIG. 4A

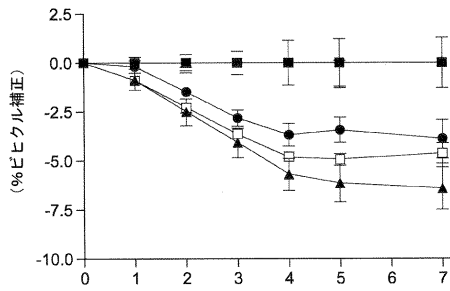


FIG. 3B

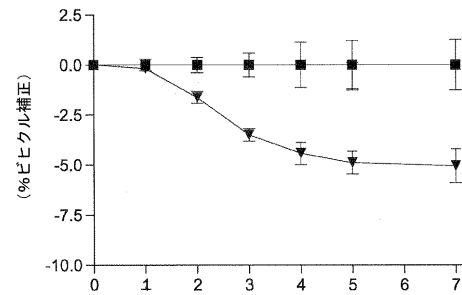


FIG. 4B

【図 5】

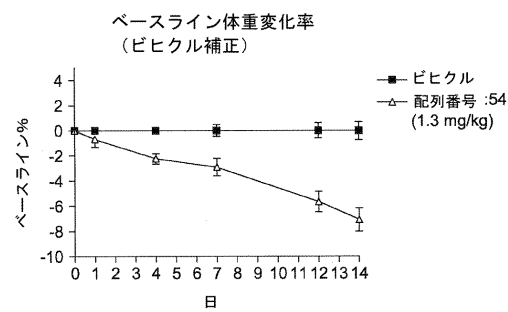


FIG. 5

【図 6】

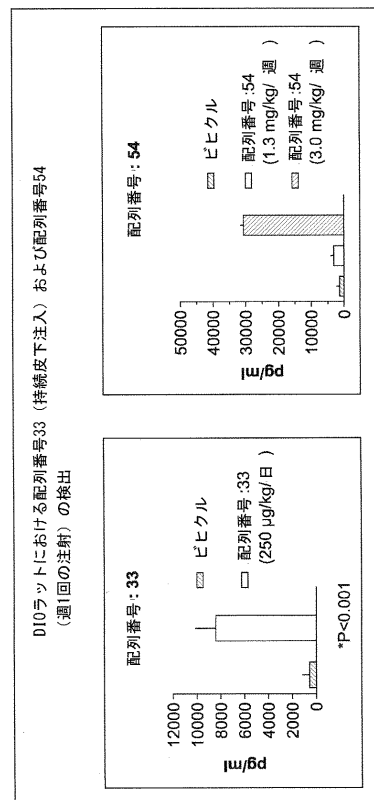


FIG. 6

【図 7】

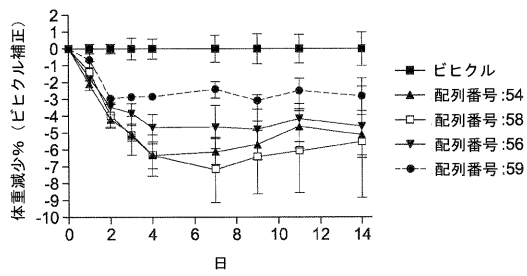


FIG. 7

【図 8】

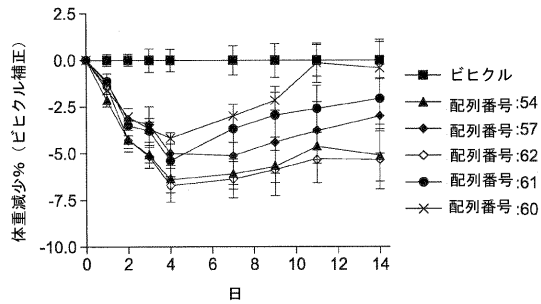


FIG. 8

【図 9】

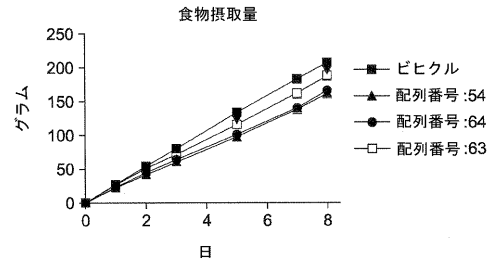


FIG. 9A

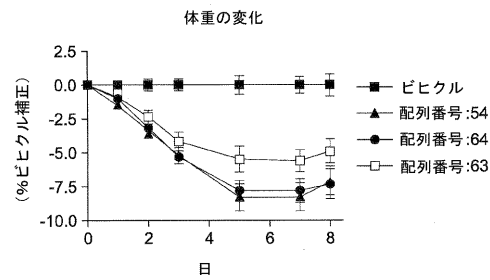


FIG. 9B

【図 10】

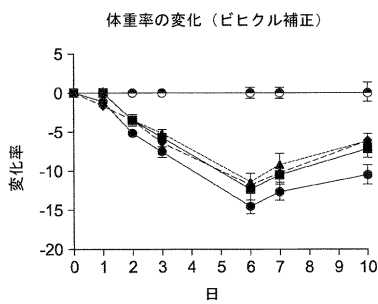


FIG. 10

【図 11 B - 11 C】

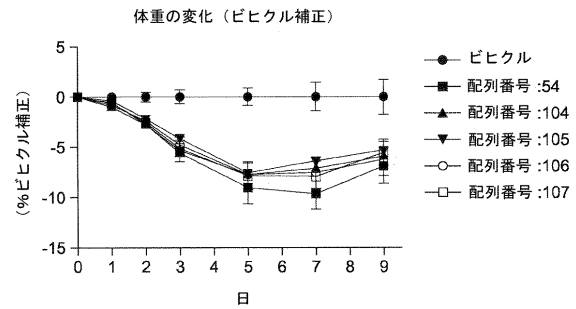


FIG. 11B

【図 11 A】

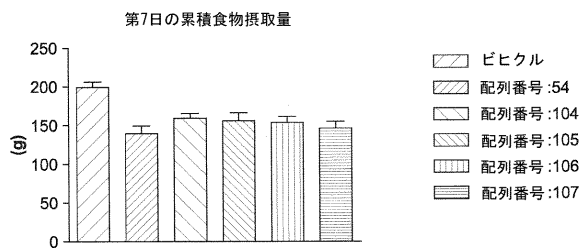


FIG. 11A

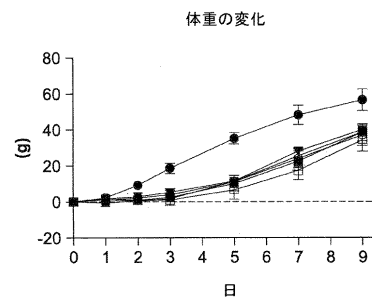


FIG. 11C

【図 1 2】

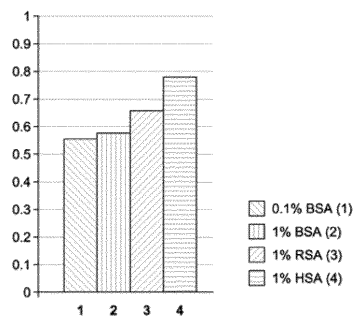


FIG. 12

【図 1 3】

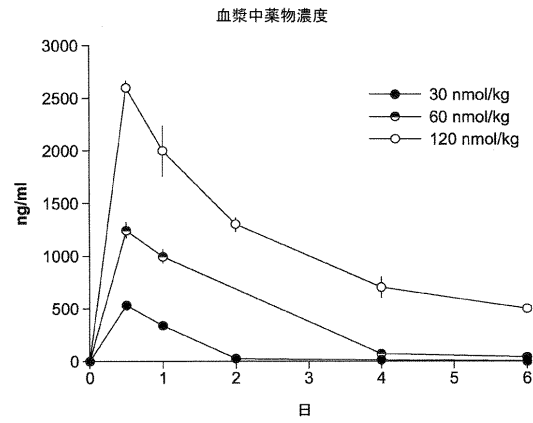


FIG. 13

【図 1 4】

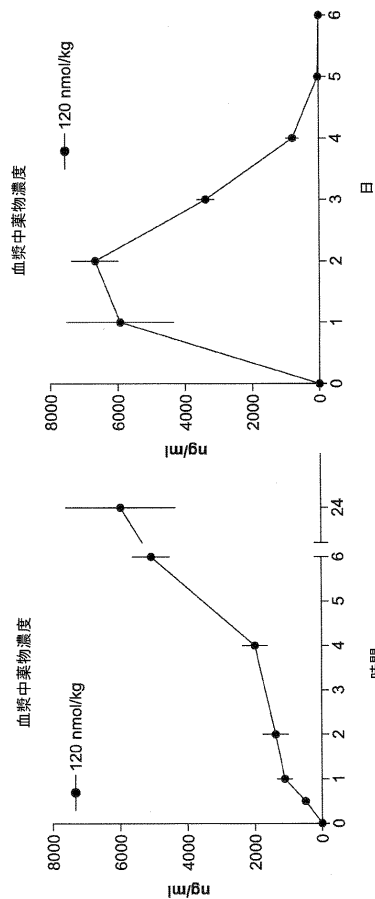


FIG. 14

【図 1 5】

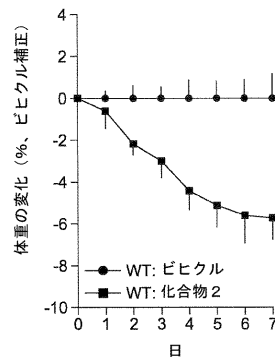


FIG. 15A

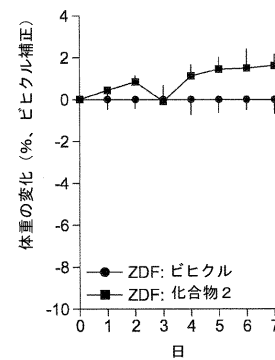
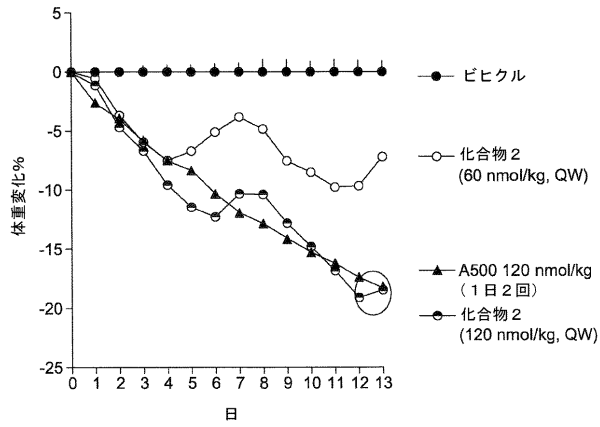
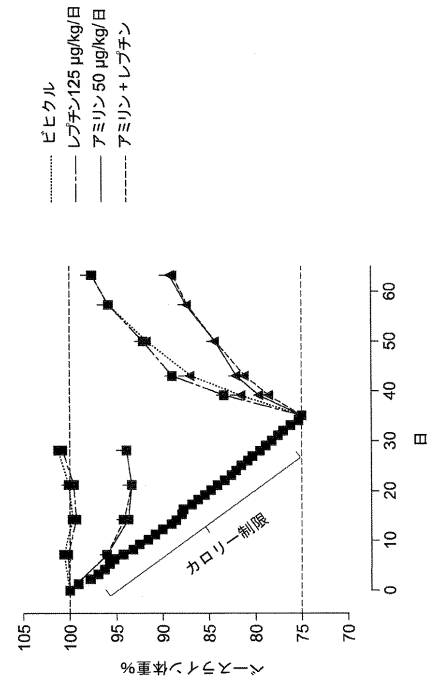


FIG. 15B

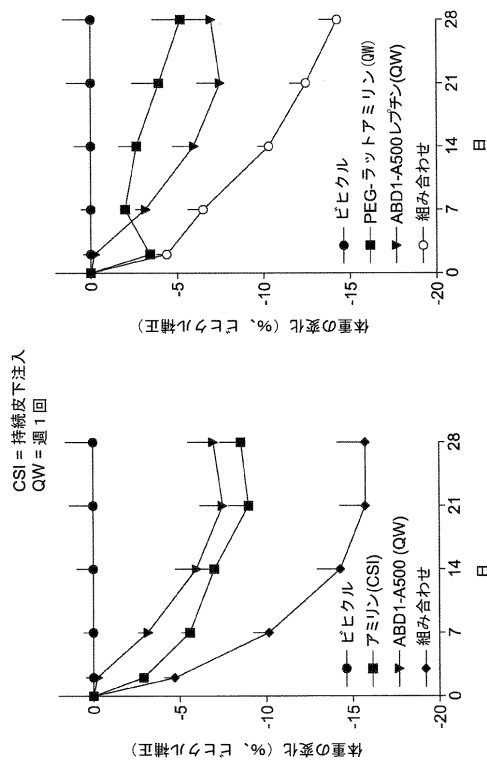
【図 16】



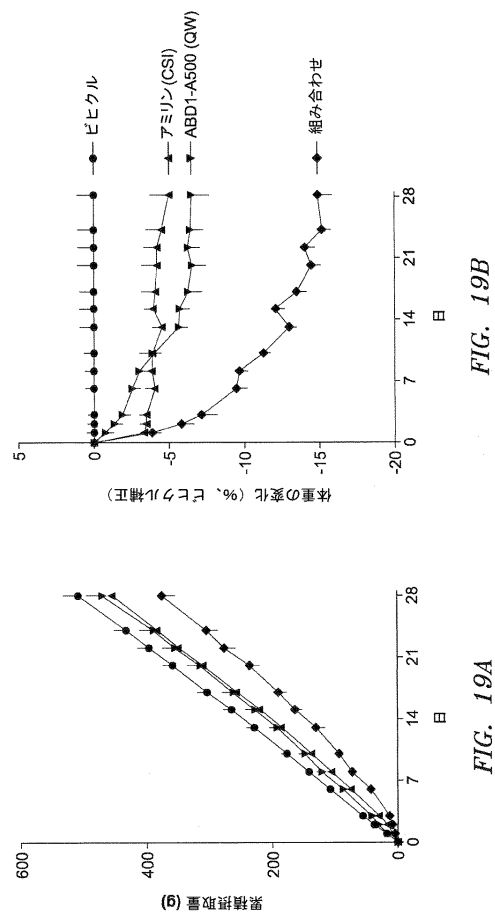
【図 17】



【図 18】



【図 19】



【図 20】

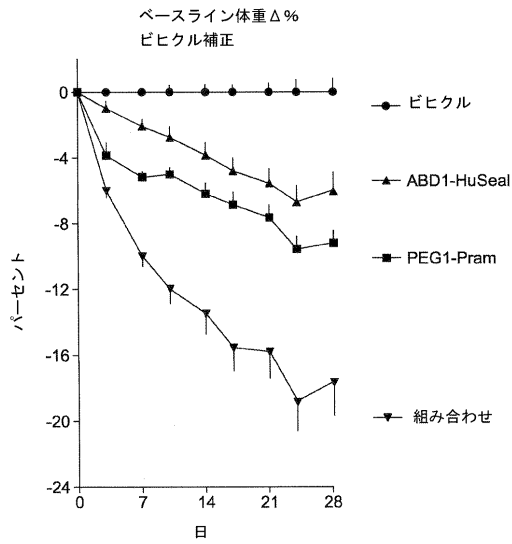


FIG. 20

【図 21】

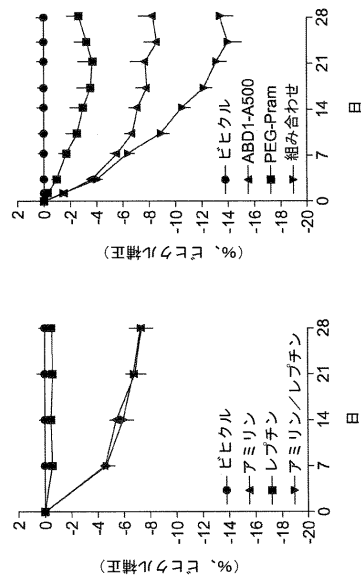


FIG. 21C

FIG. 21B

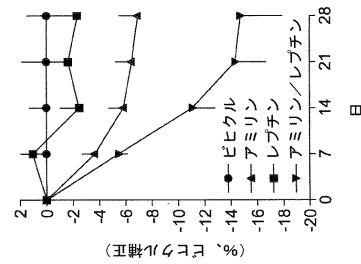


FIG. 21A

【図 22】

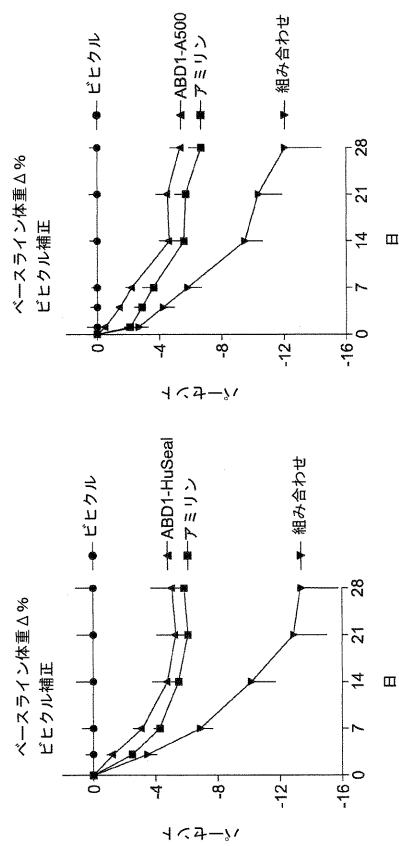


FIG. 22B

FIG. 22A

【図 23】

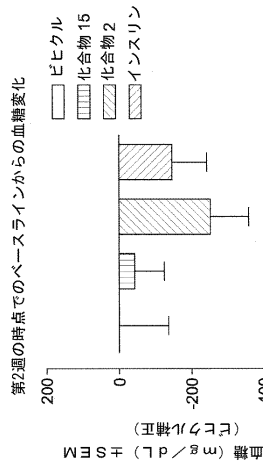


FIG. 23B

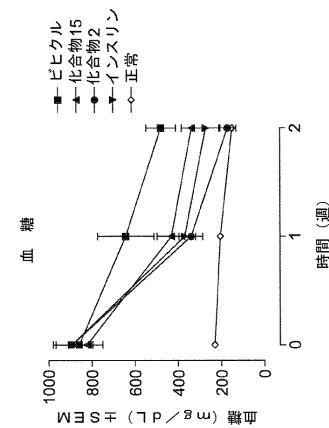


FIG. 23A

【図 24】

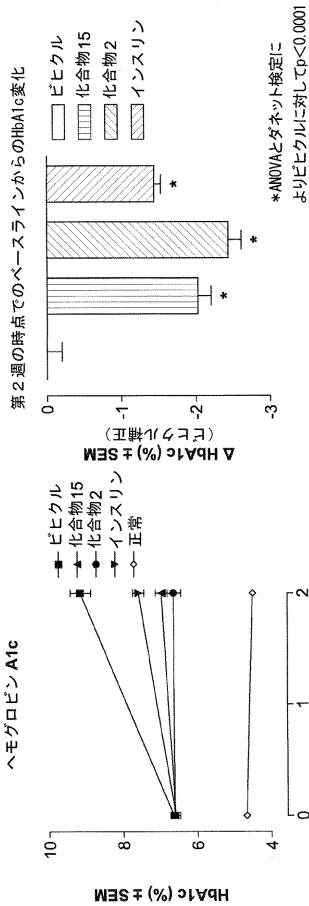


FIG. 24B

FIG. 24A

【図 26】

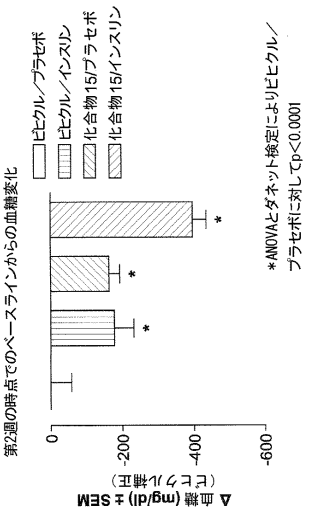
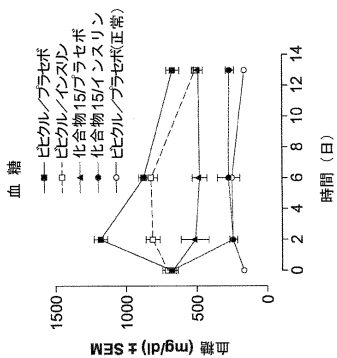


FIG. 26B

FIG. 26A



【図 25】

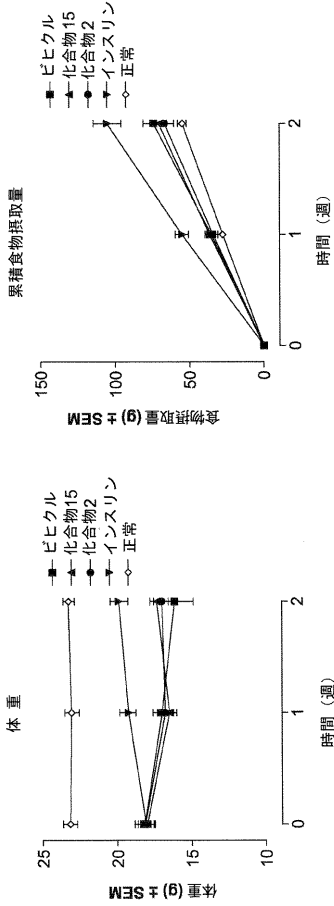


FIG. 25B

FIG. 25A

【図 27】

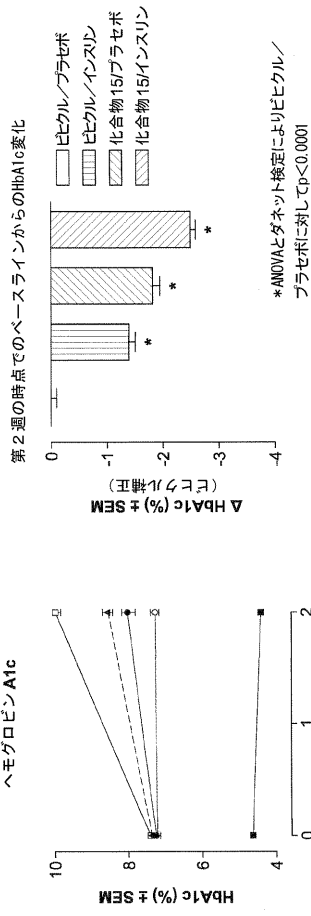


FIG. 27B

FIG. 27A

【図 28】

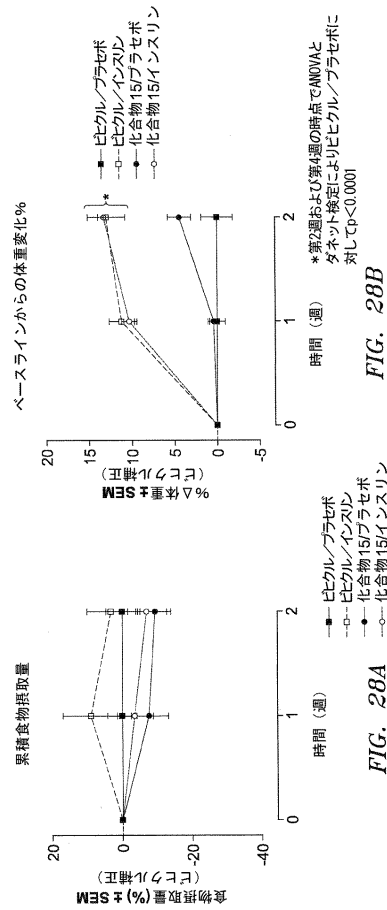


FIG. 28B

FIG. 28A

【配列表】

0006412183000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
A 6 1 P	3/04	(2006.01)	A 6 1 P	3/04	
A 6 1 P	3/06	(2006.01)	A 6 1 P	3/06	
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	15/00	(2006.01)	A 6 1 P	15/00	
A 6 1 P	25/14	(2006.01)	A 6 1 P	25/14	
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	25/28	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1

- (72)発明者 スーミトラ・エス・ゴッシュ
アメリカ合衆国92121カリフォルニア州サンディエゴ、タウン・センター・ドライブ9360番、アミリン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド、インテレクチュアル・プロパティ・グループ
- (72)発明者 メアリー・エリクソン
アメリカ合衆国92121カリフォルニア州サンディエゴ、タウン・センター・ドライブ9360番、アミリン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド、インテレクチュアル・プロパティ・グループ
- (72)発明者 デイビッド・シー・リッツィンガー
アメリカ合衆国92121カリフォルニア州サンディエゴ、タウン・センター・ドライブ9360番、アミリン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド、インテレクチュアル・プロパティ・グループ
- (72)発明者 ジジエン・グオ
アメリカ合衆国92121カリフォルニア州サンディエゴ、タウン・センター・ドライブ9360番、アミリン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド、インテレクチュアル・プロパティ・グループ
- (72)発明者 ジョナサン・デイビッド・ロス
アメリカ合衆国92121カリフォルニア州サンディエゴ、タウン・センター・ドライブ9360番、アミリン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド、インテレクチュアル・プロパティ・グループ

審査官 坂崎 恵美子

- (56)参考文献 国際公開第2009/100255 (WO, A1)
国際公開第2010/054699 (WO, A1)
米国特許出願公開第2010/0104588 (US, A1)
特表2007-505840 (JP, A)
特表平10-513450 (JP, A)
国際公開第2009/064298 (WO, A1)
American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2005年, Vol.289, No.2, p.R545-R553

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C07K 19/00
C12N 15/09
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
Caplus/WPIDS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)