

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-513626

(P2022-513626A)

(43)公表日 令和4年2月9日(2022.2.9)

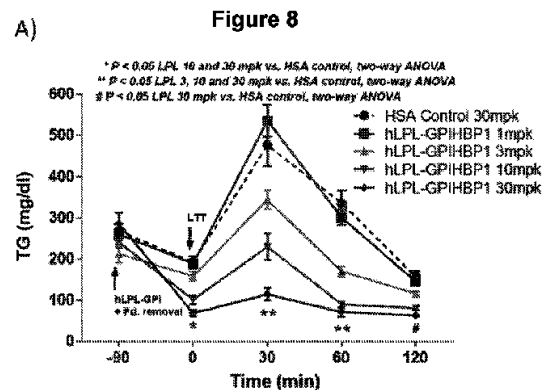
(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	Z 4 B 0 5 0
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	Z N A 4 B 0 6 4
C 1 2 N 9/18 (2006.01)	C 1 2 N 9/18	4 B 0 6 5
C 0 7 K 14/46 (2006.01)	C 0 7 K 14/46	4 C 0 7 6
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	4 C 0 8 4
審査請求 未請求	予備審査請求 未請求	(全66頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2021-529265(P2021-529265)	(71)出願人	504389991
(86)(22)出願日	令和1年11月25日(2019.11.25)		ノバルティス アーゲー
(85)翻訳文提出日	令和3年7月21日(2021.7.21)		スイス国 バーゼル リヒトシュトラッセ
(86)国際出願番号	PCT/IB2019/060140		3 5
(87)国際公開番号	WO2020/109978	(74)代理人	100092783
(87)国際公開日	令和2年6月4日(2020.6.4)		弁理士 小林 浩
(31)優先権主張番号	62/771,359	(74)代理人	100095360
(32)優先日	平成30年11月26日(2018.11.26)		弁理士 片山 英二
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100120134
	米国(US)		弁理士 大森 規雄
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA, RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR, GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く	(74)代理人	100135943
			弁理士 三橋 規樹
		(74)代理人	100104282
			弁理士 鈴木 康仁
		(72)発明者	ガオ, ジアビン
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 L P L - G P I H B P 1 融合ポリペプチド

(57)【要約】

本開示は、リポタンパク質リパーゼ（L P L）及びグリコシルホスファチジルイノシトールアンカー型高密度リポタンパク質結合タンパク質1（G P I H B P 1）を含む融合ポリペプチドに関する。また本開示は、家族性カイロミクロン血症症候群（F C S）などの疾患の処置におけるこのような融合ポリペプチドの使用にも関する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(i) リポタンパク質リパーゼ (L P L) ポリペプチド、又はその機能性変異体と、
 (i i) グリコシルホスファチジルイノシトールアンカー型高密度リポタンパク質結合タンパク質 1 (G P I H B P 1) ポリペプチド、又はその機能性変異体と
 を含む融合ポリペプチド。

【請求項 2】

1 つの式 (I) 又は (I I)

$A - B (n) - C - D (m) - E \quad (I)$

$A - D (m) - C - B (n) - E \quad (I I)$

(式中、

A = 任意選択的な N 末端配列

B = L P L ポリペプチド又はその機能性変異体

C = 任意選択的なリンカー配列

D = G P I H B P 1 ポリペプチド又はその機能性変異体

E = 任意選択的な C 末端配列であり、

n = 1 ~ 3 の整数、且つ

m = 1 ~ 3 の整数である)

を有する、請求項 1 に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 3】

n = 1 及び / 又は m = 1 である、請求項 1 又は 2 に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 4】

前記 L P L ポリペプチドの機能性変異体が、配列番号 1 又は配列番号 2 に対して少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、又は少なくとも約 99 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 5】

前記 L P L ポリペプチドの機能性変異体が、

(i) 配列番号 2 のアミノ酸のいずれかを付加、欠失、若しくは置換する 1 つ若しくは複数 (例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 若しくはそれ以上) の点突然変異を有する配列番号 2、又は

(i i) 配列番号 1 のアミノ酸 157 ~ 189 のいずれかを付加、欠失、若しくは置換する 1 つ若しくは複数 (例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 若しくはそれ以上) の点突然変異を有する配列番号 1

のアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 6】

前記 L P L ポリペプチドの機能性変異体が、

(i) 配列番号 1 若しくは配列番号 2 に対して少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、若しくは少なくとも約 99 % の配列同一性を有するアミノ酸配列；

(i i) 配列番号 2 のアミノ酸のいずれかを付加、欠失、若しくは置換する 1 つ若しくは複数 (例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 若しくはそれ以上) の点突然変異を有する配列番号 2；

(i i i) 配列番号 1 のアミノ酸 157 ~ 189 のいずれかを付加、欠失、若しくは置換する 1 つ若しくは複数 (例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 若しくはそれ以上) の点突然変異を有する配列番号 1；

(i v) 配列番号 1；又は

(v) 配列番号 2

の切断型である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 7】

10

20

30

40

50

前記 L P L ポリペプチドが配列番号 1、2、3、4、又は 45 のいずれか 1 つを含むか、又はからなる、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 8】

前記 G P I H B P 1 ポリペプチドの機能性変異体が、配列番号 5、配列番号 6 又は配列番号 7 の G P I H B P 1 ポリペプチドに対して少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 % 又は少なくとも約 99 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 9】

前記 G P I H B P 1 ポリペプチドの機能性変異体が、配列番号 7 のアミノ酸のいずれかを付加、欠失、又は置換する 1 つ又は複数（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 又はそれ以上）の点突然変異を有する配列番号 7 のアミノ酸配列を含む、請求項 1～8 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

10

【請求項 10】

前記 G P I H B P 1 ポリペプチドの機能性変異体が、

(i) 配列番号 5 の G P I H B P 1 ポリペプチドに対して少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 % 若しくは少なくとも約 99 % の配列同一性を有するアミノ酸配列；又は

(ii) 配列番号 5

の切断型である、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

20

【請求項 11】

前記 G P I H B P 1 ポリペプチドが、配列番号 5、6、7、8、9 又は 10 のいずれか 1 つを含むか、又はからなる、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 12】

前記 L P L ポリペプチド及び G P I H B P 1 ポリペプチドがリンカー C によって結合される、請求項 1～11 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 13】

前記リンカーが、配列番号 11～27 のいずれか 1 つに記載されるアミノ酸配列の 1 つ又は複数を含むか、又はからなる、請求項 12 に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 14】

前記リンカーが、配列番号 16 又は配列番号 17 に記載されるアミノ酸配列の 1 つ又は複数を含むか、又はからなる、請求項 13 に記載の融合ポリペプチド。

30

【請求項 15】

前記融合ポリペプチドが N 末端配列 A を含む、請求項 1～14 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 16】

前記融合ポリペプチドが C 末端配列 E を含む、請求項 1～15 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 17】

前記 N 末端又は C 末端配列が、H i s タグ、F L A G タグ、A r g タグ、T 7 タグ、S t r e p タグ、S タグ、A v i T a g TM 及びアプタマータグからなる群から選択される 1 つ又は複数のタグを含む、請求項 15 又は 16 に記載の融合ポリペプチド。

40

【請求項 18】

前記 N 末端又は C 末端配列が、

(i) H i s タグ及び A v i T a g TM、又は

(ii) F L A G タグ、H i s タグ及び A v i T a g TM

を含む、請求項 17 に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 19】

前記 N 末端又は C 末端配列が、配列番号 31 又は配列番号 32 に記載されるアミノ酸配列を含むか、又はからなる、請求項 15 又は 16 に記載の融合ポリペプチド。

50

【請求項 20】

前記 N 末端又は C 末端配列が、インビボで前記融合ポリペプチドの半減期を増大させる部分を含み、且つ前記 N 末端又は C 末端配列が、PEG 配列、PAS 配列、又は Fab 若しくは ScFv 分子から任意選択的に選択される抗体配列を含む、請求項 1～19 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 21】

前記抗体が CA645 である、請求項 20 に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 22】

配列番号 33～40、46～48、51、53、54、又は 55 のいずれかのアミノ酸配列を含むか、又はからなる、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 23】

請求項 1～22 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチドをコードする単離核酸配列。

【請求項 24】

請求項 23 に記載の核酸を含むベクター。

【請求項 25】

請求項 23 に記載の核酸又は請求項 24 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 26】

請求項 1～22 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチドを作製するための方法であって、核酸の発現に適した条件下で請求項 25 に記載の宿主細胞を維持し、それにより核酸を発現させ、融合ポリペプチドを産生させることと、任意選択的に、前記融合ポリペプチドを単離及び／又は精製することを含む方法。

【請求項 27】

請求項 1～22 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド、請求項 23 に記載の核酸、請求項 24 に記載のベクター、又は請求項 25 に記載の宿主細胞と、薬学的又は生理学的に許容される希釈剤及び／又は担体とを含む医薬組成物。

【請求項 28】

疾患若しくは障害の治療において使用するため、又は処置のための薬剤として使用するための、請求項 1～22 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド、請求項 23 に記載の核酸、請求項 24 に記載のベクター、請求項 25 に記載の宿主細胞、又は請求項 27 に記載の医薬組成物。

【請求項 29】

前記疾患又は障害が、カイロミクロン血症（家族性カイロミクロン血症症候群、多遺伝子性遅発型カイロミクロン血症及び早発型カイロミクロン血症を含む）、高脂血症性脾炎、高トリグリセリド血症、腹痛、再発性急性脾炎、発疹性皮膚黄色腫、網膜脂血症、肝脾腫、糖尿病、肥満症、心血管疾患、慢性腎疾患、非アルコール性脂肪性肝疾患、高トリグリセリド血症性脾炎、脂肪肝、メタボリック症候群、虚血性心疾患、及び微小血管病変から選択される、請求項 28 に記載の使用のための融合ポリペプチド、核酸、ベクター、宿主細胞又は医薬組成物。

【請求項 30】

疾患又は障害を患っている患者を処置する方法であって、請求項 1～22 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド、請求項 23 に記載の核酸、請求項 24 に記載のベクター、請求項 25 に記載の宿主細胞、又は請求項 27 に記載の医薬組成物を治療的に有効な量で前記患者に投与することを含む方法。

【請求項 31】

前記疾患又は障害が、カイロミクロン血症（家族性カイロミクロン血症症候群、多遺伝子性遅発型カイロミクロン血症及び早発型カイロミクロン血症を含む）、高脂血症性脾炎、高トリグリセリド血症、腹痛、再発性急性脾炎、発疹性皮膚黄色腫、網膜脂血症、肝脾腫、糖尿病、肥満症、心血管疾患、慢性腎疾患、非アルコール性脂肪性肝疾患、高トリグリセリド血症性脾炎、脂肪肝、メタボリック症候群、虚血性心疾患、及び微小血管病変から選択される、請求項 30 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、リポタンパク質リパーゼ（LPL）及びグリコシルホスファチジルイノシトールアンカー型高密度リポタンパク質結合タンパク質1（GPIHBP1）を含む融合ポリペプチドに関する。また本開示は、家族性カイロミクロン血症症候群（FCS）などの疾患の処置におけるこのような融合ポリペプチドの使用にも関する。

【背景技術】

【0002】

家族性カイロミクロン血症症候群（FCS）は、リポタンパク質リパーゼ（LPL）欠損症によって引き起こされる稀な遺伝性障害であり、異常に高いレベルの血漿トリグリセリド（TG）を特徴とする。FCS患者は、小児期発症の重篤な高トリグリセリド血症（ $>1,000\text{mg/dL}$ ）、腹痛のエピソード、再発性急性膵炎（AP）、発疹性皮膚黄色腫、網膜脂血症、及び肝脾腫を示す。APは、FCSの高頻度の重篤な症状である（Davidson et al., 2018, J. Clin. Lipidol, 12(4): 898-907. e2）。TGレベルが上昇するにつれて、APの危険性は徐々に高まる（Nawaz et al., 2015, Am J Gastroenterol 110: 1497-1503）。高脂血症性膵炎（HTAP）における死亡率は20~30%にも達し得る（Gubensek et al., 2014, PLoS One 9, e102748）。

【0003】

リポタンパク質リパーゼ（LPL）は、リパーゼ遺伝子ファミリーのメンバーである。LPLは、主に脂肪細胞、骨格筋細胞、及び心筋細胞によって分泌されるトリグリセリドリパーゼである。LPLのフォールディングは、シャペロンリパーゼ成熟因子1（LMF1）によって媒介される。LPLは内皮下腔内に分泌され、次にグリコシルホスファチジルイノシトールHDL結合タンパク質1（GPIHBP1）によって毛細血管の内腔に移行される。移行後、LPLは、ヘパラン硫酸化プロテオグリカン又はGPIHBP1によって内皮細胞に係留される。係留されたLPLは、超低密度リポタンパク質（VLDL）及びカイロミクロン（CM）内に保有されるトリグリセリド（TG）の加水分解を触媒する（Savonen et al., 2015, J Lipid Res 56: 588-598; Goulbourne et al., 2014, Cell Metab 18: 389-396）。LPLにより遊離される遊離脂肪酸は心臓及び筋肉組織によってエネルギー源として使用されるか、或いは脂肪組織によってTGの形態で貯蔵される。LPLは厳密に調節される酵素であり、アゴニスト（Apoc2）によって刺激され、アンタゴニスト（ANGPTL3、ANGPTL4、ANGPTL8）によって阻害される（He et al., 2018, Clin Chim Acta 480: 126-137）。LPL、GPIHBP1、LMF1における機能喪失型突然変異はLPL欠損症をもたらし、これは、血液中にTGに富んだCMの蓄積を引き起こす。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

高脂血症性膵炎（HTAP）の臨床経過を改善するために、認可された具体的な薬理学的介入は実証されていない。HTAPの処置のためにTGを 1000mg/dL 未満まで急激に低下させるための治療選択肢は、患者を、支持療法と組み合わせた非経口的低カロリー栄養法に切り替えることに限られる。装置を利用できる場合は、プラスマフェレーシスを使用することができる（Chaudhry et al., 2018, Expert Rev Clin Pharmacol 11: 589-598; Gaudet et al., 2013, J Med Econ 16: 657-666; Valaiyapathi and Ashraf, 2017, Curr. Pediatr. Rev. 13(4): 225-231）が、これは非常にコストがかかる。HTAPは予防も達成するの

10

20

30

40

50

が困難である。FCS患者は、腹痛及びHTAPの発作を回避するために血漿TGを1000mg/dL未満に維持するための選択肢がほとんどない。このような患者は、その全人生にわたって、その食事脂肪を1日当たり20g未満又は全エネルギー摂取の15%に制限しなければならない。FCS患者の八十パーセント(80%)は、このアドヒアランスを「非常に困難」と評価する(Stroes et al., 2017, Atheroscler Suppl 23:1-7)。

【課題を解決するための手段】

【0005】

我々は、驚くことに、グリコシルホスファチジルイノシトールアンカー型高密度リポタンパク質結合タンパク質1(GPIHBP1)との融合ポリペプチドとして発現されたときに、リポタンパク質リパーゼ(LPL)が高い比活性を維持し、凝集せず、PBS中で安定であり、且つANGPTL4による活性化に対して抵抗性であることを見出した。

10

【0006】

したがって、一態様において、本開示は、(i)リポタンパク質リパーゼ(LPL)ポリペプチド、又はその機能性変異体と、(ii)グリコシルホスファチジルイノシトールアンカー型高密度リポタンパク質結合タンパク質1(GPIHBP1)ポリペプチド、又はその機能性変異体とを含む融合ポリペプチドを提供する。GPIHBP1ポリペプチド(又はその機能性変異体)は、LPLポリペプチド(又はその機能性変異体)のC末端又はN末端に位置し得る。LPLポリペプチド(又はその機能性変異体)及びGPIHBP1ポリペプチド(又はその機能性変異体)は直接融合されてもよいし、或いはリンカーによって結合されてもよい。融合ポリペプチドは、例えば、精製を支援するため、発現を改善するため、又は半減期を増大させるために、N末端又はC末端アミノ酸配列をさらに含んでいてもよい。このようなN末端又はC末端アミノ酸配列はポリペプチドの発現に含まれるが、後で、例えば投与の前に除去され得る。

20

【0007】

一実施形態では、本開示は、N末端からC末端に向かって、式(I)又は(II)

$A-B(n)-C-D(m)-E$ (I)、又は

$A-D(m)-C-B(n)-E$ (II)

のうちの1つを有する融合ポリペプチドを提供し、上記式中、

A = 任意選択的なN末端配列

30

B = LPLポリペプチド又はその機能性変異体

C = 任意選択的なリンカー配列

D = GPIHBP1ポリペプチド又はその機能性変異体

E = 任意選択的なC末端配列であり、

n = 1~3の整数、且つ

m = 1~3の整数である。

【0008】

いくつかの実施形態において、n = 1である。いくつかの実施形態において、m = 1である。いくつかの実施形態において、n = 1及びm = 1である。特定の実施形態において、LPL及び／又はGPIHBP1ポリペプチドは、哺乳類配列又はその誘導体に基づく。具体的な実施形態では、LPL及び／又はGPIHBP1ポリペプチドは、ヒト配列又はその誘導体に基づく。

40

【0009】

いくつかの実施形態において、LPLポリペプチドの機能性変異体は、配列番号1又は配列番号2のLPLポリペプチドに対して少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、又は少なくとも約99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、LPLポリペプチドの機能性変異体は、配列番号1又は配列番号2のLPLポリペプチドに対して少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、又は少なくとも約99%の配

50

列同一性を有するアミノ酸配列からなる。いくつかの実施形態において、L P L ポリペプチドの機能性変異体は、(i) 配列番号 2 のアミノ酸のいずれかを付加、欠失、若しくは置換する 1 つ若しくは複数（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 若しくはそれ以上）の点突然変異を有する配列番号 2、又は (i i) 配列番号 1 のアミノ酸 157 ~ 189 のいずれかを付加、欠失、若しくは置換する 1 つ若しくは複数（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 若しくはそれ以上）の点突然変異を有する配列番号 1 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、L P L ポリペプチドの機能性変異体は、(i) 配列番号 2 のアミノ酸のいずれかを付加、欠失、若しくは置換する 1 つ若しくは複数（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 若しくはそれ以上）の点突然変異を有する配列番号 2、又は (i i) 配列番号 1 のアミノ酸 157 ~ 189 のいずれかを付加、欠失、若しくは置換する 1 つ若しくは複数（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 若しくはそれ以上）の点突然変異を有する配列番号 1 のアミノ酸配列からなる。

10

【0010】

特定の実施形態において、L P L ポリペプチドの機能性変異体は、配列番号 1 の切断型である。特定の実施形態において、L P L ポリペプチドの機能性変異体は、配列番号 2 の切断型である。いくつかの実施形態において、L P L ポリペプチドの機能性変異体は、(i) 配列番号 1 若しくは配列番号 2 に対して少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、若しくは少なくとも約 99 % の配列同一性を有するアミノ酸配列；(i i) 配列番号 2 のアミノ酸のいずれか 1 つを付加、欠失、若しくは置換する 1 つ若しくは複数（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 若しくはそれ以上）の点突然変異を有する配列番号 2；(i i i) 配列番号 1 のアミノ酸 157 ~ 189 のいずれか 1 つを付加、欠失、若しくは置換する 1 つ若しくは複数（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 若しくはそれ以上）の点突然変異を有する配列番号 1；(i v) 配列番号 1；又は (v) 配列番号 2 の切断型である。いくつかの実施形態において、L P L ポリペプチドの機能性変異体は、(i) 配列番号 1 若しくは配列番号 2 に対して少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、若しくは少なくとも約 99 % の配列同一性を有するアミノ酸配列；(i i) 配列番号 2 のアミノ酸のいずれか 1 つを付加、欠失、若しくは置換する 1 つ若しくは複数（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 若しくはそれ以上）の点突然変異を有する配列番号 2；(i i i) 配列番号 1 のアミノ酸 157 ~ 189 のいずれか 1 つを付加、欠失、若しくは置換する 1 つ若しくは複数（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 若しくはそれ以上）の点突然変異を有する配列番号 1；(i v) 配列番号 1；又は (v) 配列番号 2 の切断型であり、ここで、L P L ポリペプチドの切断型は、配列番号 1 のアミノ酸 36 ~ 335、35 ~ 340、34 ~ 345、33 ~ 350、32 ~ 355、31 ~ 360、30 ~ 365、29 ~ 370、28 ~ 375、28 ~ 380、28 ~ 385、28 ~ 390、28 ~ 395、28 ~ 400、28 ~ 405、28 ~ 410、28 ~ 415、28 ~ 420、28 ~ 425、28 ~ 430、28 ~ 435、28 ~ 440、28 ~ 445、28 ~ 450、28 ~ 455、28 ~ 460、28 ~ 465、又は 28 ~ 470 を含むか、又はからなるポリペプチドのアミノ酸配列に対応する。

20

30

40

【0011】

いくつかの実施形態において、L P L ポリペプチドの切断型は、配列番号 1 のアミノ酸 36 ~ 335、35 ~ 340、34 ~ 345、33 ~ 350、32 ~ 355、31 ~ 360、30 ~ 365、29 ~ 370、28 ~ 375、28 ~ 380、28 ~ 385、28 ~ 390、28 ~ 395、28 ~ 400、28 ~ 405、28 ~ 410、28 ~ 415、28 ~ 420、28 ~ 425、28 ~ 430、28 ~ 435、28 ~ 440、28 ~ 445、28 ~ 450、28 ~ 455、28 ~ 460、28 ~ 465、又は 28 ~ 470 を含むか、又はからなるポリペプチドのアミノ酸配列に対応する。その特定の実施形態において、配列番号 1 の切断型は、配列番号 1 の対応する領域に対して少なくとも約 80 %、少なく

50

とも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、又は少なくとも約 99%の配列同一性を有し；任意選択的に、配列番号 1 の切断型は、配列番号 1 のアミノ酸 157～189 のいずれか 1 つを付加、欠失、又は置換する 1 つ又は複数（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 又はそれ以上）の点突然変異を有する。

【0012】

いくつかの実施形態において、LPL ポリペプチドは、配列番号 1、2、3、4、又は 45 のいずれか 1 つを含むか、又はからなる。

【0013】

いくつかの実施形態において、GPIHBP1 ポリペプチドの機能性変異体は、配列番号 5、配列番号 6、又は配列番号 7 の GPIHBP1 ポリペプチドに対して少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、又は少なくとも約 99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、GPIHBP1 ポリペプチドの機能性変異体は、配列番号 5、配列番号 6、又は配列番号 7 の GPIHBP1 ポリペプチドに対して少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、又は少なくとも約 99%の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる。特定の実施形態において、GPIHBP1 ポリペプチドの機能性変異体は、配列番号 7 のアミノ酸のいずれか 1 つを付加、欠失、又は置換する 1 つ又は複数（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 又はそれ以上）の点突然変異を有する配列番号 7 のアミノ酸配列を含む。特定の実施形態において、GPIHBP1 ポリペプチドの機能性変異体は、配列番号 7 のアミノ酸のいずれか 1 つを付加、欠失、又は置換する 1 つ又は複数（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 又はそれ以上）の点突然変異を有する配列番号 7 のアミノ酸配列からなる。

【0014】

いくつかの実施形態において、GPIHBP1 ポリペプチドの機能性変異体は、(i) 配列番号 5 の GPIHBP1 ポリペプチドに対して少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、若しくは少なくとも約 99%の配列同一性を有するアミノ酸配列；又は(ii) 配列番号 5 の切断型である。いくつかの実施形態において、GPIHBP1 ポリペプチドの機能性変異体は、(i) 配列番号 5 の GPIHBP1 ポリペプチドに対して少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、若しくは少なくとも約 99%の配列同一性を有するアミノ酸配列；又は(ii) 配列番号 5 の切断型であり、ここで、GPIHBP1 ポリペプチドの切断型は、配列番号 5 のアミノ酸 62～149、61～150、60～151、55～152、50～153、45～154、40～155、35～156、30～157、25～158、又は 20～159 を含むか、又はからなるポリペプチドのアミノ酸配列に対応する。

【0015】

特定の実施形態において、GPIHBP1 ポリペプチドの切断型は、配列番号 5 のアミノ酸 62～149、61～150、60～151、55～152、50～153、45～154、40～155、35～156、30～157、25～158、又は 20～159 を含むか、又はからなるポリペプチドのアミノ酸配列に対応する。特定の実施形態において、配列番号 5 の切断型は、配列番号 5 の対応する領域に対して少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、又は少なくとも約 99%の配列同一性を有する。

【0016】

いくつかの実施形態において、GPIHBP1 ポリペプチドは、配列番号 5、6、7、8、9、又は 10 のいずれか 1 つを含むか、又はからなる。

【0017】

10

20

30

40

50

特定の実施形態において、L P L ポリペプチド及びG P I H B P 1 ポリペプチドは、リンカーによって結合される。特定の実施形態において、L P L ポリペプチド及びG P I H B P 1 ポリペプチドは、リンカーCによって結合される。いくつかの実施形態において、リンカーは、配列番号11～27のいずれ1つに記載されるアミノ酸配列を含むか、又はからなる。いくつかの実施形態において、リンカーは、配列番号16又は配列番号17に記載されるアミノ酸配列を含むか、又はからなる。いくつかの実施形態において、リンカーは、配列番号11～27のいずれか1つに記載されるアミノ酸配列の1つ又は複数を含むか、又はからなる。いくつかの実施形態において、リンカーは、配列番号16又は配列番号17に記載されるアミノ酸配列の1つ又は複数を含むか、又はからなる。

【0018】

いくつかの実施形態において、融合ポリペプチドはN末端配列を含む。いくつかの実施形態において、融合ポリペプチドは、N末端配列Aを含む。いくつかの実施形態において、融合ポリペプチドはC末端配列を含む。いくつかの実施形態において、融合ポリペプチドは、C末端配列Eを含む。特定の実施形態において、N末端又はC末端配列は、H i s タグ、F L A G タグ、A r g タグ、T 7 タグ、S t r e p タグ、S タグ、A v i T a g T M、及びアプタマータグからなる群から選択される1つ又は複数のタグを含む。いくつかの実施形態において、N末端又はC末端配列は、H i s タグ及びA v i T a g T Mを含む。いくつかの実施形態において、N末端又はC末端配列は、H i s タグ及びA v i T a g T Mからなる。いくつかの実施形態において、N末端又はC末端配列は、F L A G タグ、H i s タグ、及びA v i T a g T Mを含む。いくつかの実施形態において、N末端又はC末端配列は、F L A G タグ、H i s タグ、及びA v i T a g T Mからなる。特定の実施形態において、N末端又はC末端配列は、配列番号31又は配列番号32に記載されるアミノ酸配列を含むか、又はからなる。

【0019】

いくつかの実施形態において、N末端又はC末端配列は、インビボで融合ポリペプチドの半減期を増大させる部分を含む。特定の実施形態において、N末端又はC末端配列は、P E G 配列、P A S 配列、又は抗体配列を含む。いくつかの実施形態において、N末端又はC末端配列は、インビボで融合ポリペプチドの半減期を増大させる部分を含み、ここで、N末端又はC末端配列は、P E G 配列、P A S 配列、又はF a b 若しくはS c F v 分子から任意選択的に選択される抗体配列を含む。いくつかの実施形態において、抗体配列は、F a b 又はS c F v 分子である。いくつかの実施形態において、抗体、F a b、又はS c F v はアルブミンに結合する。特定の実施形態において、抗体はC A 6 4 5 である。

【0020】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される融合ポリペプチドは、配列番号33～40、46～48、51、53、54、又は55のいずれか1つのアミノ酸配列を含むか、又はからなる。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される融合ポリペプチドは、任意選択的にシグナルペプチドを伴わない表1のアミノ酸配列のいずれか1つを含むか、又はからなる。

【0021】

他の態様において、本開示は、本明細書に記載される融合ポリペプチドをコードする、D N A 及びR N A 分子を含む核酸分子（例えば、単離核酸分子）に関する。

【0022】

いくつかの実施形態において、核酸分子は、配列番号33～40、46～48、51、53、54、又は55のいずれか1つをコードする核酸との、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約97%、又は少なくとも約99%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、核酸分子は、表1のアミノ酸配列のいずれか1つをコードする核酸との、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約97%、又は少なくとも約99%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

【0023】

いくつかの実施形態において、核酸分子は、配列番号 44 との少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 97 % 又は少なくとも約 99 % の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

【0024】

いくつかの実施形態において、核酸分子は、配列番号 44 のヌクレオチド配列を含むか、又はからなる。

【0025】

また本開示の核酸分子を含むベクター、特に発現ベクターも開示される。

【0026】

また本開示は、本明細書に記載される融合ポリペプチドをコードする核酸及び／又はベクターを含む宿主細胞も提供する。

【0027】

また本開示は本明細書に記載される融合ポリペプチドを作製するための方法も提供し、本方法は、核酸の発現に適した条件下で本開示の宿主細胞を維持し、それにより組換え核酸を発現させ、融合ポリペプチドを産生させることを含む。本方法はさらに、融合ポリペプチドを単離及び／又は精製することを含み得る。

【0028】

また本開示は、本開示の融合ポリペプチド、核酸分子、ベクター又は宿主細胞を含み、さらに任意選択的に、薬学的又は生理学的に許容される希釈剤及び／又は担体を含む医薬組成物も提供する。また本開示は、本開示の融合ポリペプチド、核酸分子、ベクター、又は宿主細胞と、薬学的又は生理学的に許容される希釈剤及び／又は担体とを含む医薬組成物も提供する。

【0029】

また本開示は病態を患っている患者を処置する方法も提供し、本開示は、本開示の融合ポリペプチド、核酸分子、ベクター、宿主細胞、又は医薬組成物を、それを必要としている対象に投与することを含む。一実施形態では、対象は、カイロミクロン血症症候群を患っている可能性がある。

【0030】

また本開示は、本明細書に開示される病理学的障害、疾患、又は状態の (i) 治療において使用するための、及び／又は (ii) 処置のための薬剤の製造における、本開示に従う融合ポリペプチド、核酸分子、ベクター、宿主細胞、又は医薬組成物も提供する。いくつかの実施形態において、病理学的障害、疾患、又は状態を患っている患者を処置する方法が本明細書で提供され、本方法は、本明細書に記載される融合ポリペプチド、核酸、ベクター、宿主細胞、又は医薬組成物を治療的に有効な量で前記患者に投与することを含む。いくつかの実施形態において、病理学的障害、疾患、又は状態は、カイロミクロン血症（家族性カイロミクロン血症症候群、多遺伝子性遅発型カイロミクロン血症及び早発型カイロミクロン血症を含む）、高脂血症性膵炎、高トリグリセリド血症、腹痛、再発性急性膵炎、発疹性皮膚黄色腫、網膜脂血症、肝脾腫、糖尿病、肥満症、心血管疾患、慢性腎疾患、非アルコール性脂肪性肝疾患、高トリグリセリド血症性膵炎、脂肪肝、メタボリック症候群、虚血性心疾患、及び微小血管病変から選択され得る。一実施形態では、状態は、カイロミクロン血症症候群（例えば、家族性カイロミクロン血症症候群）であり得る。

【図面の簡単な説明】

【0031】

【図 1-1】図 1：種々の LPL 構築物の凝集レベル、収率、及びリパーゼ活性を示す一連のグラフである。図 1、パネル (A) 及び (C) は、LPL (A) がうまく発現されたが、凝集形態であった (C) ことを実証する。LPL を GPIHBP1 と同時発現させると (B)、凝集は観察されなかった (C)。LPL 及び GPIHBP1 の同時発現はより高い LPL 活性をもたらし (D)、また自発的不活性化に対しても LPL を保護した (E)。

【図 1-2】（上記の通り。）

10

20

30

40

50

【図 2-1】図 2：LPL-GPIHBP1 融合ポリペプチドの凝集レベル、活性、及び安定性を実証する一連のグラフである。図 1、パネル（A）及び（B）は、LPL-GPIHBP1 融合ポリペプチドが安定して発現され（A）、凝集がなかった（B）ことを実証する。LPL-GPIHBP1 融合ポリペプチドは同時発現された構築物と同等の活性を有し（C）、安定でもあった（D）。

【図 2-2】（上記の通り。）

【図 3-1】図 3：ANGPTL4 が LPL を融合ポリペプチドから移動させ得るかどうかを試験するためのアッセイの模式図及び結果を示す（A）。ANGPTL4 は、同時発現 LPL/GPIHBP1 複合体から LPL を移動させることができた（B）。融合ポリペプチド及び同時発現複合体の両方に対する ANGPTL4 の結合が実証される（C）。ANGPTL4 及び GPIHBP1 は両方とも、LPL/GPIHBP1 複合体を解離させることができる（D）。

10

【図 3-2】（上記の通り。）

【図 3-3】（上記の通り。）

【図 3-4】（上記の通り。）

【図 4】ANGPTL4（A）又は ANGPTL3（B）による不活性化に対する LPL/GPIHBP1 複合体又は LPL/GPIHBP1 融合ポリペプチドの抵抗性を実証する一連のグラフである。

【図 5-1】図 5：LPL/GPIHBP1 融合ポリペプチド（A）及び同時発現 LPL/GPIHBP1 複合体（B）の両方について、LPL の ANGPTL4 結合エピトープのマッピングを実証する一連のグラフィックスである。

20

【図 5-2】（上記の通り。）

【図 6】C57BL/6 マウスにおいて、皮下投与された LPL/GPIHBP1 融合ポリペプチドが TG レベルを低下させる能力を実証する一連のグラフである。

【図 7-1】図 7：DBA/2 マウスにおいて、静脈内に投与されたときに、LPL/GPIHBP1 融合ポリペプチドが TG レベルを低下させる能力を実証する一連のグラフである（A、B）。血漿遊離脂肪酸の増大は観察されなかった（C）。5 日間にわたる毎日の投与も、一貫して血漿 TG を低下させた（D、E）。

【図 7-2】（上記の通り。）

【図 7-3】（上記の通り。）

30

【図 8】皮下投与された DBA/2 マウスにおいて、LPL/GPIHBP1 融合ポリペプチドが TG レベルを低下させる能力を実証する一連のグラフである。

【図 9-1】図 9：単回投与による正常食（A、B）又は繰り返し投与による高脂肪食（C、D）の TALLYHO マウスにおいて、皮下投与された LPL/GPIHBP1 融合ポリペプチドによる用量依存的な TG レベルの低下を実証する一連のグラフである。

【図 9-2】（上記の通り。）

【図 10】アルブミン結合部分に連結された LPL/GPIHBP1 融合ポリペプチドにおける TG 低下の持続期間の増大を実証する一連のグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0032】

40

リポタンパク質リパーゼ（LPL）及びその機能性変異体

本明細書に記載される融合ポリペプチドにおいて使用される LPL ポリペプチドは、例えばヒトなどの哺乳類であり得る。野生型ヒト LPL は、UniProtKB/Swiss-Prot アクセッション番号：P06858.1 を有するアミノ酸配列（配列番号 1）によってコードされる。ヒト LPL は、最初に、475 のアミノ酸を有する前駆体タンパク質として翻訳される。次に、この前駆体タンパク質のアミノ酸 1～27 を含むシグナルペプチドが切断され、アミノ酸 28～475（配列番号 2）を含む成熟形態が残る。

【0033】

一実施形態では、本開示の融合ポリペプチドにおいて使用される LPL ポリペプチドは、配列番号 1 又は配列番号 2 の LPL ポリペプチドに対して少なくとも約 80%、少なくと

50

も約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、又は少なくとも約 99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態では、本開示の融合ポリペプチドにおいて使用される L P L ポリペプチドは、配列番号 1 又は配列番号 2 の L P L ポリペプチドに対して少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、又は少なくとも約 99%の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる。一実施形態では、本開示の融合ポリペプチドにおいて使用される L P L ポリペプチドは、配列番号 1 の L P L ポリペプチドを含むか、又はからなる。一実施形態では、本開示の融合ポリペプチドにおいて使用される L P L ポリペプチドは、配列番号 2 の L P L ポリペプチドを含むか、又はからなる。

10

【0034】

別の実施形態では、本開示の融合ポリペプチドにおいて使用される L P L ポリペプチドの機能性変異体は、成熟ヒト L P L ポリペプチド（配列番号 2）のアミノ酸のいずれかを付加、欠失、又は置換する 1 つ又は複数（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、又はそれ以上）の点突然変異を含み得る。

【0035】

本明細書で使用される場合、「機能性変異体」は、親タンパク質に対して実質的又は有意な配列同一性を有する親タンパク質の変異体を指し、親タンパク質の生物活性の少なくとも 1 つを保持する。親タンパク質の機能性変異体は、本開示を考慮して、当該技術分野において知られている手段によって作製することができる。機能性変異体は、親タンパク質のアミノ酸配列への 1 つ又は複数の改変を含むことができる。改変は、例えば、ポリペプチドの熱安定性を改善する、基質特異性を変更する、最適 pH を変化させるなどにより、ポリペプチドの物理化学的特性を変化させることができる。また改変は、親タンパク質の生物活性の全てを破壊又は消失させない限り、親タンパク質の生物活性を変更することもできる。

20

【0036】

いくつかの実施形態において、親タンパク質の機能性変異体は、親タンパク質の生物活性に大きな影響を与えない、親タンパク質に対する置換、例えば保存的アミノ酸置換を含む。保存的置換には、塩基性アミノ酸（アルギニン、リジン及びヒスチジン）、酸性アミノ酸（グルタミン酸及びアスパラギン酸）、極性アミノ酸（グルタミン及びアスパラギン）、疎水性アミノ酸（ロイシン、イソロイシン及びバリン）、芳香族アミノ酸（フェニルアラニン、トリプトファン及びチロシン）、及び小アミノ酸（グリシン、アラニン、セリン、スレオニン及びメチオニン）のグループ内でのアミノ酸置換が含まれるが、これらに限定されない。親タンパク質の標準アミノ酸残基を置換するために、非標準又は非天然アミノ酸（例えば、4-ヒドロキシプロリン、6-N-メチルリジン、2-アミノイソ酪酸、イソバリン、及びアルファ-メチルセリン）を使用することもできる。

30

【0037】

いくつかの実施形態において、親タンパク質の機能性変異体は、親タンパク質に対する 1 つ又は複数のアミノ酸の欠失及び／又は挿入を含む。例えば、L P L タンパク質（例えば、成熟 L P L タンパク質）の機能性変異体は、L P L タンパク質（例えば、成熟 L P L タンパク質）に対する 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 又はそれ以上のアミノ酸の欠失及び／又は挿入を含むことができる。

40

【0038】

いくつかの実施形態において、親タンパク質の機能性変異体は、親タンパク質に対する、置換、例えば保存的アミノ酸置換、並びに欠失及び／又は挿入、例えばアミノ酸の小さい欠失及び／又は挿入を含む。

【0039】

例えば、一実施形態では、配列番号 2 のアミノ酸 294～297（配列番号 1 のアミノ酸 321～324）において見出される R A K R 配列に対して、1 つ又は複数の点突然変異を行うことができる。一実施形態では、配列番号 2 における突然変異は R 294 A である

50

(配列番号45に示される)。RAKR配列は、プロタンパク質転換酵素のための切断部位である。したがって、この部位の突然変異は、ポリペプチドをタンパク質切断に対して抵抗性に行うことができる。タンパク質分解性切断に抵抗するために、本開示の融合ポリペプチドにおいて使用されるLPLポリペプチドに対して代替の突然変異が行われてもよく、これは本開示の範囲内に包含される。

【0040】

他の点突然変異は、LPLポリペプチドの機能を改善するために行うことができる。例えば、一実施形態では、本明細書に記載される融合ポリペプチドにおいて使用される機能性変異体LPLポリペプチドは、いわゆる「S447X」突然変異体であり得る。この変異体は、LPLヌクレオチド配列のヌクレオチド1595においてCからGへの変化を有する。これは、セリン447の終止コドンへの変化につながり、最後の2つのC末端アミノ酸(S及びG)を欠いたLPLの切断型が生じる。この切断型は配列番号3に示される。したがって、一実施形態では、本開示において使用される機能性変異体LPLポリペプチドは配列番号3を含むか、又はからなる。

10

【0041】

本開示の融合ポリペプチドにおいて使用されるLPLポリペプチドは、ANGPTL4結合部位に1つ又は複数の点突然変異を含み得る。したがって、本開示の融合ポリペプチドにおいて使用されるLPLポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸157～189にわたる領域に1つ又は複数の点突然変異(欠失、付加、又は置換)を含み得る。

【0042】

LPLポリペプチドの他の切断型も、本開示の融合ポリペプチドにおいて使用され得る。例えば、本明細書において最小LPL触媒ドメインと呼ばれるアミノ酸37～334(配列番号4)のみを含むLPLの切断型は、本開示の融合ポリペプチドにおいて使用され得る。本開示の融合ポリペプチドにおいて有用なLPLの他の切断型は、アミノ酸36～335、35～340、34～345、33～350、32～355、31～360、30～365、29～370、28～375、28～380、28～385、28～390、28～395、28～400、28～405、28～410、28～415、28～420、28～425、28～430、28～435、28～440、28～445、28～450、28～455、28～460、28～465、又は28～470(全て配列番号1に関する)を含むか、又はからなるポリペプチドのアミノ酸配列に対応するものを含む。

20

30

【0043】

野生型LPLポリペプチドの他の突然変異型又は切断型も、本開示の融合ポリペプチドでの使用に適している。本開示でLPLポリペプチドの機能性変異体として使用されるこのような突然変異型又は切断型はどれも、好ましくは、配列番号2に示される野生型成熟ポリペプチドの活性の少なくとも一部を保持すべきである。一実施形態では、本開示のLPLポリペプチドの機能性変異体は、配列番号2に示される野生型成熟ポリペプチドの活性の少なくとも10%(例えば、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%又はそれ以上)を保持する。特定の実施形態では、本開示のLPLポリペプチドの機能性変異体は、配列番号2に示される野生型成熟ポリペプチドの活性の少なくとも90%以上を保持する。一実施形態では、活性は、トリオレインリパーゼ活性アッセイを用いて測定され得る。例えば、FUJIFILM Wakko Diagnostics U.S.A. CorporationからのHRシリーズNEFA-HR(2)アッセイ、又はHoppe & Theimer, 1996, Phytochemistry, 42(4): 973-978を参照されたい。

40

【0044】

グリコシルホスファチジルイノシトールHDL結合タンパク質1(GPIHBP1)及びその機能性変異体

本明細書に記載される融合ポリペプチドにおいて使用されるGPIHBP1ポリペプチドは、例えばヒトを含む哺乳類であり得る。野生型ヒトGPIHBP1は、UniProt

50

K B / S w i s s - P r o t アクセション番号：Q 8 I V 1 6 を有するアミノ酸配列（配列番号 5）によってコードされる。ヒト G P I H B P 1 は、最初に、184 のアミノ酸を有する前駆体タンパク質として翻訳される。次に、この前駆体タンパク質のアミノ酸 1 ～ 20 を含むシグナルペプチドが切断され、アミノ酸 21 ～ 184（配列番号 6）を含む形態をもたらす。またヒト G P I H B P 1 は、最初に翻訳されるときに、アミノ酸 152 ～ 184 にわたるプロペプチドも含む。これも除去され、アミノ酸 21 ～ 151（配列番号 7）を含む成熟形態をもたらす。

【0045】

一実施形態では、本開示の融合ポリペプチドにおいて使用される G P I H B P 1 ポリペプチドは、配列番号 5、配列番号 6 又は配列番号 7 の G P I H B P 1 ポリペプチドに対して少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、又は少なくとも約 99% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態では、本開示の融合ポリペプチドにおいて使用される G P I H B P 1 ポリペプチドは、配列番号 5、配列番号 6 又は配列番号 7 の G P I H B P 1 ポリペプチドに対して少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、又は少なくとも約 99% の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる。一実施形態では、本開示の融合ポリペプチドにおいて使用される G P I H B P 1 ポリペプチドは、配列番号 5 の G P I H B P 1 ポリペプチドを含むか、又はからなる。一実施形態では、本開示の融合ポリペプチドにおいて使用される G P I H B P 1 ポリペプチドは、配列番号 6 の G P I H B P 1 ポリペプチドを含むか、又はからなる。一実施形態では、本開示の融合ポリペプチドにおいて使用される G P I H B P 1 ポリペプチドは、配列番号 7 の G P I H B P 1 ポリペプチドを含むか、又はからなる。

【0046】

別の実施形態では、本開示の融合ポリペプチドにおいて使用される機能性変異体 G P I H B P 1 ポリペプチドは、成熟ヒト G P I H B P 1 ポリペプチド（配列番号 7）のアミノ酸のいずれかを付加、欠失、又は置換する 1 つ又は複数（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 又はそれ以上）の点突然変異を含み得る。

【0047】

本明細書で使用される場合、「機能性変異体」は、親タンパク質に対して実質的又は有意な配列同一性を有する親タンパク質の変異体を指し、親タンパク質の生物活性の少なくとも 1 つを保持する。親タンパク質の機能性変異体は、本開示を考慮して、当該技術分野において知られている手段によって作製することができる。機能性変異体は、親タンパク質のアミノ酸配列への 1 つ又は複数の改変を含むことができる。改変は、例えば、ポリペプチドの熱安定性を改善する、基質特異性を変更する、最適 pH を変化させるなどにより、ポリペプチドの物理化学的特性を変化させることができる。また改変は、親タンパク質の生物活性の全てを破壊又は消失させない限り、親タンパク質の生物活性を変更することもできる。

【0048】

いくつかの実施形態において、親タンパク質の機能性変異体は、親タンパク質の生物活性に大きな影響を与えない、親タンパク質に対する置換、例えば保存的アミノ酸置換を含む。保存的置換には、塩基性アミノ酸（アルギニン、リジン及びヒスチジン）、酸性アミノ酸（グルタミン酸及びアスパラギン酸）、極性アミノ酸（グルタミン及びアスパラギン）、疎水性アミノ酸（ロイシン、イソロイシン及びバリン）、芳香族アミノ酸（フェニルアラニン、トリプトファン及びチロシン）、及び小アミノ酸（グリシン、アラニン、セリン、スレオニン及びメチオニン）のグループ内でのアミノ酸置換が含まれるが、これらに限定されない。親タンパク質の標準アミノ酸残基を置換するために、非標準又は非天然アミノ酸（例えば、4-ヒドロキシプロリン、6-N-メチルリジン、2-アミノイソ酪酸、イソバリン、及びアルファ-メチルセリン）を使用することもできる。

【0049】

いくつかの実施形態において、親タンパク質の機能性変異体は、親タンパク質に対する1つ又は複数のアミノ酸の欠失及び／又は挿入を含む。例えば、GPIHBP1タンパク質（例えば、成熟GPIHBP1タンパク質）の機能性変異体は、GPIHBP1タンパク質（例えば、成熟GPIHBP1タンパク質）に対する1、2、3、4、5、6、7、8、9、10又はそれ以上のアミノ酸の欠失及び／又は挿入を含むことができる。

【0050】

いくつかの実施形態において、親タンパク質の機能性変異体は、親タンパク質に対する、置換、例えば保存的アミノ酸置換、並びに欠失及び／又は挿入、例えばアミノ酸の小さい欠失及び／又は挿入を含む。

【0051】

GPIHBP1ポリペプチドの切断型も本開示の融合ポリペプチドにおいて使用され得る。例えば、プロペプチドを欠いているが、シグナルペプチドを保持するGPIHBP1ポリペプチドの切断型は、配列番号5のアミノ酸1～151（配列番号8）を含み得る。本明細書においてヒトGPIHBP1の最小機能性ドメインと呼ばれるアミノ酸63～148（配列番号9）のみを含むGPIHBP1の代替の切断型は、本開示の融合ポリペプチドにおいて使用され得る。本開示の融合ポリペプチドにおいて有用なGPIHBP1の他の切断型には、アミノ酸62～149、61～150、60～151、55～152、50～153、45～154、40～155、35～156、30～157、25～158、21～160、20～159（全て配列番号5に関する）を含むものが含まれる。アミノ酸21～160を含む切断型は、本明細書において配列番号10と称される。

【0052】

野生型GPIHBP1ポリペプチドの他の突然変異型又は切断型も、本開示の融合ポリペプチドでの使用に適している。本開示の融合ポリペプチドにおいてGPIHBP1ポリペプチドの機能性変異体として使用されるこのような突然変異型又は切断型はどれも、好ましくは、配列番号7に示される野生型成熟ポリペプチドの活性を保持すべきである。一実施形態では、本開示のGPIHBP1ポリペプチドの機能性変異体は、配列番号7に示される野生型成熟ポリペプチドの活性の少なくとも10%（例えば、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%又はそれ以上）を保持する。特定の実施形態では、本開示のGPIHBP1ポリペプチドの機能性変異体は、配列番号7に示される野生型成熟ポリペプチドの活性の少なくとも90%以上を保持する。GPIHBP1の機能性変異体の活性は、前記機能性変異体が、自発的不活性化から、並びにANGPTL3及びANGPTL4による不活性化からLPLを保護する能力をアッセイすることによって測定され得る。

【0053】

LPL及びGPIHBP1の例示的な組み合わせ

本開示の融合ポリペプチドは、本開示に記載されるLPL部分及びGPIHBP1部分のいずれかの組合せを含み得る。非限定的な例のセットとして、LPL部分は、配列番号1、2、3、4、又は45のいずれか1つを含むか、又はからなることができ、GPIHBP1部分は、配列番号5、6、7、8、9又は10のいずれか1つを含むか、又はからなることができる。

【0054】

一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号1のLPL部分と、配列番号5のGPIHBP1部分とを含み得る。一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号1のLPL部分と、配列番号6のGPIHBP1部分とを含み得る。一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号1のLPL部分と、配列番号7のGPIHBP1部分とを含み得る。一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号1のLPL部分と、配列番号8のGPIHBP1部分とを含み得る。一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号1のLPL部分と、配列番号9のGPIHBP1部分とを含み得る。一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号1のLPL部分と、配列番号10のGPIHBP1部分とを含み得る。

【0055】

一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号2のL P L部分と、配列番号5のG P I H B P 1部分とを含み得る。一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号2のL P L部分と、配列番号6のG P I H B P 1部分とを含み得る。一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号2のL P L部分と、配列番号7のG P I H B P 1部分とを含み得る。一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号2のL P L部分と、配列番号8のG P I H B P 1部分とを含み得る。一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号2のL P L部分と、配列番号9のG P I H B P 1部分とを含み得る。一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号2のL P L部分と、配列番号10のG P I H B P 1部分とを含み得る。

【0056】

一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号3のL P L部分と、配列番号5のG P I H B P 1部分とを含み得る。一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号3のL P L部分と、配列番号6のG P I H B P 1部分とを含み得る。一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号3のL P L部分と、配列番号7のG P I H B P 1部分とを含み得る。一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号3のL P L部分と、配列番号8のG P I H B P 1部分とを含み得る。一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号3のL P L部分と、配列番号9のG P I H B P 1部分とを含み得る。一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号3のL P L部分と、配列番号10のG P I H B P 1部分とを含み得る。

【0057】

一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号4のL P L部分と、配列番号5のG P I H B P 1部分とを含み得る。一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号4のL P L部分と、配列番号6のG P I H B P 1部分とを含み得る。一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号4のL P L部分と、配列番号7のG P I H B P 1部分とを含み得る。一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号4のL P L部分と、配列番号8のG P I H B P 1部分とを含み得る。一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号4のL P L部分と、配列番号9のG P I H B P 1部分とを含み得る。一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号4のL P L部分と、配列番号10のG P I H B P 1部分とを含み得る。

【0058】

一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号45のL P L部分と、配列番号5のG P I H B P 1部分とを含み得る。一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号45のL P L部分と、配列番号6のG P I H B P 1部分とを含み得る。一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号45のL P L部分と、配列番号7のG P I H B P 1部分とを含み得る。一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号45のL P L部分と、配列番号8のG P I H B P 1部分とを含み得る。一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号45のL P L部分と、配列番号9のG P I H B P 1部分とを含み得る。一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号45のL P L部分と、配列番号10のG P I H B P 1部分とを含み得る。

【0059】

リンカー

本開示に記載されるL P L部分及びG P I H B P 1部分は、隣接ポリペプチド鎖において互いに直接結合させることができ、或いは適切なリンカーを介して互いに間接的に結合される。リンカーはペプチドリンカーであり得る。ペプチドリンカーは融合ポリペプチドにおいて一般的に使用されており、リンカーを選択又は設計するための方法は周知である（例えば、Chen X et al. Adv. Drug Deliv. Rev. 65 (10) : 1357-1369 (2013) 及びWriggers W et al., Biopolymers 80 : 736-746 (2005) が参照され、これらのそれぞれの内容はこの目的のために本明細書に援用される）。

【0060】

ペプチドリンカーは、一般に、i) 可動性リンカー、ii) ヘリックス形成リンカー、及びiii) 切断可能なリンカーに分類され、各タイプの例は、当該技術分野において知られている。1つの例において、本明細書に記載される融合ポリペプチドには、可動性リンカーが含まれる。可動性リンカーは、立体障害のないアミノ酸の大部分、例えば、グリシ

10

20

30

40

50

ン及びアラニンなどを含有し得る。親水性アミノ酸 S e r も従来通り、可動性リンカーにおいて使用される。可動性リンカーの例としては、ポリグリシン（例えば、(G l y)₄ 及び (G l y)₅）、ポリアラニン ポリ (G l y - A l a)、及びポリ (G l y - S e r)（例えば、(G l y n - S e r n)_n又は (S e r n - G l y n)_n、ここで、各 n は独立して 1 以上の整数である）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0061】

ペプチドリンカーは、適切な長さを有することができる。ペプチドリンカー配列は、少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、又はそれ以上のアミノ酸残基の長さであり得る。例えば、ペプチドリンカーは、約 5～約 50 のアミノ酸の長さ；約 10～約 40 のアミノ酸の長さ；約 15～約 30 のアミノ酸の長さ；又は約 15～約 20 のアミノ酸の長さであり得る。ペプチドリンカーの長さの変化は活性を保持又は増強し、活性研究において優れた効力を生じさせる可能性がある。ペプチドリンカー配列は、天然に存在する若しくは天然に存在しないアミノ酸、又は天然に存在する及び天然に存在しないアミノ酸の両方の混合物から構成され得る。

10

【0062】

いくつかの態様において、アミノ酸グリシン及びセリンは、リンカー配列内のアミノ酸を構成する。特定の態様では、リンカー領域は一連のグリシンの繰り返し (G S G₃)_n（配列番号 11）を含み、ここで、n は 1 以上の正の整数（例えば、1～約 20）である。より具体的には、リンカー配列は G S G G G（配列番号 12）であり得る。リンカー配列は G S G G（配列番号 13）であってもよい。特定の他の態様において、リンカー領域配向は、一連のグリシンの繰り返し (S e r G l y₃)_n（配列番号 14）を含み、ここで、n は、1 以上の正の整数（例えば、1～約 20）である。

20

【0063】

他の実施形態では、リンカーは、ランダムパターン又は繰り返しパターンのグリシン (G) 及びセリン (S) を含有し得る。例えば、リンカーは、(G G G G S)_n（配列番号 15）でよく、ここで、n は 1～20、例えば 1～4 の範囲の整数である。特定の例では、n は 4 であり、リンカーは G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S（配列番号 16）である。別の特定の例では、n は 3 であり、リンカーは G G G G S G G G G S G G G G S（配列番号 17）である。

30

【0064】

他の実施形態では、リンカーは、ランダムパターン又は繰り返しパターンのグリシン (G)、セリン (S) 及びプロリン (P) を含有し得る。例えば、リンカーは (G P P G S)_n でよく、ここで、n は 1～20、例えば 1～4 の範囲の整数である。特定の例では、n は 1 であり、リンカーは G P P G S（配列番号 18）である。

【0065】

一般に、リンカーは、ヒトなどの患者又は対象に投与されたときに免疫原性でない。したがって、リンカーは、低免疫原性を有するように、或いは低免疫原性を有すると考えられるように選択され得る。

【0066】

本明細書に記載されるリンカーは例示的であり、リンカーは、所望により、G l u 及び L y s などの他のアミノ酸を含むことができる。ペプチドリンカーは、所望により、例えば、(G₃S)（配列番号 19）、(G₄S)（配列番号 15）、(G Y S)（配列番号 20）、及び／又は (G l y S e r)（配列番号 21）の複数の繰り返しを含み得る。特定の態様では、ペプチドリンカーは、例えば、(S G₄)（配列番号 22）、(S G₃)（配列番号 14）、(S G₂)（配列番号 23）又は (S e r G l y)（配列番号 24）の複数の繰り返しを含み得る。

40

【0067】

他の態様において、ペプチドリンカーは、(G₃S) + (G₄S) + (G l y S e r)（配列番号 19 + 配列番号 15 + 配列番号 21）などの、繰り返しアミノ酸配列単位の組合

50

せ及び倍数を含み得る。他の態様において、Serは、Alaで置換することができる（例えば、(G₄A)（配列番号25）又は(G₃A)（配列番号26））。さらに他の態様では、リンカーはモチーフ(EAAAK)_nを含み、ここで、nは、1以上の正の整数、例えば1～約20である（配列番号27）。特定の態様では、ペプチドリンカーは、切断可能なリンカーも含み得る。

【0068】

N末端配列及びC末端配列

本開示の融合ポリペプチドのN末端又はC末端には、種々の配列が結合されてもよい。これらは、シグナルペプチド、精製タグ／配列、又は半減期延長部分などのように機能性であってもよいし、或いは単にスペーサー配列を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、シグナルペプチドは、METDTLLLVVLLLVVPGSTG（配列番号52）であり得る。本明細書に記載される融合ポリペプチドはどれも、このようなシグナルペプチドの有無にかかわらず使用され得る。

10

【0069】

精製タグ及びマーカー

本開示の融合ポリペプチドのN末端又はC末端には、精製を支援するために、様々なタグ又はマーカーが結合されてもよい。精製を支援するために、任意のアフィニティタグを本開示の融合ポリペプチドと組み合わせることができる。このようなアフィニティタグの例は、Hisタグ、FLAGタグ、Argタグ、T7タグ、Strepタグ、Sタグ、アプタマータグ、AviTagTM、又はこれらのタグの任意の組み合わせである。一実施形態では、アフィニティタグはHisタグ（通常、5～10のヒスチジン残基を含む）、例えば、6Hisタグ（すなわち、HHHHHH）（配列番号28）である。別の実施形態では、アフィニティタグはFLAGタグ（すなわち、DYKDDDDK）（配列番号29）である。別の実施形態では、アフィニティタグはAviTagTM（すなわち、GLNDIFEAQKIEWHE）（配列番号30）である。本開示において使用するための種々の他のタグは、当該技術分野において周知である。

20

【0070】

N末端の1つ若しくは複数のタグ、C末端の1つ若しくは複数のタグ、又はN末端及びC末端のそれぞれの1つ若しくは複数のタグのいずれかを含む、このようなアフィニティタグの組合せも使用され得る。このような組み合わせの例としては、AviTag(A)と組み合わせたHisタグ(H)、又はAviTag(A)及びFLAGタグ(F)の両方と組み合わせたHisタグ(H)が挙げられる。タグはいずれの配向であってもよく、したがって、AviTag/Hisタグは配向N-AH-C又はN-HA-Cを有し得る、Avi/His/FLAGタグは配向N-AHF-C、N-FHA-Cを有し得る、などである。

30

【0071】

一実施形態では、本開示に従う融合ポリペプチドは、配列「GLNDIFEAQKIEWHEGGHHHHHHHDYKDDDDDK」（配列番号31）を有する「AHF」タグを含む。別の実施形態では、本開示に従う融合ポリペプチドは、配列「DYKDDDDDKHHHHHHGGGLNDIFEAQKIEWHE」（配列番号32）を有する「FHA」タグを含む。本明細書に記載される融合ポリペプチドはどれも、このようなタグ（例えば、AHF又はFHAタグ）の有無にかかわらず使用され得る。

40

【0072】

本明細書に記載される融合ポリペプチドはどれも、このようなタグ又はマーカーの有無にかかわらず使用され得る。

【0073】

半減期の延長

他の実施形態では、本開示の融合ポリペプチドは、インビボでの融合ポリペプチドの半減期を増大させるために、N末端又はC末端において改変され得る。

【0074】

50

融合ポリペプチドの半減期を延長するために様々な戦略を使用することができる。例えば、ポリエチレングリコール（PEG）、reCODE PEG、抗体スキャフォールド、ポリシアル酸（PSA）、ヒドロキシエチルデンプン（HES）、アルブミン結合リガンド、及び炭水化物シールドへの化学結合によって；アルブミン、IgG、FcRn、及びトランスフェリンなどの血清タンパク質に結合するタンパク質への遺伝子融合によって；ナノボディ、Fab、DARPin、avimer、affibody、及びanticalinなどの血清タンパク質に結合する他の結合部分へのカップリング（遺伝子的又は化学的）によって；rPEG、アルブミン、アルブミンのドメイン、アルブミン結合タンパク質、及びFcへの遺伝子融合によって；及び／又はナノ担体、遅延放出製剤、若しくは医療用デバイスへの取込みによって、半減期は延長され得る。

10

【0075】

インビボでの融合ポリペプチドの血清循環を延ばすために、融合ポリペプチドのN末端若しくはC末端へのPEGの部位特異的コンジュゲーションによるか、又はリジン残基に存在するイプシロン-アミノ基を介するか、のいずれかで、多官能性リンカーの有無にかかわらず、高分子量PEGなどの不活性ポリマー分子を本明細書に記載される融合ポリペプチドに結合させることができる。融合ポリペプチドをペグ化するために、融合ポリペプチドは、通常、1つ又は複数のPEG基が融合ポリペプチドに結合される条件下で、PEGの反応性エステル又はアルデヒド誘導体などのポリエチレングリコール（PEG）と反応される。ペグ化は、反応性PEG分子（又は類似の反応性水溶性ポリマー）とのアシル化反応又はアルキル化反応によって実行することができる。本明細書で使用される場合、「ポリエチレングリコール」という用語は、モノ（C1～C10）アルコキシ-又はアリールオキシ-ポリエチレングリコール又はポリエチレングリコール-マレイミドなどの他のタンパク質を誘導体化するために使用されているPEGの形態のいずれか1つを包含することが意図される。一実施形態では、PEG化される融合ポリペプチドは、グリコシル化されていない（aglycosylated）。最小の生物活性の損失をもたらす、線状又は分枝状ポリマーの誘導体化を使用することができる。PEG分子の融合ポリペプチドへの適切なコンジュゲーションを保証するために、コンジュゲーションの度合いは、SDS-PAGE及び質量分析によって厳密にモニターすることができる。未反応PEGは、サイズ排除又はイオン交換クロマトグラフィによって、融合ポリペプチド-PEG結合体から分離することができる。PEG誘導体化融合ポリペプチドは、例えばイムノアッセイを含む当業者に周知の方法を用いて、活性及びインビボ効力について試験することができる。タンパク質をペグ化するための方法は当該技術分野において知られており、本明細書に開示される融合ポリペプチドに適用することができる。例えば、この目的のためにそのそれぞれの内容が本明細書に援用される欧州特許第0154316号明細書及び欧州特許第0401384号明細書を参照されたい。

20

30

【0076】

本明細書に記載される融合ポリペプチドと共に、他の修正されたペグ化技術が使用されてもよい。一実施形態では、本明細書に記載される融合ポリペプチドは、再構成化学的直交性特異的操作技術（reconstituting chemically orthogonal directed engineering technology）（reCODE PEG）を含むことができ、これは、tRNAシンテターゼ及びtRNAを含む再構成系を介して化学的に特定の側鎖を生合成タンパク質に組み込む。この技術により、大腸菌（E. coli）、酵母、及び哺乳類細胞において、30を超える新しいアミノ酸を生合成タンパク質に組み込むことが可能になる。tRNAは、アンバーコドンが位置する任意の位置に規範的なアミノ酸を組み込み、アンバーを終止コドンから、化学的に特定のアミノ酸の組み込みをシグナル伝達するものへ変換する。

40

【0077】

一実施形態では、本明細書に記載される融合ポリペプチドは、血清半減期の延長のために組換えペグ化技術（rPEG）を含み得る。この技術は、300～600のアミノ酸の非構造化タンパク質テールを、既存の医薬用タンパク質に遺伝子融合させることを含む。こ

50

のような非構造化タンパク質鎖の見かけの分子量は、その実際の分子量よりも約15倍大きいので、タンパク質の血清半減期は著しく増大される。化学的コンジュゲーション及び再精製を必要とする従来のペグ化とは対照的に、製造プロセスが大幅に簡略化され、生成物が均質である。

【0078】

ペグ化の代替手段は、PASylation（登録商標）である（Schlappschyet al., 2013, Protein Eng Des Sel. 26(8): 489-501、その内容はこの目的のために本明細書に援用される）。PASylation（登録商標）は、ポリペプチドベースのランダムコイルドメイン（RCD）技術である（例えば、国際公開第2011/144756号パンフレット及び国際公開第2008/155134号パンフレットを参照、これらのそれぞれの内容はこの目的のために本明細書に援用される）。したがって、一実施形態では、本明細書に記載される融合ポリペプチドはPAS化される。PASylation（登録商標）のポリペプチドは、アミノ酸プロリン、アラニン、及び任意選択的にセリン（PA/S、又はセリンが存在することを示すためにPAS）の配列を含有する。アミノ酸残基の組合せであるポリマーは各アミノ酸残基の明確な二次構造優先性の解除をもたらし、安定して無秩序なポリペプチドを形成する。ランダムコイル構造をとるアミノ酸配列を有するドメインを含有する少なくとも1つのPASポリペプチドに結合された生物学的に活性なタンパク質は、この付加物を欠いているその天然状態のタンパク質と比較して、増大されたインビボ及び／又はインビトロ安定性を有することが観察された。

10

20

【0079】

PASylation（登録商標）は、ペグ化を超える特定の利点を提供すると言われていている。例えば、高い標的親和性を維持する；今日まで前臨床試験において免疫原性を誘発していない；腎臓酵素により効率的に分解されるように生分解性である；及び血流中で安定している。PASポリペプチドは多分散性を示さず、インビトロでカップリングステップを必要とせず、それにより、商品原価因子に悪影響を与えない。PASポリペプチドは、同等の分子量のPEGの粘度よりも低い粘度を有し、半減期の延長は、10倍～300倍超まで調節可能である。これらの利点は、PASylation（登録商標）により改変されるタンパク質をより有効にし、より安全にし、そして投薬量及び投与頻度の低下により患者コンプライアンスの上昇をもたらすことによって大幅に便利にし得る。

30

【0080】

PAS200ポリペプチド鎖の流体力学的体積は分子量20kDaのPEGポリマーとほぼ一致し、PAS600ポリペプチド鎖の流体力学的体積は分子量40kDaのPEGポリマーとほぼ一致する。データにより、より高濃度において対応する流体力学的体積に対して、PASポリペプチドは、PEGポリマーよりも1/3～3倍低い粘度を有することが提供される。

【0081】

ポリシアリル化は、天然ポリマーのポリシアル酸（PSA）を使用して、活性寿命を延ばし、治療用ペプチド及びタンパク質の安定性を改善する。PSAは、シアル酸（糖）のポリマーである。タンパク質及び治療用ペプチド薬物送達のために使用される場合、ポリシアル酸は、コンジュゲーションにおいて保護的な微小環境を提供する。これは、循環中の治療用タンパク質の活性寿命を増大させ、免疫系により認識されることを防止する。PSAポリマーは、天然でヒトの体内に見出される。PSAポリマーは、何百万年にもわたってその壁をPSAポリマーでコーティングするように進化した特定の細菌によって採用された。これらの天然でポリシアリル化された細菌は、次に、分子擬態によって身体の防御システムの裏をかくことができた。天然の最終的なステルス技術であるPSAは、大量に且つ所定の物理特性を伴って、このような細菌から容易に産生され得る。細菌PSAは、ヒトの体内のPSAと化学的に同一なので、タンパク質にカップリングさせた場合でも完全に非免疫原性である。一実施形態では、本明細書に記載される融合ポリペプチドは、ポリシアリル化され得る。

40

50

【0082】

別の技術は、融合ポリペプチドに連結されたヒドロキシエチルデンプン（「HES」）誘導体の使用を含む。一実施形態では、本明細書に開示される融合ポリペプチドは、ヘシル化（hesylated）され得る。HESは、蠟状トウモロコシデンプンに由来する改変された天然ポリマーであり、体内酵素によって代謝され得る。HES溶液は、通常、不十分な血液量の代わりに使用するため、及び血液のレオロジー特性を改善するために投与される。融合ポリペプチドのヘシル化は、分子の安定性を増大させると共に、腎クリアランスを低減することによって、循環半減期の延長を可能にし、生物活性の増大をもたらす。HESの分子量などの種々のパラメータを変更することにより、広範にわたるHES結合体をカスタマイズすることができる。

10

【0083】

一実施形態では、本開示の融合ポリペプチドは、1つ又は複数のヒト血清アルブミン（HSA）ポリペプチド、又はその一部に融合され得る。アルブミン融合ポリペプチドの成分としてのアルブミンの、種々のタンパク質の担体としての使用は、国際公開第93/15199号パンフレット、国際公開第93/15200号パンフレット、及び欧州特許第0413622号明細書に記載されている。ポリペプチドへの融合のためにHSAのN末端断片を使用することも提唱されている（欧州特許第0399666号明細書）。したがって、本開示の融合ポリペプチドのアルブミンへの遺伝子若しくは化学的融合、又はコンジュゲーションによって、貯蔵寿命を安定化させる若しくは延長する、及び／又はインビトロ及び／又はインビボにおいて溶液中で分子の活性を長時間保持することができる。HSA融合に関する付加的な方法は、例えば、国際公開第2001/077137号パンフレット及び国際公開第2003/006007号パンフレットにおいて見出すことができる。これらのそれぞれの内容はこの目的のために本明細書に援用される。

20

【0084】

一実施形態では、本開示の融合ポリペプチドは、アルブミン、例えばヒト血清アルブミン（HSA）に結合する抗体又はその抗体断片に融合させることができる。非限定的な例のセットとして、アルブミン結合抗体又はその抗体断片は、Fab、scFv、Fv、scFab、（Fab'）₂、単一ドメイン抗体、ラクダVHHドメイン、VH若しくはVLドメイン、又は全長モノクローナル抗体（mAb）であり得る。

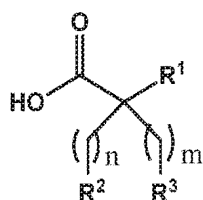
30

【0085】

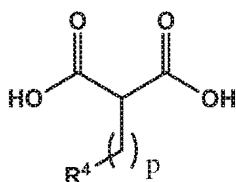
一実施形態では、本開示の融合ポリペプチドは、その半減期を延長するために脂肪酸に融合され得る。生体分子への連結に適した脂肪酸は、当該技術分野において、例えば、国際公開第2015/200078号パンフレット、国際公開第2015/191781号パンフレット、米国特許出願公開第2013/0040884号明細書に記載されており、これらのそれぞれの内容はこの目的のために本明細書に援用される。半減期を延長する適切な脂肪酸には、少なくとも1つのカルボン酸（例えば、1、2、3又は4つのCO₂H）によってそのそれぞれが置換され、そして任意選択的に、ヒドロキシル基によってさらに置換されたC6～70アルキル、C6～70アルケニル又はC6～70アルキニル鎖として定義されるものが含まれる。例えば、本明細書に記載されるタンパク質は、以下の式A1、A2又はA3：

40

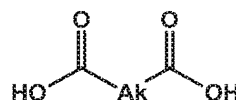
【化1】



A1



A2



又は A3

50

(式中、 R^1 は、 CO_2H 又は H であり；
 R^2 、 R^3 及び R^4 は互いに独立して、 H 、 OH 、 CO_2H 、 $-CH=CH_2$ 又は $-C\equiv CH$ であり；
 Ak は、分枝状 $C_6 \sim C_{30}$ アルキレンであり；
 n 、 m 及び p は互いに独立して、 $6 \sim 30$ の整数である)
 のいずれかを有する脂肪酸、又はそのアミド、エステル若しくは薬学的に許容される塩に連結され得る。

【0086】

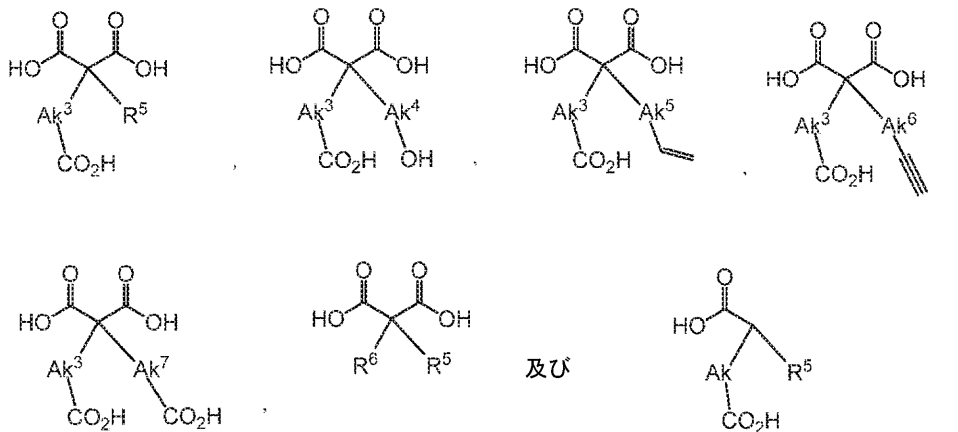
いくつかの実施形態において、脂肪酸は式 A 1 を有し、例えば、 n 及び m が独立して $8 \sim 20$ 、例えば $10 \sim 16$ である式 A 1 の脂肪酸である。別の実施形態では、脂肪酸部分は式 A 1 を有し、ここで、 R^2 及び R^3 の少なくとも 1 つは CO_2H である。

10

【0087】

いくつかの実施形態において、脂肪酸は、以下の式：

【化 2】



20

(式中、 Ak^3 、 Ak^4 、 Ak^5 、 Ak^6 及び Ak^7 は独立して ($C_8 \sim 20$) アルキレンであり、且つ R^5 及び R^6 は独立して ($C_8 \sim 20$) アルキルである)
 から選択される。

30

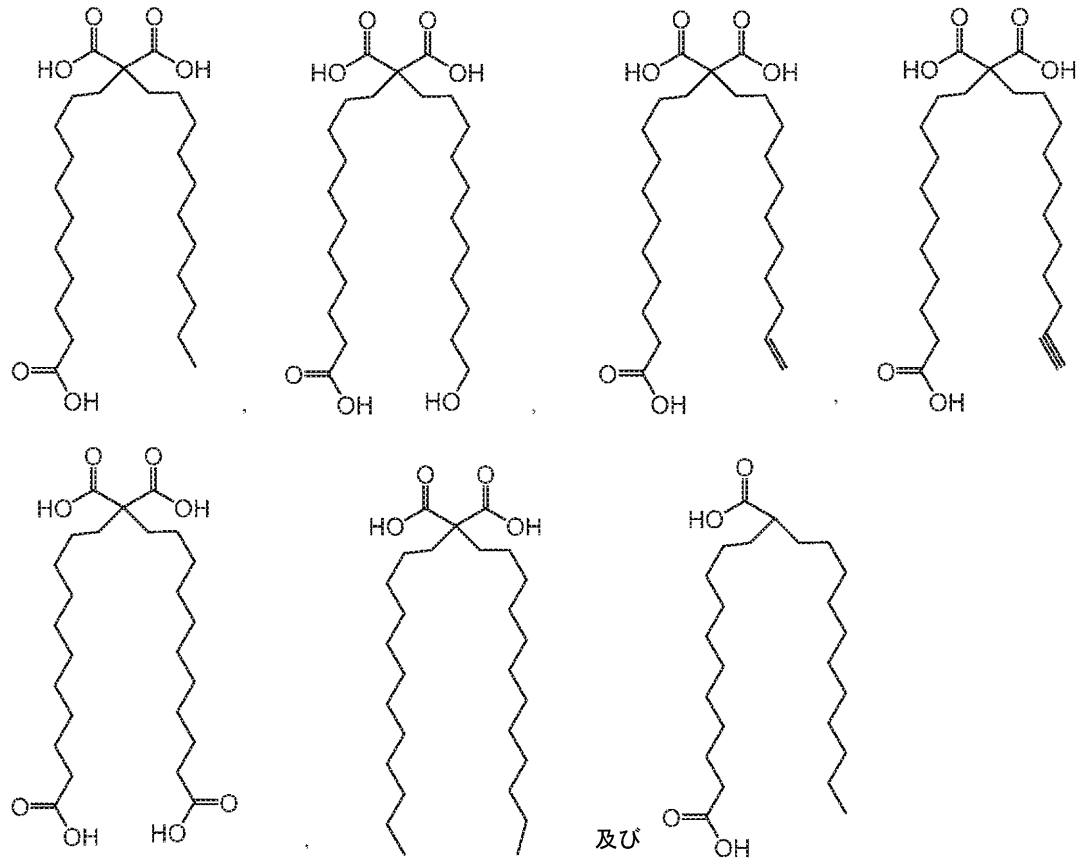
【0088】

いくつかの実施形態において、脂肪酸は、以下の式：

40

50

【化 3】



10

20

から選択される。

【 0 0 8 9 】

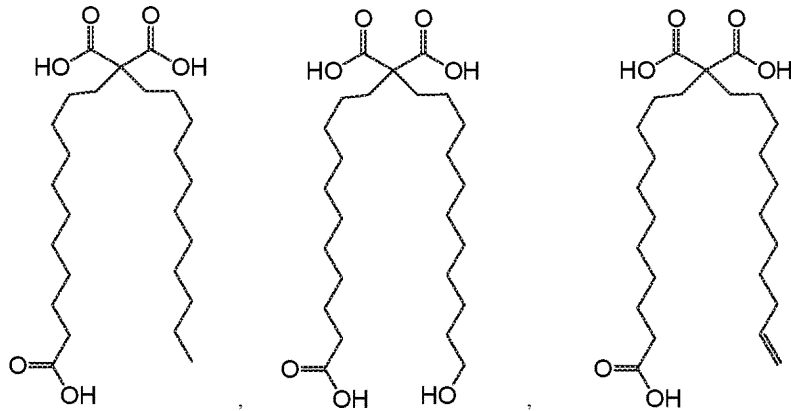
いくつかの実施形態において、脂肪酸は、以下の式：

30

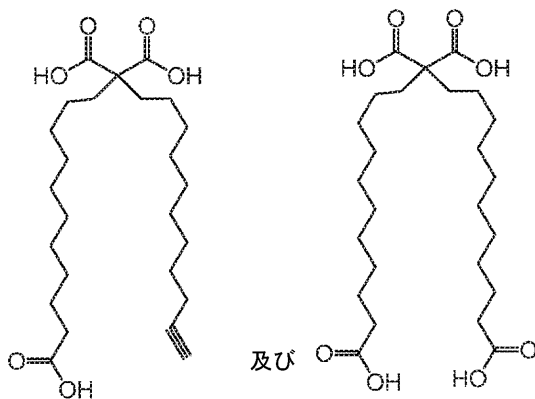
40

50

【化 4】



10



20

から選択される。

【0090】

いくつかの実施形態において、脂肪酸は式 A 2 又は A 3 を有する。特定の実施形態では、結合体は、 p が 8 ～ 20 である式 A 2 の脂肪酸部分、又は A_k が C 8 ～ 20 アルキレンである式 A 3 の脂肪酸部分を含む。

30

【0091】

本開示の融合ポリペプチドの半減期を増大させる方法は、PASylation（登録商標）及びアルブミン結合抗体への融合を含む。一実施形態では、アルブミン結合抗体は、ヒト血清アルブミンに結合し得る。一実施形態では、アルブミン結合抗体は Fab CA 645 である（Adams et al., 2016, Mabs, 8 (7): 1336-1346、その内容はこの目的のために本明細書に援用される）。別の実施形態では、アルブミン結合抗体は CA 645 ScFV である。一実施形態では、本開示の融合ポリペプチドは、PAS 200 又は PAS 600 を含む。

【0092】

例示的な構築物

本開示は、表 1 において以下の例示的な融合ポリペプチド構築物を提供する。表 1 に記載される融合ポリペプチドは、シグナルペプチド（例えば、METDTLLLVVLLLVVPGSTG（配列番号 52））の有無にかかわらずに使用され得る。表 1 に記載される融合ポリペプチドは、タグ（例えば、GLNDIFEAQKIEWHEGGHHHHHHDDYKDDDDK（配列番号 31）などの AHF タグ、又は D Y K D D D D K H H H H H H G G G L N D I F E A Q K I E W H E（配列番号 32）などの FHA）の有無にかかわらずに使用され得る。ある場合には、表 1 に記載される融合ポリペプチドは、シグナルペプチド及びタグの両方の有無にかかわらずに使用され得る。

40

【0093】

50

【表 1】

表1:例示的な融合ポリペプチド構築物

名称	配列
シグナルペプチド-AHF-hLPL(28-475)-(GGGGS) ₄ -hGPIHBP1(21-151) (配列番号33)	METDTLLLWVLLLWVPGSTGGLNDIFEAQKIEWHEGGHHHH HHDYKDDDDKADQRRDFIDIESKFALRTPEDTAEDTCHLIPG VAESVATCHFNHSSKTFMVIHGWTVTGMYESWVPKLVAALY KREPDSNVIVVDWLSRAQEHYPVSAGYTKLVGQDVARFINW MEEEFNYPLDNVHLLGYSLGAHAAGIAGSLTNKKVNRITGLDP AGPNFEYAEAPSRLSPDDADFDVLHTFTRGSPGRSIGIQKPV GHVDIYPNGGTFQPGCNIGEAI RVI AERGLGDVDQLVKCSHE RSIHLFIDSLLNEENPSKAYRCSSKEAFEKGLCLSCRKNRCNN LGYEINKVRAKRSSKMYLKTRSQMPYKVFHYQVKIHFSGTES ETHTNQAFEISLYGTVAESENIPFTLPEVSTNKTYSFLLIYTEVDI GELLMLKLKWKSDSYFSWSDWWSSPGFAIQKIRVKAGETQK KVIFCSREKVSHLQKGKAPAVFVKCHDKSLNKKSGGGGGSG GGGSGGGSGGGGSGTQQEEEEDEHDGPDDYDEEDEDE VEEETNRLPGGRSRVLLRCYTCKSLPRDERCNLTQNC SHGQ TCTTLIAHGNTESGLLTTHSTWCTDSCQPITKTVEGTQVTMT CCQSSLCNVPPWQSSRVQDPTG
AHF-hLPL(28-475)-(GGGGS) ₄ -hGPIHBP1(21-151) (シグナル配列なし) (配列番号34)	GLNDIFEAQKIEWHEGGHHHHHHHDYKDDDDKADQRRDFIDI ESKFALRTPEDTAEDTCHLIPGVAESVATCHFNHSSKTFMVIH GWTVTGMYESWVPKLVAALYKREPDSNVIVVDWLSRAQEHY PVSAGYTKLVGQDVARFINWMEEEFNYPLDNVHLLGYSLGAH AAGIAGSLTNKKVNRITGLDPAGPNFEYAEAPSRLSPDDADFDV DVLHTFTRGSPGRSIGIQKPVGHVDIYPNGGTFQPGCNIGEA RVI AERGLGDVDQLVKCSHERSIHLFIDSLLNEENPSKAYRCS SKEAFEKGLCLSCRKNRCNNLGYEINKVRAKRSSKMYLKTRS QMPYKVFHYQVKIHFSGTESETHTNQAFEISLYGTVAESENIP FTLPEVSTNKTYSFLLIYTEVDIGELLMLKLKWKSDSYFSWSDW WSSPGFAIQKIRVKAGETQKKVIFCSREKVSHLQKGKAPAVF

10

20

30

40

50

【 0 0 9 4 】

【表 2】

	VKCHDKSLNKKSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSQTQQEE EEEEDEHGPDDYDEEDEDEVEEEETNRLPGGRSRVLLRCYT KSLPRDERCNLTQNC SHGQTCTTLIAHGNTESGLLTHSTWC TDSCQPITKTVEGTQVTMTCCQSSLCNPPWQSSRVQDPTG
hLPL(28-475)-(G4S)4- hGPIHBP1(21-151) (配列番号55)	ADQRRDFIDIESKFALRTPEDTAEDTCHLIPGVAESVATCHFN HSSKTFMVIHGWTVTGMYESWVVKLVAAALYKREPDSNVIVV DWLSRAQEHYPVSAGYTKLVGQDVARFINWMEEFNYPLDN VHLLGYSLGAHAAGIAGSLTNKKVNRITGLDPAGPNFEYAEAP SRLSPDDADFVDVLHTFTRGSPGRSIGIQKPVGHVDIYPNGG TFQPGCNIGEAIKRVIAERGLGDVDQLVKCSHERSIHLFIDSLL NEENPSKAYRCSSKEAFEKGLCLSCRKNRNCNNLGYEINKVRA KRSSKMYLKTRSQMPYKVFHYQVKIHFSGTESETHTNQAFEI SLYGTVAESENIPFTLPEVSTNKTYSLIYTEVDIGELLMLKLK WKSDSYFSWSDWWSSPGFAIQKIRVKAGETQKKVIFCSREK VSHLQKKGKAPAVFVKCHDKSLNKKSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSSQTQQEEEEDEHGPDDYDEEDEDEVEEEETNRLP GGRSRVLLRCYTCKSLPRDERCNLTQNC SHGQTCTTLIAHG NTESGLLTHSTWCTDSCQPITKTVEGTQVTMTCCQSSLCNP PWQSSRVQDPTG
シグナルペプチド -AHF-hLPL(28- 475)-(G4S)4-hGPIHBP1(21- 151)-(G4S)3-PAS200 (配列番号35)	METDTLLLWVLLWVPGSTGGLNDIFEAQKIEWHEGHHHH HHDYKDDDDKADQRRDFIDIESKFALRTPEDTAEDTCHLIPG VAESVATCHFNHSSKTFMVIHGWTVTGMYESWVVKLVAAALY KREPDSNVIVVDWLSRAQEHYPVSAGYTKLVGQDVARFINW MEEFNYPLDNVHLLGYSLGAHAAGIAGSLTNKKVNRITGLDP AGPNFEYAEAPSRLSPDDADFVDVLHTFTRGSPGRSIGIQKPV GHVDIYPNGGTFQPGCNIGEAIKRVIAERGLGDVDQLVKCSHE RSIHLFIDSLLNEENPSKAYRCSSKEAFEKGLCLSCRKNRNCNN LGYEINKVRAKASSKMYLKTRSQMPYKVFHYQVKIHFSGTES ETHTNQAFEISLYGTVAESENIPFTLPEVSTNKTYSLIYTEVDI GELLMLKLKWKSDSYFSWSDWWSSPGFAIQKIRVKAGETQK KVIFCSREKVSHLQKKGKAPAVFVKCHDKSLNKKSGGGGSGG GGGSGGGGSGGGGSSQTQQEEEEDEHGPDDYDEEDEDE VEEEETNRLPGGRSRVLLRCYTCKSLPRDERCNLTQNC SHGQ TCTTLIAHGNTESGLLTHSTWCTDSCQPITKTVEGTQVTMT CCQSSLCNPPWQSSRVQDPTGGGGGSGGGGSGGGGSS AAASSSASPAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPS APAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPA ASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASP AAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAP APASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAHHHHHH
シグナルペプチド -AHF-hLPL(28- 475)-(G4S)4-hGPIHBP1(21- 151)-(G4S)3-PAS600 (配列番号36)	METDTLLLWVLLWVPGSTGGLNDIFEAQKIEWHEGHHHH HHDYKDDDDKADQRRDFIDIESKFALRTPEDTAEDTCHLIPG VAESVATCHFNHSSKTFMVIHGWTVTGMYESWVVKLVAAALY KREPDSNVIVVDWLSRAQEHYPVSAGYTKLVGQDVARFINW MEEFNYPLDNVHLLGYSLGAHAAGIAGSLTNKKVNRITGLDP AGPNFEYAEAPSRLSPDDADFVDVLHTFTRGSPGRSIGIQKPV GHVDIYPNGGTFQPGCNIGEAIKRVIAERGLGDVDQLVKCSHE RSIHLFIDSLLNEENPSKAYRCSSKEAFEKGLCLSCRKNRNCNN LGYEINKVRAKASSKMYLKTRSQMPYKVFHYQVKIHFSGTES ETHTNQAFEISLYGTVAESENIPFTLPEVSTNKTYSLIYTEVDI GELLMLKLKWKSDSYFSWSDWWSSPGFAIQKIRVKAGETQK KVIFCSREKVSHLQKKGKAPAVFVKCHDKSLNKKSGGGGSGG GGGSGGGGSGGGGSSQTQQEEEEDEHGPDDYDEEDEDE VEEEETNRLPGGRSRVLLRCYTCKSLPRDERCNLTQNC SHGQ TCTTLIAHGNTESGLLTHSTWCTDSCQPITKTVEGTQVTMT

10

20

30

40

【 0 0 9 5 】

【表 3】

	CCQSSLCNVPPWQSSRVQDPTGGGGGSGGGGSGGGGSSS AASSSSASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPS APAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPA ASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASP AAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAP APASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPA SPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPA APAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPA PSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSA PAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAA SPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPA APAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPA PASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPAS PAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPA PAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAP SAPAAHHHHHHH*	
シグナルペプチド -AHF-hLPL(28-475)-(G4S)4-hGPIHBP1(21-151)-(G4S)3-CA645scFv-LV-HV (配列番号37)	METDTLLLWVLLLWVPGSTGGLNDIFEAQKIEWHEGGHHHH HHDYKDDDDKADQRRDFIDIESKFALRTPEDTAEDTCHLIPG VAESVATCHFNHSSKTFMVIHGWTVTGMYESWVPKLVAALY KREPDNSNIVVDWLSRAQEHYPVSAGYTKLVGQDVARFINW MEEEFNYPLDNVHLLGYSLGAHAAGIAGSLTNKKVNRITGLDP AGPNFEYAEAPSRSLPDDADFVDVLHTFTRGSPGRSIGIQKPV GHVDIYPNGGTFQPGCNIGEAIRVIAERGLGDVDQLVKCSHE RSIHLFIDSLNNEENPSKAYRCSSKEAFEKGLCLSCRKNRCNN LGYEINKVRKASSKMYLKTRSQMPYKVFHYQVKIHFSGTES ETHTNQAFEISLYGTVAESENIPFTLPEVSTNKTYSLIYTEVDI GELLMLKWKWSDSYFSWSDWWSSPGFAIQKIRVKAGETQK KVIFCSREKVSHLQKGAFAVFKCHDKSLNKKSGGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSGTQQEEEEDEDHGPDYDEEDEDE VEEETNRLPGGRSRVLLRCYTCKSLPRDERCNLTQNC SHGQ TCTTLIAHGNTESGLLTTHSTWCTDSCQPITKTVEGTQVTMT CCQSSLCNVPPWQSSRVQDPTGGGGGSGGGGSGGGGSDI QMTQSPSSVSASVGDRTITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPG KAPKLLIYEASKLTSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT YYCGGGYSSISDTTFGGGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLNSYAINWV RQAPGKGLEWIGIIWASGTTFYATWAKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGLTVTVSS	10 20
シグナルペプチド -CA645Fab_HC (cotransf. CA645Fab_LC)- (G4S)3-hLPL(28-475)-(G4S)4- hGPIHBP1(21-151)-FHA (配列番号38)	METDTLLLWVLLLWVPGSTGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSC AVSGIDLNSYAINWVRQAPGKGLEWIGIIWASGTTFYATWAK GRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAP YFDLWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGGGGSAD QRRDFIDIESKFALRTPEDTAEDTCHLIPGVAESVATCHFNHS SKTFMVIHGWTVTGMYESWVPKLVAALYKREPDNSNIVVDW LSRAQEHYPVSAGYTKLVGQDVARFINWMEEEFNYP LDNVHL LGYSLGAHAAGIAGSLTNKKVNRITGLDPAGPNFEYAEAPSR SPDDADFVDVLHTFTRGSPGRSIGIQKPVGHVDIYPNGGTFQ PGCNIGEAIRVIAERGLGDVDQLVKCSHERSIHLFIDSLNNEE NPSKAYRCSSKEAFEKGLCLSCRKNRCNNLGYEINKVRKRS SKMYLKTRSQMPYKVFHYQVKIHFSGTESETHTNQAFEISLYG TVAESENIPFTLPEVSTNKTYSLIYTEVDIGELLMLKWKWSD SYFSWSDWWSSPGFAIQKIRVKAGETQKKVIFCSREKVSHL QKGAFAVFKCHDKSLNKKSGGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSGTQQEEEEDEDHGPDYDEEDEDEVEEETNRLPGGR	30 40

【 0 0 9 6 】

【表 4】

	SRVLLRCYTCKSLPRDERCNLTQNC SHGQTCTTLIAHGNTES GLLTTHTSTWCTDSCQPITKTVEGTQVTMTCCQSSSLCNVPPW QSSRVQDPTGDYKDDDDKHHHHHHGGGLNDIFEAQKIEWH E
シグナルペプチド- NOV2704Fab_HC (cotransf. NOV2704Fab_LC)-(G4S)3- hLPL(28-475)-(G4S)4- hGPIHBP1(21-151)-FHA (配列番号39)	METDTLLLWVLLLWVPGSTGEVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFS DYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISYSGSYTYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRYGMDY WGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGGGGSGGGGGSG GGGSADQRRDFIDIESKFALRTPEDTAEDTCHLIPGVAESVAT CHF NHSSKTFMVIHGWTVTGMYESWV PKLVAALYKREPDSN VIVVDWLSRAQEHYPVSAGYTKLVGQDVARFINWMEEFNYP LDNVHLLGYS LGAHAAGIAGSLTNKKVNRITGLDPAGPNFEY AEAPSR LSPDDADFDVLHTFTRGSPGRSIGIQKPVGHVDIYP NGGTFQPGCNIGEAIRVIAERGLGDVDQLVKCSHERSIHLFID SLLNEENPSKAYRCSSKEAFEKGLCLSCRKNRCNNLGEINKV RAKRSSKMYLKTRSQMPYKVFHYQVKIHFSGTESETHNQAF EISLYGTVAESENIPFTLPEVSTNKTYSF LIYTEVDIGELMLKL KWKSDSYFSWSDWWSSPGFAIQKIRVKAGETQKKVIFCSRE KVSHLQKGKAPAVFVKCHDKSLNKKSGGGGGSGGGGGSGGGG SGGGGGSGTQQEEEEDEDHGPDDYDEEDEVEEEEEETNRL PGGRSRVLLRCYTCKSLPRDERCNLTQNC SHGQTCTTLIAHG NTESGLLTTHTSTWCTDSCQPITKTVEGTQVTMTCCQSSSLCNV PPWQSSRVQDPTGDYKDDDDKHHHHHHGGGLNDIFEAQKI EWHE
hLPL(28-475)-(GGGGS)4- hGPIHBP1(21-151) (配列番号40)	ADQRRDFIDIESKFALRTPEDTAEDTCHLIPGVAESVATCHF HSSKTFMVIHGWTVTGMYESWV PKLVAALYKREPDSNVIVV DWLSRAQEHYPVSAGYTKLVGQDVARFINWMEEFNYP LDNVHLLGYS LGAHAAGIAGSLTNKKVNRITGLDPAGPNFEYAEAP SR LSPDDADFDVLHTFTRGSPGRSIGIQKPVGHVDIYPNGG TFQPGCNIGEAIRVIAERGLGDVDQLVKCSHERSIHLFIDSLL NEENPSKAYRCSSKEAFEKGLCLSCRKNRCNNLGEINKVRA KRSSKMYLKTRSQMPYKVFHYQVKIHFSGTESETHNQAFEI SLYGTVAESENIPFTLPEVSTNKTYSF LIYTEVDIGELMLKL WKSDSYFSWSDWWSSPGFAIQKIRVKAGETQKKVIFCSREK VSHLQKGKAPAVFVKCHDKSLNKKSGGGGGSGGGGGSGGGG SGGGGGSGTQQEEEEDEDHGPDDYDEEDEVEEEEEETNRLP GGGRSRVLLRCYTCKSLPRDERCNLTQNC SHGQTCTTLIAHG NTESGLLTTHTSTWCTDSCQPITKTVEGTQVTMTCCQSSSLCNV PPWQSSRVQDPTG
シグナルペプチド -AHF-hLPL(28- 475)R294A-(GGGGS)4- hGPIHBP1(21-151) (配列番号46)	METDTLLLWVLLLWVPGSTGGGLNDIFEAQKIEWHEGGHHHH HHDYKDDDDKADQRRDFIDIESKFALRTPEDTAEDTCHLIPG VAESVATCHF NHSSKTFMVIHGWTVTGMYESWV PKLVAALY KREPDSNVIVVDWLSRAQEHYPVSAGYTKLVGQDVARFINW MEEFNYP LDNVHLLGYS LGAHAAGIAGSLTNKKVNRITGLDP AGPNFEYAEAPSR LSPDDADFDVLHTFTRGSPGRSIGIQKPV GHVDIYPNGGTFQPGCNIGEAIRVIAERGLGDVDQLVKCSHE RSIHLFIDSLLNEENPSKAYRCSSKEAFEKGLCLSCRKNRCNN LGEINKVAAKRSSKMYLKTRSQMPYKVFHYQVKIHFSGTES ETHNQAFEISLYGTVAESENIPFTLPEVSTNKTYSF LIYTEVDI GELMLKLKWKSDSYFSWSDWWSSPGFAIQKIRVKAGETQK KVIFCSREKVSHLQKGKAPAVFVKCHDKSLNKKSGGGGGSG GGGGGGSGTQQEEEEDEDHGPDDYDEEDEVEEEEEETNRLP GGGRSRVLLRCYTCKSLPRDERCNLTQNC SHGQTCTTLIAHG

10

20

30

40

【 0 0 9 7 】

【表 5】

	TCTTLIAHGNTESGLLTTHSTWCTDSCQPITKTVEGTQVTMT CCQSSLCNVPPWQSSRVQDPTG
AHF-hLPL(28-475)R294A- (GGGGS)4-hGPIHBP1(21-151) (配列番号47)	GLNDIFEAQKIEWHEGGHHHHHHHDYKDDDDKADQRRDFIDI ESKFALRTPEDTAEDTCHLIPGVAESVATCFNHSSKTFMVIH GWTVTGMYESWVVKLVAALYKREPDSNVIVVDWLSRAQEHY PVSAGYTKLVGQDVARFINWMEEEFNYPDLNVHLLGYSLGAI AAGIAGSLTNKKVNRITGLDPAGPNFEYAEAPSRSPDDADFV DVLHTFTRGSPGRSIGIQKPVGHVDIYPNGGTFQPGCNIGEA RVIAERGLGDVDQLVKCSHERSIHLFIDSLLNEENPSKAYRCS SKEAFEKGLCLSCRKNRCNNLGYEINKVAAKRSSKMYLKTRS QMPYKVFHYQVKIHFSGTESETHTNQAFEISLYGTVAESENIP FTLPEVSTNKTYSFLIYTEVDIGELLMKLKWKSDSYFSWSDW WSSPGFAIQKIRVKAGETQKKVIFCSREKVSHLQKGAAPAVF VKCHDKSLNKKSGGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGGSGTQQEE EEEEDEHGPDDYDEEDEDEVEEEETNRLPGGRSRVLLRCYTC KSLPRDERCNLTQNC SHGQTCTTLIAHGNTESGLLTTHSTWCT DSCQPITKTVEGTQVTMTCCQSSLCNVPPWQSSRVQDPTG
hLPL(28-475)R294A- (GGGGS)4-hGPIHBP1(21-151) (配列番号48)	ADQRRDFIDIESKFALRTPEDTAEDTCHLIPGVAESVATCFN HSSKTFMVIHGWTVTGMYESWVVKLVAALYKREPDSNVIVV DWLSRAQEHYPVSAGYTKLVGQDVARFINWMEEEFNYPDLN VHLLGYSLGAAAGIAGSLTNKKVNRITGLDPAGPNFEYAEAP SRSPDDADFVDVLHTFTRGSPGRSIGIQKPVGHVDIYPNGG TFQPGCNIGEAIRVIAERGLGDVDQLVKCSHERSIHLFIDSLL NEENPSKAYRCS SKEAFEKGLCLSCRKNRCNNLGYEINKVAA KRSSKMYLKTRS QMPYKVFHYQVKIHFSGTESETHTNQAFEI SLYGTVAESENIPFTLPEVSTNKTYSFLIYTEVDIGELLMKLK WKSDSYFSWSDWWSSPGFAIQKIRVKAGETQKKVIFCSREK VSHLQKGAAPAVFVKCHDKSLNKKSGGGGGSGGGGGSGGGG SGGGGGSGTQQEEEEDEHGPDDYDEEDEDEVEEEETNRLP GGRSRVLLRCYTCKSLPRDERCNLTQNC SHGQTCTTLIAHGN TESGLLTTHSTWCTDSCQPITKTVEGTQVTMTCCQSSLCNV PWQSSRVQDPTG
シグナルペプチド-LPL(28-475)- (G4S)4-hGPIHBP1(21-151)- FLAG-HIS ₆ -Avi (配列番号51)	METDTLLLWVLLLWVPGSTGADQRRDFIDIESKFALRTPEDTA EDTCHLIPGVAESVATCFNHSSKTFMVIHGWTVTGMYESW VVKLVAALYKREPDSNVIVVDWLSRAQEHYPVSAGYTKLVGQ DVARFINWMEEEFNYPDLNVHLLGYSLGAAAGIAGSLTNKK VNRITGLDPAGPNFEYAEAPSRSPDDADFVDVLHTFTRGSP GRSIGIQKPVGHVDIYPNGGTFQPGCNIGEAIRVIAERGLGDV DQLVKCSHERSIHLFIDSLLNEENPSKAYRCS SKEAFEKGLCL SCRKNRCNNLGYEINKVRAKRSSKMYLKTRS QMPYKVFHYQ VKIHFSGTESETHTNQAFEISLYGTVAESENIPFTLPEVSTNKT YSFLIYTEVDIGELLMKLKWKSDSYFSWSDWWSSPGFAIQK IRVKAGETQKKVIFCSREKVSHLQKGAAPAVFVKCHDKSLNK KSGGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGGSGTQQEEEEDEHGP DYDEEDEDEVEEEETNRLPGGRSRVLLRCYTCKSLPRDERCN LTQNC SHGQTCTTLIAHGNTESGLLTTHSTWCTDSCQPITKT VEGTQVTMTCCQSSLCNVPPWQSSRVQDPTG DYKDDDDKH HHHHHGGGLNDIFEAQKIEWHE
LPL(28-475)-(G4S)4- hGPIHBP1(21-151)-FLAG-HIS ₆ - Avi (配列番号53)	ADQRRDFIDIESKFALRTPEDTAEDTCHLIPGVAESVATCFN HSSKTFMVIHGWTVTGMYESWVVKLVAALYKREPDSNVIVV DWLSRAQEHYPVSAGYTKLVGQDVARFINWMEEEFNYPDLN VHLLGYSLGAAAGIAGSLTNKKVNRITGLDPAGPNFEYAEAP SRSPDDADFVDVLHTFTRGSPGRSIGIQKPVGHVDIYPNGG TFQPGCNIGEAIRVIAERGLGDVDQLVKCSHERSIHLFIDSLL

10

20

30

40

【 0 0 9 8 】

【表 6】

	NEENPSKAYRCSSKEAFEKGLCLSCRKNRCNNLGYEINKVRA KRSSKMYLKTRSQMPYKVFHYQVKIHFSGTESETHNQAFEI SLYGTVAESENIPFTLPEVSTNKTYSLIYTEVDIGELMLKLK WKSDSYFSWSDWWSSPGFAIQKIRVKAGETQKKVIFCSREK VSHLQKGKAPAVFVKCHDKSLNKKSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSQTQQEEEEDEEDHGPDDYDEEDEVEEEEETNRLP GGRSRVLLRCYTCKSLPRDERCNLTQNC SHGQTCTTLIAHGN TESGLLTTHSTWCTDSCQPITKTVEGTQVTMTCCQSSLCNVP PWQSSRVQDPTGDYKDDDDKHHHHHGGGLNDIFEAQKIE WHE
LPL(28-475)-(G4S)4- hGPIHBP1(21-151) (配列番号54)	ADQRRDFIDIESKFALRTPEDTAEDTCHLIPGVAESVATCHFN HSSKTFMVIHGWTVTGMYESWVPKLVAALYKREPDSNVIVV DWLSRAQEHYPVSAGYTKLVGQDVARFINWMEEFNYPLDN VHLLGYSLGAHAAGIAGSLTNKKVNRTGLDPAGPNFEYAEAP SRLSPDDADFVDVLHTFTRGSPGRSIGIQKPVGHVDIYPNGG TFQPGCNIGEAIRVIAERGLGDVDQLVKCSHERSIHLFIDSLL NEENPSKAYRCSSKEAFEKGLCLSCRKNRCNNLGYEINKVRA KRSSKMYLKTRSQMPYKVFHYQVKIHFSGTESETHNQAFEI SLYGTVAESENIPFTLPEVSTNKTYSLIYTEVDIGELMLKLK WKSDSYFSWSDWWSSPGFAIQKIRVKAGETQKKVIFCSREK VSHLQKGKAPAVFVKCHDKSLNKKSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSQTQQEEEEDEEDHGPDDYDEEDEVEEEEETNRLP GGRSRVLLRCYTCKSLPRDERCNLTQNC SHGQTCTTLIAHGN TESGLLTTHSTWCTDSCQPITKTVEGTQVTMTCCQSSLCNVP PWQSSRVQDPTG

10

20

【0099】

本開示の融合ポリペプチドをコードする核酸分子

本開示の別の態様は、本開示の融合ポリペプチドをコードする核酸分子に関する。このような核酸分子は、DNA又はRNAであり得る。本明細書において特に限定されない限り、この用語は、基準核酸と同様の特性を有し、且つ天然に存在するヌクレオチドと同様の方法で代謝される、天然ヌクレオチドの既知の類似体を含む核酸を包含する。このような類似体の例としては、ホスホロチオエート、ホスホルアミデート、メチルホスホネート、キラルーメチルホスホレート、2-0-メチルリボヌクレオチド、ペプチド-核酸(PNA)が挙げられるが、これらに限定されない。他に記載されない限り、特定の核酸配列は、その保存的に改変された変異体（例えば、縮重コドン置換）及び相補的配列、並びに明確に示される配列も暗黙に包含する。具体的には、以下に詳述されるように、縮重コドン置換は、1つ又は複数の選択される（又は全ての）コドンの第3の位置が混合塩基及び／又はデオキシイノシン残基で置換された配列を作製することによって達成され得る（Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19:5081, 1991; Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608, 1985; 及び Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98, 1994、これらのそれぞれの内容はこの目的のために本明細書に援用される）。

30

40

【0100】

したがって、本開示は、配列番号33～40、46～48、51、53、54、又は55のいずれか1つ又は複数のポリペプチド配列をコードするヌクレオチド配列を含む核酸も提供する。したがって、本開示は、任意選択的にシグナルペプチドを伴わない、及び／又は任意選択的にタグ若しくはマーカーを伴わない表1のポリペプチド配列のいずれか1つをコードするヌクレオチド配列を含む核酸も提供する。

【0101】

本開示はさらに、配列番号33～40、46～48、51、53、54、又は55のい

50

れか1つをコードする核酸との、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約97%、又は少なくとも約99%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む核酸を提供する。本開示はさらに、任意選択的にシグナルペプチドを伴わない、及び／又は任意選択的にタグ若しくはマーカーを伴わない表1のアミノ酸配列のいずれか1つをコードする核酸との、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約97%、又は少なくとも約99%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む核酸を提供する。配列同一性は、通常、基準配列の全長に沿って測定される。

【0102】

本開示はさらに、配列番号44との少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約97%、又は少なくとも約99%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む核酸を提供する。

【0103】

また本開示は、配列番号44のヌクレオチド配列を含む核酸も提供する。また本開示は、配列番号44のヌクレオチド配列からなる核酸も提供する。

【0104】

ポリヌクレオチド配列は、新規の固相DNA合成によって、又は既存の配列（例えば、以下の実施例に記載される配列）のPCR突然変異誘発によって作製することができる。核酸の直接化学合成は、Narang et al., 1979, Meth. Enzymol. 68:90のリン酸トリエステル法; Brown et al., Meth. Enzymol. 68:109, 1979のリン酸ジエステル法; Beaucage et al., Tetra. Lett., 22:1859, 1981のジエチルホスホロアミダイト法; 及び米国特許第4,458,066号明細書の固体担体法（これらのそれぞれの内容はこの目的のために本明細書に援用される）などの当該技術分野において知られている方法によって達成することができる。PCRによるポリヌクレオチド配列への突然変異の導入は、例えば、PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, H. A. Erlich (Ed.), Freeman Press, NY, N. Y., 1992; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis et al. (Ed.), Academic Press, San Diego, Calif, 1990; Mattila et al., Nucleic Acids Res. 19:967, 1991; 及び Eckert et al., PCR Methods and Applications 1:17, 1991（これらのそれぞれの内容はこの目的のために本明細書に援用される）に記載されるように実施することができる。

【0105】

ベクター

本開示は、本開示の1つ又は複数の核酸分子を含むベクターも提供する。

【0106】

宿主細胞における発現のために、当該技術分野において知られている標準クローニング及び発現技術（例えば、Sambrook, J., Fritsh, E. F., and Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989に記載され、これらのそれぞれの内容はこの目的のために本明細書に援用される）に従って、融合ポリペプチドをコードする核酸は適切なベクター内に存在することができ、適切な宿主への導入後、配列は発現されて、コードされた融合ポリペプチドを産生することができる。本開示は、本開示に従う核酸配列を含むこのようなベクターにも関する。

【0107】

種々の発現ベクターを使用して、本開示の融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを発現させることができる。ウイルス系及び非ウイルス発現ベクターはいずれも、哺乳類宿主細胞などの宿主細胞において融合ポリペプチドを生成するために使用することができる。非ウイルスベクター及びシステムは、通常タンパク質又はRNAを発現するための発現カセットを含むプラスミド、エピソードベクター、及びヒト人工染色体を含む（例えば、Harrington et al., Nat Genet. 15:345, 1997が参照され、その内容はこの目的のために本明細書に援用される）。例えば、哺乳類（例えば、ヒト）細胞における本開示の融合ポリペプチドのポリヌクレオチド及びポリペプチドの発現に有用な非ウイルスベクターには、pThioHis A、B及びC、pCDNA3.1/His、pEBVHis A、B及びC（Invitrogen, San Diego, Calif.）、MPS Vベクター、並びに他のタンパク質を発現するために当該技術分野において知られている多数の他のベクターが含まれる。有用なウイルスベクターには、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルスに基づくベクター、SV40、パピローマウイルス、HBPEプスタイン・バーウイルスに基づくベクター、ワクシニアウイルスベクター及びセムリキ森林ウイルス（SFV）が含まれる。Brent et al., 上記；Smith, Annu. Rev. Microbiol. 49:807, 1995；及びRosenfeld et al., Cell 68:143, 1992を参照されたい。これらのそれぞれの内容はこの目的のために本明細書に援用される。

10

20

【0108】

発現ベクターの選択は、ベクターを発現させる意図された宿主細胞に依存する。哺乳類宿主細胞のための発現ベクターは、複製開始点、プロモーター、及びエンハンサーなどの発現制御配列（例えば、Queen, et al., Immunol. Rev. 89:49-68, 1986が参照され、その内容はこの目的のために本明細書に援用される）、並びにリボソーム結合部位、RNAスプライス部位、ポリアデニル化部位、及び転写終結配列などの必要なプロセッシング情報部位を含むことができる。これらの発現ベクターは、通常、哺乳類遺伝子又は哺乳類ウイルスに由来するプロモーターを含有する。適切なプロモーターは、構成的、細胞型特異的、段階特異的、及び／又は調節可能若しくは制御可能であり得る。有用なプロモーターには、メタロチオネインプロモーター、構成的アデノウイルス主要後期プロモーター、デキサメタゾン誘導性MMTVプロモーター、SV40プロモーター、MRP polIIIプロモーター、構成的MPS Vプロモーター、テトラサイクリン誘導性CMVプロモーター（ヒト最初期CMVプロモーターなど）、構成的CMVプロモーター、及び当該技術分野において知られているプロモーター-エンハンサーの組合せが含まれるが、これらに限定されない。

30

【0109】

形質転換生物の培養は、その発現産物が宿主細胞によってより良好に許容されるコード配列の集団にバイアスをかけることなく、非誘導条件下で拡張させることができる。プロモーターに加えて、本開示の抗体又はその断片の効率的な発現のために、他の調節エレメントも要求又は所望され得る。これらのエレメントは通常、ATG開始コドン及び隣接リボソーム結合部位又は他の配列を含む。さらに、発現の効率は、使用中の細胞系に適したエンハンサーを包含させることによって増強され得る（例えば、Scharf et al., Results Probl. Cell Differ. 20:125, 1994；及びBittner et al., Meth. Enzymol., 153:516, 1987が参照され、これらのそれぞれの内容はこの目的のために本明細書に援用される）。例えば、SV40エンハンサー又はCMVエンハンサーを使用して、哺乳類宿主細胞における発現を増大させることができる。

40

【0110】

したがって、本開示は、配列番号44の核酸配列を含むクローニング又は発現ベクターを提供する。また本開示は、配列番号33～40、46～48、51、53、54、又は55のいずれか1つをコードする核酸との、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少

50

なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、又は少なくとも約 99% の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む核酸を含むクローニング又は発現ベクターも提供する。また本開示は、任意選択的にシグナルペプチドを伴わない表 1 のアミノ酸配列のいずれか 1 つをコードする核酸との、少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、又は少なくとも約 99% の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む核酸を含むクローニング又は発現ベクターも提供する。さらに、本開示は、配列番号 33~40、46~48、51、53 又は 54 の 1 つ又は複数をコードする核酸を含むクローニング又は発現ベクターを提供する。さらに、本開示は、任意選択的にシグナルペプチドを伴わない表 1 のアミノ酸配列の 1 つ又は複数をコードする核酸を含むクローニング又は発現ベクターを提供する。

10

【0111】

宿主細胞

本開示の核酸、本開示のベクター、又はそのいずれか若しくは両方の組合せを含む、原核細胞（例えば、大腸菌（*E. coli*））又は真核細胞（例えば、昆虫細胞、酵母細胞、又は哺乳類細胞）を含む組換え細胞が提供される。したがって、本開示の核酸、本開示のベクター、又はそのいずれか若しくは両方の組合せを含む細胞、例えば、酵母、細菌（例えば、大腸菌（*E. coli*））、及び哺乳類細胞（例えば、不死化哺乳類細胞）が提供される。このような細胞は、一般に、本開示に従う融合ポリペプチドの発現のために利用される。核酸又はベクターは、標準的な技術によって宿主細胞にトランスフェクトされ得る。

20

【0112】

「トランスフェクション」という用語の種々の形態は、外因性 DNA の原核又は真核宿主細胞への導入のために一般的に使用される様々な種類の技術、例えば、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、DEAE-デキストラントランスフェクションなどを包含することが意図される。原核又は真核宿主細胞のいずれかにおいて本開示の融合ポリペプチドを発現させることが可能である。代表的な宿主細胞には、多数の大腸菌（*E. coli*）株、哺乳類細胞株、例えば、CHO、CHO-K1、及び HEK293；昆虫細胞、例えば、Sf9 細胞；並びに酵母細胞、例えば、*S. cerevisiae*（*S. cerevisiae*）及び *P. pastoris*（*P. pastoris*）が含まれる。

30

【0113】

本開示の融合ポリペプチドを発現させるための哺乳類宿主細胞は、チャイニーズハムスター卵巣（CHO 細胞）（Urlaub and Chasin, 1980 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-4220 により記載され、例えば、R. J. Kaufman and P. A. Sharp, 1982 Mol. Biol. 159: 601-621 に記載されるような DHFR 選択可能なマーカーと共に使用される dhfr-CHO 細胞を含む；これらのそれぞれの内容はこの目的のために本明細書に援用される）、NSO 骨髓腫細胞、COS 細胞及び SP2 細胞を含み得る。一実施形態では、宿主細胞は、CHO K1 PD 細胞である。別の実施形態では、宿主細胞は NSO1 細胞である。特に、NSO 骨髓腫細胞と共に使用するために、別の発現系は、国際公開第 87/04462 号パンフレット、国際公開第 89/01036 号パンフレット及び欧州特許第 338,841 号明細書（これらのそれぞれの内容はこの目的のために本明細書に援用される）に示される GS 遺伝子発現系である。融合ポリペプチドをコードする組換え発現ベクターを哺乳類宿主細胞に導入する場合、融合ポリペプチドは、宿主細胞における融合ポリペプチドの発現、又は宿主細胞を成長させる培地中への融合ポリペプチドの分泌を可能にするのに十分な期間にわたって宿主細胞を培養することによって産生され得る。融合ポリペプチドは、標準的なタンパク質精製法を用いて培地から回収することができる。

40

【0114】

医薬組成物

50

また本開示は、本明細書に記載される融合ポリペプチド、核酸、ベクター又は宿主細胞を含む医薬組成物も提供する。このような医薬組成物は、治療的に有効な量の融合ポリペプチド、核酸、ベクター又は宿主細胞と、薬学的又は生理学的に許容される希釈剤及び／又は担体とを含むことができる。担体は、一般的に、意図される投与モードに適するように選択され、例えば、組成物のpH、容積モル浸透圧濃度、粘度、透明度、色、等張性、臭気、無菌性、安定性、溶解又は放出速度、吸着、及び／又は浸透を変更、維持、又は保存するための薬剤を含むことができる。通常、これらの担体は、生理食塩水及び／又は緩衝媒体を含む、水性又はアルコール／水性溶液、エマルション又は懸濁液を含む。

【0115】

医薬組成物中に包含するのに適した薬剤には、アミノ酸（例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、又はリジン）、抗菌剤、酸化防止剤（例えば、アスコルビン酸、亜硫酸ナトリウム、又は亜硫酸水素ナトリウム）、緩衝液（例えば、ホウ酸、重炭酸、Tris-HCl、クエン酸、リン酸、又は他の有機酸）、増量剤（例えば、マンニトール又はグリシン）、キレート剤（例えば、エチレンジアミン四酢酸（EDTA））、錯化剤（例えば、カフェイン、ポリビニルピロリドン、ベーターシクロデキストリン、又はヒドロキシプロピルベーターシクロデキストリン）、充填剤、単糖、二糖、及び他の炭水化物（例えば、グルコース、マンノース、又はデキストリン）、タンパク質（例えば、遊離血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン）、着色剤、香味料及び希釈剤、乳化剤、親水性ポリマー（例えば、ポリビニルピロリドン）、低分子量ポリペプチド、塩形成対イオン（例えば、ナトリウム）、防腐剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、安息香酸、サリチル酸、チメロサル、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロルヘキシジン、ソルビン酸、又は過酸化水素）、溶媒（例えば、グリセリン、プロピレングリコール、又はポリエチレングリコール）、糖アルコール（例えば、マンニトール又はソルビトール）、懸濁化剤、界面活性剤又は湿潤剤（例えば、プルロニック（pluronic）；PEG；ソルビタンエステル；ポリソルベート20又はポリソルベート80などのポリソルベート；Triton；トロメタミン；レシチン；コレステロール又はチロキサパル（tyloxapal））、安定性増強剤（例えば、スクロース又はソルビトール）、浸透圧増強剤（例えば、塩化ナトリウム若しくはカリウムなどのアルカリ金属ハロゲン化物、又はマンニトールソルビトール）、送達媒体、希釈剤、賦形剤、及び／又は医薬品補助剤が含まれ得るが、これらに限定されない。

【0116】

非経口媒体には、塩化ナトリウム溶液、リンゲルデキストロース（Ringer's dextrose）、デキストロース、並びに塩化ナトリウム及び乳酸リンゲル液（lactated Ringer's）が含まれ得るが、これらに限定されない。カルボキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ゼラチン及びアルギネートなどの、適切な生理学的に許容される増粘剤も含まれ得る。静脈内媒体には、流体及び栄養補充剤及び電解質補充剤、例えば、リンゲルデキストロースに基づくものが含まれる。場合により、組成物の浸透圧を調整するための薬剤、例えば、糖、多価アルコール、例えば、マンニトール、ソルビトール、又は塩化ナトリウムが医薬組成物中に含有されてもよい。例えば、多くの場合、組成物は実質的に等張性であることが望ましい。防腐剤及び他の添加剤、例えば、抗菌剤、酸化防止剤、キレート剤及び不活性ガスも存在し得る。正確な製剤は、投与経路に依存するであろう。医薬品製剤のための付加的な関連の原理、方法及び成分は周知である（例えば、Allen, Lloyd V. Ed, (2012) Remington's Pharmaceutical Sciences, 22nd Editionが参照され、その内容はこの目的のために本明細書に援用される）。

【0117】

本開示の医薬組成物は、当該技術分野において知られている様々な方法の1つ又は複数を用いて、1つ又は複数の投与経路によって投与することができる。当業者により認識されるように、投与経路及び／又は投与モードは、所望される結果に応じて異なるであろう。本開示の融合ポリペプチドの投与経路には、静脈内、筋肉内、皮内、腹腔内、皮下、脊髄

性、又は例えば注射若しくは注入による、他の非経口投与経路が含まれる。本明細書で使用される「非経口投与」という語句は、通常は注射による、経腸及び局所投与以外の投与モードを意味し、静脈内、筋肉内、動脈内、くも膜下腔内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、角皮下、関節内、嚢下、くも膜下、脊髄内、硬膜外、及び胸骨内（intrasternal）の注射及び注入が含まれるが、これらに限定されない。非経口投与が考慮される場合、医薬組成物は、通常、発熱物質を含まない非経口的に許容される無菌組成物の形態である。非経口注射のために特に適切な媒体は、適切に保存される無菌等張液である。医薬組成物は、凍結乾燥ケーキなどの凍結乾燥物の形態であることも可能である。

【0118】

或いは、本明細書に記載される融合ポリペプチドは、局所、上皮又は粘膜の投与経路などの非経口ではない経路により、例えば、鼻腔内、経口、経膈、経直腸、舌下、又は局所的に投与することができる。

【0119】

特定の実施形態において、医薬組成物は皮下投与用である。ポリペプチド治療剤（例えば、抗体、融合ポリペプチドなど）の皮下投与のための適切な製剤成分及び方法は当該技術分野において知られており、例えば、米国特許出願公開第2011/0044977号明細書、米国特許第8465739号明細書及び米国特許第8476239号明細書を参照されたい。これらのそれぞれの内容はこの目的のために本明細書に援用される。通常、皮下投与のための医薬組成物は、適切な安定剤（例えば、メチオニンなどのアミノ酸、及び／又はスクロースなどの糖類）、緩衝剤、及び／又は等張化剤（tonicifying agent）を含有する。

【0120】

使用及び方法

本明細書に記載される融合ポリペプチドは治療的有用性を有する。例えば、これらの融合ポリペプチドは、対象に投与することができ、疾患の処置、予防において、及び／又は疾患症状の発症を遅らせるために使用することができる。

【0121】

したがって、本開示は、疾患若しくは障害の治療において使用するため、又は処置のための薬剤として使用するための、本開示の融合ポリペプチド、核酸、ベクター、宿主細胞、又は医薬組成物を提供する。本開示はさらに、病理学的障害の処置において使用するために、本開示の融合ポリペプチド、核酸、ベクター、宿主細胞、又は医薬組成物を提供する。また本開示は、病理学的障害の処置のための薬剤の製造における、本開示の融合ポリペプチド、核酸、ベクター、宿主細胞、又は医薬組成物の使用も提供する。本開示はさらに、病理学的障害を患っている患者又は対象を処置する方法を提供し、本方法は、治療的に有効な量の本開示の融合ポリペプチド、核酸、ベクター、宿主細胞又は医薬組成物を前記患者又は対象に投与することを含む。

【0122】

一実施形態では、処置される患者又は対象は、処置の前に、150mg/dL以上（例えば、200mg/dL、250mg/dL、300mg/dL、350mg/dL、400mg/dL、500mg/dL、600mg/dL、700mg/dL、800mg/dL、900mg/dL、1000mg/dL、1100mg/dL、1200mg/dL、1300mg/dL、1400mg/dL、1500mg/dL又はそれ以上）の血液トリグリセリドレベルを有し得る。

【0123】

本明細書で使用される場合、「病理学的障害」という用語には、カイロミクロン血症（家族性カイロミクロン血症症候群、多遺伝子性遅発型カイロミクロン血症及び早発型カイロミクロン血症を含む）、高脂血症性膵炎、高トリグリセリド血症、腹痛、再発性急性膵炎、発疹性皮膚黄色腫、網膜脂血症、肝脾腫、糖尿病、肥満症、心血管疾患、慢性腎疾患、非アルコール性脂肪性肝疾患、高トリグリセリド血症性膵炎、脂肪肝、メタボリック症候

10

20

30

40

50

群、虚血性心疾患、及び微小血管病変が含まれるが、これらに限定されない。

【0124】

したがって、一実施形態では、本開示は、カイロミクロン血症（例えば、家族性カイロミクロン血症症候群、多遺伝子性遅発型カイロミクロン血症及び／又は早発型カイロミクロン血症）の処置において使用するための、本開示の融合ポリペプチド、核酸、ベクター、宿主細胞、又は医薬組成物を提供する。

【0125】

一般原則

配列同一性は、2つのポリペプチドのアミノ酸の位置における類似性を比較するために一般的に使用される標準的な方法によって決定することができる。BLAST又はFASTAなどのコンピュータプログラムを用いて、そのそれぞれのアミノ酸の最適マッチング（一方若しくは両方の配列の全長に沿って、又は一方若しくは両方の配列の所定の部分に沿って）のために2つのポリペプチドをアラインする。プログラムは、デフォルトオープニングペナルティ及びデフォルトギャップペナルティを提供し、PAM250などのスコアリングマトリックス[標準スコアリングマトリックス; Dayhoff et al., in Atlas of Protein Sequence and Structure, vol. 5, supp. 3 (1978)を参照]をコンピュータプログラムと共に使用することができる。次に、例えば、同一マッチの総数に100を乗じてから、マッチされたスパン内のより長い配列の長さ、2つの配列をアラインするためにより長い配列内に導入されたギャップの数との合計で除したものと、同一性パーセントを計算することができる。

【0126】

本明細書の説明及び特許請求の範囲を通して、「含む (comprise)」及び「含有する (contain)」という語、並びにこれらの語の変化形、例えば「含む (comprising)」及び「含む (comprises)」は、「を含むが、これらに限定されない (including but not limited to)」を意味し、他の成分、整数又はステップを排除しない。さらに、文脈が他に要求しない限り、単数形は複数形を包含し、特に不定冠詞が使用される場合、文脈が他に要求しない限り、本明細書は、複数及び単数を企図すると理解されるべきである。

【0127】

数値xに関連する「約」という用語は、例えば $x + 5\%$ を意味する。

【0128】

本開示の各態様の特徴は、他の態様のいずれかに関連して説明される通りであってもよい。本出願の範囲内で、ここまでの段落、特許請求の範囲及び／又は以下の説明及び図面に記載される種々の態様、実施形態、実施例及び代替物、特に、それらの個々の特徴は、独立して又は組み合わせて採用され得ることが明確に意図される。すなわち、全ての実施形態及び／又は任意の実施形態の特徴は、このような特徴が不適合性でない限り、任意の方法及び／又は組み合わせで結合することができる。

【実施例】

【0129】

一般的な方法

発現プラスミド

LPL、GPIHBP1、ANGPTL3及びANGPTL4のための哺乳類発現ベクターを合成した。オープンリーディングフレームの配列は表2に記載される。

【0130】

10

20

30

40

50

【表 7】

表2 組換えヒトLPL、可溶性ヒトGPIHBP1、ヒトANGPTL3、ヒトANGPTL4及びヒトLPL-GPIHBP1融合ポリペプチドのアミノ酸配列

組換えタンパク質	アミノ酸配列
成熟ヒトLPL (配列番号2)	ADQRRDFIDIESKFALRTPEDTAEDTCHLIPGVAESVATCHFNH SSKTFMVIHGWTVTGMYESWVPKLVAALYKREPDSNVIVVDWL SRAQEHYPVSAGYTKLVGQDVARFINWMEEEFNYPLDNVHLLG YSLGAHAAGIAGSLTNKKVNRITGLDPAGPNFEYAEAPSRLSPD DADFVDVLHTFTRGSPGRSIGIQKPVGHVDIYPNGGTFQPGCNI GEAIRVIAERGLGDVDQLVKCSHERSIHLFIDSLNNEENPSKAYR CSSKEAFEKGLCLSCRKNRCNNLGYEINKVRAKRSSKMYLKTRS QMPYKVFHYQVKIHFSGTESEHTNQAFEISLYGTVAESENIPFT LPEVSTNKTYSFLIYTEVDIGELLMLKLKWKSDSYFSWSDWWS SPGFAIQKIRVKAGETQKKVIFCSREKVSHLQKGKAPAVFVKCH DKSLNKKSG
His ₆ -ヒトLPL(28-475) (配列番号41)	<u>HHHHHH</u> ADQRRDFIDIESKFALRTPEDTAEDTCHLIPGVAESVA TCHFNHSSKTFMVIHGWTVTGMYESWVPKLVAALYKREPDSNV IVVDWLSRAQEHYPVSAGYTKLVGQDVARFINWMEEEFNYPLD NVHLLGYSLGAHAAGIAGSLTNKKVNRITGLDPAGPNFEYAEAP SRLSPDDADFVDVLHTFTRGSPGRSIGIQKPVGHVDIYPNGGTF QPGCNIGEAIRVIAERGLGDVDQLVKCSHERSIHLFIDSLNNEEN PSKAYRCSSKEAFEKGLCLSCRKNRCNNLGYEINKVRAKRSSK MYLKTRSQMPYKVFHYQVKIHFSGTESEHTNQAFEISLYGTVA ESENIPFTLPEVSTNKTYSFLIYTEVDIGELLMLKLKWKSDSYFS WSDWWSSPGFAIQKIRVKAGETQKKVIFCSREKVSHLQKGKA PAVFVKCHDKSLNKKSG

10

20

30

40

50

【 0 1 3 1 】

【表 8】

ヒトLPL(28-475)-FHA (配列番号42)	ADQRRDFIDIESKFALRTPEDTAEDTCHLIPGVAESVATCHFNH SSKTFMVIHGWTVTGMYESWVPKLVAALYKREPDSNVIVVDWL SRAQEHYPVSAGYTKLVGQDVARFINWMEEEFNYPDNDVHLLG YSLGAHAAGIAGSLTNKKVNRITGLDPAGPNFEYAEAPSRLSPD DADFVDVLHTFTRGSPGRSIGIQKPVGHVDIYPNGGTFQPGCNI GEAIRVIAERGLGDVDQLVKCSHERSIHLFIDSLLNEENPSKAYR CSSKEAFEKGLCLSCRKNRCNNLGYEINKVRAKRSSKMYLKTRS QMPYKVFHYQVKIHFSGTESEHTNQAFEISLYGTVAESENIPFT LPEVSTNKTYSFILYTEVDIGELLMLKLKWKSDSYFSWSDWWS SPGFAIQKIRVKAGETQKKVIFCSREKVSHLQKGKAPAVFVKCH DKSLNKKSGDYKDDDDKHHHHHHGGGLNDIFEAQKIEWHE
ヒト可溶性GPIHBP1 (aa 21-151) (配列番号7)	QTQQEEEEDEDHGPDDYDEEDEDEVEEEETNRLPGGRSRVLL RCYTCKSLPRDERCNLTQNC SHGQTCTTLIAHGNTESGLLTTHS TWCTDSCQPITKTVEGTQVTMTCCQSSLCNVPPWQSSRVQDP TG
ヒト可溶性 GPIHBP1(21-151)- FLAG- HIS ₆ -Avi (配列番号49)	QTQQEEEEDEDHGPDDYDEEDEDEVEEEETNRLPGGRSRVLL RCYTCKSLPRDERCNLTQNC SHGQTCTTLIAHGNTESGLLTTHS TWCTDSCQPITKTVEGTQVTMTCCQSSLCNVPPWQSSRVQDP TG DYKDDDDKHHHHHHGGGLNDIFEAQKIEWHE
ヒトANGPTL4(26-406)- FLAG-6HIS-Avi (配列番号43)	GPVQSKSPRFASWDEMNVLAHGLLQLGQGLREHAERTRSQLS ALERRLSACGSACQGTGSTDLPAPESRVDPEVLHSLQTQLKA QNSRIQQLFHKVAQQQRHLEKQHLRIQLQSQFGLLDHKLHLDH EVAKPARRKRLPEMAQPVDPAHNVSRHLRLPRDCQELFQVGER QSGLFIEQPQGSPPFLVNCKMTSDGGWTVIQRHDGSDVDFNRP WEAYKAGFGDPHGEFWLGLKLVHSITGDRNSRLAVQLRDWDG NAELLQFSVHLGGEDTAYSLQLTAPVAGQLGATTVPSSLVFP STWDQDHDLRDKNCAKSLSGGWVFGTCSHSLNNGQYFRSI PQQRQKLKKGIFWKTWRGRYYPLQATTMLIQPMAAEASDYKD DDDKHHHHHHGGGLNDIFEAQKIEWHE
ヒトANGPTL3(17-460)- FLAG-HIS ₆ -Avi (配列番号50)	SRIDQDNSSFDLSPEPKSRFAMLDVVKILANGLLQLGHGLKDF VHKTGQINDIFQKLNIFDQSFYDLSLQTSEIKKEEELRRTTYK LQVKNEEVKNMSLELNSKLESLEEKILLQKVKYLEEQLTNLIQ NQPETPEHPEVTSKTFVEKQDNSIKDLLQTVEDQYKQLNQQH SQIKEIENQLRRTSIQEPTEISLSSKPRAPRTTFLQLNEIRNVKH DGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHYCDVISGSPWT LIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLKVIYSIVKQS NYVLRIELEDWKNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVNP AIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECENNN LNGKYNKPRASKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD SESFEDYKDDDDKHHHHHHGGGLNDIFEAQKIEWHE
LPL(28-475)-(G4S)4- hGPIHBP1(21-151)-FLAG- HIS ₆ -Avi (配列番号51)	METDTLLLVWVLLVWPGSTGADQRRDFIDIESKFALRTPEDTAE DTCHLIPGVAESVATCHFNHSSKTFMVIHGWTVTGMYESWVPK LVAALYKREPDSNVIVVDWLSRAQEHYPVSAGYTKLVGQDVAR FINWMEEEFNYPDNDVHLLGYSLGAHAAGIAGSLTNKKVNRITG LDPAGPNFEYAEAPSRLSPDDADFVDVLHTFTRGSPGRSIGIQK PVGHVDIYPNGGTFQPGCNI GEAIRVIAERGLGDVDQLVKCSHE RSIHLFIDSLLNEENPSKAYRCSKSEAFEKGLCLSCRKNRCNNL GYEINKVRAKRSSKMYLKTRSQMPYKVFHYQVKIHFSGTESEHT TNQAFEISLYGTVAESENIPFTLPEVSTNKTYSFILYTEVDIGELL MLKLKWKSDSYFSWSDWWSPPGFAIQKIRVKAGETQKKVIFC SREKVSHLQKGKAPAVFVKCHDKSLNKKSGGGGGSGGGGSG GGGGSGGGGSGTQQEEEEDEDHGPDDYDEEDEDEVEEEETNR LPGGRSRVLLRCYTCKSLPRDERCNLTQNC SHGQTCTTLIAHGNT ESGLLTTHSTWCTDSCQPITKTVEGTQVTMTCCQSSLCNVPP WQSSRVQDPTGDYKDDDDKHHHHHHGGGLNDIFEAQKIEWH E

10

20

30

40

【0132】

酵素及び試薬

Amplex Red、酪酸レゾルフィン、Enz chek及びDGGR基質は、Life Technologiesから購入した。ヒトVLDL及びカイロミクロンはそれぞれ、EMD Millipore及びAthens researchから得た。BSAは、Sigmaから入手した。HRシリーズNEFA-HR(2)発色試薬A及びHRシリーズNEFA-HR(2)発色試薬Bは、Wako Diagnosticsから購入した。洗浄剤は、Sigmaから入手した。

【0133】

50

組換えタンパク質の発現及び精製

ヒトLPL：以下の手順を用いて組換えヒトLPLを作製した。標準ポリエチレンイミントランスフェクション法を用いて、FreeStyle 293発現培地中で培養したHEK293T細胞を、全長ヒトLPLポリペプチド（NCBI配列NM_000237.2に一致）をコードする哺乳類発現プラスミドによりトランスフェクトした。トランスフェクションの24時間後に、細胞表面からの分泌LPLの放出を増強するために、培地にヘパリンを3 U/mLの最終濃度まで添加した。トランスフェクションの60時間後に、培地を集め、0.2 µmのフィルタを用いてろ過し、グリセロールを10% (v/v)の最終濃度まで添加した。得られた溶液を、緩衝液A（10% (v/v)グリセロールを含有する、50 mMのTris-HCl、200 mMのNaCl、pH 7.2）により予め平衡化させた5 mLヘパリンセファローズHiTrapカラムにロードした。カラムを緩衝液Aで洗浄してから、緩衝液A中の500 mMのNaCl、1 MのNaCl、及び2 MのNaClのステップグラジエントによりLPLを溶出させた。溶出画分をLPL酵素活性についてアッセイし、SDS-PAGEによりタンパク質純度をアッセイした。1 MのNaClにより、最も触媒活性があり且つ最高純度のLPLが溶出した。精製ヒトLPLのアリコート急速凍結し、使用するまで-80℃で貯蔵した。

10

【0134】

可溶性ヒトGPIHBP1：標準ポリエチレンイミン（PEI）トランスフェクション法を用いて、C末端FHAタグを有するGPIHBP1の可溶性ドメイン（solGPIHBP1）タンパク質オープンリーディングフレームを含有するプラスミドをHEK293T細胞に一過性にトランスフェクトした。細胞をFreeStyle 293発現培地における浮遊培養で増殖させ、1リットルの培地中に 1×10^6 細胞/mLの最終細胞濃度でトランスフェクションを実行した。次に、遠心分離により細胞を採取した後、0.22 µmの無菌フィルタによりろ過した。タンジェンシャルフローろ過（TFF）を用いて、浄化した上澄みを濃縮し、50 mMのTris-HCl pH 8、150 mMのNaCl、10%のグリセロール、20 mMのイミダゾールに緩衝液交換した。濃縮サンプルに、50 mMのTris-HCl pH 8、150 mMのNaCl、10%のグリセロール及び20 mMのイミダゾールを含有する緩衝液により平衡化させた5 mLのNi-NTAアフィニティカラムを通過させた。サンプルをロードした後、280 nmにおけるベースライン吸光度が達成されるまでカラムを同じ緩衝液で洗浄した。次に、イミダゾールのグラジエント（20 mM～500 mM）を実行することにより、結合ANGPTL4タンパク質を溶出させた。関連画分をプールし、Amicon濃縮器（分画分子量10,000 Da）を用いて濃縮し、PD-10カラムを用いて貯蔵緩衝液（PBS）に緩衝液交換し、アリコートに分け、液体窒素中で急速凍結した。

20

30

【0135】

ヒトLPL-可溶性GPIHBP1複合体：標準ポリエチレンイミン（PEI）トランスフェクション法を用いて、3:1:1のモル比で、ヒトLPL（タグなし、又はN末端若しくはC末端にHis若しくはFHA精製タグを有する；hLPL）、可溶性ヒトGPIHBP1（solGPIHBP1；タグなし、又はC末端にFHA精製タグを有する）、及びヒトLMF1（hLMF1、アクセッション番号：Q96S06）をコードするプラスミドを、懸濁液適応HEK293T細胞に一過性にトランスフェクトした。振とうインキュベータにおいて細胞を37℃及び5% CO₂で72時間維持した。次に、遠心分離により細胞を採取し、上澄みを0.22 µmの無菌フィルタによりろ過した。タンジェンシャルフローろ過（TFF）を用いて、浄化した上澄みを濃縮し、500 mMのNaCl、10% (v/v)グリセロール、及び20 mMのイミダゾールを含有する20 mMのTris-HCl（pH 7.5）に緩衝液交換した。次に、濃縮サンプルを、500 mMのNaCl、10% (v/v)グリセロール及び20 mMのイミダゾールを含有する20 mMのTris-HCl（pH 7.5）により平衡化させたNi-NTAアフィニティカラムに適用し、280 nmにおけるベースライン吸光度が達成されるまでカラムを同じ緩衝液で洗浄した。次に、イミダゾールのグラジエント（500 mMのNaCl及び10% (v

40

50

／v) のグリセロールを含有する 20 mM の Tris-HCl、pH 7.5 中、20 mM ～ 500 mM のイミダゾール) を実行することにより、結合 hLPL-sol GPIHBP1 複合体を溶出させ、hLPL-sol GPIHBP1 複合体含有画分 (SDS-PAGE により同定される) をプールし、濃縮し (Amicon 濃縮器、分画分子量 30 kDa)、実行緩衝液 (300 mM の NaCl を含有する 10 mM の Tris、pH 7.5) により平衡化させた Superdex 200、16/60 サイジングカラムにロードした。SDS-PAGE によりピーク画分を分析し、LPL-sol GPIHBP1 複合体を含有する画分をプールし、濃縮し、アリコートに分け、液体窒素中で急速凍結し、-80℃で貯蔵した。

【0136】

ヒト LPL-可溶性 GPIHBP1 融合ポリペプチド：標準ポリエチレンジイミン (PEI) トランスフェクション法を用いて、3:1 のモル比で、ヒト LPL-(GGGGSS) 4 リンカー-ヒト GPIHBP1 (N 末端又は C 末端の FHA 精製タグ)、及びヒト LMF1 (hLMF1) をコードするプラスミドを、懸濁液適応 HEK293T 細胞に一過性にトランスフェクトした。振とうインキュベータにおいて細胞を 37℃ 及び 5% CO₂ で 72 時間維持した。次に、遠心分離により細胞を採取し、上澄みを 0.22 µm の無菌フィルタによりろ過した。タンジェンシャルフローろ過 (TFF) を用いて、浄化された上澄みを濃縮し、300 mM の NaCl、10% (v/v) のグリセロール及び 30 mM のイミダゾールを含有する 50 mM の HEPES (pH 7.3) (緩衝液 A) に緩衝液交換した。次に、濃縮サンプルを、緩衝液 A により平衡化させた HiTrap Ni アフィニティカラム (GE) に適用し、280 nm におけるベースライン吸光度が達成されるまでカラムを同じ緩衝液で洗浄した。次に、イミダゾールのグラジエント (緩衝液 A 中に 30 mM ～ 300 mM のイミダゾール) を実行することにより、結合融合ポリペプチドを溶出させ、融合ポリペプチドを含有する画分 (SDS-PAGE により同定) をプールし、濃縮し (Amicon 濃縮器、分画分子量 30 kDa)、300 mM の NaCl 及び 10% のグリセロールを含有する 10 mM の Tris、pH 7.5、により平衡化させた Superdex 200、16/60 サイジングカラム (GE) にロードした。SDS-PAGE によりピーク画分を分析し、LPL-GPIHBP1 融合ポリペプチドを含有する画分をプールし、濃縮し、アリコートに分け、液体窒素中で急速凍結し、-80℃で貯蔵した。

【0137】

タンパク質の部位特異的ビオチン化

Avitag を有する精製タンパク質を次のようにビオチン化した：50 mM の Bicine pH 8.3 緩衝液中の約 1 mg/mL の最終濃度の精製タンパク質を、10 mM の ATP、10 mM の酢酸マグネシウム、0.1 mM のビオチン、及び BirA ビオチンリガーゼ (Avidity) の存在下で、30℃で 1 時間インキュベートしてから、4℃で一晩置いた。次に、Amicon 濃縮器 (分画分子量 10,000) を用いてタンパク質を濃縮し、PD-10 カラムを用いて、貯蔵緩衝液 (50 mM の Tris-HCl pH 7.4、150 mM の NaCl、15% のグリセロール) に緩衝液交換し、アリコートに分け、液体窒素中で急速凍結した。

【0138】

生化学アッセイ

代替基質 EnzCheck 及び酪酸レゾルフィンを用いた LPL 酵素活性

EnzCheck アッセイ

384 ウェル Costar (登録商標) ブラックプレートにおいてアッセイを実施した。LPL 活性を決定するために、20 mM の Tris-Cl pH 8.0、150 mM の NaCl、1.5% の BSA、0.05% の Zwittergent (登録商標) を含有するアッセイ緩衝液中で、様々な量の LPL タンパク質 (LPL 単独、GPIHBP1 と同時精製した LPL、又は LPL-GPIHBP1 融合体のいずれか) を 1 mM の EnzCheck (登録商標) 基質と共にインキュベートした。ANGPTL4 又は ANGPTL3

10

20

30

40

50

が L P L 活性を阻害する能力を決定するために、固定量の L P L を A N G P T L 4 又は 3 と共に 5 分間プレインキュベートした後、E n z c h e k 基質を添加した。それぞれ 4 8 2 及び 5 2 0 n m の励起及び発光波長を使用する E n v i s i o n マルチウェルプレートリーダー (P e r k i n E l m e r) を用いて活性をモニターした。反応の初期直線相に関する加水分解速度を計算した。M i c r o s o f t E x c e l 及び G r a p h P a d P r i s m ソフトウェアを用いてデータ分析を実施した。

【0139】

酪酸レゾルフィンアッセイ

基質濃度が 9 m M であり、使用した洗浄剤が 0 . 0 2 5 % の Z w i t t e r g e n t であることを除いて、E n z c h e k と同様にしてアッセイを実施した。励起及び発光波長は次の通りであった：E x . : 5 0 0 n m ; E m . : 5 9 3 n m 。

10

【0140】

基質として V L D L 及び C M を用いた L P L 酵素活性

以下のプロトコルを使用して、精製 L P L の活性を評価した。3 8 4 ウェル C o s t a r ブラックウェルプレートにおいて、L P L タンパク質 (L P L 単独、G P I H B P 1 と同時精製した L P L 、又は L P L - G P I H B P 1 融合体のいずれか ; ウェル当たり 2 0 μ L 、アッセイ緩衝液を用いて 2 倍連続希釈) を、ヒト V L D L 又は C M (ウェル当たり 2 0 μ L 、アッセイ緩衝液を用いて希釈) と混合した。この混合物に、結合酵素系 (H R シリーズ N E F A - H R (2) 、W a k o D i a g n o s t i c s U S A) を含有する A m p l e x R e d 混合物 (ウェル当たり 2 0 m L 、P B S 中に希釈) を添加し、それぞれ 5 3 1 及び 5 9 0 n m の励起及び発光波長を使用する E n v i s i o n マルチウェルプレートリーダー (P e r k i n E l m e r) を用いてレゾルフィンの蛍光を 3 0 分間連続してモニターした。規定される場合、固定濃度の L P L を、2 0 m L の体積の A N G P T L 3 又は 4 (アッセイ緩衝液を用いて 2 倍連続希釈) と共に 1 0 分間プレインキュベートした後、V L D L を添加した。最終アッセイ濃度は、様々な L P L 、様々な A N G P T L 3 又は 4 、2 . 3 m g / m L のヒト V L D L 又は 1 0 m g / m L のヒト C M 、0 . 7 5 m M の A T P 、9 0 m M の補酵素 A 、0 . 5 U / m L A C O 、1 . 2 5 U / m L の A C S 、1 . 2 U / m L の H R P 、及び 1 0 m M の A m p l e x R e d であった。M i c r o s o f t E x c e l 及び G r a p h P a d P r i s m ソフトウェアを用いて、データ分析を実施した。

20

30

【0141】

A N G P T L 4 による L P L / G P I H B P 1 複合体破壊の検出のための E L I S A アッセイ

L P L - G P I H B P 1 複合体又は L P L - G P I H B P 1 融合体 (1 0 n M 、G P I H B P 1 の C 末端において部位特異的ビオチン化) を、増大する濃度の A N G P T L 4 (1 2 点の 2 倍連続希釈物、最高濃度 1 0 0 n M) と共にインキュベートした。次に、反応混合物をストレプトアビジン被覆 M S D 上に適用した。L P L 又は A N G P T L 4 特異的 A b を用いて L P L 及び A N G P T L 4 の存在を検出し、続いてスルホタグ付き二次 A b を用いて定量化した。シグナルを生成するために、1 x M S D の読み取り緩衝液 T を添加し、S e c t o r I m a g e r 6 0 0 0 (M e s o S c a l e D i s c o v e r y) を用いてプレートを現像した。

40

【0142】

A N G P T L 4 による L P L / G P I H B P 1 複合体破壊の検出のための S P R アッセイ C 末端ビオチン標識を有する L P L - G P I H B P 1 複合体又は融合体を、1 n M の濃度でストレプトアビジン表面に固定化した。1 0 n M の濃度の A N G P T L 4 を固定化した複合体上に流し、質量を時間の関数としてモニターした。

【0143】

L P L / G P I H B P 1 複合体への A N G P T L 4 の結合の検出のための T R - F R E T ベースのアッセイ

L P L / G P I H B P 1 複合体への A N G P T L 4 の結合の T R - F R E T ベースの検出

50

のためのアッセイは、384ウェルプレート（ProxiPlate™ 384ウェルホワイト、Perkin Elmer, USA）において20μlの最終体積で実行した。アッセイ緩衝液の組成は、20mMのHEPES pH=7.4、100mMのNaCl、10%のHI-FBS、5mMのCaCl₂であった。アッセイ手順は次の通りであった：まず、4μl/ウェルの5x6HIS-hLPL-HA-Flag/ビオチン化hGPIHBP1-Avi複合体（アッセイ緩衝液中50nMのストック、10nMの複合体最終濃度）を8μl/ウェルの緩衝液に添加した。次に、4μl/ウェルの5x非ビオチン化ANGPTL4（26-406）-Flag-6HIS-Avi（最終濃度1~1000nM）を添加し、室温で1時間インキュベーションを行った。インキュベーションの後、4μlの5x抗HA-Tb/抗myc-D2（Cisbio、アッセイ緩衝液中、1.25nMの抗HA-Tb/50nMのストレプトアビジン-D2ストック濃度に希釈）（0.3125nMの抗HA-Tb/10nMのストレプトアビジン-D2最終濃度）を添加し、混合物を室温で3時間インキュベートした。最後に、EnvisionプレートリーダーEx=320 Em=665 Em=615において、プレートを読み取った。
【0144】

10

LPL/ANGPTL4複合体破壊の検出のためのTR-FRETベースのアッセイ
LPL/GPIHBP1複合体破壊のTR-FRETベースの検出のためのアッセイは、384ウェルプレート（ProxiPlate™ 384ウェルホワイト、Perkin Elmer, USA）において20μlの最終体積で実行した。アッセイ緩衝液の組成は、20mMのHEPES pH=7.4、100mMのNaCl、10%のHI-FBS、5mMのCaCl₂であった。アッセイ手順は次の通りであった：まず、4μl/ウェルの5x6HIS-hLPL-HA-Flag/hGPIHBP1-Avi複合体（アッセイ緩衝液中50nMのストック、10nMの複合体最終濃度）を8μl/ウェルの緩衝液に添加した。次に、4μl/ウェルの5xANGPTL4（26-406）-6HIS-myc（最終濃度0.2~100nM）を添加し、室温で1時間インキュベーションを行った。インキュベーションの後、4μlの5x抗HA-Tb/抗myc-D2（Cisbio、アッセイ緩衝液中、2.5nMの抗HA-Tb/200nMの抗myc-D2ストック濃度に希釈）（0.5nMの抗HA-Tb/40nMの抗myc-D2最終濃度）を添加し、混合物を室温で3時間インキュベートした。最後に、EnvisionプレートリーダーEx=320 Em=665 Em=615において、プレートを読み取った。
【0145】

20

30

LPL/ANGPTL4複合体破壊の検出のためのAlphaLISAベースのアッセイ
LPL/ANGPTL4複合体破壊のAlphaLISA（登録商標）ベースの検出のためのアッセイは、384ウェルプレート（ProxiPlate™ 384ウェルホワイト、Perkin Elmer, USA）において20μlの最終体積で実行した。アッセイ緩衝液の組成は、20mMのHEPES pH=7.4、100mMのNaCl、10%のHI-FBS、5mMのCaCl₂であった。アッセイ手順は次の通りであった：まず、4μl/ウェルの5xHA-hLPL/hGPIHBP1複合体（アッセイ緩衝液中5nMのストック）（1nMの複合体最終濃度）を添加した。次に、4μl/ウェルの5xANGPTL4（26-406）-6HIS-myc（アッセイ緩衝液中50nMのストック、10nMの最終濃度）を添加した。1時間のインキュベーションの後、4μlの5x抗HA AlphaLISA（登録商標）アクセプタービーズ（Perkin Elmer、1xイムノアッセイ緩衝液中100μg/mL、20μg/mLの最終濃度）を添加し、混合物を再度室温で1時間インキュベートした。次に、4μlの5x抗myc AlphaLISA（登録商標）ドナービーズ（Perkin Elmerカスタムビーズコーティング、1xイムノアッセイ緩衝液中100μg/mL、20μg/mL最終濃度）を添加し、TOP Seal-Aプラスクリアプレートシール（Perkin Elmer）によりプレートを密封した。プレートを室温で一晩インキュベートし、続いて、デフォルトのAlphaLISA（登録商標）機器設定を用いてEnvisionプレートリーダーにおいて読み取った。ピペッティング技術に応じて、添加の後に1500R

40

50

PMの短い遠心分離パルスを加え、試薬がウェルの底に達することを保証した。

【0146】

水素－重水素交換／質量分析によるエピトープマッピング

質量分析 (MS) と組み合わせた水素－重水素交換 (HDx) (Woods & Hamuro, 2001, J Cell Biochem, Suppl 37: 89–98、その内容はこの目的のために本明細書に援用される) を使用して、LPLタンパク質におけるANGPTL4結合エピトープをマッピングした。文献 (Chalmers, 2006、その内容はこの目的のために本明細書に援用される) に記載される方法と同様の方法を用いて、自動化HDx／MS実験を実施した。LEAPオートサンプラー、nanoACQUITY UPLCシステム、及びSynapt G2質量分析計を含むWaters HDx－MSプラットフォームにおいて実験を実施した。ANGPTL4 (79.2 μM) の非存在下及び存在下において、LPL－GPIHBP1融合ポリペプチド (15.8 μM) をpH7の重水素Tris－HCl緩衝液中、4℃で15分間標識化した。次に、氷上で冷却したクエンチ緩衝液により標識化反応を3分間クエンチした。次に、自動化ペプシン消化及びペプチド分析のために、クエンチしたタンパク質溶液をLC－MSシステムに注入した。融合ポリペプチド単独、及びANGPTL4を伴う融合ポリペプチドのLC－MSデータを比較することにより、LPL－GPIHBP1融合ポリペプチドにおけるANGPTL4結合エピトープをマッピングした。最低3回の分析トリプリケートを用いて、全ての測定を行った。

10

20

【0147】

動物研究

オスの12週齢のC57BL／6 (Taconic, Rensselaer, NY)、12～15週齢のDBA／2J又は15～24週齢のTALLYHO／JngJマウス (Jackson Lab, Bar Harbor, ME) を研究に使用した。動物を通常の光サイクル (6:00 am～6:00 pm) で収容し、正常食又は高脂肪高スクロース食 (Research diets cat#D12331i) を与え、研究の間中、水を自由に取らせた。全ての手順は、動物福祉法規則 (Animal Welfare Act Regulations) 9 CFRパート1、2及び3、並びに他のガイドラインを順守した。Novartis Institutes for Biomedical Researchの動物実験委員会 (Institutional Animal Care and Use Committee) により承認された動物プロトコルに従って、研究を実施した。血液サンプルを尾静脈採血により採取し、Microvette管 (Sarstedt AG & Co., Numbrecht, Germany) に集め、氷上で保持した後に遠心分離した。動物をランダムに媒体群又は処置群 (n=6～8／群) のいずれかに割り当て、WAKO Diagnosticsキット (Mountain View, CA) を用いて血清トリグリセリド (TG) レベルを評価し、群間で一致させた。

30

【0148】

研究の初日に、ヒト血清アルブミン (HSA、負の対照として) 又はPBS中のLPL－GPIHBP1を0.3～30 mg／5 ml／kgの用量で動物に静脈内 (IV) 又は皮下 (SC) 投与した。投与前及び投与後の複数の時点で、尾の血液サンプルを採取した。血清TGレベルを上記のように決定した。

40

【0149】

DBA／2Jマウスにおいて脂質負荷試験を実施した。Intralipid (20% 脂肪エマルジョンとしてのリン脂質安定化大豆油、Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) をIV注射した。血清サンプルを尾静脈採血から得て、Intralipid注射の前、並びに0.5、1、及び2時間後に、TGについて測定した。

【0150】

GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) を用いて統計分析を実施した。各時点についてBonferroni

50

の方法を用いて二元配置分散分析 (ANOVA) により、そしてその後の事後検定により、経時的分析を実施した。データは、平均±平均の標準誤差 (SEM) として示される。統計的有意性は、 $p < 0.05$ のレベルで容認された。

【0151】

実施例 1: GPIHBP1 は LPL を安定化し、その凝集を防止し、リパーゼ活性を増大させる

初めに、LPL タンパク質をそれ自体で精製する試みを行った。この精製を支援するために、タグなしであるか、又は N 末端若しくは C 末端タグを有する様々な LPL 構築物を合成した。これらの LPL 構築物を哺乳類細胞において発現させ、ヘパリンクロマトグラフィ又は Ni アフィニティクロマトグラフィを用いて精製した。精製タンパク質は活性であるが、高度に凝集されることが見出された (図 1、パネル A、C、及び D)。LPL と LMF1 とのコトランスフェクションは、LPL 収率を改善せず、精製タンパク質は依然として高度に凝集されたままであった (データは示さず)。GPIHBP1 の精製可溶性形態と LPL との同時発現は、自発的不活性化に対して LPL を保護した (データは示さず)。次に、以下のようにして、LMF1 の存在下で GPIHBP1 を LPL と同時発現させた: N 末端 6-His タグ付き LPL、タグなし GPIHBP1、及び LMF1 を、3:1:1 の比率で HEK293T 細胞にコトランスフェクトした。Ni アフィニティクロマトグラフィを用いて、発現タンパク質複合体を捕獲した。このトリプルコトランスフェクションは、LPL の純度及び収率を著しく改善した (図 1、パネル B)。重要なことに、GPIHBP1 及び LMF1 の存在は、均質であり、且つサイズ排除クロマトグラフィの間に約 75 kDa の複合体として溶出される LPL/GPIHBP1 複合体を生じた (図 1、パネル C)。これは、1:1 の LPL/GPIHBP1 複合体の予測分子量とよく一致した。また LPL/GPIHBP1 複合体は、LPL 単独よりも約 3~4 倍高い活性を有し (図 1、パネル D)、LPL の自発的不活性化に対して抵抗性があった (図 1、パネル E)。

【0152】

実施例 2: LPL-GPIHBP1 融合ポリペプチドは均質であり、安定であり、且つ高比活性を有する

次に、LPL-GPIHBP1 融合構築物を作製することによって LPL 及び GPIHBP1 の非解離複合体を作製した。20 アミノ酸のセリン/グリシンリンカーによって接続された LPL 及び可溶性 GPIHBP1 オープンリーディングフレームを有する哺乳類発現ベクターを設計した。精製を助けるために、融合構築物の N 末端又は C 末端のいずれかに精製タグを付加した。図 2、パネル A は、C 末端 FLAG-6-His-Avi Tag TM (FHA) タグを有する精製 LPL-GPIHBP1 複合体を示す。Ni アフィニティ及びサイズ排除クロマトグラフィを用いて、95% を超える純粋な融合ポリペプチドを得た (図 2、パネル A)。LPL/GPIHBP1 同時発現複合体と同様に、作製された融合ポリペプチドは、凝集体がなく、サイズ排除クロマトグラフィにより約 75 kDa の分子量を有する単一の均質な種として分離された (図 2、パネル B)。これらのデータは、LPL/GPIHBP1 複合体及び融合ポリペプチドが 1 つの LPL 及び 1 つの GPIHBP1 分子からなることを示した。実際、LPL/GPIHBP1 複合体の結晶構造は、LPL 及び GPIHBP1 が 1:1 の単量体の複合体を形成することを確認した (データは示さず)。融合ポリペプチドは、同時精製 LPL/GPIHBP1 複合体と同等の活性を有し (図 2、パネル C)、それにより、融合が LPL の触媒活性に悪影響を与えないことが確認された。さらに、融合ポリペプチドは高度に安定しており、4 度で 7 日間にわたって活性を維持した (図 2、パネル D)。

【0153】

実施例 3: ANGPTL4 は LPL-GPIHBP1 複合体を解離させる

次に、ANGPTL4/LPL/GPIHBP1 相互作用を調べて、ANGPTL4 の LPL への結合が GPIHBP1 の解離をもたらすかどうかを決定した。

【0154】

最初に、同時発現 L P L / G P I H B P 1 複合体又は L P L - G P I H B P 1 融合ポリペプチドを、C 末端ビオチン化 G P I H B P 1 を介してストレプトアビジン表面に固定化した。次に、タンパク質を A N G P T L 4 と共にインキュベートし、結合した A N G P T L 4 及び L P L の変化を、それぞれの高アフィニティ抗体によりモニターした。アッセイの概略図は、図 3、パネル A の上部に示される。複合体を A N G P T L 4 と共にインキュベートすると、A N G P T L 4 濃度に応じて、同時発現 L P L / G P I H B P 1 複合体からの L P L の移動が観察された。一方、A N G P T L 4 は、共有結合 L P L - G P I H B P 1 融合ポリペプチドから L P L を移動させることはできなかった（図 3、パネル A、左側）。それに応じて、結合 A N G P T L 4 を探索すると、同時発現 L P L / G P I H B P 1 複合体によって A N G P T L 4 は捕獲されなかった。しかしながら、A N G P T L 4 濃度に応じて、A N G P T L 4 は、G P I H B P 1 に共有結合した L P L 上に蓄積した（図 3、パネル A、右側）。

10

【0155】

次に、S P R を用いて A N G P T L と L P L 及び G P I H B P 1 との相互作用を分析した（図 3、パネル B）。A N G P T L 4 による同時発現 L P L / G P I H B P 1 複合体からの L P L の移動は確認されたが、融合ポリペプチドからの移動は確認されなかった。

【0156】

最後に、T R - F R E T アッセイにおいて、A N G P T L 4 は、L P L - G P I H B P 1 融合ポリペプチドに結合し（図 3、パネル C、左側）、L P L / G P I H B P 1 複合体を解離させる（図 3、パネル C、右側）ことが観察された。また A N G P T L 3 も、A N G P T L 4 ほど効率的ではないが、複合体を解離させることができた（データは示さず）。

20

【0157】

これらのデータは、A N G P T L 4 及び G P I H B P 1 の L P L への結合が相互に排他的であることを示した。実際、L P L / G P I H B P 1 複合体が遊離 G P I H B P 1 又は A N G P T L 4 により曝露されると、タンパク質はいずれも、同様の I C 5 0 値で複合体を解離させることができた（図 3、パネル D）。

【0158】

これらの観察は、L P L に対する A N G P T L 4 及び G P I H B P 1 の機能的競合と一致した。したがって我々は、A N G P T L 4 の不活性化に対して、L P L - G P I H B P 1 融合ポリペプチドが、遊離 L P L 及び同時発現 L P L / G P I H B P 1 複合体よりも抵抗性であり得ると推測した。

30

【0159】

実施例 4：L P L - G P I H B P 1 融合体は A N G P T L 4 及び A N G P T L 3 による不活性化に対して抵抗性である

L P L の酵素活性に対する A N G P T L 3 及び A N G P T L 4 の効果を調べた。L P L / G P I H B P 1 同時発現複合体は、A N G P T L 4 の不活性化に対して L P L 単独よりも 6 倍以上抵抗性であることが観察された（I C 5 0 はそれぞれ 1 9 n M 及び 3 n M）（図 4、パネル A）。同様に、L P L / G P I H B P 1 同時発現複合体は、A N G P T L 3 の不活性化に対しても、L P L 単独よりも抵抗性であった（> 3 7 倍）（I C 5 0 はそれぞれ 3 0 0 n M 及び 8 n M）（図 4、パネル B）。これにより、G P I H B P 1 は L P L を自発的不活性化から保護するだけでなく、A N G P T L による不活性化に対しても安定化することが示された。この安定化効果は、L P L - G P I H B P 1 融合ポリペプチドでは、はるかにより顕著であった。A N G P T L 4 に媒介される融合ポリペプチドの不活性化の I C 5 0 は、L P L 単独よりも 3 5 倍以上高く、同時発現 L P L / G P I H B P 1 複合体よりも 5 倍以上高かった（それぞれ、1 0 7 n M、3 n M、及び 1 9 n M）（図 4、パネル A）。A N G P T L 3 の不活性化に対する G P I H B P 1 の安定化効果も、融合ポリペプチドの場合に、より顕著であった。L P L 単独及び L P L / G P I H B P 1 同時発現複合体の I C 5 0 はそれぞれ 7 n M 及び 3 0 0 n M であるが、L P L - G P I H B P 1 融合ポリペプチドによる活性の損失は観察されなかった（図 4、パネル B）。

40

【0160】

50

実施例 5：H D x－M S 実験は L P L における A N G P T L 4 の結合エピトープをマッピングする

我々の研究はこれまでのところ、A N G P T L 4 媒介の融合ポリペプチドの不活性化が、同時発現 L P L / G P I H B P 1 複合体の不活性化よりも弱く、A N G P T L 4 が L P L に結合したままであることを実証した。したがって、融合ポリペプチドを使用して、L P L における A N G P T L 4 結合部位をマッピングした。このために、質量分析 (M S) と組み合わせて水素－重水素交換 (H D x) を利用した。この方法では、共有結合した水素原子を重水素で置換した。単離タンパク質及びタンパク質複合体を用いて交換反応を実施した。次に、2つの反応を比較した。領域がタンパク質複合体に埋め込まれる場合、この領域のアミドは、単離されたタンパク質と比較して、よりゆっくり交換することが予想された。この方法を用いて、A N G P T L 4 の存在によって遮蔽される 32 アミノ酸 (配列番号 1 のアミノ酸 157～189) の区間 d を、L P L－G P I H B P 1 融合ポリペプチドにおいて同定した (図 5、パネル A)。同じアミノ酸区間は、同時発現 L P L / G P I H B P 1 複合体においても保護された (図 5、パネル B)。これにより、L P L 及び A N G P T L 4 の相互作用は、L P L の G P I H B P 1 への融合により本質的に変更されないことが示唆された。L P L / A N G P T L 4 相互作用に関与するアミノ酸の知識は、L P L 部位特異的変異誘発による L P L－G P I H B P 1 融合ポリペプチドのさらなる安定化のためのロードマップを提供した。

10

【0161】

実施例 6：L P L－G P I H B P 1 融合ポリペプチドはいくつかのマウス系統においてトリグリセリドレベルを低下させた

20

L P L－G P I H B P 1 融合ポリペプチドの改善された薬理学的特性 (低凝集、自発的不活性化に対する抵抗性、高精製収率)、並びに L P L アンタゴニスト A N G P T L 3 及び A N G P T L 4 による不活性化に対する融合ポリペプチドの抵抗性により、我々は、融合ポリペプチドが、インビボで T G を急激に低下させるために有効な治療薬であり得ると推測した。マウスは、このような研究のために便利な動物モデルであるが、血漿 T G は、マウス系統間で大きく異なり得る。したがって、観察される効果が系統特異的でないことを保証するために、いくつかのマウス系統において L P L－G P I H B P 1 の T G 低下効果を試験した。

【0162】

30

まず C 5 7 B L / 6 マウスにおいて T G の低下を試験した。これらのマウスは本質的に低い基礎 T G (約 100 mg / d L) を有するので、その血漿 T G は、i n t r a l i p i d のポーラスにより一過性に増大させた (脂質負荷試験、図 6)。図 6 が示すように、これは、i n t r a l i p i d ポーラスの注射の約 30 分後に、T G レベルの約 5 倍のスパイクをもたらした (図 6、H S A 対照)。重要なことには、S C 投与した L P L－G P I H B P 1 は、用量依存的に T G の増大を鈍らせ、最高用量は、T G 可動域の A U C を約 80 % 減少させた (図 6、パネル A 及び B)。

【0163】

次に、約 200 mg / d L のより高い基礎 T G を有する D B A / 2 マウスにおいて、T G レベルに対する融合ポリペプチドの効果を試験した。マウス血漿中の T G レベルは、1 日の間で実質的に変化し得る (場合により、非給餌期間中に 50～60 % の低下を実証する) ので、同じ研究の一部として投与した H S A 対照に対して、融合ポリペプチド媒介の T G レベルの低下を正規化した。ここで同様に、L P L－G P I H B P 1 は、I V 投与の後に D B A / 2 マウスにおいて用量依存的に T G を低下させ、最高用量では 90 % を超える T G の低下があった (図 7、パネル A 及び B)。懸念の 1 つは、このような大きさの急速な T G の低下が、血漿中の炎症促進性の遊離脂肪酸の増大をもたらし得ることである。血漿遊離脂肪酸の増大は観察されず (図 7、パネル C)、組織により加水分解 T G が利用されることが示された。また、L P L－G P I H B P 1 を D B A / 2 マウスに毎日 5 日間投与した。肝臓、心臓、骨格筋、又は脂肪組織における明白な T G の蓄積なしに、融合ポリペプチドは一貫して血漿 T G を低下させた (図 7、パネル D 及び E)。

40

50

【0164】

より高い血漿TGを達成するために、脂質負荷試験中にLPL-GPIHBP1をDBA／2マウスにSC投与した。C57BL／6研究の結果と一致して、LPL-GPIHBP1融合ポリペプチドは、用量依存的にTGの増大を鈍らせ、最高用量は、TG可動域のAUCを約90%減少させた（図8、パネルA及びB）。最後に、約400mg／dLのベースラインTGを有する系統のTALLYHOマウスにおいてTGの低下に対するLPL-GPIHBP1の効果を試験した。この高脂血症系統において、LPL-GPIHBP1の皮下投与は、用量依存的にTG低下させ、最高用量は、TGを約70%低下させた（図9、パネルA及びB）。さらに高い基礎血漿TGを達成するために、TALLYHOマウスを高脂肪／高スクロース（HFHS）食で維持した。このレジメンはそのTGを約1000mg／dL（FCSを有するヒト患者において見られるのと同様のレベルに達する）まで増大させた。繰り返しSC投与したLPL-GPIHBP1はやはり、用量依存的に血漿TGを低下させ、最高用量は、約90%のTGの低下をもたらした（図9、パネルC及びD）。これらのデータは、インビボでLPL-GPIHBP1融合ポリペプチドがTGを急激に低下させることを確信的に実証した。

10

【0165】

実施例7：アルブミン結合部分のLPL-GPIHBP1融合体への付加はトリグリセリド低下の持続期間を延長した

LPL-GPIHBP1は、IV投与後約20分、及びSC投与の場合は約1.7時間（データは示さず）の血漿半減期を有することが決定され、それにより、様々なマウスモデルにおけるタンパク質の投与後2～5時間にわたる一過性のTGの低下が説明される。TG低下効果を延長するために、CA645のFabドメイン（Adams et al., 2016、上記）をLPL-GPIHBP1のN末端に結合させることにより、LPL-GPIHBP1融合ポリペプチドの変異体を作製した。別の構築物において、CA645 scFvをLPL-GPIHBP1のC末端に結合させた。両方の構築物がアルブミンに結合し（データは示さず）、酵素の天然基質VLDLを用いることにより改変がいずれの構築物のLPL酵素活性も損なわないことを確認した。

20

【0166】

次に、DBA／2マウスにおいてこれらの構築物がTGを低下させる能力を試験した。アルブミン結合部分の結合は、最大TG低下の持続期間を約3時間から24時間まで増大させた（図10）。

30

【0167】

配列表

配列番号1（ヒトLPL；UniProtKB／Swiss-Prot：P06858.1）

【化5】

```
MESKALLVLT LAVWLQSLTASRGGVAAADQRRDFIDIESKFALRTPEDTAEDTCHLIPGVAESVATCFHNHSSKTFM
VIHGWTVTGMYESWVPKLVAALYKREPDSNVIVVDWLSRAQEHYPVSAGYTKLVGQDVARFINWMEEFNYPLDNVH
LLGYSLGAHAAGIAGSLTNKKVNRTGLDPAGPNFEYAEAPSRLSPDDADFVDVLHTFTRGSPGRSIGIQKPVGHVD
IYPNGGTFQPGCNIGEAIIRVIAERGLGDVDQLVKCSHERSIHLFIDSLNEENPSKAYRCSSKEAFEKGLCLSCRKN
RCNNLGYEINKVRAKRSSKMYLKTRSQMPYKVFHYQVKIHFSGTESEHTNQAFEISLYGTVAESENIPFTLPEVST
NKTYSFLLIYTEVDIGELMLKLKWKSDSYFSWSDWWSSPGFAIQKIRVKAGETQKKVIFCSREKVSHLQKGKAPAVF
VKCHDKSLNKKSG
```

40

配列番号2（成熟ヒトLPL－アミノ酸28－475）

【化6】

```
ADQRRDFIDIESKFALRTPEDTAEDTCHLIPGVAESVATCFHNHSSKTFMVIHGWTVTGMYESWVPKLVAALYKREP
DSNVIVVDWLSRAQEHYPVSAGYTKLVGQDVARFINWMEEFNYPLDNVHLLGYSLGAHAAGIAGSLTNKKVNRTGL
LDPAGPNFEYAEAPSRLSPDDADFVDVLHTFTRGSPGRSIGIQKPVGHVDIYPNGGTFQPGCNIGEAIIRVIAERGLG
DVDQLVKCSHERSIHLFIDSLNEENPSKAYRCSSKEAFEKGLCLSCRKNRCNNLGYEINKVRAKRSSKMYLKTRSQ
MPYKVFHYQVKIHFSGTESEHTNQAFEISLYGTVAESENIPFTLPEVSTNKTYSFLLIYTEVDIGELMLKLKWKSD
SYFSWSDWWSSPGFAIQKIRVKAGETQKKVIFCSREKVSHLQKGKAPAVFVKCHDKSLNKKSG
```

50

配列番号 3 (「S 4 4 7 X」突然変異を有する成熟ヒト L P L)
【化 7】

ADQRRDFIDIESKFALRTPEDTAEDTCHLIPGVAESVATCHFNHSSKTFMVIHGWTVTGMYESWVPKLVAALYKREP
DSNVIVVDWLSRAQEHYPVSAGYTKLVGQDVARFINWMEEEFNYPLDNVHLLGYSLGAHAAGIAGSLTNKKVNRITG
LDPAGPNFEYAEAPSRLSPDDADFVDVLHTFTRGSPGRSIGIQKPVGHVDIYPNGGTFQPGCNIGEAIRVIAERGLG
DVDQLVKCSHERSIHLFIDSLNEENPSKAYRCSSKEAFEKGLCLSCRKNRCNNLGYEINKVRAKRSSKMYLKTRSQ
MPYKVFHYQVKIHFSGTESEHTNQAFEISLYGTVAESENIPFTLPEVSTNKTYSFLLIYTEVDIGELMLKLKWKSD
SYFSWSDWWSSPGFAIQKIRVKAGETQKKVIFCSREKVSHLQKGKAPAVFVKCHDKSLNKK

配列番号 4 (配列番号 1 のアミノ酸 3 7 - 3 3 4 ; 最小 L P L 触媒ドメイン)
【化 8】

IESKFALRTPEDTAEDTCHLIPGVAESVATCHFNHSSKTFMVIHGWTVTGMYESWVPKLVAALYKREPDSNVIVVDW
LSRAQEHYPVSAGYTKLVGQDVARFINWMEEEFNYPLDNVHLLGYSLGAHAAGIAGSLTNKKVNRITGLDPAGPNFE
YAEAPSRLSPDDADFVDVLHTFTRGSPGRSIGIQKPVGHVDIYPNGGTFQPGCNIGEAIRVIAERGLGDVDQLVKCS
HERSIHLFIDSLNEENPSKAYRCSSKEAFEKGLCLSCRKNRCNNLGYEINKVRAKRSSKMYLKTRS

10

配列番号 5 (ヒト GPI HBP 1 ; UniProtKB : Q 8 I V 1 6)
【化 9】

MKALGAVLLALLLCGRPGRGQTQQEEEEDEDEDHGPDYDEEDEDVEEEETNRLPGGRSRVLLRCYTCKSLPRDERC
NLTQNC SHGQTCTT LIAHGNTESGLLTTHSTWCTDSCQPITKTVEGTQVTMTCCQSSLCNVPPWQSSRVQDPTGKGA
GGPRGSSETVGAALLNLLAGLGAMGARRP

20

配列番号 6 (成熟ヒト GPI HBP 1 - アミノ酸 2 1 - 1 8 4)
【化 1 0】

QTQQEEEEDEDEDHGPDYDEEDEDVEEEETNRLPGGRSRVLLRCYTCKSLPRDERCNLTQNC SHGQTCTT LIAHGN
TESGLLTTHSTWCTDSCQPITKTVEGTQVTMTCCQSSLCNVPPWQSSRVQDPTGKGAGGPRGSSETVGAALLNLLA
GLGAMGARRP

配列番号 7 (ヒト GPI HBP 1 - シグナル配列なし、プロペプチドなし - アミノ酸 2 1 - 1 5 1)
【化 1 1】

QTQQEEEEDEDEDHGPDYDEEDEDVEEEETNRLPGGRSRVLLRCYTCKSLPRDERCNLTQNC SHGQTCTT LIAHGN
TESGLLTTHSTWCTDSCQPITKTVEGTQVTMTCCQSSLCNVPPWQSSRVQDPTG

30

配列番号 8 (ヒト GPI HBP 1 - プロペプチドなし - アミノ酸 1 - 1 5 1)
【化 1 2】

MKALGAVLLALLLCGRPGRGQTQQEEEEDEDEDHGPDYDEEDEDVEEEETNRLPGGRSRVLLRCYTCKSLPRDERC
NLTQNC SHGQTCTT LIAHGNTESGLLTTHSTWCTDSCQPITKTVEGTQVTMTCCQSSLCNVPPWQSSRVQDPTG

配列番号 9 (最小機能性ドメインヒト GPI HBP 1 - アミノ酸 6 3 - 1 4 8)
【化 1 3】

LRCYTCKSLPRDERCNLTQNC SHGQTCTT LIAHGNTESGLLTTHSTWCTDSCQPITKTVEGTQVTMTCCQSSLCNV
PWQSSRVQD

40

配列番号 1 0 (切断型ヒト GPI HBP 1 - アミノ酸 2 1 - 1 6 0)
【化 1 4】

QTQQEEEEDEDEDHGPDYDEEDEDVEEEETNRLPGGRSRVLLRCYTCKSLPRDERCNLTQNC SHGQTCTT LIAHGN
TESGLLTTHSTWCTDSCQPITKTVEGTQVTMTCCQSSLCNVPPWQSSRVQDPTGKGAGGPRGS

配列番号 1 1 (リンカー)
G S G

50

配列番号 1 2 (リンカー)

G S G G G

配列番号 1 3 (リンカー)

G S G G

配列番号 1 4 (リンカー)

S G G G

配列番号 1 5 (リンカー)

G G G G S

配列番号 1 6 (リンカー)

G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S

10

配列番号 1 7 (リンカー)

G G G G S G G G G S G G G G S

配列番号 1 8 (リンカー)

G P P G S

配列番号 1 9 (リンカー)

G G G S

配列番号 2 0 (リンカー)

G Y S

配列番号 2 1 (リンカー)

G S

20

配列番号 2 2 (リンカー)

S G G G G

配列番号 2 3 (リンカー)

S G G

配列番号 2 4 (リンカー)

S G

配列番号 2 5 (リンカー)

G G G G A

配列番号 2 6 (リンカー)

G G G A

30

配列番号 2 7 (リンカー)

E A A A K

配列番号 2 8 (6 H i s タグ)

H H H H H H

配列番号 2 9 (F L A G タグ)

D Y K D D D D K

配列番号 3 0 (A v i タグ)

G L N D I F E A Q K I E W H E

配列番号 3 1 (A H F タグ)

G L N D I F E A Q K I E W H E G G H H H H H D Y K D D D D K

40

配列番号 3 2 (F H A タグ)

D Y K D D D D K H H H H H H G G G L N D I F E A Q K I E W H E

配列番号 3 3 (A H F - h L P L (2 8 - 4 7 5) - (G G G G S) 4 - h G P I H B P
1 (2 1 - 1 5 1))

【化 1 5】

METDTLLLWVLLLWVPGSTGGLNDIFEAQKIEWHEGGHHHHHHHDYKDDDDKADQRRDFIDIESKFALR
 TPEDTAEDTCHLIPGVAESVATCHFNHSSKTFMVIHGWTVTGMYESWVPKLVAALYKREPDSNVIVVD
 WLSRAQEHYPVSAGYTKLVGQDVARFINWMEEEFNYPDLNVHLLGYSLGAHAAGIAGSLTNKKVNRIT
 GLDPAGPNFEYAEAPSRSPDDADFVDVLHTFTRGSPGRSIGIQKPVGHVDIYPNGGTFQPGCNIGEAIR
 VIAERGLGDVDQLVKCSHERSIHLFIDSLLNEENPSKAYRCSSKEAFEKGLCLSCRKNRCNNLGYEINKV
 RAKRSSKMYLKTRSQMPYKVFHYQVKIHFSGTESEHTNQAFEISLYGTVAESENIPFTLPEVSTNKTYSF
 LIYTEVDIGELLMLKLKWKSDSYFSWSDWWSSPGFAIQKIRVKAGETQKKVIFCSREKVSHLQKGKAPA
 VFKCHDKSLNKKSGGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGSSQTQQEEEEDEDHGPDDYDEEDEDEVEEEEE
 TNRLPGGRSRVLLRCYTCKSLPRDERCNLTQNC SHGQTCTTLIAHGNTESGLLTTHSTWCTDSCQPITK
 TVEGTQVTMTCCQSSLCNVPPWQSSRVQDPTG

10

配列番号 3 4 (A H F - h L P L (2 8 - 4 7 5) - (G G G G S) 4 - h G P I H B P 1 (2 1 - 1 5 1) (シグナル配列なし))

【化 1 6】

GLNDIFEAQKIEWHEGGHHHHHHHDYKDDDDKADQRRDFIDIESKFALRTPEDTAEDTCHLIPGVAESV
 ATCHFNHSSKTFMVIHGWTVTGMYESWVPKLVAALYKREPDSNVIVVDWLSRAQEHYPVSAGYTKLVG
 QDVARFINWMEEEFNYPDLNVHLLGYSLGAHAAGIAGSLTNKKVNRITGLDPAGPNFEYAEAPSRSPD
 DADFVDVLHTFTRGSPGRSIGIQKPVGHVDIYPNGGTFQPGCNIGEAIRVIAERGLGDVDQLVKCSHER
 SIHLFIDSLLNEENPSKAYRCSSKEAFEKGLCLSCRKNRCNNLGYEINKVRAKRSSKMYLKTRSQMPYK
 FHYQVKIHFSGTESEHTNQAFEISLYGTVAESENIPFTLPEVSTNKTYSFLIYTEVDIGELLMLKLKWKSD
 SYFSWSDWWSSPGFAIQKIRVKAGETQKKVIFCSREKVSHLQKGKAPAVFKCHDKSLNKKSGGGGG
 SGGGGSGGGGGSGGGGSSQTQQEEEEDEDHGPDDYDEEDEDEVEEEETNRLPGGRSRVLLRCYTCKSL
 PRDERCNLTQNC SHGQTCTTLIAHGNTESGLLTTHSTWCTDSCQPITKTVEGTQVTMTCCQSSLCNVPP
 WQSSRVQDPTG

20

配列番号 3 5 (A H F - h L P L (2 8 - 4 7 5) - (G 4 S) 4 - h G P I H B P 1 (2 1 - 1 5 1) - (G 4 S) 3 - P A S 2 0 0)

【化 1 7】

METDTLLLWVLLLWVPGSTGGLNDIFEAQKIEWHEGGHHHHHHHDYKDDDDKADQRRDFIDIESKFALR
 TPEDTAEDTCHLIPGVAESVATCHFNHSSKTFMVIHGWTVTGMYESWVPKLVAALYKREPDSNVIVVD
 WLSRAQEHYPVSAGYTKLVGQDVARFINWMEEEFNYPDLNVHLLGYSLGAHAAGIAGSLTNKKVNRIT
 GLDPAGPNFEYAEAPSRSPDDADFVDVLHTFTRGSPGRSIGIQKPVGHVDIYPNGGTFQPGCNIGEAIR
 VIAERGLGDVDQLVKCSHERSIHLFIDSLLNEENPSKAYRCSSKEAFEKGLCLSCRKNRCNNLGYEINKV
 RAKASSKMYLKTRSQMPYKVFHYQVKIHFSGTESEHTNQAFEISLYGTVAESENIPFTLPEVSTNKTYSF
 LIYTEVDIGELLMLKLKWKSDSYFSWSDWWSSPGFAIQKIRVKAGETQKKVIFCSREKVSHLQKGKAPA
 VFKCHDKSLNKKSGGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGSSQTQQEEEEDEDHGPDDYDEEDEDEVEEEEE
 TNRLPGGRSRVLLRCYTCKSLPRDERCNLTQNC SHGQTCTTLIAHGNTESGLLTTHSTWCTDSCQPITK
 TVEGTQVTMTCCQSSLCNVPPWQSSRVQDPTGGGGGGSGGGGGSGGGGSSSSAAASSASPAAPAPASP
 AAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAAS
 PAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPA
 PAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAASPAAPAPASPA

30

配列番号 3 6 (A H F - h L P L (2 8 - 4 7 5) - (G 4 S) 4 - h G P I H B P 1 (2 1 - 1 5 1) - (G 4 S) 3 - P A S 6 0 0)

40

【化 1 8】

METDTLLLWVLLLWVPGSTGGLNDIFEAQKIEWHEGGHHHHHHHDYKDDDDKADQRRDFIDIESKFALR
 TPEDTAEDTCHLIPGVAESVATCHFNHSSKTFMVIHGWTVTGMYESWVPKLVAALYKREPDSNVIVVD
 WLSRAQEHYPVSAGYTKLVGQDVARFINWMEEEFNPLDNVHLLGYSLGAHAAGIAGSLTNKKVNRIT
 GLDPAGPNFEYAEAPSRSPDDADFVDVLHTFTRGSPGRSIGIQKPVGHVDIYPNGGTFQPGCNIGEAIR
 VIAERGLGDVDQLVKCSHERSIHLFIDSLNEENPSKAYRCSSKEAFEKGLCLSCRKNRCNNLGYEINKV
 RAKASSKMYLKTRSQMPYKVFHYQVKIHFSGTESEHTNQAFEISLYGTVAESENIPFTLPEVSTNKTYSF
 LIYTEVDIGELLMLKLKWKSDSYFSWSDWWSSPGFAIQKIRVKAGETQKKVIFCSREKVSHLQKGKAPA
 VFVKCHDKSLNKKSGGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGSQTQQEEEEDEEDHGPDDYDEEDEDEVEEEEE
 TNRLPGGRSRVLLRCYTCKSLPRDERCNLTQNC SHGQTCTTLIAHGNTESGLLTTHSTWCTDSCQPITK
 TVEGTQVTMTCCQSSLCNVPPWQSSRVQDPTGGGGGGSGGGGGSGGGGGSSSAAASSASPAAPAPASP
 AAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAAS
 PAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPA
 PAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPA
 APAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPA
 PSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAP
 APASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPS
 APAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAP
 ASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAP
 AASPAAPAPASPAAPAPSAPAHHHHHHH

10

配列番号 3 7 (A H F - h L P L (2 8 - 4 7 5) - (G 4 S) 4 - h G P I H B P 1 (2 1 - 1 5 1) - (G 4 S) 3 - C A 6 4 5 s c F v - L V - H V)

【化 1 9】

20

METDTLLLWVLLLWVPGSTGGLNDIFEAQKIEWHEGGHHHHHHHDYKDDDDKADQRRDFIDIESKFALR
 TPEDTAEDTCHLIPGVAESVATCHFNHSSKTFMVIHGWTVTGMYESWVPKLVAALYKREPDSNVIVVD
 WLSRAQEHYPVSAGYTKLVGQDVARFINWMEEEFNPLDNVHLLGYSLGAHAAGIAGSLTNKKVNRIT
 GLDPAGPNFEYAEAPSRSPDDADFVDVLHTFTRGSPGRSIGIQKPVGHVDIYPNGGTFQPGCNIGEAIR
 VIAERGLGDVDQLVKCSHERSIHLFIDSLNEENPSKAYRCSSKEAFEKGLCLSCRKNRCNNLGYEINKV
 RAKASSKMYLKTRSQMPYKVFHYQVKIHFSGTESEHTNQAFEISLYGTVAESENIPFTLPEVSTNKTYSF
 LIYTEVDIGELLMLKLKWKSDSYFSWSDWWSSPGFAIQKIRVKAGETQKKVIFCSREKVSHLQKGKAPA
 VFVKCHDKSLNKKSGGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGSQTQQEEEEDEEDHGPDDYDEEDEDEVEEEEE
 TNRLPGGRSRVLLRCYTCKSLPRDERCNLTQNC SHGQTCTTLIAHGNTESGLLTTHSTWCTDSCQPITK
 TVEGTQVTMTCCQSSLCNVPPWQSSRVQDPTGGGGGGSGGGGGSGGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGR
 VTITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGKAPKLLYEASKLTSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYY
 CGGGYSSISDTTFGGGKVEIKGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGGSEVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAV
 SGIDLSNYAINWVRQAPGKGLEWIGIIVASGTTFYATWAKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAV
 YYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGLTVTVSS

30

配列番号 3 8 (C A 6 4 5 F a b _ H C (c o t r a n s f . C A 6 4 5 F a b _ L C) - (G 4 S) 3 - h L P L (2 8 - 4 7 5) - (G 4 S) 4 - h G P I H B P 1 (2 1 - 1 5 1) - F H A)

【化 2 0】

METDTLLLWVLLLWVPGSTGEVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKGLEWI
 GIIWASGTTFYATWAKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGLTV
 TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
 SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGGGGSADQRRDFIDIESKFALRTPEDTAEDT
 CHLIPGVAESVATCHFNHSSKTFMVIHGWTVTGMYESWVPKLVAALYKREPDSNVIVVDWLSRAQEHY
 PVSAGYTKLVGQDVARFINWMEEEFNPLDNVHLLGYSLGAHAAGIAGSLTNKKVNRITGLDPAGPNFE
 YAEAPSRSPDDADFVDVLHTFTRGSPGRSIGIQKPVGHVDIYPNGGTFQPGCNIGEAIRVIAERGLGDV
 DQLVKCSHERSIHLFIDSLNEENPSKAYRCSSKEAFEKGLCLSCRKNRCNNLGYEINKVRAKRSSKMYL
 KTRSQMPYKVFHYQVKIHFSGTESEHTNQAFEISLYGTVAESENIPFTLPEVSTNKTYSF
 LIYTEVDIGELLMLKLKWKSDSYFSWSDWWSSPGFAIQKIRVKAGETQKKVIFCSREKVSHLQKGKAPA
 VFVKCHDKSLNKKSGGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGSQTQQEEEEDEEDHGPDDYDEEDEDEVEEEETNRLPGGRSR
 VLLRCYTCKSLPRDERCNLTQNC SHGQTCTTLIAHGNTESGLLTTHSTWCTDSCQPITKTVEGTQVTMT
 CCQSSLCNVPPWQSSRVQDPTGDYKDDDDKHHHHHHGGGLNDIFEAQKIEWHE

40

配列番号 3 9 (N O V 2 7 0 4 F a b _ H C (c o t r a n s f . N O V 2 7 0 4 F a b

50

— L C) — (G 4 S) 3 — h L P L (2 8 — 4 7 5) — (G 4 S) 4 — h G P I H B P 1
(2 1 — 1 5 1) — F H A)

【化 2 1】

METDTLLLWVLLLWVPGSTGEVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMSWVRQAPGKGLEW
VSAISYSGSYTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRYGMDYWGQGLTVTS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCGGGGSGGGGSGGGGSADQRRDFIDIESKFALRT
PEDTAEDTCHLIPGVAESVATCHFNHSSKTFMVIHGWTVTGMYESWVVKLVAAALYKREPDSNVIVVDW
LSRAQEHYPVSAGYTKLVGQDVARFINWMEEEFNYPDNDVHLLGYSGLGAHAAGIAGSLTNKKVNRITGL
DPAGPNFEYAEAPSRSPDDADFDVLTFTTRGSPGRSIGIQKPVGHVDIYPNGGTFQPGCNIGEAIRVI
AERGLGDVDQLVKCSHERSIHLFIDSLNNEENPSKAYRCSSKEAFEKGLCLSCRKNRCNNLGYEINKVRA
KRSSKMYLKTRSQMPYKVFHYQVKIHFSGTESEHTNQAFEISLYGTVAESENIPFTLPEVSTNKTYSLI
YTEVDIGELLMLKLKWKSDSYFSWSDWWSSPGFAIQKIRVKAGETQKKVIFCSREKVSHLQKGKAPAV
FVKCHDKSLNKKSGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQTQQEEEEDEDHGPDDEDEDEVEEEET
NRLPGGRSRVLLRCYTCKSLPRDERCNLTQNC SHGQTCTTLIAHGNTESGLLTTHSTWCTDSCQPITKT
VEGTQVTMTCCQSSLCNVPPWQSSRVQDPTGDYKDDDDKHHHHHHGGGLNDIFEAQKIEWHE

10

配列番号 4 0 (h L P L (2 8 — 4 7 5) — (G G G G S) 4 — h G P I H B P 1 (2 1
— 1 5 1))

【化 2 2】

ADQRRDFIDIESKFALRTPEDTAEDTCHLIPGVAESVATCHFNHSSKTFMVIHGWTVTGMYESWVVKLV
AALYKREPDSNVIVVDWLSRAQEHYPVSAGYTKLVGQDVARFINWMEEEFNYPDNDVHLLGYSGLGAHA
AGIAGSLTNKKVNRITGLDPAGPNFEYAEAPSRSPDDADFDVLTFTTRGSPGRSIGIQKPVGHVDIYP
NGGTFQPGCNIGEAIRVIAERGLGDVDQLVKCSHERSIHLFIDSLNNEENPSKAYRCSSKEAFEKGLCL
CRKNRCNNLGYEINKVRAKRSSKMYLKTRSQMPYKVFHYQVKIHFSGTESEHTNQAFEISLYGTVAES
ENIPFTLPEVSTNKTYSLIYTEVDIGELLMLKLKWKSDSYFSWSDWWSSPGFAIQKIRVKAGETQKKVI
FCSREKVSHLQKGKAPAVFVKCHDKSLNKKSGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQTQQEEEEDEDH
GPDDEDEDEVEEEETNRLPGGRSRVLLRCYTCKSLPRDERCNLTQNC SHGQTCTTLIAHGNTESGL
LTTHSTWCTDSCQPITKTVEGTQVTMTCCQSSLCNVPPWQSSRVQDPTG

20

配列番号 4 1 (H i s 6 — h L P L (2 8 — 4 7 5))

【化 2 3】

HHHHHHADQRRDFIDIESKFALRTPEDTAEDTCHLIPGVAESVATCHFNHSSKTFMVIHGWTVTGMYES
WVVKLVAAALYKREPDSNVIVVDWLSRAQEHYPVSAGYTKLVGQDVARFINWMEEEFNYPDNDVHLLGY
SLGAHAAGIAGSLTNKKVNRITGLDPAGPNFEYAEAPSRSPDDADFDVLTFTTRGSPGRSIGIQKPVGH
HVDIYPNGGTFQPGCNIGEAIRVIAERGLGDVDQLVKCSHERSIHLFIDSLNNEENPSKAYRCSSKEAFE
KGLCLSCRKNRCNNLGYEINKVRAKRSSKMYLKTRSQMPYKVFHYQVKIHFSGTESEHTNQAFEISLY
GTVAESENIPFTLPEVSTNKTYSLIYTEVDIGELLMLKLKWKSDSYFSWSDWWSSPGFAIQKIRVKAGE
TQKKVIFCSREKVSHLQKGKAPAVFVKCHDKSLNKKSG

30

配列番号 4 2 (ヒ ト L P L (2 8 — 4 7 5) — F H A)

【化 2 4】

ADQRRDFIDIESKFALRTPEDTAEDTCHLIPGVAESVATCHFNHSSKTFMVIHGWTVTGMYESWVVKLV
AALYKREPDSNVIVVDWLSRAQEHYPVSAGYTKLVGQDVARFINWMEEEFNYPDNDVHLLGYSGLGAHA
AGIAGSLTNKKVNRITGLDPAGPNFEYAEAPSRSPDDADFDVLTFTTRGSPGRSIGIQKPVGHVDIYP
NGGTFQPGCNIGEAIRVIAERGLGDVDQLVKCSHERSIHLFIDSLNNEENPSKAYRCSSKEAFEKGLCL
CRKNRCNNLGYEINKVRAKRSSKMYLKTRSQMPYKVFHYQVKIHFSGTESEHTNQAFEISLYGTVAES
ENIPFTLPEVSTNKTYSLIYTEVDIGELLMLKLKWKSDSYFSWSDWWSSPGFAIQKIRVKAGETQKKVI
FCSREKVSHLQKGKAPAVFVKCHDKSLNKKSGDYKDDDDKHHHHHHGGGLNDIFEAQKIEWHE

40

配列番号 4 3 (ヒ ト A N G P T L 4 (2 6 — 4 0 6) — F L A G — 6 H I S — A v i)

50

GPVQSKSPRFASWDEMNVLAHGLLQLGQGLREHAERTRSQLSALERRLSACGSACQGTGSTDPLAP
ESRVDPEVLHSLQTQLKAQNSRIQQLFHKVAQQQRHLEKQHLRIQHLSQSQFGLLDHKHLDHEVAKPAR
RKRLPEMAQVPDPAHNVSRLHRLPRDCQELFQVGERQSGLFIEIQQGSPFLVNCKMTSDGGWTVIQR
RHDGSVDFNRPWEAYKAGFGDPHGEFWLGLEKVHSITGDRNSRLAVQLRDWDGNAELLQFSVHLGGE
DTAYSLQLTAPVAGQLGATTVPSPGLSVPFSTWDQDHDLRDKNCAKSLSGGWVFGTCSHSLNGQY
FRSIPQQRQKLKKGIFWKTWRGRYPLQATTMLIQPMAAEAASDYKDDDDKHHHHHHGGGLNDIFEA
OKIEWHE

10

ATGGAACACCGACACCCTGCTGCTGCTGGGTGCTGCTGCTGCTGCTGGGTGCCAGGATCTACAGAGCGCCGAC
CAGCGGAGAGACTTCATCGACATCGAGAGCAAGTTCGCCCTGCGGACCCCTGAGGATACCGCCGAG
GATACCTGCCACCTGATTCCAGGCGTGGCCGAGAGCGTGGCCACCTGTCACTTCAACCACAGCTCC
AAGACCTTCATGGTCATCCACGGCTGGACCGTGACCGGGATGTACGAGAGCTGGGTGCCAAACTG
GTGGCCGCCCTGTACAAGCGCGAGCCCCGACAGCAATGTGATCGTGGTGGACTGGCTGAGCAGAGC
CCAGGAACACTACCCTGTGTCCGCCGGCTACACCAAGCTCGTGGGACAGGACGTGGCCCCGGTTCA
CAACTGGATGGAAGAAGAGTTCAACTACCCCTGGACAATGTGCATCTGCTGGGCTACAGCCTGGG
AGCCCATGCCGCTGGAATTGCCGGCAGCCTGACCAACAAGAAAGTGAACCGGATACCGGCCTGGA
CCCTGCCGGCCCTAATTCGAGTATGCCGAGGCCCCCAGCAGACTGAGCCCCGACGATGCCGATT
CGTGGACGTGCTGCACACCTTACCAGAGGAAGCCCCGGCAGATCCATCGGCATCCAGAAACCTGT
GGGCCACGTGGACATCTACCCCAACGGCGGCACATTCAGCCCCGGCTGCAATATCGGCGAGGCCAT
CAGAGTGATCGCCGAGAGGGGCCCTGGGAGATGTGGATCAGCTCGTGAAGTACAGCCACGAGCGGA
GCATCCACTGTTTCATCGACTCCCTGCTGAACGAGGAAACCCCAAGCAAGTGCCTACCGGTGCAGCA
GCAAGAGGCTTCAGAGAAGGGCCTGTGCCTGAGCTGCCGGAAGAACCGGTGCAACAACCTGGGC
TACGAGATCAACAAAGTGCGGGCCAAGCGGAGCAGCAAGATGTACCTGAAAACCCGGTCCCAGATG
CCCTACAAGGTGTTCCATTATCAAGTGAAGATCCACTTCAGCGGCACCGAGAGCGAGACACACCA
ACCAGGCCTTTGAGATCAGCCTGTACGGCACCGTGGCCGAATCCGAGAACATCCCTTCACCCTGCC
CGAGGTGTCCACAAACAAGACCTACAGCTTCCTGATCTACACCGAGGTGGACATCGGCGAGCTGCT
GATGCTGAAGCTGAAATGGAAGTCCGACAGCTACTTCTCTTGAGCGACTGGTGGTCCAGCCCCGG
CTTCGCCATTAGAAAAATTAGAGTGAAGGCCGGCGAAACCCAGAAAAAAGTATCTTCTGCTCCCGC
GAGAAGGTGTCCCATCTGCAGAAGGGCAAAGCCCTGCCGTGTTGTGAAGTGCCACGACAAGAGC
CTGAACAAGAAGTCTGGCGGCGGAGGCGGATCTGGGGGAGGCGGAAGTGGCGGGGGAGGATCAG
GGGGCGGAGGATCTCAGACCCAGCAGGAAGAGGAAGAAGAGGACGAGGACCACGGCCCCGATGA
CTACGACGAAGAGGATGAGGATGAGGTGGAAGAAGAAGAGACAAACCGGCTGCCTGGCGGCAGGT
CCAGAGTGCTGCTGAGATGCTACACATGCAAGTCCCTGCCCCGGGACGAGCGGTGCAACCTGACAC
AGAATTGCTCCACGGCCAGACCTGCACCACCCTGATCGCCACGGCAATACCGAGTCTGGCCTGC
TGACCACCCACTCCACCTGCTGCCAGTCCAGCCTGTGCAACGTGCCACCTTGGCAGAGCAGCAGAGTGC
AAGTGACCATGACCTGCTGCCAGTCCAGCCTGTGCAACGTGCCACCTTGGCAGAGCAGCAGAGTGC
AGGACCCACCGGCGACTACAAGGACGACGACGACAAGCACCACCATCACCGGCGGAGGA
CTGAACGACATCTTCGAGGGCCAGAAAAATCGAGTGGCACGAATGA

20

30

ADQRRDFIDIESKFALRTPEDTAEDTCHLIPGVAESVATCHFNHSSKTFMVIHGWTVTGMYESWVPKLV
AALYKREPDSNVIVVDWLSRAQEHYPVSAGYTKLVGQDVARFINWMEEFNYPLDNVHLLGYSLGHAH
AGIAGSLTNKKVNRITGLDPAGPNFEYAEAPSRSPDDADFVDVLHTFTRGSPGRSIGIQKPVGHVDIYP
NGGTFQPGCNIGEAIRVIAERGLGDVDQLVKCSHERSIHLFIDSLNNEENPSKAYRCSSKEAFEKGLCLS
CRKNRCNNLGYEINKVAAKRSSKMYLKTRSQMPYKVFHYQVKIHFSGTESEHTNQAFEISLYGTVAES
ENIPFTLPEVSTNKYTSFLIYTEVDIGELMLKLKWKSDSYFSWSDWWSSPGFAIQKIRVKAGETQKKVI
FCSREKVSHLOKGPAPVFKCHDKSLNKKSG

40

配列番号 46 (AHF-hLPL (28-475) R294A-(GGGS)₄-hGPIHBP1 (21-151))

【化 2 8】

METDTLLLWVLLLWVPGSTGGLNDIFEAQKIEWHEGGHHHHHHHDYKDDDDKADQRRDFIDIESKFALR
 TPEDTAEDTCHLIPGVAESVATCHFNHSSKTFMVIHGWTVTGMYESWVPKLVAALYKREPDSNVIVVD
 WLSRAQEHYPVSAGYTKLVGQDVARFINWMEEEFNYPDLNVHLLGYSLGAHAAGIAGSLTNKKVNRIT
 GLDPAGPNFEYAEAPSRLSPDDADFVDVLHTFTRGSPGRSIGIQKPVGHVDIYPNGGTFQPGCNIGEAI
 VIAERGLGDVDQLVKCSHERSIHLFIDSLLNEENPSKAYRCSSKEAFEKGLCLSCRKNRCNNLGYEINKV
 AAKRSSKMYLKTRSQMPYKVFHYQVKIHFSGTESEHTNQAFEISLYGTVAESENIPFTLPEVSTNKTYSF
 LIYTEVDIGELLMKLKWKSDSYFSWSDWWSSPGFAIQKIRVKAGETQKKVIFCSREKVSHLQKGKAPA
 VFKCHDKSLNKKSGGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGSGTQQEEEEDEDHGPDDYDEEDEDEVEEEEE
 TNRLPGGRSRVLLRCYTCKSLPRDERCNLTQNC SHGQTCTTLIAHGNTESGLLTTHSTWCTDSCQPITK
 TVEGTQVTMTCCQSSLCNVPPWQSSRVQDPTG

10

配列番号 47 (AHF-hLPL (28-475) R294A-(GGGGS)4-hGPIHBP1 (21-151) (シグナル配列なし))

【化 2 9】

GLNDIFEAQKIEWHEGGHHHHHHHDYKDDDDKADQRRDFIDIESKFALRTPEDTAEDTCHLIPGVAESV
 ATCHFNHSSKTFMVIHGWTVTGMYESWVPKLVAALYKREPDSNVIVVDWLSRAQEHYPVSAGYTKLVG
 QDVARFINWMEEEFNYPDLNVHLLGYSLGAHAAGIAGSLTNKKVNRITGLDPAGPNFEYAEAPSRLSPD
 DADFVDVLHTFTRGSPGRSIGIQKPVGHVDIYPNGGTFQPGCNIGEAI VIAERGLGDVDQLVKCSHER
 SIHLFIDSLLNEENPSKAYRCSSKEAFEKGLCLSCRKNRCNNLGYEINKVAAKRSSKMYLKTRSQMPYK
 VFHYQVKIHFSGTESEHTNQAFEISLYGTVAESENIPFTLPEVSTNKTYSFLIYTEVDIGELLMKLKWKSD
 SYFSWSDWWSSPGFAIQKIRVKAGETQKKVIFCSREKVSHLQKGKAPAVFKCHDKSLNKKSGGGGG
 SGGGGSGGGGGSGGGGSGTQQEEEEDEDHGPDDYDEEDEDEVEEEEETNRLPGGRSRVLLRCYTCKSL
 PRDERCNLTQNC SHGQTCTTLIAHGNTESGLLTTHSTWCTDSCQPITKTVEGTQVTMTCCQSSLCNVPP
 WQSSRVQDPTG

20

配列番号 48 (hLPL (28-475) R294A-(GGGGS)4-hGPIHBP1 (21-151))

【化 3 0】

ADQRRDFIDIESKFALRTPEDTAEDTCHLIPGVAESVATCHFNHSSKTFMVIHGWTVTGMYESWVPKLV
 AALYKREPDSNVIVVDWLSRAQEHYPVSAGYTKLVGQDVARFINWMEEEFNYPDLNVHLLGYSLGAHA
 AGIAGSLTNKKVNRITGLDPAGPNFEYAEAPSRLSPDDADFVDVLHTFTRGSPGRSIGIQKPVGHVDIYP
 NGGTFQPGCNIGEAI VIAERGLGDVDQLVKCSHERSIHLFIDSLLNEENPSKAYRCSSKEAFEKGLCLS
 CRKNRCNNLGYEINKVAAKRSSKMYLKTRSQMPYKVFHYQVKIHFSGTESEHTNQAFEISLYGTVAES
 ENIPFTLPEVSTNKTYSFLIYTEVDIGELLMKLKWKSDSYFSWSDWWSSPGFAIQKIRVKAGETQKKVI
 FCSREKVSHLQKGKAPAVFKCHDKSLNKKSGGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGSGTQQEEEEDEDH
 GPDDYDEEDEDEVEEEEETNRLPGGRSRVLLRCYTCKSLPRDERCNLTQNC SHGQTCTTLIAHGNTESGL
 LTTHSTWCTDSCQPITKTVEGTQVTMTCCQSSLCNVPPWQSSRVQDPTG

30

配列番号 49 (ヒト可溶性 GPIHBP1 (21-151) - FLAG-HIS6-Avi)

【化 3 1】

QTQQEEEEDEDHGPDDYDEEDEDEVEEEEETNRLPGGRSRVLLRCYTCKSLPRDERCNLTQNC SHGQT
 CTTLIAHGNTESGLLTTHSTWCTDSCQPITKTVEGTQVTMTCCQSSLCNVPPWQSSRVQDPTGDYKDD
 DDKHHHHHHGGGLNDIFEAQKIEWHE

40

配列番号 50 (ヒトANGPTL3 (17-460) - FLAG-HIS6-Avi)

【化 3 2】

SRIDQDNSSFDSLSPEPKSRFAMLDVVKILANGLLQLGHGLKDFVHKTKGQINDIFQKLNIFDQSFYDLS
 LQTSEIKKEEEKELRRTTYKLQVKNEEVKNMSLELNSKLESLLKILLQKQVKYLEEQLTNLIQNQPETPEH
 PEVTSCLKTFVEKQDNSIKDLLQTVEDQYKQLNQHSQIKEIENQLRRTSIQEPTISLSSKPRAPRTTPFL
 QLNIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNET
 WENYKYGFGRLDGEFVLGLEKIYSIVKQSNYVLRLEEDWKNKHIEYSFYLGHNHETNYTLHLVAITGN
 VPNAIPENKDLVFSTWDHAKGHFNCPGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRASKPERRRGLSW
 KSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESFEDYKDDDDKHHHHHHGGGLNDIFEAQKIEWHE

配列番号 5 1 (L P L (2 8 - 4 7 5) - (G 4 S) 4 - h G P I H B P 1 (2 1 - 1 5
 1) - F L A G - H I S 6 - A v i) 10

【化 3 3】

METDTLLLWVLLLWVPGSTGADQRRDFIDIESKFALRTPEDTAEDTCHLIPGVAESVATCHFNHSSKTFM
 VIHGWTVTGMYESWVVKLVAALYKREPDSNVIVVDWLSRAQEHYPVSAGYTKLVGQDVARFINWMEEE
 FNYPLDNVHLLGYSLGAAHAGIAGSLTNKKVNRITGLDPAGPNFEYAEAPSRLSPDDADFVDVLHTFTRG
 SPGRSIGIQKPVGHVDIYPNGGTFFQPGCNIGEAIRVIAERGLGDVDQLVKCSHERSIHLFIDSLLNEENP
 SKAYRCSSKEAFEKGLCLSCRKNRCNNLGYEINKVRAKRSSKMYLKTRSQMPYKVFHYQVKIHFSGTES
 ETHNTQAFEISLYGTVAESENIPFTLPEVSTNKTYSFLLIYETVDIGELMLKLKWKSDSYFSWSDWWSSP
 GFAIQKIRVKAGETQKKVIFCSREKVSHLQKGAFAVFKCHDKSLNKKSGGGGGSGGGGGSGGGGGSG
 GGGSQTQQEEEEDEDHGPDYDEDEDEVEEEEETNRLPGGRSRVLLRCYTCKSLPRDERCNLTQNC
 HGQTCTTLIAHGNTESGLLTTHSTWCTDSCQPITKTVEGTQVTMTCCQSSLCNVPPWQSSRVQDPTGD
 YKDDDDKHHHHHHGGGLNDIFEAQKIEWHE 20

配列番号 5 2 (シグナルペプチド)

M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G

配列番号 5 3 (L P L (2 8 - 4 7 5) - (G 4 S) 4 - h G P I H B P 1 (2 1 - 1 5
 1) - F L A G - H I S 6 - A v i)

【化 3 4】

ADQRRDFIDIESKFALRTPEDTAEDTCHLIPGVAESVATCHFNHSSKTFMVIHGWTVTGMYESWVVKLV
 AALYKREPDSNVIVVDWLSRAQEHYPVSAGYTKLVGQDVARFINWMEEEFNYPLDNVHLLGYSLGAAH
 AGIAGSLTNKKVNRITGLDPAGPNFEYAEAPSRLSPDDADFVDVLHTFTRGSPGRSIGIQKPVGHVDIYP
 NGGTFFQPGCNIGEAIRVIAERGLGDVDQLVKCSHERSIHLFIDSLLNEENPSKAYRCSSKEAFEKGLCL
 CRKNRCNNLGYEINKVRAKRSSKMYLKTRSQMPYKVFHYQVKIHFSGTESETHNTQAFEISLYGTVAES
 ENIPFTLPEVSTNKTYSFLLIYETVDIGELMLKLKWKSDSYFSWSDWWSSPGFAIQKIRVKAGETQKKVI
 FCSREKVSHLQKGAFAVFKCHDKSLNKKSGGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGSQTQQEEEEDEDH
 GPDDYDEDEDEVEEEEETNRLPGGRSRVLLRCYTCKSLPRDERCNLTQNC SHGQTCTTLIAHGNTESGL
 LTTHSTWCTDSCQPITKTVEGTQVTMTCCQSSLCNVPPWQSSRVQDPTGDYKDDDDKHHHHHHGGG
 LNDIFEAQKIEWHE 30

配列番号 5 4 (L P L (2 8 - 4 7 5) - (G 4 S) 4 - h G P I H B P 1 (2 1 - 1 5
 1))

【化 3 5】

ADQRRDFIDIESKFALRTPEDTAEDTCHLIPGVAESVATCHFNHSSKTFMVIHGWTVTGMYESWVVKLV
 AALYKREPDSNVIVVDWLSRAQEHYPVSAGYTKLVGQDVARFINWMEEEFNYPLDNVHLLGYSLGAAH
 AGIAGSLTNKKVNRITGLDPAGPNFEYAEAPSRLSPDDADFVDVLHTFTRGSPGRSIGIQKPVGHVDIYP
 NGGTFFQPGCNIGEAIRVIAERGLGDVDQLVKCSHERSIHLFIDSLLNEENPSKAYRCSSKEAFEKGLCL
 CRKNRCNNLGYEINKVRAKRSSKMYLKTRSQMPYKVFHYQVKIHFSGTESETHNTQAFEISLYGTVAES
 ENIPFTLPEVSTNKTYSFLLIYETVDIGELMLKLKWKSDSYFSWSDWWSSPGFAIQKIRVKAGETQKKVI
 FCSREKVSHLQKGAFAVFKCHDKSLNKKSGGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGSQTQQEEEEDEDH
 GPDDYDEDEDEVEEEEETNRLPGGRSRVLLRCYTCKSLPRDERCNLTQNC SHGQTCTTLIAHGNTESGL
 LTTHSTWCTDSCQPITKTVEGTQVTMTCCQSSLCNVPPWQSSRVQDPTG 40

配列番号 5 5 (h L P L (2 8 - 4 7 5) - (G 4 S) 4 - h G P I H B P 1 (2 1 - 1 50

5 1))

【化 3 6】

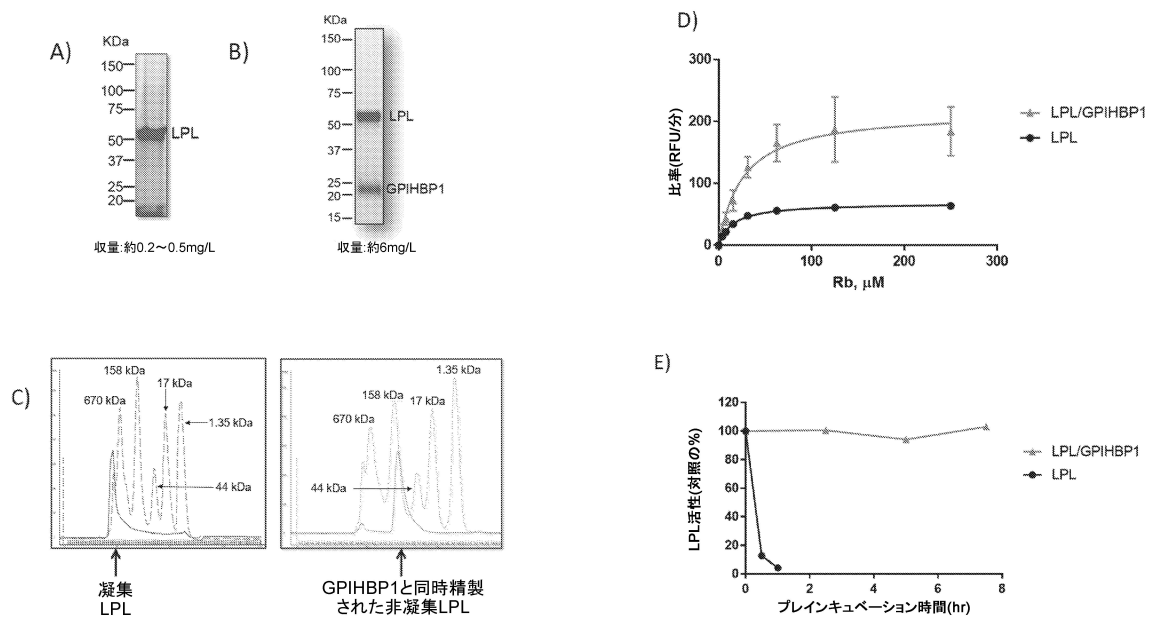
ADQRRDFIDIESKFALRTPEDTAEDTCHLIPGVAESVATCHFNHSSKTFMVIHGWTVTGMYESWVPKLV
 AALYKREPDSNVIVVDWLSRAQEHYPVSAGYTKLVGQDVARFINWMEEEFNYPOLDNVHLLGYSLGAHA
 AGIAGSLTNKKVNRITGLDPAGPNFEYAEAPSRSPDDADFVDVLHTFTRGSPGRSIGIQKPVGHVDIYP
 NGGTFFQPGCNIGEAIIRVIAERGLGDVDQLVKCSHERSIHLFIDSLNEENPSKAYRCSSKEAFEKGLCLS
 CRKNRCNNLGYEINKVRKRSSKMYLKTRSQMPYKVFHYQVKIHFSGTSEHTNQAFEISLYGTVAES
 ENIPFTLPEVSTNKTYSFLLIYTEVDIGELMLKLKWKSDSYFWSDDWWSSPGFAIQKIRVKAGETQKKVI
 FCSREKVSHLQKGKAPAVFVKCHDKSLNKKSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGTQEQEEEEDEEDH
 GPDDYDEEDEDEVEEEETNRLPGGRSRVLLRCYTCKSLPRDERCNLTQNCSHGQTCTTLIAHGNTESGL
 LTTHSTWCTDSCQPITKTVEGTQVTMTCCQSSLCNVPPWQSSRVQDPTG

10

【図面】

【図 1 - 1】

【図 1 - 2】



20

30

図 1

図 1 (続き)

40

50

【図 3 - 3】

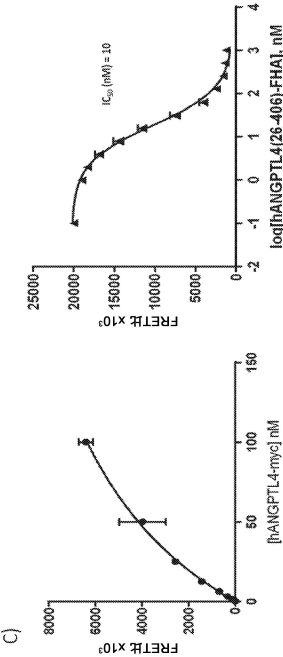


図 3 (続き)

【図 3 - 4】

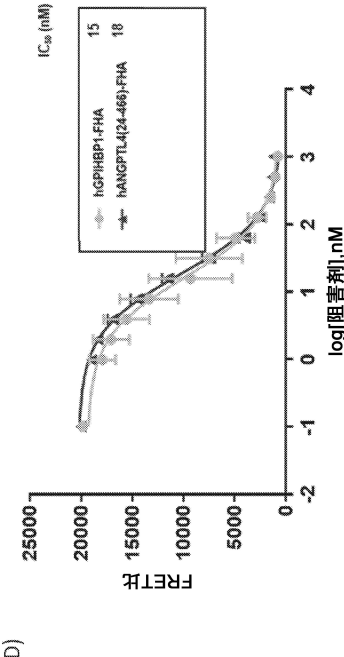


図 3 (続き)

【図 4】

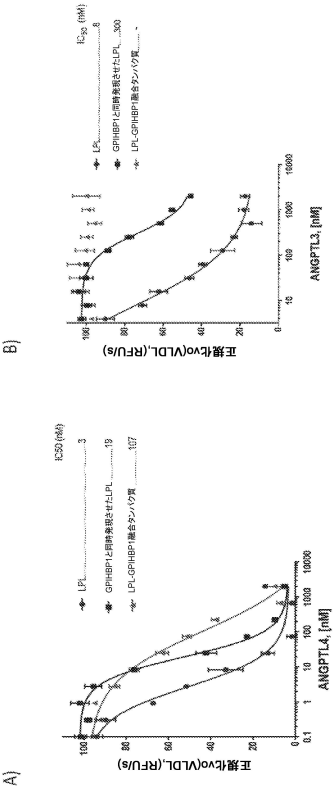


図 4

【図 5 - 1】

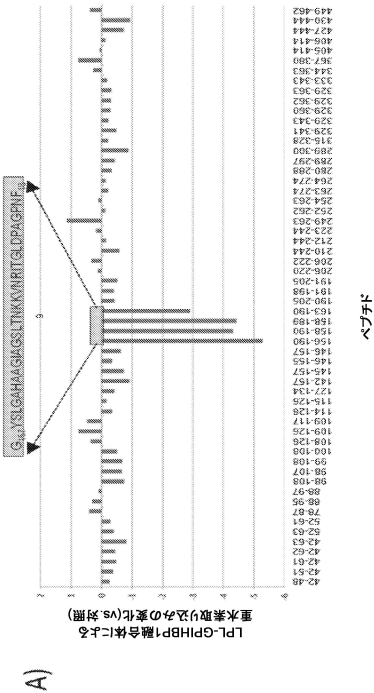


図 5

10

20

30

40

50

【図 5 - 2】

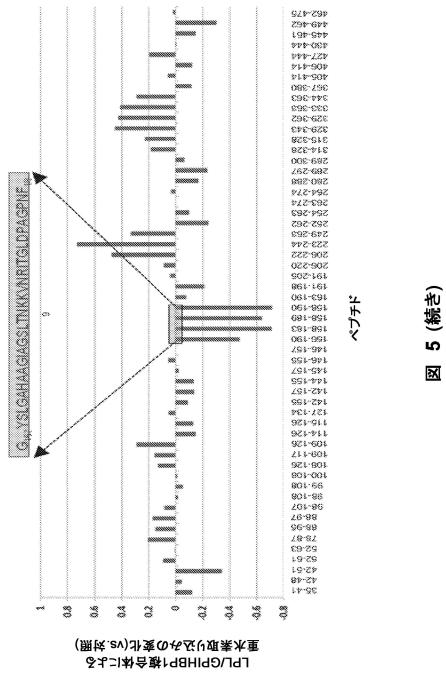


図 5 (続き)

【図 6】

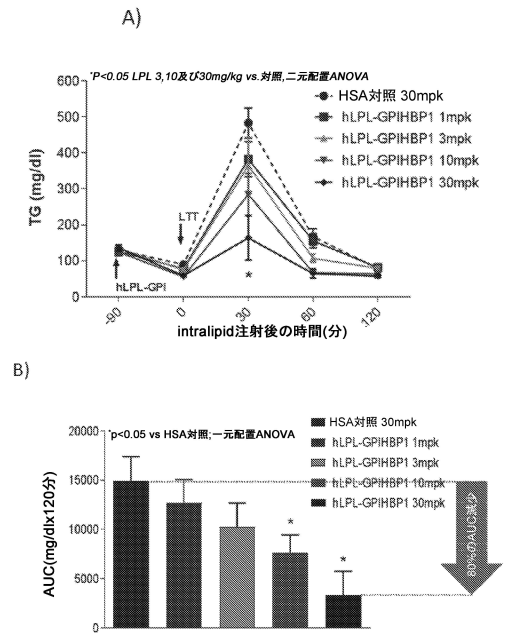


図 6

【図 7 - 1】

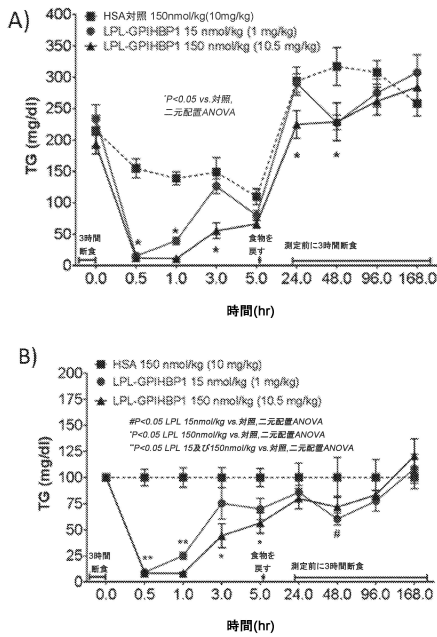


図 7

【図 7 - 2】

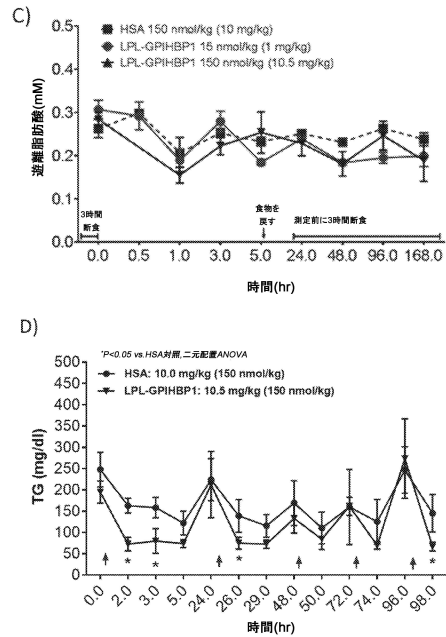


図 7 (続き)

【図 7 - 3】

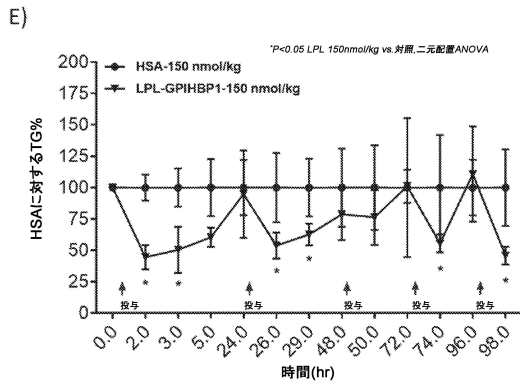


図 7 (続き)

【図 8】

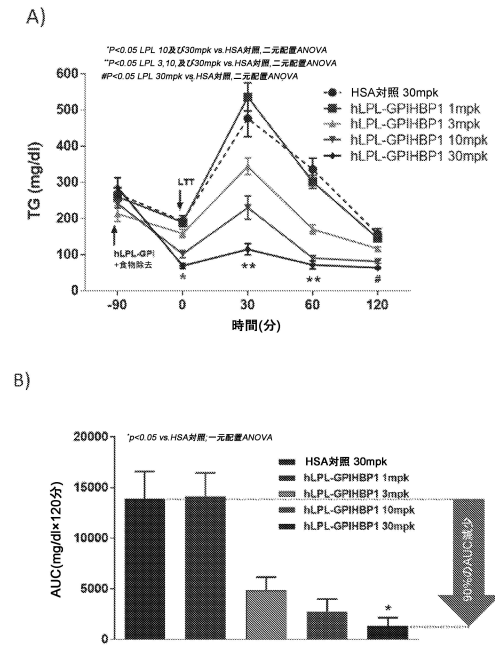


図 8

【図 9 - 1】

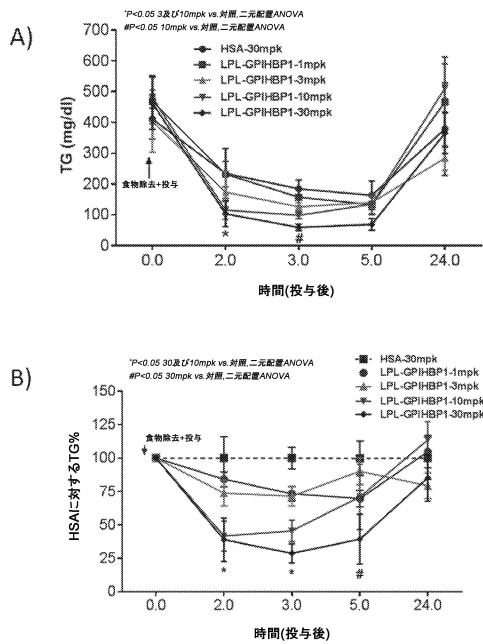


図 9

【図 9 - 2】

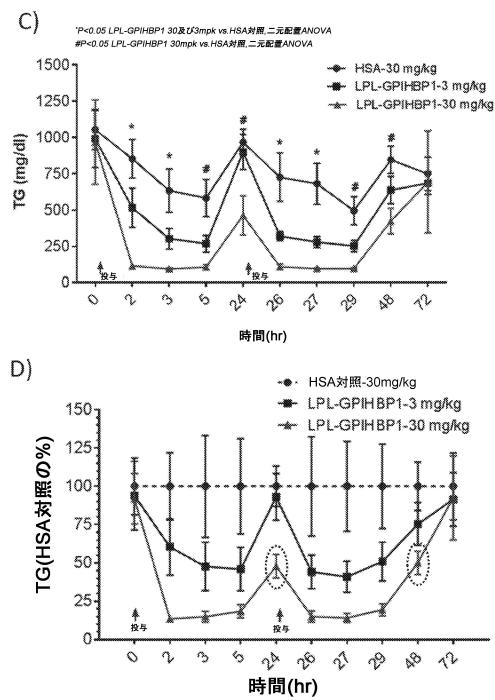


図 9 (続き)

10

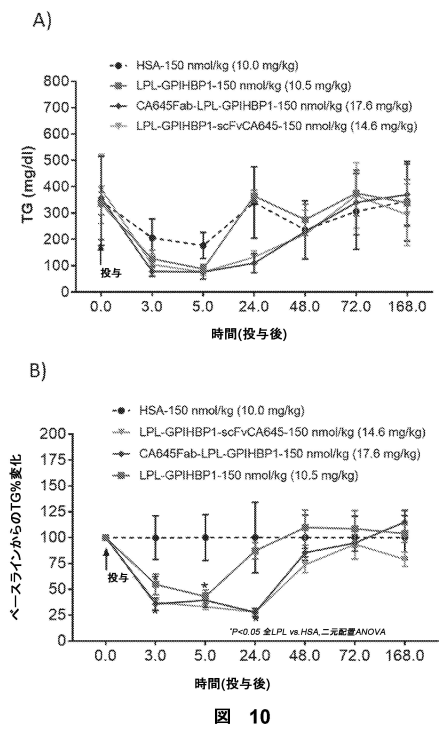
20

30

40

50

【図 10】



10

20

図 10

【配列表】

202251362600001.xml

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2019/060140

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/705 C12N9/20 A61K38/00 ADD.				
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K C12N A61K				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
X	SIMON MYSLING ET AL: "The acidic domain of the endothelial membrane protein GPIHBP1 stabilizes lipoprotein lipase activity by preventing unfolding of its catalytic domain", ELIFE, vol. 5, 3 January 2016 (2016-01-03), XP055667571, DOI: 10.7554/eLife.12095 abstract page 20, paragraph 3 - paragraph 4; figures 2,7 ----- -/--	1-3, 15, 16 4-11, 17, 18, 23-26		
Y				
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.				
* Special categories of cited documents : <table border="0"> <tr> <td style="vertical-align: top;"> "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td style="vertical-align: top;"> "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family </td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search 12 February 2020		Date of mailing of the international search report 21/02/2020		
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Gurdjian, Didier		

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2019/060140

Q(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2018/020477 A1 (UNIV CALIFORNIA [US]; UNIV GUNMA [JP]; MIYASHITA KAZUYA [JP]) 1 February 2018 (2018-02-01) abstract paragraph [0050]; sequence 1 page 87; sequence 5 paragraph [0099] - paragraph [0100]; claims 1-23; figure 6; sequence 4 -----	4-11, 17, 18, 23-26
A	MART REIMUND ET AL: "Evidence for Two Distinct Binding Sites for Lipoprotein Lipase on Glycosylphosphatidylinositol-anchored High Density Lipoprotein-binding Protein 1 (GPIHBP1)", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 290, no. 22, 29 May 2015 (2015-05-29) , pages 13919-13934, XP055667441, US ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M114.634626 abstract; figure 12 -----	1-26
A	ANNE P. BEIGNEUX ET AL: "Assessing the Role of the Glycosylphosphatidylinositol-anchored High Density Lipoprotein-binding Protein 1 (GPIHBP1) Three-finger Domain in Binding Lipoprotein Lipase", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 286, no. 22, 3 June 2011 (2011-06-03) , pages 19735-19743, XP055667439, US ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M111.242024 abstract; figure 4 -----	1-26

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2019/060140

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2018020477 A1	01-02-2018	US 2019160076 A1 WO 2018020477 A1	30-05-2019 01-02-2018

40

フロントページの続き

(51)国際特許分類			F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/55	(2006.01)	C 1 2 N	15/55		4 C 0 8 6
C 1 2 N	15/63	(2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z	4 C 0 8 7
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/15		4 H 0 4 5
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19		
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21		
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10		
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P	21/02	A	
A 6 1 K	47/64	(2017.01)	A 6 1 K	47/64		
A 6 1 K	38/46	(2006.01)	A 6 1 K	38/46		
A 6 1 P	3/00	(2006.01)	A 6 1 P	3/00		
A 6 1 P	3/06	(2006.01)	A 6 1 P	3/06		
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	3/10		
A 6 1 P	1/18	(2006.01)	A 6 1 P	1/18		
A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 P	1/16		
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P	17/00		
A 6 1 P	27/02	(2006.01)	A 6 1 P	27/02		
A 6 1 P	3/04	(2006.01)	A 6 1 P	3/04		
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00		
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P	13/12		
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00		
A 6 1 K	35/76	(2015.01)	A 6 1 K	35/76		
A 6 1 K	31/7088	(2006.01)	A 6 1 K	31/7088		

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. プルロニック
2. PLURONIC
3. TRITON

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, マサチューセッツ アベニュー
2 5 0, ノバルティス インスティテューツ フォー バイオメディカル リサーチ, インコーポレ
ーテッド

(72)発明者 ニモンカー, アミタブー

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, マサチューセッツ アベニュー
2 5 0, ノバルティス インスティテューツ フォー バイオメディカル リサーチ, インコーポレ
ーテッド

(72)発明者 トラウガー, ジョン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, マサチューセッツ アベニュー
2 5 0, ノバルティス インスティテューツ フォー バイオメディカル リサーチ, インコーポレ
ーテッド

(72)発明者 ボズネセンスキ, アンドレイ イゴレビッチ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, マサチューセッツ アベニュー
2 5 0, ノバルティス インスティテューツ フォー バイオメディカル リサーチ, インコーポレ
ーテッド

(72)発明者 ウェルドン, スティーブン クレイグ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, マサチューセッツ アベニュー
2 5 0, ノバルティス インスティテューツ フォー バイオメディカル リサーチ, インコーポレ

ーテッド

F ターム (参考) 4B050 CC04 DD07 LL01
 4B064 AG01 CA02 CA05 CA06 CA08 CA10 CA19 CC24 DA01
 4B065 AA01X AA01Y AA57X AA57Y AA72X AA72Y AA90X AA90Y AB01 AC14
 BA02 CA24 CA44
 4C076 AA95 CC14 CC15 CC16 CC18 CC21 CC41 EE59
 4C084 AA02 AA13 BA44 DC22 NA14 ZA33 ZA36 ZA70 ZA75 ZA89
 ZC21 ZC33 ZC35
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA33 ZA36 ZA70 ZA75
 ZA89 ZC21 ZC33 ZC35
 4C087 AA01 AA02 BB65 BC83 CA12 NA14 ZA33 ZA36 ZA70 ZA75
 ZA89 ZC21 ZC33 ZC35
 4H045 AA10 AA20 AA30 BA41 CA40 DA50 DA89 EA20 FA72 FA74