

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6121330号
(P6121330)

(45) 発行日 平成29年4月26日 (2017. 4. 26)

(24) 登録日 平成29年4月7日 (2017. 4. 7)

(51) Int. Cl.	F I
C O 7 K 14/46 (2006. 01)	C O 7 K 14/46 Z N A
C O 7 K 14/315 (2006. 01)	C O 7 K 14/315
C O 7 K 19/00 (2006. 01)	C O 7 K 19/00
A 6 1 K 47/42 (2017. 01)	A 6 1 K 47/42
A 6 1 K 47/50 (2017. 01)	A 6 1 K 47/48

請求項の数 9 (全 83 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-531784 (P2013-531784)	(73) 特許権者	598133654
(86) (22) 出願日	平成23年9月28日 (2011. 9. 28)		アミリン・ファーマシューティカルズ, リ
(65) 公表番号	特表2013-545724 (P2013-545724A)		ミテッド・ライアビリティ・カンパニー
(43) 公表日	平成25年12月26日 (2013. 12. 26)		AMYLIN PHARMACEUTIC
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/053770		ALS, LLC
(87) 国際公開番号	W02012/050923		アメリカ合衆国デラウェア州ウィルミン
(87) 国際公開日	平成24年4月19日 (2012. 4. 19)		トン、コンコード・パイク1800番
審査請求日	平成26年9月18日 (2014. 9. 18)	(73) 特許権者	513094387
(31) 優先権主張番号	61/422, 085		アストラゼネカ・ファーマシューティカル
(32) 優先日	平成22年12月10日 (2010. 12. 10)		ズ・リミテッド・パートナーシップ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		AstraZeneca Pharmac
(31) 優先権主張番号	61/387, 391		euticals LP
(32) 優先日	平成22年9月28日 (2010. 9. 28)		アメリカ合衆国デラウェア州、ウィルミ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ントン、コンコード・パイク1800番

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 作用持続時間が増した改変ポリペプチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 35 を含むアルブミン結合ドメインポリペプチド (ABD) と；配列番号 3 と少なくとも 90% の配列同一性を有し、エキセンディンの生物活性を有する第一のペプチドホルモンドメイン (HD1) と；ABD および HD1 を共有結合で連結するリンカー基 (L1) とを含み；前記 ABD は C-末端部分であり、前記 HD1 は N-末端部分である、改変ポリペプチド。

【請求項 2】

L1 が、G；GGG；GGS；配列番号 192；配列番号 193；配列番号 194；または配列番号 195 である、請求項 1 に記載の改変ポリペプチド。

【請求項 3】

配列番号 95 を含む、請求項 1 に記載の改変ポリペプチド。

【請求項 4】

血漿中でおよび血漿プロテアーゼに対して安定している、請求項 1-3 のいずれか一項に記載の改変ポリペプチド。

【請求項 5】

前記リンカー L1 が、配列 (Gly) 4 (配列番号 196) または (Gly) 5 (配列番号 197) を含む、請求項 1 に記載の改変ポリペプチド。

【請求項 6】

前記リンカー L1 が、配列 (Gly) 3Lys (Gly) 4 (配列番号 131)；(Gly) 3AsnGlySer (G

ly) 2 (配列番号132) ; (Gly) 3Cys (Gly) 4 (配列番号133) ; またはGlyProAsnGlyGly (配列番号134) を含む、請求項1に記載の改変ポリペプチド。

【請求項7】

前記リンカー-L1が、TG- (GGGS) 1 (配列番号198)、TG- (GGGS) 2 (配列番号199)、TG (GGGS) 3 (配列番号200)、TG- (GGGS) 4 (配列番号201)、TG- (GGGS) 5 (配列番号202)、(GGGS) 1-AS (配列番号203)、(GGGS) 2-AS (配列番号204)、(GGGS) 3-AS (配列番号205)、(GGGS) 4-AS (配列番号206)、(GGGS) 5-AS (配列番号207)、TG- (GGGS) 1-AS (配列番号208)、TG- (GGGS) 2-AS (配列番号209)、TG- (GGGS) 3-AS (配列番号210)、TG (GGGS) 4-AS (配列番号211) およびTG- (GGGS) 5-AS (配列番号212) から成る群より選択された配列を含む、請求項1に記載の改変ポリペプチド。

10

【請求項8】

請求項1-7のいずれか一項に記載の改変ポリペプチドと医薬的に許容され得る賦形剤とを含む医薬組成物。

【請求項9】

糖尿病、過体重、肥満、アルツハイマー病、短腸症候群、脂肪性肝疾患、脂質異常症、冠動脈疾患、卒中、高脂血症またはパーキンソン病を処置するための、請求項8に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

20

関連出願の相互参照

本願は、2010年9月28日出願の米国特許仮出願第61/387,391号および2010年12月10日出願の同第61/422,085号の恩典を主張するものであり、前記各米国特許仮出願は、それら全体があらゆる目的のため出典明示により本明細書に援用されている。

【背景技術】

【0002】

本願は、良好な作用持続時間、高い効力および／または適便な用法（経口投与を含む）を有する化合物、ならびにそれらの使用方法に関する。アルブミン結合ドメインと生物活性ポリペプチドを併せ持つ改変ポリペプチドを本明細書において提供する。いずれの理論にも拘束されることを望まないが、本明細書に記載する改変ポリペプチドはアルブミンを結合できるため、本化合物は循環系を巡っている間に捕捉され（例えば、アルブミンに結合され）、その結果、例えば腎クリアランスおよび／または分解の減少により、作用持続時間増加をもたらすことができると考えられる。かかる処置によって治療可能な（amendable）疾患としては、肥満および過体重、糖尿病、脂質異常症、高脂血症、短腸症候群、アルツハイマー病、脂肪性肝疾患、パーキンソン病、心血管疾患、ならびに他の中枢神経系障害、またはこれらの組み合わせが挙げられる。

30

【0003】

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

40

【0004】

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

【発明の概要】

【0005】

アルブミンに対する結合親和性およびさらなる治療有用性を有する改変ポリペプチド化合物を提供する。これらの化合物は、アルブミンを結合できる本明細書において定義するおりのアルブミン結合ドメイン（ABD）ポリペプチドと、該ABDと共有結合で連結されている、生物活性であり得、有益な生物学的応答を惹起することができるホルモンドメイン（HD）ポリペプチドとを含む、改変ポリペプチドである。本明細書に記載するABDまたはH

50

Dポリペプチドはいずれも、前記改変ポリペプチド内でリンカーL、例えば本明細書に記載するようなL1によって所望により共有結合され得る。いずれの理論にも拘束されることを望まないが、本明細書に記載する改変ポリペプチドはアルブミンを結合できるため、本化合物は対象内で捕捉され、その結果、該対象内での作用持続時間増加をもたらすことができると考えられる。

【0006】

第一の態様では、本明細書に記載の改変ポリペプチドを提供する。この改変ポリペプチドは、本明細書中で説明するアルブミン結合ドメインポリペプチド (ABD) と、ホルモンドメイン (HD1) とを含む。前記ホルモンドメインは、エキセンディン、エキセンディンの断片またはエキセンディンの類似体であるポリペプチドを含む。

10

【0007】

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

【0008】

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

【0009】

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

20

【0010】

本発明の一つの利点は、複雑なまたは追加の合成的または化学的段階ならびに付随する反応性試薬および触媒を回避して、組換え法によって前記改変ポリペプチドを完全に合成することができる点である。その結果として、本発明のポリペプチドは、作用持続時間の長い化学的に誘導体化された化合物よりはるかに合成費用が少なくなり得る。長い作用持続時間（例えば、ヒト対象において少なくとも1週間、だが必要に応じて1日1回を実現することもできる）に加えて、さらなる利点は、患者のコンプライアンスを向上させる経口送達を可能にし得る比較的小さいサイズである。

【0011】

30

本明細書に開示する化合物は、OGTT DOA (oral glucose tolerance test for duration of action: 作用持続時間についての経口グルコース負荷試験) 試験でマウスにおいて少なくとも24時間およびさらにそれ以上から2日（ヒトでは7日以上ということになる）という驚くべき有効性、糖尿病肥満 (ob/ob) マウスにおいて強い血糖管理および体重減少を立証し、ならびにマウスにおいて少なくとも2日にわたって用量依存的食物摂取量低減をもたらす。正常ラットでは、化合物曝露が皮下および静脈内投与後数日間続く（4日もの長さであることさえあり、これは、ヒトでは少なくとも1週間に1回ということになる）。化合物は、本明細書の中で証明するように、血漿中でおよび血漿プロテアーゼに対して安定しており、血清アルブミンに結合している間は活性であり、ならびに驚くべきことにエキセンディン-4より大きい最大in vivo有効性をもたらす。さらにもっと驚くべきことに、本化合物は経口送達に好適である。

40

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】図1A: OGTT DOA試験における化合物15の投与後1日の時点での経管栄養前の血糖値 (BGL) データヒストグラム。ビヒクル平均経管栄養前血糖: 117mg/dL。図説 (左から右へ): ビヒクル (白)、2nmol/kg (左上から右下への斜線); 25nmol/kg (左下から右上への斜線); 250nmol/kg (細かい斜線)。図1B: 30分時点での血糖の変化。ビヒクル平均経管栄養前血糖: 117mg/dL。図説: 図1Aと同じ。* ビヒクル対照に対して $p < 0.5$; ANOVA、ダネット検定。

【0013】

50

【図2】図2A：OGTT DOA試験における化合物15の投薬後2日の時点での経管栄養前の血糖値（BGL）データヒストグラム。ビヒクル平均経管栄養前血糖：135mg/dL。図説（左から右へ）：ビヒクル（白）、25nmol/kg（縦線）、250nmol/kg（斜線）。図2B：30分時点での血糖の変化。ビヒクル平均経管栄養前血糖：135mg/dL。図説：図2Aと同じ。* ビヒクル対照に対して $p < 0.5$ ；ANOVA、ダネット検定。

【0014】

【図3】図3A：OGTT DOA試験における化合物15および化合物8の投薬後1日の時点での経管栄養前の血糖値（BGL）データヒストグラム。ビヒクル平均経管栄養前血糖：117mg/dL。図説（左から右へ）：ビヒクル（白）；2nmol/kg 化合物15（左上から右下への斜線）；25nmol/kg 化合物15（左下から右上への斜線）；250 nmol/kg 化合物15（細かい斜線）；250 nmol/kg 化合物8（タイル柄）；25nmol/kg 化合物8（横線）；250nmol/kg 化合物8（ドット柄）。図3B：30分時点での血糖の変化。ビヒクル平均経管栄養前血糖：117mg/dL。図説：図1Aと同じ。* ビヒクル対照に対して $p < 0.5$ ；ANOVA、ダネット検定。

【0015】

【図4】HSD給餌麻酔ラットにおける化合物15の効果。図4A：静脈内グルコース負荷試験（intravenous glucose tolerance test：IVGTT）後のグルコース経時変化。図説：ビヒクル（上向き三角）；240nmol/kgの化合物15（四角）。図4B：IVGTT後のグルコースを示すヒストグラム（AUC、0-60分）。図説：ビヒクル（左）；化合物15（右）。図4C：IVGTT後のインスリンの経時変化。図説：図4Aの場合と同様。図4D：インスリンの変化を示すヒストグラム（AUC、0-30分）。図説：図4Bの場合と同様。図4E：化合物15のsc注射後の体重の経時的変化。図説：図4Aの場合と同様。図4F：化合物15のsc注射後の毎日の食物摂取量のヒストグラム。図説：各日について、ヒストグラムは、左から右へ順にビヒクルおよび化合物15（240nmol/kg）を示す。* ビヒクル対照に対して $p < 0.05$ ；ダネット検定。

【0016】

【図5】ob/ob マウスにおける化合物15の効果。図5A：化合物15の250nmol/kgでの注射後の体重の経時的変化（0-10日）。図説：ビヒクル（四角）；化合物15（三角）。図5B：図5Aについて説明したとおりの投薬後の血糖の経時的変化。図説：図5Aの場合と同様。図5C：図5Aについて説明したとおりの投薬後のHbA_{1c}の経時的変化。図説：図5Aの場合と同様。* ビヒクル対照に対して $p < 0.5$ ；ANOVA、ダネット検定。

【0017】

【図6】Zucker糖尿病肥満ラットにおける化合物15の効果。図6A：化合物15でのZucker糖尿病肥満ラットの処置後の体重の経時的変化。図6B：化合物15での処置後の血漿グルコース（mg/dL）の経時変化。図説：ビヒクル（黒四角）；化合物15（0.17mg/kg）（上向き三角）；化合物15（0.5mg/kg）（下向き三角）。

【0018】

【図7】OGTT DOAの比較。化合物15、8および10の効果を、エキセンディン-4と比較して、30分時点での血糖の変化（%経管栄養前）として評価した。図説：ヒストグラムの左から右の順での化合物：ビヒクル；2nmol/kgの化合物15；25nmol/kgの化合物15；250nmol/kgの化合物15；2nmol/kgの化合物8；25nmol/kgの化合物8；250nmol/kgの化合物8；25nmol/kgの化合物10；250nmol/kgの化合物10；250 nmol/kgのエキセンディン-4。* ビヒクル対照に対して $p < 0.5$ ；ANOVA、ダネット検定。

【0019】

【図8】5時間の時間経過にわたってヒト血漿中の化合物残存率の時間プロファイルを表す。図説：ペプチド（配列番号4）（黒四角）；化合物7（白四角）；化合物31（ぼつ印）；化合物15（白菱形）；GLP-1（7-36）アミド（黒菱形）。

【0020】

【図9】化合物31の投薬後1日の時点での経管栄養前の血糖値（BGL）データヒストグラム。ビヒクル平均経管栄養前グルコース：126mg/dL。図説：ビヒクル（白）、化合物31（25nmol/kg、黒）。図説：図1Aと同じ。* ビヒクル対照に対して $p < 0.5$ ；ANOVA、ダネット検定。

【0021】

【図10】図10Aは、6時間にわたる正常マウスの食物摂取抑制に対する化合物31の効果の経時変化を実証する図である。図説：ビヒクル（四角）；1nmol/kgの化合物31（菱形）；10nmol/kgの化合物31（ばつ印）；30nmol/kgの化合物31（丸）；100nmol/kgの化合物31（星形）。図10Bは、54時間にわたる正常マウスの食物摂取抑制に対する化合物31の効果の結果のヒストグラムを示す図である。図説（各期間毎に左から右へ）：ビヒクル（白）；1nmol/kgの $[^{14}\text{Leu}]$ エキセンディン-4（バーティクルライン（verticle lines））；10nmol/kgの $[^{14}\text{Leu}]$ エキセンディン-4（左上から右下への斜線）；30nmol/kgの $[^{14}\text{Leu}]$ エキセンディン-4（左下から右上への斜線）；100nmol/kgの $[^{14}\text{Leu}]$ エキセンディン-4（細かい斜線）；1nmol/kgの化合物31（縦線）；10nmol/kgの化合物31（細かいドット）；30nmol/kgの化合物31（大きいドット）；100nmol/kgの化合物31（チェック柄）。

10

【0022】

【図11】図11A（化合物15）および図11B（化合物21）は、リラグルチドと比較した血糖の経時変化を示す図であり、すべての化合物を週2回（BIW）与えた。図説（図11A-11B）：ビヒクル（四角）；250nmol/kg、BIWでのリラグルチド（黒三角）；25nmol/kg、BIWでの被験化合物（白三角）；250nmol/kg、BIWでの被験化合物（菱形）。図11Cは、持続皮下注入（CSI）によって与えたエキセンディン-4と比較して、週2回（BIW）与えた化合物15および化合物21についてのHbA1cの低下（基線からの%変化）を示すヒストグラムを示す図である。図説（左から右へ）：ビヒクル（白）；25nmol/kg、BIWでの化合物15（細かいチェック柄）；250nmol/kg、BIWでの化合物15（ドット柄）；25nmol/kg、BIWでの化合物21（斜線クロスハッチング）；250nmol/kg、BIWでの化合物21（縦横クロスハッチング）；7.2 nmol/kg/日、CSIでのエキセンディン-4（黒タイリング）；100nmol/kg/日、CSIでのエキセンディン-4（白タイリング）。図11Dは、持続皮下注入（CSI）によって与えたエキセンディン-4と比較して、週2回（BIW）与えた化合物15および化合物21についての体重の低下（基線からの%変化）を示す図である。図説（左から右へ）：図11Cの場合と同様。

20

【0023】

【図12】図12A-12Cは、正常Harlan Sprague-Dawley（HSD）ラットに皮下投与した例示的改変ポリペプチド化合物15および化合物21の薬物動態（PK）プロファイルおよび生物活性を示す図である。図12Aは、食物摂取量を低減させる化合物の効果を示す図である。図12Bは、体重を低下させる化合物の効果を示す図である。図12Cは、単回投与後の化合物のPKプロファイルを示す図である。図説：ビヒクル（四角）；化合物21（三角）；化合物15（菱形）。

30

【0024】

【図13】図13A-13Cは、正常Harlan Sprague-Dawley（HSD）ラットに静脈内投与したコンジュゲートしていないエキセンディン類似体と比較して例示的改変ポリペプチド化合物31の薬物動態（PK）プロファイルおよび生物活性を示す図である。図13Aは、食物摂取量を低減させる化合物の効果を示す図である。図13Bは、体重を低下させる化合物の効果を示す図である。図13Cは、単回投与後の化合物のPKプロファイルを示す図である。挿入図：2nmol/kg、IVでの $[^{14}\text{Leu}]$ エキセンディン-4および2nmol/kg、IVでの化合物31についての時間対PK結果（pg/mL）の作表。図説：ビヒクル（菱形）；2nmol/kg、IVでの $[^{14}\text{Leu}]$ エキセンディン-4（四角）；2nmol/kg、IVでの化合物31（丸）。

40

【0025】

【図14】この図は、コンジュゲートしていないエキセンディン類似体と比較した例示的改変ポリペプチド（化合物15）の経口送達後に血糖を低下させる生物活性の経時変化を示す図である。実施例18参照。平均処置前血糖：約623mg/dL。図説：ビヒクル（黒四角）；エキセンディン-4類似体（白四角）；化合物15（菱形）。

【発明を実施するための形態】

【0026】

I. 定義

50

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

【0027】

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

【0028】

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

【0029】

ポリペプチドの文脈での「断片」は、本明細書では通例の化学的意味でポリペプチドの一部を指す。例えば、断片は、親ポリペプチドの一つ以上の残基のN末端もしくはC末端欠失の結果として得られることがあり、および／または親ポリペプチドの一つ以上の残基の内部欠失の結果として得られることもある。抗体の文脈での「断片」は、生物活性分子に連結させて溶解度、対象内での分布およびこれらに類するものを調節することができる、抗体の一部を指す。例えば、エキセンディン-4（1-30）は、アミノ酸31-39のエキセンディンC末端「テール」が欠失している、エキセンディン-4の生物活性断片を表す。ポリペプチドの文脈での用語「親」は、通例の意味で、修飾、例えば挿入、欠失および／または置換前の基準構造としての機能を果たすポリペプチドを指す。本明細書に記載する改変ポリペプチドの文脈での用語「コンジュゲート」は、成分ポリペプチド、例えばABD、HD1およびこれらに類するものの間の共有結合性連結を指す。本明細書に記載する改変ポリペプチドの文脈での用語「融合」は、ペプチド主鎖の末端アミノ官能基または末端カルボキシ官能基のいずれかまたは両方を介した成分ポリペプチド、例えばABD、HD1およびこれらに類するものの間の共有結合性連結を指す。改変ポリペプチドは、合成により作製することもでき、または組換えにより作製することもできる。典型的に、融合は、組換え

【0030】

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

を有する化合物である。好ましい実施形態において、類似体は、挿入、欠失、付加および置換のいずれか一つまたは組み合わせから独立して選択された1から5のアミノ酸修飾を有する。この場合の実施形態のいずれにおいても、エキセンディン類似体は、挿入、欠失、付加および置換のいずれか一つまたは組み合わせから独立して選択された1から5のアミノ酸修飾を有することがあり、ならびに好ましくは、親化合物と少なくとも50%、例えば、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%またはさらにそれ以上の配列同一性、さらにいっそう好ましくは、親化合物と少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、またはさらにそれ以上の配列同一性を保持しており、ならびに好ましくは、親化合物は、エキセンディン-4、エキセンディン-4 (1-38)、エキセンディン-4 (1-37)、エキセンディン-4 (1-36)、エキセンディン-4 (1-35)、エキセンディン-4 (1-34)、エキセンディン-4 (1-33)、エキセンディン-4 (1-32)、エキセンディン-4 (1-31)、エキセンディン-4 (1-30)、エキセンディン-4 (1-29) またはエキセンディン-4 (1-28) であり、最も好ましくは、親化合物は、エキセンディン-4の配列を有する。一つの実施形態において、少なくとも、エキセンディン-4の位置1、4、6、7および9に対応するアミノ酸は、天然エキセンディン-4におけるようなアミノ酸であり、ならびにさらに、前記1から5の修飾は、エキセンディン-4の位置1、4、6、7および9以外の位置での保存的アミノ酸置換である。例えば、この場合の実施形態のさらなる実施形態において、エキセンディン類似体は、エキセンディン-4の少なくとも位置3、4、6、5、7、8、9、10、11、13、15、18、19、22、23、25、26および/または30において見出されるようなアミノ酸を保持し、ならびにさらに好ましくは、別のアミノ酸で、最も好ましくは化学的保存的アミノ酸で、置換されている残りの位置を1から5カ所より多く有さない。この場合の類似体のすべてにおいて、位置1および/または2でのいずれの置換または修飾もDPP-IV切断に対する耐性を保持することとなり、その上、エキセンディン-4類似体、例えばデスアミノ-ヒスチジル-エキセンディン-4について当該技術分野において公知であるようなインスリン分泌促進活性を保持するまたは向上させることとなる。当該技術分野では通例であるように、アミノ酸置換の文脈での用語「保存的」は、電荷タイプ（例えば、アニオン性、カチオン性、中性、極性など）、疎水性もしくは親水性、嵩（例えば、ファンデルワールス接触およびこれらに類するもの）、および/または官能性（例えば、ヒドロキシ、アミン、スルフヒドリルおよびこれらに類するもの）の特性を維持する置換を指す。用語「非保存的」は、保存的ではないアミノ酸置換を指す。

【0031】

2つ以上の核酸またはポリペプチド配列を比較する文脈での「同一性」、「配列同一性」などは、当該技術分野において公知の配列比較アルゴリズム、例えばBLASTまたはBLAST 2.0を使用して測定される、同じであるか、または同じであるアミノ酸残基もしくはヌクレオチドの特定百分率（すなわち、比較ウィンドウもしくは指定領域にわたって最大一致について比較および整列させたとき、特定領域にわたって約50%の同一性、好ましくは、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはさらに高い同一性）を有する2つ以上の配列もしくは部分配列を指す。この定義は、欠失および/または付加を有する配列、ならびに置換を有する配列、ならびに天然に存在する、例えば多型もしくは対立遺伝子変異体、および人工変異体を含む。好ましいアルゴリズムでは、当該技術分野において公知のように、ギャップおよびこれらに類するものについて考慮される。配列比較については、典型的には、1つの配列が基準配列としての役割を果たし、それと被験配列を比較する。配列比較アルゴリズムを使用する場合、被験配列および基準配列をコンピュータに入力し、必要に応じて部分配列座標を指定し、配列アルゴリズムプログラムパラメータを指定する。好ましくは、デフォルトプログラムパラメータを使用することができ、または代替パラメータを指定することができる。その後、配列比較アルゴリズムが、プログラムパラメータに基づき、基準配列に対する被験配列についての配列同一性パーセントを計算する。例えば、SmithおよびWaterman、1981、Adv. Appl. Math. 2:482の局所相同性アルゴリズムにより、NeedlemanおよびWunsch、1970、J. Mol. Biol. 48:443の相同性アラインメントアルゴリズム

ムにより、PearsonおよびLipman、1988、Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444の類似性検索法により、これらのアルゴリズムのコンピュータでの実施 (Wisconsin Genetics Software Package (Genetics Computer Group、575サイエンス・ドライブ、マディソン、ウィスコンシン) におけるGAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTA) により、または手動アラインメントおよび目視検査により、比較のための最適配列アラインメントを行うことができる。例えば、Current Protocols in Molecular Biology (Ausubelら編、1995補遺) を参照のこと。配列同一性パーセントおよび配列類似性パーセントの判定に好適であるアルゴリズムの好ましい例としては、BLASTおよびBLAST 2.0アルゴリズムが挙げられ、これらは、Altschulら、1977、Nuci. Acids Res. 25:3389-3402およびAltschulら、1990、J. Mol. Biol. 215:403-410に記載されている。BLASTおよびBLAST 2.0を当該技術分野において公知のとおり使用して、本発明の核酸およびタンパク質についての配列同一性パーセントを判定する。BLAST解析を行うためのソフトウェアは、米国国立生物工学情報センター (the National Center for Biotechnology Information) のウェブサイトを通して公的に入手することができる。このアルゴリズムでは、まず、データベース配列内の同じ長さのワードと整列させたときに何らかの正の値の閾値スコアTとマッチするか該Tを満たす、クエリー配列内の長さWの短いワードを同定することによって、高スコア配列ペア (HSP) を同定する。Tは、隣接ワードスコア閾値と呼ばれる (Altschulら、同上)。これらの初期隣接ワードヒットは、それらを含むより長いHSPを見つけるための検索を開始するための種としての役割を果たす。その累積アラインメントスコアを増加させることができる限り、これらのワードヒットを各配列に沿って両方向に伸長する。例えばヌクレオチド配列については、パラメータM (マッチ残基のペアについての報酬スコア; 常に>0) およびN (ミスマッチ残基についてのペナルティスコア; 常に<0) を用いて、累積スコアを計算する。アミノ酸配列については、スコア行列を用いて累積スコアを計算する。各方向へのワードヒットの伸長は、累積アラインメントスコアが、その最大到達値から量Xだけ低下したとき; 1つ以上の負のスコアを持つ残基のアラインメントの蓄積により、累積スコアがゼロ以下になるとき; またはいずれかの配列の末端に達したとき、停止する。BLASTアルゴリズムパラメータW、TおよびXがアラインメントの感度および速度を決める。BLASTNプログラム (ヌクレオチド配列用) は、デフォルトとしてワード長 (W) 11、期待値 (E) 10、M=5、N=-4、および両鎖の比較を用いる。アミノ酸配列用のBLASTPプログラムは、デフォルトとしてワード長 3、期待値 (E) 10、BLOSUM62スコア行列 (HenikoffおよびHenikoff、1989、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915参照) アラインメント (B) 50、期待値 (E) 10、M=5、N=-4、および両鎖の比較を用いる。

【0032】

数値の文脈での用語「約」は、数値の+/-10%を指す。

【0033】

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

II. 化合物

【0034】

第一の態様では、アルブミン結合ドメイン (ABD) ポリペプチド配列と少なくとも1つのポリペプチドホルモンドメイン (HD1) 配列とを含む配列を有する改変ポリペプチド化合物を提供する。用語「アルブミン結合ドメイン」、「ABD」およびこれらに類するものは、本明細書に記載するようなアルブミンを結合できるポリペプチドを指す。用語「ホルモンドメイン」、「ホルモンドメインポリペプチド」およびこれらに類するものは、対象において生物学的応答を惹起できるGP-1受容体アゴニストポリペプチドを指す。例示的ホルモンドメインとしては、エキセンディン、エキセンディン断片またはエキセンディン類似体が挙げられるが、これらに限定されない。

【0035】

驚くべきことに、エキセンディン、エキセンディン類似体または活性断片は、十分なエキセンディン-4生物活性を保持し、および延長された作用持続時間、例えば、齧歯動物

10

20

30

40

50

において少なくとも3日、さらには5日の作用持続時間（ヒト対象では少なくとも1週間以上の持続時間ということになる）を有しながらも、連鎖球菌（Streptococcus）株G148の細菌プロテインGのアルブミン結合ドメインに由来する超高親和性アルブミン結合ドメイン（ABD）に融合され得ることを発見した。「作用持続時間」は、通例の意味で、治療レジメンでより低頻度の投薬が可能になることに関連している。例えば、作用時間延長により、より低頻度および／またはより適便な投薬スケジュールが可能となる。これは、一つには、かかるABDペプチドが治療用タンパク質担体として頑丈なプラットフォームであることが十分には実証されていないため、かかるペプチドが、比較的疎水性であり、結合されている治療用ペプチドと有害に相互作用する可能性があり、およびペプチドホルモンの少なくとも一つのファミリーのための担体としての役割を果たすことができなかったことから、驚くべきことである。具体的には、ラットアミリンは、本明細書に記載するABDとコンジュゲートまたは融合されたとき、様々なエキセンディン-ABD構築物が、活性であり、長い作用持続時間を有すると判明した同じ齧歯動物モデルにおいて、顕著なまたは長期作用性in vivo活性を全く示さなかった。

10

【0036】

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

20

【0037】

エキセンディン。エキセンディンは、アリゾナ州およびメキシコ北部に内生する爬虫類である、アメリカ毒蜥蜴（Gila monster）およびメキシコ毒蜥蜴（Mexican Bearded Lizard）の唾液分泌物中で見いだされるペプチドである。エキセンディン-3は、ヘロデルマ・ホリデウム（*Heloderma horridum*）（メキシコ毒蜥蜴）の唾液分泌物中に存在し、エキセンディン-4は、ヘロデルマ・ススペクツム（*Heloderma suspectum*）（アメリカ毒蜥蜴）の唾液分泌物中に存在する。Engら、1990、J. Biol. Chem.、265：20259-62；Engら、1992、J. Biol. Chem.、267：7402-7405参照。エキセンディン-3およびエキセンディン-4の配列は、それぞれ、以下である：

HSDGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS-NH₂（配列番号1）；

HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS-NH₂（配列番号2）。

30

【0038】

Hargroveら（Regulatory Peptides、2007、141：113-119）は、天然エキセンディン-4と比較して位置14の1つだけのヌクレオチドが異なる完全長C末端アミド化エキセンディン-4ペプチド類似体である、エキセンディン-4ペプチド類似体を報告した。 [¹⁴Leu]エキセンディン-4の配列は、次のとおりである：HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPS SGAPPPS-NH₂（配列番号3）。別のエキセンディン-4ペプチド類似体は、位置14および28にアミノ酸置換を有するエキセンディン-4の最初の32アミノ酸に、非哺乳動物（カエル）GLP1のC末端からの5アミノ酸配列が続くキメラ：[Leu¹⁴、Gln²⁸]エキセンディン-4（1-32）-fGLP-1（33-37）である。この化合物は、次の配列を有する：HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIIS（配列番号4）。C末端が切頭化された生物活性形態のエキセンディン-4、例えばエキセンディン-4（1-28）、エキセンディン-4（1-29）、エキセンディン-4（1-30）、エキセンディン-4（1-31）、エキセンディン-4（1-32）およびそれらのアミド化形態も、当該技術分野において公知である。これらのエキセンディン類似体はすべて、本発明の改変ポリペプチドの成分として好適である。当該技術分野では通例であるように、ペプチド化合物名における角カッコ（すなわち、「[]」）は、該角カッコ内の残基の置換または化学的特徴を示す。例えば、[¹⁴Leu]エキセンディン-4、[¹⁴Leu] Ex-4、およびこれらに類するものは、位置14にロイシンを有するエキセンディン-4を指す。数字で示されるアミノ酸位置は、当該技術分野において常用されている様々な方法で前または後に付与された数字によって示され得る。例えば、用語¹⁴Leu、Leu14、14Leu、Leu¹⁴およびこれらに類するものは、位置14のロイシンを指す点で同義である。

40

50

【0039】

一部の実施形態において、C末端アミドまたは他のC末端キャッピング部分が、本明細書に記載する化合物中に存在し得ることは言うまでもない。

【0040】

エキセンディンは、グルカゴン様ペプチドファミリーの幾つかのメンバーとの多少の配列類似性を有し、最高相同性、53%は、膵β細胞からのインスリン分泌を刺激するインスリン分泌促進効果を有するGLP-1 (7-36) NH₂ (Gokeら、1993、J. Biol. Chem.、268:19650-55) [GLP-1 (7-37) NH₂の配列: HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLKGRG (配列番号5)、「GLP-1」とも呼ばれることもある] とのものであるが、エキセンディンは、GLP-1 相同体ではない。

10

【0041】

薬理学的研究は、エキセンディン-4が、ある種のインスリン分泌細胞においてin vitroで、GLP-1受容体で作用し得るという報告をもたらしたが、エキセンディン-4がGLP-1による作用を受けない受容体で作用することがあるということも報告されている。さらに、エキセンディン-4は、すべてではないが多少の生物学的特性をin vivoでGLP-1と共有するが、GLP-1より顕著に長い作用持続時間を有する。それらのインスリン分泌促進活性に基づき、真性糖尿病の処置および高血糖症の予防のためのエキセンディン-3およびエキセンディン-4の使用が提案されており (Eng、米国特許第5,424,286号明細書 (この参考文献は、その全体があらゆる目的のため出典明示により本明細書に援用されている))、実際、エキセンディン-4は、2型糖尿病を処置するための治療薬としての使用が米国および欧州において認可されている。

20

【0042】

事実、エキセンディンは、アメリカ毒蜥蜴からのエキセンディン遺伝子をクローニングしたChenおよびDrucker (J. Biol. Chem. 272:4108-15 (1997)) によって報告されたような哺乳動物GLP-1の種相同体 (species homolog) ではないと考えられている。アメリカ毒蜥蜴が、エキセンディンより哺乳動物プログルカゴンに類似しているプログルカゴンについての別の遺伝子 (該遺伝子からGLP-1がプロセッシングされる) も有するという観察により、エキセンディンが単にGLP-1の種相同体ではないことが指摘された。

【0043】

エキセンディンアゴニストを使用する胃腸運動の調節方法は、米国特許第6,858,576号 (すなわち、1996年8月8日出願の米国特許出願第08/694,954号の一部継続出願である、1997年8月8日出願の米国特許出願第08/908,867号に基づく米国特許) 明細書に記載されている。エキセンディンアゴニストを使用する食物摂取量低減方法は、米国特許第6,956,026号 (すなわち、1997年1月7日出願の米国特許出願第60/034,905号、1997年8月7日出願の同第60/055,404号、1997年11月14日出願の同第60/065,442号および1997年11月14日出願の同第60/066,029号の恩典を主張する、1998年1月7日出願の米国特許出願番号第09/003,869号に基づく米国特許) 明細書に記載されている。

30

【0044】

本明細書に記載する改変ポリペプチドにおいて有用な新規エキセンディンアゴニスト化合物配列は、国際公開第99/07404号 (すなわち、1998年8月6日出願のPCT/US98/16387)、国際公開第99/25727号 (すなわち、1998年11月13日出願のPCT/US98/24210)、国際公開第99/25728号 (すなわち、1998年11月13日出願のPCT/US98/24273)、国際公開第99/40788号、国際公開第00/41546号および国際公開第00/41548号パンフレットに記載されており、これらの参考文献は、それらの取得米国対応特許と共に、出典明示によりあらゆる目的のために本明細書に援用されている。インスリン分泌促進活性、食物摂取抑制活性および体重減少活性をはじめとする、当該技術分野において公知のin vitroおよびin vivoでのエキセンディン活性についてのアッセイ方法は、本明細書に記載されており、ならびに上記参考文献および本明細書に引用する他の参考文献にも記載されている。

40

【0045】

ある一定の例示的エキセンディン、エキセンディンアゴニスト、およびエキセンディン

50

類似体アゴニストとしては、エキセンディン断片 エキセンディン-4 (1-30) (His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly) ; エキセンディン-4 (1-28) 、エキセンディン-4 (1-29) 、エキセンディン-4 (1-30) 、エキセンディン-4 (1-31) およびエキセンディン-4 (1-32) が挙げられる。類似体は、¹⁴Met位置 (すなわち、¹⁴Met) にロイシンなどの非酸化性アミノ酸での置換を含む。例としては、 [¹⁴Leu] エキセンディン-4、 [¹⁴Leu] エキセンディン-4 (1-30) 、 [¹⁴Leu] エキセンディン-4 (1-28) および [¹⁴Leu, ²⁵Phe] エキセンディン-4が挙げられる。

【0046】

本明細書に記載する改変ポリペプチドにおいて使用するためのエキセンディン類似体アゴニストとしては、米国特許第7,223,725号明細書 (この参考文献は、出典明示によりあらゆる目的のために本明細書に援用されている) に記載されているもの、例えば、式: Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Gly Xaa₅ Xaa₆ Xaa₇ Xaa₈ Xaa₉ Xaa₁₀ Xaa₁₁ Xaa₁₂ Xaa₁₃ Xaa₁₄ Xaa₁₅ Xaa₁₆ Xaa₁₇ Ala Xaa₁₉ Xaa₂₀ Xaa₂₁ Xaa₂₂ Xaa₂₃ Xaa₂₄ Xaa₂₅ Xaa₂₆ Xaa₂₇ Xaa₂₈-Z₁の化合物であり、式中、Xaa₁は、His、ArgまたはTyrであり; Xaa₂は、Ser、Gly、AlaまたはThrであり; Xaa₃は、Ala、AspまたはGluであり; Xaa₅は、AlaまたはThrであり; Xaa₆は、Ala、Phe、Tyrであり; Xaa₇は、ThrまたはSerであり; Xaa₈は、Ala、SerまたはThrであり; Xaa₉は、AspまたはGluであり; Xaa₁₀は、Ala、Leu、Ile、ValまたはMetであり; Xaa₁₁は、AlaまたはSerであり; Xaa₁₂は、AlaまたはLysであり; Xaa₁₃は、AlaまたはGlnであり; Xaa₁₄は、Ala、Leu、Ile、ValまたはMetであり; Xaa₁₅は、AlaまたはGluであり; Xaa₁₆は、AlaまたはGluであり; Xaa₁₇は、AlaまたはGluであり; Xaa₁₉は、AlaまたはValであり; Xaa₂₀は、AlaまたはArgであり; Xaa₂₁は、AlaまたはLeuであり; Xaa₂₂は、Ala、Phe、Tyrであり; Xaa₂₃は、Ile、Val、LeuまたはMetであり; Xaa₂₄は、Ala、GluまたはAspであり; Xaa₂₅は、Ala、Trp、Phe、Tyrであり; Xaa₂₆は、AlaまたはLeuであり; Xaa₂₇は、AlaまたはLysであり; Xaa₂₈は、AlaまたはAsnであり; Z₁は、-OH、-NH₂、Gly-Z₂、Gly Gly-Z₂、Gly Gly Xaa₃₁-Z₂、Gly Gly Xaa₃₁ Ser-Z₂、Gly Gly Xaa₃₁ Ser Ser-Z₂、Gly Gly Xaa₃₁ Ser Ser Gly-Z₂、Gly Gly Xaa₃₁ Ser Ser Gly Ala-Z₂、Gly Gly Xaa₃₁ Ser Ser Gly Ala Xaa₃₆-Z₂、Gly Gly Xaa₃₁ Ser Ser Gly Ala Xaa₃₆ Xaa₃₇-Z₂またはGly Gly Xaa₃₁ Ser Ser Gly Ala Xaa₃₆ Xaa₃₇ Xaa₃₈-Z₂であり; Xaa₃₁、Xaa₃₆、Xaa₃₇およびXaa₃₈は、独立して、Proであるか不存在であり; ならびにZ₂は、-OHまたは-NH₂である。上に記載したエキセンディン類似体のいずれかおよびそれぞれに関して、D-ヒスチジン、デスアミノ-ヒスチジン、2-アミノ-ヒスチジン、β-ヒドロキシー-ヒスチジン、ホモヒスチジン、N-α-アセチル-ヒスチジン、α-フルオロメチル-ヒスチジン、α-メチル-ヒスチジン、3-ピリジルアラニン、2-ピリジルアラニン、4-ピリジルアラニン、4-イミダゾアセチル、デスアミノ-ヒスチジル (イミダゾプロピオニル)、β-ヒドロキシーイミダゾプロピオニル、N-ジメチル-ヒスチジルまたはβ-カルボキシーイミダゾプロピオニルのいずれかによりXaa₁に対応するヒスチジンの置換が施されているものも、特に考えられる。さらに、D-Ala、Val、Leu、Lys、Aib、(1-アミノシクロプロピル)カルボン酸、(1-アミノシクロブチル)カルボン酸、(1-アミノシクロシクロペンチル)カルボン酸、(1-アミノシクロヘキシル)カルボン酸、(1-アミノシクロヘプチル)カルボン酸または(1-アミノシクロオクチル)カルボン酸のいずれかによりXaa₂のグリシンの置換が施されている、本明細書に記載するエキセンディン類似体が、特に考えられる。

【0047】

一つの実施形態によると、例示的化合物には、Xaa₁が、HisまたはArgであり; Xaa₂が、GlyまたはAlaであり; Xaa₃が、AspまたはGluであり; Xaa₅が、AlaまたはThrであり; Xaa₆が、AlaまたはPheであり; Xaa₇が、ThrまたはSerであり; Xaa₈が、Ala、SerまたはThrであり; Xaa₉が、AspまたはGluであり; Xaa₁₀が、AlaまたはLeuであり; Xaa₁₁が、AlaまたはSerであり; Xaa₁₂が、AlaまたはLysであり; Xaa₁₃が、AlaまたはGlnであり; Xaa₁₄が、AlaまたはLeuであり; Xaa₁₅が、AlaまたはGluであり; Xaa₁₆が、AlaまたはGluであり; Xa

10

20

30

40

50

a₁₇が、AlaまたはGluであり；Xaa₁₉が、AlaまたはValであり；Xaa₂₀が、AlaまたはArgであり；Xaa₂₁が、AlaまたはLeuであり；Xaa₂₂が、Pheであり；Xaa₂₃が、Ile、Valであり；Xaa₂₄が、Ala、GluまたはAspであり；Xaa₂₅が、Ala、TrpまたはPheであり；Xaa₂₆が、AlaまたはLeuであり；Xaa₂₇が、AlaまたはLysであり；Xaa₂₈が、AlaまたはAsnであり；Z₁が、
-OH、-NH₂、Gly-Z₂、Gly Gly-Z₂、Gly Gly Xaa₃₁-Z₂、Gly Gly Xaa₃₁ Ser-Z₂、Gly Gly Xaa₃₁ Ser Ser-Z₂、Gly Gly Xaa₃₁ Ser Ser Gly-Z₂、Gly Gly Xaa₃₁ Ser Ser Gly Ala-Z₂、Gly Gly Xaa₃₁ Ser Ser Gly Ala Xaa₃₆-Z₂、Gly Gly Xaa₃₁ Ser Ser Gly Ala Xaa₃₆ Xaa₃₇-Z₂、Gly Gly Xaa₃₁ Ser Ser Gly Ala Xaa₃₆ Xaa₃₇ Xaa₃₈-Z₂であり；Xaa₃₁、Xaa₃₆、Xaa₃₇およびXaa₃₈が、独立して、Proであるか不存在であり、Z₂は、-OHまたは-NH₂である；但し、Xaa₃、Xaa₅、Xaa₆、Xaa₈、Xaa₁₀、Xaa₁₁、Xaa₁₂、Xaa₁₃、Xaa₁₄、Xaa₁₅、Xaa₁₆、Xaa₁₇、Xaa₁₉、Xaa₂₀、Xaa₂₁、Xaa₂₄、Xaa₂₅、Xaa₂₆、Xaa₂₇およびXaa₂₈のうちAlaであるのは3つにすぎないことを条件とする、上記式のものが含まれる。また、上に記載したエキセンディン類似体のいずれかおよびそれぞれに関して、D-ヒスチジン、デスアミノ-ヒスチジン、2-アミノ-ヒスチジン、β-ヒドロキシー-ヒスチジン、ホモヒスチジン、N-α-アセチル-ヒスチジン、α-フルオロメチル-ヒスチジン、α-メチル-ヒスチジン、3-ピリジルアラニン、2-ピリジルアラニン、4-ピリジルアラニン、4-イミダゾアセチル、デスアミノ-ヒスチジル（イミダゾプロピオニル）、β-ヒドロキシーイミダゾプロピオニル、N-ジメチル-ヒスチジルまたはβ-カルボキシーイミダゾプロピオニルのいずれかにより位置Xaa1に対応するヒスチジンの置換が施されているものも、特に考えられる。さらに、D-Ala、Val、Leu、Lys、Aib、（1-アミノシクロプロピル）カルボン酸、（1-アミノシクロブチル）カルボン酸、（1-アミノシクロペンチル）カルボン酸、（1-アミノシクロヘキシル）カルボン酸、（1-アミノシクロヘプチル）カルボン酸または（1-アミノシクロオクチル）カルボン酸のいずれかによりXaa2のグリシンの置換が施されている、本明細書に記載するエキセンディン類似体が、この場合特に考えられる。

【0048】

他の例示的化合物には、国際公開第99/25727号パンフレットに化合物2-23として示されているものが含まれる。別の実施形態によると、Xaa₁₄がLeu、IleまたはVal、さらに好ましくはLeuであり、および／またはXaa₂₅が、Trp、PheまたはTyr、さらに好ましくはTrpまたはPheである化合物を提供する。これらの化合物は、該化合物の合成中ばかりでなく、*in vitro*でも*in vivo*でも酸化的分解を受けにくいであろう。

【0049】

本発明の融合ポリペプチドでの使用に好適なエキセンディン類似体のさらなる例には、2003年3月4日発行の米国特許第6,528,486号明細書（この参考文献は、出典明示によりあらゆる目的のために本明細書に援用されている）に記載されているものが含まれる。具体的には、エキセンディン類似体としては、所望により、位置34-39に1つから5つまでの間の欠失、およびエキセンディンに共有結合している4-20アミノ酸単位のペプチド配列のC末端伸長部を有していてもよいエキセンディン-4（ただし、該ペプチド伸長配列内の各アミノ酸単位は、Ala、Leu、Ser、Thr、Tyr、Asn、Gln、Asp、Glu、Lys、Arg、HisおよびMetから成る群より選択される）と少なくとも90%の相同性を有するエキセンディンまたはエキセンディン類似体から成るものが含まれる。さらに好ましくは、前記伸長部は、4-20アミノ酸残基、例えば、4-15アミノ酸残基の範囲、さらに好ましくは4-10アミノ酸残基の範囲、特に4-7アミノ酸残基の範囲、例えば、4、5、6、7、8または10アミノ酸残基のペプチド配列であり、6アミノ酸残基が好ましい。最も好ましくは、米国特許第6,528,486号明細書によると、伸長ペプチドは、少なくとも1つのLys残基を含有し、さらに好ましくは3から7リシンおよび最も好ましくは6リシンである。

【0050】

例えば、一つの類似体は、HGEGTFTSDLKQMEEEAVRLFIEWLKNGG PSSGAPP SKKKKKK（配列番号118）（[des-³⁶Pro]エキセンディン-4（1-39）-Lys₆とも呼ばれる）である。さらなる例示的類似体としては、Lys₆-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-L

10

20

30

40

50

eu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser-(Lys)₆(H-Lys₆-des Pro³⁶エキセンディン-4(1-39)-(Lys)₆)(配列番号184); His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Ser(H-[des³⁶Pro,³⁷,³⁸Pro]エキセンディン-4(1-39)-NH₂)(配列番号185); Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Ser(H-(Lys)₆-[des³⁶Pro,³⁷,³⁸Pro]エキセンディン-4(1-39)(配列番号186); Asn-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Ser(H-Asn-(Glu)₅-[des³⁶Pro,³⁷,³⁸Pro]エキセンディン-4(1-39)(配列番号187); His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Ser-(Lys)₆([des³⁶Pro,³⁷,³⁸Pro]エキセンディン-4(1-39)-(Lys)₆)(配列番号188); (Lys)₆-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Ser-(Lys)₆(H-(Lys)₆-[des³⁶Pro,³⁷,³⁸Pro]エキセンディン-4(1-39)-(Lys)₆)(配列番号189); および Asp-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Ser-(Lys)₆(Asn-(Glu)₅-[des³⁶Pro,³⁷,³⁸Pro]エキセンディン-4(1-39)-(Lys)₆)(配列番号190)が挙げられる。当該技術分野において通例であるように、アミノ酸の反復は、反復数を示す下付き数字によって示すことができる; すなわち、Lys₆、(Lys)₆およびこれらに類するものは、ヘキサリシル(配列番号191)を指す。上に記載したエキセンディン類似体のいずれかおよびそれぞれに関して、D-ヒスチジン、デスアミノ-ヒスチジン、2-アミノ-ヒスチジン、β-ヒドロキシ-ヒスチジン、ホモヒスチジン、N-α-アセチル-ヒスチジン、α-フルオロメチル-ヒスチジン、α-メチル-ヒスチジン、3-ピリジルアラニン、2-ピリジルアラニン、4-ピリジルアラニン、4-イミダゾアセチル、デスアミノ-ヒスチジル(すなわちイミダゾプロピオニル)、β-ヒドロキシ-イミダゾプロピオニル、N-ジメチル-ヒスチジルまたはβ-カルボキシ-イミダゾプロピオニルのいずれかにより位置1に対応するヒスチジンの置換が施されているものが、特に考えられる。D-Ala、Val、Leu、Lys、Aib、(1-アミノシクロプロピル)カルボン酸、(1-アミノシクロブチル)カルボン酸、(1-アミノシクロシクロペンチル)カルボン酸、(1-アミノシクロヘキシル)カルボン酸、(1-アミノシクロヘプチル)カルボン酸または(1-アミノシクロオクチル)カルボン酸のいずれかにより位置2のグリシンの置換が施されている、本明細書に記載するエキセンディン類似体が、この場合さらに特に考えられる。

【0051】

前記改変ポリペプチド構築物での使用に好適なエキセンディン類似体のさらなる例は、エキセンディン-4(1-39)の対応する位置を基準にして、特に位置¹³Gln、¹⁴Met、²⁵Trpまたは²⁸Asnに、少なくとも一つの修飾アミノ酸残基を有するエキセンディン類似体が記載されている公開PCT出願・国際公開第2004/035623号パンフレット(この参考文献は、出典明示によりあらゆる目的のために本明細書に援用されている)に記載されているもの、特に、天然に存在するアミノ酸から成るものである。そのパンフレットによると、少なくとも一つのLysアミノ酸およびさらに好ましくは少なくとも5つのLysアミノ酸単位、例えば6または7つのLysアミノ酸単位を含む1-7アミノ酸C末端伸長部をさらに含む追加のかかる類似体がある。

【0052】

前記改変ポリペプチド構築物での使用に好適なエキセンディン類似体のなおさらなる例は、エキセンディンまたはエキセンディン類似体のN末端部分のアミノ酸残基がその領域内で高βターン特性を生じさせるように修飾されているエキセンディン類似体が記載されている、「N末端立体配座拘束GLP-1受容体アゴニスト化合物 (N-Terminus Conformationally Constrained GLP-1 Receptor Agonist Compounds)」と題する公開PCT出願・国際公開第2010/120476号パンフレット（あらゆる目的のために出典明示で援用する）に記載されているものである。例えば、立体配座拘束領域を生じさせることによりアミノ酸残基 His1 Gly2 Glu3 を模倣するような類似体が設計され、該類似体には、His1 Gly2 Glu3 にチアゾリジーン-プロリンペプチドミメティックを含有するエキセンディン類似体（例えば、前記パンフレット中の図17A-Fに記載されている化合物を参照のこと）が含まれ、これらは、エキセンディン-4、リキシセナチドまたは本明細書に記載する他の類似体の修飾体として使用することができる。

10

【0053】

本明細書に記載するエキセンディン、エキセンディン類似体および式のいずれかおよびそれらに関して、L-ヒスチジン、D-ヒスチジン、デスアミノ-ヒスチジン、2-アミノ-ヒスチジン、β-ヒドロキシーヒスチジン、ホモヒスチジン、N-α-アセチル-ヒスチジン、α-フルオロメチル-ヒスチジン、α-メチル-ヒスチジン、3-ピリジルアラニン、2-ピリジルアラニン、4-ピリジルアラニン、4-イミダゾアセチル、デスアミノ-ヒスチジル（イミダゾプロピオニル）、β-ヒドロキシーイミダゾプロピオニル、N-ジメチル-ヒスチジルまたはβ-カルボキシーイミダゾプロピオニルのいずれかにより位置1に対応するヒスチジンの置換が施されているものが、特に考えられる。例えば、His 1位置が修飾されている、本明細書に記載の改変ポリペプチドコンジュゲートでの使用に好ましいエキセンディン類似体は、（4-イミダゾアセチル）エキセンディン-4、（デスアミノ-ヒスチジル）エキセンディン-4（または（イミダゾプロピオニル）エキセンディン-4）、（β-ヒドロキシーイミダゾプロピオニル）エキセンディン-4、（N-ジメチル-ヒスチジル）エキセンディン-4および（β-カルボキシーイミダゾプロピオニル）エキセンディン-4である。さらに、D-Ala、Val、Leu、Lys、Aib、（1-アミノシクロプロピル）カルボン酸、（1-アミノシクロブチル）カルボン酸、（1-アミノシクロペンチル）カルボン酸、（1-アミノシクロヘキシル）カルボン酸、（1-アミノシクロヘプチル）カルボン酸または（1-アミノシクロオクチル）カルボン酸のいずれかにより位置2のグリシンの置換が施されている、本明細書に記載するエキセンディンまたはエキセンディン類似体が、この場合特に考えられる。

20

30

【0054】

上記エキセンディン類似体またはそれらの活性断片はいずれも、ABDへのリンカーと共にまたはなしで、本改変ポリペプチドでの使用に好適である。

【0055】

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

40

GVSD X₅ YK X₈ X₉ I X₁₁ X₁₂ A X₁₄ TVEGV X₂₀ AL X₂₃ X₂₄ X₂₅ I（配列番号119）

（式中、互いに独立して、

X₅は、YおよびFから選択され；

50

X_8 は、N、RおよびSから選択され；
 X_9 は、V、I、L、M、FおよびYから選択され；
 X_{11} は、N、S、EおよびDから選択され；
 X_{12} は、R、KおよびNから選択され；
 X_{14} は、KおよびRから選択され；
 X_{20} は、D、N、Q、E、H、S、RおよびKから選択され；
 X_{23} は、K、IおよびTから選択され；
 X_{24} は、A、S、T、G、H、LおよびDから選択され；ならびに
 X_{25} は、H、EおよびDから選択される）。

【0056】

好ましくは、ABDペプチドは、最大で 1×10^{-6} M、およびさらにいっそう好ましくは最大で 1×10^{-9} M（よりいっそう強い親和性）である相互作用の K_D 値で、アルブミンに結合する。用語「 K_D 値」は、当該技術分野において通例であるように、解離定数を指す。さらに好ましくは、最大で 1×10^{-10} Mである、さらにいっそう好ましくは最大で 1×10^{-11} Mである、さらにいっそう好ましくは最大で 1×10^{-12} Mである、およびまたさらには最大で 1×10^{-13} Mである相互作用の K_D 値。例えば、 1×10^{-14} Mの K_D 値は、最大で 1×10^{-13} Mである相互作用の K_D 値である。PCT公開出願番号国際公開第2009/016043号パンフレットに記載されているように、 K_D 値は、好ましくは、ヒト血清アルブミンに対して決定され得る。一つの実施形態において、上の属は、アミノ酸配列がGVSDYYKNLINNAKTVEGVKAL IDEI（配列番号120）ではないという条件で考えられる。

【0057】

本明細書および引用参考文献中で実証されているように、ABDペプチドのアルブミン結合能力は、アミノ酸変化にかかわらず、かかる変化が該ABDペプチドの十分な第三級構造を保持する限り、保持され得る。かかる変化は、例えば、アミノ酸残基のある一定の機能性分類（例えば、疎水性、親水性、極性など）に属するアミノ酸残基が同じ機能性グループからの別のアミノ酸残基に交換される置換を含む。したがって、ABDペプチドの一つのかかる実施形態において、モチーフ X_5 は、Yである。ABDの一つの実施形態において、 X_8 は、NおよびRから選択され、特にRであり得る。一つの実施形態において、 X_9 は、Lである。一つの実施形態において、 X_{11} は、NおよびSから選択され、特にNであり得る。一つの実施形態において、 X_{12} は、RおよびKから選択され、例えば、 X_{12} はRであり、または X_{12} はKである。一つの実施形態において、 X_{14} は、Kである。一つの実施形態において、 X_{20} は、D、N、Q、E、H、SおよびRから選択され、および特に、Eであり得る。一つの実施形態において、 X_{23} は、KおよびIから選択され、特にKであり得る。一つの実施形態において、 X_{24} は、A、S、T、G、HおよびLから選択される。より具体的な実施形態において、 X_{24} はLである。よりいっそう具体的な実施形態において、「 $X_{23} X_{24}$ 」は、KLである。別のよりいっそう具体的な実施形態において、「 $X_{23} X_{24}$ 」は、TLである。一つの実施形態において、 X_{24} は、A、S、T、GおよびHから選択される。より具体的な実施形態において、 X_{24} は、A、S、T、GおよびHから選択され、ならびに X_{23} は、Iである。一つの実施形態において、 X_{25} は、Hである。

【0058】

上の式中の個々のアルブミン結合モチーフの配列は、出典明示によりあらゆる目的のために本明細書に援用されているPCT公開出願番号国際公開第2009/016043号パンフレットに配列番号1-257として提示されているものを含む。アルブミン結合ポリペプチドのある一定の実施形態において、アルブミン結合モチーフは、配列番号1-257から選択されたアミノ酸配列から成る。本発明のこの態様のより具体的な実施形態において、前記モチーフ配列は、PCT公開出願番号国際公開第2009/016043号パンフレットの配列番号2、配列番号3、配列番号9、配列番号15、配列番号25、配列番号27、配列番号46、配列番号49、配列番号53、配列番号54、配列番号55、配列番号155、配列番号239、配列番号240、配列番号241、配列番号242、配列番号243、配列番号244および配列番号245から選択される。本発明のこの態様のよりいっそう具体的な実施形態において、前記モチーフ配列は、PCT公開出願番

10

20

30

40

50

号国際公開第2009/016043号パンフレットの配列番号3、配列番号53および配列番号239から選択される。これらのアルブミン結合モチーフを含有する、したがって本明細書に記載のホルモンドメインとのコンジュゲーションまたは融合に好適である、アルブミン結合ポリペプチドを本明細書中および下記でさらに説明し、ならびに表1および実施例において例示する。理論に拘束されないが、前記アルブミン結合モチーフは、3ヘリックスバンドルタンパク質ドメインの一部を形成し得ると考えられる。例えば、前記モチーフは、前記3ヘリックスバンドルタンパク質ドメイン内の、相互接続ループを伴う2つの α ヘリックスの部分を実質的に構成または形成し得る。したがって、本発明の特定の実施形態において、かかる3ヘリックスバンドルタンパク質ドメインは、連鎖球菌株G148からの細菌受容体プロテインGの3ヘリックスドメインの群から選択される。この実施形態の種々の変形では、前記モチーフが一部を形成する3ヘリックスバンドルタンパク質ドメインは、連鎖球菌株G148からのプロテインGのドメインGA1、ドメインGA2およびドメインGA3の群から選択され、特にドメインGA3である。

【0059】

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

【0060】

したがって、一つの実施形態において、前記アルブミン結合ドメインポリペプチドは、上で定義したとおりのアルブミン結合モチーフと、3ヘリックス立体配置の残部を構成する追加の配列とを含む3ヘリックスバンドルタンパク質ドメインである。そのため、アルブミン結合ドメインポリペプチドをエキセンディンもしくはその類似体または活性断片に融合させて、本明細書に記載の改変ポリペプチドを作ることができる。エキセンディン化合物へのコンジュゲーションまたは融合に好適なアルブミン結合ドメインポリペプチドは、アルブミン結合モチーフ（ABM）に共有結合で連結されており、該ABMがアミノ酸配列LAALP（配列番号183）にさらに共有結合で連結されている、アミノ酸配列：LAEAK X_a X_b A X_c X_d EL X_e KY（配列番号182）を含むことができ、この場合、ABMは、本明細書において定義するとおりのアルブミン結合モチーフであり、 X_a は、VおよびEから選択され； X_b は、L、EおよびDから選択され； X_c は、N、LおよびIから選択され； X_d は、RおよびKから選択され；ならびに X_e は、DおよびKから選択される。一部の実施形態において、エキセンディン化合物へのコンジュゲーションまたは融合に好適なアルブミン結合ドメインポリペプチドは、上で説明したようなアルブミン結合モチーフ（ABM）に共有結合で連結されており、該ABMがアミノ酸配列LAALP（配列番号183）にさらに共有結合で連結されている、アミノ酸配列：LAEAK X_a X_b A X_c X_d EL X_e KY（配列番号182）である。

【0061】

一部の実施形態において、前記アルブミン結合ドメインポリペプチドは、アミノ酸配列LAEAK X_a X_b A X_c X_d EL X_e KY GVSD X_5 YK X_8 X_9 I X_{11} X_{12} A X_{14} TVEGV X_{20} AL X_{23} X

²⁴ X₂₅ I LAALP (配列番号121) (式中、X_aは、VおよびEから選択され；X_bは、L、EおよびDから選択され；X_cは、N、LおよびIから選択され；X_dは、RおよびKから選択され；X_eは、DおよびKから選択され；X₅は、YおよびFから選択され；X₈は、N、RおよびSから選択され；X₉は、V、I、L、M、FおよびYから選択され；X₁₁は、N、S、EおよびDから選択され；X₁₂は、R、KおよびNから選択され；X₁₄は、KおよびRから選択され；X₂₀は、D、N、Q、E、H、S、RおよびKから選択され；X₂₃は、K、IおよびTから選択され；X₂₄は、A、S、T、G、H、LおよびDから選択され；ならびにX₂₅は、H、EおよびDから選択される)を含む。

【0062】

さらに、ABD配列についてのこの場合の各実施形態について、C末端プロリン（上記の位置46に対応）は、所望により不存在であり得る。さらに進んで、ABD配列についての各実施形態について、位置45のロイシンは、所望により、存在または不存在であり得る。「ABD」配列は、本明細書に開示する改変ポリペプチドの一部を形成する、適宜、一価または二価である、ABD化合物の配列である。「ペプチドホルモンドメイン (HD1) 配列」は、本明細書に開示する改変ポリペプチドの一部を形成する、適宜、一価または二価である、ペプチドホルモンドメイン (HD1) 化合物の配列である。「エキセンディン配列」は、本明細書に開示する改変ポリペプチドの一部を形成する、適宜、一価または二価である、エキセンディン化合物の配列である。「エキセンディン類似体配列」は、本明細書に開示する改変ポリペプチドの一部を形成する、適宜、一価または二価である、エキセンディン類似体化合物の配列である。「エキセンディン活性断片配列」は、本明細書に開示する改変ポリペプチドの一部を形成する、適宜、一価または二価である、エキセンディン活性断片化合物の配列である。「エキセンディン類似体活性断片配列」は、本明細書に開示する改変ポリペプチドの一部を形成する、適宜、一価または二価である、エキセンディン類似体活性断片化合物の配列である。「アルブミン結合モチーフ (ABM) 配列」は、本明細書に開示する改変ポリペプチドの一部を形成する、適宜、一価または二価である、ABMの配列である。別の言明がない限り、改変ポリペプチドは、化合物（例えば、ABDまたはHD1）を「含み」、該改変ポリペプチドの配列には該化合物の配列（例えば、ABD配列またはHD1配列）が含まれると解される。

【0063】

アルブミン結合モチーフの存在のため、ABDペプチドは、最大で 1×10^{-6} M、およびさらにいっそう好ましくは最大で 1×10^{-9} M（よりいっそう強い親和性）である相互作用のK_D値で、アルブミンに結合する。さらに好ましくは、最大で 1×10^{-10} Mである、さらにいっそう好ましくは最大で 1×10^{-11} Mである、さらにいっそう好ましくは最大で 1×10^{-12} Mである、およびまたさらには最大で 1×10^{-13} Mである相互作用のK_D値。前記値は、最も好ましくは、ヒト血清アルブミン（「HSA」）への親和性についての値である。

【0064】

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

【0065】

ある一定の実施形態において、X_aは、Eである。ある一定の実施形態において、X_bは、Dである。ある一定の実施形態において、X_cは、Iである。ある一定の実施形態において、X_dは、Kである。ある一定の実施形態において、X_aは、独立してEであり、および／または独立してX_bは、Dであり、および／または独立してX_cは、Iであり、および／または独立してX_dは、Kである。ある一定の実施形態において、前記アルブミン結合ドメインポリペプチドは、LAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKRLISKAKTVEGVKALISEILAALP (配列番号122) である。ある一定の実施形態において、前記アルブミン結合ドメインポリペプチドは、LAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVKALISEILAALP (配列番号123) である。ある一定の実施形態において、前記アルブミン結合ドメインポリペプチドは、LAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVKALISEILAALP (配列番号124) である。

【0066】

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

【0067】

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

【表1】

表1. 選択されたABDペプチド

ABDペプチド配列	配列番号
LAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAALP	23
LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKSYINRAKTVEGVHTLIGHILAALP	24
LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVNALTHILAALP	25
LAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINRARTVEGVHALIDHILAALP	26
LAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRAKLHLILAALP	27
LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKNLINRAKTVEGVSSSLKGHILAALP	28
LAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVVEALTLHILAALP	29
LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKNLINRAKTVEGVDAIAHILAALP	30
LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKSLINRAKTVEGVDAITSHILAALP	31
LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKNLINRAKTVEGVNSLTSHILAALP	32
LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKNVINKAKTVEGVVEALIDILAALP	33
LAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVQALIAHILAALP	34
LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVVEALKHLILAALP	35
LAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKRLISKAKTVEGVKALISEILAALP	122
LAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVVEALTLHILAALP	123
LAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVVEALISEILAALP	124

【0068】

10

本明細書において用いる場合の用語「アルブミン結合」および「アルブミンに対する結合親和性」は、例えば表面プラズモン共鳴技術の使用により、例えば当該技術分野において公知のBiacore計器で試験され得るポリペプチドの特性を指す。例えば、下の実施例で説明するように、アルブミン結合親和性は、アルブミンまたはその断片を前記計器のセンサーチップ上に固定し、試験すべきポリペプチドを含有する試料にそのチップ上を通過させる実験で試験され得る。あるいは、試験すべきポリペプチドを前記計器のセンサーチップ上に固定し、アルブミンまたはその断片を含有する試料にそのチップ上を通過させる。これに関して、アルブミンは、哺乳動物からの血清アルブミン、例えば、ヒト血清アルブミンであり得る。当業者は、その後、かかる実験によって得た結果を解釈して、アルブミンに対するポリペプチドの結合親和性の少なくとも一つの定性的測度を確立することができる。例えば相互作用についての K_D 値を決定するために、定量的測度が所望される場合には、表面プラズモン共鳴法を用いることもできる。例えば、Biacore2000計器（GE Healthcare）で、結合値を規定することができる。アルブミンを、好適にはその測定器のセンサーチップ上に固定し、親和性を判定すべきポリペプチドの試料を系列希釈によって調製し、注入する。その後、例えば、その計器の製造業者（GE Healthcare）によって提供されるBIAevaluation 4.1ソフトウェアの1:1ラングミュア結合モデルを使用して、その結果から K_D 値を計算することができる。

20

【0069】

一つの実施形態において、この態様によるアルブミン結合ポリペプチドは、相互作用の k_{off} 値が最大で $5 \times 10^{-5} \text{秒}^{-1}$ 、例えば最大で $5 \times 10^{-6} \text{秒}^{-1}$ であるように、アルブミンに結合する。

30

【0070】

本明細書に記載する改変ポリペプチドにおいて使用するABDの別の好ましい実施形態において、改変ポリペプチドのアルブミン結合ポリペプチド部分のアミノ酸配列は、本明細書中の表1または配列表（listing）からのものを含めて、およびさらにそれらのdes-Pro 46形態を含めて、本明細書に記載する配列のいずれか一つから選択されたABDを含む。

【0071】

一つの実施形態において、この態様によるアルブミン結合ポリペプチドは、本明細書中で定義または例示するABD配列のNおよび／またはC末端に位置する1つ以上の追加のアミノ酸残基をさらに含む。これらの追加のアミノ酸残基は、ポリペプチドによるアルブミンの結合を強化することに、およびフォールディングされたアルブミン結合ドメインの高次構造安定性をさらに向上させることにある一定の役割を果たすことができるが、同じく、例えば、ポリペプチドの生産、精製、in vivoもしくはin vitroでの安定化、カップリング、標識または検出のうちの1つ以上およびこれらの任意の組み合わせに関する他の目的にも役立ち得る。かかる追加のアミノ酸残基は、化学的カップリング、例えばHD1への化学的カップリングのために加えられた1つ以上のアミノ酸残基を含み得る。

40

【0072】

したがって、例えば、一つの実施形態では、ABDアミノ酸配列のNまたはC末端の α ヘリックスの直ぐ前または後のアミノ酸が高次構造安定性に影響を及ぼし得る。高次構造安定性向上に寄与し得るアミノ酸残基の一例は、上で定義したとおりのABDアミノ酸配列のN末

50

端に位置するセリン残基である。前記N末端セリン残基は、セリン側鎖の γ 酸素とグルタミン酸残基のポリペプチド主鎖NHとの間の水素結合を伴うことにより、カノニカルS-X-X-Eキャッピングボックスを形成することが場合によってはあり得る。このN末端キャッピングは、本開示の第一の態様によるアルブミン結合ポリペプチドを構成する3ヘリックスドメインの第一の α ヘリックスの安定化に寄与することができる。

【0073】

したがって、一つの実施形態において、前記追加のアミノ酸は、前記ポリペプチドのN末端の少なくとも1つのセリン残基を含む。言い換えると、前記ABDアミノ酸配列には、1つ以上のセリン残基（複数可）が先行している。前記アルブミン結合ポリペプチドの別の実施形態において、前記追加のアミノ酸は、ABD配列のN末端のグリシン残基を含む。ABDアミノ酸配列には、1つ、2つ、3つ、4つまたは任意の好適な数のアミノ酸残基が先行し得ることは言うまでもない。例えば、前記ABDアミノ酸配列には、単一のセリン残基、単一のグリシン残基またはこれら2つの組み合わせ、例えばグリシン-セリン（GS）の組み合わせもしくはグリシン-セリン-セリン（GSS）の組み合わせが先行し得る。N末端セリンを有する一つのかかるABDの例は、SLAEAKVLNRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP（配列番号176）である。その対応するデス-プロリン形態は、SLAEAKVLNRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAAL（配列番号177）となる。

10

【0074】

さらに別の実施形態において、前記追加のアミノ酸残基は、本明細書中で定義するABDポリペプチドのN末端のアラニン酸を含み、または上記ABD配列のN末端のアラニン-セリン配列としてセリンとの組み合わせでのアラニン酸を含む。さらに別の実施形態において、前記追加のアミノ酸残基は、本明細書中で定義するABDポリペプチドのN末端のグルタミン酸を含む。

20

【0075】

同様に、C末端キャッピングを活用して、アルブミン結合ポリペプチドを構成する3ヘリックスドメインの第三の α ヘリックスの安定性を向上させることができる。上で定義したABDアミノ酸配列のC末端に存在するC末端プロリン残基は、少なくとも一部は、キャッピング残基として機能することができる。C末端のプロリン残基に続くリシン残基は、アルブミン結合ポリペプチドの第三のヘリックスのさらなる安定化に、該ポリペプチド主鎖内のリシン残基の ϵ アミノ基と、該リシンの2および3残基前に位置するアミノ酸のカルボニル基、例えば上で定義したABDアミノ酸配列のロイシンおよびアラニン残基のカルボニル基間の水素結合によって、寄与することができる。したがって、一つの実施形態において、前記追加のアミノ酸は、前記ポリペプチドのC末端のリシン残基を含む。

30

【0076】

上で論じたように、前記追加のアミノ酸は、前記アルブミン結合ポリペプチドの生産に関係し得る。特に、C末端プロリンに続く1つ以上の所望によるアミノ酸残基は、第一の態様によるアルブミン結合ポリペプチドを化学的ペプチド合成によって生産するときに有利であり得る。かかる追加のアミノ酸残基は、例えば、前記合成のジペプチド段階でジケトピペラジンなどの望ましくない物質の形成を防止することができる。かかるアミノ酸残基の一例は、グリシンである。したがって、一つの実施形態において、前記追加のアミノ酸は、前記ポリペプチドの、プロリン残基の直後の、または上で説明したような追加のリシンおよび／またはグリシンの後の、C末端のグリシン残基を含む。あるいは、ポリペプチド生産は、ABDアミノ酸配列のC末端プロリン残基のアミド化からの恩恵を被り得る。この場合、C末端プロリンは、そのカルボキシ炭素に追加のアミン基を含む。

40

【0077】

当業者には、C末端修飾を遂行する方法、例えば、ペプチド合成のために予め作製される種々のタイプのマトリックスによる方法も知られている。

【0078】

別の実施形態において、前記追加のアミノ酸残基は、前記ポリペプチドのNおよび／またはC末端のシステイン残基を含む。かかるシステイン残基は、本明細書において定義す

50

るとおりのABDアミノ酸配列の直ぐ前および／もしくは直ぐ後ろにあることがあり、および／または上で説明したような任意の他の追加のアミノ酸残基の前および／もしくは後にあることがある。ポリペプチド鎖へのシステイン残基の付加により、該アルブミン結合ポリペプチドの部位特異的コンジュゲーションのためのチオール基を得ることができる。あるいは、セレノシステイン残基を、システイン残基の導入のための様式と同様の様式で前記ポリペプチド鎖のC末端に導入して、部位特異的コンジュゲーションを助長することができる (Chengら、Nat Prot 1:2、2006)。

【0079】

一つの実施形態において、前記アルブミン結合ポリペプチドは、2つのシステイン残基しか含まない。別の実施形態において、前記アルブミン結合ポリペプチドは、1つのシステイン残基しか含まない。

10

【0080】

別の実施形態において、前記アルブミン結合ポリペプチドの追加のアミノ酸残基は、該ポリペプチドの精製または検出のための「タグ」、例えばヘキサヒスチジル (His₆) タグ、または前記タグに特異的な抗体との相互作用のためおよび／もしくは精製の際に使用するための「myc」 (「c-Myc」) タグもしくは「FLAG」タグを含む。当業者には、他の代替物も知られている。

【0081】

例えば、好ましい改変ポリペプチド実施形態において、前記ABDには、LAEAKVLNRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (配列番号35)、およびそのN末端伸長ABD配列形態が含まれ、該N末端伸長配列には、SLAEAKVLNRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (配列番号176) およびGSLAEAKVLNRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (配列番号178) が含まれる。位置2のセリンがこの配列をキャップしており、その結果、この位置にグリシンまたはアラニンを含む場合と比較してT_mがおおよそ2°C上昇する。ASLAEAKVLNRELDKYGVSDFYKR LINKAKTVEGVEALKLHILAALP (配列番号179) の場合のように、アラニンがセリンの直前にくる場合もある。C末端プロリン、グリシンまたは両方が上記各ABD配列に不存在である、対応するポリペプチドも好ましい。したがって、上記ABDがデスープロリン形態を含み、親形態と比較して収率を向上させることができる配列LAEAKVLNRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAAL (配列番号35)、ならびにSLAEAKVLNRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAAL (配列番号177) およびGSLAEAKVLNRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAAL (配列番号180) およびASLAEAKVLNRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAAL (配列番号181) を含むそのN末端伸長ABD配列形態も好ましい。本明細書に開示するABD配列のいずれかを伴う一つの態様において、エキセンディン-4またはエキセンディン類似体へのリンカーは、本明細書に開示するようなグリシンを含むリンカー、例えば、G、GGG、GGS、GGGS (配列番号192)、TGGGGAS (配列番号193)、TGGGGAS (配列番号194) またはTGGGGSAS (配列番号195) である。

20

30

【0082】

本明細書に開示するABD配列のいずれかを伴う一つの態様において、エキセンディン-4またはエキセンディン類似体のC末端へのリンカーは、本明細書に開示するような、グリシンを含むリンカー、例えばG、GGG、GGS、GGGS、TGGGGAS、TGGGGASおよびTGGGGSASである。

40

【0083】

本明細書に記載する改変ポリペプチド、特に、そのC末端がプロリンまたはペプチド合成中にラセミ化することが公知の他のアミノ酸で終わる改変ポリペプチドの一つの実施形態では、グリシンをそのC末端に付加させて、該C末端のアミノ酸残基のラセミ化に伴う潜在的問題に対処することができる。あるいは、前記C末端アミノ酸は、グリシンで終わるのではなく、その(α-アミノ基)アミド化形態、例えば、プロリン対プロリンアミドであり得る。しかし、アミド化ポリペプチドを化学合成ではなく組換えによって生産することを望む場合には、当該技術分野において公知の幾つかの方法、例えばアミド化PAM酵素の使用によって、C末端アミノ酸のアミド化を行うことができる。

50

【0084】

前記改変ポリペプチドの別の態様は、ABDが、貧または低可溶性エキセンディン変異体の水溶液への溶解度の増加をもたらすことができることである。この特性は、ABD自体によって付与される場合もあり、または結果として生ずる複合体のためである場合もあり、この複合体は、in vivoもしくはin vitroで高可溶性アルブミンに結合した改変ポリペプチドの複合体であり、その会合が水溶液への前記改変ポリペプチドの溶解度を増加させる。したがって、このさらなる態様のある実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質またはコンジュゲートとしてのアルブミン結合ドメインに共有結合でカップリングしている、それ自体は水への溶解度がわずか1mg/mL、またはわずか2mg/mL、またはわずか5mg/mLであるエキセンディン化合物を含む組成物であって、前記化合物と前記アルブミン結合ポリペプチド、融合タンパク質またはコンジュゲートが共有結合でカップリングしており、および該改変ポリペプチドの溶解度が、融合していない（またはコンジュゲートしていない）天然エキセンディン化合物のものより大きい組成物を提供する。

10

【0085】

アルブミンへの結合。血清アルブミンは、哺乳動物血清中に最も豊富にあるタンパク質であり（40 g/L；ヒトの場合はおよそ0.7 mM）、脂質およびビリルビンをはじめとする（しかしこれに限定されない）様々な分子に結合している（Peters T、1985、Advances in Protein Chemistry 37：161）。血清アルブミンの半減期は、動物の大きさに正比例し、例えば、ヒト血清アルブミン（HSA）は、19日の半減期を有し、ウサギ血清アルブミンは、約5日の半減期を有すると言われている（McCurdy TRら、J. Lab. Clin. Med. 143：15、2004）。ヒト血清アルブミンは、体中いたるところに、特に、腸および血液区画に広く分布しており、そこで主としてモル浸透圧濃度の維持に関与する。構造的には、アルブミンは、3つの相同ドメインおよび合計584または585のアミノ酸を含む一本鎖タンパク質である（Dugaiczky Lら、1982、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79：71）。アルブミンは、17のジスルフィド架橋および単一の反応性チオール、C34を含有するが、Nに連結されたおよびOに連結された炭水化物部分はない（Peters、1985、同上；Nicholson JPら、2000、Br J Anaesth 85：599）。このグリコシル化の欠如が、アルブミンの組換え発現を単純にする。アルブミンのこの特性と、その三次元構造が公知である（He、XMおよびCarter DC、1992、Nature 358：209）という事実により、アルブミンは、組換え融合タンパク質での使用に関する魅力的な候補になっている。かかる融合タンパク質は、一般に、（そのタンパク質自体を投与すると迅速に体から一掃されることとなる）治療用タンパク質と（自然なゆっくりとしたクリアランスを示す）血漿タンパク質とを単一ポリペプチド鎖内に併せ持つ（Sheffield WP、Curr. Drug Targets Cardiovasc. Haematol. Disord. 1：1 2001）。かかる融合タンパク質は、必要とする注射頻度がより少なく、治療用タンパク質のin vivoレベルがより高いことで臨床的有用性をもたらすことができる。しかし、本明細書における改変ポリペプチドは、アルブミンにコンジュゲートしておらず、その代り、アルブミンへの非共有結合を可能にするモチーフを含有する。

20

30

【0086】

アルブミン半減期。種々の種におけるアルブミン半減期は、一般に、動物の体重に基づくアロメトリック・スケーリングに準拠することが観察されている。例えば、マウス、ラット、ウサギおよびヒトにおけるアルブミン半減期は、それぞれ、1、1.9、5.6および19日と推定されている。さらに言えば、累乗フィット分析（DaviesおよびMorris、1993、Pharm. Res. (N.Y.) 10：1093-1095）により、次の方程式が得られる：
アルブミン半減期（日）= $3.75 \times \text{体重 (kg)}^{0.368}$ 。

40

【0087】

さらなる実施形態。本明細書に開示する各ポリペプチドが、それらの天然に存在する第一のアミノ酸を有するフレーム内のN末端にメチオニンを含む、例えば、N末端にメチオニンが付加されたエキセンディン-4であるMet-エキセンディン-4を含むことも考えられることは言うまでもない。さらに、本明細書に示す改変ポリペプチド配列中にC末端Glyが出現する場合、この残基が後のアミド化中に失われ得ることは言うまでもない。一部の実

50

施形態は、合成における中間体、例えば、当該技術分野において公知であるようなアフィニティー精製に用いられる「Hisタグ」を有するもの、および所望により後で除去して、治療用に好適な成熟改変ポリペプチドを得ることができるものなどである。

【0088】

本明細書に記載する任意の改変ポリペプチドの一部の実施形態において、エキセンディン類似体は、親エキセンディン配列に対して少なくとも70%、例えば、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%のまたはさらにそれ以上の配列同一性を有することができる。一部の実施形態において、前記親エキセンディンはエキセンディン-4であり、および前記エキセンディン類似体は、エキセンディン-4に対して少なくとも70%、例えば、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%のまたはさらにそれ以上の配列同一性を有し得る。当該技術分野において公知であるように、GLP-1（グルカゴン様ペプチド1）は、エキセンディンではなく；およびGLP-1の配列は、本明細書に記載する改変ポリペプチドに好適なエキセンディン配列から明確に除外される。

【0089】

一部の実施形態では、ポリペプチドホルモンドメインとABDペプチドを共有結合で連結している本明細書に記載のリンカー、例えばL1、を有する化合物を提供する。一部の実施形態において、第一のリンカー（L1）は、改変ポリペプチド中のHD1を共有結合で連結する。一部の実施形態において、L1は、結合である。一部の実施形態では、ポリペプチドホルモンドメイン（例えば、本明細書に記載のHD1）を、ペプチドリリンカーを介してABDペプチドに共有結合で連結させることができる。リンカーは所望によるものである、すなわち、いずれのリンカーも単に結合であり得る。存在する場合、リンカーは主にスペーサー機能を果たすものなので、リンカーの化学構造は重要ではない。一つの実施形態において、リンカーは、ペプチド結合によって連結された1から30のアミノ酸を含む。それらのアミノ酸を20の天然に存在する（すなわち生理的）アミノ酸から選択することができる。あるいは、非天然アミノ酸を化学合成、翻訳後化学修飾によって組み込むこともでき、または宿主細胞での組換え発現によるin vivo組み込みによって組み込むこともできる。これらのアミノ酸の中には、グリコシル化されているものもあり得る。別の実施形態において、前記1から30のアミノ酸は、グリシン、アラニン、プロリン、アスパラギン、グルタミンおよびリシンから、ならびにさらにアスパルテートおよびグルタメートから選択される。さらなる実施形態において、前記リンカーは、アミノ酸で構成されており、該アミノ酸の大多数が立体障害のないアミノ酸、例えばグリシン、アラニンおよび／またはセリンである。「立体障害のない」は、通例の意味で、より大きな側鎖を有するアミノ酸、例えば、Leu、Trp、Tyr、Pheおよびこれらに類するものに比べて立体障害が最小限に抑えられるような、小さい側鎖、例えば0-2個の非水素原子、を有するアミノ酸を指す。ポリグリシン類、例えば、(Gly)₃、(Gly)₄（配列番号125）、(Gly)₅（配列番号126）は特に有用であり、ポリアラニン類、ポリ(Gly-Ala)およびポリ(Gly-Ser)も有用である。荷電ポリグリシン類は有用であり得、それらとしては、例えば、ポリ(Gly_n-Glu)（配列番号127）、ポリ(Gly_n-Lys)（配列番号128）、ポリ(Gly_n-Asp)（配列番号129）およびポリ(Gly_n-Arg)（配列番号130）モチーフ（これらの式中、nは、1から6であり得る）が挙げられる。リンカーの他の具体的な例は、(Gly)₃Lys(Gly)₄（配列番号131）；(Gly)₃AsnGlySer(Gly)₂（配列番号132）；(Gly)₃Cys(Gly)₄（配列番号133）；およびGlyProAsnGlyGly（配列番号134）である。GlyとAlaの組み合わせは特に有用であり、GlyとSerの組み合わせも有用である。したがって、さらなる実施形態において、前記ペプチドリリンカーは、グリシンリッチペプチド、例えば、Gly-Gly-Gly；配列[Gly-Ser]_n（配列番号135）、[Gly-Gly-Ser]_n（配列番号136）、[Gly-Gly-Gly-Ser]_n（配列番号137）および[Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]_n（配列番号138）（これらの式中、nは、1、2、3、4、5または6である）の群から選択され、例えば、[Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]₃である。「グリシンリッチペプチド」は、複数のグリシン残基、好ましくは多数のグリシン残基、さらに好ましくは圧倒的多数のグリシン残基を含むポリペプチドを指す。

【0090】

一定の実施形態では、荷電リンカーを使用することがある。かかる荷電リンカーは、顕著な数の酸性残基（例えば、Asp、Gluおよびこれらに類するもの）を含有し得、または顕著な数の塩基性残基（例えば、Lys、Argおよびこれらに類するもの）を含有し得るので、該リンカーは、それぞれ、7未満のまたは7より大きいpIを有する。当業者には理解されるように、またすべての他のことが同じである場合、所与のリンカー中の酸性または塩基性残基の相対量が多いほど、そのリンカーのpIは、それぞれ、低くまたは高くなる。かかるリンカーは、本明細書に開示する改変ポリペプチドに有利な特性、例えば、ペプチドpI（等電点）を修飾する特性であって、そしてまたその修飾によって特定のpHで、例えば生理pH（例えば、pH7.2とpH7.6の間（両端の値を含む））での、またはかかるポリペプチドを含む医薬組成物中での、かかるポリペプチドの溶解性および／または安定性を向上させることができる特性を付与することができる。当該技術分野において公知であるように、ペプチドの溶解度は、該ペプチドのpIから少なくともプラスまたはマイナス1pH単位またはそれ以上であるpHを有する組成物で製剤化することによって向上させることができる。

10

【0091】

例えば、「酸性リンカー」は、7未満；6と7の間（両端の値を含む）；5と6の間（両端の値を含む）；4と5の間（両端の値を含む）；3と4の間（両端の値を含む）；2と3の間（両端の値を含む）；または1と2の間（両端の値を含む）のpIを有するリンカーである。同様に、「塩基性リンカー」は、7より大きい；7と8の間（両端の値を含む）；8と9の間（両端の値を含む）；9と10の間（両端の値を含む）；10と11の間（両端の値を含む）；11と12の間（両端の値を含む）；または12と13の間（両端の値を含む）のpIを有するリンカーである。ある一定の実施形態において、酸性リンカーは、 $[\text{Gly-Glu}]_n$ （配列番号139）； $[\text{Gly-Gly-Glu}]_n$ （配列番号140）； $[\text{Gly-Gly-Gly-Glu}]_n$ （配列番号141）； $[\text{Gly-Gly-Gly-Gly-Glu}]_n$ （配列番号142）、 $[\text{Gly-Asp}]_n$ （配列番号143）； $[\text{Gly-Gly-Asp}]_n$ （配列番号144）； $[\text{Gly-Gly-Gly-Asp}]_n$ （配列番号145）； $[\text{Gly-Gly-Gly-Gly-Asp}]_n$ （配列番号146）（これらの式中、nは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上である）の群から選択される配列、例えば、 $[\text{Gly-Gly-Glu}]_6$ を含有するであろう。ある一定の実施形態において、塩基性リンカーは、 $[\text{Gly-Lys}]_n$ （配列番号147）； $[\text{Gly-Gly-Lys}]_n$ （配列番号148）； $[\text{Gly-Gly-Gly-Lys}]_n$ （配列番号149）； $[\text{Gly-Gly-Gly-Gly-Lys}]_n$ （配列番号150）、 $[\text{Gly-Arg}]_n$ （配列番号151）； $[\text{Gly-Gly-Arg}]_n$ （配列番号152）； $[\text{Gly-Gly-Gly-Arg}]_n$ （配列番号153）； $[\text{Gly-Gly-Gly-Gly-Arg}]_n$ （配列番号154）（これらの式中、nは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上である）の群から選択される配列、例えば、 $[\text{Gly-Gly-Lys}]_6$ を含有するであろう。

20

30

【0092】

加えて、一定の構造モチーフまたは構造的特徴、例えば α ヘリックスを有するリンカーを調製することができる。例えば、かかるリンカーは、 $[\text{Glu-Ala-Ala-Ala-Lys}]_n$ （配列番号155）（式中、nは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上である）の群から選択される配列、例えば、 $[\text{Glu-Ala-Ala-Ala-Lys}]_3$ 、 $[\text{Glu-Ala-Ala-Ala-Lys}]_4$ 、または $[\text{Glu-Ala-Ala-Ala-Lys}]_5$ を含有し得る。当業者は、任意の特定のリンカー配列のヘリックスの内容を容易に決めることができる。

40

【0093】

ペプチドリinker以外の生体適合性リンカーを使用して、エキセンディンのC末端をABDまたはABM配列のN末端に共有結合させることができる。前記リンカーは、生体適合性ポリマー、好ましくは水溶性、およびさらに好ましくは約50kDから約5000kD、または約50kDから500kD、または約100kDから500kDであり得る。例示的生体適合性、水溶性ポリマーリンカーは、PEGリンカー、例えば、 $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-$ であり、この式中のnは、このPEGリンカーが100から5000kD、好ましくは100から500kDの分子量を有することができるようなものである。かかるリンカーは、 $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$

50

あり得、この場合のnは、PEGリンカー分子量が100kDから5000kD、好ましくは10kDから500kDになるようなものであり得る。他の生体適合性ポリマー、例えば、多糖類、ポリプロピレングリコール、およびポリプロピレングリコールとエチレングリコールのコポリマーをはじめとする（しかしこれに限定されない）生体適合性ポリマーを使用することができる。典型的には、かかるリンカーは、同一または異なる反応性基であり得る反応性基を、各端に含むであろう。反応性基を有するかかるリンカーは公知であり、入手可能である。好ましくは、前記反応性基は、ペプチドのN末端アミノまたはC末端カルボキシ基のいずれかと反応性である。例えば、反応性基は、当該技術分野において公知であるように、ブチルアルデヒド、プロピオンアルデヒド、アルデヒド、スクシンイミドまたはマレイミド部分であり得る。 $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_n-\text{C}(\text{O})-$ （式中、 $n=2-20$ ）など、そしてペプチド官能基を立体障害しない任意の基、例えば低級アルキル（例えば、 C_1-C_6 ）、低級アシル、ハロゲン、CN、および NH_2 によってさらに置換されていることがあるアルキルリンカーは、あまり好ましくない。

【0094】

本発明による使用に好適なリンカーが、上記および本明細書に記載する特徴およびモチーフの1つ以上を有し得ることも理解されるはずである。例えば、リンカーは、酸性リンカーならびに α ヘリックスなどの構造モチーフも含むことがある。同様に、リンカーは、塩基性リンカーと、 α ヘリックスなどの構造モチーフとを含むことがある。リンカーは、酸性リンカーと、塩基性リンカーと、 α ヘリックスなどの構造モチーフとを含むことがある。加えて、本発明による改変ポリペプチドが、1つより多くのリンカーを有することがあり、それぞれのかかるリンカーが、本明細書に記載する特徴の1つ以上を有することがあることも理解されるはずである。

【0095】

本明細書に記載するリンカーは例示的であり、本発明の範囲内のリンカーは、さらにかなり長いことがあり、他の残基を含むこともある。一つの実施形態において、エキセンディン配列がリンカーなしでABD配列に直接連結されている改変ポリペプチドは、明白に除外される。

【0096】

一部の実施形態において、前記改変ポリペプチドは、C末端にABD配列を、およびN末端にHD1配列を含む。一定の好ましい実施形態において、前記N末端は、エキセンディン配列、エキセンディン断片配列またはエキセンディン類似体配列である。さらに、ABDおよびHD1を含む実施形態に関して、前記改変ポリペプチドは、構造HD1-ABDを有する場合がある。

【0097】

本明細書に示す改変ポリペプチドのN末端および／またはC末端について明確な指示がなければ、その改変ポリペプチドをN末端からC末端に向かって読むべきであることは言うまでもない。例えば、HD1が、エキセンディン化合物またはその類似体の配列を有する場合、用語HD1-ABD、HD1-L1-ABD、HD1-ABD、およびこれらに類するものは、N末端および／またはC末端についての明確な指示がなければ、エキセンディン配列またはその類似体が、改変ポリペプチドのN末端に存し、ABDが、C末端に存することを意味する。逆に、N末端および／またはC末端が明確に指示されている場合には、その末端についての明確な指示に従って改変ポリペプチド読むべきである。例えば、末端 $\text{HD1}_{\text{C末端}}-\text{ABD}$ 、 $\text{HD1}-\text{L1}-\text{ABD}_{\text{N末端}}$ 、およびこれらに類するものは、ABDがその改変ポリペプチドのN末端に存し、HD1がC末端に存することを意味する。

【0098】

一部の実施形態において、本明細書に記載する改変ポリペプチドは、ABDポリペプチドのみの、すなわち融合ホルモンドメイン不存在の状態の親和性とは異なる、血清アルブミンに対する親和性を有する。有効な会合を達成するために、前記改変ポリペプチドは、解離定数 K_D が、例えば約 10^{-6}M 、 10^{-7}M 、 10^{-8}M 、 10^{-9}M 、 10^{-10}M 、 10^{-11}M 、 10^{-12}M 、 10^{-13}M 、 10^{-14}M またはさらに 10^{-15}M 未満であるような、血清アルブミンに対する結合親

和性を有し得る。一部の実施形態において、親和性は、過度に強くないので、前記改変ポリペプチドは、アルブミンから解離することでき、生物学的応答、例えば、受容体、例えばエキセンディン受容体への結合を惹起することができる。親和性、好ましくはヒト血清アルブミンに対する親和性は、PCT公開出願番号国際公開第2009/016043号パンフレットに記載されているように測定することができ、この参考文献は、その全体があらゆる目的（限定ではないがアッセイおよび合成方法を含む）のため出典明示により本明細書に援用されている。

【0099】

一部の実施形態において、本明細書に記載する改変ポリペプチドは、ホルモンドメイン（単数または複数）とコンジュゲートしている、血漿半減期を延長することができる異なる部分（例えば、PEGまたはFcまたはアルブミン）を有する対応する化合物より優れている。この文脈で、用語「優れている」は、疾患または障害の処置の評価に重きが置かれ得る様々な機能的特性を指す。例えば、本明細書に記載する改変ポリペプチドは、ホルモンドメイン（単数または複数）とコンジュゲートしている異なる部分を有する対応する化合物より少ない、例えば1倍、2分の1、3分の1、4分の1、5分の1またはさらにそれ以下の生物活性（ホルモンドメイン）成分を要するだろう。さらなる例については、本明細書に記載する改変ポリペプチドは、より高い効力、例えば1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、50倍またはさらにそれより高い効力を有し得る。

【0100】

ここで考えられる改変ポリペプチド化合物としては、下記の表2に示すような化合物が挙げられる。一つの好ましい化合物は、化合物31である。

10

20

【表 2】

表2. 選択した例示的改変ポリペプチド

化合物	配列
5	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSTGGGGSASLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (配列番号40)
6	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSTGGGSGGGSGGGSGGGSASLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (配列番号41)
7	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISTGGGGGASLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (配列番号42)
8	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISTGGGSGGGSGGGSGGGSASLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (配列番号43)
10	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNTGGGGSASLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (配列番号51)
15	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISTGGGGSASLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (配列番号163)
21	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGSLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (配列番号99)
23	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGSLSEAKEMAIRELDANGVSDFYKDKIDDAKTVEGVVALKDLILNSLP (配列番号169)
24	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGSLAKAKADAIEILKKYGIGDYIYIKLINNGKTAEGVTALKDEILASLP (配列番号170)
31	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGSLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (配列番号95)
32	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGSLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (配列番号97)
33	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEISGGSLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (配列番号96)
34	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSTGGGGSASLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (配列番号55) ;

10

20

30

【0101】

ここで考えられるさらなるポリペプチド化合物としては、下記の表3Aに示すような化合物が挙げられる：

【表 3】

表3A. 選択した例示的改変ポリペプチド

化合物	配列
9	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNTGGGSGGGSGGGSGGGSASLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (配列番号53)
11	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNTGGGSGGGSGGGSGGGSASLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (配列番号62)
12	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNTGGGGSASLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (配列番号67)
19	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSTGGGGSASYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (配列番号166)
20	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (配列番号167)

40

【0102】

具体的には、N末端メチオニンがまったく存在しない上記配列の化合物が考えられる。N末端メチオニンは、主として、細菌発現に適便なものとして存在し得る。しかし、本発明

50

の改変ペプチドを真核生物宿主細胞（例えば酵母（例えば、ピチア属（*Pichia*））、哺乳動物、バキュロウイルス）または翻訳後N末端タンパク質分解性プロセッシングを有する他の宿主細胞で発現させて、所望のホルモンまたはABD配列の天然に存在する成熟ペプチド対応物中に見い出されるような、すなわちメチオニンまたは他のリーダー配列が付加されていない、N末端アミノ酸を生じさせることができる。あるいは、発現および／または分泌（およびさらには精製）に使用されるN末端配列は、例えばTEVなどのプロテアーゼの使用などにより、翻訳後に除去することができるものであり得る。

【0103】

様々なHD1、L1およびABD成分を有する、ここで考えられるさらなる改変ポリペプチド化合物には、下記の表3Bに開示するものを含めて、本明細書中の表および配列表（listing）の改変ポリペプチドのいずれかの構造を有する化合物が含まれる。

【表 4 - 1】

表3B. 選択した例示的改変ポリペプチド

配列	
HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNTGGGGSASLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (配列番号51)	
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNTGGGGSASLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (配列番号52)	
HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNTGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSASLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (配列番号53)	
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNTGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSASLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (配列番号54)	10
HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGPSSGAPPPSTGGGGSASLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (配列番号55)	
HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGPSSGAPPPSTGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSASLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (配列番号56)	
HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISTGGGGSASLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (配列番号57)	
HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISTGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSASLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (配列番号58)	
HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGPSSGAPPSKKKKKKKTGGGGSASLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (配列番号59)	20
HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGPSSGAPPSKKKKKKKTGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSASLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (配列番号60)	
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGPSSGAPPPSGGLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (配列番号61)	
HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNTGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSASLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (配列番号62)	
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGPSSGAPPPSTGGGGSASLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (配列番号63)	
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGPSSGAPPPSTGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSASLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (配列番号64)	30
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISTGGGGSASLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (配列番号65)	
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISTGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSASLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (配列番号66)	
HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNTGGGGSASLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (配列番号67)	
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNTGGGGSASLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (配列番号68)	
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNTGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSASLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (配列番号70)	40

【表 4 - 2】

HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSTGGGGSASLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAK TVEGVRALKLHILAALP (配列番号71)	
HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSTGGGSGGGSGGGSGGGSASLAEAKVLANRELDKYG VSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (配列番号72)	
HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISTGGGGSASLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVE GVRALKLHILAALP (配列番号73)	
HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISTGGGSGGGSGGGSGGGSASLAEAKVLANRELDKYGV SDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (配列番号74)	
HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSKKKKKKKTGGGGSASLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKN IINRAKTVEGVRALKLHILAALP (配列番号75)	10
HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSKKKKKKKTGGGSGGGSGGGSGGGSAS LAEAKVLANR ELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (配列番号76)	
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGGLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGV RALKLHILAALP (配列番号77)	
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGGLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGV EALKLHILAALP (配列番号78)	
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISGGGLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEA LKLHILAALP (配列番号79)	
HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGGLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAA LP (配列番号80)	20
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGGLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAAL P (配列番号81)	
HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGGLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEG VEALKLHILAALP (配列番号82)	
HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISGGGLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEA LKLHILAALP (配列番号83)	
HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSKKKKKKKGGGLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKA KTVEGVEALKLHILAALP (配列番号84)	
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGGLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGV EALKLHILAALP (配列番号85)	30
HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGGLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAAL P (配列番号86)	
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGGLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGV RALKLHILAALP (配列番号87)	
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISGGGLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRAL KLHILAALP (配列番号88)	
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGGLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAAL P (配列番号89)	
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGGLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAAL P (配列番号90)	40

【表 4 - 3】

HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGV RALKLHILAALP (配列番号91)	
HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISGGGLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRA LKLHILAALP (配列番号92)	
HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSKKKKKKGGGLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRA KTVEGVRAKLHILAALP (配列番号93)	
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGV RALKLHILAALP (配列番号94)	
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGV EALKLHILAALP (配列番号95)	10
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISGGSLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGV EALKLHILAALP (配列番号96)	
HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGSLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGV EALKLHILAALP (配列番号97)	
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGSLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGV EALKLHILAALP (配列番号98)	
HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGV EALKLHILAALP (配列番号99)	
HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISGGSLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGV EALKLHILAALP (配列番号100)	20
HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSKKKKKKGGSLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKA KTVEGV EALKLHILAALP (配列番号101)	
HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGSLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGV RALKLHILAALP (配列番号102)	
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGV RALKLHILAALP (配列番号103)	
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISGGSLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGV RALKLHILAALP (配列番号104)	
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGSLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGV RALKLHILAALP (配列番号105)	30
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGSLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGV RALKLHILAALP (配列番号106)	
HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGV RALKLHILAALP (配列番号107)	
HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISGGSLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGV RALKLHILAALP (配列番号108)	
HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSKKKKKKGGSLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAK TVEGV RALKLHILAALP (配列番号109)	

III. 設計および生産方法

【0104】

構築物の設計。本明細書に記載する改変ポリペプチドをアミノ酸レベルで設計することができる。その後、当該技術分野において公知の様々なソフトウェア製品を使用して、これらの配列を、そのヌクレオチド配列を所望の発現宿主、例えば所望の発現宿主ベースのタンパク質発現、コドン最適化、制限部位内容物について最適化するように、逆翻訳することができる。例えば、ヌクレオチド配列を大腸菌 (E. coli) ベースのタンパク質発現についておよび制限部位内容物について最適化することができる。対象となるヌクレオチド配列に基づき、オーバーラップしているオリゴヌクレオチドを当該技術分野において公知であるような多段階PCRに付すことができる。当該技術分野において周知の条件下での

10

20

30

40

50

多重PCR反応においてこれらのオリゴヌクレオチドを用いて、対象となるタンパク質をコードするcDNAを構築することができる。一例については、1X Amplitaq Buffer、1.3mM MgCl₂、200uM dNTP、4U Amplitaq Gold、0.2 uMの各プライマー（AmpliTaQ Gold、ABI）で、サイクリングパラメータ：（94C：30秒、58C：1分、72C：1分）、35サイクルである。

【0105】

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

【0106】

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

【0107】

例示的構築物。ここで考えられる改変ポリペプチドの生産に有用な構築物には、下記の表4に示すポリペプチドをコードする構築物が含まれる。

【表5】

表4. 改変ポリペプチドの生産のための選択した例示的改変ポリペプチド

化合物	配列
P1	MAHHHHHHVGTGSNENLYFQHGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNTGGGGSGGGSGGGSGGG SASLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGV EALKLHILAALP (配列番号156)
P2	MAHHHHHHVGTGSNENLYFQHGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNTGGGGSASLAEAKVLANR ELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGV EALKLHILAALP (配列番号157)
P3	MAHHHHHHVGTGSNENLYFQHGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNTGGGGSGGGSGGGSGGG SASLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGV RALKLHILAALP (配列番号158)
P4	MAHHHHHHVGTGSNENLYFQHGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNTGGGGSASLAEAKVLANR ELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGV RALKLHILAALP (配列番号159)
P5	MSDKIIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAEWCGPCKMIAPILDEIADEYQGKLTVAKL NIDQNPGTAP KYGIRGIPTLLLFKNGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLAGSGSGHMH HHHHHSSGLVPRGSGMKET AAAKFERQHMDSPDLGTENLYFQHGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSTGGGGS GGGSGGGSGGGSGASLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGV EALKLHILAALP (配列番号160)
P6	MSDKIIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAEWCGPCKMIAPILDEIADEYQGKLTVAKL NIDQNPGTAP KYGIRGIPTLLLFKNGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLAGSGSGHMH HHHHHSSGLVPRGSGMKET AAAKFERQHMDSPDLGTENLYFQHGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNTGGGGSGGGSGGGSG GGASLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGV RALKLHILAALP (配列番号161)
P7	MSDKIIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAEWCGPCKMIAPILDEIADEYQGKLTVAKL NIDQNPGTAP KYGIRGIPTLLLFKNGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLAGSGSGHMH HHHHHSSGLVPRGSGMKET AAAKFERQHMDSPDLGTENLYFQHGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNTGGGGSASLAEAKVLA NRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGV RALKLHILAALP (配列番号162)

【0108】

一般的生産方法。本明細書に記載する改変ポリペプチド化合物は、当該技術分野において公知である生物学的、化学的および／または組換えDNA技術を用いて調製することができる。例示的方法は、本明細書に、および米国特許第6,872,700号明細書；国際公開第2007/139941号、同第2007/140284号、同第2008/082274号および同第2009/011544号パンフレット；ならびに米国特許出願公開第2007/0238669号明細書に記載されており、前記参考文献

献の開示は、それら全体があらゆる目的のため出典明示により本明細書に援用されている。前記化合物の他の調製方法をここで述べる。

【0109】

本明細書に記載する改変ポリペプチド化合物は、標準的な固相ペプチド合成技術、例えば、自動または半自動ペプチド合成装置を使用して調製することができる。簡単におよび一般的に言うと、前記ABDおよび治療用ホルモンペプチドを別々に作製し、その後、互いにコンジュゲートすることができ、または単一ポリペプチドとして作製することができる。したがって、別法として前記アルブミン結合ポリペプチド、治療用ホルモンまたは改変ポリペプチドを、保護された反応性側鎖を有するアミノ酸および／またはアミノ酸誘導体を使用する非生物学的ペプチド合成によって生産することができ、この非生物学的ペプチド合成では、アミノ酸および／またはアミノ酸誘導体を段階的にカップリングして、保護された反応性側鎖を有する第一の態様によるポリペプチドを形成し、前記ポリペプチドの反応性側鎖から保護基を除去し、および水溶液中で前記ポリペプチドをフォールディングさせ得る。すなわち、通常のアミノ酸（例えば、グリシン、アラニン、フェニルアラニン、イソロイシン、ロイシンおよびバリン）および予め保護されているアミノ酸誘導体を使用して、溶液中で、または有機溶媒中の固体支持体上で、ポリペプチド配列を逐次的に構築する。完全ポリペプチド配列が構築されたら、保護基を除去し、そのポリペプチドを水溶液中でフォールディングさせる。

10

【0110】

本開示による各ポリペプチドは、可逆的にフォールディングし、ABDドメインは、追加の要因なしで3ヘリックスバンドルドメインへと可逆的にフォールディングし、したがって自発的にフォールディングする。前記改変コンジュゲートは、任意の方法、例えば、本明細書に記載するような方法、例えば、非生物学的ペプチド合成によるアルブミン結合ポリペプチドの生産、および生産されたABDポリペプチドと本明細書中で定義する治療用ホルモンとのコンジュゲーション（この場合のABDは、完全に可逆的にフォールディングする）を含む方法によって生産することができる。これを円偏光二色性スペクトル分析によってアッセイした；20℃で一つのスペクトルを取り、90℃に加熱し、その後、20℃に戻した後に第二のスペクトルを取った。この手順の間に、当該技術分野において公知のT_mを判定し、変性したペプチドのフォールディング後にT_mが不変であることを見出した。

20

【0111】

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

30

40

【0112】

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

50

Manual、バージョン1.3B、1988年7月1日、第6節、pp. 49-70、Applied Biosystems, Inc. (カリフォルニア州フォスターシティ) 参照) を用いて行うことができる。HF(−5°Cから0°C、1時間)により、Boc-ペプチド樹脂を開裂することができる。水と酢酸を交互に用いて樹脂からペプチド抽出し、濾液を凍結乾燥させ得る。標準的な方法(例えば、Introduction to Cleavage Techniques、Applied Biosystems, Inc.、1990、pp. 6-12)に従って、Fmoc-ペプチド樹脂を開裂し得る。Advanced Chem Tech Synthesizer (Model MP S 350、ケンタッキー州ルイヴィル) を使用してペプチドを組み立てることもできる。

【0113】

本明細書に記載する化合物(エキセンディン、ABD、リンカー、改変ポリペプチド)を、Sambrookら、1989、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harborなどの当該技術分野において公知の方法を用いる組換えDNA技術を用いて調製することもできる。非ペプチド化合物を当該記述分野公知の方法によって調製することができる。例えば、Bartlettら、1986、Biorg. Chem.、14: 356-377に記載されているものなどの当該技術分野において公知の方法を用いて、リン酸塩含有アミノ酸およびかかるアミノ酸を含有するペプチドを調製することができる。アートメソッド(art methods)を用いてまたは本明細書に記載するように化合物をコンジュゲートさせることができる。

【0114】

あるいは当該技術分野において公知の組換え技術によって前記改変ポリペプチドを生産することができる。例えば、Sambrookら、1989(同上)参照。組換え技術によって生産されたこれらの改変ポリペプチドをポリヌクレオチドから発現させることができる。コドン縮重の利用を考慮に入れて野生型cDNA、例えばエキセンディン-4から、かかる改変ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド(DNAおよびRNAを含む)を得ることができ、さらに所望に応じて改変して、指示された置換を組み込むことができることは、当業者には理解されるであろう。これらのポリヌクレオチド配列をコドンに組み込んで、微生物宿主におけるmRNAの転写および翻訳を助長することができる。当該技術分野において周知の方法に従って、かかる製造的配列を容易に構築することができる。例えば、国際公開第83/04053号パンフレット参照(この参考文献は、その全体があらゆる目的のため出典明示により本明細書に援用されている)。上記ポリヌクレオチドは、所望によりN末端メチオニル残基をコードすることもある。本発明において有用な非ペプチド化合物を当該技術分野公知の方法によって調製することができる。例えば、リン酸塩含有アミノ酸、およびかかるアミノ酸を含有するペプチドを、当該技術分野において公知の方法を用いて調製することができる。例えば、BartlettおよびLanden、1986、Bioorg. Chem. 14: 356-77参照。

【0115】

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

【0116】

然るが故に、ポリヌクレオチド配列は、新規の有用なウイルスおよびプラスミドDNAベクターの生成に有用であり、新規の有用な形質転換およびトランスフェクション原核および真核宿主細胞(培養で増殖させた細菌、酵母および哺乳動物細胞を含む)の生成に有用

10

20

30

40

50

であり、ならびに本改変ポリペプチドを発現できるかかる宿主細胞の新規の有用な培養増殖方法に有用である。本明細書における改変ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列は、改変ポリペプチドの生産不足が緩和されるか、または改変ポリペプチドの生産のレベル上昇の必要性が満たされる場合における遺伝子療法に有用であり得る。

【0117】

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

10

【0118】

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

【0119】

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

20

【0120】

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

30

40

【0121】

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

50

【0122】

本発明の改変ポリペプチドは、市販の発現系、例えば、Pichia Expression System(Invitrogen、カリフォルニア州サンディエゴ)をその製造業者の指示書に従って使用して、酵母、例えば、ピチア属(Pichia)において組換え発現させることもできる。この系もまたプレートローα配列に依存して分泌を命ずるが、挿入物の転写は、メタノールによる誘導時にアルコールオキシダーゼ(AOX1)プロモーターによって駆動される。例えば、細菌および哺乳動物細胞上清から該改変ポリペプチドを精製するために用いられる方法によって、その分泌された改変ポリペプチドを酵母増殖培地から精製する。

【0123】

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

【0124】

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

【0125】

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

【0126】

別の例では、改変ポリペプチドをコードするDNA配列をPCRによって増幅し、適切なベクター、例えばpGEX-3X(Pharmacia、ニュージャージー州ピスカタウェイ)にクローニングし得る。pGEXベクターは、該ベクターによってコードされたグルタチオン-S-トラン

スフェラーゼ (GST) を含む融合タンパク質と、該ベクターのクローニング部位に挿入されたDNA断片によってコードされたタンパク質とを生産するように設計されている。例えば適切な切断部位を含むようにPCR用のプライマーを生成することができる。その後、組換え融合タンパク質を、該融合タンパク質のGST部分から切断することができる。pGEX-3X/改変ポリペプチド構築物を大腸菌XL-1 Blue細胞 (Stratagene、カリフォルニア州ラホーヤ) に形質転換し、個々の形質転換体を単離し、37°CでLB培地 (カルベニシリンを補足したもの) において波長600 nmで0.4の光学密度になるまで増殖させ、その後、0.5mMのイロプロピルβ-D-チオガラクトピラノシド (Sigma Chemical Co.、ミズーリ州セントルイス) の存在下で4時間、さらにインキュベートする。個々の形質転換体からのプラスミドDNAを精製し、自動シーケンサーを使用して部分的に配列決定して、正しい配向で所望の改変ポリペプチドをコードする遺伝子挿入物の存在を確認する。

10

【0127】

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

20

【0128】

その融合タンパク質を消化に付して、GSTを成熟改変ポリペプチドから切断することができる。この消化反応物 (20~4μg 融合タンパク質、20~30単位 ヒトトロニン (0.5mL PBS中の4000U/mg (Sigma)) を16~48時間、室温でインキュベートし、変性SDS-PAGEゲルに負荷して反応生成物を分画する。そのゲルを0.4M KClに浸漬して、タンパク質バンドを可視化する。改変ポリペプチドの予想分子量に対応するタンパク質バンドの同定を、自動シーケンサー (Applied Biosystems Model 473A、カリフォルニア州フォスターシティ) を使用する部分アミノ酸配列解析により確認することができる。

30

【0129】

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

40

【0130】

前記形質転換細胞を長期、高収率タンパク質生産のために使用することが好ましく、それ故、安定した発現が望ましい。かかる細胞を、所望の発現カセットと共に選択マーカーを含有するベクターで形質転換したら、それらの細胞を強化培地中で1~2日間、放置して増殖させ、その後、その培地を選択培地に切り替える。選択に対する耐性を付与するように選択マーカーを設計し、その存在により、導入配列を首尾よく発現する細胞の増殖およ

50

び回収が可能になる。安定的に形質転換された細胞の耐性集塊を、その細胞に適した組織培養技術を用いて増殖させることができる。

【0131】

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

10

【0132】

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

20

30

【0133】

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

40

【0134】

50

本明細書に記載のものを含めて、当該技術分野において公知の若干の方法によって、ペプチドを精製し得る。一つの方法では、Waters Delta Prep 3000システムを使用してRP-HPLC(分取用および分析用)によりペプチドを精製する。C4、C8またはC18分取カラム(10 μ 、2.2X25cm; Vydac、カリフォルニア州ヘスペリア)を使用してペプチドを単離し得、C4、C8またはC18分析カラム(5 μ 、0.46X25cm; Vydac)を使用して純度を判定し得る。溶媒(A=0.1%TFA/水およびB=0.1%TFA/CH₃CN)を分析カラムに1.0mL/分の流量でおよび分取カラムに15mL/分の流量で供給することができる。アミノ酸分析をWaters Pico Tagシステムで行い、Maximaプログラムを使用して処理し得る。ペプチドを気相酸加水分解(115 $^{\circ}$ C、20~24時間)によって加水分解することができる。標準的な方法(Cohenら、The Pico Tag Method: A Manual of Advanced Techniques for Amino Acid Analysis, pp. 11-52, Millipore Corporation、ミルフォード、マサチューセッツ(1989))によって、加水分解物を誘導体化し、分析し得る。M-Scan, Incorporated(ペンシルバニア州ウエストチェスター)により、高速原子衝突分析を行うことができる。ヨウ化セシウムまたはヨウ化セシウム/グリセリンを使用して質量較正を行うことができる。飛行時間型検出を用いるプラズマ脱離イオン化解析をApplied Biosystems Bio-Ion 20質量分析計で行うことができる。

10

【0135】

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

20

30

40

【0136】

次の要領で改変ポリペプチドを発現および単離することができ、そして発現および単離

50

した。大腸菌発現ベクターへのクローニングのために、市販のソフトウェアを使用して、所望の改変ポリペプチドのタンパク質配列を設計し、DNA配列に逆翻訳した。核酸配列をオリゴヌクレオチドとして得、標準PCR増幅法を用いてライゲートするか、または標準的な制限酵素を使用して既存の発現構築物から消化し、その後、互いにライゲートした。対象となるタンパク質を発現する配列を、誘導発現用のT7プロモーターと共に、プラスミドpET45に配置した。構築物を配列決定によって検証した後、ベクターDNAを精製し、発現宿主、典型的にはBL21 (DE3) に形質転換した。単一コロニーを選択して、スターター培養物を4mL LB培地中で約6時間増殖させた。900uLストックに100uLの80%グリセリンを添加することによってグリセリンストックを調製し、-80Cで保存した。所望により、500uLの非誘導試料をゲル分析用に確保した。125mL トンプソンフラスコの中で60uLのスターター培養物を使用して60mLの培養物（例えば、MagicMedia（商標）大腸菌発現培地；Invitrogen, USA；Glennら、J. Biol. Chem. 2008、283(19)：12717-29参照）を接種し、30℃で一晩インキュベートした。250uLの試料を分析用に取り出した。細胞を遠心分離によりペレットとして回収し、後のプロセッシングのために冷凍した。細胞抽出物の調製およびニッケル樹脂での初回通過精製は、次のように行った。大腸菌細胞ペレットを、開始培養容積に等しい容積の溶解緩衝液（50mM TrisHCl、150mM NaCl、pH8.0）に完全に再懸濁させた。その後、細胞を100psiで3回、マイクロフルイダイザー（Microfluidics、マサチューセッツ州）に付した。細胞抽出物を30分間、16,000 x gで遠心分離して、破壊片を除去した。EGTA（150mMストック）をその細胞抽出物に添加して、3mM EGTAの最終濃度にした。その後、そのライゼートを、洗浄して予め平衡させたNi-NTA Superflowカラムに適用した。その後、そのカラムに結合したタンパク質を溶解緩衝液+EGTA（50mM TrisHCl、150mM NaCl、pH8.0、3mM EGTA）で洗浄した後、その結合タンパク質を50mLの溶出緩衝液（25mM TrisHCl、50mM NaCl、250mM イミダゾール、pH8.0）で溶出した。Hisタグの切断およびその後の精製は、次のとおりであった。溶出したタンパク質をAmicon-Ultra15遠心式フィルターユニット（Millipore、米国）で濃縮し、その後、目的タンパク質のN末端からHisタグを除去するプロテアーゼ消化の準備のために25mM TrisHCl、pH8.0、50mM NaClで希釈した。そのタンパク質溶液に0.1%のβ-メルカプトエタノールおよび1%のTurbo TEVプロテアーゼ（2mg/mL、10,000単位/mg；Excellgen、米国）を添加し、それを混合し、室温で4時間、次いで4℃で一晩インキュベートした。Ni-NTA Superflowカラム（Qiagen、米国）を、50mM TrisHCl、100mM NaCl、45mM イミダゾール、pH8.0で予め平衡させた。そのTEV消化反応物を50mM TrisHCl、150mM NaCl、pH8.0で2倍希釈した。希釈した消化反応物をNi-NTAカラムの頂部に注意深く適用し、通過画分を回収した。そのカラムに10mLの50mM trisHCl、100mM NaCl、45mM イミダゾール、pH8.0を添加して、非結合タンパク質をすべて溶出させた。カラムから溶出したタンパク質を回収し、合わせ、その後、サイズ排除クロマトグラフィー（Superdex 75 HiLoad 26/60カラム（GE Healthcare Biosciences、米国）で2回）を用いて洗練した。EndoTrap Red（Lonza、スイス国）をその製造業者の指示書に従って使用して、残存細菌エンドトキシンをすべて除去した。

【0137】

封入体調製。封入体画分中に見い出される改変ポリペプチドについては、以下の手順が有益であり得る。50mL培養物それぞれについて最少100mLの溶解緩衝液に細胞ペレットを再懸濁させ得る。30mLを添加するときには10mLピペットを使用して再懸濁させ得、その後、そのチューブを追加の70mLで洗浄することができる。全プロセスを通して氷水中でチャンバーを維持するように注意ながら、100PSI（分）でマイクロフルイダイザーにその再懸濁細胞溶液を何度も通す、例えば、4回通過させることができる。その流動化スラリーを14000xgで20分、遠心分離（例、250mL ナルゲンボトルを使用して、JLA 10.5、10,000 rpm）することができる。その封入体ペレットをピペット先端での粉碎後、攪拌棒および攪拌プレートを用いて氷上で1時間、4℃で冷却溶解緩衝液に再懸濁させることができる。そのペレットを、再度、ピペット先端で粉碎後、4℃で1時間攪拌棒および攪拌プレートを用いて蒸留H₂Oに再懸濁させ、その後、14000xgで15分、遠心分離することができる。上清を除去して廃棄することができる。得られたものを-80Cで保存することができる。

【0138】

タンパク質精製。本明細書に記載するように、発現されたポリペプチドを単離するための非常に多数の方法が公知である。分泌された改変ポリペプチドが好ましい。しかし、以下は、封入体を形成する場合の一例である。封入体ペレットを、適切な容量の可溶化緩衝液（8M尿素または8Mグアニジン、50mM Tris、10mM DTT、pH7.75）に1時間、室温で可溶化することができる。可溶化されたペレットを20分間、27000gで遠心分離することができる。濾過した（例えば、0.4μm）上清を室温で適切な容量のリフォールディング緩衝液（50mM Tris-HCl、1M尿素、0.8Mアルギニン、4mMシステイン、1mMシスタミン；pH8）に1滴ずつ移入することができる。その後、その得られたものを4℃で一晩以上、穏やかに混合しながら放置させ得る。試料を濃縮し、GE Healthsciences AKTA FPLCを使用して4℃環境で、1~2mL/分でゲル濾過カラム（Superdex75 26/60）にかけることができる。適切なタンパク質含有画分をSDS-PAGEによって同定し、プールし、第二のゲル濾過カラムに通すことができる。その後、プールしたタンパク質をAmiconフィルターで適切な濃度に濃縮し、当該技術分野において公知であるように、例えばEndosafe PTS Reader（Charles River）を使用して、エンドトキシンレベルについてアッセイすることができる。タンパク質試料がエンドトキシン基準に合格したら、それを滅菌濾過し、アリコートに分配し、品質管理アッセイにかけることができる。品質管理アッセイは、適切な質量を得るために、分析HPLC-SEC、非還元的SDS PAGEおよびRP HPLC-MSを含み得る。1x PBS（137mM塩化ナトリウム、2.7mM塩化カリウム、4.3mMリン酸二ナトリウム、1.4mMリン酸一カリウム、pH7.2）中のタンパク質を得、アリコートに分配し、-70から-80℃で保管のために急速冷凍することができる。

10

20

IV. 使用方法および疾患処置方法

【0139】

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

【0140】

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

30

【0141】

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

40

【0142】

肥満の病因は、多因子性であると考えられる。問題は、肥満対象の場合、脂肪組織過剰になるまで栄養素利用能とエネルギー消費のバランスが取れないことである。中枢神経系（CNS）は、エネルギーバランスを制御し、様々な行動的、自律神経系および内分泌系の活動を動物の代謝状態に適するように調整する。これらの活動を制御するメカニズムまたは系は、前脳（例えば、視床下部）、後脳（例えば、脳幹）および脊髄にわたって広く分布している。最終的に、これらの系からの代謝情報（すなわち、燃料利用率）および認知情報（すなわち、学習性嗜好）を統合し、欲求（食物探求）および完了行動（摂食）に携わる決定をオンにする（食事調達および開始）か、オフにする（食事停止）。視床下部は、これらのシグナルの統合および次いで脳幹への命令の発信を主として担当すると考えら

50

れる。脳幹核は、完了運動制御系の要素（例えば、咀嚼および嚥下に関与する筋肉）を制御する。それ故、これらのCNS核は、事実上、摂食行動についての「最終共通経路」を構成していると言われている。

【0143】

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

10

【0144】

肥満は、依然として、不完全にしか処置できない慢性の本質的に難治性の代謝障害である。したがって、対象の体重低下および／または体重維持に有用な新規な治療薬が必要とされている。かかる治療薬は、対象の健康に対して著しく有益な効果をもたらすことになる。

【0145】

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

20

【0146】

糖尿病／急性心筋梗塞患者の高リスクの性質を理解して、不安定狭心症または非ST上昇型心筋梗塞（総称して「ACS」と呼ばれる）を有する入院患者の管理についての米国心臓病学会（American College of Cardiology）／米国心臓協会（American Heart Association）（「ACC／AHA」）臨床診療ガイドラインは、最近、入院糖尿病患者は、高血糖の積極的管理を必要とする特別な集団であることを認めた。具体的には、前記ガイドラインは、入院糖尿病／ACS患者に対する血糖降下療法は、10mg/dL未満の食前の血糖値、180mg/dL 1日の最大目標値、および7%未満の退院後のヘモグロビンA1cを達成することを目標にするべきであると述べている。

30

【0147】

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

40

50

【0148】

脂質調節疾患 (lipid regulation disease)。脂質異常症は、血液中の正常脂質成分の乱れである。長期インスリンレベル上昇は、脂質異常症につながり得ると考えられる。高脂血症は、血液中の上昇したまたは異常な脂質および／またはリポタンパク質レベルの存在である。脂肪性肝疾患、例えば非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) は、単純脂肪肝 (脂肪症) から、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) に、そして肝硬変 (肝臓の不可逆的、進行性瘢痕化) に及ぶ広い範囲の肝臓疾患を指す。NAFLDのすべての病期は、共通して肝臓細胞 (肝細胞) 内の脂肪蓄積 (脂肪浸潤) を有する。

【0149】

加えて、いずれの理論にも拘束されることを望まないが、2型糖尿病における相対的インスリン不足、糖毒性、および門脈経由での腹部内脂肪からの高送達による肝臓遊離脂肪酸負荷量増加は、脂肪肝障害の潜在的原因として関連づけられる。実際、摂食行動は、NASHを含めて、その多くの帰結を伴う肥満体のメタボリックシンドロームを駆動する重要な要因であると仮定されている。したがって、2型糖尿病で既に実証されているように、食物摂取量減少および少量頻食を目的とした処置により、NASHを有効に処置および予防することができる。インスリン分泌および体重減少を促進する薬物ならびに胃内容排出を遅らせる薬物も耐糖能向上に有効であり、したがって、脂肪肝とその随伴高インスリン血症を改善することができる。したがって、エキセンディン、エキセンディン類似体アゴニスト、エキセンディン誘導体アゴニスト、特にエキセンディン-4の使用は、この状態の治療法 (treatment modality) として十分好適であり得る。したがって、エキセンディンまたは生物活性 (ホルモンドメイン) ペプチド成分またはそれらの断片もしくは類似体を含む、本明細書に記載する改変ポリペプチドは、脂肪肝障害の処置に有用であり得る。

【0150】

アルツハイマー病。アルツハイマー病 (AD) は、当該技術分野において公知であるように、A β タンパク質の調節不全を含む脳内の斑および濃縮体に関連づけられている。ニューロンGLP-1受容体の刺激は、ニューロン可塑性および細胞生存の調節に重要な役割を果たすことが報告されている。GLP-1は、培養ニューロン細胞において神経突起成長を誘導し、興奮毒性細胞死および酸化的損傷から保護することが報告されている。GLP-1およびエキセンディン-4は、マウス脳内の内因性アミロイド β ペプチド (A β タンパク質) レベルを低下させることおよびニューロン中の β アミロイド前駆タンパク質 (β -APP) レベルを低下させることが報告された。例えば、Perryら、2004、Curr. Drug Targets 5(6) : 565-571参照。本明細書に開示する改変化合物での処置は、アルツハイマー病に関連した治療標的に恩恵をもたらすことができる。

【0151】

パーキンソン病。パーキンソン病 (PD) は、「原発性パーキンソニズム」、すなわち、全身性の二次的原因が一切ない神経変性プロセスに起因する独立したパーキンソニズムの同義語である。パーキンソニズムは、ドーパミン欠損によって引き起こされる、震え、硬直および動作の緩慢化といった症状を特徴とする。いずれの理論にも拘束されることを望まないが、エキセンディン-4は、ミクログリア不活化因子として機能することによりドーパミン作動性ニューロンの生存因子として作用することができると考えられ、これは、エキセンディン-4が、PDなどの神経変性疾患のための価値ある治療薬であり得ることを示唆している。

【0152】

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

【0153】

ステロイド誘導型糖尿病。糖質コルチコイドが炭水化物代謝に影響を及ぼすことは周知

10

20

30

40

50

である。外因性糖質コルチコイド投与にตอบสนองして、肝臓グルコース生産増加、ならびに末梢組織におけるインスリン分泌およびインスリン刺激グルコース取り込み低下が観察される。さらに、糖質コルチコイド処置は、当該技術分野において公知であるように、プロインスリン (P1) /免疫反応性インスリン (IRI) 比を変更する。糖尿病を有さない対象において糖質コルチコイドによって誘導される高血糖症の典型的な特徴としては、極めて小さい空腹時血糖上昇、過度の食後高血糖、外因性インスリンに対する非感受性、およびメトホルミンまたはスルホニル尿素療法に対する非応答性が挙げられる。したがって、エキセンディン生物活性 (ホルモンドメイン) ペプチド成分またはその断片もしくは類似体を含む、本明細書に記載する改変ポリペプチドは、ステロイド誘導型糖尿病の処置に有用であり得る。

10

【0154】

ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 処置誘導型糖尿病。ヒト免疫不全ウイルス (HIV) -1 プロテアーゼ阻害剤 (PI) の日常的臨床使用への導入後間もなく、PI使用と高血糖症の発症を関連づける報告が現れ始めた。PIでの処置を受けるHIV感染対象のおおよそ1%から6%が真性糖尿病を発症することとなる一方で、それよりかなり大きい割合の対象が、インスリン耐性および耐糖能障害を発症することとなる。したがって、エキセンディン生物活性 (ホルモンドメイン) ペプチド成分またはその断片もしくは類似体を含む、本明細書に記載する改変ポリペプチドは、HIV処置誘導型糖尿病の処置に有用であり得る。

【0155】

成人潜在性自己免疫性糖尿病 (LADA)。成人潜在性自己免疫性糖尿病 (LADA) としても公知の進行性自己免疫性糖尿病は、2型糖尿病と診断された患者のおおよそ10%に存在すると考えられる。LADA患者は、膵島細胞の細胞質抗原または、より多くの場合、グルタミン酸デカルボキシラーゼのいずれかに対する循環抗体を有する。これらの対象は、1型糖尿病と2型糖尿病の両方に特有の臨床像を呈する。インスリン分泌は、自己免疫性糖尿病の急速進行性形態の場合より緩徐進行性形態の場合のほうが良好に保たれるが、LADA対象におけるインスリン分泌は、時間とともに低下する傾向がある。したがって、エキセンディン生物活性 (ホルモンドメイン) ペプチド成分またはその断片もしくは類似体を含む、本明細書に記載する改変ポリペプチドは、LADAの処置に有用であり得る。

20

【0156】

無自覚性低血糖 (HU)。グルコース対抗制御不全 (defective glucose counterregulation) は、わずか1回の最近の低血糖エピソードの後でさえ発生することがある。低血糖エピソードを繰り返し経験する対象は、低血糖またはインペンディングインスリンショック (impending insulin shock) に典型的に随伴する症状を認識する能力を喪失することが多く、この状態を「無自覚性低血糖」と呼ぶ。患者が彼または彼女自身の状態を正しく認識しないために、昏睡および発作をはじめとする深刻な神経学的問題が結果として起こるほどの低さに血糖値が降下することがある。したがって、エキセンディン生物活性 (ホルモンドメイン) ペプチド成分またはその断片もしくは類似体を含む、本明細書に記載する改変ポリペプチドは、HUの処置に有用であり得る。

30

【0157】

拘束性肺疾患。GLP 1受容体は、肺内局在が確認されている。エキセンディンは、GLP-1受容体によって生物学的応答を惹起することができる。特に、サルコイドーシスは、肺を冒すことが多い全身性肉芽腫性疾患である。古典的には拘束性肺疾患として考えられていたが、気道閉塞がここ数年の間にこの疾患の一つの認知された特徴となった。サルコイドーシスは、いかなるレベルでにせよ気道を冒し得、またその罹患部位が小気道を含むときには、より一般的な閉塞性気道疾患、例えば喘息および慢性気管支炎に似ていることがある。したがって、エキセンディン生物活性 (ホルモンドメイン) ペプチド成分またはその断片もしくは類似体を含む、本明細書に記載する改変ポリペプチドは、かかるホルモンドメインペプチドが肺の弾力性を向上させるかまたは固縮を遅らせることができるので、拘束性肺疾患の処置に有用であり得る。

40

【0158】

50

短腸症候群（SBS）。エキセンディン-4は、短腸症候群の処置に有効と報告されている。Kunkelら、Neurogastroenterol. Motil. (2011) 参照。SBSは、下痢および栄養失調を特徴とする重篤な臨床的障害である。回腸のL細胞によって生産されるグルカゴン様ペプチド-1（GLP-1）は、近位腸管通過を調節する。広範囲の回腸切除が行われると、SBSの場合と同様にGLP-1レベルが不十分になることがある。エクセナチドは、SBS患者の栄養状態および腸の症状を改善させた。したがって、SBS患者は、本明細書に記載する改変ポリペプチドでの処置によって治療可能である。もはや食事に関係のない、排便回数および便形状および得られる便通の改善を達成することができる。さらなる恩恵は、全非経口栄養を停止させ得ることである。本明細書におけるこれらの化合物は、SBS患者の排便習慣、栄養状態および生活の質の実質的向上をもたらすこととなり、さらに、非経口栄養および小腸移植の必要性を低減させ得る。

10

【0159】

したがって、一つの態様において、対象の疾患または障害を処置するための方法を提供する。前記対象は、前記疾患または障害の処置を必要としている。一部の実施形態において、前記対象は、肥満の処置を必要としている。前記疾患または障害は、糖尿病、過体重、肥満、アルツハイマー病、脂肪性肝疾患、脂質異常症、冠動脈疾患、卒中、SBSもしくは高脂血症、または本明細書中で検討した他の疾患である。糖尿病は、I型糖尿病、II型糖尿病、妊娠糖尿病または糖尿病前症、ならびにHIVまたはステロイド誘導型糖尿病も含み得る。前記処置方法は、前記疾患または障害の処置に有効な量での本明細書に記載の改変ポリペプチドの前記対象への投与を含む。これらの疾患に特に有用なのは、血糖降下活性を有する本明細書に記載する化合物（例えば、ABDに連結されたエキセンディン-4またはその断片もしくは類似体）であり、体重を低下もしくは食物摂取活動を低減させ、HbA1cを低下させ、胃内容排出を遅延させ、血漿グルカゴンを低下させ、および／または腸運動性の利点を有する。

20

【0160】

一部の実施形態において、前記疾患または障害は、糖尿病、過体重もしくは肥満、または脂質異常症もしくは高脂血症である。前記改変ポリペプチドは、ABDおよびHD1ポリペプチドならびに所望によりリンカーK1を含み得、この場合のHD1は、エキセンディンまたはその断片もしくは類似体である。したがって、前記改変ポリペプチドは、次の構造のうちの1つを有し得る：HD1-ABDまたはHD1-L1-ABD。

30

【0161】

一部の実施形態において、前記疾患または障害は、糖尿病、過体重、肥満、脂質異常症、アルツハイマー病、脂肪性肝疾患、SBSまたは高脂血症である。前記改変ポリペプチドは、エキセンディンまたはその断片もしくは類似体を含み得る。したがって、前記改変ポリペプチドは、次の構造のうちの1つを有し得る：HD1-ABDまたはHD1-L1-ABD。一部の実施形態において、前記改変ポリペプチド中のエキセンディンは、エキセンディン-4である。一部の実施形態において、前記エキセンディン断片は、エキセンディン-4の断片である。一部の実施形態において、前記エキセンディン類似体は、エキセンディン-4と少なくとも70%、例えば、70%、75%、80%、85%、90%、95%のまたはさらにそれ以上の同一性を有する。これらの疾患に特に有用なのは、血糖降下活性を有する本明細書に記載する化合物（例えば、ABDに連結されたエキセンディン-4またはその断片もしくは類似体）であり、体重を低下もしくは食物摂取活動を低減させ、HbA1cを低下させ、胃内容排出を遅延させ、血漿グルカゴンを低下させ、または腸運動性の利点を有する。

40

【0162】

一部の実施形態において、前記疾患または障害は、糖尿病、過体重、肥満、脂質異常症、アルツハイマー病、脂肪性肝疾患、SBSまたは高脂血症である。前記改変ポリペプチドは、エキセンディンまたはその断片もしくは類似体を含み得る。したがって、前記改変ポリペプチドは、次の構造のうちの1つを有し得る：HD1-ABDまたはHD1-L1-ABD。一部の実施形態において、前記エキセンディンは、エキセンディン-4である。一部の実施形態において、前記エキセンディン断片は、エキセンディン-4の断片である。一部の実施形態に

50

において、前記エキセンディン類似体は、エキセンディン-4と少なくとも70%、例えば、70%、75%、80%、85%、90%、95%のまたはさらにそれ以上の同一性を有する。これらの疾患に特に有用なのは、血糖降下活性を有する本明細書に記載する化合物（例えば、ABDに連結されたエキセンディン-4またはその断片もしくは類似体）であり、体重を低下もしくは食物摂取活動を低減させ、胃内容排出を遅延させ、血漿グルカゴンを下させ、または腸運動性の利点を有する。前記改変ポリペプチドは、ホルモンドメインとして、エキセンディンまたはその類似体もしくは断片しか含まない場合もある。

【0163】

前記疾患または障害は、糖尿病、過体重、肥満、脂質異常症、アルツハイマー病、脂肪性肝疾患、SBS、高脂血症、パーキンソン病もしくは心血管疾患または本明細書に記載する他の疾患であり得る。前記改変ポリペプチドは、エキセンディンまたはその断片もしくは類似体を含み得る。したがって、前記改変ポリペプチドは、次の構造のうちの1つを有し得る：HD1 ABDまたはHD1 L1 ABD。一部の実施形態において、前記エキセンディンは、エキセンディン-4である。一部の実施形態において、前記エキセンディン断片は、エキセンディン-4の断片である。一部の実施形態において、前記エキセンディン類似体は、エキセンディン-4と少なくとも70%、例えば、70%、75%、80%、85%、90%、95%のまたはさらにそれ以上の同一性を有する。これらの疾患に特に有用なのは、血糖降下活性を有する本明細書に記載する化合物（例えば、ABDに連結されたエキセンディン-4またはその断片もしくは類似体）であり、体重を低下もしくは食物摂取活動を低減させ、HbA1cを下させ、胃内容排出を遅延させ、血漿グルカゴンを下させ、または腸運動性の利点を有する。

【0164】

本明細書に記載する化合物および方法によって処置することができるさらなる疾患および障害としては、ステロイド誘導型糖尿病、HIV処置誘導型糖尿病、成人潜在性自己免疫性糖尿病（LADA）、非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）および非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）、無自覚性低血糖（HU）、拘束性肺疾患（サルコイドーシスを含む）、ならびにメタボリックシンドロームXが挙げられる。前記改変ポリペプチドは、エキセンディンまたはその断片もしくは類似体を含み得る。したがって、前記改変ポリペプチドは、次の構造のうちの1つを有し得る：HD1-ABDまたはHD1-L1-ABD。一部の実施形態において、前記エキセンディンは、エキセンディン-4である。一部の実施形態において、前記エキセンディン断片は、エキセンディン-4の断片である。一部の実施形態において、前記エキセンディン類似体は、エキセンディン-4と少なくとも70%、例えば、70%、75%、80%、85%、90%、95%のまたはさらにそれ以上の同一性を有する。これらの疾患に特に有用なのは、血糖降下活性を有する本明細書に記載する化合物（例えば、ABDに連結されたエキセンディン-4またはその断片もしくは類似体）であり、体重を低下もしくは食物摂取活動を低減させ、胃内容排出を遅延させ、HbA1cを下させ、血漿グルカゴンを下させ、または腸運動性の利点を有する。前記改変ポリペプチドは、ホルモンドメインとして、エキセンディンまたはその類似体もしくは断片のみを含む場合がある。前記疾患または障害は、糖尿病、過体重、肥満、脂質異常症、アルツハイマー病、脂肪性肝疾患、高脂血症、パーキンソン病もしくは心血管疾患または本明細書に記載する他の疾患であり得る。

【0165】

本明細書に記載する化合物および方法によって処置することができるさらなる疾患および障害としては、ステロイド誘導型糖尿病、HIV処置誘導型糖尿病、成人潜在性自己免疫性糖尿病（LADA）、非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）および非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）、無自覚性低血糖（HU）、拘束性肺疾患（サルコイドーシスを含む）、ならびにメタボリックシンドロームXが挙げられる。血糖降下活性を有する本明細書に記載する化合物（例えば、ABDに連結されたエキセンディン-4またはその断片もしくは類似体）は、これらの疾患に特に有用である。

【0166】

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

【0167】

GLP-1受容体結合および機能アッセイ：GLP-1受容体結合活性および親和性を測定し得る公知の方法はいくらでもある。例えば、一つの方法では、受容体源がRINm5F細胞膜であり、リガンドが [125 I] GLP-1またはヨウ素標識エキセンディン (1-39) またはヨウ素標識エキセンディン (9-39) である結合置換アッセイを用いて、結合活性を測定する。10
ホモジネートしたRINm5F細胞膜を、20mM HEPES緩衝液中で、40,000cpm [125 I] GLP-1 (またはエキセンディン) トレーサーおよび様々な濃度の被験化合物と共に2時間、23°Cで、定常的に混合しながらインキュベートする。反応混合物を、0.3%PEI溶液に予め浸漬しておいたガラスフィルターパッドで濾過し、氷冷リン酸緩衝食塩水ですすぐ。シンチレーションカウンターを使用して結合カウントを判定する。GraphPad Prism (登録商標) (GraphPad Software, Inc.、カリフォルニア州サンディエゴ) を用いて、結合親和性を計算する。

【0168】

機能性GLP-1受容体活性化についてのin vitroアッセイは、公知の方法および細胞および組織を使用して行うことができる。例えば、GLP-1受容体担持細胞のエキセンディン-4刺激は、アデニル酸シクラーゼ活性化の増加、cAMP合成、膜脱分極、細胞内カルシウムの増加、およびグルコース誘導インスリン分泌の増加を誘導し得る。例えば、Holzら、1995、J. Biol. Chem. 270 (30) : 17749-57参照。rMTC 6-23 (クローン6) 細胞システムを使用する細胞ベースのアッセイを用いて、生成されたcAMPに基づいて化合物のGLP-1受容体アゴニスト活性を判定することができる。前記バイオアッセイの一つの実施形態では、6-23 (クローン6) 細胞での細胞ベースのアッセイにおけるcAMP生産との相関により、化合物のGLP-1受容体アゴニスト活性を定量的に判定する。前記細胞ベースのアッセイは、6-23 (クローン6) 生細胞を使用する。前記6-23 (クローン6) 細胞は、アメリカ合衆国培養細胞系統保存機関 (American Type Culture Collection) からATCC (登録商標) 番号CRL-1607 (商標) として、および欧州細胞カルチャーコレクション (European Collection of Cell Cultures) からECACC番号87042206として入手できる。別の実施形態において、前記細胞ベースのアッセイは、均一時間分解蛍光アッセイ (HTRF (登録商標)) である。HTRF (登録商標) キットは、Cisbio International (マサチューセッツ州ベッドフォード) から市販されている。HTRF (登録商標) キットの使用方法は当該技術分野において公知であり、該キットは、一般に、例えば、試料、標準物質、校正曲線の準備の仕方および実験の行い方に関する取扱説明書を含む。均一時間分解蛍光細胞ベースアッセイは、米国特許第5,527,684号明細書 (この開示は出典明示により本明細書に援用されている)、および Cisbio HTRF (登録商標) Product Centerから入手できる資料参照番号 (Document Reference No.) 62AM4PEB rev02 (2007年8月) に記載されている。www.htrf.com/products/gper/camp/参照 (この開示は出典明示により本明細書に援用されている)。好ましい方法では、前記バイオアッセイは、Cisbioからカタログ番号62AM4PEBとして入手できるHTRF (登録商標) cAMPダイナミック2 1,000アッセイキットを使用する細胞ベースのアッセイにおいてラット甲状腺癌6-23 (クローン6) 細胞を使用する。前記HTRF (登録商標) 標準物質および校正を、前記キットの中の説明書に従って準備する。アルブミンの存在を伴って、または伴わずに、アッセイを行うことができる。20
30
40

【0169】

活性および作用持続時間および薬物動態についてのin vivoアッセイは、公知の方法を用いて行うことができる。例えば、持続時間は、経口グルコース負荷試験 (OGTT) を用いて行うことができ、この場合、薬物は、グルコースが経口投与される前の所望の時点で対象に薬物され (薬物作用持続時間を測定するため; OGTT DOA)、そしてグルコース血中レ 50

ベルが測定される（例えば、マウスで容易に行われる）。静脈内グルコース負荷試験（IV GTT）を用いて活性および持続時間を測定することもでき、この場合、薬物は、グルコースがIV投与される前の所望の時点で投与され（IVGTT DOA）、そして血糖値が測定される（例えば、ラットで容易に行うことができる）。好ましい改変化合物には、薬物の単回投与後少なくとも24時間の持続時間、好ましくは、薬物の単回投与を施した後少なくとも3日、少なくとも4日、少なくとも5日、少なくとも6日および少なくとも1週間という、血糖に対する望ましい効果がある。

【0170】

例えば、NIH/Swiss雌マウスへのベースライン試料採取（baseline sample）の直後、 $t=0$ の時点で、被験ポリペプチドを皮下注射する。血液試料を第1日の間の所望の期間、例えば、 $t=2$ 、4および8時間の時点で採取し、その後、第5日まで、または第7日まで、またはそれより長く、毎日採取する。血糖は、OneTouch（登録商標）Ultra（登録商標）（Johnson & Johnson Companyの傘下のLifeScan, Inc.、カリフォルニア州ミルピータス）で測定される。薬物の血糖制御活性などの活性の持続時間（DOA）判定のために、薬物投与後の所望の時点でOGTTまたはIVGTTを行うことができる。また、体重および食物摂取量または他の薬理学的もしくは薬物動態パラメータを測定することもできる。例えば、06:00に点灯する12時間:12時間の明暗周期で雌NIH/Swissマウス（8–20週齢）を群居飼育する。注記のある場合を除き、水および標準ペレット状マウス固形飼料を自由に入手可能とした。実験の朝、マウスを実験群に分け、おおよそ06:30時に開始して絶食させる。典型的な試験では、3マウス/ケージで、 $n=2$ ケージ。0分時点で、血糖試料を採取し、その後直ちにビヒクルまたは化合物を約1nmol/kgから25nmol/kgの範囲の量で腹腔内注射する。この単回投与後、30、60、120、180および240分の時点で、そして1週間以上にわたって毎日、血糖が測定され得る。この実験の変型では、14または28日などのより長い期間にわたって毎日または毎週、投与を施す。測定時点、例えば60分または1日での血糖を0分時点での血糖で割ることによって、処置前%を計算する。有意な処置効果をANOVA ($p<0.05$) によって特定した。有意差が存在する場合、ダンネット検定（Prism（登録商標）v. 4.01, GraphPad Software Inc.、カリフォルニア州サンディエゴ）を用いて試験平均を対照平均と比較する。血糖は、OneTouch（登録商標）Ultra（登録商標）（Johnson & Johnson Companyの傘下のLifeScan, Inc.、カリフォルニア州ミルピータス）で測定することができる。* ビヒクル対照に対して $p<0.05$; ANOVA、ダンネット検定。他のパラメータも測定することができる。

【0171】

食物摂取抑制についてのin vivoアッセイ：前記改変ポリペプチドは、様々な公知方法で食欲抑制の持続時間および程度について、ならびに体重減少に対する効果の持続時間および程度について試験され得る。例えば、前記ポリペプチドは、マウス食物摂取量アッセイで食欲抑制について、および食餌誘導肥満（DIO）マウスにおける体重増加に対するそれらの効果について試験され得る。かかるアッセイについての実験プロトコルを下で説明する。

【0172】

例えば、06:00に点灯する12時間:12時間の明暗周期で雌NIH/Swissマウス（8–24週齢）を群居飼育する。注記のある場合を除き、水および標準ペレット状マウス固形飼料を自由に入手可能とする。実験1日前、おおよそ15:00時に開始してマウスを絶食させる。実験の朝、マウスを実験群に分ける。典型的な試験では、3マウス/ケージで、 $n=4$ ケージ。0分時点で、すべてのマウスに、典型的には約2nmol/kgから75nmol/kgの範囲の量のビヒクルまたは被験化合物の腹腔内注射を施し、予め計量しておいた量（10–15 g）の標準固形飼料を直ちに与える。様々な時点、典型的には、30、60および120分の時点で、またはそれより長くおいた時点で、例えば毎日、餌を取り出し、計量して、消費された餌の量を判定する（Morley, Floodら、1994, Am. J. Physiol. 267: R178-R184）。0時点で最初に供給した餌の重量から、例えば30または60分時点で残っている餌の重量を引くことによって、食物摂取量を計算する。有意な処置効果をANOVA ($p<0.05$) によって特定する。有

意差が存在する場合、ダンネット検定 (Prism (登録商標) v. 2.01、GraphPad Software Inc.、カリフォルニア州サンディエゴ) を用いて試験平均を対照平均と比較する。体重も測定することができる。

【0173】

体重、脂肪再分布、および除脂肪体重アッセイ：体重および関連効果についてのアッセイも次のように行うことができる。Sprague-Dawleyラットの食餌誘導肥満 (DIO) は、肥満およびエネルギー恒常性の調節の試験のための貴重なモデルである。これらのラットは、脂肪およびエネルギーが比較的高い食餌で肥満になりやすい系統の (Cr1:CD (登録商標) (SD) BR) ラットから開発された。例えば、Levin、1994、Am. J. Physiol. 267:R527-R535、Levinら、1997、Am. J. Physiol. 273:R725-R730参照。DIO雄ラットは、Charles River Laboratories, Inc. (マサチューセッツ州ウィルミントン) から得られる。それらのラットを22℃の靴箱ケージの中で12/12時間の明暗周期で個々に飼育する。中等度高脂肪食餌 (脂肪から32%kcal; Research Diets D1226B) を用いて自由採食でラットを飼育する。これらのラットは、典型的には、約500gの平均体重に達する。Levin DIOラットを7日間、ケージ飼育環境に馴化させる。3夜の馴化の間に、ラットにビヒクルの単回腹腔内 (IP) 注射を施す。試験当日、暗周期の開始時に化合物またはビヒクル (例えば、10% DMSO) の単回IP注射をラットに施す。自動食餌摂取量測定システム (BioDAQ, Research Diets) により、この試験コース全体を通して5秒間隔で食物摂取量を測定する。体重を毎夜記録する。

【0174】

NMR (Echo Medical Systems、テキサス州ヒューストン) を使用して、薬物治療前および後に体組成を測定することができる。体組成測定のために、ラットを、換気のよいプレキシングラス管に短時間 (約1分) 入れ、その後、それを専用の齧歯動物NMR機に挿入した。これにより、脂肪および乾燥除脂肪組織の正確なグラム数の変化 (例えば、処置後の体脂肪のグラム数-ベースラインでの体脂肪のグラム数=体脂肪のグラム数の変化) の計算ならびに脂肪および乾燥除脂肪組織についての体組成%の変化 (例えば、処置後の体脂肪%-ベースラインでの体脂肪%=体脂肪%の変化) の計算を行うことができた。すべてのデータを平均±SEMとして表す。分散分析 (ANOVA) およびpost-hoc検定を用いて、群間差について検定する。P値<0.05を有意とみなす。統計解析およびグラフ作成は、Windows用PRISM (登録商標) 4 (GraphPad Software, Inc.、カリフォルニア州サンディエゴ) を使用して行う。グラフおよび結果を、典型的には、体重、体脂肪%のビヒクル補正変化、および体タンパク質の変化として示す。

VI. 医薬組成物

【0175】

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

【0176】

さらなる態様において、本明細書に記載の改変ポリペプチド化合物を医薬的に許容され得る賦形剤と併せて含む医薬組成物を提供する。一実施形態において、前記医薬組成物は、本明細書に記載するような経口医薬組成物である。一部の実施形態において、前記医薬組成物は、長期持続性医薬組成物である。医薬組成物の投与についての文脈での用語「長

期持続性」は、作用持続時間を指す。したがって、長期持続性医薬組成物を、例えば、1時間、2時間、4時間、8時間、12時間、1日、2日、3日、4日、5日、6日、1週間、2週間、3週間、1ヶ月またはさらにそれ以上の間隔で投与し得る。一実施形態において、投与は、1日に2回（すなわち、「1日2回」）である。好ましい実施形態において、投与は、1日に1回（すなわち、「1日1回」）である。さらに好ましい実施形態において、投与は、1週間に1回（すなわち、「週1回」）である。一部の実施形態において、前記改変ポリペプチドは、本明細書中の表2、3Aおよび3Bに示す改変ポリペプチドから選択される。一部の実施形態において、前記改変ポリペプチドは、本明細書中の表2および3Aに示す改変ポリペプチドから選択される。一部の実施形態において、前記改変ポリペプチドは、本明細書中の表2に示す改変ポリペプチドから選択される。

10

A. 製剤

【0177】

本明細書に記載する改変ポリペプチドは、対象に単独で投与され得、または共投与され得る。共投与は、個々にまたは併用（1つより多くの化合物）での化合物の同時または逐次的投与を含むものとする。例えば、レプチン（例えば、メトレレプチン）およびアミリン（例えば、プラムリンチド）を含む併用療法で肥満を有益に処置できることが判明した。例えば、米国特許出願公開第2008/0207512号明細書参照。したがって、例えば肥満および過体重の処置に有用なABDとエキセンディン化合物とを含む本明細書に記載する改変ポリペプチドを、単独で投与してかかる処置を果たすことができ、またはレプチンもしくはレプチンアゴニスト、例えばメトレレプチン、および／またはアミリンもしくはアミリンアゴニスト、例えばプラムリンチドのいずれかと共投与することができる。

20

【0178】

一部の実施形態において、エキセンディン、エキセンディン類似体またはエキセンディンアゴニスト改変ポリペプチドを、1つ以上の抗糖尿病薬、例えば抗高血糖薬、例えば、インスリン（正規、短期作用型、長時間作用型および基底インスリンを含む）、アミリン、プラムリンチド、メトホルミンおよびチアゾリジンジオン（ロシグリタゾンおよびピオグリタゾンを含む）と共投与する、本明細書に記載する製剤および方法を、さらに提供する。

【0179】

一部の実施形態では、前記エキセンディン、エキセンディン類似体またはエキセンディン類似体アゴニスト改変ポリペプチドを1つ以上のコレステロールおよび／またはトリグリセリド降下薬と共投与する、本明細書に記載する製剤および方法を、さらに提供する。例示的薬剤としては、HMG CoAレダクターゼ阻害剤（例えば、アトルバスタチン、フルバスタチン、ロバスタチン、プラバスタチン、ロスバスタチン、シンバスタチン）；胆汁酸封鎖剤（bile acid sequestrants）（例えば、コレセベラム、コレステラミン、コレステポール）；フィブラート（例えば、フェノフィブラート、クロフィブラート、ゲムフィブロジル）；エゼチミブ、ニコチン酸、プロブコール、ロバスタチン／ナイアシン合剤；アトルバスタチン／アムロジピン合剤およびシンバスタチン／エゼチミブ合剤が挙げられる。

30

【0180】

前記エキセンディン化合物は治療活性化合物であり、ABDと融合させると驚くべきことに活性を保持するので、本開示は、医薬品として使用するための、すなわち治療に使用するための組成物を提供する。液体形態または乾燥形態いずれかの改変ポリペプチドと、所望による少なくとも一つの医薬的に許容され得る担体および／または賦形剤とを含む組成物が特に考えられ、それらをここで例示する。

40

【0181】

前記組成物は、in vivoまたはin vitroでアルブミンと会合する能力を有する。一定の場合、前記組成物と生存生物外のアルブミンとの複合体を形成すること、すなわち、外因性アルブミンを前記組成物に加えることが有益であり得る。かかる組成物を凍結乾燥させて、周囲温度での保存に好適である製剤を提供することができる。したがって、本開示は、上で定義したとおりの組成物であって、ヒト血清アルブミンなどのアルブミンをさらに

50

含み、場合により乾燥形態であり得る組成物も提供する。

【0182】

共投与は、前記エキセンディン、エキセンディンアゴニストもしくはエキセンディン類似体アゴニスト改変ポリペプチドと第二の薬剤を別々に投与することによって果たされることもあり、または前記エキセンディン、エキセンディンアゴニストもしくはエキセンディン類似体アゴニスト改変ポリペプチドと第二の薬剤とを含む単一の医薬製剤を投与することによって果たされることもある。前記第二の薬剤に適切な用法は、当該技術分野において一般に公知である。

【0183】

前記調製物を、所望される場合には、当該技術分野において公知であるような他の活性物質（例えば、代謝分解を低減させるために）または他の治療活性薬剤と共投与することもできる。本明細書に記載するエキセンディン改変ポリペプチドを、他の活性抗糖尿病または抗肥満薬、例えばレプチンまたはレプチンアゴニスト、およびアミリンまたはアミリンアゴニスト化合物、例えばアミリン（ダバリンチドおよびそれらの類似体を含む）と共に投与することができる。

【0184】

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

KCNTATCATQRLANFLVRSSNNLGPVLPPTNVGSNTY（配列番号6）；

KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGAILSSSTNVGSNTY（配列番号7）；

KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGPILPPTNVGSNTY（配列番号8）。

【0185】

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

CGNLSTCMLGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAP（配列番号9）；

CSNLSTCVLGKLSQELHKLQTYPRNTGSGTP（配列番号10）；

KCNTATCVLGRLSQELHRLQTYPRNTGSNTY（配列番号11）。

【0186】

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

【0187】

「アミリンアゴニスト化合物」には、天然アミリンペプチド、アミリン類似体ペプチド

10

20

30

40

50

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

【0188】

別の活性薬剤と共投与するとき、それらの化合物を同時にまたは連続的に投与することができ、一緒または別々に製剤化することができる。本明細書における改変化合物は、本質的に長時間作用性であるので、1日1回、週1回、またはより長い間隔での投与に好適である。したがって、前記エキセンディン改変ポリペプチドの例えば週1回での投与期間中に、他の薬剤を必要に応じて1回投与または複数回投与いずれかで、例えば、1日1回、1日2回、1日3回、週1回投与することができる。

【0189】

アミリン化合物などの他の薬剤の単回または複数回用製剤については報告されている。例えば、プラムリンチドは、糖尿病を処置するため、および肥満を処置するために1日1回、2回および3回投与用に製剤化され、投与に成功している。

【0190】

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

【0191】

一般に、前記改変ポリペプチドを患者への投与のために安定した安全な医薬組成物に製剤化することができる。本発明の方法での使用が考えられる医薬製剤は、おおよそ0.01から1.0% (w/v)、一定の場合には0.05から1.0%の前記改変ポリペプチドと、最終組成物のpHを約3.0から約7.0にさせ得るおおよそ0.02から0.5% (w/v) の酢酸、リン酸、クエン酸またはグルタミン酸緩衝液と、おおよそ1.0から10% (w/v) の炭水化物または多価アルコール等張化剤と、所望により、m-クレゾール、ベンジルアルコール、メチル、エチル、プロピルおよびブチルパラベンならびにフェノールの群から選択されたおおよそ0.005から1.0% (w/v) の保存剤を含み得る。一般に、製剤化したペプチドを多用途製品に含めることとなる場合に、かかる保存剤を含める。

【0192】

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

【0193】

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

10

【0194】

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

【0195】

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

20

【0196】

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

【0197】

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

30

【0198】

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

40

【0199】

安定剤を前記製剤に含めてもよいが、必ずしも必要であるとは限らない。しかし、含める場合、本発明の実施に有用な安定剤は、炭水化物または多価アルコールである。本発明の実施に有用な、好適な安定剤は、おおよそ1.0から10%（w/v）の炭水化物または多価アルコールである。前記多価アルコールおよび炭水化物は、それらの主鎖に同じ特徴、すなわち--CHOH--CHOH--を共有しており、これがタンパク質の安定化に関与する。前記多価アルコールとしては、ソルビトール、マンニトール、グリセリンおよびポリエチレングリコール（PEG）のような化合物が挙げられる。これらの化合物は、直鎖分子である。一方、

50

前記炭水化物、例えば、マンノース、リボース、スクロース、フルクトース、トレハロース、マルトース、イノシトールおよびラクトースは、ケトまたはアルデヒド基を含有し得る環状分子である。これらニクラスの化合物は、高温および冷凍—解凍または凍結乾燥プロセスにより引き起こされる変性に対してタンパク質を安定させることに有効であることが実証されている。好適な炭水化物としては、ガラクトース、アラビノース、ラクトース、または糖尿病患者に対して悪影響を及ぼさない任意の他の炭水化物、すなわち、代謝されて許容しがたく高い血糖濃度を形成することのない炭水化物が挙げられる。かかる炭水化物は、当該技術分野では糖尿病患者に好適であると周知である。スクロースおよびフルクトースは、非糖尿病用途（例えば、肥満の処置）で前記化合物と共に使用するのに好適である。

10

【0200】

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

【0201】

20

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

【0202】

30

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

【0203】

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

40

【0204】

改変ポリペプチドは、液体形態のとき、ガラス容器中でガラスに吸着する傾向を有さないことがあり得、したがって、医薬製剤をさらに安定させるために界面活性剤を必要としないことがある。しかし、液体形態のときにかかる傾向を有する化合物に関しては、界面活性剤をそれらの製剤に使用すべきである。その後、これらの製剤を凍結乾燥させ得る。界面活性剤は、多くの場合、疎水分解のタンパク質の変性と塩架橋分離によるタンパク質の変性の両方の原因となる。比較的低濃度の界面活性剤が、界面活性剤部分とタンパク質の反応性部位との強い相互作用のため、強い変性活性を発揮し得る。しかし、この相互作用

50

用の賢明な使用により、タンパク質を界面または表面変性に対して安定させることができる。前記改変ポリペプチドをさらに安定させることができる界面活性剤は、所望により、全製剤の約0.001から0.3% (w/v) の範囲で存在し得、該界面活性剤としては、ポリソルベート80 (すなわち、ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノオレエート)、CHAPS (登録商標) (すなわち、3- [(3-コラミドプロピル) ジメチルアンモニオ] 1-プロパンスルホネート)、Brij (登録商標) (例えば、Brij (登録商標) 35、これは、(ポリオキシエチレン (23) ラウリルエーテル) である)、ポロキサマー、または別の非イオン性界面活性剤が挙げられる。

【0205】

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

【0206】

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

【0207】

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

【0208】

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

【0209】

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

【0210】

ガラスバイアル用の栓、例えば、West 4416/50、4416/50 (テフロン面付き) および4406/40、Abbott 5139または任意の均等内容の栓を注射用の医薬のための閉鎖キャップ (closure) として使用することができる。ペプチド抗肥満薬を含む製剤用のこれらの栓は、該ペプチドはもちろん、該製剤の他の成分とも適合性である。本発明者らは、患者使用パターンを用いて試験した時にこれらの栓が栓完全性試験に合格する、例えば、栓が少なくとも約100回の注射に耐えることができることも発見した。あるいは、前記ペプチドを、後の再構成のためのバイアル、注射器またはカートリッジ内で凍結乾燥させることができる

10

20

30

40

50

。本発明の液体製剤を1もしくは2チャンバー式カートリッジ、または1もしくは2チャンバー注射器に充填することができる。

【0211】

上で説明した医薬製剤の各成分は、当該技術分野において公知であり、およびPharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications、第1巻、第2版、Avisら編、Merckel Dekker、ニューヨーク、ニューヨーク、1992に記載されており、前記参考文献は、その全体が出典明示により本明細書に援用されている。

【0212】

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

10

【0213】

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

20

【0214】

一定の実施形態では、本明細書に記載する改変ポリペプチドを対象に末梢投与する。一部の実施形態において、本発明の液体医薬製剤は、非経口投与を意図したものである。好適な投与経路としては、筋肉内経路、静脈内経路、皮下経路、皮内経路、関節内経路、髄腔内経路およびこれらに類するものが挙げられる。一部の実施形態では、皮下投与経路が好ましい。一定の実施形態では、経粘膜送達も好ましい。これらの経路としては、液体、半固体または固体形態のペプチドの投与を含み得る経口、鼻、舌下、肺および頬側経路が挙げられるが、それらに限定されない。改変ポリペプチドを含む製剤について、これらの経路による投与は、非経口送達と比較してバイオアベイラビリティが減少するため、所望の生物学的効果を得るために実質的により多くの化合物を必要とし得る。

30

【0215】

加えて、ポリマーマイクロカプセル、マトリックス、溶液、インプラントおよびデバイスを形成し、それらを非経口的にまたは外科的手段により投与することによって、非経口制御放出送達を果たすことができる。制御放出製剤の例は、米国特許第6,368,630号、同第6,379,704号および同第5,766,627号明細書に記載されており、これらの参考文献は出典明示により本明細書に援用されている。これらの剤形は、ペプチドの一部がポリマーマトリックスまたはデバイス内に捕捉されるため、より低いバイオアベイラビリティを有し得る。例えば、米国特許第6,379,704号、同第6,379,703号および同第6,296,842号明細書参照（これらの各参考文献は、それらの全体があらゆる目的のため出典明示により本明細書に援用されている）。

40

【0216】

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

【0217】

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

50

【0218】

投与は、経細胞経路、細胞間隙経路または受容体伝達経路をはじめとする経口経路によるものであり得る。いずれの理論にも拘束されることを望まないが、本明細書に記載のエキセンディン含有する改変ポリペプチドは、一つには、それらの比較的小さいサイズおよび消化管酵素に対する相対的安定性のため、経口利用可能である。吸収／透過増進剤によって開かれる腸細胞間の密着結合は、幅20nm未満であると報告されている。例えば、Chaoら、1998、J. Drug Targeting、6：37-43参照。したがって、本明細書に記載の十分小さい（例えば、10kDまたは15kD未満）改変ポリペプチドは、腸壁を通過し、門脈系内のアルブミンに結合し、それによって循環系に入ることができる。本発明の改変ポリペプチドの経口送達は、1日2回、1日1回、1日おき（once other day）、3日に1回、週1回、2週間に1回、3週間に1回またはさらに1ヶ月に1回であり得る。他のペプチドに好適な経口送達系を使用してもよい。一実施形態において、前記経口送達系は、例えば、1から4時間の、比較的急速な取り込みプロファイルを有することがあり、この場合、その改変ポリペプチドの本質的に長い作用持続時間により、所望される、例えば1日1回または週1回投与のための、作用持続時間延長がもたらされる。例えば、ABDの選択、およびアルブミンに対するその親和性によって、作用持続時間を選択することができる。理論により拘束されることを望まないが、アルブミンに対する親和性が高いほど、長い循環時間が生じることとなり、その結果、長い作用持続時間が得られると考えられる。経口送達は、公知のin vitro およびin vivo法を用いて試験することができる。例えば、透過／吸収増進剤および／またはプロテアーゼ阻害剤を用いて、または用いずに製剤化した改変ポリペプチドを含有する溶液でマウスに強制経口投与を施すことにより、任意の添加した賦形剤の利用能および効果を経口的に試験することができる。薬力学（治療効果）および薬物動態（薬物の特性）[例えば、薬物血漿中レベル、急性もしくは慢性グルコースおよび／もしくはHbA1c低下、インスリン血漿中レベル、食物摂取阻害、体重減少、ならびに／または脂質レベル]のいずれかまたは両方を、経時的に測定することができる。

B. 有効投薬量

【0219】

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

【0220】

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

【0221】

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

【0222】

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

【0223】

しかし、典型的な用量は、本明細書における改変ポリペプチドの延長された半減期にかんがみて、1日あたり約1ug、5ug、10ug、50ug、100ugから150ugの下限から、1週間あたり約50ug、100ug、150ug、200ugまたはさらに300ugの上限までの医薬化合物を含有し得る。前記用量を個別単位用量で所望の間隔において、例えば毎日または毎週、送達することができる。

10

【0224】

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

【0225】

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

20

【0226】

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

30

C. 毒性

【0227】

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

40

【0228】

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

50

【実施例】

【0229】

VII. 実施例

以下の実施例において有用なペプチドとしては、次のものが挙げられる：HaPGTFTSDLSK QMEEE AVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSTGGGGSASLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKHLILAA LP; HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVLKLAELAKVLAN RELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKHLILAA LP (配列番号164); HEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKLAELAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEA LKLHILAA LP (配列番号165); HEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEW LKNGGPSSGAPPPSGGSLKNAKEDAIA ELKKAGITSDFYFNAVNKAKTVEEVNALKNEILKALP (化合物22) (配列番号168); H(Aib)QGTFTSDYS KYLDEQAAKEFIAWLMN TYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKHLILAA LP (配列番号171); HSQGTFTSDYSK YLDEQAAKEFIAWLMNTYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKHLILAA LP (配列番号172); HSQGTFTSDYSKYL DEQAAKEFIAWLMNTGGGSYGVS D FYKRLINKAKTVEGVEALKHLILAA LP (配列番号173); HaPGTFTSDLS KQMEEE AVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSTGGGGSASLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKHLIL A LP (化合物14)、および [[Lys27#] HEGTFTSDLSKQMEEEA VRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS] [LA EAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKHLILAA LP-GGG-#] (化合物30)。当該技術分野に おいて通例であるように、小文字1文字アミノ酸略号 (例えば、「a」) は、D-アミノ酸 (例えば、D-Ala) を示す。側鎖連結ペプチド化合物の命名法では、角カッコ (「[]」) は、独立した断片を示し、クロスハッチ (「#」) は、連結位置を示す。

10

【実施例1】

【0230】

エキセンディン類似体-ABD改変ポリペプチドの精製。

方法。配列：MAHHHHHHVGTGSNENLYFQHGEFTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEW LKQGGPSKEIISTGGGGSAS LAELAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKHLILAA LP (配列番号50) を有する、当該 技術分野において公知のHis₆ (配列番号49) 「タグ」が組み込まれたN末端伸長部を有す る例示的化合物15 (配列番号163) を最初に製造した。

20

【0231】

細胞抽出物の調製。細胞抽出物を調製するために、50mLの細胞培養物からの細胞ペレ ットを60mLの溶解緩衝液 (50mM Tris HCl、150mM NaCl、pH8.0) に完全に再懸濁させた。再 懸濁させた細胞を100PSIで3回、マイクロフルイダイザー (Microfluidics、マサチューセ ッツ州) にかけた。細胞抽出物を30分間、16,000 x gで遠心分離して、破壊片を除去した 。EGTA (150mMストック) を細胞抽出物に添加して、3mMの最終濃度にした。

30

【0232】

Ni-NTAクロマトグラフィー。Ni-NTA superflowの50%懸濁液 10mLを15mLの空カラム に充填した。そのカラムを10mLの水、50mLの溶解緩衝液、および3mM EGTAを伴う20mLの 溶解緩衝液 (50mM TrisHCl、150mM NaCl、pH8.0、3mM EGTA) で洗浄した。細胞抽出物をN i-NTAカラムの頂部に注意深く添加し、通過画分を回収した。そのカラムを、EGTAを伴う 30mLの溶解緩衝液 (50mM TrisHCl、150mM NaCl、pH8.0、3mM EGTA) で洗浄した。10mLの 溶出緩衝液 (25mM TrisHCl、50mM NaCl、250mM イミダゾール、pH8.0) をカラムの頂部に 添加し、溶出画分 (2mL/画分) を回収した。SDS-PAGEを実行して、通過および各画分を 確認した。Hisタグの付いた化合物を含有する画分をプールした。

40

【0233】

TEVプロテアーゼ消化。His₆タグの付いた化合物を25mM TrisHCl、50mM NaCl、pH8.0で3 倍希釈した。β-メルカプトエタノール (0.1%) および2%のTurbo TEVプロテアーゼ (2 mg/mL、10,000単位/mg、Accelagen) を添加し、得られたものを混合し、室温で2時間、 そして4°Cで一晩インキュベートした。

【0234】

開裂されたHis-TagおよびTurbo TEVのNi-NTAでの除去。Ni-NTA superflowの50%懸 濁液 6mLを15mLの空カラムに充填した。そのカラムを、20mLの水、および20mLの50mM Tr i sHCl、100mM NaCl、45mM イミダゾール、pH8.0で洗浄した。そのTEV消化反応物を50mM Tr i sHCl、150mM NaCl、pH8.0で2倍希釈した。希釈した消化反応物をNi-NTAカラムの頂部に

50

注意深く添加し、通過画分を回収した。10mLの50mM TrisHCl、100mM NaCl、45mM イミダゾール、pH8.0をそのカラムに添加して、非結合タンパク質をすべて溶出した。通過画分を回収し、合わせた。

【0235】

第一のサイズ排除クロマトグラフィー (SEC)。そのNi-NTA通過画分を0.2umフィルターで濾過した。Superdex 75 HiLoad 26/60カラムを390mLのPBSで予備平衡させた。濾過した通過画分をそのHiLoad 26/60カラムにサンプルポンプで注入した。1.5CVのPBSでタンパク質を溶出し、単量体ピークをプールした。

【0236】

第二のサイズ排除クロマトグラフ。第一のSECのプールを0.2umフィルターで濾過した。Superdex 75 HiLoad 26/60カラムを390mLのPBSで予備平衡させた。濾過した通過画分をそのカラムHiLoad 26/60にサンプルポンプで注入した。1.5CVのPBSでタンパク質を溶出し、単量体ピークをプールした。

【0237】

第三のサイズ排除クロマトグラフィー。第二のSECのプールを0.2umフィルターで濾過した。Superdex 75 HiLoad 26/60カラムを390mLのPBSで予備平衡させた。濾過した通過画分をそのカラムHiLoad 26/60にサンプルポンプで注入した。1.5CVのPBSでタンパク質を溶出し、単量体ピークをプールした。

【0238】

EndoTrap Redでの残留エンドトキシンの除去。第三のSECのプールは、約20EU/mgのエンドトキシンをまだ含有しており、EndoTrap Redの使用によりそれを除去した。簡単に言うと、0.5mLのゲルスラリーを、1mLの再生緩衝液をスラリーに添加し、そのチューブをおおよそ5秒間、穏やかに振盪して混合することによって活性化した。その上清を遠心分離し、吸引した。この工程をさらに2回繰り返した。1mLの平衡緩衝液を添加し、そのチューブをおおよそ5秒間、穏やかに振盪することにより混合を行った。その上清を遠心分離し、吸引した。この工程をさらに2回繰り返した。タンパク質試料 (5.5mL) を樹脂に添加し、90分間、室温でインキュベートし、インキュベートしている間、そのチューブを穏やかに揺動または回転させた。得られたものを1200 x gで5分間遠心分離し、その上清を清浄なチューブに移した。

【0239】

結果。最終精製タンパク質は、用いた条件下でおおよそ6kDタンパク質としてSDS-PAGEゲル上を泳動した。LC-MSは、9827ダルトンの正確な分子量を示した。50mLの細胞培養物からのタンパク質の収量は3.3mgであった。

【実施例2】

【0240】

エキセンディン-ABD改変ポリペプチドの活性。

本発明のエキセンディン-ABD改変ポリペプチドは、in vitro細胞活性化アッセイにおいて十分なエキセンディン活性を保持した。加えて、これらの改変ポリペプチドは、哺乳動物に単回用量として投与されたとき、エキセンディン-4と比較して、血糖降下および体重減少についての劇的に向上した作用持続時間をもたらした。驚くべきことに、作用持続時間を齧歯動物モデルにおいて少なくとも1日、さらには少なくとも4日、およびさらには少なくとも7日、またはそれ以上延長することができ、これはヒト対象では少なくとも1週間の作用持続時間ということになるため、1日2回、1日1回、週3回、週2回またはさらに週1回の投与に好適である。

【0241】

本明細書に開示する化合物の機能活性は、GLP-1受容体を発現する細胞系統を使用して判定することができる。例えば、米国特許出願公開第2011/0097751号A1参照 (この参考文献は、アッセイ方法について出典明示により援用されている)。この実施例では、GLP-1Rを内因的に発現する細胞を使用して機能活性を判定した。エキセンディン活性の尺度としてcAMP誘導を検出する。HTRFアッセイキット (Cisbo International (マサチューセッ

10

20

30

40

50

ツ州ベルフォード)) を使用した。前記バイオアッセイは、Cisbioからカタログ番号62AM 4PEBとして入手できるHTRF (登録商標) cAMPダイナミック2 1,000アッセイキットを使用する細胞ベースのアッセイにおいてラット甲状腺癌6-23 (クローン6) 細胞を使用した。前記HTRF (登録商標) 標準物質および校正物質は、前記キットの中の説明書に従って準備される。384ウェル形式のHTRF (CisBio) 細胞ベースcAMPアッセイキットを使用して化合物処置の30分後に、cAMPの蓄積を測定する。10 μ M フォルスコリン (アデニル酸シクラーゼの構成的活性化因子) での細胞処理を基準にしてペプチドの有効性を判定し、4パラメーターモデルに当てはめる非線形回帰分析を用いる濃度-応答曲線の分析によりペプチドの効力 (EC₅₀) を判定する。効力 (EC₅₀) についてのGLP-1受容体機能活性 (cAMP誘導) の結果を下記の表5に提供する (表中の値はエキセンディン-4標準物質に正規化した)。10

【表 6】

表5. GLP-1R機能活性

解説	GLP-1R機能活性 (EC ₅₀) /nM
エキセンディン-4	0.004
[Leu ¹⁴ , Gln ²⁸] エキセンディン-4 (1-32) -fGLP-1) 33-37) (配列番号4)	0.016
エキセンディン-4 (1-28) アミド	0.011
化合物5	0.982
化合物6	0.0325
化合物15	0.091
化合物8	0.048
化合物10	0.146
化合物21	0.131
化合物31	0.62
化合物32	2.043
化合物33	0.77

【実施例 3】

【0 2 4 2】

OGTT DOA活性

グルコース経管栄養 (1.5k/kg デキストロース) の前およびグルコース経管栄養の30分後の血糖に対する効果を、様々な量の化合物15を伴うペプチド化合物の投与の1日後に調査した。結果を図1A-1Bに示す。図9に示すように、25nmol/kgでの化合物31も投与後24時間の時点で活性を示した。4時間絶食させたNIH/Swissマウスに、図に示す用量で薬物を投与した。バーは、平均±sdを表す。ペプチドをt=-1日の時点でIP注射した。4時間絶食させたNIH/Swiss雌マウスにt=0の時点でグルコース経管栄養 (1.5g/kg) を施した。OneTouch (登録商標) Ultra (登録商標) (Johnson & Johnson Companyの傘下のLifeScan, Inc., カリフォルニア州ミルピータス) で血糖を測定した。* ビヒクル対照に対してp<0.05; ANOVA、ダネット検定。このOGTT DOAは、薬物を投与した少なくとも24時間後に薬物活性が存在することを示す。 (コンジュゲートしていない) エキセンディン-4は、このアッセイにおいて、t-24時間 (グルコースアッセイの1日前) に投与したとき、およびより高い用量でさえ効果がなかった。40

【実施例 4】

【0 2 4 3】

OGTT DOA活性

経管栄養 (1.5k/kg デキストロース) の前および30分の時点での血糖に対する効果を、様々な量の化合物15の投与の2日後に調査した。結果を図2A-2Bに示す。4時間絶食させたNIH/Swissマウスに、図に示す用量で薬物を投与した。このOGTT DOAは、薬物を投与した50

少なくとも48時間後に薬物活性が存在することを示す。

【実施例 5】

【0 2 4 4】

OGTT DOA活性

血糖に対する化合物15の効果と化合物8の効果の比較を行った。結果を図3A-3Bに示す。4時間絶食させたNIH/Swissマウスに、図に示す用量で薬物を投与した。このOGTT DOAは、薬物を投与した少なくとも24時間後に薬物活性が存在することを示す。

【実施例 6】

【0 2 4 5】

HSD給餌麻酔ラットに対する化合物15の効果

10

化合物15 (240nmol/kg) での処置の効果と投与の5日後にSprague Dawley給餌麻酔ラットにおいて調査した。IVGTT後の血漿中グルコースの経時変化を図4Aに示す。積分 (AUC_{0-60}) 血糖値を図4Bのヒストグラムに示す。被験対象におけるインスリンレベルの経時変化を図4Cに示した。積分インスリンレベル (AUC_{0-30}) を図4Dに示す。被験対象についての経時的体重変化 (ベースラインからの変化%) を図4Eに示す。被験対象についての毎日の食物摂取量のヒストグラムの描画を図4Fに提供する。このIVGTT DOAは、薬物を投与した少なくとも5日時間 (5 days hours) 後に、特に、体重および毎日の食物摂取量に対する効果について、薬物活性が存在することを示す。

【実施例 7】

【0 2 4 6】

20

ob/obマウスにおける化合物15の効果

ob/obマウスにおける体重、グルコースおよびHbA_{1c}に対する化合物15の効果の経時変化を投与後に調査した。図5Aに示すように、顕著な体重減少が250nmol/kgの化合物15での処置の結果として起こる。グルコースの変化 (前処理%) およびHbA_{1c}の変化 (前処理%) を図5B-5Cに示す。点は、平均±s.d. (標準偏差) を表す。絶食させていない雄ob/obマウスに日=0でのベースライン試料採集直後に化合物15をsc注射した。別の指示がない限り、本明細書に記載する血糖測定にはOneTouch (登録商標) Ultra (登録商標) デバイス (LifeScan, Inc., カリフォルニア州Milpitas) を用いた。化合物21も体重減少およびHbA_{1c}低下を示した。

【実施例 8】

30

【0 2 4 7】

Zucker糖尿病肥満 (ZDF) ラットにおける化合物15の活性

本明細書に記載する例示的化合物の体重およびグルコース低下の複合的有効性を評定するために、約14週齢雄ZDFラットにおいて化合物15の用量依存効果を調査した。ベースライングルコースは426mg/dLであり、ベースライン体重は431gであった。群の大きさn=8。図6Aは、処置後の体重の経時変化 (ビヒクル補正%) を示す。図6Bは、血漿グルコースの経時変化を示す。

【実施例 9】

【0 2 4 8】

OGTT DOA (作用持続時間) に対する化合物15、8および10の活性

40

図7に示すように、30分の時点での血糖の変化 (経管栄養前%) に対する化合物15、8および10の効果を調査した。図中、バーは、平均±s.d.を表す。被験化合物をt=-1日の時点でIP注射した。4時間絶食させたNIH/Swiss雌マウスにt=0の時点でグルコース経管栄養 (1.5g/kg) を施した。本明細書中で説明するとおりに血糖を測定した。このOGTT DOAは、薬物を投与した少なくとも24時間後に薬物活性が存在することを示す。

【実施例 10】

【0 2 4 9】

24時間の時点でのOGTT DOA (作用持続時間) に対する化合物の活性

30分の時点で血糖の変化 (経管栄養前%) に対する本明細書に開示する化合物の効果を調査した。被験化合物を25nmol/kgで、t=-1日の時点で、IP注射した。4時間絶食させた

50

NIH/Swiss雌マウスに $t=0$ の時点でグルコース経管栄養（1.5g/kg）を施した。本明細書中で説明するとおり血糖を測定した。このOGTT DOAは、薬物を投与した少なくとも24時間後に薬物活性が存在することを示す。結果を下記の表6に示す。化合物30（リシン27連結）および化合物32は、血糖降下をもたらさなかった。これは、これらの条件下、24時間の時点での存在の欠如を示す。（コンジュゲートしていない）エキセンディン-4は、このアッセイにおいて、 $t=24$ 時間に投与したとき、およびより高い用量でさえ効果がなかった。位置3にプロリンを有する化合物14は、*in vitro*機能アッセイにおいて本質的に不活性であり、血糖降下OGTTアッセイにおいて不活性（およびおそらく体重増加促進性（weight promoting））であった（データを示さない）。P.マグヌス（P. magnus）からのPABタンパク質であるアルブミン結合配列を有する化合物22は、上記のアッセイにおいて体重低下性を殆ど有さず、あったとしても3%しか有さなかった。切頭型ABDを有する化合物19および化合物20は、持続時間は短縮されるが、*in vitro*活性を依然として維持し、OGTT DOAアッセイにおいてそれぞれ6%および8%血糖を降下させた。

【表7】

表6. OGTTにおける投与後24時間の時点での血糖降下

解説	ビヒクルと比較した血糖降下%
化合物5	-28
化合物6	-18
化合物15	-21
化合物8	-21
化合物10	-22
化合物21	-23
化合物23	-23
化合物24	-17
化合物31	-22
化合物33	-19

【実施例11】

【0250】

血清アルブミン結合

本明細書に記載するBiacoreのものを含めて、アルブミンへの改変ポリペプチドの結合の特性確認を行い得る方法はいくらでもある。この実施例では、25℃でGLCセンサーチップを使用してBioRad ProteOn XPR36システム（Bio-Rad Laboratories、米国カリフォルニア州ハーキュリーズ；ProteOn XPR36 Protein Interaction Array Systemカタログ番号#176-0100）で結合測定を行った。アミンカップリングのために、下で示すように水中で最初のストックから30倍希釈したスルホ-NHS/EDCの1:1混合物を使用して5分間、GLCチップを活性化した。各アルブミン試料を10mM 酢酸Na pH5.0中25ug/mLに希釈して、離れたセンサー表面に5分間注射した。その後、各表面を1Mエタノールアミン pH8.5でブロックした。各アルブミンをレゾナンスユニットでの2000-5000の密度でカップリングした。3倍希釈系列で5nMを最高濃度として使用して、改変ポリペプチドの結合を試験した。泳動緩衝液は、10mM HEPES pH7.4、150 mM NaCl、3 mM EDTAおよび0.005% tween-20を含有した。3倍希釈系列を用いてすべての試料を試験した。各濃度系列を二重反復で試験した。最高濃度についての解離相を3時間、モニターした。

【0251】

前記改変ポリペプチドについて測定された相対 K_D を下の表7に示す。結果は、前記アルブミン結合ポリペプチドが高親和性で血清アルブミンと会合することを示す。カッコ内の数は、最終有効数字での標準偏差を表す。下記の表からわかるように、配列番号35のアルブミン結合ドメインに融合したエキセンディンポリペプチドは、様々な種からの血清アルブミン、特にヒト血清アルブミンに対して、コンジュゲートしていないABDペプチド自体

と比較しても、極めて高い親和性を保持する。

【表 8】

表7

化合物	ヒトSA	イヌSA	サルSA	マウスSA	ラットSA
配列番号35	16 (4) pM	201 (2) pM	123 (1) pM	1.24 (1) nM	18 (5) pM
化合物15	68pM	513pM	91pM	1.25nM	200pM
化合物21	85pM	397pM	78pM	1.33nM	16pM

【実施例 1 2】

【0 2 5 2】

血清アルブミンの存在下での活性

血清アルブミンの存在下での前記改変ポリペプチドのin vitro活性の特性確認を実証した。アルブミン、特にヒト血清アルブミンの存在および不存在下で、アッセイを実行することができる。上のデータは、約0.1%ウシ血清アルブミン (BSA) の存在下で判定したものである。下記の表は、上で説明した、ただし様々な種からの血清アルブミンの存在下での、受容体活性化 (cAMP誘導) アッセイの機能活性を提示するものである。明らかなように、驚くべきことに、化合物がヒト血清アルブミンなどの血清アルブミンに結合しているときでさえ、アルブミン結合の結果として起こる化合物の立体障害およびさらには見かけのストークス半径の変化に関する可能性を伴う、大きな血清アルブミンの存在にもかかわらず、前記改変ポリペプチドはGLP-1受容体アゴニスト活性を保持している。一部の種の血清アルブミン、例えばヒト血清アルブミンへのABDおよび前記改変ポリペプチドのピコモル親和性を考えると、前記改変ポリペプチドは、このアッセイに（そしてまた、循環血中in vivoで）存在するアルブミンに有効かつ十分に結合すると考えられる。（上記のような）アルブミンへの化合物の極めて高い結合親和性および血液中の高濃度の血清アルブミンの存在のため、該化合物は、本質的にin vivo結合状態で存在することとなると予想されるが、驚くべきことに、（ここで実証するように）十分なエキセンディン機能を提供する。

【表 9】

表8

化合物	0.1%ウシ アルブミン	1%ウシ アルブミン	1%ヒト アルブミン	1%ラット アルブミン
GLP-1 (7-36) アミド	0.0306	0.0058	0.0112	0.0179
化合物15	0.7854	0.2204	0.185	0.2473
化合物21	1.1013	0.2234	0.2022	0.2164
化合物31	1.1408	0.2313	0.2139	0.2358
GLP-1 (7-36) アミド通 常アッセイ条件	0.0256	0.0224	0.0165	0.0153

【実施例 1 3】

【0 2 5 3】

化合物はヒト血漿およびヒト血漿酵素に対して安定している

化合物をヒト血漿およびヒト細胞膜プロテアーゼに対する安定性について検査した。ヒト血漿中での代表ペプチドの安定性が次のように実現された：ゼロ時点で開始して、その期間（5時間）の間、10分毎に100 μL試料を取り出すのに十分な量でヒト血漿中の10 μg/mLの化合物を調製した。ヒト血漿への化合物の添加後、その試料を穏やかに混合し、その混合物の100 μL試料を微量遠心チューブに移して、ゼロ時点とした。試料の残りを37℃のインキュベーターに入れ、600RPMで60分間混合した。10分間隔で、前記混合物の100 μL試料を取り出し、別の微量遠心チューブに移した。ゼロ時点で、および各10分間隔で100 μL

の試料を移した後、混合しながら100 μ Lの冷0.2%ギ酸：アセトニトリルをゆっくりと添加することにより、回収した各試料を抽出した。アセトニトリル溶液の添加後、試料を高速で15秒間ボルテックス混合した。抽出試料を -20°C で少なくとも20分間保存し、その後、11,000 $\times$ gで10分間、 5°C で遠心分離した。各試料の上清を新たな微量遠心チューブに移し、再び遠心分離し、最後にLC/MS分析のために移した。0.1%トリフルオロ酢酸を含有する水中の5–95%アセトニトリル (acetonitrile) 勾配を用いて、Agilent HLPC (LC/MS 1200) で試料分析を行った。表9は、標準物質 (100%) に正規化した結果を示す。図8は、5時間の時間経過にわたってヒト血漿中の化合物残存率の時間プロファイルを表すものである。

【表 10】

表9.

化合物	ヒト血漿中での安定性%
GLP-1 (7-37) アミド (配列番号5)	41.7
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGSKEIIS (配列番号4)	100
化合物15	96.0
化合物21	89.5
化合物31	93.7

【0 2 5 4】

ヒト腎臓刷子縁膜 (KBBM) アッセイにおける代表的ペプチドの相対安定性が次のように実現された。ヒト腎臓刷子縁膜タンパク質抽出物には様々なペプチダーゼが豊富に含まれている。溶媒蒸発を回避するために0リングシールを有するポリプロピレン微量遠心チューブの中でタンパク質抽出物調製物 (hKBBMP)、5マイクロL (およそ7マイクログラム/mLのタンパク質) を625マイクロLのHEPES緩衝液 (25mM、pH7.4) で希釈した。別のバイアルの中でペプチドストック溶液 (水中50%のアセトニトリル中、300マイクロM) を調製し、70マイクロLのこの溶液を上記hKBBMP溶液に添加した。その溶液を、最終ペプチド濃度が30マイクロMになるように、手での振盪により穏やかに混合した。その後、100マイクロLのこの溶液を6本の異なるチューブに等分し、一本のチューブに200マイクロLの酵素停止溶液 (0.1%TFAを伴う水中50%のアセトニトリル) を添加した。このチューブを $t=0$ 分時点での初回ペプチド濃度の測定に使用し、一方、他の5本のチューブすべては、水浴を使用して 37°C でインキュベートした。1、2、3、4および5時間の間隔で各チューブを取り出し、200マイクロLの停止溶液で失活させた。最後に、6本のチューブすべてを1800 $\times$ gで10分間遠心分離して、沈殿タンパク質をすべて除去した。上清 (10マイクロL) をHPLCオートサンプラーに移し、選択したイオンカウント法を用いることによりAUCを測定した。各試料を3回反復で実行し、データ分析のために平均AUCを計算した。試料分析は、質量検出器を備えたAgilent HPLCで、0.1%TFAとアセトニトリルの勾配を用いて行った。GraphPad Prism (登録商標) 5ソフトウェアを使用して、酵素的消化時間の $t=0$ から5時間までの親ペプチド残存百分率をプロットした。各ペプチドについてのデータが陽性対照に対する相対ペプチド安定性として報告された。述べたように試料を $n=6$ として実行し、CVは20%以内であった。このhKBBM安定性アッセイの結果を表10に示す。

【表 11】

表10.

化合物	安定性%
GLP-1 (7-37) アミド (配列番号5)	16
HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGSKEIIS (配列番号4)	100
化合物21	103

10

20

30

40

50

【実施例 14】

【0255】

空胞形成の欠如

一部の薬物、例えば一部のPEG化タンパク質に関しては、近位曲尿細管の内側を覆う上皮細胞の細胞質中で望ましくない空胞が形成することがあり、これは望ましくない毒性の尺度となる。本願の改変アルブミン結合化合物は、腎臓空胞を形成しない。C57BL6雌マウス（n=2ケージ、3マウス/ケージ）を毎日消灯の3時間前に計量した。第0-6日の計量直後にマウスに被験化合物を皮下注射した。第7日にマウスを殺し、腎臓を病理組織診断に付した。腎皮質尿細管上皮細胞の細胞質空胞化についての重症度スコアは、次のとおりであった：スコア1=極微（8-15%）；2=軽度（16-35%）；3=中等度（36-60%）；4=顕著（>60%）。空胞形成を誘発することが公知の陽性対照化合物には3のスコアを付けた。ABDポリペプチド自体は、0スコアであった。化合物15は、0スコアであった。

10

【実施例 15】

【0256】

正常マウスにおける食物摂取抑制に対する効果

正常マウスの食物摂取抑制に対する被験化合物の効果の経時変化を判定した。図10Aに示すように、用量依存性の顕著な体重減少が6時間にわたって化合物31での処置の結果として起こる。図10Bは、正常マウスにおいて少なくとも54時間、化合物の単回投与後の用量依存性、持続性食物摂取抑制を示している。エキセンディン類似体の効果は、24時間以内に無くなる。化合物31は、最高用量で3日後でさえ食物摂取を依然として顕著に抑制する。点は、n=4ケージ（3マウス/ケージ）の平均±標準偏差を表す。ペプチドをt=0の時点でIP注射した。注射後直ちに餌を導入し、消費量をt=30、60、120、180、240、300、360分、24時間、30時間、48時間および54時間の時点で測定した。* ビヒクル対照に対してp<0.05；ANOVA、ダネット検定。ED50は、化合物31については約10nmol/kg、および[Leu14]エキセンディン-4については2nmol/kgであった。

20

【実施例 16】

【0257】

糖尿病ob/obマウスにおけるエキセンディン-アルブミン結合ドメインポリペプチドの効果

血糖降下、HbA_{1c}低下および体重低下に対する、本明細書に記載するエキセンディン-アルブミン結合ドメイン改変ポリペプチドの慢性的曝露の効果を実証するために、糖尿病ob/ob/マウスを化合物15および化合物21で処置した。ob/obマウスにおける体重、血糖降下およびHbA_{1c}低下に対する被験化合物の効果の経時変化を投与後に調査し、4週間後の値を図11A、11B、11Cおよび11Dに示した。図11A（化合物15）および11B（化合物21）は、リラグルチドと比較した血糖の変化を示す図であり、すべての化合物を週2回（BIW）与えた。そして図11Cは、持続皮下注入（CSI）によって与えたエキセンディン-4と比較した、週2回（BIW）与えた化合物15および化合物21についてのHbA_{1c}の低下（基線からの変化%）を示す図である。図11Dは、持続皮下注入（CSI）によって与えたエキセンディン-4と比較した、週2回（BIW）与えた化合物15および化合物21についての体重の低下（基線からの変化%）を示す図である。驚くべきことに、図11Aおよび11Bからわかるように、各化合物は、慢性的曝露による血糖降下について、等モル（equimolar）投与でのリラグルチドより優れている。さらに、リラグルチドと等モル投与で、化合物15および化合物21は、それぞれ、長時間作用性アルブミン結合GLP-1誘導体であるリラグルチド[N-イプシロン-（ガンマー-Glu（N-α-ヘキサデカノイル））-Lys26, Arg34]-GLP-1-（7-37）-酸よりHbA_{1c}低下および体重減少の点で有効であった（データを示さない）。図11Cに示すように顕著なHbA_{1c}低下が、および図11Dに示すように顕著な体重減少が、28日間、各週2回、腹腔内に（IP）施した25および250nmol/kgの各化合物での処置の結果として生ずる。点は、平均±s.d.（標準偏差）を表す。絶食させていない雄ob/obマウスに日=0でのベースライン試料採集直後に各被験化合物をIP注射した。25nmol/kg biw（週2回）投与について観察された効果は、エキセンディン-4について最大効力をもたらすことが知られて

30

40

50

いる用量である約7.2nmol/kg/日での持続注入（CSI）によって与えたエキセンディン-4について観察された効果より大きかった。したがって、匹敵する等モル用量で、化合物15および化合物21は、最大有効用量のエキセンディン-4の糖血および体重減少効果より優れていた。250nmol/kgで、化合物15は、最大有効用量のエキセンディン-4より顕著に優れており、化合物21は、最大有効用量のエキセンディン-4の2倍有効であった。別の指示がない限り、本明細書に記載する血糖測定にはOneTouch（登録商標）Ultra（登録商標）デバイス（LifeScan, Inc.、カリフォルニア州Milpitas）を用いた。

【0258】

驚くべきことに、上で観察されたように、コンジュゲートしていないエキセンディン-4と比較して低減されたin vitro効力にもかかわらず、本明細書に開示するアルブミン結合ポリペプチドに融合したエキセンディンの急性（6時間以内の）in vivo活性は、最大有効性に関してはコンジュゲートしていないエキセンディンのものと同様であり、効力（例えばEC50）に関しては、例えばマウスにおいて食物摂取量低減によって測定したとき（データを示さない）、ほんのわずか（数分の1）しか低くない。さらにいっそう驚くべきことに、慢性的曝露の効果は、本明細書に開示するアルブミン結合ポリペプチドに融合したエキセンディンが、エキセンディン-4（持続注入）と同様に強力であり、またはより大きい効力を有することさえあり、しかもより大きい最大効果をもたらすことができることを示す。さらに、マウスまたはラットアルブミンに対する非常に高い親和性、および低いオフレートに照らして、前記すべての改変化合物は、in vivoアッセイの際（ならびにin vitroアッセイの際）アルブミンに有効に結合している。したがって、前記改変ポリペプチドは、アルブミンと結合しているときでさえ、GLP-1R機能活性を保持していた。これは、一つには、アルブミン化合物、例えばリラグチドがアルブミンから解離したときのみ顕著に活性であると報告されているので、驚くべきことである。また、他方、エキセンディン機能を得るために、エキセンディンをコンジュゲートさせたアルブミン結合ペプチドからタンパク質分解によりエキセンディンを除去する必要があるとの報告もある。したがって、本明細書に示すようなin vivo活性は、さらにいっそう印象的である。

【実施例17】

【0259】

in vivoでの改変ポリペプチドの長い持続時間および作用

本明細書に記載する改変ポリペプチドの長い半減期および長い活性持続時間をさらに実証するために、ラットを使用して薬物動態（PK）特性および薬力学的（PD）特性を判定した。正常Harlan Sprague-Dawley（HSD）ラットに皮下投与した例示的改変ポリペプチド化合物15および化合物21の薬物動態プロファイルおよび生物活性を提示する。組換え改変化合物である化合物21および化合物15をt=0の時点で25nmol/kgで正常HSDラットに皮下注射した。給餌HSD雄ラットからt=1時間、3時間、6時間、24時間、48時間、72時間、96時間および168時間の時点で尾出血によって血液を採集した。餌重量および体重を毎日測定した。図12Aは、食物摂取量を低減させる化合物15および化合物21の効果を示す図である。図12Bは、体重を低下させる化合物15および化合物21の効果を示す図である。図12Cは、化合物15および化合物21の単回投与後のPKプロファイルを示す図である。点は、平均±sdを表す。

【0260】

両方の例示的改変ポリペプチドについて少なくとも七（7）日までの曝露が観察された。この皮下送達により、ラットにおいて化合物15は54時間の見かけの半減期を有し、化合物21は61時間の見かけの半減期を有する。アロメトリック・スケーリングにより、およびヒトアルブミンに対する前記改変ポリペプチドの強い親和性にかんがみて、ヒト対象では少なくとも同様に長いおよびさらにはより長い物理的および生物学的活性持続時間が予想される。したがって、前記化合物は、特にヒト対象において、少なくとも1日2回（例えば朝晩）、少なくとも毎日、週2回、およびさらには週1回の投与を必要とする。

【0261】

正常Harlan Sprague-Dawley（HSD）ラットに静脈内投与した例示的改変ポリペプチド

の薬物動態プロファイルおよび生物活性を提示する。組換え改変化合物である化合物31を $t=0$ の時点で、 2nmol/kg で正常HSDラットに静脈内注射した。給餌HSD雄ラットから $t=1$ 時間、3時間、6時間、24時間、48時間、72時間、96時間および168時間の時点で尾出血によって血液を採集した。餌重量および体重を毎日測定した。図13Aは、食物摂取量を低減させる化合物31の効果を示す図である。図13Bは、体重を低下させる化合物31の効果を示す図である。図13Cは、化合物31の単回IV投与後のPKプロファイルを示す図である。半減期を少なくとも約14時間と推定し、点は、平均 $\pm$ sdを表す。

【0262】

この例示的改変ポリペプチドについて、これらの比較的低い用量でさえ、七(7)日までの曝露が観察された。アロメトリック・スケーリングにより、およびヒトアルブミンに対する前記改変ポリペプチドの強い親和性にかんがみて、ヒト対象では少なくとも同様に長いおよびさらにはより長い物理的および生物学的活性持続時間が予想される。したがって、前記化合物は、特にヒト対象において、少なくとも1日2回(例えば朝晩)、少なくとも毎日、週2回、およびさらには週1回の投与を必要とする。

【実施例18】

【0263】

改変ポリペプチドの経口送達は全身分布を達成する

腸管取り込みを伴う経口送達を、代表的改変化合物を使用して調査した。糖尿病db/dbマウスに次の化合物を 240nmol/kg で経口(経管栄養により経口)投与した: エキセンディン類似体 [Leu14, Gln28] エキセンディン-4-(1-32)-fGLP-1-(33-37) 酸および化合物15。データは、前記改変ペプチドが、送達および取り込みを増進し得る他の特定の賦形剤不存在の製剤PBS/プロピレングリコール(50:50)の場合でさえ、経口的に生物学的利用能を示すことを明示する。前記エキセンディン類似体と比較すると、エキセンディン類似体の分子量の2倍より大きい化合物15も、(両方とも 1mg/kg 用量で)、同製剤で経口的に生物学的利用能を示す。これらの結果は、両方の化合物が、経口投与されたとき活性であり、試験した条件下で120分まで同等に効果的であったことを示す。結果を図14に提示する。点は、平均 $\pm$ sdを表す。ベースライン試料の採取直後、 $t=0$ の時点で、ペプチドを経管栄養により経口投与した。マウスは、2時間絶食させたdb/dbマウスであった。したがって、本明細書に提示する化合物は、特にヒト対象において、少なくとも1日2回(例えば朝晩)、少なくとも毎日、週3回、週2回、およびさらには週1回経口の投与を必要とする。

VIII. 実施形態

【0264】

実施形態1. アルブミン結合ドメインポリペプチド(ABD)配列と、エキセンディン配列、エキセンディン類似体配列、エキセンディン活性断片配列またはエキセンディン類似体活性断片配列から選択された第一のペプチドホルモンドメイン(HD1)配列とを含む、改変ポリペプチド。

【0265】

実施形態2. 前記ABD配列および前記HD1配列を共有結合で連結する第一のリンカー(L1)をさらに含む、実施形態1に記載の改変ポリペプチド。

【0266】

実施形態3. 前記ABD配列をC末端部分としておよび前記HD1配列をN末端部分として含む、実施形態1から2のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0267】

実施形態4. 構造HD1-ABDを有する、実施形態3に記載の改変ポリペプチド。

【0268】

実施形態5. 構造HD1-L1-ABDを有する、実施形態3に記載の改変ポリペプチド。

【0269】

実施形態6. 前記HD1配列が、前記エキセンディン配列または前記エキセンディン類似体配列から成る、実施形態1から5のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0270】

実施形態7. 前記エキセンディン配列が、エキセンディン-4配列である、実施形態6に記載の改変ポリペプチド。

【0271】

実施形態8. 前記エキセンディン活性断片配列が、エキセンディン-4 (1-28)、エキセンディン-4 (1-29)、エキセンディン-4 (1-30)、エキセンディン-4 (1-31) またはエキセンディン-4 (1-32) (配列番号2) の配列である、実施形態6に記載の改変ポリペプチド。

【0272】

実施形態9. 前記エキセンディンまたはエキセンディン類似体の配列が、(配列番号3)、(配列番号4)、(配列番号2)、(配列番号111)、(配列番号112)、(配列番号113)、(配列番号114)、(配列番号115)、(配列番号116)、(配列番号117) および (配列番号118) から成る群より選択された配列を含む、請求項6に記載の改変ポリペプチド。

10

【0273】

実施形態10. 前記エキセンディン類似体配列が、配列 (配列番号3)、(配列番号4)、(配列番号2)、(配列番号111)、(配列番号112)、(配列番号113)、(配列番号114)、(配列番号115)、(配列番号116)、(配列番号117) および (配列番号118) のうちのいずれか一つから成る群より選択されたエキセンディン-4配列またはエキセンディン類似体配列と少なくとも70%の同一性を有する、実施形態1から9のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

20

【0274】

実施形態11. 前記エキセンディン類似体配列が、エキセンディン-4配列、または (配列番号3)、(配列番号4)、(配列番号2)、(配列番号111)、(配列番号112)、(配列番号113)、(配列番号114)、(配列番号115)、(配列番号116)、(配列番号117) および (配列番号118) から成る群より選択された配列を有するエキセンディン類似体配列を基準にして1から5のアミノ酸修飾を含み、該修飾が、挿入、欠失、付加および置換のいずれか一つまたは組み合わせから独立して選択される、実施形態1から10のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0275】

30

実施形態12. 前記ABD配列が、アルブミン結合モチーフ (ABM) 配列を含む、実施形態1から11のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0276】

実施形態13. 前記ABD配列が、アミノ酸配列: GVSD X5 YK X8 X9 I X11 X12 A X14 TVE GV X20 AL X23 X24 X25 I (配列番号119) (式中、X5は、YおよびFから選択され; X8は、N、RおよびSから選択され; X9は、V、I、L、M、FおよびYから選択され; X11は、N、S、EおよびDから選択され; X12は、R、KおよびNから選択され; X14は、KおよびRから選択され; X20は、D、N、Q、E、H、S、RおよびKから選択され; X23は、K、IおよびTから選択され; X24は、A、S、T、G、H、LおよびDから選択され; ならびにX25は、H、EおよびDから選択される) から成るアルブミン結合モチーフ (ABM) 配列を含む、実施形態1から11のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

40

【0277】

実施形態14. 前記ABD配列が、アミノ酸配列GVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEI (配列番号120) から成らないアルブミン結合モチーフ (ABM) 配列を含む、実施形態1から13のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0278】

実施形態15. 前記ABD配列が、アルブミン結合モチーフ (ABM) 配列に共有結合で連結されており、該ABM配列がアミノ酸配列LAALP (配列番号183) にさらに共有結合で連結されている、アミノ酸配列: LAEAK Xa Xb A Xc Xd EL Xe KY (配列番号182) (式中、Xaは、VおよびEから選択され; Xbは、L、EおよびDから選択され; Xcは、N、LおよびIから選択

50

され；Xdは、RおよびKから選択され；ならびにXeは、DおよびKから選択される）を含む、実施形態1から14のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0279】

実施形態16. 前記ABDが、アミノ酸配列： LAEAK Xa Xb A Xc Xd EL Xe KY GVSD X5 YK X8 X9 I X11 X12 A X14 TVEGV X20 AL X23 X24 X25 I LAALP（配列番号121）（式中、Xaは、VおよびEから選択され；Xbは、L、EおよびDから選択され；Xcは、N、LおよびIから選択され；Xdは、RおよびKから選択され；Xeは、DおよびKから選択され；X5は、YおよびFから選択され；X8は、N、RおよびSから選択され；X9は、V、I、L、M、FおよびYから選択され；X11は、N、S、EおよびDから選択され；X12は、R、KおよびNから選択され；X14は、KおよびRから選択され；X20は、D、N、Q、E、H、S、RおよびKから選択され；X23は、K、IおよびTから選択され；X24は、A、S、T、G、H、LおよびDから選択され；ならびにX25は、H、EおよびDから選択される）を含む、実施形態1から15のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

10

【0280】

実施形態17. 前記ABD配列中のC末端プロリンが存在しない、実施形態16に記載の改変ポリペプチド。

【0281】

実施形態18. 前記ABD配列中の位置45のロイシンが存在しない、実施形態16から17のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0282】

20

実施形態19. 前記ABD配列が、A、AS、GまたはGSから選択されたN末端付加をさらに含む、実施形態16から18のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0283】

実施形態20. 前記ABD配列が、アミノ酸配列LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALK LHILAALP（配列番号35）を含む、実施形態16に記載の改変ポリペプチド。

【0284】

実施形態21. 前記ABD配列が、（配列番号23）、（配列番号24）、（配列番号25）、（配列番号26）、（配列番号27）、（配列番号28）、（配列番号29）、（配列番号30）、（配列番号31）、（配列番号32）、（配列番号33）、（配列番号34）、（配列番号35）、（配列番号122）、（配列番号123）および（配列番号124）から成る群より選択された配列を含む、実施形態16に記載の改変ポリペプチド。

30

【0285】

実施形態22. 前記ABDの配列が、（配列番号23）、（配列番号24）、（配列番号25）、（配列番号26）、（配列番号27）、（配列番号28）、（配列番号29）、（配列番号30）、（配列番号31）、（配列番号32）、（配列番号33）、（配列番号34）、（配列番号35）、（配列番号122）、（配列番号123）および（配列番号124）から成る群より選択された配列を有するABDの配列と少なくとも85%の同一性を有する、実施形態1から11のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0286】

実施形態23. 前記ABD配列中のC末端プロリンが存在しない、実施形態16から22のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

40

【0287】

実施形態24. 前記ABD配列中の位置45のロイシンが存在しない、実施形態16から23のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0288】

実施形態25. 前記リンカーL1が、1から30アミノ酸のペプチドリinkerである、実施形態2から24のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0289】

実施形態26. 前記リンカーL1が、20の天然に存在するアミノ酸から選択される、実施形態2から25のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

50

【0290】

実施形態27. 前記リンカーL1が、化学合成、翻訳後化学修飾によって、または宿主細胞での組換え発現によるin vivo組み込みによって組み込まれた非天然アミノ酸を含む、実施形態2から25のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0291】

実施形態28. 前記リンカーL1アミノ酸が、グリシン、アラニン、プロリン、アスパラギン、グルタミンおよびリシンから選択される、実施形態2から27のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0292】

実施形態29. 前記リンカーL1が、立体障害のない大多数のアミノ酸を含む、実施形態2から28のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。 10

【0293】

実施形態30. 前記リンカーL1が、ポリグリシン、ポリアラニン、ポリ (Gly-Ala) またはポリ (Gly-Ser) を含む、実施形態2から29のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0294】

実施形態31. 前記リンカーL1が、配列 (Gly) 3、(Gly) 4 (配列番号196) または (Gly) 5 (配列番号197) を含む、実施形態30に記載の改変ポリペプチド。

【0295】

実施形態32. 前記リンカーL1が、配列 (Gly) 3Lys (Gly) 4 (配列番号131) ; (Gly) 3AsnGlySer (Gly) 2 (配列番号132) ; (Gly) 3Cys (Gly) 4 (配列番号133) ; またはGlyProAsnGlyGly (配列番号134) を含む、実施形態2から29のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。 20

【0296】

実施形態33. 前記リンカーL1が、GlyとAlaの組み合わせを含む、実施形態2から32のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0297】

実施形態34. 前記リンカーL1が、GlyとSerの組み合わせを含む、実施形態2から32のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0298】

実施形態35. 前記リンカーL1が、グリシンリッチペプチドから成る群より選択される、実施形態2から34のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。 30

【0299】

実施形態36. 前記リンカーL1が、N末端TGジペプチドを含む、実施形態2から35のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0300】

実施形態37. 前記リンカーL1が、C末端ASジペプチドを含む、実施形態2から36のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0301】

実施形態38. 前記リンカーL1が、N末端TGジペプチドおよびC末端ASジペプチドを含む、実施形態2から37のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。 40

【0302】

実施形態39. 前記リンカーL1が、TG- (GGGS) 1 (配列番号198)、TG- (GGGS) 2 (配列番号199)、TG (GGGS) 3 (配列番号200)、TG- (GGGS) 4 (配列番号201)、TG- (GGGS) 5 (配列番号202)、(GGGS) 1-AS (配列番号203)、(GGGS) 2-AS (配列番号204)、(GGGS) 3-AS (配列番号205)、(GGGS) 4-AS (配列番号206)、(GGGS) 5-AS (配列番号207)、TG- (GGGS) 1-AS (配列番号208)、TG- (GGGS) 2-AS (配列番号209)、TG- (GGGS) 3-AS (配列番号210)、TG (GGGS) 4-AS (配列番号211) およびTG- (GGGS) 5-AS (配列番号212) から成る群より選択された配列を含む、実施形態2から38のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。 50

【0303】

実施形態40. 前記リンカーL1 TGジペプチドまたはASジペプチドが、不存在である、またはT、A、SおよびGから選択された一対のアミノ酸によって置換されている、実施形態39に記載の改変ポリペプチド。

【0304】

実施形態41. 約10-6mol/L未満の解離定数で血清アルブミンに結合する、実施形態1から40のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0305】

実施形態42. 約10-9mol/L未満の解離定数で血清アルブミンに結合する、実施形態41に記載の改変ポリペプチド。

10

【0306】

実施形態43. 約10-12mol/L未満の解離定数で血清アルブミンに結合する、実施形態42に記載の改変ポリペプチド。

【0307】

実施形態44. 少なくとも1日の作用持続時間を有する、実施形態1から43のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0308】

実施形態45. 少なくとも3日の作用持続時間を有する、実施形態44に記載の改変ポリペプチド。

【0309】

20

実施形態46. 少なくとも6日の作用持続時間を有する、実施形態45に記載の改変ポリペプチド。

【0310】

実施形態47. ヒト対象において少なくとも6日の作用持続時間を有する、実施形態1から46のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0311】

実施形態48. (配列番号40)、(配列番号41)、(配列番号42)、(配列番号43)、(配列番号51)、(配列番号163)、(配列番号99)、(配列番号169)、(配列番号170)、(配列番号95)、(配列番号97)、(配列番号96)、(配列番号55)、(配列番号53)、(配列番号62)、(配列番号67)、(配列番号166)、(配列番号167)、(配列番号51)、(配列番号52)、(配列番号53)、(配列番号54)、(配列番号55)、(配列番号56)、(配列番号57)、(配列番号58)、(配列番号59)、(配列番号60)、(配列番号61)、(配列番号62)、(配列番号63)、(配列番号64)、(配列番号65)、(配列番号66)、(配列番号67)、(配列番号68)、(配列番号70)、(配列番号71)、(配列番号72)、(配列番号73)、(配列番号74)、(配列番号75)、(配列番号76)、(配列番号77)、(配列番号78)、(配列番号79)、(配列番号80)、(配列番号81)、(配列番号82)、(配列番号83)、(配列番号84)、(配列番号85)、(配列番号86)、(配列番号87)、(配列番号88)、(配列番号89)、(配列番号90)、(配列番号91)、(配列番号92)、(配列番号93)、(配列番号94)、(配列番号95)、(配列番号96)、(配列番号97)、(配列番号98)、(配列番号99)、(配列番号100)、(配列番号101)、(配列番号102)、(配列番号103)、(配列番号104)、(配列番号105)、(配列番号106)、(配列番号107)、(配列番号108)または(配列番号109)を含む、実施形態1から47のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

30

40

【0312】

実施形態49. (配列番号40)、(配列番号41)、(配列番号42)、(配列番号43)、(配列番号51)、(配列番号163)、(配列番号99)、(配列番号169)、(配列番号170)、(配列番号95)、(配列番号97)、(配列番号96)、(配列番号55)、(配列番号53)、(配列番号62)、(配列番号67)、(配列番号166)または(配列番号167)を含む、実施形態1から47のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0313】

50

実施形態50. (配列番号40)、(配列番号41)、(配列番号42)、(配列番号43)、(配列番号51)、(配列番号163)、(配列番号99)、(配列番号169)、(配列番号170)、(配列番号 95)、(配列番号 97)、(配列番号 96)または(配列番号55)を含む、実施形態1から47のいずれか一つに記載の改変ポリペプチド。

【0314】

実施形態51. 対象の疾患または障害を処置するための方法であって、実施形態1-50のいずれか一つに記載の改変ポリペプチドを、該疾患または障害の処置に有効な量で、それを必要とする対象に投与することを含む方法。

【0315】

実施形態52. 前記疾患または障害が、糖尿病、過体重、肥満、アルツハイマー病、短腸症候群、脂肪性肝疾患、脂質異常症、冠動脈疾患、卒中、高脂血症またはパーキンソン病である、実施形態51に記載の方法。

10

【0316】

実施形態53. 前記疾患または障害が、糖尿病、過体重、肥満、短腸症候群またはパーキンソン病である、実施形態52に記載の方法。

【0317】

実施形態54. 前記疾患または障害が、I型糖尿病、II型糖尿病または糖尿病前症である、実施形態53に記載の方法。

【0318】

実施形態55. 前記疾患または障害が、II型糖尿病である、実施形態52に記載の方法。

20

【0319】

実施形態56. 前記疾患または障害が、脂質異常症または高脂血症である、実施形態52に記載の方法。

【0320】

実施形態57. かかる処置を必要とする前記対象が肥満である、実施形態52に記載の方法。

【0321】

実施形態58. 実施形態1-50のいずれか一つに記載の改変ポリペプチドと医薬的に許容され得る賦形剤とを含む医薬組成物。

【0322】

30

実施形態59. 経口医薬組成物である、実施形態58に記載の医薬組成物。

【0323】

実施形態60. 持続放出性または長期持続性医薬組成物である、実施形態58から59のいずれか一つに記載の医薬組成物。

【0324】

実施形態61. 1日1回用医薬組成物である、実施形態58から60のいずれか一つに記載の医薬組成物。

【0325】

実施形態62. 1日2回用医薬組成物である、実施形態58から60のいずれか一つに記載の医薬組成物。

40

【0326】

実施形態63. 週1回用医薬組成物である、実施形態58から60のいずれか一つに記載の医薬組成物。

【0327】

実施形態64. 対象の疾患または障害を処置するための、実施形態58から63のいずれか一つに記載の医薬組成物。

【0328】

実施形態65. 前記疾患または障害が、糖尿病、過体重、肥満、アルツハイマー病、脂肪性肝疾患、短腸症候群、脂質異常症、冠動脈疾患、卒中、高脂血症またはパーキンソン病である、実施形態64に記載の医薬組成物。

50

【0329】

実施形態66. 前記疾患または障害が、糖尿病、過体重、肥満、短腸症候群またはパーキンソン病である、実施形態65に記載の医薬組成物。

【0330】

実施形態67. 前記疾患または障害が、I型糖尿病、II型糖尿病または糖尿病前症である、実施形態66に記載の医薬組成物。

【0331】

実施形態68. 週1回の投与を規定する、実施形態1から67のいずれか一つに記載の改変ポリペプチドまたは医薬組成物。

【0332】

実施形態69. 1日1回の投与を規定する、実施形態1から67のいずれか一つに記載の改変ポリペプチドまたは医薬組成物。

【0333】

実施形態70. 1日2回の投与を規定する、実施形態1から67のいずれか一つに記載の改変ポリペプチドまたは医薬組成物。

【0334】

実施形態71. 前記改変ポリペプチドが、(配列番号40)、(配列番号41)、(配列番号42)、(配列番号43)、(配列番号51)、(配列番号163)、(配列番号99)、(配列番号169)、(配列番号170)、(配列番号 95)、(配列番号 97)、(配列番号 96)、(配列番号55)、(配列番号53)、(配列番号62)、(配列番号67)、(配列番号166)、(配列番号167)、(配列番号51)、(配列番号52)、(配列番号53)、(配列番号54)、(配列番号55)、(配列番号56)、(配列番号57)、(配列番号58)、(配列番号59)、(配列番号60)、(配列番号61)、(配列番号62)、(配列番号63)、(配列番号64)、(配列番号65)、(配列番号66)、(配列番号67)、(配列番号68)、(配列番号70)、(配列番号71)、(配列番号72)、(配列番号73)、(配列番号74)、(配列番号75)、(配列番号76)、(配列番号77)、(配列番号78)、(配列番号79)、(配列番号80)、(配列番号81)、(配列番号82)、(配列番号83)、(配列番号84)、(配列番号85)、(配列番号86)、(配列番号87)、(配列番号88)、(配列番号89)、(配列番号90)、(配列番号91)、(配列番号92)、(配列番号93)、(配列番号94)、(配列番号95)、(配列番号96)、(配列番号97)、(配列番号98)、(配列番号99)、(配列番号100)、(配列番号101)、(配列番号102)、(配列番号103)、(配列番号104)、(配列番号105)、(配列番号106)、(配列番号107)、(配列番号108)または(配列番号109)を含む、実施形態58から70のいずれか一つに記載の医薬組成物。

【0335】

実施形態72. 前記改変ポリペプチドが、(配列番号40)、(配列番号41)、(配列番号42)、(配列番号43)、(配列番号51)、(配列番号163)、(配列番号99)、(配列番号169)、(配列番号170)、(配列番号 95)、(配列番号 97)、(配列番号 96)、(配列番号55)、(配列番号53)、(配列番号62)、(配列番号67)、(配列番号166)または(配列番号167)を含む、実施形態58から71のいずれか一つに記載の医薬組成物。

【0336】

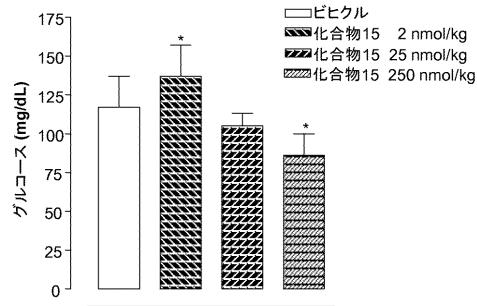
実施形態73. 前記改変ポリペプチドが、(配列番号40)、(配列番号41)、(配列番号42)、(配列番号43)、(配列番号51)、(配列番号163)、(配列番号99)、(配列番号169)、(配列番号170)、(配列番号 95)、(配列番号 97)、(配列番号 96)または(配列番号55)を含む、実施形態58から71のいずれか一つに記載の医薬組成物。

【0337】

実施形態74. 前記改変ポリペプチドが、(配列番号95)の配列を含む、請求項58から67のいずれか一項に記載の医薬組成物。

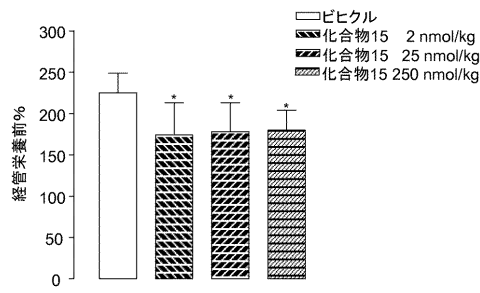
【図 1 A】

Fig. 1A.



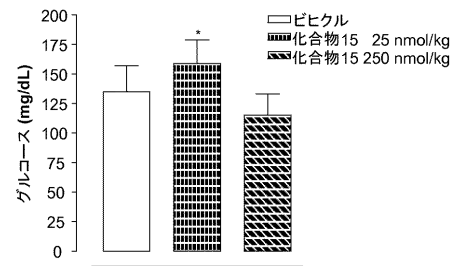
【図 1 B】

Fig. 1B



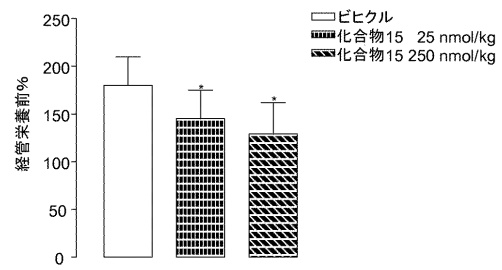
【図 2 A】

Fig. 2A.



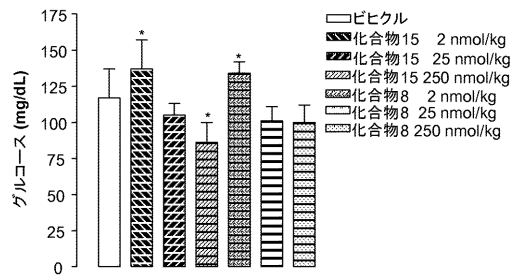
【図 2 B】

Fig. 2B.



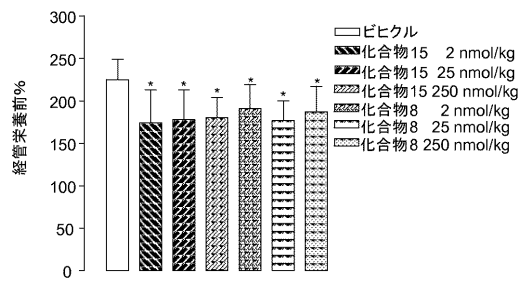
【図 3 A】

Fig. 3A.



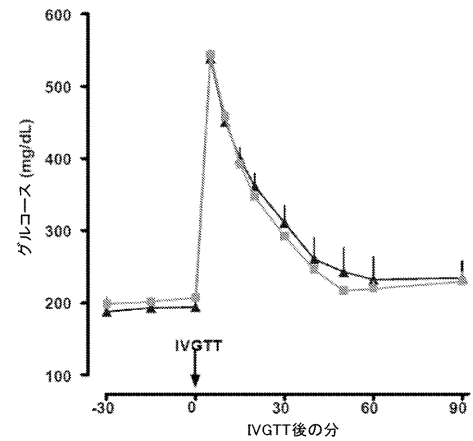
【図 3 B】

Fig. 3B.



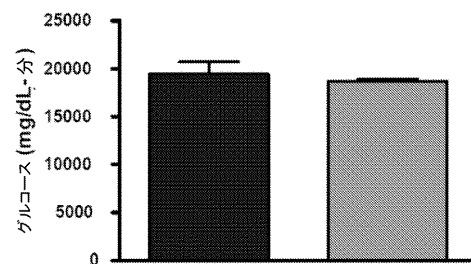
【図 4 A】

Fig. 4A.



【図 4 B】

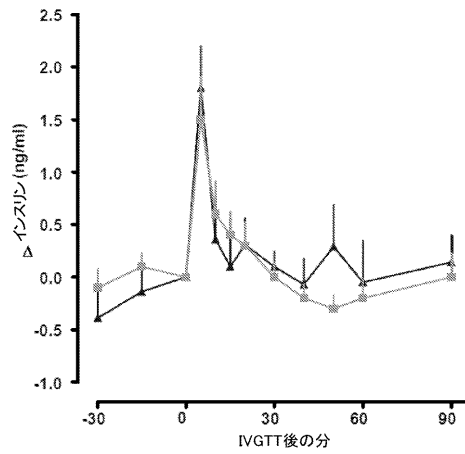
Fig. 4B



* Vehicle control group P < 0.05

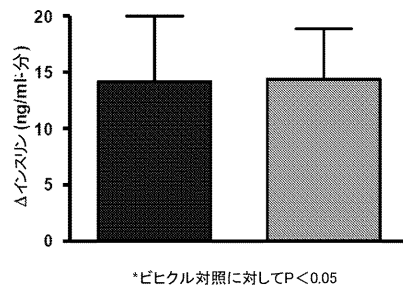
【図 4 C】

Fig. 4C.



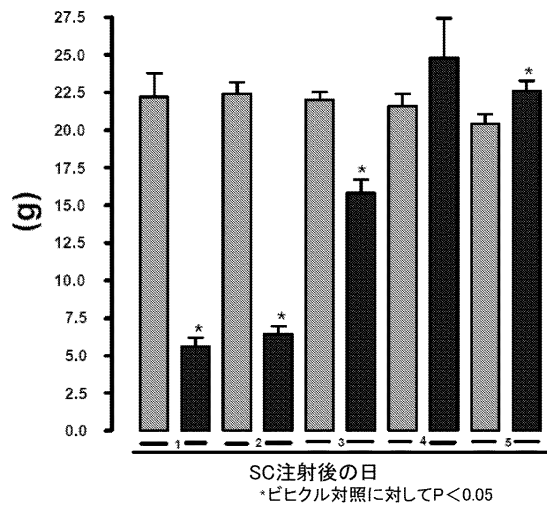
【図 4 D】

Fig. 4D.



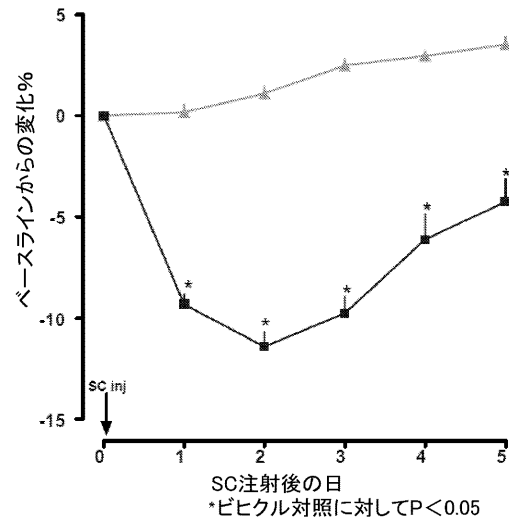
【図 4 F】

Fig. 4F.



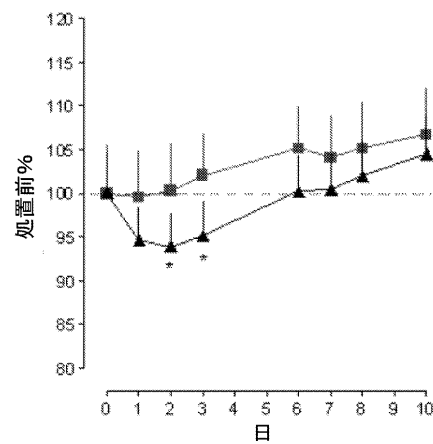
【図 4 E】

Fig. 4E.



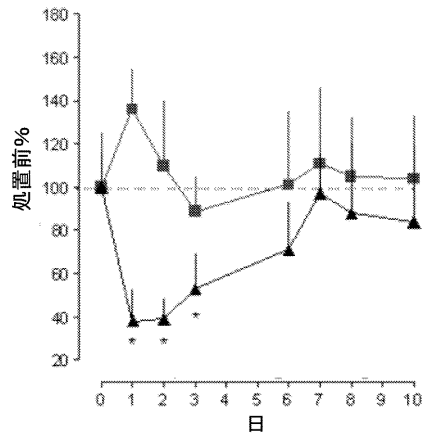
【図 5 A】

Fig. 5A.



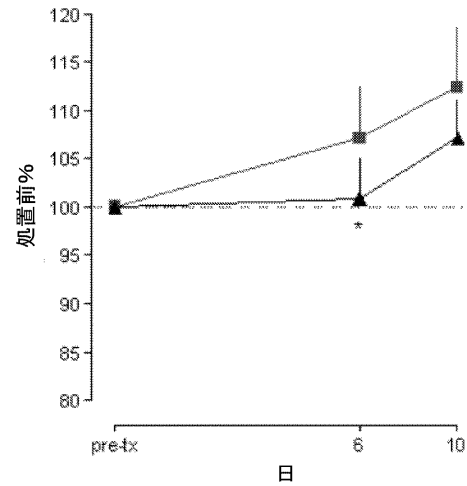
【図 5 B】

Fig. 5B.



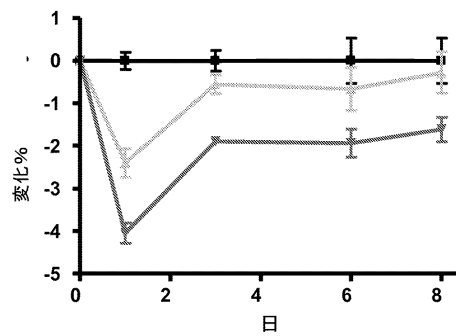
【図 5 C】

Fig. 5C.



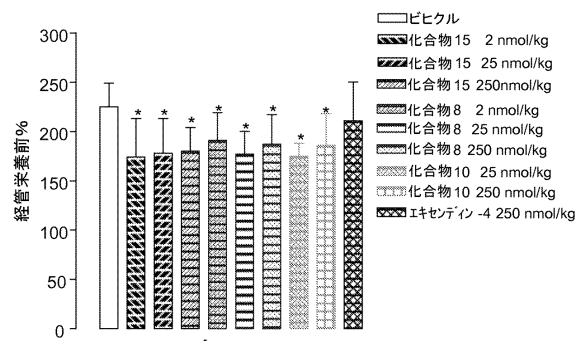
【図 6 A】

Fig. 6A



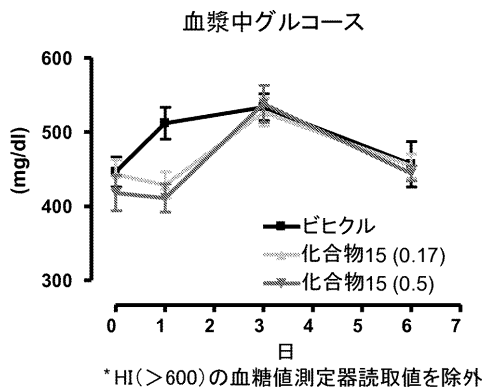
【図 7】

Fig. 7



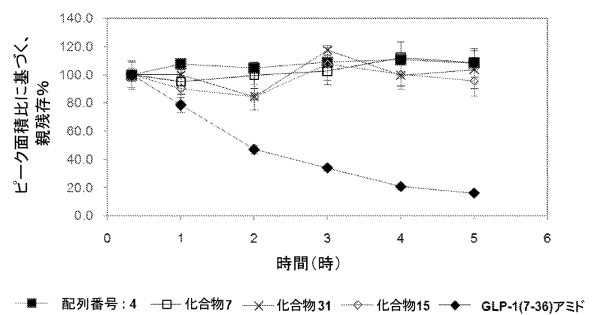
【図 6 B】

Fig. 6B.



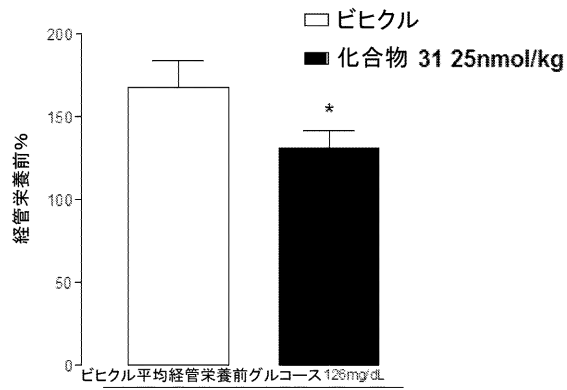
【図 8】

Fig. 8



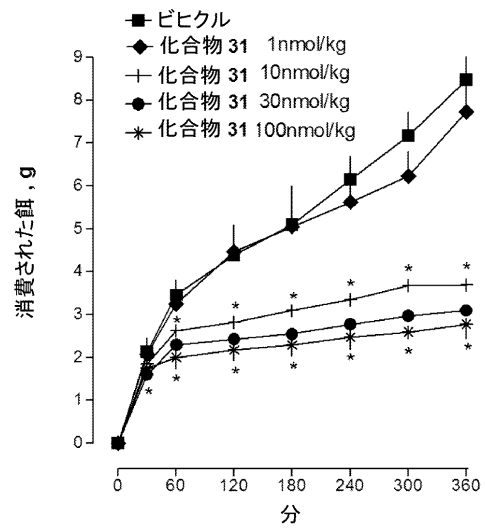
【図 9】

Fig. 9



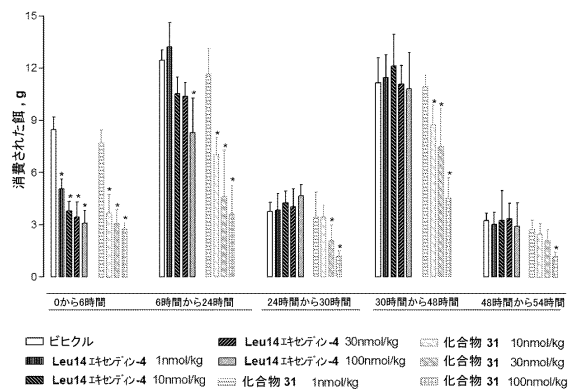
【図 10 A】

Fig. 10A



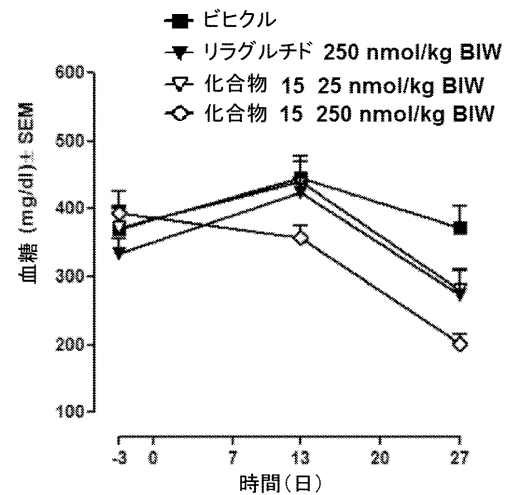
【図 10 B】

Fig 10B



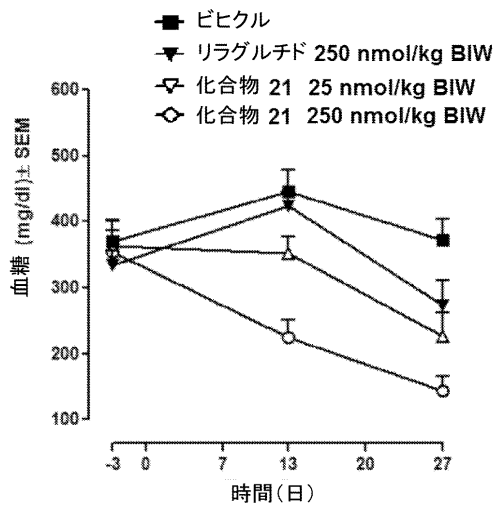
【図 11 A】

Fig. 11A



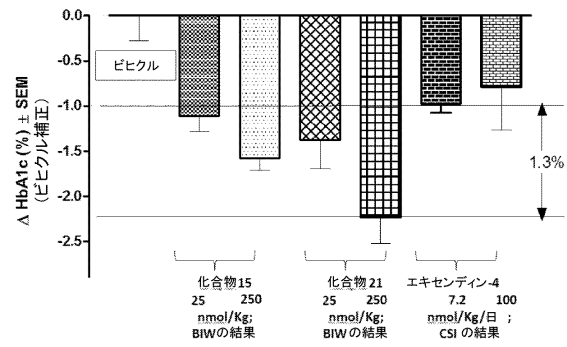
【図 1 1 B】

Fig. 11B



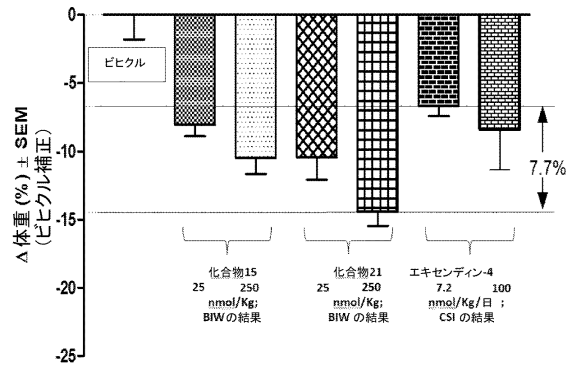
【図 1 1 C】

Fig. 11C



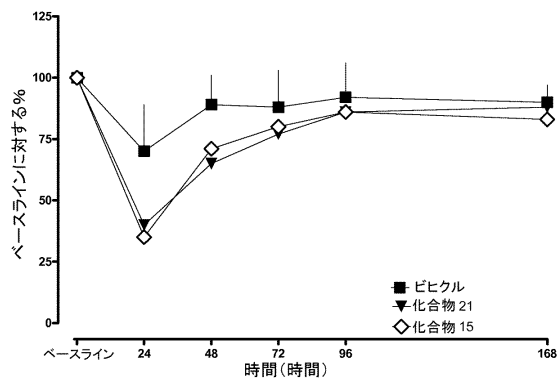
【図 1 1 D】

Fig. 11D



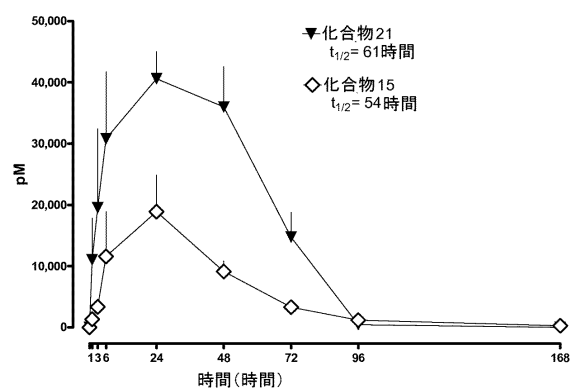
【図 1 2 A】

Fig. 12A



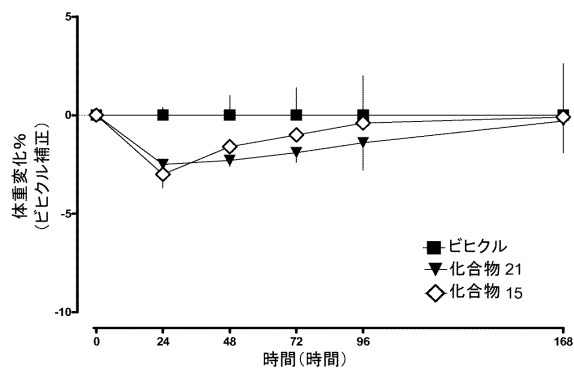
【図 1 2 C】

Fig. 12C



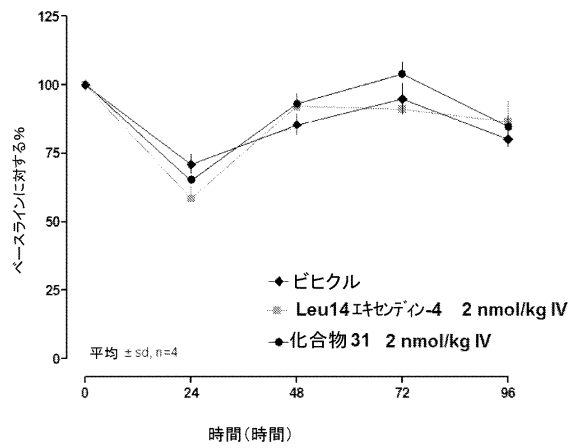
【図 1 2 B】

Fig. 12B



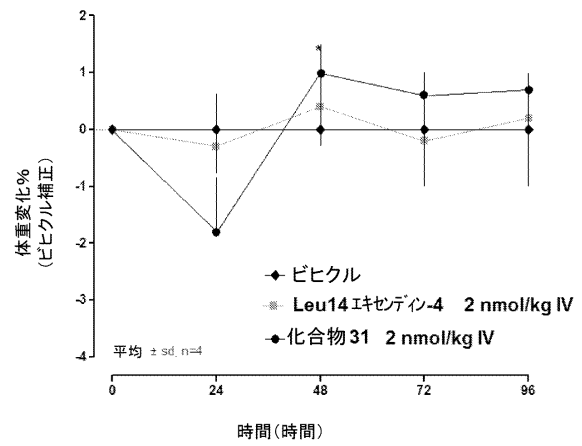
【図 1 3 A】

Fig. 13A



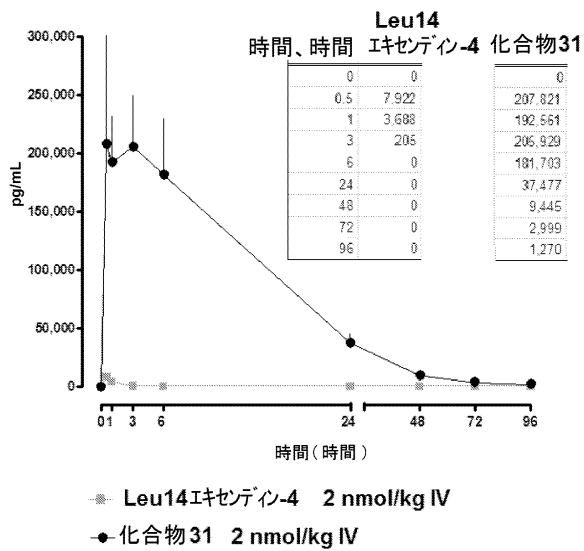
【図 1 3 B】

Fig. 13B



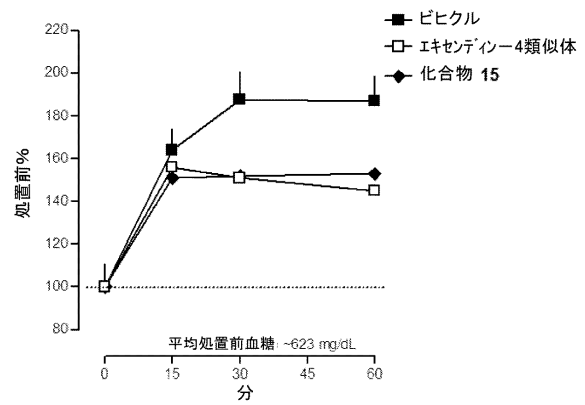
【図 1 3 C】

Fig. 13C



【図 1 4】

Fig. 14



【配列表】

0006121330000001.app

フロントページの続き

- | | |
|-------------------------|---------------|
| (51)Int.Cl. | F I |
| A 6 1 K 38/22 (2006.01) | A 6 1 K 37/24 |
| A 6 1 P 3/10 (2006.01) | A 6 1 P 3/10 |
| A 6 1 P 3/04 (2006.01) | A 6 1 P 3/04 |
| A 6 1 P 25/28 (2006.01) | A 6 1 P 25/28 |
| A 6 1 P 1/16 (2006.01) | A 6 1 P 1/16 |
| A 6 1 P 3/06 (2006.01) | A 6 1 P 3/06 |
| A 6 1 P 9/10 (2006.01) | A 6 1 P 9/10 |
| A 6 1 P 9/00 (2006.01) | A 6 1 P 9/00 |
| A 6 1 P 25/16 (2006.01) | A 6 1 P 25/16 |
- (74)代理人 100081422
弁理士 田中 光雄
- (74)代理人 100084146
弁理士 山崎 宏
- (74)代理人 100156122
弁理士 佐藤 剛
- (72)発明者 メアリー・エリクソン
アメリカ合衆国 9 2 1 2 1 カリフォルニア州サンディエゴ、タウン・センター・ドライブ 9 3 6 0 番、アミリン・ファーマシューティカルズ・リミテッド・ライアビリティ・カンパニー、リーガル・デパートメント内
- (72)発明者 デイビッド・シー・リッツィンガー
アメリカ合衆国 9 2 1 2 1 カリフォルニア州サンディエゴ、タウン・センター・ドライブ 9 3 6 0 番、アミリン・ファーマシューティカルズ・リミテッド・ライアビリティ・カンパニー、リーガル・デパートメント内
- (72)発明者 スーミトラ・エス・ゴッシュ
アメリカ合衆国 9 2 1 2 1 カリフォルニア州サンディエゴ、タウン・センター・ドライブ 9 3 6 0 番、アミリン・ファーマシューティカルズ・リミテッド・ライアビリティ・カンパニー、リーガル・デパートメント内
- (72)発明者 ジジエン・グオ
アメリカ合衆国 9 2 1 2 1 カリフォルニア州サンディエゴ、タウン・センター・ドライブ 9 3 6 0 番、アミリン・ファーマシューティカルズ・リミテッド・ライアビリティ・カンパニー、リーガル・デパートメント内
- (72)発明者 スウェタ・ネラヴェトラ
アメリカ合衆国 9 2 1 2 1 カリフォルニア州サンディエゴ、タウン・センター・ドライブ 9 3 6 0 番、アミリン・ファーマシューティカルズ・リミテッド・ライアビリティ・カンパニー、リーガル・デパートメント内
- (72)発明者 チェンジャオ・スン
アメリカ合衆国 9 2 1 2 1 カリフォルニア州サンディエゴ、タウン・センター・ドライブ 9 3 6 0 番、アミリン・ファーマシューティカルズ・リミテッド・ライアビリティ・カンパニー、リーガル・デパートメント内
- (72)発明者 マノジ・ピー・サマント
アメリカ合衆国 9 2 1 2 1 カリフォルニア州サンディエゴ、タウン・センター・ドライブ 9 3 6 0 番、アミリン・ファーマシューティカルズ・リミテッド・ライアビリティ・カンパニー、リーガル・デパートメント内
- (72)発明者 アブヒナンディニ・シャルマ
アメリカ合衆国 9 2 1 2 1 カリフォルニア州サンディエゴ、タウン・センター・ドライブ 9 3 6 0 番、アミリン・ファーマシューティカルズ・リミテッド・ライアビリティ・カンパニー、リーガル

- ・デパートメント内
- (72)発明者 クリストファー・ジェイ・ソアレス
アメリカ合衆国92121カリフォルニア州サンディエゴ、タウン・センター・ドライブ9360
番、アミリン・ファーマシューティカルズ・リミテッド・ライアビリティ・カンパニー、リーガル
・デパートメント内
- (72)発明者 オディール・イー・レビー
アメリカ合衆国92121カリフォルニア州サンディエゴ、タウン・センター・ドライブ9360
番、アミリン・ファーマシューティカルズ・リミテッド・ライアビリティ・カンパニー、リーガル
・デパートメント内
- (72)発明者 ララ・マメドバ
アメリカ合衆国92121カリフォルニア州サンディエゴ、タウン・センター・ドライブ9360
番、アミリン・ファーマシューティカルズ・リミテッド・ライアビリティ・カンパニー、リーガル
・デパートメント内

審査官 中村 勇介

- (56)参考文献 国際公開第2009/121804 (WO, A1)
国際公開第2010/094722 (WO, A1)
特表2009-545301 (JP, A)
特表2009-517476 (JP, A)
国際公開第2009/016043 (WO, A1)
国際公開第2010/054699 (WO, A1)
Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 2010 Jul, 49(29), pp.4930-4933

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C07K 1/00-19/00
C12N15/00-15/90
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)