

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6403685号  
(P6403685)

(45) 発行日 平成30年10月17日(2018.10.17)

(24) 登録日 平成30年9月21日(2018.9.21)

(51) Int.Cl.

F 1

<b>A61K 38/18</b>	<b>(2006.01)</b>	A 61 K	38/18	Z N A
<b>A61P 1/16</b>	<b>(2006.01)</b>	A 61 P	1/16	1 O 1
<b>C07K 19/00</b>	<b>(2006.01)</b>	C 07 K	19/00	
<b>C07K 14/50</b>	<b>(2006.01)</b>	C 07 K	14/50	
<b>C12N 15/62</b>	<b>(2006.01)</b>	C 12 N	15/62	

請求項の数 32 (全 92 頁)

(21) 出願番号	特願2015-550762 (P2015-550762)
(86) (22) 出願日	平成25年12月26日 (2013.12.26)
(65) 公表番号	特表2016-513073 (P2016-513073A)
(43) 公表日	平成28年5月12日 (2016.5.12)
(86) 國際出願番号	PCT/US2013/077782
(87) 國際公開番号	W02014/105939
(87) 國際公開日	平成26年7月3日 (2014.7.3)
審査請求日	平成28年12月15日 (2016.12.15)
(31) 優先権主張番号	61/746,499
(32) 優先日	平成24年12月27日 (2012.12.27)
(33) 優先権主張国	米国(US)
(31) 優先権主張番号	61/779,604
(32) 優先日	平成25年3月13日 (2013.3.13)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	514002695 エヌジーエム バイオファーマシューティ カルス、インコーポレーテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94 080 サウス サンフランシスコ オイ スター ポイント ブルーバード 333
(74) 代理人	100097456 弁理士 石川 徹
(72) 発明者	レイ リング アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94 404 フォスター シティ ナンタケッ ト ストリート 411

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】胆汁酸ホメオスタシス調整並びに胆汁酸障害及び疾患の治療の方法

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

胆汁酸ホメオスタシスを調整するか、又は胆汁酸に関係した若しくは関連した障害を治療するための医薬品の製造におけるキメラペプチドの使用であつて、

該キメラペプチドが、配列番号1(M1)、配列番号2(M2)、配列番号6(M6)、配列番号7(M7)、配列番号52(M52)、配列番号192(M53)、配列番号69(M69)、又は配列番号70(M70)を含むか又はこれからなるアミノ酸配列を有する、前記使用。

## 【請求項 2】

前記キメラペプチドが、約250個未満のアミノ酸の長さである、請求項1記載の使用。

## 【請求項 3】

前記キメラペプチドが、配列番号1(M1)を含むか又はこれからなるアミノ酸配列を有する、請求項1記載の使用。

## 【請求項 4】

前記キメラペプチドが、配列番号2(M2)を含むか又はこれからなるアミノ酸配列を有する、請求項1記載の使用。

## 【請求項 5】

前記キメラペプチドが、配列番号6(M6)を含むか又はこれからなるアミノ酸配列を有する、請求項1記載の使用。

## 【請求項 6】

前記キメラペプチドが、配列番号7(M7)を含むか又はこれからなるアミノ酸配列を有す

10

20

る、請求項1記載の使用。

【請求項7】

前記キメラペプチドが、配列番号52(M52)を含むか又はこれからなるアミノ酸配列を有する、請求項1記載の使用。

【請求項8】

前記キメラペプチドが、配列番号192(M53)を含むか又はこれからなるアミノ酸配列を有する、請求項1記載の使用。

【請求項9】

胆汁酸ホメオスタシスを調整するか、又は胆汁酸に関係した若しくは関連した障害を治療するための医薬品の製造におけるキメラペプチドの使用であって、10

該キメラペプチドが、配列番号70(M70)を含むアミノ酸配列を有する、前記使用。

【請求項10】

胆汁酸ホメオスタシスを調整するか、又は胆汁酸に関係した若しくは関連した障害を治療するための医薬品の製造におけるキメラペプチドの使用であって、

該キメラペプチドが、配列番号70(M70)からなるアミノ酸配列を有する、前記使用。

【請求項11】

胆汁酸ホメオスタシスを調整するか、又は胆汁酸に関係した若しくは関連した障害を治療するための医薬品の製造におけるキメラペプチドの使用であって、

該キメラペプチドが、配列番号69(M69)を含むアミノ酸配列を有する、前記使用。

【請求項12】

胆汁酸ホメオスタシスを調整するか、又は胆汁酸に関係した若しくは関連した障害を治療するための医薬品の製造におけるキメラペプチドの使用であって、

該キメラペプチドが、配列番号69(M69)からなるアミノ酸配列を有する、前記使用。

【請求項13】

前記ペプチドが、免疫グロブリンFc領域に融合されている、請求項1～12のいずれか一項記載の使用。

【請求項14】

前記ペプチドが、医薬として許容し得る担体を更に含む医薬組成物として製剤化されている、請求項1～13のいずれか一項記載の使用。

【請求項15】

前記医薬品が、対象における胆汁酸合成を低下させる、請求項1～14のいずれか一項記載の使用。30

【請求項16】

前記医薬品が、対象におけるCYP7a1のレベルを低下させる、請求項1～14のいずれか一項記載の使用。

【請求項17】

前記対象が、原発性胆汁性肝硬変(PBC)を有する、請求項1～16のいずれか一項記載の使用。

【請求項18】

前記対象が、原発性硬化性胆管炎(PSC)を有する、請求項1～16のいずれか一項記載の使用。40

【請求項19】

前記対象が、胆汁鬱滞を有する、請求項1～16のいずれか一項記載の使用。

【請求項20】

前記対象が、妊娠性肝内胆汁鬱滞(PIC)を有する、請求項1～16のいずれか一項記載の使用。

【請求項21】

前記対象が、胆汁酸下痢(BAD)又は胆汁酸吸收不良(BAM)を有する、請求項1～16のいずれか一項記載の使用。

【請求項22】

10

20

30

40

50

前記対象が、非-アルコール性脂肪性肝炎(NASH)を有する、請求項1～16のいずれか一項記載の使用。

【請求項23】

前記対象が、胆汁酸合成の異常を有する、請求項1～16のいずれか一項記載の使用。

【請求項24】

前記医薬品が、胆汁酸ホメオスタシスを調整する、請求項1～14のいずれか一項記載の使用。

【請求項25】

前記医薬品が、胆汁酸に関係した若しくは関連した障害を治療する、請求項1～14のいずれか一項記載の使用。 10

【請求項26】

前記胆汁酸に関係した若しくは関連した障害が、PBCである、請求項25記載の使用。

【請求項27】

前記胆汁酸に関係した若しくは関連した障害が、PSCである、請求項25記載の使用。

【請求項28】

前記胆汁酸に関係した若しくは関連した障害が、胆汁鬱滯である、請求項25記載の使用。 11

【請求項29】

前記胆汁酸に関係した若しくは関連した障害が、PICである、請求項25記載の使用。

【請求項30】

前記胆汁酸に関係した若しくは関連した障害が、BAD又はBAMである、請求項25記載の使用。 20

【請求項31】

前記胆汁酸に関係した若しくは関連した障害が、NASHである、請求項25記載の使用。

【請求項32】

前記胆汁酸に関係した若しくは関連した障害が、胆汁酸合成の異常である、請求項25記載の使用。 21

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の相互参照)

本出願は、2012年12月27日に出願された米国特許出願第61/746,499号、2013年3月13日に出願された米国特許出願第61/779,604号、及び2013年10月4日に出願された米国特許出願第61/887,129号の優先権を請求するものであり、これら各出願は、それらの全体が引用により本明細書中に組み込まれている。 22

(発明の分野)

本発明は、胆汁酸ホメオスタシスを調整する、線維芽細胞増殖因子19(FGF19)のタンパク質及びペプチド配列(及びペプチド模倣体)の変種、並びにFGF19及び/又は線維芽細胞増殖因子21(FGF21)のタンパク質及びペプチド配列(及びペプチド模倣体)の融合体、並びにFGF19及び/又はFGF21のタンパク質及びペプチド配列(及びペプチド模倣体)の融合体の変種、並びに胆汁酸に関係した及び関連した障害の治療方法及び該治療における該変種及び融合体の使用に関する。 40

【背景技術】

【0002】

(緒言)

哺乳動物の胆汁中に主として認められるステロイド酸である胆汁酸は、コレステロール、トリグリセリド、グルコース及びエネルギーホメオスタシスを調節し、且つ小腸における脂質の消化及び吸収を促進する。小腸における脂質及び脂溶性ビタミンの乳化は、ミセル形成を可能にし、これは次に乳糜システム(lacteal system)を介して輸送されることができる。胆汁酸の他の機能は、胆汁の流動を駆動し、肝臓からの異化産物を除去し、且つ 50

小腸及び胆管において認められる細菌叢の減少を補助することを含む。胆汁酸はまた、それら自身の合成及び腸肝循環の調節に関与している。例えば、Staelsらの文献、*Diabetes Care* (2009) 32(suppl 2) S237-S245を参照されたい。

#### 【 0 0 0 3 】

ヒトにおいて、胆汁酸生成は主に、静脈周囲の肝細胞において、コレステロールを2種の一次胆汁酸であるコール酸及びケノデオキシコール酸へ変換する一連の酵素反応により起こる。一次胆汁酸は、2つの個別の経路により合成される。「古典的」又は「中性」経路では、一次胆汁酸は、古典的胆汁酸合成経路の第一の律速段階を触媒するシトクロムP450酵素コレステロール7-ヒドロキシラーゼ(cyp7a1)による触媒を介した、コレステロールの水酸化により生成される(例えば、Inagakiらの文献、*Cell Metabolism*, 2:217-25 (2005年10月) 参照)。

10

#### 【 0 0 0 4 】

本明細書において更に説明されるように、cyp7a1の活性は、コール酸によりダウンレギュレーションされ、且つコレステロールによりアップレギュレーションされ；従って、cyp7a1は、胆汁酸それ自身により調節される。コレステロールの胆汁酸への変換は、この経路により主に作用される。加えて、ほとんどの個体において、胆汁酸のおよそ6%は、「代替」又は「酸性」経路により合成される。この経路は、オキシステロールを胆汁酸へ変換する酵素cyp27a1により調節される。cyp7a1とは対照的に、cyp27a1は、胆汁酸それ自身によっては調節されない。

20

#### 【 0 0 0 5 】

コール酸及びケノデオキシコール酸が、腸管腔へ分泌される場合、腸管細菌は、各々の一部を脱水酸化し、二次胆汁酸であるデオキシコール酸(コール酸由来)及びリトコール酸(ケノデオキシコール酸由来)を形成する。肝細胞は、これら4種の胆汁を、2種のアミノ酸グリシン又はタウリンの一方と抱合し、胆汁酸塩(bile salt)と称される、合計8種の可能な抱合胆汁酸を形成することができる。従って全体で主要な胆汁酸は、コール酸、ケノデオキシコール酸、グリココール酸、タウロコール酸、デオキシコール酸及びリトコール酸である。これらの胆汁酸4種全ては、血流へ戻し輸送され、肝臓へ戻され、腸肝循環を介し再分泌することができる。例えばStaelsらの文献、*Diabetes Care* (2009) 32(suppl 2) S237-S245を参照されたい。

30

#### 【 0 0 0 6 】

一次胆汁酸(コール酸及びケノデオキシコール酸)は、肝臓で合成される一方、二次胆汁酸(デオキシコール酸及びリトコール酸)は、細菌により産生される。これら4種の胆汁酸は、リン脂質及びコレステロールとの混合ミセルとして、胆囊において貯蔵するために、毛細胆管管腔へ分泌される。食物摂取時に、コレシストキニンは、胆囊収縮を刺激し、ミセル化された胆汁酸の腸管管腔へのその放出を生じ、消化を助ける。腸肝循環は、胆汁酸の~90-95%が、遠位回腸から再吸収され、且つ肝臓へ戻し輸送されることを可能にし；この胆汁酸取り込み及び輸送は、中心周辺の肝細胞により主に起こる。再吸収されない胆汁酸およそ5%は、糞便中に排泄され、その喪失量は、引き続きの肝臓における新規の胆汁酸合成により置き換えられる。例えばRoseらの文献、*Cell Metabolism*, 14:1, pp 123-130 (2011年7月6日) を参照されたい。

40

#### 【 0 0 0 7 】

一次胆汁酸(ケノデオキシコール酸及びコール酸)は、ファルネソイド-X-受容体(FXR)、プレグナン-X-受容体(PXR)及び構成的アンドロスタン受容体(CAR)の生理的リガンド／アクチベーターであり、並びにリトコール酸は、ビタミンD受容体(VDR)及びGタンパク質共役受容体TGR5のリガンドである。FXRは、胆汁酸に対する高度な選択性を示すのに対し；PXR及びCARは、異物代謝と脂質ホメオスタシスとを統合している数多くの受容体に作用する。FXR、PXR、CAR及びTGR5は、脂質及びグルコースのホメオスタシス並びにエネルギー消費の調節において、更には肝臓及び末梢インスリン感受性の調節において、相乗的活性を発揮する。界面活性剤又は洗剤として、胆汁酸は細胞に対し潜在的に毒性であり、且つ胆汁酸プールのサイズは、細胞毒性の蓄積を防ぐよう、肝臓及び腸内で厳密に調節される

50

。胆汁酸プールサイズが増大した場合、FXRを含むいくつかの核受容体の相互作用に関するフィードバック機構が活性化され、新たな胆汁酸合成を阻害する。例えばFiorucciらの文献、Prog Lipid Res. 2010年4月；49(2):171-85. 電子版、2009年12月2日を参照されたい。

#### 【 0 0 0 8 】

肝臓における胆汁酸の合成は、ホルモンFGF19により負に調節される。FGF19は、腸から分泌され、肝臓へCyp7a1を抑制するシグナルを送る。比べて、腸管FXR活性化はまた、食後の経腸管胆汁酸フラックス(transintestinal bile acid flux)のために、FGF19の発現を誘導し、FGF19は小腸上皮細胞により放出され、且つ循環し、肝細胞FGF受容体4(FGFR4)受容体に結合し；FGFR4受容体は、c-Jun NH<sub>2</sub>-末端キナーゼ(JNK)経路の活性化を介して、胆汁酸合成を減少するシグナルを伝達する。CYP7A1の抑制は、一日の摂食・絶食サイクルに反応した肝内のコレステロールからの胆汁酸合成の減少をもたらす。10

#### 【 0 0 0 9 】

##### (治療との関連)

本明細書記載のように、異常な胆汁酸ホメオスタシスは、胆汁鬱滞、門脈体循環シャント、クローン病、及び肝臓微小血管異形成症を含む、数多くの障害を生じるか又は増悪し得る。加えて胆汁酸は、メタボリック症候群、内臓型肥満を含むあるクラスターの心臓血管疾患危険因子、インスリン抵抗性、脂質異常症、血圧上昇、及び凝固性亢進の調整において役割を果たしている。従って胆汁酸活性の調整は、数多くの有益な治療効果を提供することができる。20

#### 【 0 0 1 0 】

##### (脂質-及びグルコース-関連障害)

胆汁酸(又は非ステロイド性合成FXRアゴニスト)によるFXRの活性化は、血漿トリグリセリドを低下し、且つ糖尿病性マウスにおける高血糖症を改善することが示されている。胆汁酸はまた、Gタンパク質共役受容体TGR5の活性化を通じて、マウスにおいてFXR-非依存方式でエネルギー消費を調節する。従ってFXR活性及び胆汁酸代謝の調整は、例えばメタボリック症候群及び2型糖尿病の治療に関する治療的アプローチを提供することができる。例えばLefebvreらの文献、Physiol Rev. 2009年1月；89(1):147-91を参照されたい。

#### 【 0 0 1 1 】

胆汁酸合成(回腸切除を伴う)は、胆汁酸の腸肝循環を破壊し、血漿中の総コレステロール及びLDLコレステロールを減少し、且つHDLコレステロール、アポリポタンパク(apo)-AI、及びトリグリセリドのレベルを増加する。肝臓への胆汁酸の回帰を中断した直接の結果として、cyp7a1発現は再度抑制され、且つコレステロールの胆汁酸への変換は刺激される。従って、消化管内に胆汁酸を封鎖する物質(例えばコレステラミン)は、それらの再吸収を防止し、結果的に代償機構として、より多くの内因性コレステロールが、胆汁酸の生成へとシャントされ、これはコレステロールレベルの低下に繋がる。30

#### 【 0 0 1 2 】

胆汁酸合成への増大した転用(diversion)に起因する、肝コレステロールの枯渇は、肝LDL受容体発現の増大に繋がり、これは、胆汁酸合成又は回腸切除により生じる総コレステロール及びLDLコレステロールの漸減の主な原因となるLDL受容体発現をもたらす。HDLコレステロール及びトリグリセリドの両代謝において、FXRは独立した調節の役割を果たすと考えられる。40

#### 【 0 0 1 3 】

記載のように、胆汁酸合成は、2型糖尿病に関連していることも分かっている。胆汁酸プールサイズ及び組成に対する作用、肝グルコース生成及び腸管グルコース吸収におけるFXRが媒介した変更、末梢インスリン感受性に対する影響、インクレチニン作用、及びエネルギー使用を含む、数多くの因子が、グルコース調節に貢献し得る。胆汁酸合成の調整は、糖尿病の治療において有用であるのみではなく、前糖尿病状態の治療における臨床的有用性も見い出しえる。

#### 【 0 0 1 4 】

10

20

30

40

50

### (胆汁酸吸収不良及び下痢)

例えば胆汁酸の吸収不良から生じる、結腸における過剰な濃度の胆汁酸は、慢性下痢の原因となる。大量の胆汁酸が結腸へ侵入する場合、これらは、水分分泌及び腸管の運動を刺激し、胆汁酸下痢(BAD)と称される状態である慢性の下痢を引き起こす。より詳細には、胆汁酸輸送体の腸管での発現が減少する場合、腸は、胆汁酸再吸収の効率が悪くなる(1型胆汁酸吸収不良)。同様に、腸管の運動が胃-腸手術により影響を受けるか、又は胆汁酸が小腸細菌の過剰成長により脱抱合されるならば、吸収は、より効率が悪くなる(3型胆汁酸吸収不良)。また、疾患の明らかな徴候を示さない患者の非常に小さい群が存在する(2型胆汁酸吸収不良)。(一般に、Waltersらの文献、Clin. Gastroenterol Hepatol. 7:1189-94 (2009年11月)を参照)。

10

### 【0015】

#### (胆汁鬱滞及び原発性胆汁性肝硬変)

胆汁鬱滞の状態は、(例えば閉塞による)肝内又は肝外での胆汁排泄の急性又は慢性の中斷により引き起こされる。胆汁形成の不良は、進行性胆汁鬱滞性の肝臓損傷及び死滅を生じる。閉塞は、胆汁酸塩、胆汁色素ビリルピン、及び脂質を、正常に排泄せずに血流中に蓄積させる。慢性胆汁鬱滞の症状は、皮膚変色、擦過により引き起こされる瘢痕又は皮膚損傷、骨痛、黄色腫、又は黄色板腫を含む。進行した胆汁鬱滞性患者は、体調が優れず、容易に疲労し、吐き気をもよおすことが多い。腹痛、並びに食欲不振、吐気及び発熱のような全身症状は、通常胆汁鬱滞性を引き起こす基礎となる状態に起因する。

### 【0016】

20

肝内胆汁鬱滞性は通常、肝炎によるか又は肝炎に似た症状を生じる薬物適用により引き起こされる。クロルプロマジンを含むフェノチアジン誘導体薬は、突然の発熱及び炎症を引き起こし得るが、それらの薬物を中止した後は症状は通常消散する。稀に、以下に更に考察する慢性胆汁性肝硬変に似た状態が、該薬物適用を中止した後であっても持続する。一部の患者は、例えば三環系抗うつ薬(例えばアミトリプチリン及びイミプラミン)並びにフェニルブタゾンなどに対する反応において同様の反応を経験する。肝内胆汁鬱滞性はまた、アルコール性肝臓疾患、原発性胆汁性肝硬変、及び転移した癌を含む、他の原因を有することがある。

### 【0017】

比較すると、ある種の薬物適用の有害作用として、手術の合併症、重篤な損傷、組織-破壊性感染症、又は静脈内栄養補給を含む、肝外胆汁鬱滞性のいくつかの原因が存在する。肝外胆汁鬱滞性は、胆嚢から十二指腸への胆汁の流れを遮断する腫瘍及び胆石などの状態により(例えば、総胆管を閉鎖する結石により)引き起こされ得る。肝外胆汁鬱滞性はまた、膵臓癌により、及びより稀には、総胆管の非-癌性の狭窄、胆管癌、又は膵臓の障害の結果として引き起こされることがある。

30

### 【0018】

肝内及び肝外の両方の胆汁鬱滞性の症状は、黄疸、暗色尿、及び白色便を含む。状態が進行した場合、皮膚全体に及ぶ搔痒が、重症化することがある。

### 【0019】

40

妊娠性肝内胆汁鬱滞性(ICP)は、妊娠第二期及び第三期に頻発し、且つこれは妊娠時黄疸の二番目の最も一般的な原因である。症状は通常出産後2~4週間以内に消失するが、これらは、その後母体が再び妊娠した場合に、出現することがある。同様の状態は、経口避妊薬を服用している一部の女性を冒すが、症状は経口避妊薬の使用を中止すると消失する。

### 【0020】

胆汁酸合成の先天異常は、稀な遺伝的障害であり、これは時に新生児胆汁鬱滞性として現れる。これは、正常な胆汁酸の生成の障害、並びに異常な胆汁酸及び胆汁酸代謝産物の蓄積により特徴づけられる。診断されないか又は不適切に診断された場合、そのような先天異常は、肝不全又は進行性慢性肝臓疾患を生じ得る。

### 【0021】

薬剤誘発性胆汁鬱滞性は、化学療法又は他の薬物適用の合併症であり得る。薬剤誘発性胆

50

汁鬱滞の2つの主な型は、特異体質反応及び直接の毒性傷害である。特異体質反応は、治療開始時又はそれ以降に起こることがある。アレルギー反応は、様々であり、且つ服用される薬物適用の量とは関連しない。

#### 【0022】

直接の毒性傷害において、症状の重篤性は、関与する薬物適用の量に比例する。この状態は、治療開始後短期間に発症し、予測可能なパターンが続き、且つ通常は肝臓損傷を引き起こす。直接の毒性反応は、クロルプロマジンを服用する患者全員の1%において発症する。

#### 【0023】

稀な状態である良性家族性再発性胆汁鬱滞は、搔痒及び黄疸の短い反復性のエピソードにより特徴づけられるが、これらの症状は消失することが多く、且つこの状態は肝硬変を引き起こさない(一般に、Roseらの文献、Cell Metabolism, 14(1):123-30 (2011年7月)を参照)。

#### 【0024】

原発性胆汁性肝硬変(PBC)は、肝臓の外へと胆汁酸を輸送する胆管の自己免疫破壊から主に生じる進行性肝臓疾患であり、これは胆汁鬱滞を生じる。該疾患が進行した場合、胆汁酸の持続性の毒性の増大(build-up)は、慢性炎症及び線維症が特徴的な進行性の肝臓損傷を引き起こす。

#### 【0025】

PBCは稀であるが、これは、最も一般的な胆汁鬱滞性肝臓疾患であり、且つ米国においては肝臓移植の五番目に最も一般的な原因である。PBC患者の大半は、最初の診断時には無症候性であるが、ほとんどは、時間が経つにつれて疲労及び搔痒などの症状を発症する。黄疸は、疾患の進行に起因して生じ得る。必須ではないが、PBCの診断を確認するために肝生検を使用することができ、且つ肝機能の指標を提供するためにビリルビンがモニタリングされることが多い。胆汁酸が媒介した毒性に反応して肝細胞により放出される酵素であるALPの上昇した血清レベルは、概して治療反応及び予後の指標として患者において綿密にモニタリングされる。

#### 【0026】

PBCの標準治療法(care therapy)であるウルソジオールを受けているにもかかわらず、進行したPBC患者の大部分が、肝不全、移植又は5~10年以内の死亡へと進むであろう。結果として、代替療法が、現在評価されている。一つの可能性のある有望な薬剤は、OCAであり、胆汁酸アナログ及び原発性ヒト胆汁酸ケノデオキシコール酸から誘導されるFXRアゴニスト、又はCDCAである。OCAは、ウルソジオールに対し不十分な治療反応を有する患者、又はウルソジオールに忍容性がない患者について評価されている(Intercept Pharmaceuticals社、ニューヨーク)。

#### 【0027】

##### (原発性硬化性胆管炎)

原発性硬化性胆管炎は、慢性の線維化性炎症過程であり、これは胆樹の破壊及び胆汁性肝硬変を生じる。狭窄は、患者の80%より多くで肝内及び肝外の両方の胆管に位置するが、これらの患者の約10%は肝内狭窄のみを有し、他方で5%未満は肝外狭窄のみを有する。寛解及び再発は、本疾患の経過を特徴づける。原発性硬化性胆管炎の原因は不明であるが、胆管への損傷は、免疫調節の遺伝異常、ウイルス感染、腸管細菌由来の毒素、門脈系内の細菌、虚血性血管損傷、及び腸管細菌由来の毒性胆汁酸の1つ以上により起こると考えられる。

#### 【0028】

原発性硬化性胆管炎の患者の大半は、基礎となる炎症性腸疾患(潰瘍性大腸炎又はクローン病)を有する。患者は恐らく、クローン病よりも潰瘍性大腸炎(15%対85%)を有し、全ての潰瘍性大腸炎患者のおよそ2.5~7.5%は、原発性硬化性胆管炎を有するであろう。原発性硬化性胆管炎は、一部の患者においては長期間にわたり静止し続けることがあるが；多くの場合、これは進行性である。

10

20

30

40

50

**【 0 0 2 9 】**

米国における原発性硬化性胆管炎の有病率は、人口100,000人当たりおよそ1~6症例であり、その圧倒的多数は白人である。原発性硬化性胆管炎患者のおよそ75%は、平均年齢が診断時におよそ40歳である男性である。初期段階でのこの疾患の管理は、疾患進行を予防する薬物の使用に関連している。内視鏡的アプローチ及び手術的アプローチが、症状発症時のために予定されている。肝移植手術が、最終的には必要とされ、且つ完全治癒のための唯一の機会を供する。原発性硬化性胆管炎の患者は、胆管癌のリスクが増大している(10~15%)。

**【 0 0 3 0 】**

原発性硬化性胆管炎の患者の大半は、症状を示さず、通常慣習的血液検査における肝機能の異常な生化学試験の検出により診断される。症状が発症した場合、症状は、胆汁流れの閉塞の結果であり、且つ黄疸、搔痒、右上四分の一の腹痛、発熱、及び悪寒を含む。症状はまた、体重減少及び疲労も含むことがある。患者は、進行した疾患が存在するにもかかわらず、何年も無症候であり続けることがあり、症状の発現は、通常進行した疾患の存在を示唆している。

**【 0 0 3 1 】****( 診断 )**

胆汁酸吸収不良は、SeHCAT(23-セレノ-25-ホモ-タウロ-コール酸(セレンホモコール酸タウリン又はタウロセルコール酸))核医学試験により、容易に診断される。代わりの診断試験は、胆汁酸前駆体である7'-ヒドロキシ-4-コレステン-3-オンの血清中の測定に関与している。

**【 0 0 3 2 】****( 治療 )**

胆汁酸封鎖剤(例えば、粉末の形状であるコレスチラミン及びコレスチポール)は、胆汁酸吸収不良の治療に使用される主要薬剤である。残念ながら、多くはこの樹脂粉末の口当たり及び味が悪いために、多くの患者は、コレスチラミン及びコレスチポールに忍容性がない。幸いながら、胆汁酸封鎖剤コレセベラムが、錠剤の形状で利用可能であり、忍容性がより良いことが多い。

**【 0 0 3 3 】**

全ての胆汁酸封鎖剤は、他の化合物と結合することが可能であり、且つこれはまた脂溶性ビタミン(A、D、E及びK)の欠乏症が起こる可能性があり、ビタミンサプリメントの投与を必要とする。

**【 0 0 3 4 】**

置換療法及び補充療法も、胆汁酸ホメオスタシスに関連したいいくつかの障害において有用であることが証明されている。置換療法において、循環胆汁酸の組成が、内在性胆汁酸の細胞傷害性を減少するか又は胆汁コレステロール分泌を減少するようコレステロール代謝を調整するかのいずれかのために、変更される。対照的に、胆汁酸補充は、胆汁酸欠損症の補正を目的としている。

**【 0 0 3 5 】****( 置換療法 )**

一次胆汁酸ケノデオキシコール酸(CDCA)の投与は、胆汁コレステロール分泌を減少し及び胆石を次第に溶解することが示されている。ウルソデオキシコール酸(UDCA)は肝毒性を生じないので、CDCAは、次第にUDCAにより置き換えられている。ケノデオキシコール酸は、ヒトにおいてわずかな肝毒性があるが、いくつかの動物においては、これは高度な肝毒性がある。コレステロール胆石溶解のためのUDCA投与は有効且つ安全であるにもかかわらず、症候性疾患の迅速な治癒をもたらす腹腔鏡胆囊摘出術の成功のために、今日UDCAは頻繁には使用されない。対照的に内科療法は、数ヶ月の治療を必要とし、常には結石を溶解せず、一部の患者においては引き続き次第に再発する。

**【 0 0 3 6 】**

UDCA療法は、原発性胆汁性肝硬変の患者において、肝臓の試験結果を改善することが示

10

20

30

40

50

されており、その作用は恐らく複数の機序に関与している。UDCA療法はまた、妊娠に関連した胆汁鬱滞及び完全非経口的栄養に関連した胆汁鬱滞などの、他の胆汁鬱滞性状態において好ましい作用を示している。

#### 【0037】

(補充療法)

通常ケノデオキシコール酸(CDCA)又はウルソデオキシコール酸(UDCA)及びコール酸の混合物による、胆汁酸補充は、胆汁酸合成の先天異常において使用され、細胞傷害性胆汁酸前駆体の合成を抑制し、且つ一次胆汁酸の腸肝循環への投入を回復する。

#### 【0038】

短腸症候群患者において、胆汁酸欠損症は、近位腸において起こり、ミセル可溶化の低下へ繋がる。これは、減少した表面積及び短い通過時間に加え、重篤な脂肪の吸收不良に繋がる。合成胆汁酸アナログであるコリルサルコシン(コリル-N-メチルグリシン)は、短腸症候群の患者において脂質吸收を増大し、これは脱抱合及び脱ヒドロキシル化に対する抵抗性がある。

#### 【0039】

クローン回腸炎に随伴する胆汁酸下痢の患者は、糖質コルチコイド治療により補助され、且つ顕微鏡的大腸炎はまた、ステロイドにより補助される。ブデソニド及び抗生物質を含む他の薬剤の投与は、いくつかの状況において有用である。

#### 【0040】

先に詳述したように、PBCの治療は一般に、ウルソジオール投与を包含しているが、ウルソジオールに対し不十分な治療的反応を有する患者又はウルソジオールに対し忍容できない患者のために、代替療法が評価されている。

#### 【0041】

従って、ヒトなどの哺乳動物において、前述の障害、並びに以下を含むが、これらに限定されるものではない胆汁酸障害を治療する必要性が存在する：メタボリック症候群；脂質又はグルコース障害；コレステロール又はトリグリセリド代謝；2型糖尿病；例えば、肝内の胆汁鬱滞の疾患(例えば、原発性胆汁性肝硬変(PBC)、原発性家族性肝内胆汁鬱滞(PFIC)(例えば、進行性PFIC)、原発性硬化性胆管炎(PSC)、妊娠性肝内胆汁鬱滞(PIC)、新生児胆汁鬱滞、及び薬物誘発性胆汁鬱滞(例えば、エストロゲン))、並びに、肝外胆汁鬱滞の疾患(例えば、腫瘍由来の胆管(bile duct)圧縮、胆石による胆管閉塞)を含む、胆汁鬱滞；回腸切除、炎症性腸疾患(例えば、クローン病及び潰瘍性大腸炎)、下痢(例えば胆汁酸下痢(BAD))及びGI症状に繋がる以外特徴づけられない(特発性)胆汁酸の吸收を損なう障害、並びにGI癌、肝臓癌、及び／又は胆嚢癌(例えば、結腸癌及び肝細胞癌)を含む、胆汁酸吸收不良及び遠位小腸に関与する他の障害；並びに／又は、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)、肝硬変及び門脈圧亢進症の一因となるものなどの、胆汁酸合成異常。本発明は、この必要性を満足し、且つ関連する恩恵を提供する。

#### 【発明の概要】

#### 【0042】

(概要)

本発明は、一部、胆汁酸ホメオスタシス調整活性などの1種以上の活性を有する、FGF19ペプチド配列の変種、FGF19及び／又はFGF21ペプチド配列の融合体、並びにFGF19及び／又はFGF21ペプチド配列の融合体(キメラ)の変種を基にしている。そのようなFGF19及び／又はFGF21ペプチド配列の変種及び融合体(キメラ)は、胆汁酸に関係した又は関連した障害を治療するために使用される配列を含む。そのようなFGF19及び／又はFGF21ペプチド配列の変種及び融合体(キメラ)は、肝細胞癌(HCC)形成又はHCC腫瘍形成を実質的に又は有意には増加又は誘導しない配列も含む。そのようなFGF19及び／又はFGF21ペプチド配列の変種及び融合体(キメラ)は、脂質プロファイルの実質的上昇又は増加を誘導しない配列を更に含む。

#### 【0043】

一実施態様において、胆汁酸ホメオスタシスを調整するか又は胆汁酸に関係した若しく

10

20

30

40

50

は関連した障害を治療する方法又は使用は：a)少なくとも7個のアミノ酸残基を含むN-末端領域であって、該N-末端領域が、第一のアミノ酸位置及び最後のアミノ酸位置を有し、ここで該N-末端領域が、DSSPL又はDASPHを含むもの；並びに、b)配列番号:99[FGF19]の一部を含むC-末端領域であって、該C-末端領域が、第一のアミノ酸位置及び最後のアミノ酸位置を有し、ここで該C-末端領域が、配列番号:99 [FGF19]のアミノ酸残基16-29、

## 【化1】

(WGDPIRLRHLYTSG; 配列番号 :169)

を含み、ここで該W残基が、C-末端領域の第一のアミノ酸位置に対応しているもの：を含む、キメラペプチド配列を投与し、胆汁酸ホメオスタシスを調整するか又は胆汁酸に関係した若しくは関連した障害を治療することを含む。 10

## 【0044】

別の実施態様において、胆汁酸ホメオスタシスを調整するか又は胆汁酸に関係した若しくは関連した障害を治療する方法又は使用は：a)配列番号:100[FGF21]の一部を含むN-末端領域であって、該N-末端領域が、第一のアミノ酸位置及び最後のアミノ酸位置を有し、ここで該N-末端領域が、アミノ酸残基GQVを含み、且つここで該V残基が、N-末端領域の最後のアミノ酸位置に対応しているもの；並びに、b)配列番号:99[FGF19]の一部を含むC-末端領域であって、該C-末端領域が、第一のアミノ酸位置及び最後のアミノ酸位置を有し、ここで該C-末端領域が、配列番号:99[FGF19]のアミノ酸残基21-29、

## 【化2】

RLRHLYTSG ( 配列番号 :185)

を含み、且つここで該R残基が、C-末端領域の第一の位置に対応しているもの：を含む、キメラペプチド配列を投与し、胆汁酸ホメオスタシスを調整するか又は胆汁酸に関係した若しくは関連した障害を治療することを含む。 20

## 【0045】

更なる実施態様において、胆汁酸ホメオスタシスを調整するか又は胆汁酸に関係した若しくは関連した障害を治療する方法又は使用は：a)配列番号:100[FGF21]の一部を含むN-末端領域であって、該N-末端領域が、第一のアミノ酸位置及び最後のアミノ酸位置を有し、ここで該N-末端領域が、アミノ酸残基GQVを含む配列番号:100[FGF21]の少なくとも5個の隣接アミノ酸を含み、且つここで該V残基が、N-末端領域の最後のアミノ酸位置に対応しているもの；並びに、b)配列番号:99[FGF19]の一部を含むC-末端領域であって、該C-末端領域が、第一のアミノ酸位置及び最後のアミノ酸位置を有し、ここで該C-末端領域が、配列番号:99[FGF19]のアミノ酸残基21-29、 30

## 【化3】

RLRHLYTSG ( 配列番号 :185)

を含み、且つここで該R残基が、C-末端領域の第一の位置に対応しているもの：を含む、キメラペプチド配列を投与し、胆汁酸ホメオスタシスを調整するか又は胆汁酸に関係した若しくは関連した障害を治療することを含む。 40

## 【0046】

追加の実施態様において、胆汁酸ホメオスタシスを調整するか又は胆汁酸に関係した若しくは関連した障害を治療する方法又は使用は：a)参照型又は野生型FGF19と比べ、1以上のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する、FGF19配列の変種；b)参照型又は野生型FGF21と比べ、1以上のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する、FGF21配列の変種；c)FGF21配列の一部に融合されたFGF19配列の一部；又は、d)FGF21配列の一部に融合されたFGF19配列の一部であって、ここで該FGF19及び／又はFGF21配列部分が、参照型又は野生型FGF19及び／又はFGF21と比べ、1以上のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有するもの：のいずれかを含むか又はこれからなる、ペプチド配列を投与し、胆汁酸ホメオスタシスを調整するか又は胆汁酸に関係した若しくは関連した障害を治療することを含む。 50

## 【0047】

様々な特定の実施態様において、キメラペプチド配列は、アミノ酸残基GQを含む配列番号:100[FGF21]の少なくとも6個の隣接アミノ酸を伴うN-末端領域を有するか；又は、アミノ酸残基GQVを含む配列番号:100[FGF21]の少なくとも7個の隣接アミノ酸を伴うN-末端領域を有する。

## 【0048】

様々な追加の実施態様において、ペプチド配列は、配列番号:99[FGF19]のカルボキシ末端のアミノ酸21-194に融合された配列番号:100[FGF21]のアミノ末端のアミノ酸1-16を有するか、或いは該ペプチド配列は、配列番号:100[FGF21]のカルボキシ末端のアミノ酸147-181に融合された配列番号:99[FGF19]のアミノ末端のアミノ酸1-147を有する(M41)か、或いは該ペプチド配列は、配列番号:100[FGF21]のカルボキシ末端のアミノ酸17-181に融合された配列番号:99[FGF19]のアミノ末端のアミノ酸1-20を有する(M44)か、或いは該ペプチド配列は、配列番号:99[FGF19]のカルボキシ末端のアミノ酸148-194に融合された配列番号:100[FGF21]のアミノ末端のアミノ酸1-146を有する(M45)か、或いは該ペプチド配列は、配列番号:100[FGF21]の内部アミノ酸17-146に融合されたか又は配列番号:99[FGF19]のカルボキシ末端のアミノ酸148-194に融合された配列番号:99[FGF19]のアミノ末端のアミノ酸1-20を有する(M46)。

10

## 【0049】

様々な更なる実施態様において、ペプチド配列は、配列番号:99[FGF19]のアミノ酸残基125-129、EIRPDへの少なくとも1個のアミノ酸置換；配列番号:99[FGF19]のアミノ酸残基126-128、IRPへの少なくとも1個のアミノ酸置換；又は、配列番号:99[FGF19]のアミノ酸残基127-128、RPへの少なくとも1個のアミノ酸置換；又は、配列番号:99[FGF19]のアミノ酸残基1-124及び／若しくは配列番号:99[FGF19]のアミノ酸残基130-194への少なくとも1個のアミノ酸置換を有する。より詳細に述べると、例えば、配列番号:99[FGF19]のアミノ酸残基127-128、IRPの1個への置換を伴うペプチド配列であり、ここで少なくとも1個のアミノ酸置換が、R127L又はP128Eであるものである。

20

## 【0050】

本発明の方法及び使用は、本明細書に示したペプチド又はキメラ配列を用いて実践することができる。例えば、M1-M98若しくはM101-M160、又は配列番号:1～98、101～135、若しくは138～196として本明細書中に記載の任意のペプチド配列を含むか又はこれからなる配列、表1～10に記載の任意の配列を含むか又はこれからなるペプチド配列、又は本明細書の配列表に記載の任意の配列を含むか又はこれからなるペプチド配列である。

30

## 【0051】

本発明の方法及び使用は、いずれか好適な長さのペプチド又はキメラ配列を用いて実践することができる。特定の実施態様において、該ペプチド又はキメラ配列のN-末端又はC-末端領域は、長さが約20～約200個のアミノ酸残基である。別の特定の態様において、ペプチド又はキメラ配列は、アミノ末端、カルボキシ末端又は内部に1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20又はそれよりも多いアミノ酸欠失を有する。更に特定の実施態様において、ペプチド又はキメラ配列は、約5～10、10～20、20～30、30～40、40～50、60～70、70～80、80～90、90～100個又はそれよりも多いアミノ酸のアミノ酸配列を含むか又はこれらからなるN-末端領域又はC-末端領域を有する。追加のより特定の実施態様において、ペプチド又はキメラ配列は、FGF19又はFGF21の約5～10、10～20、20～30、30～40、40～50、50～60、60～70、70～80、80～90、90～100個又はそれよりも多いアミノ酸のアミノ酸配列を含むか又はこれらからなるFGF19配列部分又はFGF21配列部分を有する。

40

## 【0052】

様々な態様において、ペプチド配列は、配列番号:99[FGF19]のアミノ酸16-20の

## 【化4】

配列に対応する

【化5】

WGDPI(配列番号:170)

配列モチーフを有するか；FGF19のアミノ酸配列16-20のFGF19

【化6】

WGDPI(配列番号:170)

に対応する置換された、変異された又は非存在の

【化7】

10

WGDPI(配列番号:170)

配列モチーフを有するか；置換された、変異された又は非存在の1個以上のアミノ酸を伴う

【化8】

WGDPI(配列番号:170)

配列を有する。様々な他の更なる態様において、該ペプチド配列は、アミノ酸16-20においてFGF19

【化9】

20

WGDPI(配列番号:170)

配列について置換された

【化10】

GQV, GDI, WGPI(配列番号:171), WGDPV(配列番号:172), WGDI(配列番号:173), GDPI(配列番号:174), GPI, WGQPI(配列番号:175), WGAPI(配列番号:176), AGDPI(配列番号:177), WADPI(配列番号:178), WGDAI(配列番号:179), WGDPA(配列番号:180), WDPI(配列番号:181), WGDI(配列番号:182), WGDP(配列番号:183)又はFGDPI(配列番号:184)

30

のいずれかを有するFGF19変種配列から区別される。

【0053】

様々な更なる態様において、N-末端領域は、アミノ酸残基

【化11】

VHYG(配列番号:101)

を含み、ここで該N-末端領域は、アミノ酸残基

【化12】

DASPHVHYG(配列番号:102)

40

を含むか、又は該N-末端領域は、アミノ酸残基

【化13】

DSSPLVHYG(配列番号:103)

を含む。より特定すると、一態様において、該Gは、該N-末端領域の最後の位置に対応する。

【0054】

様々な追加の態様において、N-末端領域は、アミノ酸残基

【化14】

DSSPLLQ(配列番号:104)

を含み、且つここで該Q残基は、該N-末端領域の最後のアミノ酸位置であるか、又はアミノ酸残基

【化15】

DSSPLLQFGGQV(配列番号:105)

を含み、ここで該V残基は、該N-末端領域の最後の位置に対応する。

【0055】

10

より特定すると、N-末端領域は更に、Rが該N-末端領域の第一のアミノ酸位置である、  
【化16】

RHPIP(配列番号:106)

又は、Hが該N-末端領域の第一のアミノ酸位置である、

【化17】

HPIP(配列番号:107)

又は、Rが該N-末端領域の第一のアミノ酸位置である、

【化18】

20

RPLAF(配列番号:108)

又は、Pが該N-末端領域の第一のアミノ酸位置である、

【化19】

PLAF(配列番号:109)

又は、Rが該N-末端領域の第一のアミノ酸位置である、R:を含む。

【0056】

30

様々な他の態様において、ペプチド又はキメラ配列は、N-末端領域の最初の4個のアミノ酸残基である、アミノ酸残基HPIP(配列番号:107)を有する。様々なまた異なる態様において、ペプチド又はキメラ配列は、該N-末端領域の第一の位置がR残基を有するか、又は該N-末端領域の第一の位置がM残基であるか、又は該N-末端領域の第一及び第二の位置がM配列であるか、又は該N-末端領域の第一及び第二の位置がRM配列であるか、又は該N-末端領域の第一及び第二の位置がRD配列であるか、又は該N-末端領域の第一及び第二の位置がDS配列であるか、又は該N-末端領域の第一及び第二の位置がMD配列であるか、又は該N-末端領域の第一及び第二の位置がMS配列であるか、又は該N-末端領域の第一から第三の位置がMDS配列であるか、又は該N-末端領域の第一から第三の位置がRDS配列であるか、又は該N-末端領域の第一から第三の位置がMSD配列であるか、又は該N-末端領域の第一から第三の位置がMSS配列であるか、又は該N-末端領域の第一から第三の位置がDSS配列であるか、又は該N-末端領域の第一から第四の位置が

40

【化20】

RDSS(配列番号:115)

配列であるか、又は該N-末端領域の第一から第四の位置が

【化21】

MDSS(配列番号:116)

配列であるか、又は該N-末端領域の第一から第五の位置が

【化22】

MRDSS (配列番号:117)

配列であるか、又は該N-末端領域の第一から第五の位置が

【化23】

MSSPL (配列番号:113)

配列であるか、又は該N-末端領域の第一から第六の位置が

【化24】

MDSSPL (配列番号:110) 10

配列であるか、又は該N-末端領域の第一から第七の位置が

【化25】

MSDSSPL (配列番号:111)

配列である。

【0057】

様々な他の特定の態様において、ペプチド又はキメラ配列は、該N-末端領域の第一のアミノ酸位置に、"M"残基、"R"残基、"S"残基、"H"残基、"P"残基、"L"残基又は"D"残基を有する。様々な代わりの特定の態様において、ペプチド又はキメラ配列、ペプチド配列は、該N-末端領域の第一のアミノ酸位置に、"M"残基又は"R"残基を有さない。 20

【0058】

更なる様々な他の態様において、ペプチド又はキメラ配列は、下記配列のいずれか一つを伴うN-末端領域を有する：

【化26】

MDSSPL (配列番号:110), MSDSSPL (配列番号:111), SDSSPL (配列番号:112), MSSPL (SE配列番号:113) 又は SSPL (配列番号:114)

。

【0059】

様々な更に追加の態様において、ペプチド又はキメラ配列は、配列番号:99[FGF19]のほぼ残基194に対応するC-末端領域の最後の位置の残基を有する。 30

【0060】

様々なより特定の態様において、ペプチド配列は、下記配列のいずれか一つ、又は該ペプチド配列のいずれかの部分配列若しくはその断片を有するか又はこれからなる：

## 【化27】

RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLLEIKA  
VALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEILEDGYNVYRSEKHRLPVSL  
SSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSDMPFGLVTGLE  
AVRSPSFEK (M3) (配列番号 :3);

RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLLEIKA  
VALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIREDGYNVYRSEKHRLPVSL  
SSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSDMPFGLVTGLE  
AVRSPSFEK (M140) (配列番号 :194);

RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRQRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLLEIKA  
VALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEILEDGYNVYRSEKHRLPVSL  
SSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSDMPFGLVTGLE  
AVRSPSFEK (M160) (配列番号 :196);

RDSSPLVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLLEIKAVALRT  
VAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQ  
RQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSDMPFGLVTGLEAVRSP  
SFEK (M69) (配列番号 :69);

RDSSPLLQWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLLEIKAVALRTVAI  
KGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQ  
LYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSDMPFGLVTGLEAVRSPSFE  
K (M52) (配列番号 :52);

RHIPDSSPLLQFGGQVRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLLEIKAVALR  
TVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAK  
QRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSDMPFGLVTGLEAVRS  
PSFEK (M5) (配列番号 :5);

10

20

30

HPIPDSSPLLQFGGQVRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVALRT  
VAIKGVHVSRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLSAKQ  
RQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSDMPFGLVTGLEAVRSP  
SFEK (M5-R) (配列番号 : 160);

HPIPDSSPLLQFGGQVQRQRYLYTDDAQQTAEAHLEIREDTVGGAADQSPESSLQLKALKPGV  
IQILGVKTSRFLCQRPDGALY GSLHFDP EACSFRELLLEDGY NVY QSEA HSLPLH LPGN KSPH  
RDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMV GPSQGRSPSYAS (M71) (SEQ  
10  
(配列番号 : 71);

HPIPDSSPLLQFGGQVQRQRYLYTDDAQQTAEAHLEIREDTVGGAADQSPESSLQLKALKPGV  
IQILGVKTSRFLCQRPDGALY GSLHFDP EACSFRELLLEDGY NVY QSEA HGLPLH LPGN KSPH  
RDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMV GPSQGRSPSYAS (M72)  
(配列番号 : 72);

HPIPDSSPLLQFGGQVQRQRYLYTDDAQQTAEAHLEIREDTVGGAADQSPESSLQLKALKPGV  
IQILGVKTSRFLCQRPDGALY GSLHFDP EACSFRELLLEDGY NVY QSEA HGLPLH LPGN KSPH  
RDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMV VQDELQGV GEGCHMHPE  
20  
NCKTLLTDIDRTHTEKPVWDGITGE (M73) (配列番号 : 73);

RPLAFSDASPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKA  
VALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLS  
SSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSDMPFGLVTGLE  
AVRSPSFEK (M1) (配列番号 : 1 又は 139);

RPLAFSDSSPLVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKA  
30  
VALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLS  
SSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSDMPFGLVTGLEA  
VRSPSFEK (M2) (配列番号 : 2 又は 140);

RDSSPLLQFGGQVRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVALRTVAI  
KGVHVSRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLSAKQRQ  
LYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSDMPFGLVTGLEAVRSPSFE  
K (M48) (配列番号 : 48 又は 6 又は 148);  
40

RPLAFSDSSPLLQFGGQVRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVAL  
RTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLSA

KQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLEAVR  
SPSFEK (M49) (配列番号 : 49 又は 7 又は 149);

RHPIPDSPLLQFGDQVRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLIEIKAVALR  
TVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEILEDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAK  
QRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLEAVRS  
PSFEK (M50) (配列番号 : 50);

RHPIPDSPLLQFGGNVRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLIEIKAVALR  
TVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAK  
QRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLEAVRS  
PSFEK (M51) (配列番号 : 51 又は 36 又は 155);

MDSSPLLQWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLIEIKAVALRTVA  
IKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQ  
LYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLEAVRSPSFE  
K (M53) (配列番号 : 192);

MRDSSPLVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLIEIKAVALR  
TVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAK  
QRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDS16MDPFGLEAV  
RSPSFEK (M70) (配列番号 : 70);

RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLIEIKA  
VALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEILPDGYNVYRSEKHRLPVSL  
SSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLEAV  
AVRSPSFEK (M139) (配列番号 : 193); 又は

RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLIEIKA  
VALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEILCDGYNVYRSEKHRLPVSL  
SSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLEAV  
AVRSPSFEK (M141) (配列番号 : 195);

。 いずれかの前記ペプチド配列のいくつかの実施態様において、R末端残基は、欠失されている。

#### 【 0 0 6 1 】

様々な追加の特定の態様において、該ペプチド配列のN-末端は、下記のいずれかを含むか又はこれからなる :

10

20

30

40

## 【化28】

HPIPDSPLQFGGVQLRHLYTSG (M5-R) (配列番号 :160 のアミノ酸 1-25 );  
DSSPLLQFGGVQLRHLYTSG (M6-R) (配列番号 :6 のアミノ酸 2-22 );  
RPLAFSDSPLLQFGGVQLRHLYTSG (M7) (配列番号 :7 のアミノ酸 1-27 );  
HPIPDSPLLQWGDPIRLRHLYTSG (M8-R) (配列番号 :8 のアミノ酸 2-26 );  
HPIPDSPLLQFGWGDPPIRLRHLYTSG (M9-R) (配列番号 :9 のアミノ酸 2-28 );  
HPIPSSPHVHYGGVQLRHLYTSG (M10-R) (配列番号 :10 のアミノ酸 2-28 );  
RPLAFSDAGPLLQWGDPIRLRHLYTSG (M11) (配列番号 :11 のアミノ酸 1-27 );  
RPLAFSDAGPLLQFGWGDPPIRLRHLYTSG (M12) (配列番号 :12 のアミノ酸 1-29 );  
RPLAFSDAGPLLQFGGVQLRHLYTSG (M13) (配列番号 :13 のアミノ酸 1-27 );  
HPIPSSPHVHYGGVQLRHLYTSG (M14-R) (配列番号 :14 のアミノ酸 2-26 );  
RPLAFSDAGPHVHYGGVQLRHLYTSG (M15) (配列番号 :15 のアミノ酸 1-27 );  
RPLAFSDAGPHVHWGDPIRLRHLYTSG (M16) (配列番号 :16 のアミノ酸 1-27 );  
RPLAFSDAGPHVGWGDPPIRLRHLYTSG (M17) (配列番号 :17 のアミノ酸 1-27 );  
RPLAFSDAGPHYWGDPPIRLRHLYTSG (M18) (配列番号 :18 のアミノ酸 1-27 );  
RPLAFSDAGPVYWGDPPIRLRHLYTSG (M19) (配列番号 :19 のアミノ酸 1-27 );  
RPLAFSDAGPVHGWGDPIRLRHLYTSG (M20) (配列番号 :20 のアミノ酸 1-27 );  
RPLAFSDAGPVHYWGDPPIRLRHLYTSG (M21) (配列番号 :21 のアミノ酸 1-27 );  
RPLAFSDAGPHVHGWDPIRLRHLYTSG (M22) (配列番号 :22 のアミノ酸 1-27 );  
RPLAFSDAGPHHGWDPIRLRHLYTSG (M23) (配列番号 :23 のアミノ酸 1-27 );  
RPLAFSDAGPHHYWGDPPIRLRHLYTSG (M24) (配列番号 :24 のアミノ酸 1-27 );  
RPLAFSDAGPHVYWGDPPIRLRHLYTSG (M25) (配列番号 :25 のアミノ酸 1-27 );  
RPLAFSDSSPLVHWGDPIRLRHLYTSG (M26) (配列番号 :26 のアミノ酸 1-27 );  
RPLAFSDSSPHVHWGDPIRLRHLYTSG (M27) (配列番号 :27 のアミノ酸 1-27 );  
RPLAFSDAGPHVWGDPIRLRHLYTSG (M28) (配列番号 :28 のアミノ酸 1-26 );  
RPLAFSDAGPHVHYWGDPPIRLRHLYTSG (M29) (配列番号 :29 のアミノ酸 1-28 );  
RPLAFSDAGPHVHYAWGDPIRLRHLYTSG (M30) (配列番号 :30 のアミノ酸 1-29 );  
RHPIPDSPLLQFGAQVQLRHLYTSG (M31) (配列番号 :31 のアミノ酸 1-26 );  
RHPIPDSPLLQFGDQVQLRHLYTSG (M32) (配列番号 :32 のアミノ酸 1-26 );  
RHPIPDSPLLQFGPQVQLRHLYTSG (M33) (配列番号 :33 のアミノ酸 1-26 );  
RHPIPDSPLLQFGGAVRLRHLYTSG (M34) (配列番号 :34 のアミノ酸 1-26 );  
RHPIPDSPLLQFGGEVRLRHLYTSG (M35) (配列番号 :35 のアミノ酸 1-26 );  
RHPIPDSPLLQFGGNVRLRHLYTSG (M36) (配列番号 :36 のアミノ酸 1-26 );  
RHPIPDSPLLQFGGQARLRHLYTSG (M37) (配列番号 :37 のアミノ酸 1-26 );

10

20

30

40

RHPIPDSPLLQFGGQIRLRHLYTSG (M38) (配列番号:38 のアミノ酸 1-26 );  
RHPIPDSPLLQFGGQTRLRHLYTSG (M39) ( 配列番号:39 のアミノ酸 1-26 );  
RHPIPDSPLLQFGWGQPVRLRHLYTSG (M40) ( 配列番号:40 のアミノ酸 1-28 );  
DAGPHVHYGWGDPIRLRHLYTSG (M74-R) (配列番号:74 のアミノ酸 2-24 );  
VHYGWGDPIRLRHLYTSG (M75-R) (配列番号:75 のアミノ酸 2-19 );  
RLRHLYTSG (M77-R) (配列番号:77 のアミノ酸 2-10 );  
RHPIPDSPLLQFGWGDPIRLRHLYTSG (M9) ( 配列番号:9 のアミノ酸 1-28 );  
RHPIPDSPLLQWGDPIRLRHLYTSG (M8) ( 配列番号:8 のアミノ酸 1-26 );  
RPLAFSDAGPLLQFGWGDPIRLRHLYTSG (M12) (配列番号:12 のアミノ酸 1-29 );  
RHPIPDSPPHVHYGWGDPIRLRHLYTSG (M10) (配列番号:10 のアミノ酸 1-28 );  
RPLAFSDAGPLLQFGGQVRLRHLYTSG (M13) ( 配列番号:13 のアミノ酸 1-27 );  
RHPIPDSPPHVHYGGQVRLRHLYTSG (M14) ( 配列番号:14 のアミノ酸 1-26 );  
RPLAFSDAGPHVHYGGDIRLRHLYTSG (M43) 配列番号:43 のアミノ酸 1-27 );又は  
RDSSPLLQFGGQVRLRHLYTSG (M6) (配列番号:6 のアミノ酸 1-22 )

10

20

。

## 【 0 0 6 2 】

様々な更なる特定の態様において、ペプチド配列は、下記のいずれか、又は該ペプチド配列のいずれかの部分配列若しくはその断片を含むか又はこれからなる：

## 【化29】

HIPDSSPLLQFGGQVRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVALRT  
VAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLSAKQ  
RQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESMDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSP  
SFEK (配列番号 :160);

DSSPLLQFGGQVRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVALRTVAI  
KGHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLSAKQRQ  
LYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESMDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFE  
K (配列番号 :138 又は 161);

RPLAFSDASPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKA  
VALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLS  
SSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESMDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLE  
AVRSPSFEK (配列番号 :1 又は 139);

RPLAFSDSSPLVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKA  
VALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLS  
SAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESMDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEA  
VRSPSFEK (配列番号 :2 又は 140); 又は

DSSPLVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVALRTV  
AIKGHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLSAKQR  
QLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESMDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSF  
EK (配列番号 :141)

。いずれかの前記ペプチド配列のいくつかの実施態様において、R末端残基が欠失されている。

## 【0063】

様々な更に追加の特定の態様において、ペプチド配列は、C-末端に配列番号:99[FGF19]のアミノ酸残基30-194の付加を更に含み、その結果キメラポリペプチドを生じる。

## 【0064】

様々な更なる実施態様において、ペプチド又はキメラ配列は、アミノ酸置換、付加、挿入を有するか、又は少なくとも1個の欠失されたアミノ酸を有する部分配列である。ペプチド配列のそのようなアミノ酸置換、付加、挿入及び欠失は、例えば、N-末端若しくはC-末端、又は内部の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、若しくはそれよりも多いアミノ酸残基(10~20、20~30、30~40、40~50個など)であることができる。例えば、部分配列は、アミノ末端、カルボキシ末端、又は内部からの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個又はそれよりも多いアミノ酸欠失を有する。特定の態様において、アミノ酸置換、又は欠失は、FGF19のアミノ酸位置8~20

## 【化30】

(AGPHVHYGWGDPI) (配列番号 :187)

のいずれかにおいて生じる。

## 【0065】

様々な更により特定の態様において、ペプチド又はキメラ配列は、該ペプチドのC-末端に配置された、下記のFGF19配列の全て又は一部を更に含むか :

10

20

30

40

50

## 【化 3 1】

PHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGL  
LQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPE  
EPEDLRGHLESDFSSPLETDSMDPFGLVTLGEAVRSPSFEK (配列番号 :188)

又は該アミノ末端 "R" 残基が、該配列から欠失されている。

## 【 0 0 6 6】

様々な実施態様において、ペプチド又はキメラ配列は、比較配列よりも大きい又は小さい機能又は活性を有する。特定の実施態様において、ペプチド配列は、FGF19、又はFGF19のアミノ酸16-20において

10

## 【化 3 2】

WGDPI ( 配列番号 :170)

配列について置換された :

## 【化 3 3】

GQV, GDI,  
WGPI ( 配列番号 : 171), WGDPV ( 配列番号 : 172), WGDI ( 配列番号 : 173), GDPI ( 配列番号:174), GPI, WGQPI ( 配列番号 : 175), WGAPI ( 配列番号 : 176), AGDPI ( 配列番号 : 177), WADPI ( 配列番号 : 178), WGDAI ( 配列番号 : 179), WGDPA ( 配列番号 : 180), WDPI (配列番号:181), WGDI ( 配列番号 : 182), WGDP ( 配列番号 : 183) 又はFGDPI ( 配列番号 : 184)  
のいずれかを有するFGF19変種配列と比べ、低下したHCC形成を有するか ; 或いは、FGF19、又はFGF19のアミノ酸16-20において

20

## 【化 3 4】

WGDPI ( 配列番号 :170)

配列について置換された :

## 【化 3 5】

GQV, GDI, WGPI ( 配列番号 : 171), WGDPV ( 配列番号 : 172), WGDI ( 配列番号 : 173), GDPI ( 配列番号 : 174), GPI, WGQPI ( 配列番号 : 175), WGAPI ( 配列番号 : 176), AGDPI ( 配列番号:177), WADPI (配列番号 : 178), WGDAI ( 配列番号 : 179), WGDPA ( 配列番号 : 180), WDPI (配列番号:181), WGDI ( 配列番号 : 182), WGDP ( 配列番号 : 183) 又はFGDPI ( 配列番号 : 184)

30

のいずれかを有するFGF19変種配列と比べ、より大きいグルコース降下活性を有するか ; 或いは、FGF19、又はFGF19のアミノ酸16-20において

## 【化 3 6】

WGDPI ( 配列番号 :170)

配列について置換された :

40

## 【化37】

GQV, GDI, WGPI(配列番号：171), WGDPV(配列番号：172), WGDI(配列番号：173), GDPI(配列番号：174), GPI, WGQPI(配列番号：175), WGAPI(配列番号：176), AGDPI(配列番号：177), WADPI(配列番号：178), WGDAI(配列番号：179), WGDPA(配列番号：180), WDPI(配列番号：181), WGDI(配列番号：182), WGDP(配列番号：183)又はFGDPI(配列番号：184)

のいずれかを有するFGF19変種配列と比べ、より少ない脂質増加活性を有するか；或いは、FGF19、又はFGF19のアミノ酸16-20において

10

## 【化38】

WGDP(配列番号：170)

配列について置換された：

## 【化39】

GQV, GDI, WGPI(配列番号：171), WGDPV(配列番号：172), WGDI(配列番号：173), GDPI(配列番号：174), GPI, WGQPI(配列番号：175), WGAPI(配列番号：176), AGDPI(配列番号：177), WADPI(配列番号：178), WGDAI(配列番号：179), WGDPA(配列番号：180), WDPI(配列番号：181), WGDI(配列番号：182), WGDP(配列番号：183)又はFGDPI(配列番号：184)

20

のいずれかを有するFGF19変種配列と比べ、より少ないトリグリセリド、コレステロール、非-HDL又はHDL増加活性を有するか；或いは、該ペプチド配列は、FGF21と比べ、より少ない除脂肪量低下活性を有する。そのような機能及び活性は、インビトロにおいて、又は例えばdb/dbマウスにおいてなど、インビトロにおいて確認することができる。

## 【0067】

追加の様々な実施態様において、ペプチド又はキメラ配列は、他の分子の機能又は活性に対する作用を有する。一態様において、ペプチド配列は、FGFR4媒介性活性を維持するか又は増大する。別の態様において、ペプチド配列は、線維芽細胞増殖因子受容体4(FGFR4)に結合するか若しくはFGFR4を活性化するか、又は検出可能にFGFR4に結合しないか若しくはFGFR4を活性化しない。追加の態様において、ペプチド配列は、FGFR4へのFGF19結合親和性よりもより少ない、同等又はより大きい親和性でFGFR4に結合する。更なる態様において、ペプチド配列は、FGF19がFGFR4を活性化するよりも少ない、同等又はより大きい程度又は量までFGFR4を活性化する。

30

## 【0068】

更なる追加の様々な実施態様において、ペプチド又はキメラ配列は、L-アミノ酸、D-アミノ酸、非天然アミノ酸、又はアミノ酸の模倣体、誘導体若しくは類似体を1種以上含む。また更なる様々な実施態様において、ペプチド又はキメラ配列は、リンカー又はスペーサーにより連結された、N-末端領域、C-末端領域、又はFGF19配列部分、又はFGF21配列部分を有する。

40

## 【0069】

更に追加の実施形態において、キメラペプチド又はペプチド配列は、医薬組成物に含まれ、これは次に、本発明の方法及び使用を実践するために使用することができる。そのような組成物は、不活性成分又は他の活性成分の組合せを含む。一実施態様において、医薬組成物などの組成物は、キメラペプチド配列又はペプチド配列、並びに胆汁酸ホメオスタシスを改善する物質を含む。

## 【0070】

キメラペプチド又はペプチド配列の投与又は送達を含む治療の使用及び方法も、提供さ

50

れる。特定の実施態様において、対象の治療の使用又は方法は、本発明のペプチド配列により治療可能な障害を有するか又は有するリスクのある対象などの、対象へ、本発明のキメラペプチド又はペプチド配列を、該障害を治療するのに有効な量で、投与することを含む。更なる実施態様において、方法又は使用は、胆汁酸に関係した又は関連した障害を有する対象などの、対象へ、本発明のキメラペプチド又はペプチド配列を投与することを含む。

#### 【0071】

本発明の方法及び使用の特定の態様において、キメラペプチド配列又はペプチド配列は、胆汁酸ホメオスタシスを改善するか又は提供するのに有効な量で、対象へ投与される。本発明の方法及び使用に従い治療可能な胆汁酸に関係した又は関連した障害の非限定的例は、メタボリック症候群；脂質又はグルコース関連障害；コレステロール又はトリグリセリド代謝；2型糖尿病；例えば、肝内の胆汁鬱滞の疾患(例えば、PBC、PFIC、PSC、PIC、新生児胆汁鬱滞、及び薬物誘発性胆汁鬱滞(例えば、エストロゲン))、並びに、肝外胆汁鬱滞の疾患(例えば、腫瘍由来の胆管圧縮、胆石による胆管閉塞)を含む、胆汁鬱滞；回腸切除、炎症性腸疾患(例えば、クローン病及び潰瘍性大腸炎)、下痢(例えばBAD)及びGI症状に繋がる以外特徴づけられない(特発性)胆汁酸の吸収を損なう障害、並びにGI癌、肝臓癌及び/又は胆嚢癌(例えば、結腸癌及び肝細胞癌)を含む、胆汁酸吸収不良及び遠位小腸に関与する他の障害；並びに/又は、NASH、肝硬変及び門脈圧亢進症の一因となるものなどの、胆汁酸合成異常を含む。一実施態様において、胆汁酸に関係した又は関連した障害は、胆汁酸吸収不良である。別の実施態様において、胆汁酸に関係した又は関連した障害は、下痢である。別の実施態様において、胆汁酸に関係した又は関連した障害は、胆汁鬱滞(例えば、肝内又は肝外の胆汁鬱滞)である。別の実施態様において、胆汁酸に関係した又は関連した障害は、原発性胆汁性肝硬変である。別の実施態様において、胆汁酸に関係した又は関連した障害は、原発性硬化性胆管炎である。別の実施態様において、胆汁酸に関係した又は関連した障害は、PFIC(例えば進行性PFIC)である。

#### 【0072】

任意に実質的又は有意なHCC活性を伴わずに、胆汁酸ホメオスタシスを調整するキメラペプチド配列及びペプチド配列などの、キメラペプチド配列又はペプチド配列を分析及び/又は同定する方法及び使用も、提供される。一実施態様において、方法又は使用は：a)候補ペプチド配列を提供すること；b)該候補ペプチド配列を被験動物へ投与すること；c)該候補ペプチド配列の投与後、該動物の胆汁酸レベルを測定し、該候補ペプチド配列が胆汁酸ホメオスタシスを調整するかどうかを決定すること；並びに、d)該候補ペプチド配列を、該動物におけるHCCの誘導、又はHCC活性と相關するマーカーの発現について分析すること；を含む。胆汁酸ホメオスタシスを調整するが、実質的HCC活性を有さない候補ペプチドは、そのことにより該候補ペプチド配列を、実質的HCC活性を伴わずに胆汁酸ホメオスタシスを調整するペプチド配列として同定する。

#### 【0073】

特定の態様において、キメラペプチド配列又はペプチド配列はまた、動物におけるHCCの誘導(例えば、被験動物由来の肝組織試料の評価)、又はHCC活性に相關するマーカーの発現について分析される。そのような方法は、該候補を、同じく任意に実質的又は有意なHCC活性を伴うことなく、胆汁酸ホメオスタシス調整活性を有するものとして同定する。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0074】

##### (図面の説明)

【図1】図1は、指定された濃度のFGF19及びFGF21(配列番号:99及び100)が腹腔内投薬されたdb/dbマウスにおけるcyp7a1発現を示している。

#### 【0075】

【図2】図2A-2Dは、A)変種M1(配列番号:1)；B)変種M2(配列番号:2)；C)変種M5(配列番号:5)；及び、D)変種M32(配列番号:32)の投薬後の、ヒト初代肝細胞におけるcyp7a1発現を示している。

10

20

30

40

50

## 【0076】

【図3】図3A-3Dは、A)変種M69(配列番号:69)；B)変種M75(配列番号:75)；C)変種M70(配列番号:70)；及び、D)変種M76(配列番号:76)の投薬後の、ヒト初代肝細胞におけるcyp7a1発現を示す。

## 【0077】

【図4】図4A-4Dは、A)変種M85(配列番号:85)；B)変種M96(配列番号:96)；C)変種M90(配列番号:90)；及び、D)変種M98(配列番号:98)の投薬後の、ヒト初代肝細胞におけるcyp7a1発現を示す。

## 【0078】

【図5】図5は、指定された変種：M1、M2、M5、M32、M69、M70、M75、M76、M85、M90、M9 10 6及びM98の、cyp7a1 IC<sub>50</sub>(pM)、相対cyp7a1発現及びHCCスコアを示す表である。

## 【0079】

【図6】図6は、M70投与が、プラセボと比べ、胆汁酸合成のマーカーである7a-ヒドロキシ-4-コレステン-3-オン(C4)を抑制することができる事を示している、臨床試験の結果を示す。

## 【0080】

【図7】図7は、L6細胞におけるFGFR4/-クロト複合体の発現は、FGF19、M3及びM70による、細胞内シグナル伝達経路の活性化を強化することを示す。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0081】

## (詳細な説明)

本発明は、胆汁酸ホメオスタシスを調整し、且つ胆汁酸に関係した又は関連した障害を治療することができるキメラ配列及びペプチド配列を提供する。一実施態様において、キメラペプチド配列は、少なくとも7個のアミノ酸残基を有するN-末端領域であり、第一のアミノ酸位置及び最後のアミノ酸位置を有するN-末端領域であって、ここで該N-末端領域が、

## 【化40】

DSSPL(配列番号:121)又はDASPH(配列番号:122)

配列を有するもの；並びに、FGF19の一部を有するC-末端領域であり、第一のアミノ酸位置及び最後のアミノ酸位置を有するC-末端領域であって、ここで該C-末端領域がFGF19のアミノ酸残基16-29 30

## 【化41】

(WGDPIRLHLYTSG; 配列番号:169)

を含み、且つ該W残基が、C-末端領域の第一のアミノ酸位置に対応しているもの：を含むか又はこれらからなる。

## 【0082】

別の実施態様において、キメラペプチド配列は、FGF21の一部を有するN-末端領域であり、第一のアミノ酸位置及び最後のアミノ酸位置を有するN-末端領域であって、ここで該N-末端領域が、GQV配列を有し、且つ該V残基が、N-末端領域の最後のアミノ酸位置に対応しているもの；並びに、FGF19の一部を有するC-末端領域であり、第一のアミノ酸位置及び最後のアミノ酸位置を有するC-末端領域であって、ここで該C-末端領域が、FGF19のアミノ酸残基21-29 40

## 【化42】

(RLRHLYTSG; 配列番号:185)

を含み、且つ該R残基が、C-末端領域の第一の位置に対応しているもの：を含むか又はこれらからなる。

## 【0083】

10

20

30

40

50

更なる実施態様において、ペプチド配列は、参照型又は野生型FGF19と比べ、1以上のアミノ酸の置換、挿入又は欠失を有するFGF19配列変種を含むか又はこれからなる。追加の実施態様において、ペプチド配列は、参照型又は野生型FGF21と比べ、1以上のアミノ酸の置換、挿入又は欠失を有するFGF21配列変種を含むか又はこれからなる。また追加の実施態様において、ペプチド配列は、FGF21配列の一部に融合されたFGF19配列の一部を含むか又はこれからなる。更なる追加の実施態様において、ペプチド配列は、FGF21配列の一部に融合されたFGF19配列の一部であって、ここで該FGF19及び／又はFGF21配列部分が、参照型又は野生型FGF19及び／又はFGF21と比べ、1以上のアミノ酸置換、挿入若しくは欠失を有するものを含むか又はこれからなる。

## 【0084】

10

本発明はまた、FGF19及び／又はFGF21ペプチド配列の変種及び融合体を使用し治療可能な障害を有するか又は有するリスクのある対象を治療する方法及び使用を提供する。一実施態様において、方法又は使用は、FGF19及び／又はFGF21ペプチド配列の1以上の変種又は融合体を、胆汁酸に関係した又は関連した障害を治療するのに有効な量で、対象と接触させるか又は投与することを含む。別の実施態様において、方法又は使用は、FGF19及び／又はFGF21ペプチド配列の変種又は融合体をコードしている1以上の核酸分子(例えば、任意にベクターを含む、該ペプチド配列をコードしている核酸と機能可能に連結された発現制御エレメント)を、胆汁酸に関係した又は関連した障害を治療するのに有効な量で、対象と接触させるか又は投与することを含む。

## 【0085】

20

代表的参照型又は野生型FGF19配列を、以下に示す：

## 【化43】

RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLLEIKA  
VALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQQLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSL  
SSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDMDPFGLVGTGLE  
AVRSPSFEK (配列番号：99)

。

## 【0086】

30

代表的参照型又は野生型FGF21配列を、以下に示す：

## 【化44】

HIPIDSSPLLQFGGQVRQRQLYTDDAQQTTEAHLEIREDTVGGAADQSPESSLQLKALKPGV  
IQILGVKTSRFLCQRPDGALY GSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGPLHLPGNKS  
RDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS (配列  
番号：100)

。FGF21対立遺伝子変種は、例えば、M70、M71及びM72を含む。

## 【0087】

40

用語「ペプチド」、「タンパク質」及び「ポリペプチド」配列は、アミド結合若しくは同等物により共有結合された、2個以上のアミノ酸、又はアミノ酸の化学修飾及び誘導体を含む「残基」を意味するよう本明細書において互換的に使用される。ペプチドの全て又は一部を形成するアミノ酸は、既知の21種の天然のアミノ酸からであってよく、これらはそれらの1文字略語又は一般的3文字略語の両方で示される。本発明のペプチド配列において、従来のアミノ酸残基は、それらの従来の意味を有する。従って「Leu」はロイシンであり、「Ile」はイソロイシンであり、「Nle」はノルロイシンであるなどである。

## 【0088】

インビボにおいて胆汁酸ホメオスタシスを調整する、本明細書記載の参照型FGF19及びFGF21ポリペプチドとは異なるペプチド配列が、本明細書において例示されている(例えば

50

、表1～10及び配列表)。非限定的な特定の例は、FGF19のカルボキシ末端アミノ酸21-194に融合されたFGF21のアミノ末端アミノ酸1-16を持つペプチド配列；FGF21のカルボキシ末端アミノ酸147-181に融合されたFGF19のアミノ末端アミノ酸1-147を持つペプチド配列；FGF21のカルボキシ末端アミノ酸17-181に融合されたFGF19のアミノ末端アミノ酸1-20を持つペプチド配列；FGF19のカルボキシ末端アミノ酸148-194に融合されたFGF21のアミノ末端アミノ酸1-146を持つペプチド配列；及び、FGF19のカルボキシ末端アミノ酸148-194に融合されたFGF21の内部アミノ酸17-146に融合されたFGF19のアミノ末端アミノ酸1-20を持つペプチド配列である。

## 【0089】

追加の特定のペプチド配列は、FGF19(配列番号:99)のアミノ酸16-20の

## 【化45】

10

WGDPI

配列に対応する

## 【化46】

WGDPI(配列番号:170)

配列モチーフを有するか、FGF19(配列番号:99)のアミノ酸16-20の

## 【化47】

20

WGDPI

配列に対応する

## 【化48】

WGDPI(配列番号:170)

配列モチーフを欠いているか、又はFGF19(配列番号:99)のアミノ酸16-20のFGF19

## 【化49】

WGDPI

配列に対応する置換された(すなわち、変異された)

30

## 【化50】

WGDPI(配列番号:170)

配列モチーフを有する。

## 【0090】

本発明の特定のペプチド配列は、FGF19及びFGF21とは異なる配列(例えば、本明細書に示したもの)、及びアミノ酸16-20においてFGF19

## 【化51】

WGDPI(配列番号:170)

40

配列について置換された

## 【化52】

GQV, GDI, WGPI

(配列番号:171), WGDPV(配列番号:172), WGDI(配列番号:173), GDPI(配列番号:174), GPI, WGQPI(配列番号:175), WGAPI(配列番号:176), AGDPI(配列番号:177), WADPI(配列番号:178), WGDAI(配列番号:179), WGDPA(配列番号:180), WDPI(配列番号:181), WGDI(配列番号:182), WGDP(配列番号:183)又はFGDPI(配列番号:184)

50

のいずれかを有するFGF19変種配列も含む。従って、野生型FGF19及びFGF21(例えば、各々、配列番号:99及び配列番号:100として本明細書に示したもの)は、除外される配列であり、且つFGF19のアミノ酸16-20において

【化53】

WGDP( 配列番号 :170)

配列について置換された

【化54】

GQV, GDI, WGPI( 配列番号 : 171),

10

WGDPV( 配列番号 : 172), WGDI( 配列番号 : 173), GDPI( 配列番号 : 174), GPI, WGQPI( 配列番号:175), WGAPI( 配列番号 : 176), AGDPI( 配列番号 : 177), WADPI( 配列番号 : 178), WGDAI( 配列番号 : 179), WGDPA ( 配列番号 : 180), WDPI (SEQ ID NO:181), WGDI ( 配列番号:182), WGDP ( 配列番号 :183) 又は FGDPI ( 配列番号 : 184)

のいずれかを有するFGF19も、除外され得る。しかしこの除外は、例えば、配列が例としてGQV、GQV、GDI、若しくはGPIのいずれかを有するFGF19に融合された3つのFGF21残基、又は

【化55】

20

WGPI

( 配列番号 : 171), WGDI ( 配列番号 : 173), GDPI ( 配列番号 : 174), WDPI ( 配列番号 : 181), WGDI ( 配列番号 : 182), 又は WGDP ( 配列番号 : 183)

のいずれかに融合された2つのFGF21残基を有する場合には適用されない。

【0091】

ペプチド配列の特定の非限定的例は、M1-M98(各々、配列番号:1-52、192、及び54-98)として本明細書において特定された配列変種の全て又は一部を含むか又はそれらからなる。ペプチド配列のより特定する非限定的例は：

30

【化56】

HIPIDSSPLLQFGGQVRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVALRT  
VAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVYRSEKHLRPLVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSP  
SFEK (M5-R) ( 配列番号 : 160)

(FGF21配列は、アミノ末端に "R" 残基を含むこともできる) ;

【化 5 7】

DSSPLLQFGGVQLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVALRTVAI  
KGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLSAKQRQ  
LYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFE  
K (配列番号 : 138 及び 161);

RPLAFSDASPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKA  
VALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLS  
SSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLE  
AVRSPSFEK (M1) (配列番号 : 1 又は 139);

10

RPLAFSDSSPLVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKA  
ALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLS  
SAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEA  
VRSPSFEK (M2) (配列番号 : 2 又は 140);

DSSPLVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVALRTV  
AIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLSAKQR  
QLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSF  
EK (配列番号 : 141);

20

RDSSPLVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVALRT  
VAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLSAKQ  
RQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSP  
SFEK (M69) (配列番号 : 69);

RDSSPLLQWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVALRTVAI  
KGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLSAKQRQ  
LYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFE  
K (M52) (配列番号 : 52);

30

HIPDSSPLLQFGGVQLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVALRT  
VAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLSAKQ

RQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSP  
SFEK (M5-R) ( 配列番号 : 160);

HIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTAEAHLEIREDTVGGAADQSPESSLQLKALKPGV  
IQILGVKTSRFLCQRPDGALY GSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHSLPLHLPGNKSPH  
RDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS (M71)  
(配列番号 : 71);

HIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTAEAHLEIREDTVGGAADQSPESSLQLKALKPGV  
IQILGVKTSRFLCQRPDGALY GSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPH  
RDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS (M72)  
(配列番号 : 72);

HIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTAEAHLEIREDTVGGAADQSPESSLQLKALKPGV  
IQILGVKTSRFLCQRPDGALY GSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPH  
RDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVQDELQVGEGCHMHPE  
NCKTLTDIDRTHTKEPVWDGITGE (M73) ( 配列番号 : 73);

RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKA  
VALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLQYSEEDCAFEEILEDGYNVYRSEKHRLPVSL  
SSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLE  
AVRSPSFEK (M3) ( 配列番号 : 3);

RDSSPLLQFGGQVRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVALRTVAI  
KGHSVRYLCMGADGKMQGLQYSEEDCAFEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQ  
LYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFE  
K (M48) ( 配列番号 : 48, 6 又は 148);

RPLAFSDSSPLLQFGGQVRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVAL  
RTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLQYSEEDCAFEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSA  
KQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVR  
SPSFEK (M49) ( 配列番号 : 49, 7 又は 149);

RHIPDSSPLLQFGDQVRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVALR  
TVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLQYSEEDCAFEEILEDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAK  
QRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRS  
PSFEK (M50) ( 配列番号 : 50);

10

20

30

40

RHIPDSSPLLQFGGNVRLHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLIEKAVALR  
TVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLSAK  
QRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSDMPFGLVTGLEAVRS  
PSFEK (M51) (配列番号 : 51, 36 又は 155);

MDSSPLLQWGDPIRLHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLIEKAVALRTVA  
IKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLSAKQRQ  
LYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSDMPFGLVTGLEAVRS  
PSFEK (M53) (配列番号 : 192);

MRDSSPLVHYGWGDPIRLHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLIEKAVALR  
TVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLSAK  
QRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSDMPFGLVTGLEAVRS  
PSFEK (M70) (配列番号 : 70);

RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLIEKA  
VALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEILPDGYNVRSEKHRLPVS  
SSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSDMPFGLVTGLE  
AVRSPSFEK (M139) (配列番号 : 193);

RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLIEKA  
VALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIREDGYNVRSEKHRLPVS  
SSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSDMPFGLVTGLE  
AVRSPSFEK (M140) (配列番号 : 194);

RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLIEKA  
VALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEILCDGYNVRSEKHRLPVS  
SSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSDMPFGLVTGLE  
AVRSPSFEK (M141) (配列番号 : 195); 又は

RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRQRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLIEKA  
VALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEILEDGYNVRSEKHRLPVS  
SSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSDMPFGLVTGLE  
AVRSPSFEK (M160) (配列番号 : 196)

として示される配列の全て又は一部、或いは前記ペプチド配列のいずれかの部分配列又はそれらの断片を含むか又はそれらからなる。前記ペプチド配列のいずれかのいくつかの実施態様において、R末端残基は欠失されている。

#### 【 0 0 9 2 】

ペプチド配列の追加の特定の非限定的例は、N-末端に、下記のいずれかの全て又は一部を含むか又はこれからなるペプチド配列を有し：

## 【化58】

HPIPDSPLLQFGGQVRLRHLYTSG (M5-R) (配列番号:160のアミノ酸 1-25 );  
DSSPLLQFGGQVRLRHLYTSG (M6) (M6-R) (配列番号:6 のアミノ酸 2-22 );  
RPLAFSDSSPLLQFGGQVRLRHLYTSG (M7) (配列番号:7 のアミノ酸 1-27 );  
HPIPDSPLLQWGDPIRLRHLYTSG (M8-R) (配列番号:8 のアミノ酸 2-26 );  
HPIPDSPLLQFGWGDPIRLRHLYTSG (M9-R) (配列番号:9 のアミノ酸 2-28 );  
HPIPDSSPHVHYGGQVRLRHLYTSG (M10-R) (配列番号:10のアミノ酸 2-28 ); 10  
RPLAFSDAGPLLQWGDPIRLRHLYTSG (M11) (配列番号:11 のアミノ酸 1-27 );  
RPLAFSDAGPLLQFGWGDPIRLRHLYTSG (M12) (配列番号:12 のアミノ酸 1-29 );  
RPLAFSDAGPLLQFGGQVRLRHLYTSG (M13) (配列番号:13 のアミノ酸 1-27 );  
HPIPDSSPHVHYGGQVRLRHLYTSG (M14-R) (配列番号:14のアミノ酸 2-26 );  
RPLAFSDAGPHVHYGGQVRLRHLYTSG (M15) (配列番号:15 のアミノ酸1-27 );  
RPLAFSDAGPHVHWGDPIRLRHLYTSG (M16) (配列番号:16のアミノ酸 1-27 );  
RPLAFSDAGPHVGWGDPIRLRHLYTSG (M17) (配列番号:17 のアミノ酸 1-27 ); 20  
RPLAFSDAGPHYGWGDPIRLRHLYTSG (M18) (配列番号:18 のアミノ酸 1-27 );  
RPLAFSDAGPVYGWGDPIRLRHLYTSG (M19) (配列番号:19 のアミノ酸 1-27 );  
RPLAFSDAGPVHGWDPIRLRHLYTSG (M20) (配列番号:20 のアミノ酸 1-27 );  
RPLAFSDAGPVHYWGDPPIRLRHLYTSG (M21) (配列番号:21 のアミノ酸 1-27 );  
RPLAFSDAGPHVHGWDPIRLRHLYTSG (M22) (配列番号:22 のアミノ酸 1-27 );  
RPLAFSDAGPHHGWDPIRLRHLYTSG (M23) (配列番号:23のアミノ酸 1-27 );  
RPLAFSDAGPHHYWGDPPIRLRHLYTSG (M24) (配列番号:24 のアミノ酸 1-27 );  
RPLAFSDAGPHVYWGDPPIRLRHLYTSG (M25) (配列番号:25のアミノ酸 1-27 ); 30  
RPLAFSDSSPLVHWGDPIRLRHLYTSG (M26) (配列番号:26 のアミノ酸 1-27 );  
RPLAFSDSSPHVHWGDPIRLRHLYTSG (M27) (配列番号:27 のアミノ酸 1-27 );  
RPLAFSDAGPHVWGDPIRLRHLYTSG (M28) (配列番号:28のアミノ酸 1-26 );  
RPLAFSDAGPHVHYWGDPPIRLRHLYTSG (M29) (配列番号:29 のアミノ酸 1-28 );  
RPLAFSDAGPHVHYAWGDPIRLRHLYTSG (M30) (配列番号:30 のアミノ酸 1-29 );  
RHPIPDSPLLQFGAQVRLRHLYTSG (M31) (配列番号:31 のアミノ酸 1-26 );  
RHPIPDSPLLQFGDQVRLRHLYTSG (M32) (配列番号:32 のアミノ酸 1-26 ); 40  
RHPIPDSPLLQFGPQVRLRHLYTSG (M33) (配列番号:33 のアミノ酸 1-26 );  
RHPIPDSPLLQFGGAVRLRHLYTSG (M34) (配列番号:34のアミノ酸 1-26 );  
RHPIPDSPLLQFGGEVRLRHLYTSG (M35) (配列番号:35 のアミノ酸 1-26 );

RHPIPDSPLQFGGNVRLRHLYTSG (M36) (配列番号 : 36 のアミノ酸 1-26 );  
 RHPIPDSPLQFGGQARLRHLYTSG (M37) (配列番号 : 37 のアミノ酸 1-26 );  
 RHPIPDSPLQFGGQIRLRHLYTSG (M38) (配列番号 : 38 のアミノ酸 1-26 );  
 RHPIPDSPLQFGGQTRLRHLYTSG (M39) (配列番号 : 39 のアミノ酸 1-26 );  
 RHPIPDSPLQFGWGPVRLRHLYTSG (M40) (配列番号 : 40 のアミノ酸 1-28 );  
 DAGPHVHYGWGDPIRLRHLYTSG (M74-R) (配列番号 : 74 のアミノ酸 2-24 );  
 VHYGWGDPIRLRHLYTSG (M75-R) (配列番号 : 75 のアミノ酸 2-19 );  
 RLRHLYTSG (M77-R) (配列番号 : 77 のアミノ酸 2-10 );  
 RHPIPDSPLQFGWGDPIRLRHLYTSG (M9) (配列番号 : 9 のアミノ酸 1-28 );  
 RHPIPDSPLQWGDPIRLRHLYTSG (M8) (配列番号 : 8 のアミノ酸 1-26 );  
 RPLAFSDAGPLLQFGWGDPIRLRHLYTSG (M12) (配列番号 : 12 のアミノ酸 1-29 );  
 RHPIPDSSPHVHYGWGDPIRLRHLYTSG (M10) (配列番号 : 10 のアミノ酸 1-28 );  
 RPLAFSDAGPLLQFGGQVRLRHLYTSG (M13) (配列番号 : 13 のアミノ酸 1-27 );  
 RHPIPDSSPHVHYGGQVRLRHLYTSG (M14) (配列番号 : 14 のアミノ酸 1-26 );  
 RPLAFSDAGPHVHYGGDIRLRHLYTSG (M43) (配列番号 : 43 のアミノ酸 1-27 ); 又は  
 RDSSPLQFGGQVRLRHLYTSG (M6) (配列番号 : 6 のアミノ酸 1-22 )

: 且つ前記ペプチド配列のいずれかについて、アミノ末端R残基は欠失されてよい。

【0093】

本発明のペプチド配列は加えて、FGF19、又はFGF19のアミノ酸16-20において

【化59】

WGDP (配列番号 : 170)

30

配列について置換された

【化60】

GQV, GDI, WGPI (配列番号 : 171), WGDPV (配列番号 : 172), WGDI (配列番号 : 173), GDPI (配列番号 : 174), GPI, WGQPI (配列番号 : 175), WGAPI (配列番号 : 176), AGDPI (配列番号 : 177), WADPI (配列番号 : 178), WGDAI (配列番号 : 179), WGDPA (配列番号 : 180), WDPI (配列番号 : 181), WGDI (配列番号 : 182), WGDP (配列番号 : 183)又はFGDPI (配列番号 : 184)

40

のいずれかを有するFGF19変種配列と比べ、HCCの誘導若しくは形成の低下若しくは非存在を伴うものを含む。本発明のペプチド配列はまた、FGF19、又はFGF19のアミノ酸16-20において

【化61】

WGDP (配列番号 : 170)

配列について置換された

## 【化62】

GQV, GDI, WGPI, WGPI(配列番号:171), WGDPV(配列番号:172), WGDI(配列番号:173), GDPI(配列番号:174), GPI, WGQPI(配列番号:175), WGAPI(配列番号:176), AGDPI(配列番号:177), WADPI(配列番号:178), WGDAI(配列番号:179), WGDPA(配列番号:180), WDPI(配列番号:181), WGDI(配列番号:182), WGDP(配列番号:183)又はFGDPI(配列番号:184)

のいずれかを有するFGF19変種配列と比べ、より大きいグルコース降下活性を伴うものも  
含む。本発明のペプチド配列は更に、FGF19、又はFGF19のアミノ酸16-20において

## 【化63】

WGDP(配列番号:170)

配列について置換された

## 【化64】

GQV, GDI, WGPI(配列番号:171), WGDPV(配列番号:172), WGDI(配列番号:173), GDPI(配列番号:174), GPI, WGQPI(配列番号:175), WGAPI(配列番号:176), AGDPI(配列番号:177), WADPI(配列番号:178), WGDAI(配列番号:179), WGDPA(配列番号:180), WDPI(配列番号:181), WGDI(配列番号:182), WGDP(配列番号:183)又はFGDPI(配列番号:184)

のいずれかを有するFGF19変種配列と比べ、より少ない脂質(例えば、トリグリセリド、コレステロール、非-HDL又はHDL)増加活性を伴うものを含む。

## 【0094】

典型的には、本発明のペプチド配列中のアミノ酸又は残基の数は、合計約250個未満(例えば、アミノ酸又はそれらの模倣体)であろう。様々な特定の実施態様において、残基の数は、約20個から最大約200個までの残基(例えば、アミノ酸又はそれらの模倣体)を含む。追加の実施態様において、残基の数は、約50個から最大約200個までの残基(例えば、アミノ酸又はそれらの模倣体)を含む。更なる実施態様において、残基の数は、長さが約100個から最大約195個までの残基(例えば、アミノ酸又はそれらの模倣体)を含む。

## 【0095】

アミノ酸又は残基は、アミド化学結合により、又は例えばグルタルアルデヒド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、二官能性マレイミド、又はN,N'-ジシクロヘキシリカルボジイミド(DCC)により形成されるものを含む、非天然及び非-アミド化学結合により、連結され得る。非-アミド結合は、例えば、ケトメチレン、アミノメチレン、オレフィン、エーテル、チオエーテルなどを含む(例えば、Spatolaの文献、「アミノ酸、ペプチド及びタンパク質の化学及び生化学(Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins)」、第7巻、267-357頁(1983)の「ペプチド及び主鎖修飾(Peptide and Backbone Modifications)」、Marcel Dekker社、NYを参照されたい)。従って、本発明のペプチドがFGF19配列の一部及びFGF21配列の一部を含む場合、これら2つの部分は、アミド結合によって互いに連結される必要はないが、任意の他の化学部分により連結されるか又はリンクマー部分を介して一緒に複合され得る。

## 【0096】

本発明はまた、例示されたペプチド配列が、少なくとも検出可能若しくは測定可能な活性若しくは機能を保持する限りは、該ペプチド配列の部分配列、変種及び修飾形を含む(表1~10及び配列表に列記されたFGF19及びFGF21の変種及び部分配列を含む)。例えば、いくつかの例示された変種ペプチドは、C-末端部分に、例えば該変種の "TSG" アミノ酸残基

10

20

30

40

50

に続けて、FGF19 C-末端配列：

【化65】

PHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGL  
LQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPE  
EPEDLRGHLESMDMFSSPLETDSMDPFGLVGLEAVRSPSFEK (配列番号：188)

を有する。

【0097】

また、いくつかの例示された変種ペプチド、例えば、アミノ末端にFGF21配列の全て又は一部を有するものは、N-末端に配置された "R" 残基を有し、これは省略することができる。同様に、いくつかの例示された変種ペプチドは、N-末端に配置された "M" 残基を含み、これは "R" 残基などの省略された残基に追加(append)されるか又はそれと更に置換されることができる。より特定すると、様々な実施態様において、ペプチド配列はN-末端に、  
【化66】

RDSS (配列番号：115), DSS, MDSS (配列番号：116) 又は MRDSS (配列番号：117)  
のいずれかを含む。更に細胞において、"M" 残基が "S" 残基に隣接する場合、"M" 残基は切断され、その結果 "M" 残基はペプチド配列から欠失されるのに対し、"M" 残基が "D" 残基に隣接する場合は、"M" 残基は切断されないでよい。従って例として、様々な実施態様において、ペプチド配列は、N-末端に残基  
10

【化67】

MDSSPL (配列番号：119), MSDSSPL (配列番号：120) (切断され SDSSPL (配列番号:112) へ) 及び MSSPL (配列番号：113) (切断され SSPL (配列番号：114) へ)  
を伴うものを含む。  
20

【0098】

従って、本発明の「ペプチド」、「ポリペプチド」及び「タンパク質」配列は、部分配列、変種又は修飾形(例えば、融合体又はキメラ)が少なくとも検出可能な活性又は機能を保持する限り、例えば胆汁酸ホメオスタシスを調整する限りは、表1～10及び配列表に列記されたFGF19及びFGF21変種及び部分配列の、並びに表1～10及び配列表に列記されたFGF19/FGF21融合体及びキメラの、部分配列、変種及び修飾形を含む。  
30

【0099】

本明細書において使用される用語「修飾する」及びその文法上の変形は、組成物が、ペプチド配列などの参照の組成物に関して逸脱していることを意味する。そのような修飾されたペプチド配列、核酸及び他の組成物は、参照の修飾されないペプチド配列、核酸、若しくは他の組成物と比べ、より大きい若しくはより少ない活性若しくは機能を有するか、又は異なる機能若しくは活性を有するか、或いは検出アッセイ及び/又はタンパク質精製において使用するための抗体を誘発するように、療法のために処方されたタンパク質において望ましい特性(例えば、血清半減期)を有してよい。例えば、本発明のペプチド配列は、血清半減期を増加するように、タンパク質のインビトロ及び/又はインビボ安定性を増大するようになど修飾されることがある。  
40

【0100】

本明細書に例示されたペプチド配列のそのような部分配列、変種及び修飾形(例えば、表1～10及び配列表に列記されたペプチド配列)の特定の例は、アミノ末端、カルボキシ末端又は内部への又はそれらからの、1個以上のアミノ酸の置換、欠失及び/又は挿入/付加を含む。一例は、アミノ酸残基の該ペプチド配列内の別のアミノ酸残基との置換である。別のあるものは、1個以上のアミノ酸残基の該ペプチド配列からの欠失、又は1個以上のアミノ酸残基の該ペプチド配列への挿入若しくは付加である。

【0101】

50

置換、欠失又は挿入／付加された残基の数は、ペプチド配列の1個以上のアミノ酸(例えば、1～3、3～5、5～10、10～20、20～30、30～40、40～50、50～60、60～70、70～80、80～90、90～100、100～110、110～120、120～130、130～140、140～150、150～160、160～170、170～180、180～190、190～200、200～225、225～250個又はそれよりも多い)である。従って、FGF19又はFGF21配列は、置換、欠失又は挿入／付加された少数又は多数のアミノ酸(例えば、1～3、3～5、5～10、10～20、20～30、30～40、40～50、50～60、60～70、70～80、80～90、90～100、100～110、110～120、120～130、130～140、140～150、150～160、160～170、170～180、180～190、190～200、200～225、225～250個、又はそれよりも多い)を有することができる。加えて、FGF19アミノ酸配列は、FGF21由来のアミノ酸の約1～3、3～5、5～10、10～20、20～30、30～40、40～50、50～60、60～70、70～80、80～90、90～100、100～110、110～120、120～130、130～140、140～150、150～160、160～170、170～180、180～190、190～200、200～225、225～250個又はそれよりも多いアミノ酸配列を含む又はそれらからなるか；或いは、FGF21アミノ酸又は配列は、FGF19由来のアミノ酸の約1～3、3～5、5～10、10～20、20～30、30～40、40～50、50～60、60～70、70～80、80～90、90～100、100～110、110～120、120～130、130～140、140～150、150～160、160～170、170～180、180～190、190～200、200～225、225～250個又はそれよりも多いアミノ酸配列を含むか又はそれらからなることができる。  
10

#### 【0102】

置換の具体例は、L-残基についてのD残基の置換を含む。従って、残基はL-異性体配置で記されているが、D-異性体が検出可能又は測定可能な機能を有さない配列に繋がらない限りは、本発明のペプチド配列のいずれか特定の位置又は全ての位置でのD-アミノ酸が含まれる。  
20

#### 【0103】

追加の具体例は、非保存的置換及び保存的置換である。「保存的置換」は、生物学的、化学的又は構造的に類似した残基による、1個のアミノ酸の置き換えである。生物学的に類似とは、その置換は、生物活性、例えばグルコース降下活性が同等であることを意味する。構造的に類似とは、アミノ酸が、アラニン、グリシン及びセリンなど類似した長さの側鎖を有するか、又は類似したサイズを有するか、或いは第一、第二又は追加のペプチド配列の構造が維持されることを意味する。化学的類似性とは、残基が、同じ電荷を有するか、又は両方とも親水性及び疎水性であることを意味する。特定の例は、イソロイシン、バリン、ロイシン若しくはメチオニンなどの1個の疎水性残基のもう1個のものとの置換、又はアルギニンのリジンとの、グルタミン酸のアスパラギン酸との、又はグルタミンのアスパラギンとの、セリンのトレオニンとなどの置換のように、1個の極性残基のもう1個のものとの置換を含む。慣習的アッセイを使用し、部分配列、変種又は修飾形は、グルコース降下活性などの活性を有するかどうかを決定することができる。  
30

#### 【0104】

本明細書に例示されているペプチド配列の部分配列、変種及び修飾形(例えば、表1～10及び配列表に列記されたペプチド配列)の特定の例は、参照型ペプチド配列(例えば、表1～10、配列表のいずれかのペプチド配列)に50%～60%、60%～70%、70%～75%、75%～80%、80%～85%、85%～90%、90%～95%、又は96%、97%、98%、若しくは99%の同一性を有する。用語「同一性」及び「相同性」及びそれらの文法上の変形は、2種以上の言及された実体が同じであることを意味する。従って、2つのアミノ酸配列が同一である場合、これらは同一のアミノ酸配列を有する。「同一の区域、領域又はドメイン」とは、2種以上の言及された実体の一部が同じであることを意味する。従って2つのアミノ酸配列が1つ以上の配列領域にわたり同一又は相同である場合、これらはこれらの領域において同一性を共有している。  
40

#### 【0105】

2つの配列間の同一性の程度は、当該技術分野において公知のコンピュータプログラム及び数学的アルゴリズムを用い、評価することができる。配列同一性(相同性)の割合を計算するそのようなアルゴリズムは、一般に、比較領域にわたる配列ギャップ及びミスマッチ  
50

チを考慮している。例えば、BLAST(例えば、BLAST 2.0)検索アルゴリズム(例えば、Altschulらの文献、J. Mol. Biol. 215:403 (1990)参照、NCBIにより公入手可能)は、下記の例証的検索パラメータを有する：ミスマッチ-2；ギャップオープン5；ギャップイクステンション2。ペプチド配列比較のためのBLASTPアルゴリズムは、典型的には、PAM100、PAM 250、BLOSUM 62又はBLOSUM 50などのスコアリングマトリックスと組合せて使用される。FASTA(例えば、FASTA2及びFASTA3)並びにSSEARCH配列比較プログラムもまた、同一性の程度を定量するために使用される(Pearsonらの文献、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:2444 (1988) ; Pearsonの文献、Methods Mol Biol. 132:185 (2000) ; 及び、Smithらの文献、J. Mol. Biol. 147:195 (1981))。Delaunay-ベースのトポロジーマッピングを使用する、タンパク質の構造類似性を定量するためのプログラムもまた開発されている(Bostickらの文献、Biochem Biophys Res Commun. 304:320 (2003))。

#### 【0106】

本明細書に例示されたペプチド配列の部分配列、変種及び修飾形(例えば、表1~10及び配列表に列記された配列)を含む本発明のペプチド配列において、「アミノ酸」又は「残基」は、従来の -アミノ酸に加え、少なくとも1つの側鎖が本明細書に定義されたアミノ酸側鎖部分である、 -アミノ酸、 , ジ置換アミノ酸及びN-置換アミノ酸を含む。「アミノ酸」は更に、N-アルキル -アミノ酸を含み、ここで該N-末端アミノ基は、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>の線状又は分岐したアルキル置換基を有する。従って用語「アミノ酸」は、天然のタンパク質アミノ酸の立体異性体及び修飾型、非タンパク質のアミノ酸、翻訳後修飾されたアミノ酸(例えば、グリコシル化、リン酸化、エステル又はアミド切断などにより)、酵素的に修飾された又は合成されたアミノ酸、誘導体化されたアミノ酸、アミノ酸を模倣するようデザインされた構築物若しくは構造物、修飾された側鎖部分を伴う、天然の部分から誘導体化された、又は合成された若しくは非天然のアミノ酸などを含む。修飾され且つ通常でないアミノ酸は、本発明のペプチド配列に含まれる(例えば、「合成ペプチド：使用指針(Synthetic Peptides: A User's Guide)」：Hrubyらの文献、Biochem. J. 268:249 (1990)；及び、Toniolo C.の文献、Int. J. Peptide Protein Res. 35:287 (1990)を参照されたい)。

#### 【0107】

加えて、アミノ酸の保護基及び修飾基が含まれる。本明細書において使用される用語「アミノ酸側鎖部分」は、任意のアミノ酸の任意の側鎖を含み、この用語「アミノ酸」は本明細書において定義されている。従ってこれは、天然のアミノ酸中の側鎖部分を含む。これは更に、天然のタンパク質アミノ酸の立体異性体及び修飾型、非タンパク質アミノ酸、翻訳後修飾されたアミノ酸、酵素的に修飾された若しくは合成されたアミノ酸、誘導体化されたアミノ酸、アミノ酸を模倣するようデザインされた構築物若しくは構造物などの中の側鎖部分などの、本明細書に示し且つ当業者に公知のような、修飾された天然のアミノ酸中の側鎖部分を含む。例えば、本明細書に開示された又は当業者に公知の任意のアミノ酸の側鎖部分は、この定義に含まれる。

#### 【0108】

「アミノ酸側鎖部分の誘導体」は、アミノ酸側鎖部分の定義内に含まれる。誘導体化されたアミノ酸側鎖部分の非限定的例は、例えば、(a)存在するアルキル、アリール、又はアラルキル鎖への1個以上の飽和又は不飽和の炭素原子の付加；(b)側鎖中の炭素の別の原子、好ましくは酸素又は窒素との置換；(c)メチル(--CH<sub>3</sub>)、メトキシ(--OCH<sub>3</sub>)、ニトロ(--NO<sub>2</sub>)、ヒドロキシル(--OH)、又はシアノ(--C≡N)を含む、側鎖の炭素原子への末端基の付加；(d)ヒドロキシ基、チオール基又はアミノ基を含む側鎖部分に関して、好適なヒドロキシ、チオール又はアミノ保護基の付加；或いは、(e)環構造を含む側鎖部分に関して、直接又はエーテル連結を介して結合したヒドロキシル、ハロゲン、アルキル、又はアリール基を含む、1個以上の環置換基の付加：を含む。アミノ基に関して、好適な保護基は、当業者に公知である。提供されたそのような誘導体化は、最終ペプチド配列において所望の活性を提供する(例えば、グルコース降下、改善されたグルコース又は脂質の代謝、抗-糖尿病活性、実質的HCC形成若しくは腫瘍形成の非存在、除脂肪量又は脂肪量の実質的調

10

20

30

40

50

整の非存在など)。

【0109】

「アミノ酸側鎖部分」は、そのような誘導体化を全て含み、且つ特定の非限定的例としては、 -アミノ酪酸、12-アミノドデカン酸、 -アミノイソ酪酸、6-アミノヘキサン酸、4-(アミノメチル)-シクロヘキサンカルボン酸、8-アミノオクタン酸、ビフェニルアラニン、Boc--t-ブトキシカルボニル、ベンジル、ベンゾイル、シトルリン、ジアミノ酪酸、ピロールリジン、ジアミノプロピオン酸、3,3'-ジフェニルアラニン、オルソニン(ortho nine)、シトルリン、1,3-ジヒドロ-2H-イソインドールカルボン酸、エチル、Fmoc-フルオレニルメトキシカルボニル、ヘプタノイル( $\text{CH}_3\text{---}(\text{CH}_2)_5\text{---C}(=\text{O})\text{---}$ )、ヘキサノイル( $\text{CH}_3\text{---}(\text{CH}_2)_4\text{---C}(=\text{O})\text{---}$ )、ホモアルギニン、ホモシステイン、ホモリジン、ホモフェニルアラニン、ホモセリン、メチル、メチオニンスルホキシド、メチオニンスルホン、ノルバリン(NVA)、フェニルグリシン、プロピル、イソプロピル、サルコシン(SAR)、tert-ブチルアラニン、及びベンジルオキシカルボニルが挙げられる。

【0110】

天然のタンパク質アミノ酸の立体異性体及び修飾型、非タンパク質アミノ酸、翻訳後修飾されたアミノ酸、酵素的に合成されたアミノ酸、誘導体化されたアミノ酸を含む非天然のアミノ酸、前述のいずれかから誘導された , , ジ置換アミノ酸(すなわち、少なくとも1本の側鎖は、それが誘導された残基のものと同じである、 , , ジ置換アミノ酸)、前述のいずれかから誘導された -アミノ酸(すなわち、 -炭素の存在について以外は、それが誘導された残基と同じである -アミノ酸)などを含む、前述のもの全てを含む、単独のアミノ酸は、本明細書において「残基」と称することができる。 -アミノ酸の側鎖部分に加え、好適な置換基は、C1～C6の線状又は分岐したアルキルを含む。Aibは、 , , ジ置換アミノ酸の例である。 , , ジ置換アミノ酸は、従来のL-及びD-異性体の言及を用いて称することができるが、そのような言及は便宜上であること、及び -位置の置換基が異なる場合、そのようなアミノ酸は、必要に応じ、指定されたアミノ酸側鎖部分を伴う残基のL-又はD-異性体から誘導された , , ジ置換アミノ酸と互換的に称することができることは理解されるべきである。従って、(S)-2-アミノ-2-メチル-ヘキサン酸は、L-Nle(ノルロイシン)から誘導された , , ジ置換アミノ酸、又はD-Alaから誘導された , , ジ置換アミノ酸のいずれかといふことができる。同様に、Aibは、Alaから誘導された , , ジ置換アミノ酸といふことができる。 , , ジ置換されたアミノ酸が提供される場合は常に、それらの(R)及び(S)配置の全てを含むことは理解されるべきである。

【0111】

「N-置換アミノ酸」は、任意に -炭素位置にH以外の置換基が存在しない、アミノ酸側鎖部分が主鎖アミノ基に共有結合されているいづれかのアミノ酸を含む。サルコシンは、N-置換アミノ酸の例である。例として、サルコシン及びAlaのアミノ酸側鎖部分は、同じ、すなわちメチルである点において、サルコシンは、AlaのN-置換アミノ酸誘導体と称することができる。

【0112】

本明細書に例示されたペプチド配列の部分配列、変種及び修飾形(例えば、表1～10及び配列表に記載された配列)を含む、本発明のペプチド配列の共有的修飾は、本発明に含まれている。共有的修飾の一つの型は、標的化されたアミノ酸残基を、該ペプチドの選択された側鎖又はN-若しくはC-末端残基と反応することが可能である有機誘導体化剤と反応させることを含む。二官能性物質による誘導体化は、例えば、抗-ペプチド抗体を精製する方法において使用するための、水-不溶性の支持体マトリックス又は表面にペプチドを架橋結合するために、又はその逆で、有用である。通常使用される架橋結合剤は、例えば1,1-ビス(ジアゾアセチル)-2-フェニルエタン、グルタルアルデヒド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、例えば4-アジドサリチル酸とのエステル、3,3'-ジチオビス(スクシンイミジルプロピオネート)などのジスクシンイミジルエステルを含むホモ二官能性イミドエステル、ビス-N-マレイミド-1,8-オクタンなどの二官能性マレイミド及びメチル-3-[*p*-アジドフェニル]ジチオ]プロピオイミダートなどの物質を含む。

10

20

30

40

50

## 【0113】

他の修飾は、グルタミニル残基及びアスパラギニル残基の、各々、対応するグルタミル残基及びアスパルチル残基への脱アミド化、プロリン及びリジンの水酸化、セリル残基又はトレオニル残基のヒドロキシリル基のリン酸化、リジン、アルギニン、及びヒスチジン側鎖の -アミノ基のメチル化(T. E. Creightonの文献、「タンパク質：構造及び分子特性(Proteins: Structure and Molecular Properties)」、W.H. Freeman & Co.、サンフランシスコ、79-86頁(1983))、N-末端アミンのアセチル化、任意のC-末端カルボキシリル基のアミド化などを含む。

## 【0114】

例示されたペプチド配列、並びに本明細書に例示されたペプチド配列の部分配列、変種及び修飾形(例えば、表1~10及び配列表に列記された配列)はまた、安定性のための主鎖の変形、誘導体、及びペプチド模倣体を含むことができる。用語「ペプチド模倣体」は、ピペラジンコア分子、ケト-ピペラジンコア分子及びジアゼピンコア分子を含むが、これらに限定されるものではない、残基の模倣体である分子(「模倣体」と称する)を含む。別に指定しない限りは、本発明のペプチド配列のアミノ酸模倣体は、カルボキシリル基及びアミノ基の両方、並びにアミノ酸側鎖に対応する基を含むか、又はグリシンの模倣体の場合は水素以外の側鎖は含まない。

10

## 【0115】

例として、これらは、天然のアミノ酸の立体障害、表面電荷分布、極性などを模倣する化合物を含むが、生物学的システムにおいて安定性を付与するアミノ酸である必要はないであろう。例えば、プロリンは、適切なサイズ及び置換の他のラクタム又はラクトンにより置換されることができ；ロイシンは、アルキルケトン、N-置換アミドにより置換されることに加え、アルキル、アルケニル若しくは他の置換基を使用しアミノ酸側鎖の長さを変動させることができ、他のものは当業者に明らかであろう。そのような置換を行うのに必須の要素は、該分子をデザインするために使用した残基とおおまかに同じサイズ及び電荷及び立体配置の分子を提供することである。これらの修飾の緻密化は、該化合物を機能アクセイ(例えばグルコース降下アクセイ)又は他のアクセイにおいて分析し、且つ構造活性相関を比較することにより行われるであろう。そのような方法は、医化学及び創薬の分野の業者の範囲内である。

20

## 【0116】

30

例示されたペプチド配列の部分配列、配列変種及び修飾形(例えば、表1~10及び配列表に列記されたペプチドを含む)を含む、本発明のペプチド配列の別の修飾型は、グリコシリ化である。本明細書において使用される「グリコシリ化」は、広範に、1つ以上の糖部分(例えば、糖鎖)のタンパク質、脂質又は他の有機分子への存在、付加又は結合をいう。本明細書における用語「脱グリコシリ化」の使用は、一般に、1つ以上の糖部分(例えば糖鎖)の除去又は欠失を意味することが意図される。加えて、この語句は、存在する様々な糖部分(例えば糖鎖)の種類及び割合(量)の変化に関与する、未変性タンパク質のグリコシリ化における定性的変化を含む。

## 【0117】

40

グリコシリ化は、アミノ酸残基の修飾によるか、又は未変性の配列に存在又は非存在し得る1以上のグリコシリ化部位の追加により、実現することができる。例えば、典型的な非グリコシリ化残基は、グリコシリ化され得る残基で置換することができる。グリコシリ化部位の付加は、アミノ酸配列の変更により達成することができる。該ペプチド配列への変更は、例えば、1つ以上のセリン又はトレオニン残基(0-結合型グリコシリ化部位について)又はアスパラギン残基(N-結合型グリコシリ化部位について)の付加又は置換により行うことができる。N-結合型及び0-結合型オリゴ糖の構造と各型に認められる糖残基の構造は、異なってよい。両方に共通して認められる糖の一つの型は、N-アセチルノイタミン酸(以後シアル酸と称す)である。シアル酸は通常、N-結合型及び0-結合型の両オリゴ糖の末端残基であり、且つその陰性電荷のために、糖タンパク質に酸性特性をもたらし得る。

## 【0118】

50

本発明のペプチド配列は、ヌクレオチド(例えばDNA)レベルでの変化により、特に該ペプチドをコードしているDNAを所望のアミノ酸に翻訳されるコドンが生じるように予め選択された塩基で変異することにより、任意に変更することができる。該ペプチド上の糖鎖の数を増加する別の手段は、グリコシドのポリペプチドへの化学的又は酵素的カップリングである(例えば、WO 87/05330参照)。脱グリコシリ化は、基礎となるグリコシリ化部位を除去することにより、化学的手段及び/又は酵素的手段によりグリコシリ化を欠失することにより、又はグリコシリ化されるアミノ酸残基をコードしているコドンの置換により実現することができる。化学的脱グリコシリ化技術は公知であり、且つポリペプチド上の糖鎖の酵素的切断は、様々なエンドグリコシダーゼ及びエキソグリコシダーゼの使用により実現することができる。

10

#### 【0119】

様々な細胞株を使用し、グリコシリ化されるタンパク質を生成することができる。ひとつの非限定的例は、ジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)-欠損チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞であり、これは組換え糖タンパク質の生成に一般に使用される宿主細胞である。これらの細胞は、酵素 - ガラクトシド -2,6-シアル酸転移酵素を発現せず、従って -2,6結合におけるシアル酸を、これらの細胞において生成される糖タンパク質のN-結合型オリゴ糖へ付加しない。

#### 【0120】

別の修飾型は、別のタンパク質(例えば、対象タンパク質と異なるアミノ酸配列を有するタンパク質)、又は担体分子などの、本発明のペプチド配列のN-及び/又はC-末端での1以上の追加の成分又は分子の複合(例えば連結)である。従って、例示的ペプチド配列は、別の成分又は分子との複合体であることができる。

20

#### 【0121】

いくつかの実施態様において、本発明のペプチド配列のアミノ末端又はカルボキシ末端は、免疫グロブリンFc領域(例えば、ヒトFc)に融合され、融合複合体(又は融合体分子)を形成することができる。Fc融合複合体は、生物薬剤の全身の半減期を増大することができ、その結果該生物薬剤製品は、延長された活性を有するか又は必要な投与頻度を減らすことができる。Fcは、血管を裏打ちしている内皮細胞内の胎児性Fc受容体(FcRn)に結合し、且つ結合時に、このFc融合分子は、分解及び循環への再放出から保護され、該分子をより長く循環内に維持する。このFc結合は、それにより内在性IgGがそのより長い血漿半減期を保持する機序であると考えられる。周知であり且つ検証されたFc融合薬物は、薬物動態、溶解度、及び製造効率を向上するために、抗体のFc領域へ連結された生物薬剤の2つのコピーからなる。より最近のFc-融合技術は、従来のFc-融合複合体と比べ、該生物薬剤の薬物動態特性及び薬力学特性を最適化するための、抗体のFc領域への生物薬剤の単独コピーに結びつけられている。

30

#### 【0122】

複合体修飾を使用し、第二分子の追加的又は相補的機能又は活性を伴う活性を維持するペプチド配列を作製することができる。例えば、溶解度、貯蔵、インビボ又は貯蔵半減期若しくは安定性、免疫原性の低下、インビボにおける遅延若しくは制御された放出を促進するために、例えばペプチド配列は、分子へ複合されることができる。他の機能又は活性は、複合されないペプチド配列に比べ毒性を低下する複合体、複合されないペプチド配列よりもより効率的にある種類の細胞又は臓器を標的化する複合体、又は本明細書に示した障害又は疾患(例えば糖尿病)に関連した原因又は作用に対抗するための薬物を含む。

40

#### 【0123】

タンパク質療法の臨床的有効性は、短い血漿半減期及び易分解性により制限されることがある。様々な治療的タンパク質の研究は、(例えば、典型的にはタンパク質及び非タンパク質性ポリマー(例えばPEG)の両方へ共有的に結合された連結部分を介して)ペプチド配列を様々な非タンパク質性ポリマー、例えばポリエチレングリコール(PEG)、ポリプロピレングリコール、又はポリオキシアルキレンへ複合又は連結することを含む様々な修飾が、半減期を延長することができることを示している。そのようなPEG-複合された生体分子

50

は、より良い物理安定性及び温度安定性、酵素分解への感受性に対する保護、増加した溶解度、より長いインビボ循環半減期及び減少したクリアランス、低下した免疫原性及び抗原性、並びに低下した毒性を含む、臨床上有益な特性を有することが示されている。

#### 【0124】

本発明のペプチド配列への複合に適したPEGは、一般に水中において室温で可溶性であり、且つ一般式R(O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O-Rを有し、ここでRは水素又はアルキル基若しくはアルカノール基などの保護基であり、nは1~1000の整数である。Rが保護基である場合、これは一般に1~8個の炭素を有する。本ペプチド配列に複合されたPEGは、線形又は分岐型であることができる。分岐したPEG誘導体、「星型-PEG」及び多-アーム型PEGが、本発明に含まれる。本発明で使用されるPEGの分子量は、いずれか特定の範囲に限定されるものではないが、いくつかの実施態様は、分子量500~20,000を有するのに対し、別の実施態様は、分子量4,000~10,000を有する。

10

#### 【0125】

本発明は、PEGが異なる「n」値を有し、その結果様々な異なるPEGが特定の比で存在する複合体の組成物を含む。例えば、一部の組成物は、n=1、2、3及び4である、複合体の混合物を含有する。一部の組成物において、n=1である複合体の割合は18~25%であり、n=2である複合体の割合は50~66%であり、n=3である複合体の割合は12~16%であり、且つn=4である複合体の割合は最大5%である。そのような組成物は、当該技術分野において公知の反応条件及び精製方法により生成することができる。

20

#### 【0126】

PEGは、本発明のペプチド配列へ直接的又は間接的(例えば、中間体を介して)結合することができる。例えば、一実施態様において、PEGは、末端反応基(「スペーサー」)を介して結合する。スペーサーは、例えば、1種以上のペプチド配列の遊離のアミノ基又はカルボキシル基と、ポリエチレングリコールの間の結合を媒介する末端反応基である。遊離アミノ基に結合することができるスペーサーを有するPEGは、ポリエチレングリコールのコハク酸エステルのN-ヒドロキシスクシニルイミドによる活性化により調製することができる、N-ヒドロキシスクシニルイミドポリエチレングリコールを含む。遊離アミノ基に結合することができる別の活性化されたポリエチレングリコールは、ポリエチレングリコールモノメチルエーテルとシアヌル酸クロリドとの反応により調製することができる、2,4-ビス(0-メトキシポリエチレングリコール)-6-クロロ-s-トリアジンである。遊離カルボキシル基に結合する活性化されたポリエチレングリコールは、ポリオキシエチレンジアミンを含む。

30

#### 【0127】

スペーサーを有するPEGへの1種以上の本発明のペプチド配列の複合は、様々な従来の方法により実行することができる。例えばこの複合反応は、試薬のタンパク質に対するモル比4:1から30:1までを利用し、pH5~10の溶液中で、温度4~室温で、30分~20時間かけて実行することができる。反応条件は、主として所望の置換度の作製に向かう反応を指向するように選択することができる。概して、低い温度、低いpH(例えば、pH=5)、及び短い反応時間は、結合されるPEGの数を減少させる傾向があるのに対し、高い温度、中性から高いpH(例えば、pH=7)、及び比較的長い反応時間は、結合されるPEGの数を増加させる傾向がある。当該技術分野において公知の様々な方法を使用し、この反応を終結することができる。一部の実施態様において、この反応は、反応混合液の酸性化、及び例えば-20~での凍結により終結される。

40

#### 【0128】

例示されたペプチド配列の部分配列、配列変種及び修飾形(表1~10及び配列表に列記されたペプチドを含む)を含む本発明のペプチド配列は更に、タンパク質；セファロース、アガロース、セルロース、セルロースビーズなどの、多糖；ポリグルタミン酸、ポリリジンなどの、ポリマー性アミノ酸；アミノ酸コポリマー；失活されたウイルス粒子；ジフテリア、破傷風、コレラ由来のトキソイド、ロイコトキシン分子などの、失活された細菌性毒素；失活された細菌；及び、樹状細胞などの、大型のゆっくり代謝される巨大分子への

50

複合を含む。そのような複合された形態は、望ましいならば、本発明のペプチド配列に対する抗体を産生するために使用することができる。

#### 【0129】

追加の複合に適した成分及び分子としては、例えば、チログロブリン；ヒト血清アルブミン(HSA)などの、アルブミン；破傷風トキソイド；ジフテリアトキソイド；ポリ(D-リジン：D-グルタミン酸)などの、ポリアミノ酸；ロタウイルスのVP6ポリペプチド；インフルエンザウイルスヘマグルチニン、インフルエンザウイルス核タンパク質；キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)；及び、B型肝炎ウイルスコアタンパク質及び表面抗原；又は、前述の任意の組合せが挙げられる。

#### 【0130】

10  
アルブミンの本発明のペプチド配列への融合は、例えば、HSA(ヒト血清アルブミン)をコードしているDNA又はそれらの断片が、ペプチド配列をコードしているDNAに連結されるなどの、遺伝子操作により実現することができる。その後好適な宿主を、融合体ポリペプチドを発現するように、例えば好適なプラスミドの形状で、この融合されたスクレオチド配列により形質転換又はトランスフェクションすることができる。この発現は、インビトロの形態で、例えば原核細胞若しくは真核細胞において、又はインビボの形態で、例えばトランスジェニック生体において実行することができる。本発明の一部の実施態様において、融合タンパク質の発現は、哺乳動物の細胞株、例えばCHO細胞株において実行される。

#### 【0131】

20  
標的タンパク質又はペプチドをアルブミンへ遺伝子融合する更なる手段は、Albufuse(登録商標)(Novozymes Biopharma社；デンマーク)として公知の技術を含み、且つこの複合された治療的ペプチド配列は頻繁に生体に取り込まれやすくなり、はるかにより有効となり始める。この技術は、C型肝炎感染症を治療するために使用されるアルブミンとインターフェロン-2Bの組合せである、Albuferon(登録商標)(Human Genome Sciences社)を製造するために商業的に利用されている。

#### 【0132】

別の実施態様は、1種以上のヒトドメイン抗体(dAb)の使用を伴う。dAbは、ヒト抗体(IgG)の最も小さい機能性結合単位であり、且つ好ましい安定性及び溶解度の特徴を有する。この技術は、HSA及び関心対象の分子(例えば、本発明のペプチド配列)に複合されたdAbを伴う(これにより、「AlbudAb」が形成される；例えば、EP1517921B、WO2005/118642及びW02006/051288参照)。AlbudAbは、多くの場合、ペプチドの血清半減期を延長するために使用される現在の技術よりも小さく、かつ細菌又は酵母などの微生物発現系において製造しやすい。HSAは、半減期約3週間を有するので、得られる複合された分子は、その半減期を改善する。dAb技術の使用はまた、関心対象の分子の有効性を増強することができる。

#### 【0133】

追加の複合に適した成分及び分子は、単離又は精製に適したものとを含む。特定の非限定的例としては、ビオチン(ビオチン-アビジン特異結合対)、抗体、受容体、リガンド、レクチンなどの結合性分子、又は例えばプラスチック若しくはポリスチレン製のビーズ、プレート又はビーズ、磁気ビーズ、試験小片、及び膜などの固体支持体を含む分子などが挙げられる。

#### 【0134】

40  
陽イオン交換クロマトグラフィーなどの精製法を使用し、電荷差により複合体を分離することができ、これは複合体をそれらの様々な分子量に効果的に分離する。例えば、陽イオン交換カラムに装加し、且つその後～20mM酢酸ナトリウム、pH～4により洗浄し、その後pH3～5.5、好ましくはpH～4.5で緩衝された線形(0M～0.5M)のNaCl勾配により溶離することができる。陽イオン交換クロマトグラフィーにより得られた画分の内容は、例えば、質量分析、SDS-PAGE、又は分子量により分子実体を分離する他の公知の方法などの、従来の方法を用い、分子量により同定することができる。次に、修飾されないタンパク質配列及び他の数の結合PEGを有する複合体を含まない、結合され精製されたPEGを所望の数有す

る複合体を含む画分が、状況に応じて同定される。

【0135】

更に別の実施態様において、本発明のペプチド配列は、非限定的に、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、マイトイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチニン、ビンプラスチニン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、及びそれらの類似体又は相同体を含む細胞毒性薬を含む、化学物質(例えば、免疫毒素又は化学療法薬)に連結される。他の化学物質は、例えば、代謝拮抗薬(例えば、メトトレキセート、6-メルカブトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシルダカルバジン)；アルキル化剤(例えば、メクロレタミン、カルムスチニン及びロムスチニン、シクロトスファミド(cy clothiosphamide)、ズルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトイシンC、及びシスプラチニン)；抗生物質(例えば、ブレオマイシン)；並びに、有糸分裂阻害剤(例えば、ビンクリスチニン及びビンプラスチニン)を含む。細胞毒素は、当該技術分野において公知であり且つ本明細書に記載のリンカー技術を使用し、本発明のペプチドへ複合することができる。  
10

【0136】

更に複合に適した成分及び分子は、アッセイにおける検出に適したものとを含む。特定の非限定的例は、放射性同位体(例えば、<sup>125</sup>I; <sup>35</sup>S、<sup>32</sup>P; <sup>33</sup>P)、検出可能な生成物を生じる酵素(例えば、ルシフェラーゼ、-ガラクトシダーゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ及びアルカリホスファターゼ)、蛍光タンパク質、発色性タンパク質、色素(例えば、フルオレセインイソチオシアネート)；蛍光発光金属(例えば、<sup>152</sup>Eu)；化学発光化合物(例えば、ルミノール及びアクリジニウム塩)；生物発光化合物(例えば、ルシフェリン)；並びに、蛍光タンパク質などの、検出可能な標識を含む。間接的標識物は、ペプチド配列に結合している標識された又は検出可能な抗体を含み、ここで該抗体は検出され得る。  
20

【0137】

いくつかの実施態様において、本発明のペプチド配列は、放射性同位元素に複合され、診断薬又は治療薬として有用である、細胞傷害性放射性医薬(放射性免疫複合体)を作製する。そのような放射性同位元素の例は、ヨウ素<sup>131</sup>、インジウム<sup>111</sup>、イットリウム<sup>90</sup>、及びルテチウム<sup>177</sup>を含むが、これらに限定されるものではない。放射性免疫複合体を調製する方法は、当業者には公知である。市販されている放射性免疫複合体の例としては、イブリツモマブ、チウキセタン、及びトシツモマブが挙げられる。  
30

【0138】

本発明のペプチド配列の循環半減期を延長し、安定性を増加し、クリアランスを減少するか、又は免疫原性若しくはアレルゲン性を変更するために本発明に含まれる他の手段及び方法は、該分子の特徴を修飾するために、他の分子に連結されているヒドロキシエチルデンプン誘導体を利用する、HES化(hesylation)によるペプチド配列の修飾に関与している。HES化の様々な態様は、例えば、米国特許出願第2007/0134197号及び第2006/0258607号に説明されている。

【0139】

本発明のペプチド配列を修飾するために使用される前述の成分及び分子のいずれかは、任意にリンカーを介して複合されてよい。好適なリンカーは、一般に修飾されたペプチド配列と連結された成分及び分子の間の動きを可能にするのに十分な長さである「可動性リンカー」を含む。これらのリンカーモノマーは一般に、約6~50個の原子の長さである。これらのリンカーモノマーはまた、例えば、アリールアセチレン、2~10のモノマー単位を含むエチレングリコールオリゴマー、ジアミン、二酸、アミノ酸、又はそれらの組合せであることもできる。好適なリンカーモノマーは、容易に選択することができ、且つ1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、10~20、20~30、30~50個のアミノ酸(例えば、Gly)などのいずれか好適な長さであることができる。  
40

【0140】

例証的可動性リンカーモノマーは、グリシンポリマー(G)<sub>n</sub>、グリシン-セリンポリマー(例えば、

## 【化68】

(GS)<sub>n</sub>, GSGGS<sub>n</sub> (配列番号: 129) 及び GGGS<sub>n</sub> (配列番号: 130),

ここでnは少なくとも1の整数である)、グリシン-アラニンポリマー、アラニン-セリンポリマー、及び他の可動性リンカーを含む。グリシンポリマー及びグリシン-セリンポリマーは、比較的構造化されておらず(unstructured)、そのため成分間のニュートラルなテザーとして役立つことができる。可動性リンカーの例は、

## 【化69】

GGSG (配列  
番号:131), GGS GG (配列番号:132), GSG SG (配列番号:133), GS GGG (配列番号:134),  
GGG SG (配列番号:189), 及び GS S SG (配列番号:135)

を含むが、これらに限定されるものではない。

## 【0141】

表1~10及び配列表に列記されたFGF19及びFGF21の変種及び部分配列並びにFGF19/FGF21融合体及びキメラに加え、表1~10及び配列表に列記された配列の部分配列、配列変種及び修飾形を含む本発明のペプチド配列は、本明細書に示す1つ以上の活性を有する。活性の一例は、胆汁酸ホメオスタシスの調整である。活性の別の例は、例えばFGF19と比べ、HCCの低下した刺激又は形成である。活性の追加の例は、例えばFGF21と比べ、より低い又は低下した脂質(例えば、トリグリセリド、コレステロール、非-HDL)又はHDLの増加活性である。活性の更なる例は、例えばFGF21と比べ、より低い又は低下した除脂肪筋肉量(Lean muscle mass)の低下活性である。活性のまた別の例は、FGFR4への結合、又はFGFR4の活性化であり、例えば、FGFR4についてのFGF19結合親和性と同等又はより大きい親和性でFGFR4に結合するペプチド配列；並びに、FGFR4を活性化するFGF19と同等又はより大きい程度又は量までFGFR4を活性化するペプチド配列である。活性のまた更なる例は、胆汁酸に関係した又は関連した障害の治療を含む。

## 【0142】

より特定すると、表1~10及び配列表に列記されたFGF19及びFGF21の変種及び部分配列並びにFGF19/FGF21融合体及びキメラに加え、表1~10及び配列表に列記された配列の部分配列、配列変種及び修飾形を含む本発明のペプチド配列は、下記の活性を伴うものを含む：FGF19、又はFGF19のアミノ酸16-20において

## 【化70】

WGDPI (配列番号:170)

配列について置換された

## 【化71】

GQV,

GDI, WGPI (配列番号: 171), WGDPV (配列番号: 172), WGDI (配列番号: 173), GDPI (配列番号:174), GPI, WGQPI (配列番号: 175), WGAPI (配列番号: 176), AGDPI (配列番号:177), WADPI (配列番号: 178), WGDAI (配列番号: 179), WGDPA (配列番号: 180), WDPI (配列番号: 181), WGDI (配列番号: 182), WGDP (配列番号: 183)又はFGDPI (配列番号:184)

のいずれかを有するFGF19変種配列と比べ、低下したHCC形成を有する一方で、胆汁酸ホメオスタシスを調整するか又は胆汁酸に関係した若しくは関連した障害を治療するペプチド配列；FGF19、又はFGF19のアミノ酸16-20において

## 【化72】

WGDPI(配列番号:170)

配列について置換された

## 【化73】

GQV, GDI, WGPI(配列番号:171), WGDPV(配列番号:172),  
 WGDI(配列番号:173), GDPI(配列番号:174), GPI, WGQPI(配列番号:175), WGAPI(配列番号:176), AGDPI(配列番号:177), WADPI(配列番号:178), WGDAI(配列番号:179),  
 WGDPA(配列番号:180), WDPI(配列番号:181), WGDI(配列番号:182), WGDP(配列番号:183)又はFGDPI(配列番号:184)

10

のいずれかを有するFGF19変種配列と比べ、より大きい胆汁酸調整活性を有するペプチド配列；FGF19、又はFGF19のアミノ酸16-20において

## 【化74】

WGDPI(配列番号:170)

配列について置換された

## 【化75】

20

GQV, GDI, WGPI(配列番号:171), WGDPV(配列番号:172), WGDI(配列番号:173), GDPI(配列番号:174), GPI, WGQPI(配列番号:175), WGAPI(配列番号:176), AGDPI(配列番号:177), WADPI(配列番号:178), WGDAI(配列番号:179), WGDPA(配列番号:180), WDPI(配列番号:181), WGDI(配列番号:182), WGDP(配列番号:183)又はFGDPI(配列番号:184)

のいずれかを有するFGF19変種配列と比べ、より少ない脂質増加活性(例えば、より少ないトリグリセリド、コレステロール、非-HDL)又はより多いHDL増加活性を有するペプチド配列；並びに、FGF21と比べ、より少ない除脂肪量低下活性を有するペプチド配列。

30

## 【0143】

より特定すると、表1～10及び配列表に列記されたFGF19及びFGF21の変種及び部分配列並びにFGF19/FGF21融合体及びキメラに加え、表1～10及び配列表に列記された配列の部分配列、配列変種及び修飾形を含む本発明のペプチド配列は、下記の活性を伴うものを含む：胆汁酸ホメオスタシスを調整するペプチド配列；胆汁酸に関係した又は関連した障害を治療するペプチド配列；FGFR4に結合するか、又はFGFR4を活性化するペプチド配列、例えば、FGFR4についてのFGF19結合親和性と同等又はより大きい親和性でFGFR4に結合するペプチド配列；FGFR4を活性化するFGF19と同等又はより大きい程度又は量までFGFR4を活性化するペプチド配列；例えばFGF19と比べ、アルド-ケト還元酵素遺伝子発現をダウンレギュレーション又は低下するペプチド配列；並びに、FGF21と比べ溶質担体ファミリー1、メンバー2(SIC1a2)遺伝子発現をアップレギュレーション又は増加するペプチド配列。

40

## 【0144】

本明細書に開示されたように、変種は、FGF19の様々なN-末端修飾及び/又は切断を含み、これは1又は数個のN-末端FGF19アミノ酸が、FGF21由来のアミノ酸により置換されている変種を含む。そのような変種は、グルコース降下活性に加え、好ましい脂質プロファイルを有し、測定可能に若しくは検出可能に腫瘍原性ではない変種を含む。

## 【0145】

様々な特定の態様において、FGF19のループ-8領域(残基127-129は、ループ-8領域を構成すると規定される)への修飾は、グルコース降下活性を有し、更に実質的腫瘍原性を示

50

すことなく、好ましい代謝パラメータを保持することが、本明細書において明らかにされている。本明細書において、FGF19残基127-129は、ループ-8領域を構成すると規定されるが、しかし文献において、ループ-8領域は、他の残基(例えば、残基125-129)を含むか又はこれらからなると規定されることがある。実施例8及び9に説明したように、FGF19フレームワークへのR127L及びP128E置換の特定の組合せは、HCC形成に対し予想外の陽性作用を有した。更により驚くべきことに、R127L及びP128E置換並びにFGF19コア領域におけるLeu(L)のGln(Q)への置換の組合せ(例えば、表1~4、9及び10に示されたコア領域配列を参照されたい)は、HCC形成の防止に対し、更により有意な作用を有した。従って、FGF19ループ-8領域の変種は、実質的に、測定可能な又は検出可能なHCC形成を減少又は排除することができる所以、これらの変種が含まれる。更に、HCC形成を減少させる作用は、ループ-8領域の外側のアミノ酸残基の修飾(例えば、コア領域内のアミノ酸残基の置換)により増強され得る。

#### 【0146】

例えば胆汁酸ホメオスタシスの調整、グルコース降下活性、胆汁酸に関係した又は関連した障害の分析、HCC形成又は腫瘍形成、脂質増加活性、又は除脂肪量低下活性などの活性は、db/dbマウスなどの動物において確認することができる。FGFR4への結合又はFGFR4の活性化の測定は、本明細書に開示されたアッセイ又は当業者に公知のアッセイにより確認することができる。

#### 【0147】

用語「結合する」又は「結合している」は、ペプチド配列に関して使用される場合、ペプチド配列が、分子レベルで相互作用することを意味する。従ってFGFR4に結合するペプチド配列は、FGFR4配列の全て又は一部に結合する。特異的及び選択的結合は、当該技術分野において公知のアッセイ(例えば、競合結合、免疫沈降、ELISA、フローサイトメトリー、ウェスタンプロット)を使用し、非特異的結合から区別することができる。

#### 【0148】

ペプチド及びペプチド模倣体は、当該技術分野において公知の方法を用い、生成し且つ単離することができる。ペプチドは、化学的方法を用い、全体又は一部を合成することができる(例えば、Caruthersの文献、(1980)、Nucleic Acids Res. Symp. Ser. 215; Hornの文献、(1980); 及び、Banga, A.K.の文献、「治療用ペプチド及びタンパク質、製剤、処理及び送達システム(Therapeutic Peptides and Proteins, Formulation, Processing and Delivery Systems)」、(1995)、Technomic Publishing社、ランカスター、PAを参照されたい)。ペプチド合成は、様々な固相技術を使用し、実行することができ(例えば、Robe rgeの文献、Science 269:202 (1995); Merrifieldの文献、Methods Enzymol. 289:3 (1997)参照)、且つ例えばABI 431Aペプチド合成装置(Perkin Elmer社)を製造業者の指示に従い使用し、自動合成を実行することができる。ペプチド及びペプチド模倣体はまた、コンビナトリアル的方法を用いて合成することもできる。合成残基及び模倣体を取り込んでいるポリペプチドは、当該技術分野において公知の様々な手順及び方法を用い、合成することができる(例えば、「有機合成(Organic Syntheses)」、累積版、Gilmanら(編集)、John Wiley & Sons社、NY参照)。修飾されたペプチドは、化学修飾法により生成することができる(例えば、Belousovの文献、Nucleic Acids Res., 25:3440 (1997); Frenkelの文献、Free Radic. Biol. Med. 19:373 (1995); 及び、Blommersの文献、Biochemistry, 33:788 6 (1994)参照)。ペプチド配列の変動、誘導体化、置換及び修飾は同じく、オリゴヌクレオチド-媒介型(部位特異的)変異誘発、アラニンスキャニング、及びPCRベースの変異誘発などの方法を用い、行うことができる。部位特異的変異誘発(Carterらの文献、Nucl. Acids Res., 13:4331 (1986); Zollerらの文献、Nucl. Acids Res. 10:6487 (1987))、カセット変異誘発(Wellsらの文献、Gene 34:315 (1985))、制限部位選択変異誘発(Wellsらの文献、Philos. Trans. R. Soc. London Ser A 317:415 (1986))及び他の技術を、本発明のペプチド配列、変種、融合体及びキメラ、並びにそれらの変動、誘導体化、置換及び修飾を生成するために、クローニングされたDNAについて実行することができる。

#### 【0149】

10

20

30

40

50

「合成された」又は「製造された」ペプチド配列とは、手作業による操作に関する任意の方法により作製されたペプチドである。そのような方法は、前述のもの、例えば化学合成、組換えDNA技術、大型分子の生化学的又は酵素的断片化、及びそれらの組合せを含むが、これらに限定されるものではない。

#### 【0150】

例示されたペプチド配列の部分配列、配列変種及び修飾形(例えば、表1～10及び配列表に列記された配列)を含む本発明のペプチド配列は、キメラ分子を形成するように、修飾することもできる。本発明に従い、異種ドメインを含むペプチド配列が提供される。そのようなドメインは、該ペプチド配列のアミノ末端又はカルボキシリ-末端に付加することができる。異種ドメインはまた、該ペプチド配列内に配置されるか、並びに/又は代わりにFGF19及び/若しくはFGF21由来のアミノ酸配列の側方に位置することができる。10

#### 【0151】

用語「ペプチド」はまた、ペプチドの二量体又は多量体(オリゴマー)も含む。本発明に従い、例示されたペプチド配列に加え、例示されたペプチド配列の部分配列、変種及び修飾形(例えば、表1～10及び配列表に列記された配列)の二量体又は多量体(オリゴマー)も提供される。

#### 【0152】

本発明は更に、表1～10及び配列表に列記された配列の部分配列、配列変種及び修飾形を含む本発明のペプチド配列をコードしている核酸分子、並びに該ペプチドをコードしている核酸を含むベクターを提供する。従って「核酸」は、本明細書に開示された例示されたペプチド配列をコードしているものに加え、例示されたペプチド配列の機能性部分配列、配列変種及び修飾形をコードしているものが、少なくとも検出可能な又は測定可能な活性又は機能を維持している限りは、これらを含む。例えば、グルコースを降下又は低下する能力の一部を維持する、本明細書に開示された例示されたペプチド配列の部分配列、変種又は修飾形(例えば、表1～10及び配列表に列記された配列)は、正常なグルコースホメオスタシスを提供するか、又はインビポにおいて慢性若しくは急性高血糖症などに関連した組織病理学的状態を軽減する。20

#### 【0153】

本明細書において遺伝子、ポリヌクレオチド、ヌクレオチド配列、プライマー、オリゴヌクレオチド又はプローブとも称される核酸は、任意の長さの天然の又は修飾されたプリン-及びピリミジン-含有ポリマー、ポリリボヌクレオチド又はポリデオキシリボヌクレオチド又は混合型ポリリボ-ポリデオキシリボヌクレオチド及びそれらの-アノマー型のいずれかをいう。2種以上のプリン-及びピリミジン-含有ポリマーは典型的には、ホスホエステル結合により又はそれらの類似体によって連結される。これらの用語は、デオキシリボ核酸(DNA)及びリボ核酸(RNA)を含む、核酸の全ての型を意味するよう、互換的に使用される。これらの核酸は、単鎖、二重鎖、又は三重鎖、線状又は環状であることができる。核酸は、ゲノムDNA及びcDNAを含む。RNA核酸は、スプライシングされるか又はされないmRNA、rRNA、tRNA又はアンチセンスであることができる。核酸は、天然、合成のものに加え、ヌクレオチド類似体及び誘導体を含む。30

#### 【0154】

遺伝暗号の縮重の結果として、核酸分子は、本発明のペプチド配列をコードしている核酸分子に関して縮重している配列を含む。従って、本明細書に例示されたペプチド配列の部分配列、変種及び修飾形(例えば、表1～10及び配列表に列記された配列)を含む、ペプチド配列をコードしている縮重した核酸配列が提供される。用語「相補的」とは、核酸配列に関して使用する場合、言及された領域が、100%相補的であること、すなわちミスマッチのない100%の塩基対合を示すことを意味する。40

#### 【0155】

核酸は、様々な公知の標準クローニング法及び化学合成法のいずれかを用いて、生成することができ、且つ部位特異的変異誘発又は当業者に公知の他の組換え技術により、意図的に変更することができる。ポリヌクレオチドの純度は、配列決定、ゲル電気泳動、UV分50

光法により決定することができる。

**【0156】**

核酸は、「発現カセット」と本明細書において称される、そこで核酸の発現が「発現制御エレメント」により影響されるか又は調整される核酸構築体に挿入されてよい。用語「発現制御エレメント」とは、機能的に有効に連結されている核酸配列の発現を調整するか又はこれに影響を及ぼす1以上の核酸配列エレメントをいう。発現制御エレメントは、適宜、プロモーター、エンハンサー、転写ターミネーター、遺伝子サイレンサー、タンパク質をコードしている遺伝子の前の開始コドン(例えばATG)などを含むことができる。

**【0157】**

核酸配列に機能的に有効に連結された発現制御エレメントは、核酸配列の転写及び適切ならば、翻訳を制御する。用語「機能的に有効に連結された」とは、言及された成分が、それらの意図された様式で機能することを可能にする関係である隣接位置をいう。典型的には、発現制御エレメントは、遺伝子の5'末端又は3'末端に並置されるが、イントロン性であることともできる。

10

**【0158】**

発現制御エレメントは、転写を構成的に活性化するエレメントを含み、これは、誘導性(すなわち、活性化のために外部シグナル又は刺激を必要とする)、又は抑制解除性(すなわち、転写を停止するためにシグナルを必要とする;該シグナルが最早存在しない場合は、転写は活性化又は「抑制解除」される)である。遺伝子発現を特定の細胞型又は組織について制御可能とするのに十分である制御エレメント(すなわち、組織-特異性制御エレメント)も、本発明の発現カセット中に含まれる。典型的には、そのようなエレメントは、コード配列の上流又は下流(すなわち、5'側及び3'側)に位置する。プロモーターは一般に、コード配列の5'側に配置される。組換えDNA技術又は合成技術により作出されたプロモーターを使用し、本発明のポリヌクレオチドの転写を提供することができる。「プロモーター」は典型的には、転写を指示するのに十分である最小配列エレメントを意味する。

20

**【0159】**

核酸は、宿主細胞への形質転換のために、並びに後続の発現及び/又は遺伝子操作のためにプラスミドへ挿入することができる。プラスミドは、宿主細胞において安定して増殖することができる核酸であり;プラスミドは、該核酸の発現を駆動するための発現制御エレメントを任意に含んでよい。本発明の目的に関して、ベクターは、プラスミドと同義語である。プラスミド及びベクターは一般に、細胞及びプロモーターにおける増殖のために少なくとも複製起点を含む。プラスミド及びベクターはまた、例えば、宿主細胞における発現のための発現制御エレメントを含むことができ、その結果、例えばペプチド配列をコードするか、宿主細胞及び生物(例えば、治療が必要な対象)においてペプチド配列を発現するか、又はペプチド配列を作出する核酸の発現及び/又は遺伝子操作に有用である。

30

**【0160】**

本明細書において使用される用語「導入遺伝子」は、人工的に(by artifice)細胞又は生物へ導入されているポリヌクレオチドを意味する。例えば、導入遺伝子を有する細胞では、該導入遺伝子は、細胞の遺伝子操作又は「形質転換」により導入されている。その中に導入遺伝子が導入されている細胞又はそれらの子孫は、「形質転換された細胞」又は「形質転換体」と称される。典型的には、導入遺伝子は、形質転換体の子孫に含まれるか、又はその細胞から発生する生物の一部となる。導入遺伝子は、染色体DNAへ挿入されるか、又は自己複製プラスミド、YAC、ミニ染色体などとして維持される。

40

**【0161】**

細菌系プロモーターは、T7、並びにバクテリオファージ のpL、plac、ptrp、ptac(ptr-p-lacハイブリッドプロモーター)などの誘導性プロモーター及びテトラサイクリン反応性プロモーターを含む。昆虫細胞系プロモーターは、構成的又は誘導性プロモーター(例えば、エクジソン)を含む。哺乳動物細胞の構成的プロモーターは、SV40、RSV、ウシ乳頭腫ウイルス(BPV)及び他のウイルスプロモーター、又は哺乳動物細胞のゲノム由来の誘導性プロモーター(例えば、メタロチオネインIIAプロモーター;熱ショックプロモーター)、

50

又は哺乳動物のウイルス由来の誘導性プロモーター(例えば、アデノウイルス後期プロモーター；誘導性マウス乳癌ウイルス末端反復配列を含む。或いはレトロウイルスゲノムは、好適な宿主細胞にペプチド配列を導入し、且つ発現を指示するように、遺伝子修飾されることができる。

#### 【0162】

本発明の方法及び使用は、インビオ送達を含む場合、発現系は更に、インビオ使用のためにデザインされたベクターを含む。特定の非限定的例としては、アデノウイルスベクター(米国特許第5,700,470号及び第5,731,172号)、アデノ随伴ウイルスベクター(米国特許第5,604,090号)、単純ヘルペスウイルスベクター(米国特許第5,501,979号)、レトロウイルスベクター(米国特許第5,624,820号、第5,693,508号及び第5,674,703号)、BPVベクター(米国特許第5,719,054号)、CMVベクター(米国特許第5,561,063号)、並びにパルボウイルス、ロタウイルス、ノーウォークウイルス及びレンチウイルスベクター(例えば、米国特許第6,013,516号参照)が挙げられる。ベクターは、幹細胞を含む腸管の細胞へ、遺伝子を送達するものを含む(Croyleらの文献、Gene Ther. 5:645 (1998) ; S.J. Henningの文献、Adv. Drug Deliv. Rev. 17:341 (1997)、米国特許第5,821,235号及び第6,110,456号)。これらのベクターの多くは、臨床試験のために承認されている。

#### 【0163】

酵母ベクターは、構成的プロモーター及び誘導性プロモーターを含む(例えば、Ausubelらの文献、「分子生物学の最新プロトコール(Current Protocols in Molecular Biology)」、第2巻13章、Greene編集、Publish. Assoc. & Wiley Interscience社、1988 ; Grantらの文献、Methods in Enzymology, 153:516 (1987), Wu及びGrossman編集；Bitterの文献、Methods in Enzymology, 152:673 (1987), Berger及びKimmel編集, Acad. Press社、N.Y.；及び、Strathernらの文献、「酵母サッカロミセスの分子生物学(The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces)」、(1982) Cold Spring Harbor Press編集、第I巻及び第II巻を参照されたい)。ADH若しくはLEU2などの構成的酵母プロモーター又はGALなどの誘導性プロモーターを使用することができる(R. Rothsteinの文献、「DNAクローニング、実践法(DNA Cloning, A Practical Approach)」、第11巻3章、D.M. Glover編集、IRL Press社、ワシントンD.C.、1986)。例えば相同組換えを介し、外来核酸配列の酵母染色体への組み込みを促進するベクターは、当該技術分野において公知である。挿入されたポリヌクレオチドが、より一般的なベクターには大きすぎる(例えば約12Kbよりも大きい)場合には、酵母人工染色体(YAC)が典型的には使用される。

#### 【0164】

発現ベクターは、選択圧に抵抗を付与する選択マーカー又は同定可能なマーカー(例えば、-ガラクトシダーゼ)を含むこともでき、これにより該ベクターを有する細胞を選択、成長及び拡大することが可能である。或いは、選択マーカーは、ペプチド配列をコードしている核酸を含む第一のベクターにより、宿主細胞へ同時トランスフェクションされる第二のベクター上にあることができる。選択システムは、各々、tk-細胞、hprt-細胞又はaprt-細胞において利用することができる、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子(Wiglerらの文献、Cell, 11:223 (1977))、ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシリルトランスフェラーゼ遺伝子(Szybalskaらの文献、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 48:2026 (1962))、及びアデニンホスホリボシリルトランスフェラーゼ遺伝子(Lowyらの文献、Cell, 22:817 (1980))を含むが、これらに限定されるものではない。加えて、代謝拮抗物質抵抗性は、メトトレキセートに対する抵抗性を付与するdhfr(O'Hareらの文献、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:1527 (1981))；ミコフェノール酸に対する抵抗性を付与するgpt遺伝子(Mulliganらの文献、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:2072 (1981))；アミノ配糖体G-418に対する抵抗性を付与するネオマイシン遺伝子(Colberre-Garapinらの文献、J. Mol. Biol. 150:1(1981))；ピューロマイシン；並びに、ヒグロマイシンに対する抵抗性を付与するヒグロマイシン遺伝子(Santerreらの文献、Gene, 30:147 (1984))の選択の基礎として使用することができる。追加の選択可能な遺伝子は、細胞がトリプトファンの代わりにインドールを利用することを可能にするtrpB；ヒスチジンの代わりにヒスチノール(histidine)

10

20

30

40

50

nol)を利用することを可能にするhisD(Hartmanらの文献、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:8047 (1988))；及び、オルニチンデカルボキシラーゼインヒビターである2-(ジフルオロメチル)-DL-オルニチン(DFMO)に対する抵抗性を付与するODC(オルニチンデカルボキシラーゼ)(McConlogueの文献、(1987)、「分子生物学の最新情報(Recent Communications in Molecular Biology)」、Cold Spring Harbor Laboratory)を含む。

#### 【0165】

本発明に従い、本明細書記載のFGF19及び／又はFGF21の変種又は融合体を生成する形質転換細胞(インビトロ、エクスピボ及びインビボ)並びに宿主細胞が提供され、ここでFGF19及び／又はFGF21の変種又は融合体の発現は、FGF19及び／又はFGF21の変種又は融合体をコードしている核酸によりもたらされる。本発明のペプチド配列を発現する形質転換細胞及び宿主細胞は典型的には、本発明のペプチド配列をコードしている核酸を含む。一実施態様において、形質転換細胞又は宿主細胞は、原核細胞である。別の実施態様において、形質転換細胞又は宿主細胞は、真核細胞である。様々な態様において、真核細胞は、酵母又は哺乳動物(例えば、ヒト、霊長類など)の細胞である。

10

#### 【0166】

本明細書において使用される「形質転換」細胞又は「宿主」細胞は、コードされたペプチド配列の発現を増大及び／又は転写することができる核酸が導入される細胞である。この用語はまた、宿主細胞の子孫又はサブクローンを含む。

#### 【0167】

形質転換細胞及び宿主細胞は、細菌及び酵母などの微生物；並びに、植物、昆虫及び哺乳動物の細胞を含むが、これらに限定されるものではない。例えば、組換えバクテリオファージ核酸、プラスミド核酸若しくはコスミド核酸発現ベクターにより形質転換された細菌；組換え酵母発現ベクターにより形質転換された酵母；組換え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)により感染された、若しくは組換えプラスミド発現ベクター(例えば、Tiプラスミド)により形質転換された、植物細胞システム；組換えウイルス発現ベクター(例えば、バキュロウイルス)により感染された昆虫細胞システム；並びに、組換えウイルス発現ベクター(例えば、レトロウイルス、アデノウイルス、ワクシニアウイルス)により感染された動物細胞システム、又は一過性又は安定した増殖又は発現のために操作された形質転換された動物細胞システムを含む。

20

#### 【0168】

遺伝子治療での使用及び方法のために、形質転換細胞は、対象内にあることができる。対象内の細胞は、インビボにおいて、本明細書に示した本発明のペプチド配列をコードしている核酸により形質転換されることができる。或いは細胞は、インビトロにおいて、導入遺伝子又はポリヌクレオチドにより形質転換され、その後治療を達成するために、対象の組織に移植されることができる。或いは初代細胞単離株又は樹立された細胞株は、FGF19及び／若しくはFGF21の変種、又はFGF19の全て又は一部を含むか若しくはFGF21の全て又は一部を含むキメラペプチド配列などの、それらの融合体/キメラ配列(若しくは変種)をコードしている導入遺伝子又はポリヌクレオチドにより形質転換され、その後任意に対象の組織に移植されることができる。

30

#### 【0169】

ペプチド配列の発現のための、特にインビボにおける発現のための非限定的標的細胞は、臍細胞(島細胞)、筋肉細胞、粘膜細胞及び内分泌細胞を含む。そのような内分泌細胞は、FGF19及び／若しくはFGF21の変種、又はFGF19の全て又は一部を含む若しくはFGF21の全て又は一部を含むキメラペプチド配列などの、それらの融合体/キメラ配列(若しくは変種)の誘導的生成(分泌)を提供することができる。形質転換するための追加の細胞は、幹細胞、又は例えば多様な臍細胞(島細胞)、筋肉細胞、粘膜細胞及び内分泌細胞へと分化する始原細胞などの、他の多分化能細胞又は多能性細胞を含む。幹細胞の標的化は、本発明のペプチド配列のより長期の発現を提供する。

40

#### 【0170】

50

本明細書において使用される用語「培養された」とは、細胞に関して使用する場合、細胞がインビトロにおいて成長することを意味する。そのような細胞の特定の例は、対象から単離された細胞、及び組織培養物中で成長されるか又は成長のために順応された細胞である。別の例は、インビトロにおいて遺伝子操作された細胞、及び同じ又は異なる対象へと戻し移植された細胞である。

#### 【0171】

用語「単離された」とは、細胞に関して使用する場合、その天然のインビオ環境から分離される細胞を意味する。「培養された」細胞及び「単離された」細胞は、遺伝子形質転換など、手作業により操作されてよい。これらの用語は、細胞分裂時に生じる変異のために、親の細胞と同一でないことがある子孫細胞を含む、該細胞の任意の子孫を含む。これらの用語は、ヒト全体を含まない。10

#### 【0172】

本発明のペプチド配列をコードしている核酸は、安定した発現のために、生物全体の細胞へ導入することができる。非-ヒトトランスジェニック動物を含むそのような生物は、動物全体におけるペプチド発現の効果及び治療的利益の研究に有用である。例えば本明細書に開示されるように、マウスにおいて、FGF19及び／若しくはFGF21の変種、又は本明細書に示したFGF19の全て又は一部を含む若しくはFGF21の全て又は一部を含むキメラペプチド配列などの、それらの融合体/キメラ配列(若しくは変種)は、胆汁酸ホメオスタシスを調整する。

#### 【0173】

特定の疾患(例えば、糖尿病、変性疾患、癌など)を発症するか又は発症し易いマウス系統はまた、該疾患易罹患性のマウスにおいて、治療用タンパク質発現の効果を研究するために、本明細書において説明される治療用タンパク質を導入するのに有用である。ストレプトゾトシン(STZ)-誘導性糖尿病(STZ)マウスなどの、特定の病態又は生理的状態に易罹患性であるトランスジェニック及び遺伝的動物モデルは、FGF19及び／若しくはFGF21の変種、又は本明細書に示したFGF19の全て又は一部を含む若しくはFGF21の全て又は一部を含むキメラペプチド配列などの、それらの融合体/キメラ配列(若しくは変種)を発現するのに適した標的である。従って本発明に従い、FGF19及び／若しくはFGF21の変種、又はFGF19の全て又は一部を含む若しくはFGF21の全て又は一部を含むキメラペプチド配列などの、それらの融合体/キメラ配列(若しくは変種)を生成する、非-ヒトトランスジェニック動物が提供され、その生成は、動物においては天然には生じず、これは動物の体細胞又は生殖細胞に存在する導入遺伝子によりもたらされる。20

#### 【0174】

用語「トランスジェニック動物」とは、その動物の体細胞又は生殖系列細胞が、微量注入又は組換えウイルスによる感染などによる細胞下レベルでの計画的な遺伝子操作により、直接又は間接に受け取った遺伝情報を生じる動物をいう。用語「トランスジェニック」とは更に、本明細書に記載のように遺伝子操作されたトランスジェニック動物から得られた細胞又は組織(すなわち、「トランスジェニック細胞」、「トランスジェニック組織」)を含む。本文脈において、「トランスジェニック動物」は、古典的交雑又は体外受精により作出された動物は包含せず、むしろ1つ以上の細胞が核酸分子を受け取っている動物を意味する。発明のトランスジェニック動物は、その導入遺伝子に関してヘテロ接合又はホモ接合のいずれかができる。マウス、ヒツジ、ブタ及びカエルを含むトランスジェニック動物を作出する方法は、当該技術分野において周知であり(例えば、米国特許第5,721,367号、第5,695,977号、第5,650,298号、及び第5,614,396号参照)、従ってこれらは追加的に含まれる。30

#### 【0175】

ペプチド配列、ペプチド配列をコードしている核酸、ペプチド配列を発現しているベクター及び形質転換された宿主細胞は、単離された形態及び精製された形態を含む。用語「単離された」とは、発明の組成物の修飾語句として使用される場合、組成物が、環境中の1種以上の成分から、実質的に完全に又は少なくとも一部分離されていることを意味する40

。一般に天然に存在する組成物は、単離される場合、天然にそれらが通常会合している1種以上の物質、例えば1種以上のタンパク質、核酸、脂質、炭水化物又は細胞膜を実質的に含まない。用語「単離された」は、変種、修飾又は誘導体化された形態、融合体及びキメラ、多量体/オリゴマーなどの組成物の代替の物理的形態、又は宿主細胞において発現された形態を除外しない。用語「単離された」はまた、そのいずれかが手作業により作製される、その中に組合せで存在する形態(例えば、医薬組成物、組合せ組成物など)を除外しない。

#### 【0176】

「単離された」組成物はまた、夾雜物又は望ましくない物質若しくは材料などの、1種以上の他の材料の一部、相当数、又はほとんど若しくは全てを含まない場合に、「精製される」ことができる。本発明のペプチド配列は一般に、天然に存在することは知られていないか又は存在するとは考えられていない。しかし、天然に存在する組成物に関して、単離された組成物は一般に、それが典型的には天然に会合している他の材料の一部、相当数、又はほとんど若しくは全てを含まないであろう。従って、同じく天然に生じる単離されたペプチド配列は、例えば、タンパク質ライブラリーのタンパク質又はゲノムライブラリー若しくはcDNAライブラリー中の核酸などの、非常に多数の他の配列の中に存在するポリペプチド又はポリヌクレオチドを含まない。「精製された」組成物は、1以上の他の不活性分子又は活性分子との組合せを含む。例えば、本発明のペプチド配列は、例えば、グルコース降下薬又は治療薬などの、他の薬物又は薬剤と組合せた。

#### 【0177】

本明細書に使用される用語「組換え」とは、ペプチド配列、ペプチド配列をコードしている核酸などの修飾語句として使用される場合、組成物が、一般に天然(例えばインビトロ)においては生じない様式で操作されている(すなわち、設計されている(engineered))ことを意味する。組換えペプチドの特定の例は、本発明のペプチド配列が、ペプチド配列をコードしている核酸でトランスフェクションされた細胞により発現されている場合である。組換え核酸の特定の例は、ペプチド配列をコードしている核酸(例えば、ゲノム又はcDNA)が、該遺伝子が生物のゲノムで通常近接している5'領域、3'領域又はイントロン領域を伴い又は伴わずに、プラスミドへクローニングされている場合である。別の組換えペプチド又は核酸の例は、FGF19の一部及びFGF21の一部を含むキメラペプチド配列などの、ハイブリッド又は融合体配列である。

#### 【0178】

本発明に従い、例示されたペプチド配列の部分配列、変種及び修飾形(表1~10及び配列表に列記されたFGF19及びFGF21変種及び部分配列、並びに表1~10及び配列表に列記されたFGF19/FGF21融合体及びキメラを含む)を含む、本発明のペプチド配列の組成物及び混合物が提供される。一実施態様において、混合物は、1種以上のペプチド配列及び医薬として許容し得る担体又は賦形剤を含有する。別の実施態様において、混合物は、1種以上のペプチド配列、並びに胆汁酸ホメオスタシス調整又は抗-糖尿病性若しくはグルコース降下性の薬物若しくは治療薬などの補助薬又は治療薬を含有する。医薬として許容し得る担体又は賦形剤中の1種以上のペプチド配列の、1種以上の胆汁酸ホメオスタシス調整若しくは胆汁酸に関係した又は関連した障害の治療、又は抗-糖尿病性若しくはグルコース降下性の薬物若しくは治療薬との組合せなども、提供される。本発明のペプチド配列と、例えば胆汁酸ホメオスタシス調整又は該酸に関係した若しくは関連した障害の治療、又はグルコース降下性薬物又は治療薬などの別の薬物又は薬剤とのそのような組合せは、例えば対象の治療に関して、本発明の方法及び使用に従い有用である。

#### 【0179】

組合せはまた、本発明のペプチド配列又は核酸の、ポリエステル、炭水化物、ポリアミン酸(polyamine acid)、ヒドロゲル、ポリビニルピロリドン、エチレン-酢酸ビニル、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、硫酸プロタミン、又はラクチド/グリコリドコポリマー、ポリラクチド/グリコリドコポリマー、又はエチレン酢酸ビニルコポリマーなどの、粒子又は高分子物質への組み込み；例えば、各々、ヒドロキシメチルセルロ

10

20

30

40

50

ース若しくはゼラチン-マイクロカプセル、又はポリ(メチルメタクリレート)マイクロカプセルを使用する、コアセルベーション技術によるか又は界面重合により調製されたマイクロカプセル中の捕獲；高分子複合体、ナノ-カプセル、ミクロスフェア、ビーズ、並びに例えば水中油型エマルション、ミセル、混合型ミセル、及びリポソームを含む脂質-ベースのシステム(例えば、N-ラウロイル、N-オレオイルなどのN-脂肪酸アシル基、ドデシルアミン、オレオイルアミンなどの脂肪酸アミンなど、米国特許第6,638,513号参照)などのコロイド薬物送達システム及び分散システム中への組み込みを含む。

#### 【0180】

本明細書に示されたような例示されたペプチド配列の部分配列、変種及び修飾形(表1～10及び配列表に記載されたFGF19及びFGF21の変種及び部分配列、並びに表1～10及び配列表に記載されたFGF19/FGF21融合体及びキメラを含む)を含む発明のペプチドは、グルコース代謝を調整し、且つ血液から筋肉、肝臓及び脂肪などの重要な代謝臓器へのグルコースの輸送を促進するために使用することができる。そのようなペプチド配列は、耐糖能を回復するのに及び／又はグルコースホメオスタシスを改善若しくは正常とするのに十分な量又は有効な量で生成され得る。

10

#### 【0181】

本明細書に開示されたように、マウスへの様々なFGF19及びFGF21変種並びに融合体ペプチド配列の投与は、胆汁酸ホメオスタシスをうまく調整した。更にFGF19とは対照的に、いくつかのペプチド配列は、マウスにおいてHCC形成又は腫瘍形成を刺激又は誘導しなかった。従って、例示されたペプチド配列の部分配列、変種及び修飾形(表1～10及び配列表に記載されたFGF19及びFGF21の変種及び部分配列、並びに表1～10及び配列表に記載されたFGF19/FGF21融合体及びキメラを含む)を含む発明のペプチドの、インビボ法又はエクスピボ法の直接又は間接のいずれかによる動物への投与(例えば、該変種若しくは融合体ペプチド、該変種若しくは融合体ペプチドをコードしている核酸、又は該変種若しくは融合体ペプチドを発現している形質転換された細胞若しくは遺伝子治療ベクターの投与)は、胆汁酸に関係した又は関連した障害などの、様々な障害の治療に使用することができる。

20

#### 【0182】

従って本発明は、インビトロ、エクスピボ及びインビボ(例えば、対象への又は対象における)の方法及び使用を含む。そのような方法及び使用は、本明細書に示した任意の本発明のペプチド配列により実践することができる。

30

#### 【0183】

本発明に従い、障害を有するか又は有するリスクのある対象を治療する方法が提供される。様々な実施態様において、方法は、本明細書に開示されたFGF19又はFGF21変種、融合体若しくはキメラ(例えば、表1～10参照)、又は本明細書に開示されたFGF19若しくはFGF21変種、融合体若しくはキメラの部分配列、変種若しくは修飾形(例えば、表1～10及び配列表参照)などのペプチド配列を、該障害を治療するのに有効な量で対象へ投与することを含む。

#### 【0184】

発明のペプチド並びに方法及び使用により治療、予防などが可能な障害の例は、胆汁酸に関係した又は関連した障害を含む。疾患及び障害の非限定的例は、以下を含む：メタボリック症候群；脂質又はグルコース関連障害；コレステロール又はトリグリセリド代謝；2型糖尿病；例えば、肝内の胆汁鬱滞の疾患(例えば、PBC、PFIC、PSC、PIC、新生児胆汁鬱滞、及び薬物誘発性胆汁鬱滞(例えば、エストロゲン))、並びに、肝外胆汁鬱滞の疾患(例えば、腫瘍由来の胆管圧縮、胆石による胆管閉塞)を含む、胆汁鬱滞；回腸切除、炎症性腸疾患(例えば、クローン病及び潰瘍性大腸炎)、下痢(例えばBAD)及びGI症状に繋がる以外特徴づけられない(特発性)胆汁酸の吸収を損なう障害、並びにGI癌、肝臓癌、及び／又は胆囊癌(例えば、結腸癌及び肝細胞癌)を含む、胆汁酸吸収不良及び遠位小腸に関与する他の障害；並びに／又は、NASH、肝硬変及び門脈圧亢進症の一因となるものなどの、胆汁酸合成異常。治療のために、本発明のペプチド配列は、胆汁酸ホメオスタシスの調整を

40

50

必要とする対象又は胆汁酸に関係した若しくは関連した障害を有する対象へ、投与することができる。本発明のペプチド配列はまた、腎損傷(例えば、尿細管損傷又は腎症)、肝変性、眼損傷(例えば、糖尿病性網膜症又は白内障)、及び糖尿病による足の障害を含む、他の高血糖-関連障害；脂質異常症及び例えばアテローム性動脈硬化症、冠動脈疾患、脳血管障害などのそれらの後遺症においても有用であることができる。

#### 【0185】

肥満症及び上昇したボディマス(非限定期に非アルコール性脂肪肝疾患(NAFLD)、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)、及び多嚢胞卵巣症候群(PCOS)などのそれらの合併状態を含む)などの、メタボリック症候群に関連し得る他の状態、並びにまた血栓症、凝固能亢進状態及び血栓形成促進性状態(動脈性及び静脈性)、高血圧(門脈圧亢進症(肝静脈圧勾配(HVP G)が5mmHgより高いと定義される)、心臓血管疾患、脳卒中及び心不全；アテローム性動脈硬化症、慢性炎症性腸疾患(例えば、クローン病及び潰瘍性大腸炎)、喘息、紅斑性狼瘡、関節炎、又は他の炎症性リウマチ障害を含む、炎症反応が関与した障害又は状態；例えば脂肪肉腫、固形癌及び新生物を含む脂肪細胞腫瘍、脂肪腫様癌腫などの、細胞周期又は細胞分化過程の障害；アルツハイマー病、多発性硬化症、パーキンソン病、進行性多巣性白質脳症及びギランバレー症候群を含む、中枢神経及び末梢神経の神経変性疾患及び／若しくは脱髓障害、並びに／又は神経炎症過程に関与した神経系疾患、並びに／又は他の末梢神経障害；紅斑性-扁平性皮膚症を含む、皮膚及び皮膚科的障害及び／又は創傷治癒過程の障害；並びに、X染色体症候群、変形性関節炎、及び急性呼吸窮迫症候群などの、他の障害も含む。

10

20

#### 【0186】

本明細書において使用する用語「胆汁酸に関係した又は関連した障害」とは、対象の状態に言及して使用する場合には、対象に存在する胆汁酸(1種以上の胆汁酸)の一過性又は慢性の異常なレベルを意味する。この状態は、胆汁酸の合成、代謝又は吸収の阻害、減少又は遅延により引き起こされ得、その結果該対象は、典型的には正常対象においては認められない胆汁酸レベルを示す。

#### 【0187】

本明細書において開示されたように、本発明は、同等の年齢、性別、人種などの適宜合致した対象に対し、胆汁酸に関係した又は関連した障害の進行を予防する(例えば、特定の障害を有する素因のある対象において)、緩徐化するか、遅延するか又は進行若しくは発症を阻害するか、或いは治療する(例えば、改善する)方法を含む。従って、様々な実施態様において、例えば胆汁酸ホメオスタシスを調整するか又は胆汁酸に関係した又は関連した障害を治療する本発明の方法は、胆汁酸ホメオスタシスを調整するか又は胆汁酸に関係した又は関連した障害を治療するのに有効な量の、本明細書において説明した本発明のペプチド(例えば、例として表1～10又は配列表に示した、FGF19及び／又はFGF21の変種又は融合体)と接触するか又はこれを投与することを含む。

30

#### 【0188】

更に本発明は、その全てが、単独で若しくは組合せで、例えば、胆汁酸に関係した又は関連した障害に繋がり得る、望ましくないレベルの又は異常に低いレベルの胆汁酸の進行を予防する(例えば、特定の障害を有する素因のある対象において)、緩徐化する又は阻害するか、或いは発症を遅延するか、或いは治療する方法を含む。そのような障害は、例えば、例として遺伝性素因又は食事に起因し得る。

40

#### 【0189】

用語「対象」とは、動物をいう。典型的には、動物は、本発明のペプチド配列による治療から恩恵のある哺乳動物である。特定の例は、靈長類(例えばヒト)、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ブタ及びヒツジを含む。

#### 【0190】

対象は、障害、例えば胆汁酸に関係した又は関連した障害、例としてメタボリック症候群；脂質又はグルコース関連障害；コレステロール又はトリグリセリド代謝；2型糖尿病；例えば、肝内の胆汁鬱滞の疾患(例えば、PBC、PFIC、PSC、PIC、新生児胆汁鬱滞、及び

50

薬物誘発性胆汁鬱滞(例えば、エストロゲン))、並びに、肝外胆汁鬱滞の疾患(例えば、腫瘍由来の胆管圧縮、胆石による胆管閉塞)を含む、胆汁鬱滞；回腸切除、炎症性腸疾患(例えば、クローン病及び潰瘍性大腸炎)、下痢(例えばBAD)及びGI症状に繋がる以外特徴づけられない(特発性)胆汁酸の吸收を損なう障害、並びにGI癌、肝臓癌、及び／又は胆嚢癌(例えば、結腸癌及び肝細胞癌)を含む、胆汁酸吸收不良及び遠位小腸に関与する他の障害；並びに／又は、NASH、肝硬変及び門脈圧亢進症の一因となるものなどの、胆汁酸合成異常などの障害を有する対象；或いは、障害を有さないが、該障害の発症のリスクがある対象を含む。胆汁酸に関連した又は関係した障害を発症するリスクのある対象は、例えば、その食事が、急性又はメタボリック症候群；脂質又はグルコース関連障害；コレステロール又はトリグリセリド代謝；2型糖尿病；例えば、肝内の胆汁鬱滞の疾患(例えば、PBC、PFIC、PSC、PIC、新生児胆汁鬱滞、及び薬物誘発性胆汁鬱滞(例えば、エストロゲン))、並びに、肝外胆汁鬱滞の疾患(例えば、腫瘍由来の胆管圧縮、胆石による胆管閉塞)を含む、胆汁鬱滞；回腸切除、炎症性腸疾患(例えば、クローン病及び潰瘍性大腸炎)、下痢(例えばBAD)及びGI症状に繋がる以外特徴づけられない(特発性)胆汁酸の吸收を損なう障害、並びにGI癌、肝臓癌、及び／又は胆嚢癌(例えば、結腸癌及び肝細胞癌)を含む、胆汁酸吸收不良及び遠位小腸に関与する他の障害；並びに／又は、NASH、肝硬変及び門脈圧亢進症の一因となるものなどの、胆汁酸合成異常などの、胆汁酸に関係した又は関連した障害の発症の家族歴又は遺伝性素因を有し得る対象を含む。

#### 【0191】

本明細書に開示されたように、治療方法は、本明細書に記した本発明のペプチド(例えば、例として表1～10又は配列表に記したFGF19及び／又はFGF21の変種又は融合体)を、対象において望ましい転帰又は結果を実現するのに有効な量で接触させるか又は投与することを含む。望ましい転帰又は結果を生じる治療は、対象における該状態の1以上の症状の重症度又は頻度を減少、低下又は予防すること、例えば、対象の状態の改善又は「有益な効果」又は「治療効果」を含む。その結果治療は、一過性に(例えば、1～6、6～12、又は12～24時間)、中期間(例えば、1～6、6～12、12～24又は24～48日間)、又は長期間(例えば、1～6、6～12、12～24、24～48週間、又は24～48週間以上)にわたり、該障害の1以上の症状の重症度又は頻度を減少又は低下又は予防し、該障害の進行又は増悪を安定化又は阻害し、且つ場合によっては、該障害を逆行することができる。従ってメタボリック症候群；脂質又はグルコース関連障害；コレステロール又はトリグリセリド代謝；2型糖尿病；例えば、肝内の胆汁鬱滞の疾患(例えば、PBC、PFIC、PSC、PIC、新生児胆汁鬱滞、及び薬物誘発性胆汁鬱滞(例えば、エストロゲン))、並びに、肝外胆汁鬱滞の疾患(例えば、腫瘍由来の胆管圧縮、胆石による胆管閉塞)を含む、胆汁鬱滞；回腸切除、炎症性腸疾患(例えば、クローン病及び潰瘍性大腸炎)、下痢(例えばBAD)及びGI症状に繋がる以外特徴づけられない(特発性)胆汁酸の吸收を損なう障害、並びにGI癌、肝臓癌、及び／又は胆嚢癌(例えば、結腸癌及び肝細胞癌)を含む、胆汁酸吸收不良及び遠位小腸に関与する他の障害；並びに／又は、NASH、肝硬変及び門脈圧亢進症の一因となるものなどの、胆汁酸合成異常などの、胆汁酸に関係した又は関連した障害の場合；例えば治療は、胆汁酸に関連又は関係した障害の1以上の症状又は作用を減少又は軽減することができる。

#### 【0192】

使用及び／又は対象の治療のための「有効な量」又は「十分な量」は、単独で、又は1

10

20

30

40

50

種以上の他の組成物(薬物などの治療薬又は高血糖症の治療)、治療、プロトコール、若しくは治療的レジメンの薬剤と組合せて、単回投与量又は反復投与量で、任意の期間(一過性、中期間又は長期間)の検出可能な反応を、測定可能な若しくは検出可能な程度の又は任意の期間(例えば、数時間、数日間、数ヶ月間、数年間又は治癒)にわたる望ましい転帰又は主観的若しくは客観的恩恵を対象へ、提供する量をいう。そのような量は典型的には、障害、又は1つ、複数若しくは全ての有害症状、該障害の帰結又は合併症を、測定可能な程度改善するのに有効であるが、該障害の進行又は増悪の軽減又は阻害は、満足できる転帰であると考えられる。

#### 【 0 1 9 3 】

本明細書において使用する用語「改善する」は、対象の障害の改善、該障害の重症度の低下、又は該障害の進行若しくは増悪の阻害(例えば、該障害の安定化)を意味する。胆汁酸に関係した又は関連した障害(例えば、メタボリック症候群；脂質又はグルコース関連障害；コレステロール又はトリグリセリド代謝；2型糖尿病；例えば、肝内の胆汁鬱滞の疾患(例えば、PBC、PFIC、PSC、PIC、新生児胆汁鬱滞、及び薬物誘発性胆汁鬱滞(例えば、エストロゲン))、並びに、肝外胆汁鬱滞の疾患(例えば、腫瘍由来の胆管圧縮、胆石による胆管閉塞)を含む、胆汁鬱滞；回腸切除、炎症性腸疾患(例えば、クローン病及び潰瘍性大腸炎)、下痢(例えばBAD)及びGI症状に繋がる以外特徴づけられない(特発性)胆汁酸の吸收を損なう障害、並びにGI癌、肝臓癌、及び／又は胆嚢癌(例えば、結腸癌及び肝細胞癌)を含む、胆汁酸吸收不良及び遠位小腸に関与する他の障害；並びに／又は、NASH、肝硬変及び門脈圧亢進症の一因となるものなどの、胆汁酸合成異常)の症例において；例えば改善は、該障害の1以上の症状又は作用の減少又は軽減ができる。

10

#### 【 0 1 9 4 】

そのため治療的利益又は改善は、該障害又は疾患に関連した症状、合併症、結果又は基礎となる原因のいずれか一つ、ほとんど又は全ての完全な除去を必要としない。従って、ある期間にわたり(数時間、数日間、数週間、数ヶ月など)、対象の状態の一過性、中期間若しくは長期間の漸増する改善、又は発生、頻度、重症度、進行若しくは期間の部分的減少、又は1以上の関連した有害症状若しくは合併症若しくは結果若しくは基礎となる原因の阻害若しくは逆行、該障害又は疾患の増悪若しくは進行(例えば、該状態、障害若しくは疾患の1以上の症状又は合併症の安定化)が存在する場合に、満足できるエンドポイントが達成される。

20

#### 【 0 1 9 5 】

従って、本発明のペプチド配列により治療可能な障害の症例において、障害を改善するのに十分なペプチドの量は、該障害の種類、重症度及び程度、又は期間、望ましい治療効果又は転帰によって決まり、且つ当業者は容易に確定することができるであろう。同じく適量は、個々の対象(例えば、対象内の生物学的利用能、性別、年齢など)によって決まるであろう。例えば、対象における一過性の又は部分的な正常胆汁酸ホメオスタシスの回復は、メタボリック症候群；脂質又はグルコース関連障害；コレステロール又はトリグリセリド代謝；2型糖尿病；例えば、肝内の胆汁鬱滞の疾患(例えば、PBC、PFIC、PSC、PIC、新生児胆汁鬱滞、及び薬物誘発性胆汁鬱滞(例えば、エストロゲン))、並びに、肝外胆汁鬱滞の疾患(例えば、腫瘍由来の胆管圧縮、胆石による胆管閉塞)を含む、胆汁鬱滞；回腸切除、炎症性腸疾患(例えば、クローン病及び潰瘍性大腸炎)、下痢(例えばBAD)及びGI症状に繋がる以外特徴づけられない(特発性)胆汁酸の吸收を損なう障害、並びにGI癌、肝臓癌、及び／又は胆嚢癌(例えば、結腸癌及び肝細胞癌)を含む、胆汁酸吸收不良及び遠位小腸に関与する他の障害；並びに／又は、NASH、肝硬変及び門脈圧亢進症の一因となるものなどの、胆汁酸合成異常の治療に使用される薬物の用量又は頻度を減少することができる；それにもかかわらず、治療から完全に解放されることはない。有効量は、例えば、1種以上の関連する生理学的作用を測定することにより、確定することができる。

30

#### 【 0 1 9 6 】

対象を治療するための本発明の方法及び使用は、胆汁酸に関係した又は関連した障害などの対象の障害を予防するか又は可能性を減少するために、予防に関して適用可能である

40

50

。或いは方法及び使用は、対象の治療時若しくは治療後に実践することができる。例えば、対象の別の薬物又は治療薬を使用し胆汁酸ホメオスタシスを改善するための治療前、治療時又は治療後に、例えば本発明の方法又は使用を、例えば本発明のペプチド配列を、該対象へ投与することができる。加えて、本発明のペプチド配列などの組成物は、例えば胆汁酸を安定化する薬物又は治療薬などの、別の薬物又は薬剤と組合せることができる。

#### 【0197】

従って対象を治療するための本発明の方法及び使用は、別の治療の前に、実質的に同時に又は後に実践することができ、且つ別の型の療法で補助することができる。補助療法は、インスリン、インスリン感度増強剤及び他の薬物治療などの他のグルコース降下治療、食事制限(低糖質、低脂肪など)、体重減少手術(胃バイパス、胃切除術による胃容積の減少)、胃緊縛術、胃バルーン、胃スリーブなどを含む。例えば、高血糖障害又はインスリン抵抗性障害を治療するための本発明の方法又は使用は、対象においてグルコースを降下するか又はインスリン感受性を増大する薬物又は他の医薬組成物と組合せて使用することができる。

10

#### 【0198】

本開示は、以下を含む、多くの薬剤(及びそれらのクラス)との併用療法を意図している：1)インスリン(例えば、ボーラス及び基本的類似体)、インスリン模倣体、並びにスルホニル尿素(例えば、クロルプロパミド、トラザミド、アセトヘキサミド、トルブタミド、グリブリド、グリメピリド、グリビジド)及びメグリチニド(例えば、レパグリニド(ランジン(PRANDIN))及びナテグリニド(スターリックス(STARLIX)))を含むインスリン分泌のシミュレーションを引き起こす薬剤；2)ビグアニド(例えば、メトホルミン(グルコファージ(GLUCOPHAGE)))、並びにグルコース利用を促進し、肝グルコース生成を減少し及び/又は腸管のグルコース放出(output)を縮小することにより作用する他の薬剤；3) -グルコシダーゼ阻害剤(例えば、アカルボース及びミグリトール)、並びに炭水化物消化及び結果としての消化管からの吸収を遅延し、且つ食後の高血糖を低下する他の薬剤；4)インスリン作用を増強し(例えば、インスリン増感により)、その結果末梢組織におけるグルコース利用を促進する、チアゾリジンジオン(例えば、ロシグリタゾン(アバンディア(AVANDIA))、トログリタゾン(レズリン(REZULIN))、ピオグリタゾン(アクトス(ACTOS))、グリビジド、ベラグリタゾン、リボグリタゾン、ネットグリタゾン、トログリタゾン、エングリタゾン、シグリタゾン、アダグリタゾン、ダルグリタゾン；5)DPP-IV阻害剤(例えば、ビルダグリプチン(GALVUS)及びシタグリプチン(JANUVIA))を含むグルカゴン-様-ペプチド、並びにグルカゴン-様ペプチド-1(GLP-1)及びGLP-1アゴニスト及び類似体(例えば、エキセナチド(バイエッタ(BYETTA)及びITCA 650(エキセナチド類似体を12ヶ月にわたり送達する皮下に挿入された浸透圧ポンプ；Intarcia社、ボストン、MA))；6)並びに、DPP-IV-抵抗性類似体(インクレチニン模倣体)、PPARアゴニスト、二重作用PPARアゴニスト、汎作用性(pan-acting)PPARアゴニスト、PTP1B阻害剤、SGLT阻害剤、インスリン分泌促進剤、RXRアゴニスト、グリコーゲン合成酵素キナーゼ-3阻害剤、免疫調節成分、-3アドレナリン作動性受容体アゴニスト、11-HSD1阻害剤、及びアミリン類似体。

20

#### 【0199】

いくつかの実施態様において、本明細書に提供されるキメラペプチド及び方法と組合せて使用することができる他の例証的薬剤は、ジペプチジルペプチダーゼ-4(DPP-4)阻害剤、プロモクリプチン製剤(例えば、胆汁酸封鎖剤(例えば、コレセベラム)、及びSGLT-2阻害剤を含む。食欲抑制剤も周知であり、且つ本明細書に提供される組成物及び方法と組合せて使用することができる。補助療法は、発明の方法及び使用の前、同時に又は後に投与することができる。

30

#### 【0200】

例示されたペプチド配列の部分配列、配列変種及び修飾形(例えば、表1～10及び配列表に列記された配列)を含む、本発明のペプチド配列は、単位投与量又は単位剤形に製剤することができる。特定の実施態様において、ペプチド配列は、例えば胆汁酸ホメオスタシスの異常又は迷走(aberrant)のために、例えばメタボリック症候群；脂質又はグルコース

40

50

関連障害；コレステロール又はトリグリセリド代謝；2型糖尿病；例えば、肝内の胆汁鬱滞の疾患(例えば、PBC、PFIC、PSC、PIC、新生児胆汁鬱滞、及び薬物誘発性胆汁鬱滞(例えば、エストロゲン))、並びに、肝外胆汁鬱滞の疾患(例えば、腫瘍由来の胆管圧縮、胆石による胆管閉塞)を含む、胆汁鬱滞；回腸切除、炎症性腸疾患(例えば、クローン病及び潰瘍性大腸炎)、下痢(例えばBAD)及びGI症状に繋がる以外特徴づけられない(特発性)胆汁酸の吸收を損なう障害、並びにGI癌、肝臓癌、及び／又は胆嚢癌(例えば、結腸癌及び肝細胞癌)を含む、胆汁酸吸收不良及び遠位小腸に関与する他の障害；並びに／又は、NASH、肝硬変及び門脈圧亢進症の一因となるものなどの、胆汁酸合成異常のために、治療が必要な対象を治療するのに有効な量である。単位投与量の例は、約25～250、250～500、500～1000、1000～2500又は2500～5000、5000～25,000、25,000～50,000ng；約25～250、250～500、500～1000、1000～2500又は2500～5000、5000～25,000、25,000～50,000μg；及び、約25～250、250～500、500～1000、1000～2500又は2500～5000、5000～25,000、25,000～50,000mgの範囲である。  
10

#### 【0201】

例示されたペプチド配列の部分配列、配列変種及び修飾形(例えば、表1～10及び配列表に列記された配列)を含む、本発明のペプチド配列は、例えば有効量又は十分量で、単回投与量又は反復用量として意図された効果を提供するために、投与することができる。投与量の例は、約25～250、250～500、500～1000、1000～2500又は2500～5000、5000～25,000、25,000～50,000pg/kg；約50～500、500～5000、5000～25,000又は25,000～50,000ng/kg；及び、約25～250、250～500、500～1000、1000～2500又は2500～5000、5000～25,000、25,000～50,000μg/kgの範囲である。単回投与量又は反復投与量は、例えば、1日に複数回、連続する日、隔日、毎週又は断続的に(例えば、毎週2回、1、2、3、4、5、6、7若しくは8週毎に1回、又は2、3、4、5若しくは6ヶ月毎に1回)投与することができる。  
20

#### 【0202】

例示されたペプチド配列の部分配列、配列変種及び修飾形(例えば、表1～10及び配列表に列記された配列)を含む、本発明のペプチド配列を投与することができ、且つ方法は、任意の経路により、全身投与、局部(regional)投与又は局所投与により実践され得る。例えば、ペプチド配列は、非経口(例えば、皮下、静脈内、筋肉内、若しくは腹腔内)、経口(例えば、摂食、口腔内、若しくは舌下)、吸入、皮内、腔内、頭蓋内、経真皮(外用)、経粘膜的又は経直腸内に投与することができる。例示されたペプチド配列の部分配列、変種及び修飾形(例えば、表1～10及び配列表に列記された配列)を含む、本発明のペプチド配列、並びに医薬組成物を含む本発明の方法は、(マイクロ)カプセル封入送達システムによるか又は投与のためのインプラントに包装するかで投与することができる。  
30

#### 【0203】

非経口(例えば皮下)投与の特定の非限定的例は、Intarcia皮下送達システム(Intarcia Therapeutics社；ヘイワード、CA)の使用を含む。このシステムは、一定量の治療薬を所望の期間にわたり送達する、ミニチュアの浸透圧ポンプを備えている。好適な治療範囲内に薬物レベルを維持することに加え、このシステムは、ヒト体温でタンパク質性治療薬の安定性を延長された期間維持する製剤と共に使用することができる。

#### 【0204】

本発明は更に、例示されたペプチド配列の部分配列、変種及び修飾形(例えば、表1～10及び配列表に列記された配列)を含む本発明のペプチド配列(複数可)、並びに1種以上の医薬として許容し得る又は生理的に許容し得る希釈剤、担体又は賦形剤を含有する、「医薬組成物」を提供する。特定の実施態様において、1又は複数のペプチド配列は、治療的に許容し得る量で存在する。本医薬組成物は、本発明の方法及び使用に従い使用されてよい。従って例えば本医薬組成物は、本発明の治疗方法及び使用を実践するために、エクスピボ又はインビボで対象へ投与することができる。  
40

#### 【0205】

本発明の医薬組成物は、意図された投与方法又は投与経路と適合するように、製剤することができ；投与経路の例は、本明細書に示している。加えて、本医薬組成物は更に、本  
50

明細書に開示された他の治療的活性薬剤又は化合物(例えば、胆汁酸安定化剤又は薬物)、或いは本明細書に示した様々な胆汁酸疾患及び障害の治療又は予防に使用することができる当業者に公知の他の治療的活性薬剤又は化合物を含有してよい。

#### 【0206】

医薬組成物は典型的には、例示されたペプチド配列の部分配列、変種及び修飾形(例えば、表1~10及び配列表に記載された配列)を含む、本発明のペプチド配列の少なくとも1種を治療的有効量、並びに1種以上の医薬として及び生理的に許容し得る製剤物質を含有する。好適な医薬として又は生理的に許容し得る希釈剤、担体又は賦形剤としては、抗酸化剤(例えば、アスコルビン酸及び硫酸水素ナトリウム)、保存剤(例えば、ベンジルアルコール、メチルパラベン、エチル又はn-プロピル、p-ヒドロキシ安息香酸エステル)、乳化剤、懸濁化剤、分散剤、溶媒、充填剤、增量剤、緩衝液、ビヒクル、希釈剤、及びノ又はアジュバントが挙げられるが、これらに限定されるものではない。例えば、好適なビヒクルは、恐らく非経口的投与のために医薬組成物において一般的な他の材料を補充した、生理食塩水又はクエン酸緩衝食塩水であってよい。中性の緩衝食塩水又は血清アルブミンと混合した食塩水は、更なるビヒクルの例である。当業者は、本発明において使用される医薬組成物及び剤形において使用することができる様々な緩衝液を容易に認めるであろう。典型的緩衝液としては、医薬として許容し得る弱酸、弱塩基、又はそれらの混合物が挙げられるが、これらに限定されるものではない。緩衝成分はまた、リン酸、酒石酸、乳酸、コハク酸、クエン酸、酢酸、アスコルビン酸、アスパラギン酸、グルタミン酸、及びそれらの塩などの水溶性材料を含む。10

#### 【0207】

ビヒクル中の主要な溶媒は、事実上水性又は非水性のいずれかであってよい。加えてビヒクルは、医薬組成物のpH、浸透圧、粘度、無菌性又は安定性を改変又は維持するために、他の医薬として許容し得る賦形剤を含有することができる。いくつかの実施態様において、医薬として許容し得るビヒクルは、水性緩衝液である。他の実施態様において、ビヒクルは、例えば塩化ナトリウム及びノ又はクエン酸ナトリウムを含む。20

#### 【0208】

本発明の医薬組成物はまた、発明のペプチドの放出速度を改変又は維持するための他の医薬として許容し得る製剤物質を含むことができる。そのような製剤物質は、持続放出製剤の調製において当業者に公知のそれらの物質を含む。医薬として及び生理的に許容し得る製剤物質に関する更なる参照については、例えば、「レミントン薬科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)」、第18版(1990, Mack Publishing社、イーストン、Pa. 18042)、1435-1712頁; 「メルクインデックス(The Merck Index)」、第12版(1996, Merck Publishing Group社、ホワイトハウス、NJ); 及び、「固体剤形の医薬原理(Pharmaceutical Principles of Solid Forms)」(1993, Technicon Publishing社、ランカスター、Pa.)を参考されたい。投与に適した追加の医薬組成物は、当該技術分野において公知であり、且つ本発明の方法及び組成物において利用可能である。30

#### 【0209】

医薬組成物は、液剤、懸濁剤、ゲル剤、乳剤、固形剤、又は脱水若しくは凍結乾燥された散剤として、滅菌バイアル中に貯蔵されてよい。そのような組成物は、そのまま使用する形態、使用前に再構成が必要な凍結乾燥された形態、使用前に希釈が必要な液体形態、又は他の許容し得る形態のいずれかで貯蔵されてよい。一部の実施態様において、医薬組成物は、単回使用容器(例えば、単回使用バイアル、アンプル、注射器、又は自動噴射装置(例えばEpiPen(登録商標)に類似したもの))の中で提供されるのに対し、反復使用容器(例えば、反復使用バイアル)が他の実施態様において提供される。インプラント(例えば、埋め込み型ポンプ)及びカテーテルシステムを含む、いずれかの薬物送達装置を使用し、発明のペプチドを送達することができ、これらは両方共当業者に公知である。一般に皮下又は筋肉内に投与されるデボ注射剤も、発明のペプチドを規定された期間にわたり放出するため利用することができる。デボ注射剤は通常、固体-又は油-ベースのいずれかであり、且つ一般に本明細書に示した製剤成分の少なくとも1つを含有する。当業者は、デボ40

50

50

50

50

注射剤の可能性のある製剤及び使用について精通している。

**【0210】**

医薬組成物は、その意図された投与経路と適合するように製剤することができる。従つて、医薬組成物は、非経口(例えば、皮下(s.c.)、静脈内、筋肉内、又は腹腔内)、皮内、経口(例えば、摂取)、吸入、腔内、頭蓋内、及び経真皮(外用)を含む経路による投与に適した担体、希釈剤、又は賦形剤を含む。

**【0211】**

医薬組成物は、無菌の注射用水性又は油性の懸濁剤の形態であってよい。この懸濁剤は、本明細書に開示されたか又は当業者に公知の好適な分散剤又は湿潤剤及び懸濁化剤を用い、製剤されてよい。無菌の注射用調製品はまた、例えば1,3-ブタンジオール中の液剤のように、無毒の非経口的に許容し得る希釈剤又は溶媒中の無菌の注射用液剤又は懸濁剤であってもよい。利用することができる許容し得る希釈剤、溶媒及び分散媒は、水、リンゲル液、等張塩化ナトリウム溶液、クレモフォールEL(商標)(BASF社、パルシパニー、NJ)又はリン酸緩衝食塩水(PBS)、エタノール、ポリオール(例えば、グリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコール)、並びにそれらの好適な混合物を含む。加えて、無菌の不揮発性油は、溶媒又は懸濁媒体として従来使用されている。この目的のために、合成モノ-又はジグリセリドを含む、任意の無刺激性の不揮発性油を使用することができます。更にオレイン酸などの脂肪酸の、注射用調製品における使用を認める。特定の注射用製剤の延長された吸収は、吸収を遅延する物質(例えば、アルミニウムモノステアレート又はゼラチン)を含有することにより、実現することができる。

10

**【0212】**

医薬組成物は、例えば、錠剤、カプセル剤、トローチ剤、舐剤、水性若しくは油性懸濁剤、分散可能な散剤若しくは顆粒剤、乳剤、硬若しくは軟カプセル剤、又はシロップ剤、液剤、マイクロビーズ又はエリキシル剤のような、経口使用に適した形態であってよい。経口使用が意図された医薬組成物は、医薬組成物の製造に関して当該技術分野において公知の任意の方法に従い調製することができる。そのような組成物は、医薬として洗練され且つ口当たりの良い調製品を提供するために、甘味剤、香味剤、着色剤及び保存剤などの物質を1種以上含有することができる。発明のペプチドを含有する錠剤は、錠剤の製造に適した無毒の医薬として許容し得る賦形剤との混合物であってよい。これらの賦形剤は、例えば炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、乳糖、リン酸カルシウム又はリン酸ナトリウムなどの、希釈剤；例えばトウモロコシデンプン、又はアルギン酸などの、造粒剤及び崩壊剤；例えばデンプン、ゼラチン又はアカシアゴムなどの、結合剤、並びに例えばステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸又はタルクなどの、滑沢剤を含む。

20

**【0213】**

経口投与に適した錠剤、カプセル剤などは、コーティングされなくてよいか、又はこれらは、胃腸管中での崩壊及び吸収を遅延し、これにより長期にわたる持続作用を提供するために、公知の技術によりコーティングされてよい。例えば、グリセリルモノステアラート又はグリセリルジステアレートなどの時間遅延物質を使用することができる。これらはまた、放出制御のための浸透圧性治療用錠剤を形成するために、当該技術分野において公知の技術によりコーティングされてよい。追加の物質は、投与された組成物の送達を制御するために、ポリエステル、ポリアミン酸、ヒドロゲル、ポリビニルピロリドン、ポリ無水物、ポリグリコール酸、エチレン-酢酸ビニル、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、硫酸プロタミン、又はラクチド/グリコリドコポリマー、ポリラクチド/グリコリドコポリマー、又はエチレン酢酸ビニルコポリマーなどの、生分解性又は生体適合性粒子又は高分子物質を含む。例えば、経口薬剤は、各々、ヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル又はポリ(メチルメタクリレート)マイクロカプセル剤を使用する、コアセルベーション技術又は界面重合により調製したマイクロカプセル中に、或いはコロイド薬物送達システム中に捕獲することができる。コロイド分散システムは、高分子複合体、ナノ-カプセル、ミクロスフェア、マイクロビーズ、並びに水中油型エマルジョン、ミセル、混合型ミセル、及びリポソームを含む脂質-ベースのシステムを含む。

30

40

50

そのような製剤の調製方法は、当業者に公知であり、且つ市販されている。

【0214】

経口使用のための製剤はまた、活性成分が例えば炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、カオリン又は微晶質セルロースなどの不活性固形希釈剤と混合されている、硬ゼラチンカプセル剤として、或いは活性成分が水又は油性媒体、例えばピーナッツ油、流動パラフィン、若しくはオリーブ油と混合されている、軟ゼラチンカプセル剤としても提示される。

【0215】

水性懸濁剤は、それらの製造に適した賦形剤との混合物中に活性物質を含有する。そのような賦形剤は、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシ-プロピルメチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、ポリビニル-ピロリドン、トラガカントガム及びアカシアゴムなどの懸濁化剤であり；分散剤又は湿潤剤は、天然のホスファチド、例えばレシチン、又はアルキレンオキシドの脂肪酸との縮合生成物、例えばポリオキシ-エチレンステアレート、又はエチレンオキシドの長鎖脂肪アルコールとの縮合生成物、例えばヘプタデカエチレンオキシセタノール、又はエチレンオキシドの脂肪酸及びヘキシトール由来の部分エステルとの縮合生成物、例えばポリオキシエチレンソルビトールモノオレエートなど、又はエチレンオキシドの脂肪酸及びヘキシトール無水物由来の部分エステルとの縮合生成物、例えばポリエチレンソルビタンモノオレエートであってよい。これらの水性懸濁剤は、1種以上の保存剤を含有することもできる。

【0216】

油性懸濁剤は、活性成分を、植物油、例えば落花生油、オリーブ油、ゴマ油若しくはココナツ油中に、又は流動パラフィンなどの鉱油中に懸濁することにより、製剤することができる。油性懸濁剤は、増粘剤、例えば蜜ろう、固体パラフィン又はセチルアルコールなどを含有することができる。先に示したもののような甘味剤、及び香味剤を添加し、口当たりの良い経口調製品を提供することができる。

【0217】

水の添加による水性懸濁液の調製に適した分散可能な散剤及び顆粒剤は、分散剤又は湿潤剤、懸濁化剤及び1種以上の保存剤と混合した活性成分を提供する。好適な分散剤又は湿潤剤及び懸濁化剤は、本明細書に例示されている。

【0218】

本発明の医薬組成物はまた、水中油型エマルジョンの形態であってよい。油相は、植物油、例えばオリーブ油若しくは落花生油、又は鉱油、例えば流動パラフィン、又はそれらの混合物であってよい。好適な乳化剤は、天然のガム、例えばアカシアゴム又はトラガカントガム；天然のホスファチド、例えば大豆、レシチン、及び脂肪酸由来のエステル若しくは部分エステル；ヘキシトール無水物、例えばソルビタンモノオレエート；並びに、部分エステルのエチレンオキシドとの縮合生成物、例えばポリオキシエチレンソルビタンモノオレエートであってよい。

【0219】

医薬組成物はまた、インプラント、リポソーム、ヒドロゲル、プロドラッグ及びマイクロカプセル封入された送達システムを含む、放出制御製剤などの、迅速な分解又は体からの排泄に対し、組成物を保護するための担体を含有することができる。例えば、グリセリルモノステアラート若しくはステアリン酸グリセリルの単独での、又はワックスとの組合せなどの遅延物質を使用することができる。注射用医薬組成物の延長された吸収は、例えばアルミニウムモノステアレート又はゼラチンなどの、吸収を遅延する物質を含有することにより実現することができる。微生物の作用の防止は、様々な抗菌剤及び抗真菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサールなどにより実現することができる。

【0220】

本発明はまた、直腸投与のための坐剤の形態で、発明のペプチドを含んでいる。坐剤は、発明のペプチドを、常温では固形であるが、直腸温度では液体であり、従って直腸内で溶融し、薬物を放出する好適な非刺激性の賦形剤と混合することにより調製することができます。

10

20

30

40

50

きる。そのような材料は、カカオバター及びポリエチレングリコールを含むが、これらに限定されるものではない。

#### 【0221】

本発明に従い、実質的HCC活性を伴わずに胆汁酸ホメオスタシスを調整するペプチド(又は本明細書に示した部分配列、変種又は修飾形)を同定する方法が提供される。一実施態様において、方法は、候補ペプチド配列を提供すること；該候補ペプチド配列を被験動物へ投与すること；候補ペプチド配列の投与後動物の胆汁酸レベルを測定し、候補ペプチド配列が、胆汁酸ホメオスタシスを調整するかどうかを決定すること；並びに、動物におけるHCCの誘導に関する候補ペプチド配列又はHCC活性と相關するマーカーの発現を分析すること：を含む。これにより胆汁酸ホメオスタシスを調整するが実質的HCC活性を有さない候補ペプチドは、実質的HCC活性を伴わずに、胆汁酸ホメオスタシスを調整するペプチド配列を同定する。10

#### 【0222】

用語「アッセイする」及び「測定する」及びそれらの文法上の変形は、本明細書において互換的に使用され、且つ定性的決定若しくは定量的決定のいずれか、又は定性的決定及び定量的決定の両方をいう。これらの用語が検出に関して使用される場合、本明細書に示し且つ当該技術分野において公知の様々な方法を含む、相対量を評価する任意の手段が意図されている。例えば、胆汁酸、及び7-ヒドロキシ-4-コレステン-3-オンなどの前駆体は、対象からの試料(例えば、血清)中で、アッセイ又は測定することができる。別の非限定的例は、血清又はヘパリン処理された血漿を使用する、2つの反応方法(Randox Laboratories社)を含む。第一の反応において、胆汁酸は、3-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼにより酸化され、引き続きチオ-NADがチオ-NADHへ還元される。第二の反応において、酸化された胆汁酸は、同じ酵素により還元され、引き続きNADHがNADへ酸化される。チオ-NADHの生成速度は、405nmでの特異的吸光度の変化を測定することにより決定される。20

#### 【0223】

最も一般的な肝臓癌型であるHCCのリスク因子は、2型糖尿病(恐らく肥満症により増悪)を含む。2型糖尿病におけるHCCのリスクは、糖尿病の期間及び治療プロトコールに応じて、より大きくなる(非-糖尿病性リスクの~2.5倍から~7倍まで)。

#### 【0224】

様々な方法論を、HCCのスクリーニング及び診断において使用することができ、且つこれらは当業者に周知である。HCCの指標は、-フェトプロテイン(AFP)又はdes-カルボキシプロトロンビン(DCP)の上昇したレベルなどの、腫瘍マーカーの検出を含む。超音波、CT走査及びMRIを含む、多くの様々な走査技術及び造影技術も有用である。本発明に関して、ペプチド(例えば候補ペプチド)はHCC誘導の証拠を示すかどうかの評価は、例えば、野生型FGF19によるHCC結節の形成と比べ、ペプチドを投与したdb/dbマウスなどの動物モデルにおけるHCC結節形成を定量することにより、インビボにおいて決定することができる。巨視的に、肝臓癌は、結節性であり、そこでは腫瘍結節(円形から橢円形の、灰色又は緑色の、境界がはっきりしているが被囊されていない)が、1つの大きい塊又は複数の比較的小さい塊のいずれかとして出現する。或いは、HCCは、拡散性であり且つ境界がはっきりせず且つ頻繁に門脈に浸潤している、浸潤性腫瘍として存在することがある。40

#### 【0225】

1つ以上の前記技術の結果が、HCCが存在する可能性を示した後で、肝組織試料の病理学的評価が一般に行われる。従って、ペプチド配列がHCC誘導の証拠を示すかどうかを決定するために、本発明の方法は更に、HCC試験において有用なインビボ動物モデル(例えばdb/dbマウス)由来の肝組織試料を評価することを含んでよい。顕微鏡評価により、病理学者は、HCCの4種の一般的構造的及び細胞学的型(パターン)のひとつが存在するかどうか(すなわち、線維層板型、偽腺状(腺様)型、多形型(巨細胞)及び明細胞)を決定することができる。

#### 【0226】

50

20

30

40

50

本発明はまた、例示されたペプチド配列の部分配列、配列変種及び修飾形(例えば、表1～10及び配列表に記載されたペプチドを含む)を含む本発明のペプチド配列に結合する抗体、及びそれらの断片の产生及び使用も含む。

#### 【0227】

本明細書において使用する用語「抗体」(Ab)及び「免疫グロブリン」(Ig)は、同じ構造特徴を有する糖タンパク質をいう。抗体は、抗原への結合特異性を示すが、免疫グロブリンは、抗体、及び抗原特異性を欠くことがある他の抗体-様分子の両方を含む。

#### 【0228】

用語「抗体」は、それらが所望の生物活性を示すことを条件として、無傷のモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、少なくとも2つの無傷の抗体から形成された多重特異性抗体(例えば、二重特異性抗体)、並びにFab及び $F(ab')_2$ を含む抗体結合断片を含む。基本的抗体構造単位は、四量体を含み、且つ各四量体は、2つの同一のポリペプチド鎖対により構成され、各対は、1本の「軽」鎖(約25kDa)及び1本の「重」鎖(約50～70kDa)を有する。各鎖のアミノ末端部分は、抗原認識に主に係わる約100～110個又はそれよりも多いアミノ酸の可変領域を含む。対照的に、各鎖のカルボキシ末端部分は、エフェクター機能に主に係わる定常領域を規定する。ヒト軽鎖は、及び 軽鎖として分類されるのに対し、ヒト重鎖は、μ、γ、δ、ε又はαとして分類され、各々、抗体アイソタイプをIgM、IgD、IgA、及びIgEとして規定する。結合断片は、組換えDNA技術により、又は無傷の抗体の酵素的若しくは化学的切断により作製される。結合断片は、Fab、Fab'、 $F(ab')_2$ 、Fv、及び1本鎖抗体を含む。

10

20

#### 【0229】

各重鎖は、1つの末端で可変ドメイン(VH)に続けていくつかの定常ドメインを有する。各軽鎖は、1つの末端に可変ドメイン(VL)及びその他端に定常ドメインを有し；軽鎖の定常ドメインは、重鎖の第一の定常ドメインと並置され、且つ軽鎖可変ドメインは、重鎖の可変ドメインと並置される。軽鎖及び重鎖内で、可変領域及び定常領域は、約12個以上のアミノ酸の「J」領域により連結され、また重鎖は、約10個以上のアミノ酸の「D」領域を含む。これらの抗体鎖は全て、3つの超可変領域に連結された、比較的保存されたフレームワーク領域(FR)の同じ全体構造を示し、これらは全て相補性決定領域又はCDRと称される。各対の2本鎖のCDRは、フレームワーク領域により並置され、特異的エピトープへ結合することが可能である。軽鎖及び重鎖の両方は、N-末端からC-末端へ、ドメインFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3及びFR4を含む。

30

#### 【0230】

無傷の抗体は、2つの結合部位を有し、且つ二価抗体又は二重特異性抗体以外は、2つの結合部位は同じである。二重特異性抗体又は二価抗体は、2つの異なる重鎖／軽鎖対及び2つの異なる結合部位を有する人工のハイブリッド抗体である。二重特異性抗体は、ハイブリドーマの融合又はFab'断片の連結を含む、様々な方法により作製することができる。

#### 【0231】

本明細書において使用される用語「モノクローナル抗体」とは、実質的に相同な抗体の集団から得られた抗体をいい、すなわちその集団を構成する個々の抗体は、少量で存在し得る可能性のある天然の変異以外は、同一である。モノクローナル抗体は、高度に特異性があり、単独の抗原性部位に対して方向づけられる。異なる決定基(エピトープ)に対し方向づけられる異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製品とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の単独の決定基に対し方向づけられる。

40

#### 【0232】

「中和抗体」は、それが結合する標的抗原のエフェクター機能を除外又は有意に低下することができる抗体分子である。

#### 【0233】

抗体結合断片は、無傷の抗体の酵素的又は化学的切断により产生することができる。酵素パパインによる抗体の消化は、「Fab」断片としても公知の2つの同一の抗原-結合断片と、抗原-結合活性を有さない「Fc」断片を生じる。酵素ペプシンによる抗体の消化は、

50

抗体分子の2つのアームが依然連結され且つ2つの抗原結合部位を含む $F(ab')_2$ 断片を生じる。 $F(ab')_2$ 断片は、抗原と架橋する能力を有する。

#### 【0234】

用語「Fab」は、軽鎖の定常ドメイン及び重鎖のCH1ドメインを含む抗体の断片をいう。本明細書において使用される用語「Fv」は、抗原-認識部位及び抗原-結合部位の両方を維持している抗体の最小断片をいう。2本鎖Fv種において、この領域は、非共有的に会合している、1本の重鎖及び1本の軽鎖可変ドメインの二量体からなる。1本鎖Fv種において、1本の重鎖及び1本の軽鎖可変ドメインは、可動性ペプチドリンクーにより共有的に連結され、その結果軽鎖及び重鎖は、2本鎖Fv種中のものに類似した「二量体」構造で会合することができる。各可変ドメインの3つのCDRが相互作用し、VH-VL二量体の表面上の抗原-結合部位を規定することは、この立体配置においてである。6つのCDRは集合的に抗体に抗原-結合特異性を付与するが、単独の可変ドメイン(又は抗原に対し特異性のあるわずかに3つのCDRを含むFvの半分)であっても、抗原を認識し且つ結合する能力を有する。

10

#### 【0235】

用語「相補性決定領域」又は「CDR」とは、特異的リガンドとの接触をもたらし、且つその特異性を決定する、免疫受容体の一部をいう。用語「超可変領域」とは、抗原-結合に係わっている抗体のアミノ酸残基をいう。超可変領域は一般に、「相補性決定領域」若しくは「CDR」由来のアミノ酸残基及び/又は「超可変ループ」由来のそれらの残基を含む。

20

#### 【0236】

本明細書において使用される用語「エピトープ」とは、タンパク質抗原上の抗体への結合部位をいう。エピトープ決定基は通常、アミノ酸又は糖側鎖などの分子の化学的に活性のある表面集団(groupings)に加え、特異的三次元構造的及び電荷の特徴からなる。抗体は、解離定数が 1 μM、好ましくは 100nM、及び最も好ましくは 10nMである場合に、抗原に結合するといわれる。増大した平衡定数("K<sub>D</sub>")とは、エピトープと抗体の間により低い親和性が存在することを意味するのに対し、減少した平衡定数とは、エピトープと抗体の間により高い親和性が存在することを意味する。特定量「以下の」K<sub>D</sub>を伴う抗体とは、その抗体が、所定のK<sub>D</sub>又はそれよりも強力にエピトープへ結合することを意味する。K<sub>D</sub>は、エピトープと抗体の結合特徴を説明するが、「効力」は、抗体の機能に関する抗体それ自身の有効性を説明する。平衡定数と効力の間に、必ずしも相関関係は存在せず；従つて例えれば、相対的に低いK<sub>D</sub>は、自動的に高い効力を意味するのではない。

30

#### 【0237】

抗体に関して用語「選択的に結合する」とは、抗体が単独の物質へのみ結合することを意味するのではなく、第一の物質への該抗体のK<sub>D</sub>が、第二の物質への該抗体のK<sub>D</sub>より少ないことを意味する。エピトープへ排他的に結合する抗体は、その単独のエピトープへのみ結合する。

#### 【0238】

ヒトへ投与される場合、齧歯類(マウス又はラット)の可変領域及び/又は定常領域を含む抗体は、例えば、体からの迅速なクリアランス、又は抗体に対する体の免疫応答の発生と時には関連付けられる。齧歯類由来の抗体の利用を避けるために、完全ヒト抗体を、ヒト抗体機能の齧歯類への導入により作製することができ、その結果該齧歯類は完全ヒト抗体を産生する。本明細書においては具体的に同定されないが、「ヒト」抗体と「完全ヒト」抗体は、本明細書において互換的に使用することができる。用語「完全ヒト」は、部分的にのみヒトである抗体を、全面的にヒト又は完全にヒトである抗体から識別する場合に有用であり得る。当業者は、完全ヒト抗体を作製する様々な方法を知っている。

40

#### 【0239】

可能性のあるヒト抗-マウス抗体反応に対処するために、キメラ抗体又は他のヒト化抗体を利用することができます。キメラ抗体は、ヒト定常領域及びマウスの可変領域を有し、そのためヒト抗-キメラ抗体反応は、一部の患者において認められる。従つて、可能性のあるヒト抗-マウス抗体反応又はヒト抗-キメラ抗体反応を避けるために、多量体酵素に対

50

する完全ヒト抗体を提供することが有利である。

【0240】

完全ヒトモノクローナル抗体は、例えば、当業者に公知の技術によるハイブリドーマ細胞株の作製により、調製することができる。他の調製方法は、CHO細胞などの、好適な哺乳動物の宿主細胞の形質転換のための特定の抗体をコードしている配列の使用に関与している。形質転換は、例えば、ウイルス内の(又はウイルスベクターへの)ポリヌクレオチドのパッケージング、及びウイルス(又はベクター)による宿主細胞の形質導入を含む、ポリヌクレオチドを宿主細胞へ導入するためのいずれか公知の方法によるか、又は当該技術分野において公知のトランスフェクション手順によることができる。異種ポリヌクレオチドを哺乳動物細胞へ導入する方法は、当該技術分野において周知であり、且つデキストラン-媒介性トランスフェクション、リン酸カルシウム沈降、ポリブレン-媒介性トランスフェクション、プロトプラスト融合、電気穿孔法、リポソーム内のポリヌクレオチドの封入、及びDNAの核への直接微量注入を含む。発現のための宿主として利用可能な哺乳動物細胞株は、当該技術分野において周知であり、CHO細胞、HeLa細胞、及びヒト肝細胞性癌細胞を含むが、これらに限定されない。  
10

【0241】

抗体は、診断及び/又は治療に使用することができる。例えば該抗体は、対象における本発明の1種以上のペプチドのレベルを検出し、且つ検出されたレベルを、標準対照レベル又は予め(例えば、何らかの罹患以前に)決定された対象におけるベースラインレベルのいずれかと比較することにより、診断薬として使用することができる。該抗体は、1種以上の本発明のペプチドの活性を調整する治療薬として使用することができ、これにより状態又は障害に対する効果を有する。  
20

【0242】

本発明は、好適な包装材料に包装された、本発明のペプチド配列を、1種以上の治療薬、それらの組成物及び医薬組成物と任意に組合せて備えるが、これらに限定されるものではない、キットを提供する。キットは任意に、成分の説明又はその中の成分のインピトロ、インピボ、若しくはエクスピビオにおける使用に関する指示を含む、ラベル又は添付文書を備える。指示の例は、メタボリック症候群；脂質又はグルコース関連障害；コレステロール又はトリグリセリド代謝；2型糖尿病；例えば、肝内の胆汁鬱滞の疾患(例えば、PBC、PFIC、PSC、PIC、新生児胆汁鬱滞、及び薬物誘発性胆汁鬱滞(例えば、エストロゲン))  
30、並びに、肝外胆汁鬱滞の疾患(例えば、腫瘍由来の胆管圧縮、胆石による胆管閉塞)を含む、胆汁鬱滞；回腸切除、炎症性腸疾患(例えば、クローン病及び潰瘍性大腸炎)、下痢(例えばBAD)及びGI症状に繋がる以外特徴づけられない(特発性)胆汁酸の吸收を損なう障害、並びにGI癌、肝臓癌、及び/又は胆嚢癌(例えば、結腸癌及び肝細胞癌)を含む、胆汁酸吸收不良及び遠位小腸に関与する他の障害；並びに/又は、NASH、肝硬変及び門脈圧亢進症の一因となるものなどの、胆汁酸合成異常などの、胆汁酸に関係した又は関連した障害の治療に関する指示を含む。  
30

【0243】

キットは、例えば、2種以上のペプチド配列の単独で、又はペプチド配列の別の治療的に有用な組成物(例えば、胆汁酸ホメオスタシス調整薬)との組合せなど、そのような成分の集合を含むことができる。  
40

【0244】

用語「包装材料」とは、キットの成分を収容している物理的構造をいう。包装材料は、成分の無菌性を維持することができ、且つそのような目的のために通常使用される材料(例えば、紙、段ボール、ガラス、プラスチック、箔、アンプル、バイアル、チューブなど)で製造することができる。

【0245】

本発明のキットは、ラベル又は添付文書を備えることができる。ラベル又は添付文書は、個別の、又は成分、キット若しくは包装材料(例えば箱)に付属された、又は例えばキット成分を含むアンプル、チューブ若しくはバイアルに付けられた、「印刷物」、例えば紙  
50

又は厚紙を含む。ラベル又は添付文書は加えて、ディスク(例えば、ハードディスク、カード、メモリーディスク)、CD-若しくはDVD-ROM/RAM、DVD、MP3などの光学ディスク、磁気テープ、又はRAM及びROMなどの電子記憶媒体、又は磁気/光学記憶媒体などのこれらのハイブリッド、FLASH媒体又はメモリー型カードなどの、コンピュータで読み取り可能な媒体を含むことができる。

#### 【0246】

ラベル又は添付文書は、その中の1種以上の成分、投与量、活性成分の作用機序、薬物動態及び薬力学を含む臨床薬理の情報を確定することを含むことができる。ラベル又は添付文書は、製造業者の情報、ロット番号、製造業者の住所及び製造日時を確定する情報を含むことができる。

10

#### 【0247】

ラベル又は添付文書は、そのためにキットの成分が使用される状態、障害、疾患又は症状に関する情報を含むことができる。ラベル又は添付文書は、方法、治療プロトコール又は治療的レジメンにおいて1種以上のキット成分を使用する、臨床医に関する又は対象に関する指示を含むことができる。指示は、投薬の量、頻度又は期間、並びに本明細書に示した方法、治療プロトコール又は治療的レジメンのいずれかの実践に関する指示を含むことができる。指示の例は、本明細書に示したペプチド配列の治療又は使用に関する指示を含む。従って本発明のキットは追加的に、治疗方法及び使用を含む本明細書に説明する本発明の方法及び使用のいずれかの実践に関するラベル又は指示を含むことができる。

#### 【0248】

20

ラベル又は添付文書は、予防的又は治療的恩恵などの、成分が提供することができるあらゆる恩恵に関する情報を含むことができる。ラベル又は添付文書は、特定の組成物の使用に適切でないような状況に関する対象又は臨床医への警鐘などの、可能性のある有害副作用に関する情報を含むことができる。有害副作用はまた、対象が、本組成物との不適合であり得る1種以上の他の医薬品の服用を有するか、今後服用するか又は現在服用している場合、或いは対象が、該組成物と不適合である別の治療プロトコール又は治療的レジメンを有するか、今後受けるか又は現在受けている場合に起こり得、その結果指示は、そのような不適合に関する情報を含むことができる。

#### 【0249】

発明のキットは加えて、他の成分を含むことができる。キットの各成分は、個別の容器に封入され、且つ様々な容器は全て単独の包装内にあることができる。発明のキットは、冷蔵のためにデザインされることができる。発明のキットは更に、本発明のペプチド配列を含むか、又はペプチド配列をコードしている核酸を含むようにデザインすることができる。キット内の細胞は、使用時まで、適切な貯蔵条件下で維持することができる。

30

#### 【0250】

別に規定しない限りは、本明細書において使用する全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の業者により通常理解されるものと同じ意味を有する。本明細書において説明した方法及び材料に類似した又は同等の方法及び材料を、本発明の実践又は試験に使用することができるが、好適な方法及び材料を本明細書に説明している。

#### 【0251】

40

本明細書に引用した全ての出願、刊行物、特許及び他の参考文献、GenBank引用及びATC引用は、それらの全体が引用により組み込まれている。矛盾する場合、定義を含む本明細書が支配するであろう。本明細書に使用する单数形「ある(a, an, the)」は、別に文脈が明確に指示しない限りは、複数の言及を含む。従って例えば、「あるペプチド配列」又は「ある治療」の言及は、そのような配列、治療の複数を含み、他も同様である。

#### 【0252】

本明細書において使用する数値は、本文書を通じ範囲の形式で提示されることが多い。範囲の形式の使用は、単に便宜上且つ簡潔さのためであり、別に文脈が明確に指示しない限りは、本発明の範囲の変動限界として解釈されるべきではない。従って、別に文脈が明確に指示しない限りは、範囲の使用は明確に、全ての可能性のある部分範囲、その範囲内

50

の個々の数値全て、並びにそのような範囲内の整数及び範囲内の値の分数又は整数を含む全ての数値又は数値範囲を含む。範囲の幅にかかわらず、且つ本特許文書を通じた全ての文脈において、この解釈(construction)が適用される。従って例えば90～100%の範囲の言及は、91～99%、92～98%、93～95%、91～98%、91～97%、91～96%、91～95%、91～94%、91～93%などを含む。90～100%の範囲の言及はまた、91%、92%、93%、94%、95%、95%、97%など、更には91.1%、91.2%、91.3%、91.4%、91.5%など、92.1%、92.2%、92.3%、92.4%、92.5%など、及びそれに類するものも含む。

#### 【 0 2 5 3 】

加えて、1～3、3～5、5～10、10～20、20～30、30～40、40～50、50～60、60～70、70～80、80～90、90～100、100～110、110～120、120～130、130～140、140～150、150～160、160～170、170～180、180～190、190～200、200～225、225～250の範囲の言及は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20などを含む。更なる例において、25～250、250～500、500～1000、1000～2500又は2500～5000、5000～25,000、5000～50,000の範囲の言及は、例えば、25、26、27、28、29・・・、250、251、252、253、254・・・、500、501、502、503、504・・・などの任意の数値又はその中の若しくはそのような数値を包含する範囲を含む。10

#### 【 0 2 5 4 】

同じく本明細書において使用されるように、連続する範囲が、本文書を通じて明らかにされる。連続する範囲の使用は、別の範囲を提供するための上側の範囲及び下側の範囲の組合せを含む。範囲の幅にかかわらず、且つ本特許文書を通じて全ての文脈において、この解釈が適用される。従って、例えば5～10、10～20、20～30、30～40、40～50、50～75、75～100、100～150などの連続する範囲の言及は、5～20、5～30、5～40、5～50、5～75、5～100、5～150、及び10～30、10～40、10～50、10～75、10～100、10～150、及び20～40、20～50、20～75、20～100、20～150などの範囲、及びそれに類するものを含む。20

#### 【 0 2 5 5 】

簡潔さを助けるために、いくつかの略語を本明細書において使用する。一例は、アミノ酸残基を表す1文字略語である。アミノ酸及びそれらの対応する3文字及び1文字略語を、以下に示す：

## 【表1】

アラニン	Ala	(A)	
アルギニン	Arg	(R)	
アスパラギン	Asn	(N)	
アスパラギン酸	Asp	(D)	
システイン	Cys	(C)	
グルタミン酸	Glu	(E)	
グルタミン	Gln	(Q)	10
グリシン	Gly	(G)	
ヒスチジン	His	(H)	
イソロイシン	Ile	(I)	
ロイシン	Leu	(L)	
リジン	Lys	(K)	
メチオニン	Met	(M)	
フェニルアラニン	Phe	(F)	
プロリン	Pro	(P)	
セリン	Ser	(S)	20
トレオニン	Thr	(T)	
トリプトファン	Trp	(W)	
チロシン	Tyr	(Y)	
バリン	Val	(V)	

## 【0256】

本発明は概して、多くの実施態様を説明するために肯定的文体を用い、本明細書において明らかにされている。本発明はまた具体的には、物質又は材料、方法の工程及び条件、プロトコール、手順、アッセイ又は分析などの、特定の対象物が、完全に又は一部除外されている実施態様を含む。従って、本発明は概して本発明が含まないものに関しては本明細書において記載しないが、それにもかかわらず本発明に明確に含まれない態様が、本明細書において開示されている。

## 【0257】

本発明の多くの実施態様が説明されている。それにもかかわらず、本発明の精神及び範囲から逸脱しない限りは、様々な変更を行うことができることは理解されるであろう。従って以下の実施例は、請求項に説明された本発明の範囲を例示することを意図しており、範囲を限定することを意図するものではない。

## 【実施例】

## 【0258】

(実施例)

(実施例1)

下記は、本明細書の試験において使用した様々な方法及び材料の説明である。

## 【0259】

(動物) db/dbマウスは、The Jackson Laboratory社(バー・ハーバー、ME)から購入した。マウスは、管理光(12時間明及び12時間暗のサイクル、暗午後6:30～午前6:30)、温度( $2 \pm 4$ )及び湿度(50% ± 20%)の条件下で、動物の福祉に関する指針(welfare guidelines)に従い飼育した。マウスは、自在に水(オートクレープにかけた蒸留水)を摂取し、且つ脂肪17kcal%、タンパク質23kcal%及び炭水化物60kcal%を含有する市販の飼料(Harlan Laboratories社、インディアナポリス、IN、Irradiated 2018 Teklad Global 18% Protein Rodent Diet)を自由に摂餌した。全ての動物試験は、NGM施設内動物の福祉と使用に関

30

40

50

する委員会により承認された。

【0260】

(DNA配列及びアミノ酸配列) ヒトFGF19(ホモサピエンスFGF19、GenBank寄託番号NM\_005117.2)変種をコードしているORFのcDNA。cDNA(GenBank寄託番号NP\_005108.1)によりコードされたタンパク質配列。

【0261】

(PCR) FGF19 ORFを、ヒト小腸組織から調製した組換えDNA(cDNA)を用い、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により増幅した。Phusion(登録商標)高忠実度DNAポリメラーゼの入ったPCR試薬キットは、New England BioLabs社(F-530L、イプスウィック、MA)から購入した。下記のプライマーを使用した：フォワードPCRプライマー：

10

【化76】

5' CCGACTAGTCACCCatgcggagcgggtgtgg (配列番号 :136)

及びリバースPCRプライマー：

【化77】

5' ATAAGAATGCGGCCGCTTACTTCTCAAAGCTGGACTCCTC (配列番号 :137)

。増幅されたDNA断片を、制限酵素Spe I及びNot Iにより消化し(これらの制限部位は、各々5'又は3'PCRプライマーに含まれた)、次に同じ制限酵素で消化されているAAV導入遺伝子ベクターにライゲーションした。発現に使用したベクターは、選択マーカー、並びにクローニングされたコード配列の挿入部位の5'側の強力な真核生物プロモーター、それに続く3'側の非翻訳領域及びウシ成長ホルモンのポリアデニル化した尾部で構成された発現力セットを含んだ。この発現構築体はまた、5'末端及び3'末端に、内部末端反復が側方に位置した。

20

【0262】

(初代ヒト肝細胞におけるCyp7a1抑制アッセイ) 初代ヒト肝細胞を、100nMデキサメタゾン(Sigma社)及び0.25mg/ml Matrigel(商標)(Becton Dickinson Biosciences社)を補充したWilliams E培地(Invitrogen社)中で、コラーゲンコートされたプレート(Becton Dickinson Biosciences社)上に播種した。細胞を、FGF19又は変種により、37℃で6時間処理した。Cyp7a1発現を、定量的RT-PCR(TaqMan(登録商標)ABI PRISM 7700、Applied Biosystems社)により、3つ組みで評価し、且つGAPDH発現に対し規準化した。

30

【0263】

(Cyp7a1インビオ抑制アッセイ) 9週齢の雄のdb/dbマウス(Jackson Laboratories社)に、組み換えたんぱく質FGF19又はFGF21を、0.1mg/kg、1mg/kg、及び10mg/kgで腹腔内注射した。動物を、注射の5時間後に、安樂死させた。肝臓を摘出し、TRIzol(登録商標)試薬(Invitrogen社)中でホモジナイズした。総RNAを抽出し、DNase(Ambion社)により処理し、引き続き定量的RT-PCR分析し、GAPDH発現に対して規準化した。

【0264】

(AAVの生成及び精製) AAV293細胞(Agilent Technologies社、サンタクララ、CAから入手)を、10%ウシ胎仔血清及び1×抗生素質-抗真菌性溶液(Mediatech社、マナサス、VA)を補充したダルベッコ変形イーグル培地(DMEM、Mediatech社、マナサス、VA)において培養した。これらの細胞を、1日目に、150mm細胞培養プレートに、密度50%で播種し、且つ2日目に、以下の3種のプラスミド(各々20μg/プレート)により、リン酸カルシウム沈降法を用いたransfectionした：AAV導入遺伝子プラスミド、pHelper(商標)プラスミド(Agilent Technologies社)及びAAV2/9プラスミド(Gaoらの文献、J. Virol. 78:6381 (2004))。transfectionの48時間後、細胞をプレートから掻取り、3000×gの遠心分離によりペレット化し、20mMトリス(pH8.5)、100mM NaCl及び1mM MgCl<sub>2</sub>を含有する緩衝液中に再懸濁させた。この懸濁液を、アルコールドライアイス浴中で凍結し、その後37℃の水浴中で解凍した。この凍結及び解凍サイクルを、3回繰り返し；Benzonase(登録商標)(Sigma-aldrich社、セントルイス、MO)を50ユーニット/mlで添加し；デオキシコール酸を、最終

40

50

濃度0.25%で添加した。37℃で30分間インキュベーションした後、細胞デブリを、5000×gで20分間の遠心分離によりペレット化した。上清中のウイルス粒子を、先に説明された様な(Zolotukhin S.らの文献、(1999) Gene Ther. 6:973)不連続イオジキサナール(Sigma-Aldrich社、セントルイス、MO)勾配を用いて精製した。ウイルスストックを、Vivaspin(登録商標)20(MWカットオフ100,000ダルトン、Sartorius Stedim Biotech社、オーバーニュ、仏国)を用いて濃縮し、且つ10%グリセロールを含むリン酸-緩衝食塩水(PBS)中に再懸濁し、-80℃で貯蔵した。ウイルスゲノムコピー数を決定するために、ウイルスストック2μlを、50ユニット/ml Benzonase(登録商標)、50mMトリス-HCl(pH7.5)、10mM MgCl<sub>2</sub>、及び10mM CaCl<sub>2</sub>を含有する溶液6μl中で、37℃で30分間インキュベーションした。

## 【0265】

10

その後、2mg/mlプロテイナーゼK、0.5% SDS及び25mM EDTAを含有する溶液15μlを添加し、この混合物を、55℃で、更に20分間インキュベーションし、ウイルスDNAを放出させた。ウイルスDNAを、ミニDNeasy(登録商標)キット(Qiagen社、バレンシア、CA)によりクリーニングし、且つ水40μlにより溶離した。ウイルスゲノムコピー(GC)は、定量的PCRを用いて決定した。

## 【0266】

ウイルスストックを、PBSにより、望ましいGC/mlまで希釈した。ウイルス試験溶液(200μl)を、尾静脈注射によりマウスへ送達した。

## 【0267】

20

(肝細胞癌(HCC)アッセイ) 肝臓標本を、AAV注射後24週目のdb/dbマウスから採取した。HCCスコアを、変種-注射したマウス由来の全肝臓の表面上のHCC結節の数を、野生型FGF19-注射したマウス由来のHCC結節の数で除算し、記録した。

## 【0268】

(血清FGF19/FGF21/変種曝露レベルアッセイ) マウス尾断片由来の全血液(約50μl/マウス)を、平面のキャピラリーチューブ(BD Clay Adams SurePrep(商標)、Becton Dickinson社、スパークス、MD)に収集した。チューブをAutocrit(商標) Ultra 3(Becton Dickinson社、スパークス、MD)において回転することにより、血清及び血液細胞を分離した。血清中のFGF19、FGF21、及び変種の曝露レベルを、EIAキット(Biovendor社)を製造業者の指示に従い用い、決定した。

## 【0269】

30

(FGFR4結合及び活性アッセイ) 固相ELISA(結合)アッセイ及びERKリン酸化アッセイを、精製された組換えタンパク質を用いて行った。FGFR結合アッセイは、固相ELISAを用いて行った。簡単に述べると、96ウェルプレートを、2μg/ml抗-hFc抗体によりコーティングすることができる、且つ1μg/ml FGFR1-hFc又はFGFR4-hFcと一緒にインキュベーションすることができる。1μg/ml可溶性IgG-クロト及び20μg/mlヘパリンの存在下でのFGF19変種への結合を、ビオチニル化された抗-FGF19抗体(0.2μg/mL)、引き続きストレプトアビジン-HRPインキュベーション(100ng/mL)により検出することができる。FGFR4活性化アッセイに関して、Hep3B細胞を、FGF19変種により、37℃で10分間刺激し、その後直ちに溶解し、且つCis-Bio社から市販されているキットを用い、ERKリン酸化についてアッセイすることができる。

40

## 【0270】

## (実施例2)

本明細書において示したもののようなFGF19変種が、cyp7a1発現を抑制することを確認するために、野生型FGF19によるcyp7a1発現の阻害を、様々な濃度で投与後に決定した。FGF21の作用を、同様の方法で評価した。

## 【0271】

簡単に述べると、0時点で、db/dbマウスに、組み換えFGF19(0.1mg/kg；1mg/kg；10mg/kg)又は組み換えFGF21(0.1mg/kg；1mg/kg；10mg/kg)のいずれかを、腹腔内投与した。投薬の5時間後、肝臓を摘出し、RNAを抽出し、且つcyp7a1発現を、基準化対照としてGADPHを使用する、リアルタイムPCR(QPCR)により決定した。各マウス群において、n=3、及び様

50

々なFGF19及びFGF21濃度に関するcyp7a1発現値を、PBSビヒクル対照が投薬されたマウスと比較した。

**【0272】**

図1に説明したように、FGF19は、濃度-依存様式で、cyp7a1発現を劇的に減少させた。FGF21投与は、cyp7a1発現の減少を引き起こしたにもかかわらず、この作用は、FGF19について認められる作用よりも明らかに少なかった。

**【0273】**

ヒト初代肝細胞におけるcyp7a1発現に対する変種M70の作用を、FGF19の作用に対するものと比較した。図2に記したように、変種M70は、cyp7a1発現をFGF19のそれと同等量で抑制した。

10

**【0274】**

(実施例3)

前述のアッセイを使用し、初代ヒト肝細胞におけるcyp7a1の抑制を、数多くのFGF19変種について決定した。図3～図5に示したように、いくつかの変種(例えば、M1、M2など)は、強力なcyp7a1抑制を示した。

**【0275】**

Cyp7a1抑制に関するいくつかの追加のFGF19変種の作用を評価するために、インビトロにおける細胞-ベースのアッセイ(初代ヒト肝細胞)及びインビボアッセイ(db/dbマウスにおけるタンパク質投薬)を利用し、ここでこれらの変種を、食塩水-処置対照と比較した。図5は、結果( $IC_{50}$ 及びCyp7a1(%))を表の形で示している。評価されたほとんどのFGF19変種は、Cyp7a1-阻害活性を示したが、数種の変種(例えば、M90、M96、M98、M5及びM32)は、最早Cyp7a1を抑制しなかった。

20

**【0276】**

Cyp7a1抑制活性を保持するFGF19変種は、先に説明したHCCアッセイ(又は他の関連アッセイ又はモデル)において、HCC誘導を引き起こすことなく、胆汁酸代謝の調整及び/又は胆汁酸-関連疾患(例えば、胆汁酸下痢及び原発性胆汁性肝硬変)の治療において有用であり得る変種を同定するために、更に評価することができる。図面は、HCCアッセイにおいて評価された変種に関するデータを説明している。

**【0277】**

(実施例4)

30

以下は、25種の追加の変種ペプチドの脂質上昇活性及び腫瘍形成について分析したデータのまとめである。このデータは、db/dbマウスにおけるHCC形成により決定されるように、脂質上昇と腫瘍形成の間の正の相関を明確に示している。

**【0278】**

これらの表は、様々な変種ペプチドをまとめている。そのような例証された変種ペプチドは、C-末端部分、例えば“TSG”アミノ酸残基の後に、FGF19 C-末端配列：

**【化78】**

PHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGL  
LQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPE  
EPEDLRGHLESMDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK (配列番号：188)

40

を有する。注目すべきは、統計学的に有意な脂質の上昇を引き起こさなかった変種ペプチド(M5を含む合計7種)は、HCC形成を誘導しなかった。対照的に、統計学的に有意な脂質の上昇を引き起こした全ての変種ペプチド(合計17種)は、マウスにおいてHCC形成をも引き起こした。このデータは、脂質上昇活性とHCC形成の間に強力な正の相関が存在することを示している。従って、脂質上昇活性は、動物におけるHCC形成の指標及び/又は予測因子として使用することができる。

**【0279】**

表1：db/dbマウスにおいて上昇したトリグリセリド及びコレステロールはHCC形成と正

50

相関するようにみえる(配列番号:99、5及び74-81参照)。

【表2】

	N-末端ドメイン	配列番号	コア	配列番号	脂質	HCC
					上昇	形成
FGF19	RPLAFSDAGPHVHYGWDPI	99 (aa 1-20)	RLRHLYTSG	185	+	+
FGF21	HPIPDSSPLLQ--FGGQV	100 (aa 1-16)	RQRHLYTDD	186	-	-
M5	R-HPIPDSSPLLQ--FGGQV	5 (aa 1-17)	RLRHLYTSG	185	-	-
M74	R -----DAGPHVHYGWDPI	74 (aa 1-15)	RLRHLYTSG	185	+	+
M75	R -----VHYGWDPI	75 (aa 1-10)	RLRHLYTSG	185	-	-
M76	R -----GDPI	76 (aa 1-5)	RLRHLYTSG	185	-	-
M77	R -----	77 (aa 1)	RLRHLYTSG	185	-	-
M78	R -----AGPHVHYGWDPI	78 (aa 1-14)	RLRHLYTSG	185	+	+
M79	R -----GPHVHYGWDPI	79 (aa 1-13)	RLRHLYTSG	185	+	+
M80	R -----PHVHYGWDPI	80 (aa 1-12)	RLRHLYTSG	185	-	-
M81	R -----HVHYGWDPI	81 (aa 1-11)	RLRHLYTSG	185	-	-

## 【0280】

表2: db/dbマウスにおいて上昇したトリグリセリド及びコレステロールはHCC形成と正相関するようにみえる(配列番号:99、100及び82-98参照)。

【表3】

	N-末端ドメイン	配列番号	コア	配列番号	脂質	HCC
					上昇	形成
FGF19	RPLAFSDAGPHVHYGWDPI	99 (aa 1-20)	RLRHLYTSG	185	+	+
FGF21	HPIPDSSPLLQ--FGGQV	100 (aa 1-16)	RQRHLYTDD	186	-	-
M82	RPLAFSAAGPHVHYGWDPI	82 (aa 1-20)	RLRHLYTSG	185	+	+
M83	RPLAFSDAAPHVHYGWDPI	83 (aa 1-20)	RLRHLYTSG	185	+/-	+/-
M84	RPLAFSDAGAHAVHYGWDPI	84 (aa 1-20)	RLRHLYTSG	185	+/-	+/-
M85	RPLAFSDAGPHVHYGAGDPI	85 (aa 1-20)	RLRHLYTSG	185	-	-
M86	RPLAFSDAGPHVHYGWPAPI	86 (aa 1-20)	RLRHLYTSG	185	+	+
M87	RPLAFSDAGPHVHYGWDPI	87 (aa 1-20)	RLRHLYTSG	185	+	+

## 【0281】

表3: db/dbマウスにおいて上昇したトリグリセリド及びコレステロールはHCC形成と正相関するようにみえる(配列番号:99、100及び88-98参照)

【表4】

N-末端ドメイン	コア	配列番号	脂質 上昇	HCC 形成
FGF19 RPLAFSDAGPHVHYGWDPI	RLRHLYTSG	99 (aa 1-29)	+	+
FGF21 HPIPDSSPLLQ--FGGQV	RQRHLYTDD	100 (aa 1-25)	-	-
H31A/S141A(M88)	FGF19		+	+
H31A/H142A(M89)	FGF19		+	+
K127A/R129A(M90)	FGF19		+	+
K127A/S141A(M91)	FGF19		+	+
K127A/H142A(M92)	FGF19		+	+
R129A/S141A(M93)	FGF19		+	+
S141A/H142A(M94)	FGF19		+	+
K127A/H142A(M95)	FGF19		+	+
K127A/R129A/S141A(M96)	FGF19		+	+
K127A/R129A/H142A(M97)	FGF19		+	+
K127A/R129A/S141A/H142A(M98)	FGF19		+	+

## 【0282】

M88 (H31A/S141A):

## 【化 7 9】

RPLAFSDAGPHVHYGWDPIRLRHLYTSGPAGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLIEIKAVALRT  
 VAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKN  
 RGFLPLAHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLES DMFSSPLETD SMDPFGLVTGLEAVRS PSFEK

(配列番号 :88)

## 【 0 2 8 3 】

M89 (H31A/H142A) :

## 【化 8 0】

10

RPLAFSDAGPHVHYGWDPIRLRHLYTSGPAGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLIEIKAVALRT  
 VAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKN  
 RGFLPLSAFLPMLPMVPEEPEDLRGHLES DMFSSPLETD SMDPFGLVTGLEAVRS PSFEK

(配列番号 :89)

## 【 0 2 8 4 】

M90 (K127A/R129A) :

## 【化 8 1】

20

RPLAFSDAGPHVHYGWDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLIEIKAVALRT  
 VAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLSSAAQAQLYKN  
 RGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLES DMFSSPLETD SMDPFGLVTGLEAVRS PSFEK

(配列番号 :90)

## 【 0 2 8 5 】

M91 (K127A/S141A) :

## 【化 8 2】

30

RPLAFSDAGPHVHYGWDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLIEIKAVALRT  
 VAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLSSAAQRQLYKN  
 RGFLPLAHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLES DMFSSPLETD SMDPFGLVTGLEAVRS PSFEK

(配列番号 :91)

## 【 0 2 8 6 】

M92 (K127A/H142A) :

## 【化 8 3】

40

RPLAFSDAGPHVHYGWDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLIEIKAVALRT  
 VAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLSSAAQRQLYKN  
 RGFLPLSAFLPMLPMVPEEPEDLRGHLES DMFSSPLETD SMDPFGLVTGLEAVRS PSFEK

(配列番号 :92)

## 【 0 2 8 7 】

M93 (R129A/S141A) :

## 【化 8 4】

RPLAFSDAGPHVHYGWDPIRLRHYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLIEIKAVALRT  
 VAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLSSAKQAQLYKN  
 RGFLPLAHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSDMPFGLVTGLEAVRSPSFEK

(配列番号 : 93)

## 【 0 2 8 8 】

M94 (S141A/H142A) :

10

## 【化 8 5】

RPLAFSDAGPHVHYGWDPIRLRHYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLIEIKAVALRT  
 VAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKN  
 RGFLPLAAFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSDMPFGLVTGLEAVRSPSFEK

(配列番号 : 94)

## 【 0 2 8 9 】

M95 (K127A/H142A) :

20

## 【化 8 6】

RPLAFSDAGPHVHYGWDPIRLRHYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLIEIKAVALRT  
 VAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLSSAAQRQLYKN  
 RGFLPLSAFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSDMPFGLVTGLEAVRSPSFEK

(配列番号 : 95)

## 【 0 2 9 0 】

M96 (K127A/R129A/S141A) :

30

## 【化 8 7】

RPLAFSDAGPHVHYGWDPIRLRHYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLIEIKAVALRT  
 VAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLSSAAQAQLYKN  
 RGFLPLAHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSDMPFGLVTGLEAVRSPSFEK

(配列番号 : 96)

## 【 0 2 9 1 】

M97 (K127A/R129A/H142A) :

40

## 【化 8 8】

RPLAFSDAGPHVHYGWDPIRLRHYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLIEIKAVALRT  
 VAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLSSAAQAQLYKN  
 RGFLPLSAFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSDMPFGLVTGLEAVRSPSFEK

(配列番号 : 97)

## 【 0 2 9 2 】

M98 (K127A/R129A/S141A/H142A) :

50

**【化 8 9】**

RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVALRT  
VAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAAQAOQLYKN  
RGFLPLAFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESMDMFSSPLETDSDMPFGLVTGLEAVRSPSFEK

(配列番号 : 98)

**【 0 2 9 3】**

(実施例5)

10

下記は、グルコース降下活性及び脂質上昇活性について分析した追加のFGF19変種ペプチドのデータのまとめである。

**【 0 2 9 4】**

表4は、M5からM40と称される、35種の追加のFGF19変種の該ペプチド「コア配列」を例示している。そのような例示された変種ペプチドは、C-末端部分に、例えばコア配列の "TSG" アミノ酸残基に続けて、下記FGF19 C-末端配列：

**【化 9 0】**

PHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGL  
LQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPE  
EPEDLRGHLESMDMFSSPLETDSDMPFGLVTGLEAVRSPSFEK (配列番号 : 188)

20

を有する。このデータは、変種M6、M7、M8、mM38及びM39は、db/dbマウスにおいて、グルコース降下活性の望ましい特徴を有するが、統計学的に有意な脂質上昇活性を有さないことを明確に示している。

**【 0 2 9 5】**

表4：追加の変種及びN-末端ドメインの詳細なマッピング(配列番号:99、100、及び5-40参照)

【表5】

	N-末端ドメイン	N-末端 ドメインの 配列番号	コア	配列 番号	グルコース 降下	脂質 上昇
FGF19	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPI	99 (aa 1-20)	RLRHLYTSG	185	+	+
FGF21	-HPIPDSPLLQ--FGGQV	100 (aa 1-16)	RQRHLYTDD	186	+	-
M5	RHIPIDSSPLLQ--FGGQV	5 (aa 1-17)	RLRHLYTSG	185	+	-
M6	R---DSSPLLQ--FGGQV	6 (aa 1-18)	RLRHLYTSG	185	+	-
M7	RPLAFSDSSPLLQ--FGGQV	7 (aa 1-18)	RLRHLYTSG	185	+	-
M8	R-HPIPDSPLLQ--WGDPPI	8 (aa 1-17)	RLRHLYTSG	185	+	-
M9	R-HPIPDSPLLQFGWGDPPI	9 (aa 1-19)	RLRHLYTSG	185	+	+
M10	R-HPIPDSPPHVHYGWGDPI	10 (aa 1-19)	RLRHLYTSG	185	-	+
M11	RPLAFSDAGPLLQ--WGDPPI	11 (aa 1-18)	RLRHLYTSG	185	N/D	N/D
M12	RPLAFSDAGPLLQFGWGDPPI	12 (aa 1-20)	RLRHLYTSG	185	-	+
M13	RPLAFSDAGPLLQ--FGGQV	13 (aa 1-18)	RLRHLYTSG	185	-	-
M14	R-HPIPDSPPHVHYG--GQV	14 (aa 1-17)	RLRHLYTSG	185	-	-
M15	RPLAFSDAGPHVHYG--GQV	15 (aa 1-18)	RLRHLYTSG	185	+	+
M16	RPLAFSDAGPHVH--WGDPPI	16 (aa 1-18)	RLRHLYTSG	185	N/D	N/D
M17	RPLAFSDAGPHV--GWGDPI	17 (aa 1-18)	RLRHLYTSG	185	N/D	N/D
M18	RPLAFSDAGPH--YGWGDPPI	18 (aa 1-18)	RLRHLYTSG	185	N/D	N/D
M19	RPLAFSDAGP-V-YGWGDPI	19 (aa 1-18)	RLRHLYTSG	185	N/D	N/D
M20	RPLAFSDAGP-VH-GWGDPI	20 (aa 1-18)	RLRHLYTSG	185	N/D	N/D
M21	RPLAFSDAGP-VHY-WGDPI	21 (aa 1-18)	RLRHLYTSG	185	N/D	N/D
M22	RPLAFSDAGPHVH-GWGDPI	22 (aa 1-18)	RLRHLYTSG	185	N/D	N/D
M23	RPLAFSDAGPH-H-GWGDPI	23 (aa 1-18)	RLRHLYTSG	185	N/D	N/D
M24	RPLAFSDAGPH-HY-WGDPI	24 (aa 1-18)	RLRHLYTSG	185	N/D	N/D
M25	RPLAFSDAGPHV-Y-WGDPI	25 (aa 1-18)	RLRHLYTSG	185	N/D	N/D
M26	RPLAFSDSSPLVH--WGDPPI	26 (aa 1-18)	RLRHLYTSG	185	N/D	N/D
M27	RPLAFSDSSPHVH--WGDPPI	27 (aa 1-18)	RLRHLYTSG	185	N/D	N/D
M28	RPLAFSDAPHV----WGDPPI	28 (aa 1-16)	RLRHLYTSG	185	N/D	N/D
M29	RPLAFSDAGPHVHY-WGDPI	29 (aa 1-19)	RLRHLYTSG	185	N/D	N/D
M30	RPLAFSDAGPHVHYAWGDPI	30 (aa 1-20)	RLRHLYTSG	185	N/D	N/D
M31	R-HPIPDSPLLQ--FGAQV	31 (aa 1-17)	RLRHLYTSG	185	+/-	-
M32	R-HPIPDSPLLQ-- FGIYQV	32 (aa 1-18)	RLRHLYTSG	185	-	-
M33	R-HPIPDSPLLQ--FGGQV	33 (aa 1-17)	RLRHLYTSG	185	-	-
M34	R-HPIPDSPLLQ--FGGAV	34 (aa 1-17)	RLRHLYTSG	185	+/-	-
M35	R-HPIPDSPLLQ--FGGEV	35 (aa 1-17)	RLRHLYTSG	185	+/-	+/
M36	R-HPIPDSPLLQ--FGGQV	36 (aa 1-17)	RLRHLYTSG	185	+/-	-
M37	R-HPIPDSPLLQ--FGGUUA	37 (aa 1-17)	RLRHLYTSG	185	-	-
M38	R-HPIPDSPLLQ--FGGQT	38 (aa 1-17)	RLRHLYTSG	185	+	-
M39	R-HPIPDSPLLQ--FGGQT	39 (aa 1-17)	RLRHLYTSG	185	+	-
M40	R-HPIPDSPLLQFGWGQP	40 (aa 1-16)	RLRHLYTSG	185	-	+

表4a : (配列番号:99、100、5、9、8、12、10、13、15、14、43、6及び7参照)

【表6】

	N-末端ドメイン コア	配列番号	<u>グルコース</u> 降下	脂質 上昇	HCC 形成
FGF19	RPLAFSDAGPHVHYGWDPI RLRHLYTSG	99 (aa 1-29)	+	+	+
FGF21	HPIPDSSPLLQ--FGGQV RQRILYTDD	100 (aa 1-25)	+	-	-
M5	R-HPIPDSSPLLQ--FGGQV RLRHLYTSG	5 (aa 1-26)	+	-	-
M9	R-HPIPDSSPLLQFGWGDPI RLRHLYTSG	9 (aa 1-28)	+	+	+
M8	R-HPIPDSSPLLQ--WGDPPI RLRHLYTSG	8 (aa 1-26)	+	+	+
M12	RPLAFSDAGPLLQFGWGDPI RLRHLYTSG	12 (aa 1-29)	-	+	+
M10	R-HPIPDSSPHVHYGWDPI RLRHLYTSG	10 (aa 1-28)	-	+	+
M13	RPLAFSDAGPLLQ--FGGQV RLRHLYTSG	13 (aa 1-27)	-	+	+
M15	RPLAFSDAGPHVHYG--GQV RLRHLYTSG	15 (aa 1-27)	-	-	+/-
M14	R-HPIPDSSPHVHYG--GQV RLRHLYTSG	14 (aa 1-26)	-	-	+/-
M43	RPLAFSDAGPHVHYG-GD-I RLRHLYTSG	43 (aa 1-27)	+	-	+/-
M6	R-----DSSPLLQ--FGGQV RLRHLYTSG	6 (aa 1-22)	+	-	-
M7	RPLAFSDSSPLLQ--FGGQV RLRHLYTSG	7 (aa 1-27)	-	-	-

10

20

表4b：(配列番号:99、5及び31-40参照)

【表7】

	N-末端ドメイン コア	配列番号	<u>グルコース</u> 降下	脂質 上昇	HCC 形成
FGF19	RPLAFSDAGPHVHYGWDPI RLRHLYTSG	99 (aa 1-29)	+	+	+
FGF21	HPIPDSSPLLQ--FGGQV RQRILYTDD	100 (aa 1-25)	+	-	-
M5	R-HPIPDSSPLLQ--FGGQV RLRHLYTSG	5 (aa 1-26)	+	-	-
M31	R-HPIPDSSPLLQ--FGAQV RLRHLYTSG	31 (aa 1-26)	+	-	+
M32	R-HPIPDSSPLLQ--FGDQV RLRHLYTSG	32 (aa 1-26)	+	-	-
M33	R-HPIPDSSPLLQ--FGPQV RLRHLYTSG	33 (aa 1-26)	-	-	+
M34	R-HPIPDSSPLLQ--FGGAV RLRHLYTSG	34 (aa 1-26)	-	-	+
M35	R-HPIPDSSPLLQ--FGGEV RLRHLYTSG	35 (aa 1-26)	-	-	+
M36	R-HPIPDSSPLLQ--FGGNV RLRHLYTSG	36 (aa 1-26)	+	-	+/-
M37	R-HPIPDSSPLLQ--FGGQA RLRHLYTSG	37 (aa 1-26)	-	-	+
M38	R-HPIPDSSPLLQ--FGGQI RLRHLYTSG	38 (aa 1-26)	-	-	+
M39	R-HPIPDSSPLLQ--FGGQT RLRHLYTSG	39 (aa 1-26)	-	-	+
M40	R-HPIPDSSPLLQFGWGPV RLRHLYTSG	40 (aa 1-28)	-	+	+

30

40

表4c：(配列番号:99、100、5、52、54-68、4、69、70及び53参照)

【表8】

	N-末端ドメイン コア	配列番号	グルコース 降下	脂質 上昇	HCC 形成
FGF19	RPLAFSDAGPHVHYWGDP I RLRHLYTSG	99 (aa 1-29)	+	+	+
FGF21	HPIPDSSPLLQ--FGGQV RQRHLYTDD	100 (aa 1-25)	+	-	-
M5	R-HPIPDSSPLLQ--FGGQV RLRHLYTSG	5 (aa 1-26)	+	-	-
M52	R-----DSSPLLQ--WGDP I RLRHLYTSG	52 (aa 1-22)	+	+	-
M54	RPLAFSDAGPLLQ--WGDP I RLRHLYTSG	54 (aa 1-27)	-	+	+
M55	RPLAFSDAGPH--YGWGDPI RLRHLYTSG	55 (aa 1-27)	-	+	+
M56	RPLAFSDAGP-V-YGWGDPI RLRHLYTSG	56 (aa 1-27)	-	+	+
M57	RPLAFSDAGP-VT-GWGDPI RLRHLYTSG	57 (aa 1-27)	-	+	+
M58	RPLAFSDAGP-VHY-WGDP I RLRHLYTSG	58 (aa 1-27)	-	+	+
M59	RPLAFSDAGPH-H-GWGDPI RLRHLYTSG	59 (aa 1-27)	-	+	+
M60	RPLAFSDAGPH-HY-WGDP I RLRHLYTSG	60 (aa 1-27)	-	+	+
M61	RPLAFSDAGPHV--GWGDPI RLRHLYTSG	61 (aa 1-27)	-	+	+
M62	RPLAFSDAGPHV-Y-WGDP I RLRHLYTSG	62 (aa 1-27)	-	+	+
M63	RPLAFSDAGPHVH--WGDP I RLRHLYTSG	63 (aa 1-27)	+	+	+
M64	RPLAFSDSSPLVH--WGDF I RLRHLYTSG	64 (aa 1-27)	+	+	+
M65	RPLAFSDSSPHVH--WGDP I RLRHLYTSG	65 (aa 1-27)	-	+	+
M66	RPLAFSDAGPHLQ--WGDP I RLRHLYTSG	66 (aa 1-27)	+	+	+
M67	RPLAFSDAGPHV---WGDP I RLRHLYTSG	67 (aa 1-26)	-	-	+/-
M68	RPLAFSDAGPHVHY-WGDP I RLRHLYTSG	68 (aa 1-28)	-	+	-
M4	RPLAFSDAGPHVHYAWGDPI RLRHLYTSG	4 (aa 1-29)	+	+	+
M69	R-----DSSPLVHYWGDP I RLRHLYTSG	69 (aa 1-24)	+	+	-
M70	MR----DSSPLVHYWGDP I RLRHLYTSG	70 (aa 1-25)	+	+	-
M53	M-----DSSPLLQ--WGDP I RLRHLYTSG	192 (aa 1-22)	+	+	-

10

20

30

## 【0296】

表5は、追加の変種のペプチド配列を例示している。

表5：追加の変種(配列番号:41、42及び44-46)

## 【化91】

M41:

RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLIEKAVALRT  
 VAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLSAKQRQLYKN  
 RGFLPLSHFLPML**PEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS** (配列番号:41)

M42:

**HPIPDSPLLQFGGQV**RLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLIEKAVALRTVAIK  
 GVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLSAKQRQLYKNRGFL  
 PLSHFLPML**PEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS** (配列番号:42)

10

M44:

RPLAFSDAGPHVHYGWGDPI**RQRYLYTDDAQQTAEAHLEIREDTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVI**  
**QILGVKTSRFLCQRPDGALY GSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAP**  
**RGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS** (配列番号:44)

M45:

**HPIPDSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTAEAHLEIREDTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILG**  
**VKTSRFLCQRPDGALY GSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPA**  
**RFLPLPGLPPALPMVPEEPEDLRGHLES**DMFSSPLETDSDMPFGLVTGLEAVRSPSFEK (配列番号:45)

20

M46:

RPLAFSDAGPHVHYGWGDPI**RQRYLYTDDAQQTAEAHLEIREDTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVI**  
**QILGVKTSRFLCQRPDGALY GSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAP**  
**RGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS** PMVPEEPEDLRGHLES  
 DMFSSPLETDSDMPFGLVTGLEAVRSPSFEK (配列番号:46)

30

## 【0297】

表6は、M1、M2及びM69と称される、3種のFGF19変種のペプチド配列を例示している。このデータは、これらの3種の変種が、db/dbマウスにおいて、グルコース降下活性の望ましい特徴を有することを明確に示している。これら3種の変種は、db/dbマウスにおいて脂質を上昇させるように見える。

表6：追加の変種(配列番号:1、2及び69)

## 【化92】

**M1:**

RPLAFSDASPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKA  
 VALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSL  
 SSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSDMPFGLVTGLE  
 AVRSPSFEK (配列番号:1又は139)

**M2:**

10

RPLAFSDSSPLVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKA  
 ALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSL  
 SAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSDMPFGLVTGLEA  
 VRSPSFEK (配列番号:2又は140)

**M69:**

20

RDSSPLVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVALRT  
 VAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQ  
 RQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSDMPFGLVTGLEAVRSP  
 SFEK (配列番号:69)

## 【0298】

(実施例6)

下記は、FGF19は、食餌が誘導した肥満症マウス及びob/dbマウスにおいて体重を減少し、且つdb/dbマウスにおいて肝臓腫瘍形成活性及び体重を減少することを示すデータのまとめである。

## 【0299】

30

マウスに、AAVベクター中のFGF19又はFGF21を注射した。体重は、注射後4週間記録した。

表7：FGF19は、食餌が誘導した肥満症マウス及びob/dbマウスにおいて体重を減少する(各々、配列番号:99のaa 1-29及び配列番号:100のaa 1-25に相当する配列)

【表9】

	N-末端ドメイン	コア	<u>DIOマウスにおける</u>	<u>ob/dbマウスにおける</u>
			<u>体重減少</u>	<u>体重減少</u>
FGF19	RPLAFSDAGPHVHYGWGDP I RLRHLYTSG		+	+
FGF21	HPIPDGSPLLQ--FGGQW RQRLYYTDD		+	+

40

表8：FGF19、FGF21及び選択された変種のdb/dbマウスにおける体重と肝臓腫瘍形成の相関(例えば、配列番号:99、100、5、6、32、52及び69参照)

【表10】

	N-末端ドメイン ↓ コア	配列番号	肝臓 腫瘍 小結節	体重
FGF19	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPI RLRHLYTSG	99 (aa 1-29)	+	増加
FGF21	HPIPDSPLLQ--FGGQV RQRYLYTDD	100 (aa 1-25)	-	減少
M5	R-HPIPDSPLLQ--FGGQV RLRHLYTSG	5 (aa 1-26)	-	増加
M6	R-----DSSPLLQ--FGGQV RLRHLYTSG	6 (aa 1-22)	-	減少
M32	R-HPIPDSPLLQ--FGDQV RLRHLYTSG	32 (aa 1-26)	-	減少
M52	R-----DSSPLLQ--WGDPI RLRHLYTSG	52 (aa 1-22)	-	減少
M69	R-----DSSPLVHYGWGDPI RLRHLYTSG	69 (aa 1-24)	-	増加

## 【0300】

(実施例7)

下記は、変種M5ペプチド及び変種M69ペプチドは血液グルコースを低下させることを示す試験である。

## 【0301】

マウス(ob/ob)に、M5(0.1及び1mg/kg、s.c.)又はFGF19(1mg/kg、s.c.)、又は変種M69(0.1及び1mg/kg、s.c.)又はFGF19(1mg/kg、s.c.)を(皮下)注射した。血漿グルコースレベルを、注射後2、4、7、及び24時間に測定した。変種M5及び変種M69の結果は、野生型FGF19と類似したグルコース降下作用を示した(データは示さず)。

## 【0302】

(実施例8)

この実施例は、数種の変種ポリペプチド、並びにグルコース降下、脂質プロファイルパラメータ、及びHCC形成に関する該変種の作用を含む、それらの特定の特徴を示している。

## 【0303】

特に、表9は、変種M5(配列番号:5)、M6(配列番号:6)及びM50(配列番号:50)について作製されたデータを、対応するN-末端Arg(R)欠失を有する変種ポリペプチド(各々、M144、M145、及びM146と称する)について作成されたデータと比較している。各変種に関するいくつかの配列ドメインのみ、列記している:N-末端ドメイン、コア、及びシート-8/ループ-8/シート-9領域。

表9

10

20

30

## 【表11】

	N-末端ドメイン	コア	シート8/ ループ8/シート9 領域	グルコース 降下	体重減少	HDL 上昇	トリ グリセリド 上昇	HCC 形成
FGF19	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPI (配列番号:99のaa 1-20)	RLRHLYTSG (配列番号:99のaa 21-29)	//EEIRPDGYNVY// (配列番号:99のaa 102-112)	+	-	+	+	+
FGF21	HPIPDSPLLQ-FGGQV (配列番号:100のaa 1-20)	RQRHLYTDD (配列番号:100のaa 21-29)	//ELLLEDGYNVY// (配列番号:100のaa 97-107)	+	+	-	-	-
M5	R-HPIPDSPLLQ-FGGQV (配列番号:5のaa 1-17)	RLRHLYTSG (配列番号:5のaa 18-26)	//EEIRPDGYNVY// (配列番号:5のaa 99-109)	+	-	-	-	10
M6	R-----DSSPLLQ-FGGQV (配列番号:6のaa 1-14)	RLRHLYTSG (配列番号:6のaa 15-23)	//EEIRPDGYNVY// (配列番号:6のaa 95-105)	+	-	-	-	-
M50	R-HPIPDSPLLQ-FGDQV (配列番号:50のaa 1-17)	RLRHLYTSG (配列番号:50のaa 18-26)	//EEIRPDGYNVY// (配列番号:50のaa 99-109)	+	+	-	-	-
M144	-HPIPDSPLLQ-FGGQV (配列番号:5のaa 2-17)	RLRHLYTSG (配列番号:5のaa 18-26)	//EEIRPDGYNVY// (配列番号:5のaa 99-109)	+	-	-	-	-
M145	-----DSSPLLQ-FGGQV (配列番号:6のaa 2-14)	RLRHLYTSG (配列番号:6のaa 15-23)	//EEIRPDGYNVY// (配列番号:6のaa 95-105)	+	-	-	-	-
M146	-HPIPDSPLLQ-FGDQV (配列番号:50のaa 2-17)	RLRHLYTSG (配列番号:50のaa 18-26)	//EEIRPDGYNVY// (配列番号:50のaa 99-109)	+	+	-	-	20

## 【0304】

表9のデータが示すように、N-末端Arg(R)の欠失は、グルコース降下、体重減少、HDL及びトリグリセリド上昇、並びにHCC形成に有意な影響を及ぼさなかった。

## 【0305】

## (実施例9)

この実施例は、FGF19のループ8領域にアミノ酸置換を有する数種の変種ポリペプチドを、体重、いくつかの代謝パラメータ、及びHCC形成に関する該変種の作用と共に示している。

## 【0306】

表10のデータは、M3、M139、M140、M141及びM160と称される変種ポリペプチドに関連している。M3に関するアミノ酸配列は、本明細書別所に説明し、且つM139、M140、M141及びM160のアミノ酸配列は、以下である：

10

20

30

## 【化93】

RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKA  
 VALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLQYSEEDCAFEEEILPDGYNVYRSEKHRLPVSL  
 SSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSDMPFGLVTGLE  
 AVRSPSFEK (M139) (配列番号 :193);

RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKA  
 VALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLQYSEEDCAFEEEIREDGYNVYRSEKHRLPVSL  
 SSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSDMPFGLVTGLE  
 AVRSPSFEK (M140) (配列番号 :194);

RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKA  
 VALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLQYSEEDCAFEEEILCDGYNVYRSEKHRLPVSL  
 SSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSDMPFGLVTGLE  
 AVRSPSFEK (M141) (配列番号 :195); 及び

RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRQRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKA  
 VALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLQYSEEDCAFEEEILEDGYNVYRSEKHRLPVSL  
 SSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSDMPFGLVTGLE  
 AVRSPSFEK (M160) (配列番号 :196)

10

20

## 【0307】

前述の変種の各々に関する下記の配列ドメインのみ、表10に列記している：N-末端ドメイン、コア、及びシート-8/ループ-8/シート-9領域。ループ8領域を形成している特定のアミノ酸残基は、文献において普遍的に受け容れられてはいないが、FGF19残基127-129は、本明細書においてループ-8領域を構築するものとして規定されている。

表10

## 【表12】

	N-末端ドメイン	コア	グルコース 降下	体重減少	IDL 上昇	トリ グリセリド 上昇	HCC 形成
FGF19	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPI (配列番号:99 の aa 1-20 )	RRLHLYTSG (配列番号:99 の aa 21-29 )	//FEIRPDGYNVY// (配列番号:99 の aa 102-112 )	+	-	+	+
FGF21	HPIPDSPLLQ-FFGQV (配列番号:100 の aa 1-20 )	RQRHLYTDD (配列番号:100 の aa 21-29 )	//ELLLEDGYNVY// (配列番号:100 の aa 97-107 )	+	+	-	-
M3	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPI (配列番号:3 の aa 1-20)	RRLHLYTSG (配列番号:3 の aa 21-29 )	//EEILEDGYNVY// (配列番号:3 の aa 102-112 )	+	+	+	+
M139	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPI (配列番号:193 の aa 1-20 )	RRLHLYTSG (配列番号:193 の aa 21-29 )	//EEILPDGYNVY// (配列番号:193 の aa 102-112 )	+	-	+	+
M140	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPI (配列番号:194 の aa 1-20 )	RRLHLYTSG (配列番号:194 の aa 21-29 )	//EEIREDGYNVY// (配列番号:194 の aa 102-112 )	+	+	+	+
M141	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPI (配列番号:195 の aa 1-20 )	RRLHLYTSG (配列番号:195 の aa 21-29 )	//EEILCDGYNVY// (配列番号:195 の aa 102-112 )	+	-	+	+
M160	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPI (配列番号:196 の aa 1-20 )	RQRHLYTSG (配列番号:196 の aa 21-29 )	//EEILEDGYNVY// (配列番号:196 の aa 102-112 )	+	+	+	+

10

20

## 【0308】

表10を参照し、P128E置換は、HCC形成を有意に防止するために必要であるが、それ自身によりHCC形成を防止するためには不充分であるように見える。特に、HCC形成の防止における改善は、M140におけるP128E置換により認められる。反対に、R127L置換は、それ自身により、HCC形成を防止しない(M139参照)。M3との比較において指摘されるように、R127L及びP128E置換の組合せは、HCC形成を減少するが、HCC形成を排除しない。しかし驚くべきことに、R127L及びP128E置換の組合せは、FGF19コア領域内のLeu(L)のGln(Q)への置換を伴うと、HCC形成を有意に防止する(M160参照)。

30

## 【0309】

これらのデータは、FGF19ループ8領域は、HCC形成において役割を果たしていることを示している。ループ8領域の外側のアミノ酸残基(例えば、コア領域における置換)は、HCC形成の防止を増強することができる。

## 【0310】

M1 (配列番号:1)

## 【化94】

RPLAFSDASPHVHYGWGDPIRLHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLIEKA  
VALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSL  
SSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESMDMFSSPLETDSDMPFGLVTGLE  
AVRSPSFEK

40

## 【0311】

M2 (配列番号:2)

## 【化95】

RPLAFSDSSPLVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAV  
 ALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHLRVSL  
 SAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESMDMFSSPLETDSDMPFGLVTGLEA  
 VRSPSFEK

## 【0312】

M3 (配列番号:3)

## 【化96】

10

RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKA  
 VALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEILEDGYNVRSEKHLRVSL  
 SSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESMDMFSSPLETDSDMPFGLVTGLE  
 AVRSPSFEK

## 【0313】

M5 (配列番号:5)

## 【化97】

20

RHIPDSSPLLQFGGQVRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVALR  
 TVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHLRVSLSSAK  
 QRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESMDMFSSPLETDSDMPFGLVTGLEAVRS  
 PSFEK

## 【0314】

M5-R (配列番号:160)

## 【化98】

30

HIPDSSPLLQFGGQVRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVALRT  
 VAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHLRVSLSSAKQ  
 RQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESMDMFSSPLETDSDMPFGLVTGLEAVRSP  
 SFEK

## 【0315】

M48 (配列番号:48)

## 【化99】

40

RDSSPLLQFGGQVRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVALRTVAI  
 KGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHLRVSLSSAKQRQ  
 LYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESMDMFSSPLETDSDMPFGLVTGLEAVRSPSFE  
 K

## 【0316】

M49 (配列番号:49)

## 【化100】

RPLAFSDSSPLLQFGGVRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVAL  
 RTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLSA  
 KQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESMDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVR  
 SPSFEK

## 【0317】

M50 (配列番号:50)

## 【化101】

10

RHPIPDSPLLQFGDQVRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVALR  
 TVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEILEDGYNVYRSEKHRLPVSLSAK  
 QRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESMDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRS  
 PSFEK

## 【0318】

M51 (配列番号:51)

## 【化102】

20

RHPIPDSPLLQFGGNVRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVALR  
 TVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLSAK  
 QRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESMDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRS  
 PSFEK

## 【0319】

M52 (配列番号:52)

## 【化103】

30

RDSSPLLQWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVALRTVAI  
 KGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLSAKQRQ  
 LYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESMDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFE  
 K

## 【0320】

M53 (配列番号:192)

## 【化104】

40

MDSSPLLQWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVALRTVA  
 IKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLSAKQRQ  
 LYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESMDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFE  
 K

## 【0321】

M69 (配列番号:69)

## 【化105】

RDSSPLVHYGWDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLIEIKAVALRT  
 VAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHLRVLPSLSSAKQ  
 RQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSP  
 SFEK

## 【0322】

M70 (配列番号:70)

## 【化106】

10

MRDSSPLVHYGWDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLIEIKAVALR  
 TVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHLRVLPSLSSAK  
 QRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRS  
 PSFEK

## 【0323】

M71 (配列番号:71)

## 【化107】

20

HPIPDSPLLQFGGQVRQRYLTTDAQQTEAHLEIREDTVGGAADQSPESLLQLKALKPGV  
 IQILGVKTSRFLCQRPDGALY GSLHFDPEACSFRELLLEDGYN VYQSEAHSLPLHLPGNKSPH  
 RDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS

## 【0324】

M72 (配列番号:72)

## 【化108】

30

HPIPDSPLLQFGGQVRQRYLTTDAQQTEAHLEIREDTVGGAADQSPESLLQLKALKPGV  
 IQILGVKTSRFLCQRPDGALY GSLHFDPEACSFRELLLEDGYN VYQSEAHGLPLHLPGNKSPH  
 RDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS

## 【0325】

M73 (配列番号:73)

## 【化109】

HPIPDSPLLQFGGQVRQRYLTTDAQQTEAHLEIREDTVGGAADQSPESLLQLKALKPGV  
 IQILGVKTSRFLCQRPDGALY GSLHFDPEACSFRELLLEDGYN VYQSEAHGLPLHLPGNKSPH  
 RDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVQDELQVGEGCHMHPE  
 NCKTLLTDIDRTHTEKPVWDGITGE

40

## 【0326】

M75 (配列番号:75)

## 【化110】

RVHYGWDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLIEIKAVALRTVAIKG  
 VHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHLRVLPSLSSAKQRQLY  
 KNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK

## 【0327】

50

M76 (配列番号:76)

【化111】

RGDPRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVALRTVAIKGVHSVR  
YLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEERPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFL  
PLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSDMPFGLVTGLEAVRSPSFEK

【0328】

FGF19 (配列番号:99)

【化112】

10

RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKA  
VALRTVAIKGVHSVRYLGMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEERPDGYNVYRSEKHRLPVSL  
SSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSDMPFGLVTGLE  
AVRSPSFEK

【0329】

(実施例10)

この実施例は、ヒト患者におけるM70の投与は、胆汁酸合成のマーカーである7a-ヒドロキシ-4-コレステン-3-オン(C4)の抑制を生じることを示している。

20

【0330】

(試験対象)：年齢18～65歳の範囲で、正常体重(肥満度指数(BMI)20-35)を伴う健常な成人が、本試験に登録した。本試験プロトコールは、オーストラリアヒト臨床試験倫理委員会により承認され、且つ書面によるインフォームドコンセントを各対象から得た。本試験への組み入れに関して、各対象は、スクリーニング時の病歴、理学試験、12誘導心電図(ECG)、臨床検査所見、及びバイタルサインから、臨床的に有意な所見を伴わないことで決定される、良好な健康状態でなければならなかった。いずれか有意な代謝、アレルギー、皮膚、肝臓、腎臓、血液、肺、心臓血管系、GI、神経、又は精神の障害の病歴又は臨床症状発現を伴う対象は、登録から除外した。

【0331】

30

試験デザイン：本試験は、無作為化二重盲検プラセボ-対照デザインであった。対象の予備スクリーニングは、登録の7～30日前に行い、ベースライン評価は、処置前に行った。各対象は、M70の投与量3mg/日の皮下注射を、単回ボーラス投与で、7日間、毎日受け取った。血液試料を、留置カテーテルを通して、ヘパリン処置チューブに採取した。1日目及び7日目のM70又はプラセボの投与後4.5時間又は24時間後に採取した血液試料を、分析した。7a-ヒドロキシ-4-コレステン-3-オン(C4)の血清レベルを用い、CYP7A1酵素活性(胆汁酸合成)をモニタリングした。これらは、既報のように(Galmanらの文献、(2003) J Lipid Res. 2003;44(4):859-66)、試料抽出後、それに続く高圧液体クラマトグラフィー(HPLC)により、個人の血清試料から分析した。

【0332】

40

結果：図6に提示したデータは、1日目及び7日目に、投与後4.5時間及び24時間の両方で、該患者のC4の血清レベルは、プラセボを受け取った患者と比べ、有意に抑制されたことを示している。

【0333】

(実施例11)

本実施例は、ラット筋芽細胞細胞株における、FGF19、M3、及びM70による、マウスFGFR4- -クロトシグナル伝達の活性化を示している。

【0334】

(方法)：ELK1ルシフェラーゼアッセイを、マウスFGFR4、b-クロト、及びELK1に融合された5×UASルシフェラーゼ及びGAL4-DNA-結合ドメイン(DBD)を含むレポーター構築体によ

50

り、一過性にトランスフェクションされたL6細胞において行った。このシステムにおいて、ルシフェラーゼ活性は、内在性リン酸化された細胞外シグナル-調節キナーゼ(ERK)により調節される。細胞は、リガンドと共に、6時間インキュベーションし、その後ルシフェラーゼ活性測定のために溶解した。

**【0335】**

細胞-ベースの受容体活性化アッセイを使用し、マウスFGFR4の $\alpha$ -クロト存在下でのリガンド-依存型シグナル伝達を媒介する能力を評価した。この目的のために、これらのタンパク質の内在性発現を欠いているラットL6筋芽細胞細胞株を、マウス由来のFGFR4及び $\beta$ -クロトをコードしているDNA、及びEIk1-依存型キメラ転写因子-ベースのレポーターシステムを含むプラスミドによりトランスフェクションした。

10

**【0336】**

トランスフェクション後、リガンド-依存型ルシフェラーゼ発現の濃度反応を、ルシフェリン基質の存在下で、全細胞溶解液において分析した。

**【0337】**

(結果) : L6細胞におけるFGFR4及び $\beta$ -クロトの同時発現は、M3、M70の両方及びFGF19において、細胞内シグナル伝達経路の活性化を増強することが認められた(各々、EC<sub>50</sub> = 20、38及び53pM)(表11及び図7参照)。

表11 : L6細胞におけるマウスFGFR4/ $\beta$ -クロト複合体の同時発現は、FGF19、M3及びM70による細胞内シグナル伝達経路の活性化を増強する。

**【表13】**

20

リガンド	FGFR4 / $\beta$ -クロト	
	EC <sub>50</sub> (pM)	E <sub>max</sub> (増強倍率)
FGF19	52.5 ± 0.01	1.82 ± 0.09
M3	19.8 ± 0.04	1.68 ± 0.04
M70	38.3 ± 0.12	1.85 ± 0.14

EC<sub>50</sub> = 最大有効濃度の半量 ; E<sub>max</sub> = 最大有効性。データは、平均 ± SDで表す。

**【0338】**

これらのデータは、FGFR4- $\beta$ -クロト共受容体とコグネットリガンドの間の三者複合体の形成は、細胞内シグナル伝達の強力な活性化にとって重要であることを示唆している。

30

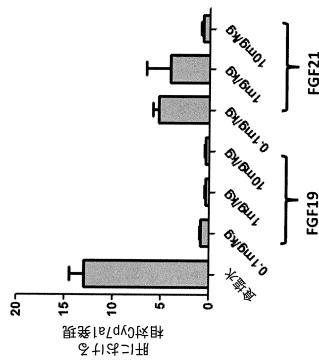
**【0339】**

(配列表)

本明細書は、配列表のコンピュータで読み取り可能な形(CRF)のコピーと共に提出されている。2013年12月26日に作製され、且つサイズが241,577バイトである、CRF表題13370-007\_SEQLIST.txtは、本配列表の紙面上のコピーと同一であり、且つその全体が引用により本明細書中に組み込まれている。

【図1】

図1



【図2 A - D】

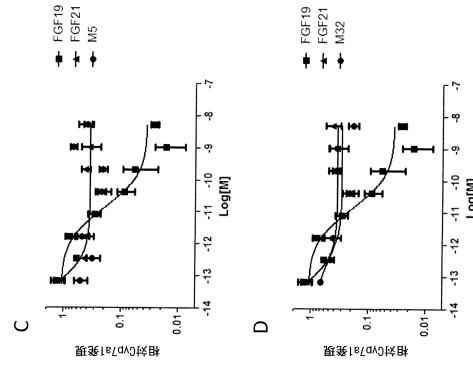


図2A-2D

【図3 A - D】

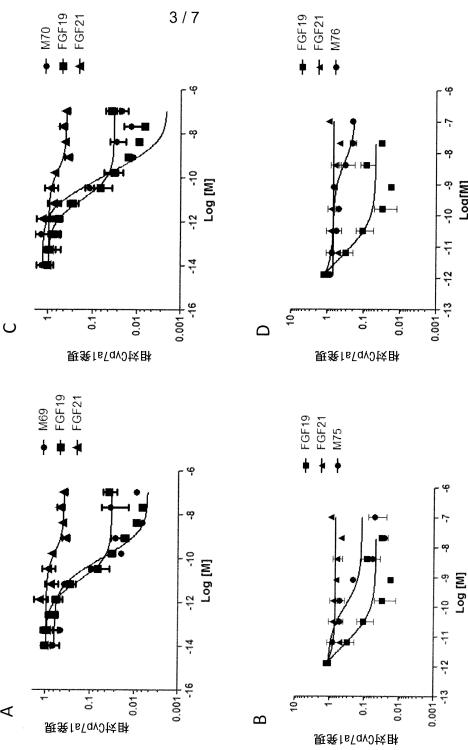


図3A-3D

【図4 A - D】

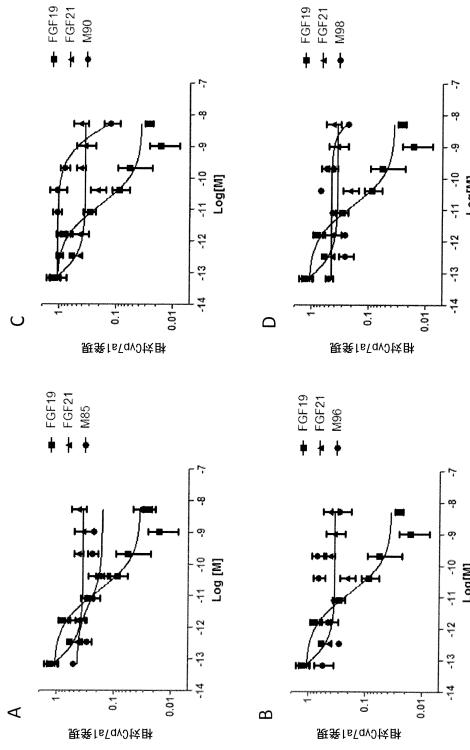


図4A-4D

【図5】

変種	Cyp7a1 IC50 (pM)	相対 Cyp7a1 発現	HCC スコア
食塩水処理	n/a	100%	0.00
FGF19	2.3	4%	1.00
FGF21	n/a	35%	0.00
M1	1.1	10%	0.04
M2	0.9	2%	0.06
M5	n/a	100%	0.00
M32	n/a	100%	0.00
M69	8.6	0.5%	0.00
M70	4.8	0.2%	0.00
M75	34	12%	0.00
M76	n/a	17%	0.00
M85	3.6	16%	0.00
M90	859	100%	1.00
M96	n/a	100%	1.00
M98	n/a	100%	1.00

図5

【図6】

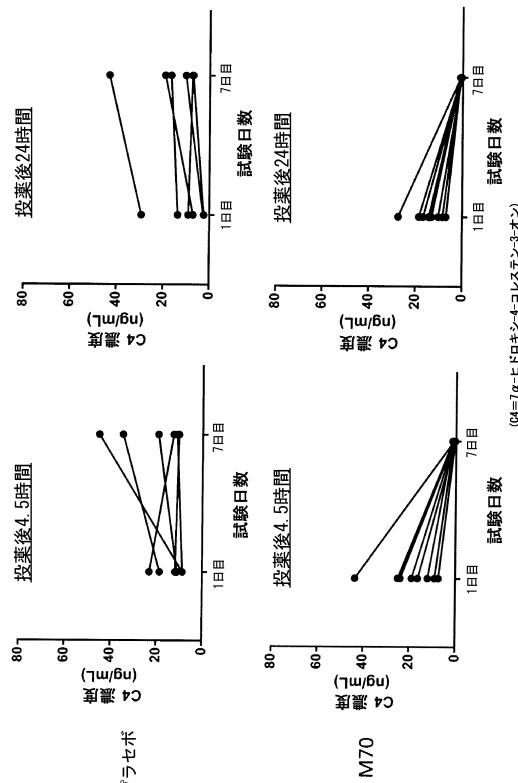


図6

【図7】

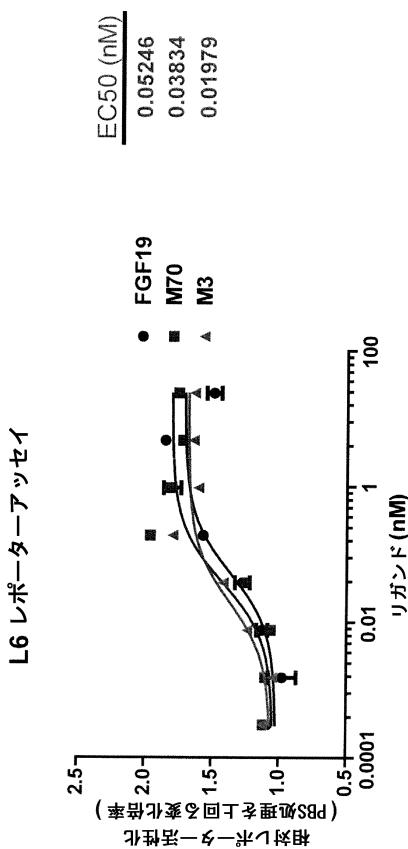


図7

【配列表】

0006403685000001.app

---

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 61/887,129

(32)優先日 平成25年10月4日(2013.10.4)

(33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 ジアン ルオ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94796 アルバニ ベンチュラ アベニュー 992

審査官 小森 潔

(56)参考文献 米国特許出願公開第2011/0104152(US, A1)

特表2012-530493(JP, A)

PLoS One, 2011年, Vol. 6, No. 3, e17868, p1-11

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2010年, Vol. 107, No. 32, p14158-14163

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 38/18

JST Plus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)

Cplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)