(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)公開番号
特開2022-13959
(P2022-13959A)
(43)公開日　令和4年1月19日(2022.1.19)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C12N 15/16	*(2006.01)*	C12N	15/16	ZNA	4B065
C07K 19/00	*(2006.01)*	C07K	19/00		4C076
C07K 14/575	*(2006.01)*	C07K	14/575		4C084
C12N 15/10	*(2006.01)*	C12N	15/10	200Z	4H045
C12N 15/63	*(2006.01)*	C12N	15/63	Z	

審査請求　未請求　請求項の数　15　ＯＬ　（全21頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2018-207134(P2018-207134)
(22)出願日　平成30年11月2日(2018.11.2)

(71)出願人　000000066
味の素株式会社
東京都中央区京橋１丁目１５番１号
(71)出願人　512300159
エクスエル‐プロテイン ゲーエムベーハー
ドイツ連邦共和国 ８５３５４ フライジング，リセ‐マイトナー‐ストリート ３０
(74)代理人　110002147
特許業務法人酒井国際特許事務所
(72)発明者　北原 吉朗
神奈川県川崎市川崎区鈴木町１－１ 味の素株式会社内
(72)発明者　岡松 順子
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　融合タンパク質

(57)【要約】　（修正有）【課題】安定性が向上したＧＬＰ－１（１－３７）改変体を提供する。【解決手段】下記（ａ）ならびに（ｂ）：（ａ）ある特定の配列のアミノ酸配列からなるＧＬＰ－１（１－３７）、または前記ある特定の配列のアミノ酸配列において１～３個のアミノ酸残基が置換されているＧＬＰ－１（１－３７）変異体；ならびに（ｂ）少なくとも５０個のプロリンおよびアラニン残基からなるアミノ酸配列を含むランダムコイルポリペプチド部分、を含む、融合タンパク質。【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
下記（ａ）ならびに（ｂ）を含む、融合タンパク質：
（ａ）配列番号１のアミノ酸配列からなるＧＬＰ－１（１－３７）、または配列番号１のアミノ酸配列において１～３個のアミノ酸残基が置換されているＧＬＰ－１（１－３７）変異体；ならびに
（ｂ）少なくとも５０個のプロリンおよびアラニン残基からなるアミノ酸配列を含むランダムコイルポリペプチド部分。
【請求項２】
ランダムコイルポリペプチド部分が、ＧＬＰ－１（１－３７）またはＧＬＰ－１（１－３７）変異体のＣ末端に付加されている、請求項１記載の融合タンパク質。
【請求項３】
ランダムコイルポリペプチド部分が、５０～３０００個のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含む、請求項１または２記載の融合タンパク質。
【請求項４】
プロリン残基が、ランダムコイルポリペプチド部分のアミノ酸配列の１０％超かつ７５％未満を構成する、請求項１～３のいずれか一項記載の融合タンパク質。
【請求項５】
ランダムコイルポリペプチド部分が、複数のアミノ酸リピートを含み、前記リピートが、プロリンおよびアラニン残基からなり、６個以下の連続したアミノ酸残基が同一である、請求項１～４のいずれか一項記載の融合タンパク質。
【請求項６】
前記ＧＬＰ－１（１－３７）変異体が、配列番号１のアミノ酸配列において１～６番目のアミノ酸残基のいずれか１個が別のアミノ酸残基に置換されているＧＬＰ－１（１－３７）変異体である、請求項１～５のいずれか一項記載の融合タンパク質。
【請求項７】
前記ＧＬＰ－１（１－３７）変異体が、配列番号１のアミノ酸配列において４番目のフェニルアラニン残基または６番目のアルギニン残基が別のアミノ酸残基に置換されているＧＬＰ－１（１－３７）変異体である、請求項１～６のいずれか一項記載の融合タンパク質。
【請求項８】
前記ＧＬＰ－１（１－３７）変異体が、配列番号１のアミノ酸配列において４番目のフェニルアラニン残基または６番目のアルギニン残基がアラニン残基に置換されているＧＬＰ－１（１－３７）変異体である、請求項７記載の融合タンパク質。
【請求項９】
配列番号１のアミノ酸配列において４番目のフェニルアラニン残基または６番目のアルギニン残基が別のアミノ酸残基に置換されているＧＬＰ－１（１－３７）変異体。
【請求項１０】
配列番号１のアミノ酸配列において４番目のフェニルアラニン残基または６番目のアルギニン残基がアラニン残基に置換されている、請求項９記載のＧＬＰ－１（１－３７）変異体。
【請求項１１】
請求項１～８のいずれか一項記載の融合タンパク質、あるいは請求項９または１０記載のＧＬＰ－１（１－３７）変異体を含む、医薬。
【請求項１２】
請求項１～８のいずれか一項記載の融合タンパク質、あるいは請求項９または１０記載のＧＬＰ－１（１－３７）変異体を含む、糖尿病治療剤。
【請求項１３】
請求項１～８のいずれか一項記載の融合タンパク質、あるいは請求項９または１０記載のＧＬＰ－１（１－３７）変異体をコードするポリヌクレオチド。

【請求項１４】
請求項１３記載のポリヌクレオチド、およびそれに作動可能に連結されているプロモーターを含む発現ベクター。
【請求項１５】
請求項１４記載の発現ベクターを含む宿主細胞。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、融合タンパク質などに関する。
【背景技術】
【０００２】
グルカゴン様ペプチド－１（ＧＬＰ－１）は、前駆体タンパク質であるプレプログルカゴンのプロセシングにより生成されるグルカゴン関連ペプチドの一つであり、栄養素刺激により消化管上皮で分泌されるペプチドホルモンである。ＧＬＰ－１は、膵臓におけるインスリン分泌促進作用（インクレチン作用）との関連性を有することが考えられていた。
【０００３】
ＧＬＰ－１は当初、プレプログルカゴンペプチドの９２位～１２８位のアミノ酸配列を有する３７アミノ酸からなるペプチド（以下、「ＧＬＰ－１（１－３７）」と呼ぶ）として同定された。その後、ＧＬＰ－１（１－３７）における７位～３７位のアミノ酸配列を有する３１アミノ酸のペプチド（以下、「ＧＬＰ－１（７－３７）」と呼ぶ）およびそのアミド体がインクレチン作用の活性本体として作用していることが明らかになった（特許文献１）。
【０００４】
ＧＬＰ－１（７－３７）は、インクレチン作用および膵臓におけるインスリン産生細胞誘導作用（β細胞増殖促進およびアポトーシス抑制作用）を有する（特許文献１）。そのため、ＧＬＰ－１（７－３７）に基づく医薬が開発されている。また、ＧＬＰ－１（７－３７）を安定化するための改変体も検討されている（特許文献２）。
【０００５】
一方、ＧＬＰ－１（１－３７）は、ＧＬＰ－１（７－３７）と異なる作用を示し、腸管細胞のインスリン産生細胞への分化誘導作用を有することが見出された（特許文献１）。しかし、インクレチン作用および膵臓におけるインスリン産生細胞誘導作用が弱いことから、ＧＬＰ－１（１－３７）に基づく医薬は開発されていない。また、本発明者らが把握する限り、ＧＬＰ－１（１－３７）を安定化するための改変体も検討されていない。
【０００６】
医薬として有用なペプチドを安定化する方法として、安定化ポリペプチドを付加する方法が提案されている（特許文献３および４）。
【先行技術文献】
【特許文献】
【０００７】
【特許文献１】特許第４５４８３３５号公報
【特許文献２】米国特許出願公開第２０１３／００５９７８０号明細書
【特許文献３】特許第５８２８８８９号公報
【特許文献４】特許第５３５１８８９号公報
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００８】
本発明の目的は、安定性が向上したＧＬＰ－１（１－３７）改変体を提供することである。
【課題を解決するための手段】
【０００９】

本発明者らは、鋭意検討した結果、プロリンおよびアラニン残基に富むランダムコイルポリペプチドの付加により、ＧＬＰ－１（１－３７）の安定性を向上させることができること、およびＧＬＰ－１（１－３７）の特定のアミノ酸残基を置換した変異体も安定性を向上させることができることなどを見出し、本発明を完成するに至った。

【００１０】

すなわち、本発明は、以下のとおりである。

〔１〕下記（ａ）ならびに（ｂ）を含む、融合タンパク質：

（ａ）配列番号１のアミノ酸配列からなるＧＬＰ－１（１－３７）、または配列番号１のアミノ酸配列において１～３個のアミノ酸残基が置換されているＧＬＰ－１（１－３７）変異体；ならびに

（ｂ）少なくとも５０個のプロリンおよびアラニン残基からなるアミノ酸配列を含むランダムコイルポリペプチド部分。

〔２〕ランダムコイルポリペプチド部分が、ＧＬＰ－１（１－３７）またはＧＬＰ－１（１－３７）変異体のＣ末端に付加されている、〔１〕の融合タンパク質。

〔３〕ランダムコイルポリペプチド部分が、５０～３０００個のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含む、〔１〕または〔２〕の融合タンパク質。

〔４〕プロリン残基が、ランダムコイルポリペプチド部分のアミノ酸配列の１０％超かつ７５％未満を構成する、〔１〕～〔３〕のいずれかの融合タンパク質。

〔５〕ランダムコイルポリペプチド部分が、複数のアミノ酸リピートを含み、前記リピートが、プロリンおよびアラニン残基からなり、６個以下の連続したアミノ酸残基が同一である、〔１〕～〔４〕のいずれかの融合タンパク質。

〔６〕前記ＧＬＰ－１（１－３７）変異体が、配列番号１のアミノ酸配列において１～６番目のアミノ酸残基のいずれか１個が別のアミノ酸残基に置換されているＧＬＰ－１（１－３７）変異体である、〔１〕～〔５〕のいずれかの融合タンパク質。

〔７〕前記ＧＬＰ－１（１－３７）変異体が、配列番号１のアミノ酸配列において４番目のフェニルアラニン残基または６番目のアルギニン残基が別のアミノ酸残基に置換されているＧＬＰ－１（１－３７）変異体である、〔１〕～〔６〕のいずれかの融合タンパク質。

〔８〕前記ＧＬＰ－１（１－３７）変異体が、配列番号１のアミノ酸配列において４番目のフェニルアラニン残基または６番目のアルギニン残基がアラニン残基に置換されているＧＬＰ－１（１－３７）変異体である、〔７〕の融合タンパク質。

〔９〕配列番号１のアミノ酸配列において４番目のフェニルアラニン残基または６番目のアルギニン残基が別のアミノ酸残基に置換されているＧＬＰ－１（１－３７）変異体。

〔１０〕配列番号１のアミノ酸配列において４番目のフェニルアラニン残基または６番目のアルギニン残基がアラニン残基に置換されている、〔９〕のＧＬＰ－１（１－３７）変異体。

〔１１〕〔１〕～〔８〕のいずれかの融合タンパク質、あるいは〔９〕または〔１０〕のＧＬＰ－１（１－３７）変異体を含む、医薬。

〔１２〕〔１〕～〔８〕のいずれかの融合タンパク質、あるいは〔９〕または〔１０〕のＧＬＰ－１（１－３７）変異体を含む、糖尿病治療剤。

〔１３〕〔１〕～〔８〕のいずれかの融合タンパク質、あるいは〔９〕または〔１０〕のＧＬＰ－１（１－３７）変異体をコードするポリヌクレオチド。

〔１４〕〔１３〕のポリヌクレオチド、およびそれに作動可能に連結されているプロモーターを含む発現ベクター。

〔１５〕〔１４〕の発現ベクターを含む宿主細胞。

【発明の効果】

【００１１】

本発明の融合タンパク質およびＧＬＰ－１（１－３７）変異体は、ＧＬＰ－１（１－３７）の活性を保持し、かつ安定性が向上したタンパク質として有用である。

【図面の簡単な説明】

【００１２】
【図１】図１は、ＧＬＰ－１（１－３７）ペプチド（ネイティブＧＬＰ－１）の雄性Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスにおける血中動態を示すグラフである。
【図２】図２は、Ｃｏｒｙｎｅｘ（登録商標）発現系（ＣｓｐＡ）で発現させたネイティブＧＬＰ－１またはＧＬＰ－１（１－３７）変異体（ＧＬＰ－１Ｒ６Ａ）とランダムコイルポリペプチド部分（ＰＡＳ２００またはＰＡＳ６００）との融合タンパク質のＳＤＳ－ＰＡＧＥを示す図である。
【図３】図３は、ＧＬＰ－１Ｒ６Ａ－ＰＡ６００ペプチドのベースピーククロマトグラム／トータルイオンクロマトグラム（ＢＰＣ／ＴＩＣ）のデータを示す図である。
【図４】図４は、ＧＬＰ－１Ｒ６Ａ－ＰＡ６００ペプチドの飛行時間型質量分析（ＴＯＦＭＳ）のデータを示す図である。
【図５】図５は、ＧＬＰ－１Ｒ６Ａ－ＰＡ６００ペプチドの再構成のデータを示す図である。
【図６】図６は、融合タンパク質（ＰＡＳｙｌａｔｉｏｎ（登録商標）ペプチド）およびネイティブＧＬＰ－１のＧＬＰ－１受容体に対する活性化作用を示すグラフである。
【図７】図７は、融合タンパク質（ＰＡＳｙｌａｔｉｏｎ（登録商標）ペプチド）およびネイティブＧＬＰ－１の雄性Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスにおける血中動態を示すグラフである。
【発明を実施するための形態】
【００１３】
本発明は、融合タンパク質を提供する。本発明の融合タンパク質は、下記（ａ）ならびに（ｂ）を含む：
（ａ）配列番号１のアミノ酸配列からなるＧＬＰ－１（１－３７）、または配列番号１のアミノ酸配列において１～３個のアミノ酸残基が置換されているＧＬＰ－１（１－３７）変異体；ならびに
（ｂ）少なくとも５０個のプロリンおよびアラニン残基からなるアミノ酸配列を含むランダムコイルポリペプチド部分。
【００１４】
上記（ａ）におけるＧＬＰ－１（１－３７）が有する配列番号１のアミノ酸配列は、プレプログルカゴンペプチドの９２位～１２８位の３７アミノ酸からなるアミノ酸配列に相当する。上記（ａ）におけるＧＬＰ－１（１－３７）変異体は、配列番号１のアミノ酸配列において１～６番目のアミノ酸残基のいずれか１個が別のアミノ酸残基に置換されている変異体が好ましく、配列番号１のアミノ酸配列において４番目のフェニルアラニン残基または６番目のアルギニン残基が別のアミノ酸残基に置換されている変異体がより好ましい。置換後のアミノ酸残基としては、塩基性側鎖を有するアミノ酸（例、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（例、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電性極性側鎖を有するアミノ酸（例、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖を有するアミノ酸（例、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、β位分岐側鎖を有するアミノ酸（例、スレオニン、バリン、イソロイシン）、芳香族側鎖を有するアミノ酸（例、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）、ヒドロキシル基（例、アルコール性、フェノール性）含有側鎖を有するアミノ酸（例、セリン、スレオニン、チロシン）、および硫黄含有側鎖を有するアミノ酸（例、システイン、メチオニン）が挙げられ、非極性側鎖を有するアミノ酸（グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）が好ましく、アラニンが特に好ましい。上記（ａ）におけるＧＬＰ－１（１－３７）変異体は、配列番号１のアミノ酸配列において４番目のフェニルアラニン残基または６番目のアルギニン残基がアラニン残基に置換されている変異体が特に好ましい。置換されるアミノ酸残基の個数は、１～３個であり、好ましくは１または２個であり、より好ましくは１個である。

【００１５】
上記（ｂ）のランダムコイルポリペプチド部分は、プロリン／アラニン－リッチ配列（ＰＡＳ）から構成されるアミノ酸配列を有するポリペプチド部分である（特許第５８２８８９号公報）。ランダムコイルポリペプチド部分のアミノ酸配列は、ＧＬＰ－１（１－３７）活性を保持し、融合タンパク質の安定性が向上し、かつ融合タンパク質の産生が可能との条件を満たす限りにおいて、特に限定されない。
【００１６】
ランダムコイルポリペプチド部分は、少なくとも５０個のプロリンおよびアラニン残基からなるアミノ酸配列を含み、例えば、少なくとも１００個、少なくとも１５０、少なくとも２００個、少なくとも２５０個、少なくとも３００個、少なくとも３５０、少なくとも４００個、少なくとも５００個、または少なくとも６００個のプロリンおよびアラニン残基からなるアミノ酸配列を含んでもよい。ランダムコイルポリペプチド部分は、例えば、最大で３０００個、最大で２０００個、最大で１５００個、最大で１２００個、最大で８００個のプロリンおよびアラニンアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含んでもよい。ランダムコイルポリペプチド部分は、例えば、約５０、約１００、約１５０、約２００、約２５０、約３００、約３５０、約４００、約５００、約６００、約７００、約８００、約９００～約３０００個のプロリンおよびアラニンアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含んでもよい。ランダムコイルポリペプチド部分は、例えば、２００～３０００個、２００～２５００個、２００～２０００個、２００～１５００個、２００～１０００個、３００～３０００個、３００～２５００個、３００～２０００個、３００～１５００個、３００～１０００個、４００～３０００個、４００～２５００個、４００～２０００個、４００～１５００個、４００～１０００個、５００～３０００個、５００～２５００個、５００～２０００個、５００～１５００個、５００～１０００個、６００～３０００個、６００～２５００個、６００～２０００個、６００～１５００個、６００～１０００個、７００～３０００個、７００～２５００個、７００～２０００個、７００～１５００個、７００～１０００個、８００～３０００個、８００～２５００個、８００～２０００個、８００～１５００個、または８００～１０００個のプロリンおよびアラニンアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含んでもよい。
【００１７】
ランダムコイルポリペプチド部分のアミノ酸配列は、例えば、１０％超のプロリン残基を含んでもよく、好ましくは、１２％超、１４％超、１８％超、２０％超、２２％、２３％、または２４％超、最も好ましくは、２５％超のプロリン残基を含んでもよい。ランダムコイルポリペプチド部分のアミノ酸配列は、例えば、７５％未満、好ましくは、７０％未満、６５％未満、６０％未満、５５％未満、または５０％未満のプロリン残基を含んでもよく、ここで、より低い値が好ましい。より好ましくは、ランダムコイルポリペプチド部分のアミノ酸配列は、４８％未満、４６％未満、４４％未満、または４２％未満のプロリン残基を含んでもよい。さらにより好ましくは、ランダムコイルポリペプチド部分のアミノ酸配列は、４１％未満、４０％未満、３９％未満、３８％未満、３７％未満、または３６％未満のプロリン残基を含んでもよく、ここで、より低い値が好ましい。最も好ましくは、アミノ酸配列は、３５％未満のプロリン残基を含んでもよい。プロリン残基は、好ましくは、ランダムコイルポリペプチド部分のアミノ酸配列の１０％超かつ７５％未満を構成してもよい。
【００１８】
逆もまた同様に、ランダムコイルポリペプチド部分のアミノ酸配列は、例えば、２５％超、好ましくは、３０％超、３５％超、４０％超、４５％、５０％超、５２％超、５４％超、５６％超、５８％超、または５９％超のアラニン残基を含んでもよく、ここで、より大きい値が好ましい。より好ましくは、ランダムコイルポリペプチド部分のアミノ酸配列は、６０％超、６１％超、６２％超、６３％超、または６４％超のアラニン残基を含んでもよい。最も好ましくは、ランダムコイルポリペプチド部分のアミノ酸配列は、６５％超のアラニン残基を含んでもよい。

【００１９】
したがって、ランダムコイルポリペプチド部分は、約２５％のプロリン残基と約７５％のアラニン残基からなるアミノ酸配列を含んでもよい。あるいは、ラランダムコイルポリペプチド部分は、約３５％のプロリン残基と約６５％のアラニン残基からなるアミノ酸配列を含んでもよい。
【００２０】
ランダムコイルポリペプチド部分のアミノ酸配列は、１０％未満、９％未満、８％未満、７％未満、６％未満、５％未満、４％未満、３％未満、または約２％未満のプロリンおよびアラニンとは異なるアミノ酸を含んでもよい。
【００２１】
ランダムコイルポリペプチド部分は、複数のアミノ酸リピートを含んでもよい。アミノ酸リピートは、プロリンおよびアラニン残基からなり、６個以下の連続したアミノ酸残基が同一である、アミノ酸配列である。アミノ酸リピートとしては、例えば、以下：
ＡＡＰＡＡＰＡＰＡＡＰＡＡＰＡＰＡＡＰＡ（配列番号１３）；
ＡＡＰＡＡＡＰＡＰＡＡＰＡＡＰＡＰＡＡＰ（配列番号１４）；
ＡＡＡＰＡＡＡＰＡＡＡＰＡＡＡＰＡＡＡＰ（配列番号１５）；
ＡＡＰＡＡＰＡＡＰＡＡＰＡＡＰＡＡＰＡＡＰＡＡＰ（配列番号１６）；
ＡＰＡＡＡＰＡＰＡＡＡＰＡＰＡＡＡＰＡＰＡＡＡＰ（配列番号１７）；
ＡＡＡＰＡＡＰＡＡＰＰＡＡＡＡＰＡＡＰＡＡＰＰＡ（配列番号１８）および
ＡＰＡＰＡＰＡＰＡＰＡＰＡＰＡＰＡＰ（配列番号１９）
のアミノ酸配列が挙げられる。ランダムコイルポリペプチド部分は、アミノ酸リピートの組合せ、断片、または円順列変異体を含んでもよい。
【００２２】
「ランダムコイルポリペプチド部分」とは、ランダムコイルコンホメーションを形成するポリペプチドをいう。ランダムコイルコンホメーションの形成は、例えば、円二色性（ＣＤ）分光法により確認することができる。ランダムコイルポリペプチド部分のより詳細な定義については、特許第５８２８８８９号公報を参照することができる。
【００２３】
融合タンパク質における上記（ａ）および（ｂ）の融合様式は、融合タンパク質がＧＬＰ－１（１－３７）活性を保持し、かつ融合タンパク質の安定性が向上する限りにおいて特に限定されないが、上記（ａ）および（ｂ）が共有結合的に連結していることが好ましく、融合タンパク質を生物学的方法により産生可能にする観点から、上記（ａ）および（ｂ）が単一のポリペプチド中に含まれていることがより好ましく、上記（ｂ）が上記（ａ）のＣ末端またはＮ末端に付加されていることがさらにより好ましく、活性を保持する観点から、上記（ｂ）が上記（ａ）のＣ末端に付加されていることが特に好ましい。
【００２４】
本発明はまた、ＧＬＰ－１（１－３７）変異体（以下、単に「変異体」と略すことがある）を提供する。本発明の変異体は、上記（ａ）におけるＧＬＰ－１（１－３７）変異体として例示したものが挙げられるが、好ましくは配列番号１のアミノ酸配列において４番目のフェニルアラニン残基または６番目のアルギニン残基が別のアミノ酸残基に置換されているＧＬＰ－１（１－３７）変異体であり、より好ましくは、配列番号１のアミノ酸配列において４番目のフェニルアラニン残基または６番目のアルギニン残基がアラニン残基に置換されているＧＬＰ－１（１－３７）変異体である。
【００２５】
本発明の融合タンパク質または変異体は、医薬等の用途の観点から、ＧＬＰ－１（１－３７）活性を保持することが好ましい。本明細書において「ＧＬＰ－１（１－３７）活性」とは、ネイティブＧＬＰ－１（１－３７）が有する生化学的、生理学的、または薬理学的活性をいう。ＧＬＰ－１（１－３７）活性は、例えば、ＧＬＰ－１受容体に対する活性化作用、または腸管細胞のインスリン産生細胞への分化誘導作用を指標として示されてもよい。この場合において、ＧＬＰ－１受容体に対する活性化作用を有する、または腸管細胞

のインスリン産生細胞への分化誘導作用を有する場合に、ＧＬＰ－１（１－３７）活性を有するということができる。また、ＧＬＰ－１受容体に対する活性化作用が高い、または腸管細胞のインスリン産生細胞への分化誘導作用が高ければ、ＧＬＰ－１（１－３７）活性が高いということができる。ＧＬＰ－１（１－３７）活性の程度は、例えば、ＧＬＰ－１受容体に対する活性化作用のＥＣ５０を指標として示されてもよい。「ＧＬＰ－１（１－３７）活性を保持する」とは、例えば１０～１０００ｎＭ、好ましくは２０～５００ｎＭのＥＣ５０値を示すことであってもよい。ＥＣ５０は、例えば、融合タンパク質の濃度の対数値を横軸に、活性値を縦軸にとり、得られるシグモイド曲線から、最大活性の５０％の活性が得られる濃度を計算し、ＥＣ５０とすることにより求めることができる。

【００２６】

本発明の融合タンパク質または変異体は、医薬等の用途の観点から、ネイティブＧＬＰ－１（１－３７）と比して安定性が向上することが好ましい。本明細書において「安定性」とは、ペプチドまたはタンパク質が元の化学構造、または生化学的、生理学的、薬理学的活性を維持する能力をいい、特に、生体内での安定性をいう。安定性の程度は、例えば血中半減期を指標として示されてもよい。この場合において、血中半減期が長い場合に、安定性が高いということができる。「安定性が向上する」とは、相対的指標として、例えば、ネイティブＧＬＰ－１（１－３７）の１．１倍以上の安定性を示すことであってもよく、好ましくは１．３倍以上、より好ましくは５倍以上、さらにより好ましくは１０倍以上、特に好ましくは２０倍以上の安定性を示すことであってもよい。あるいは、「安定性が向上する」とは、絶対的指標として、例えば、０．５時間以上の血中半減期を示すことであってもよく、好ましくは０．６時間以上、より好ましくは１時間以上、さらにより好ましくは２時間以上、特に好ましくは４時間以上の血中半減期を示すことであってもよい。血中半減期は、例えば、マウスの血液投与後の血液サンプル中のペプチドまたはタンパク質の存在量の経時変化をＬＣ－ＭＳ（例、Ｑ－ＴＯＦ／ＭＳ）で分析することより求めることができる。

【００２７】

本発明の融合タンパク質または変異体は、ＧＬＰ－１（１－３７）活性を保持し、かつ生体内の安定性が向上しているので、例えば、医薬、または試薬として、特に医薬として有用である。したがって、本発明は、上記の融合タンパク質または変異体を含む医薬を提供する。本発明の融合タンパク質または変異体は、医薬組成物の形態において提供されてもよい。このような医薬組成物は、上記の融合タンパク質または変異体に加えて、医薬上許容され得る担体を含んでいてもよい。医薬上許容され得る担体としては、例えば、ショ糖、デンプン、マンニット、ソルビット、乳糖、グルコース、セルロース、タルク、リン酸カルシウム、炭酸カルシウム等の賦形剤、セルロース、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリプロピルピロリドン、ゼラチン、アラビアゴム、ポリエチレングリコール、ショ糖、デンプン等の結合剤、デンプン、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルスターチ、炭酸水素ナトリウム、リン酸カルシウム、クエン酸カルシウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、エアロジル、タルク、ラウリル硫酸ナトリウム等の滑剤、クエン酸、メントール、グリシルリシン・アンモニウム塩、グリシン、オレンジ粉等の芳香剤、安息香酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム、メチルパラベン、プロピルパラベン等の保存剤、クエン酸、クエン酸ナトリウム、酢酸等の安定剤、メチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ステアリン酸アルミニウム等の懸濁剤、界面活性剤等の分散剤、水、生理食塩水、オレンジジュース等の希釈剤、カカオ脂、ポリエチレングリコール、白灯油等のベースワックスなどが挙げられるが、それらに限定されるものではない。

【００２８】

経口投与に好適な製剤は、水、生理食塩水、オレンジジュースのような希釈液に有効量のリガンドを溶解させた液剤、有効量のリガンドを固体や顆粒として含んでいるカプセル剤、サッシェ剤または錠剤、適当な分散媒中に有効量の有効成分を懸濁させた懸濁液剤、有効量の有効成分を溶解させた溶液を適当な分散媒中に分散させ乳化させた乳剤等である。

【００２９】

医薬または医薬組成物は、非経口的な投与（例、静脈内注射、皮下注射、筋肉注射、局所注入、腹腔内投与）に好適である。このような非経口的な投与に好適な医薬または医薬組成物としては、水性および非水性の等張な無菌の注射液剤があり、これには抗酸化剤、緩衝液、制菌剤、等張化剤等が含まれていてもよい。また、水性および非水性の無菌の懸濁液剤が挙げられ、これには懸濁剤、可溶化剤、増粘剤、安定化剤、防腐剤等が含まれていてもよい。

【００３０】

医薬または医薬組成物の投与量は、有効成分の種類・活性、病気の重篤度、投与対象となる動物種、投与対象の薬物受容性、体重、年齢等によって異なるが、適宜設定することができる。

【００３１】

本発明の融合タンパク質または変異体は、例えば、糖尿病（例、１型、２型）等の疾患の治療剤または治療用医薬組成物として有用である。１型糖尿病の発症時には、膵臓β細胞数が３０％以下に減少することが報告されている（Ｅｉｓｅｎｂａｒｔｈ ＧＳ，Ｎ．Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ，３１４，１３６０－１３６８，１９９４）。２型糖尿病の発症時には、膵臓β細胞機能が５０％以下に低下することが報告されている（Ｌｅｂｏｖｉｔｚ ＨＥ，Ｊｏｓｌｉｎ’ｓ Ｄｉａｂｅｔｅｓ Ｍｅｌｌｉｔｕｓ １４ｔｈ Ｅｄ．６８７－７１０，２００５）。ＧＬＰ－１（１－３７）は、腸管細胞のインスリン産生細胞への分化を誘導する。本発明の融合タンパク質または変異体は、ＧＬＰ－１（１－３７）活性を有するので、ＧＬＰ－１（１－３７）と同様に腸管細胞のインスリン産生細胞への分化を誘導し、インスリン産生細胞数を増加させることが期待される。インスリン産生細胞数の増加により、１型または２型糖尿病で減少したβ細胞の数または機能を補償し、糖尿病を改善させるために有用と考えられる。

【００３２】

本発明の融合タンパク質または変異体は、本発明の融合タンパク質または変異体をコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞（本発明の宿主細胞）を用いて、融合タンパク質を宿主細胞に産生させることで入手することができる。本発明の融合タンパク質または変異体を産生させるための宿主細胞としては、例えば、動物、昆虫、魚類、植物、または微生物に由来する細胞が挙げられる。動物としては、哺乳動物または鳥類（例、ニワトリ）が好ましく、哺乳動物がより好ましい。哺乳動物としては、例えば、霊長類（例、ヒト、サル、チンパンジー）、齧歯類（例、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ）、家畜および使役用の哺乳動物（例、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウマ）が挙げられる。

【００３３】

好ましい実施形態では、宿主細胞は、ヒト細胞、またはヒトタンパク質の産生に汎用されている細胞（例、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、ヒト胎児腎由来ＨＥＫ２９３細胞）である。

【００３４】

別の好ましい実施形態では、宿主細胞は、微生物である。融合タンパク質または変異体の大量生産等の観点より、このような宿主細胞を用いてもよい。微生物としては、例えば、細菌および真菌が挙げられる。細菌としては、宿主細胞として用いられている任意の細菌を使用することができ、例えば、バシラス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ）属細菌〔例、枯草菌（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｂｔｉｌｉｓ）〕、コリネバクテリウム（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ）属細菌〔（例、コリネバクテリウム・グルタミカム（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｇｌｕｔａｍｉｃｕｍ）〕、エシェリヒア（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ）属細菌〔例、シェリヒア・コリ（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ）〕、パントエア（Ｐａｎｔｏｅａ）属細菌（例、パントエア・アナナティス（Ｐａｎｔｏｅａ ａｎａｎａｔｉｓ））が挙げられる。真菌としては、宿主細胞として用いられている任意の真菌を使用することができ、例えば、サッカロミセス（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）属真菌〔例、サッカロミセス・セレビシエー（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）〕、およびシゾサッカロミセス（Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）属真菌〔例、シ

ゾサッカロミセス・ポンベ（Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｐｏｍｂｅ）〕が挙げられる。あるいは、微生物として、糸状菌を用いてもよい。糸状菌としては、例えば、アクレモニウム属（Ａｃｒｅｍｏｎｉｕｍ）／タラロマイセス属（Ｔａｌａｒｏｍｙｃｅｓ）、トリコデルマ属（Ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ）、アルペルギルス属（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）、ニューロスポラ属（Ｎｅｕｒｏｓｐｏｒａ）、フサリウム属（Ｆｕｓａｒｉｕｍ）、クリソスポリウム属（Ｃｈｒｙｓｏｓｐｏｒｉｕｍ）、フミコーラ属（Ｈｕｍｉｃｏｌａ）、エメリセラ属（Ｅｍｅｒｉｃｅｌｌａ）、およびハイポクレア属（Ｈｙｐｏｃｒｅａ）に属する細菌が挙げられる。

【００３５】

さらに別の好ましい実施形態では、宿主細胞は、腸内細菌である。融合タンパク質または変異体を腸内で産生させる観点より、このような宿主細胞を用いてもよい。腸内細菌としては、例えば、乳酸菌（Ｄｕａｎ　ＦＦ，Ｄｉａｂｅｔｅｓ　６４：１７９４－８０３，２０１５）が挙げられる。

【００３６】

本発明の宿主細胞は、本発明の融合タンパク質または変異体をコードするポリヌクレオチドに加えて、当該ポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターを含む発現単位を含むことが好ましい。用語「発現単位」とは、タンパク質として発現されるべき所定のポリヌクレオチドおよびそれに作動可能に連結されたプロモーターを含む、当該ポリヌクレオチドの転写、ひいては当該ポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質の産生を可能にする単位をいう。発現単位は、ターミネーター、リボゾーム結合部位、および薬剤耐性遺伝子等のエレメントをさらに含んでいてもよい。発現単位は、ＤＮＡであってもＲＮＡであってもよいが、ＤＮＡであることが好ましい。発現単位は、微生物（宿主細胞）においてゲノム領域（例、上記タンパク質をコードするポリヌクレオチドが固有に存在する天然ローカスである天然ゲノム領域、もしくは当該天然ローカスではない非天然ゲノム領域）、または非ゲノム領域（例、細胞質内）に含まれることができる。発現単位は、１または２以上（例、１、２、３、４、または５）の異なる位置においてゲノム領域中に含まれていてもよい。非ゲノム領域に含まれる発現単位の具体的な形態としては、例えば、プラスミド、ウイルスベクター、ファージ、および人工染色体が挙げられる。

【００３７】

発現単位を構成するプロモーターは、その下流に連結されたポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質を宿主細胞で発現させることができるものであれば特に限定されない。例えば、プロモーターは、宿主細胞に対して同種であっても異種であってもよいが、好ましくは異種である。例えば、組換えタンパク質の産生に汎用される構成または誘導プロモーターを用いることができる。このようなプロモーターは、用いられる宿主細胞の種類（例、ヒト細胞等の哺乳動物細胞、微生物）に応じて、哺乳動物由来のプロモーター、微生物由来のプロモーター、ウイルス由来のプロモーター等のプロモーターを適宜選択することができる。

【００３８】

本発明の宿主細胞は、当該分野において公知の任意の方法により作製することができる。例えば、本発明の宿主細胞は、発現ベクターを用いる方法（例、コンピテント細胞法、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム沈澱法）、またはゲノム改変技術により作製することができる。発現ベクターが宿主細胞のゲノムＤＮＡと相同組換えを生じる組込み型（ｉｎｔｅｇｒａｔｉｖｅ）ベクターである場合、発現単位は、形質転換により、宿主細胞のゲノムＤＮＡに組み込まれることができる。一方、発現ベクターが宿主細胞のゲノムＤＮＡと相同組換えを生じない非組込み型ベクターである場合、発現単位は、形質転換により、宿主細胞のゲノムＤＮＡに組み込まれず、宿主細胞内において、発現ベクターの状態のまま、ゲノムＤＮＡから独立して存在できる。あるいは、ゲノム編集技術（例、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステム、Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ　Ａｃｔｉｖａｔｏｒ－Ｌｉｋｅ　Ｅｆｆｅｃｔｏｒ　Ｎｕｃｌｅａｓｅｓ（ＴＡＬＥＮ））によれば、発現単位を宿主細胞のゲノムＤＮＡに組み込むこと、および宿主細胞が固有に備える発現単位を改変す

ることが可能である。
【００３９】
発現ベクターは、発現単位として上述した最小単位に加えて、宿主細胞で機能するターミネーター、リボゾーム結合部位、および薬剤耐性遺伝子等のエレメントをさらに含んでいてもよい。薬剤耐性遺伝子としては、例えば、テトラサイクリン、アンピシリン、カナマイシン、ハイグロマイシン、ホスフィノスリシン等の薬剤に対する耐性遺伝子が挙げられる。発現ベクターはまた、宿主細胞のゲノムＤＮＡとの相同組換えのために、宿主細胞のゲノムとの相同組換えを可能にする領域をさらに含んでいてもよい。例えば、発現ベクターは、それに含まれる発現単位が一対の相同領域（例、宿主細胞のゲノム中の特定配列に対して相同なホモロジーアーム、ｌｏｘＰ、ＦＲＴ）間に位置するように設計されてもよい。発現単位が導入されるべき宿主細胞のゲノム領域（相同領域の標的）としては、特に限定されないが、宿主細胞において発現量が多い遺伝子のローカスであってもよい。
【００４０】
発現ベクターは、プラスミド、ウイルスベクター、ファージ、または人工染色体であってもよい。発現ベクターはまた、組込み型（ｉｎｔｅｇｒａｔｉｖｅ）ベクターであっても非組込み型ベクターであってもよい。組込み型ベクターは、その全体が宿主細胞のゲノムに組み込まれるタイプのベクターであってもよい。あるいは、組込み型ベクターは、その一部（例、発現単位）のみが宿主細胞のゲノムに組み込まれるタイプのベクターであってもよい。発現ベクターはさらに、ＤＮＡベクター、またはＲＮＡベクター（例、レトロウイルス）であってもよい。このような発現ベクターは、用いられる宿主細胞の種類（例、ヒト細胞等の哺乳動物細胞、微生物）に応じて、適宜選択することができる。
【００４１】
宿主細胞を培養するための培地は公知であり、宿主細胞の種類に応じた適切な培地を用いることができる。このような培地には、所定の成分（例、炭素源、窒素源、ビタミン）が添加されてもよい。宿主細胞は、通常１６～４２℃、好ましくは２５～３７℃で、通常５～１６８時間、好ましくは８～７２時間培養される。培養方法としては、例えば、バッチ培養法、流加培養法、連続培養法が挙げられる。あるいは、誘導剤を用いて、融合タンパク質の発現を誘導してもよい。
【００４２】
産生された目的タンパク質は、塩析、沈殿法（例、等電点沈殿法、溶媒沈殿法）、分子量差を利用する方法（例、透析、限外濾過、ゲル濾過）、特異的親和性を利用する方法（例、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー）、疎水度の差を利用する方法（例、疎水性クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー）、またはこれらの組み合わせにより、宿主細胞またはその含有培地から精製および単離することが可能である。本発明の融合タンパク質または変異体が宿主細胞内に蓄積される場合、本発明の融合タンパク質または変異体は、まず、宿主細胞を破砕（例、ソニケーション、ホモジナイゼーション）または溶解（例、リゾチーム処理）し、次いで、得られた破砕物および溶解物を、上述した方法で処理することにより、得ることができる。
【００４３】
本発明はまた、本発明の融合タンパク質または変異体の作製に用いることができる、上述したような、本発明の融合タンパク質または変異体をコードするポリヌクレオチド、ならびにそれを含む発現ベクターおよび宿主細胞を提供する。
【実施例】
【００４４】
次に実施例を示して本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。
【００４５】
比較例１．ＧＬＰ－１（１－３７）の血中動態
市販の飼料（オリエンタル酵母、ＣＲＦ－１）および水道水を自由摂取させた８週齢の雄性Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスに、ＧＬＰ－１（１－３７）を１２０ｎｍｏｌ／１０ｍＬ／ｋ

ｇで腹腔内投与した。投与後５、１５、３０、６０、１８０、３６０分に頸静脈より採血し、遠心分離後、採取した血漿に有機溶媒および酸変性による除タンパク質処理を施した後、ＬＣ／ＭＳ／ＭＳ（ＡＢ　ＳＣＩＥＸ、ＱＴＲＡＰ（登録商標）６５００）分析に供した。
ＧＬＰ－１（１－３７）濃度は、投与後３０分で最高血中濃度（１１０ｎＭ）に達したが、３時間後には２ｎＭに低下し、投与後速やかに血中から消失することが確認された（図１）。したがって、ＧＬＰ－１（１－３７）の血中での分解を抑制し、血中半減期を延長させることが必要と考えられた。

【００４６】

実施例１．アミノ酸置換によるＧＬＰ－１（１－３７）の安定化

（１－１）ＧＬＰ－１（１－３７）および変異体の調製

アミノ酸置換によるＧＬＰ－１（１－３７）の血中安定性の向上を検討した。ＧＬＰ－１（１－３７）（以下、「ネイティブＧＬＰ－１」とも呼ぶ）およびＧＬＰ－１（１－３７）変異体（ＧＬＰ－１Ｆ４ＡおよびＧＬＰ－１Ｒ６Ａ）をペプチド合成により調製した。ＧＬＰ－１Ｆ４ＡおよびＧＬＰ－１Ｒ６Ａはそれぞれ、ネイティブＧＬＰ－１のアミノ酸配列において４番目のフェニルアラニン残基および６番目のアルギニン残基をアラニン残基に置換した変異体である。ネイティブＧＬＰ－１および変異体のアミノ酸配列を表１に示す。

【００４７】

【表１】

表１．ネイティブＧＬＰ－１および変異体のアミノ酸配列

ペプチド	アミノ酸配列	配列番号
ネイティブGLP-1	HDEFE RHAEG TFTSD VSSYL EGQAA KEFIA WLVKG RG	1
GLP-1F4A	HDEAE RHAEG TFTSD VSSYL EGQAA KEFIA WLVKG RG	2
GLP-1R6A	HDEFE AHAEG TFTSD VSSYL EGQAA KEFIA WLVKG RG	3

【００４８】

（１－２）血中安定化の検討

各ペプチド５００μｇ／ｋｇをＣ５７ＢＬ／６Ｊマウスの尾静脈内に投与し、血中濃度の推移を測定したところ、下記の表２に示す半減期が得られた。ＧＬＰ－１Ｆ４ＡおよびＧＬＰ－１Ｒ６Ａはネイティブ ＧＬＰ－１よりも延長した半減期を示し、特にＧＬＰ－１Ｒ６Ａでは延長効果が非常に高く、ネイティブＧＬＰ－１と比べて７．２倍の値を示した。

【００４９】

【表２】

表２．ＧＬＰ－１（１－３７）および変異体の血中半減期

ペプチド	半減期（hrs）
Native GLP-1	0.47
GLP-1F4A	0.65
GLP-1R6A	3.4

【００５０】

実施例２．ランダムコイルポリペプチド部分の付加によるＧＬＰ－１（１－３７）の安定化

（２－１）ランダムコイルポリペプチド部分付加ＧＬＰ－１（１－３７）融合タンパク質の調製

ランダムコイルポリペプチド部分付加によるＧＬＰ－１（１－３７）の血中安定性の向上を検討した。最初に、ランダムコイルポリペプチド部分付加ＧＬＰ－１（１－３７）融合タンパク質が生産可能であるかを検討した。
ランダムコイルポリペプチド部分として２００または６００アミノ酸残基からなるプロリ

ン／アラニン－リッチ配列（ＰＡＳ）を有するポリペプチド部分（ＰＡ２００、ＰＡ６００）を用いた。ネイティブＧＬＰ－１およびＧＬＰ－１Ｒ６Ａにこれらの ＰＡＳの付加（ＰＡＳｙｌａｔｉｏｎ（登録商標））を施すことにより得られる融合タンパク質（ＧＬＰ－１－ＰＡ２００、ＧＬＰ－１－ＰＡ６００、ＧＬＰ－１Ｒ６Ａ－ＰＡ２００、およびＧＬＰ－１Ｒ６Ａ－ＰＡ６００）を、Ｃｏｒｙｎｅｘ（登録商標）発現系（ＣｓｐＡ）にて発現させた。具体的には、ＷＯ２０１６／１７１２２４の記載に従い、ＣｓｐＡシグナル配列のＣ末側に、それぞれの融合タンパク質（ＧＬＰ－１－ＰＡ２００、ＧＬＰ－１－ＰＡ６００、ＧＬＰ－１Ｒ６Ａ－ＰＡ２００、およびＧＬＰ－１Ｒ６Ａ－ＰＡ６００）を接続したアミノ酸配列を有するタンパク質を発現させた。ＣｓｐＡシグナル配列は、細胞膜を透過する際に細胞膜上に存在するシグナルペプチダーゼにより切断されるため、目的の融合タンパク質（ＧＬＰ－１－ＰＡ２００、ＧＬＰ－１－ＰＡ６００、ＧＬＰ－１Ｒ６Ａ－ＰＡ２００、およびＧＬＰ－１Ｒ６Ａ－ＰＡ６００）が培養上清中に分泌される。ＣｓｐＡシグナル配列および融合タンパク質のアミノ酸配列を表３に示す。

【００５１】

【表３】

表３．ＣｓｐＡシグナル配列および融合タンパク質のアミノ酸配列

ポリペプチド	アミノ酸配列	配列番号
CspAシグナル配列	MKRMKSLAAALTVAG AMLAA PVATA	4
GLP-1-PA200	HDEFERHAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRGAAPAAPAPAAPAA PAPAAPAAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAAP AAPAPAAPAAPAPAAPAAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAAPAAPAPAAPAA PAPAAPAAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAAP AAPAPAAPAAPAPAAPAAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAA	5
GLP-1-PA600	HDEFERHAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRGAAPAAPAPAAPAA PAPAAPAAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAAP AAPAPAAPAAPAPAAPAAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAAPAAPAPAAPAA PAPAAPAAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAAP AAPAPAAPAAPAPAAPAAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAAPAAPAPAAPAA PAPAAPAAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAAP AAPAPAAPAAPAPAAPAAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAAPAAPAPAAPAA PAPAAPAAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAAP AAPAPAAPAAPAPAAPAAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAAPAAPAPAAPAA PAPAAPAAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAAP AAPAPAAPAAPAPAAPAAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAAPAAPAPAAPAA PAPAAPAAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAAP AAPAPAAPAAPAPAAPAAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAA	6
GLP-1R6A-PA200	HDEFEAHAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRGAAPAAPAPAAPAA PAPAAPAAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAAP AAPAPAAPAAPAPAAPAAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAAPAAPAPAAPAA PAPAAPAAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAAP AAPAPAAPAAPAPAAPAAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAA	7
GLP-1R6A-PA600	HDEFEAHAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRGAAPAAPAPAAPAA PAPAAPAAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAAP AAPAPAAPAAPAPAAPAAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAAPAAPAPAAPAA PAPAAPAAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAAP AAPAPAAPAAPAPAAPAAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAAPAAPAPAAPAA PAPAAPAAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAAP AAPAPAAPAAPAPAAPAAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAAPAAPAPAAPAA PAPAAPAAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAAP AAPAPAAPAAPAPAAPAAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAAPAAPAPAAPAA PAPAAPAAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAAP AAPAPAAPAAPAPAAPAAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAA	8

【００５２】

培養上清中に分泌発現された融合タンパク質をＳＤＳ－ＰＡＧＥで分析したところ、２～３ｇ／Ｌという良好な発現量を得たことが示された（図２）。この結果から、ランダムコイルポリペプチド部分付加ＧＬＰ－１（１－３７）融合タンパク質はＣｏｒｙｎｅｘ（登録商標）発現系で生産可能であることが確かめられた。

【００５３】

（２－２）融合タンパク質の定量方法の検討

ＬＣ－ＭＳによる分析をＰＡＳ配列が付加されたペプチド（融合タンパク質）の定量に用いることができるかを検討するため、各融合タンパク質をＱ－ＴＯＦ／ＭＳ（ＡＢ　ＳＣ

ＩＥＸ，Ｘ５００Ｂ　ＱＴＯＦ　ｓｙｓｔｅｍ）で定量した。Ｑ－ＴＯＦ／ＭＳ条件を表４に示す。

【００５４】

【表４】

表４．各融合タンパク質のＱ－ＴＯＦ／ＭＳ定量条件

HPLC system	SCIEX ExionLC™ AC system
Column	Waters Acquity UPLC BEH300 C4 Column 2.1×50 mm
Mobile Phase Solvent A	0.1%ギ酸水溶液
Solvent B	0.1%ギ酸含有アセトニトリル溶液

MS system	SCIEX X500B QTOF system
Polarity	Positive
mode	TOF MS Intact protein mode

【００５５】

ＧＬＰ－１Ｒ６Ａ－ＰＡ６００のＱ－ＴＯＦ／ＭＳデータを図３～５に示す。トータルイオンクロマトグラム（ＴＩＣ）にて溶出時間４．９６分のピークのＭＳスペクトルからデコンボリューションを行い、分子量を計算した結果５２２７０．８５となり、ＧＬＰ－１Ｒ６Ａ－ＰＡ６００の理論値５２２６９．７３とほぼ一致した。血漿サンプルの前処理はＡｍｉｃｏｎ（登録商標）Ｕｌｔｒａ－０．５（ＮＭＷＬ：１００ｋＤａ）を用いて限外ろ過する事により行い、ろ液を回収して分析に供した。本結果より、血漿中ＧＬＰ－１融合タンパク質濃度のＬＣ－ＭＳによる分析が可能であることが示され、ＬＣ－ＭＳ分析により血中安定性の評価が可能であることが示された。

【００５６】

（２－３）融合タンパク質のＧＬＰ－１受容体活性化作用試験（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ）

各融合タンパク質の活性はＧＬＰ－１受容体に対する活性化作用で評価した。評価はＧＬＰ－１受容体、およびｃＡＭＰ　Ｒｅｓｐｏｓｅ　Ｅｌｅｍｅｎｔ（ＣＲＥ）－ｌｕｃｉｆｅｒａｓｅを発現させたＨＥＫ２９３Ｔ細胞株を用いて実施した。

【００５７】

１０％ＦＢＳニチレイ（Ｓｉｇｍａ、１７２０１２）、１％Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｎ－Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｉｎ（Ｐ／Ｓ、ナカライテスク、０９３６７－３４）および３００μｇ／ｍＬ　Ｇ４１８（ナカライテスク、１６５１３２６）を含むＤＭＥＭ／Ｈａｍ’ｓ　Ｆ－１２培地（ナカライテスク、０８４６０－９５）で維持したＨＥＫ２９３Ｔ細胞をＤ－ＰＢＳ（－）（ナカライテスク、１４２４９－９５）で洗浄後、０．１％ｔｒｙｐｓｉｎ／０．４ｍＭ　ＥＤＴＡ（０．２５％ｔｒｙｐｓｉｎ／１ｍＭ　ＥＤＴＡ（ナカライテスク０７０８６－７４）をＰＢＳ（－）で希釈）で細胞を剥がし回収、Ｇ４１８非存在下で１００ｍｍディッシュに２．５×１０^{6}ｃｅｌｌｓ播種し、３７℃、５％ＣＯ$_{2}$で一晩培養した。翌日７０～８０％コンフルエントであることを確認し、ＧＬＰ－１受容体遺伝子、ｃＡＭＰ応答配列（ＣＲＥ）を含むホタル・ルシフェラーゼベクター［ｐＧＬ４．２９［ｌｕｃ２Ｐ／ＣＲＥ／Ｈｙｇｒｏ　ｖｅｃｔｏｒ］（Ｐｒｏｍｅｇａ、Ｅ８４７１）および内部コントロールとしてウミシイタケ・ルシフェラーゼベクター［ｐＧＬ４．７４［ｈＲｌｕｃ／ＴＫ］（Ｐｒｏｍｅｇａ、Ｅ６９２１）とＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅＴＭ２０００　ｒｅａｇｅｎｔ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、１１６６８－０２７）、ＯＰＴＩ－ＭＥＭ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、３１９８５０６２）を穏やかに混合し２０分静置後、Ｐ／Ｓ非添加の養生培地に交換した細胞に全量滴下し３７℃、５％ＣＯ$_{2}$で４時間以上培養して遺伝子導入を行った。培養後９６ウェルプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ　Ｂｉｏｃｏａｔ　ｐｏｌｙ－Ｄ－Ｌｙｓｉｎｅ　ｃｅｌｌｗａｒｅ　９６　ｗｅｌｌ　Ｂｌａｃｋ／Ｃｌｅａｒ　ｐｌａｔｅ　ｗｉｔｈ　ｌｉｄ）に１．２×１０^{4}ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌ播種し３７℃、５％ＣＯ$_{2}$で一晩培養した。翌日、培地を完全に除

去しＣＤ２９３培地（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）で調製した被験物質溶液を６０μＬ／ウェルずつ添加し、３７℃、５％CO_2で４時間培養後、Ｄｕａｌ－Ｇｌｏ（登録商標）Ｌｕｃｉｆｅｒａｓｅ　Ａｓｓａｙ　Ｓｙｓｔｅｍ（Ｐｒｏｍｅｇａ）のＤｕａｌ－Ｇｌｏ（登録商標）Ｌｕｃｉｆｅｒａｓｅ　Ａｓｓａｙ　Ｒｅａｇｅｎｔを２０μＬ／ウェル添加し、遮光下で１５分振とう後、ＦＤＳＳ７０００ＥＸ（浜松ホトニクス）の高感度発光測定Ｌｕｍｉ（Ｐｈｏｔｏｎ　Ｃｏｕｎｔｉｎｇモード）を用いて測定した。その後ホタルルシフェラーゼ発光を止め、Ｄｕａｌ－Ｇｌｏ（登録商標）Ｓｔｏｐ＆Ｇｌｏ（登録商標）Ｒｅａｇｅｎｔを２０μＬ／ウェル添加し、遮光下で１５分振とう後、再度ＦＤＳＳ７０００にてウミシイタケルシフェラーゼの測定を行った。
測定値はホタルルシフェラーゼによる積算値ｌｕｃをウミシイタケルシフェラーゼによる積算値ｈＲｌｕｃで除し、ｌｕｃ／ｈＲｌｕｃを活性値とし、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ６でＥＣ５０値を算出した。

【００５８】

ネイティブＧＬＰ－１およびＧＬＰ－１Ｒ６Ａに由来の４種類のＰＡＳｙｌａｔｉｏｎ（登録商標）ペプチド（ＧＬＰ－１－ＰＡ２００、ＧＬＰ－１－ＰＡ６００、ＧＬＰ－１Ｒ６Ａ－ＰＡ２００、ＧＬＰ－１Ｒ６Ａ－ＰＡ６００）を精製し、ネイティブＧＬＰ－１（１－３７）を加えた５種類のペプチドについて活性を評価した。その結果、ＧＬＰ－１－ＰＡ２００およびＧＬＰ－１－ＰＡ６００の活性はＧＬＰ－１（１－３７）と比し５～１０倍程度低下したが、ＧＬＰ－１Ｒ６Ａ－ＰＡ２００およびＧＰＬ－１Ｒ６Ａ－ＰＡ６００はＧＬＰ－１（１－３７）と比べて若干の低下あるいはほぼ同程度の活性であり、ほぼ維持されていることが確認された（図６、表５）。

【００５９】

【表５】

表５．融合タンパク質およびネイティブＧＬＰ－１のＥＣ５０値

	GLP-1-PA200	GLP-1-PA600	GLP-1R6A-PA200	GLP-1R6A-PA600	GLP-1 (1-37)
EC_{50} (nM)	296	119	34	61	22

【００６０】

（２－４）融合タンパク質の血中動態試験（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ）

ネイティブＧＬＰ－１およびＧＬＰ－１Ｒ６Ａから４種類のＰＡＳｙｌａｔｉｏｎ（登録商標）ペプチド（ＧＬＰ－１－ＰＡ２００、ＧＬＰ－１－ＰＡ６００、ＧＬＰ－１Ｒ６Ａ－ＰＡ２００、ＧＬＰ－１Ｒ６Ａ－ＰＡ６００）を精製し、ネイティブＧＬＰ－１（１－３７）を加えた５種類のペプチドについて血中動態を評価した。市販の飼料および水道水を自由摂取させた８週齢の雄性Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスに ＧＬＰ－１（１－３７）および４種のＰＡＳｙｌａｔｅｄ　ＧＬＰ－１を１２０ｎｍｏｌ／１０ｍＬ／ｋｇで腹腔内投与した。ネイティブＧＬＰ－１（１－３７）は投与後３０分、１、３時間、４種のＰＡＳｙｌａｔｅｄ　ＧＬＰ－１は投与後８、１２、１８時間に採血しＤＰＰ－ＩＶ阻害剤およびＰｒｏｔｅａｓｅ　ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ　ｃｏｃｋｔａｉｌを添加したチューブに入れ混合した。遠心分離後採取した血漿１００μＬに蒸留水２００μＬを添加混合し、Ａｍｉｃｏｎ（登録商標）Ｕｌｔｒａ－０．５（ＮＭＷＬ：１００ｋＤａ）を用いて限外ろ過後のろ液を回収して分析に供した。

【００６１】

ネイティブＧＬＰ－１（１－３７）は投与１時間後には検出限界（０．１５μＭ）未満となり血中から速やかに消失し血中半減期が０．２時間であったが、ＰＡＳｙｌａｔｅｄ　ＧＬＰ－１はいずれも投与１８時間後まで１μＭ以上の血中曝露を認め、ＰＡＳｙｌａｔｉｏｎ（登録商標）による血中半減期の延長が確認された。また、ＰＡ２００、ＰＡ６００共にｎａｔｉｖｅ＋ＰＡＳｙｌａｔｉｏｎと比し改変体＋ＰＡＳｙｌａｔｉｏｎで血中半減期の延長効果の増強が確認され、改変体－ＰＡ２００でｔ１／２＝７．１時間、改変

体－ＰＡ６００ではｔ１／２＝２０時間とＧＬＰ－１（１－３７）と比べて３０倍～１００倍の半減期延長を認めた（図７、表６）。

【００６２】

【表６】

表６．融合タンパク質およびネイティブＧＬＰ－１の血中半減期

	GLP-1-PA200	GLP-1-PA600	GLP-1R6A-PA200	GLP-1R6A-PA600	GLP-1 (1-37)
T1/2 (hrs)	5.3	15	7.1	20	0.21

【産業上の利用可能性】

【００６３】

本発明の融合タンパク質または変異体は、医薬、特に糖尿病治療剤等の用途に有望である。本発明のポリヌクレオチド、発現ベクターおよび宿主細胞は、本発明の融合タンパク質または変異体の調製に有用である。

【配列表フリーテキスト】

【００６４】

配列番号１は、ＧＬＰ－１（１－３７）のアミノ酸配列を示す。

配列番号２は、ＧＬＰ－１Ｆ４Ａのアミノ酸配列を示す。

配列番号３は、ＧＬＰ－１Ｒ６Ａのアミノ酸配列を示す。

配列番号４は、ＣｓｐＡシグナル配列のアミノ酸配列を示す。

配列番号５は、ＧＬＰ－１－ＰＡ２００のアミノ酸配列を示す。

配列番号６は、ＧＬＰ－１－ＰＡ６００のアミノ酸配列を示す。

配列番号７は、ＧＬＰ－１Ｒ６Ａ－ＰＡ２００のアミノ酸配列を示す。

配列番号８は、ＧＬＰ－１Ｒ６Ａ－ＰＡ６００のアミノ酸配列を示す。

配列番号９は、ＧＬＰ－１－ＰＡ２００のアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

配列番号１０は、ＧＬＰ－１－ＰＡ６００のアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

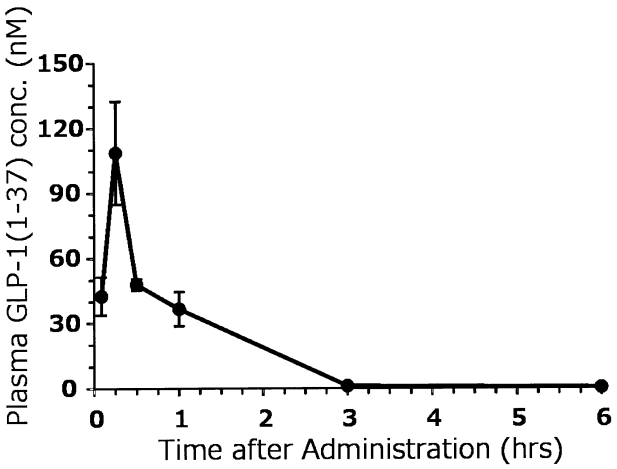
配列番号１１は、ＧＬＰ－１Ｒ６Ａ－ＰＡ２００のアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

配列番号１２は、ＧＬＰ－１Ｒ６Ａ－ＰＡ６００のアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

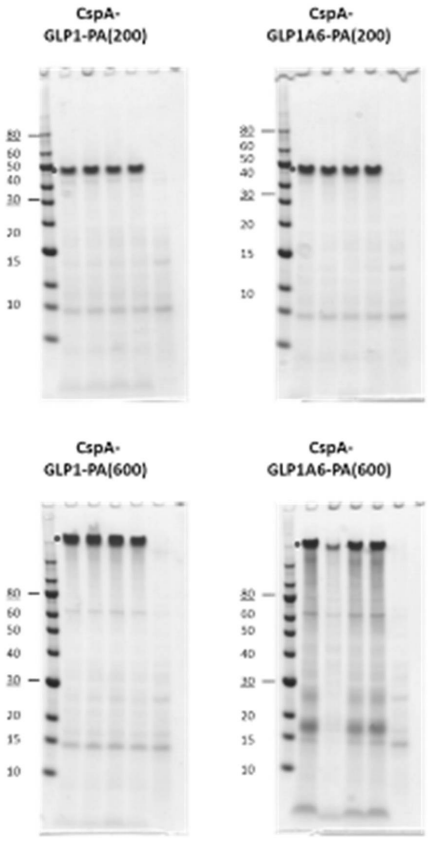
配列番号１３～１９は、ランダムコイルポリペプチド部分のアミノ酸リピートのアミノ酸配列の例を示す。

【図面】

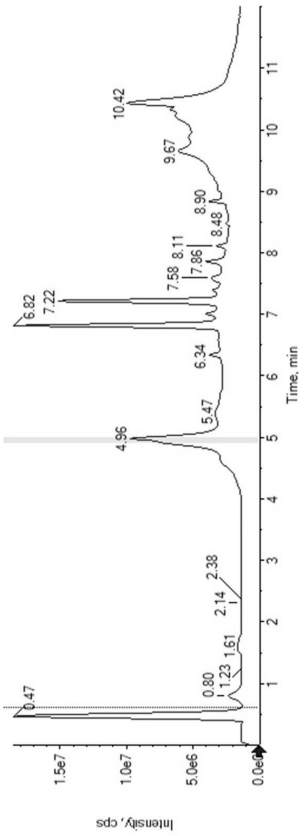
【図１】


Plasma GLP-1(1-37) conc. (nM)
150
120
90
60
30
0
0
1
2
3
4
5
6
Time after Administration (hrs)

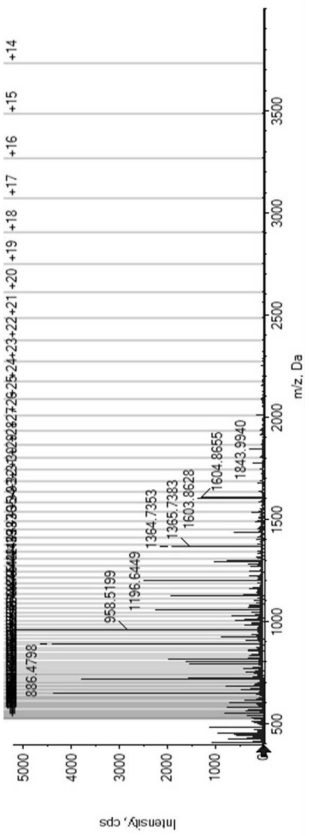
【図２】


CspA-GLP1-PA(200)
CspA-GLP1A6-PA(200)
CspA-GLP1-PA(600)
CspA-GLP1A6-PA(600)

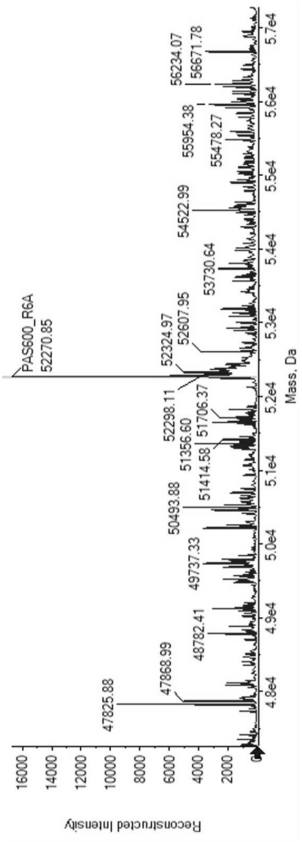
【図３】


10.42
9.67
8.90
8.48
8.11
7.86
7.58
7.22
6.82
6.34
5.47
4.96
2.38
2.14
1.61
1.23
0.80
0.47
Time, min
Intensity, cps

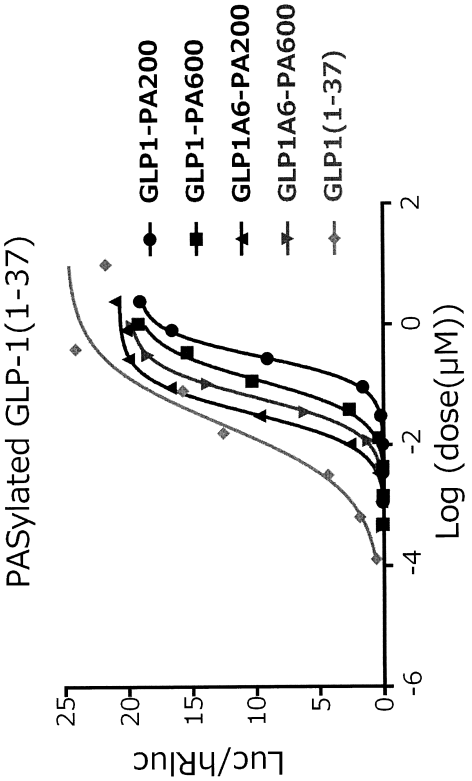
【図４】


m/z, Da
Intensity, cps
886.4798
958.5199
1196.6449
1364.7353
1365.7383
1603.8628
1604.8655
1843.9940

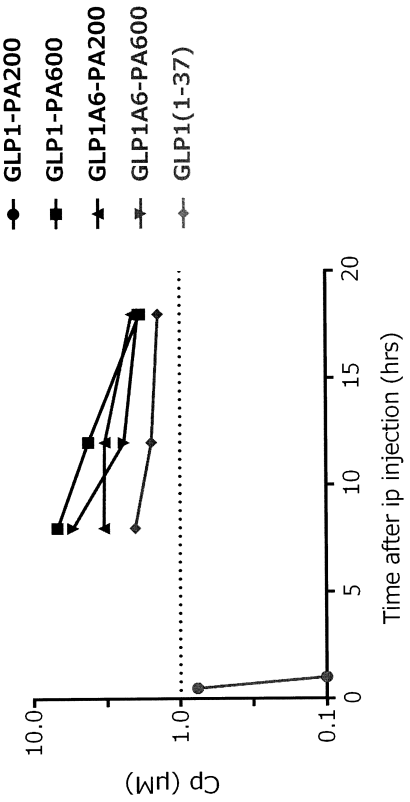
【図５】


PAS600_R6A
52270.85
47825.88
47868.99
48782.41
49737.33
50493.88
51356.60
51414.58
52298.11
51706.37
52324.97
52607.95
53730.64
54522.99
55478.27
55954.38
56234.07
56671.78
Reconstructed Intensity
Mass, Da

【図６】


GLP1-PA200
GLP1-PA600
GLP1A6-PA200
GLP1A6-PA600
GLP1(1-37)
PASylated GLP-1(1-37)
Luc/hRluc
Log (dose(μM))

【図７】


GLP1-PA200
GLP1-PA600
GLP1A6-PA200
GLP1A6-PA600
GLP1(1-37)
Cp (μM)
Time after ip injection (hrs)

【配列表】
20220139590000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
C12N 1/15 (2006.01)		C12N	1/15	
C12N 1/19 (2006.01)		C12N	1/19	
C12N 1/21 (2006.01)		C12N	1/21	
C12N 5/10 (2006.01)		C12N	5/10	
C07K 14/00 (2006.01)		C07K	14/00	
A61K 38/26 (2006.01)		A61K	38/26	
A61K 47/64 (2017.01)		A61K	47/64	
A61P 3/10 (2006.01)		A61P	3/10	

神奈川県川崎市川崎区鈴木町１－１　味の素株式会社内
(72)発明者　平澤　成郎
神奈川県川崎市川崎区鈴木町１－１　味の素株式会社内
(72)発明者　菊池　慶実
神奈川県川崎市川崎区鈴木町１－１　味の素株式会社内
(72)発明者　ビンダー　ウリ
ドイツ連邦共和国８５３５４フライジング，リセ－マイトナー－ストリート３０
(72)発明者　デシュライン　ニコル
ドイツ連邦共和国８５３５４フライジング，リセ－マイトナー－ストリート３０

Ｆターム（参考）　4B065　AA24X AB01 AC14 AC15 BA01 CA24 CA44
4C076　CC21 CC41 EE41 EE59 FF63
4C084　AA02 AA07 BA01 BA41 DB35 NA03 ZC35
4H045　AA10 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA30 DA45 EA27 FA74