

(19)日本国特許庁(JP)

**(12)特許公報(B2)**

(11)特許番号  
**特許第7093311号**  
**(P7093311)**

(45)発行日 令和4年6月29日(2022.6.29)

(24)登録日 令和4年6月21日(2022.6.21)

(51)国際特許分類

C 0 7 K	14/56 (2006.01)	F I	C 0 7 K	14/56	Z N A
A 6 1 P	31/12 (2006.01)		A 6 1 P	31/12	1 7 1
A 6 1 P	31/16 (2006.01)		A 6 1 P	31/16	
A 6 1 P	31/14 (2006.01)		A 6 1 P	31/14	
A 6 1 K	47/60 (2017.01)		A 6 1 K	47/60	

請求項の数 28 (全21頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-566519(P2018-566519)  
 (86)(22)出願日 平成29年6月16日(2017.6.16)  
 (65)公表番号 特表2019-519553(P2019-519553  
 A)  
 (43)公表日 令和1年7月11日(2019.7.11)  
 (86)国際出願番号 PCT/US2017/037964  
 (87)国際公開番号 WO2017/222940  
 (87)国際公開日 平成29年12月28日(2017.12.28)  
 審査請求日 令和1年12月11日(2019.12.11)  
 (31)優先権主張番号 62/352,163  
 (32)優先日 平成28年6月20日(2016.6.20)  
 (33)優先権主張国・地域又は機関  
 米国(US)

(73)特許権者 516001834  
 エランコ・ユース・インコーポレイテッド  
 E l a n c o U S I n c .  
 アメリカ合衆国4 6 1 4 0 インディアナ  
 州グリーンフィールド、イノベーション  
 ・ウェイ2 5 0 0 番  
 (73)特許権者 508048481  
 アンブルックス、インコーポレイテッド  
 A m b r x , I n c .  
 アメリカ合衆国, 9 2 0 3 7 カリフォ  
 ルニア州, ラホーヤ, スイート 1 0 0  
 , ノース トーレイ パインス ロード 1  
 0 9 7 5  
 1 0 9 7 5 N o r t h T o r r e y  
 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ペグ化ブタインターフェロンおよびその使用方法

**(57)【特許請求の範囲】****【請求項1】****【表1】**

X<sub>a</sub>X<sub>b</sub>CDLPQTHSLAHLTRALRLLAQMRRIISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKAQAMALVHEMLQQTFQ  
 LFSTEGSAAWNESLLHQFYTG LDQQLRDLEACVMQEAGLEGTPLEEDSIRAVRKYFHRLTLYLQEKS  
 YSPCAWEIVRAEVMRSSRFSSSRNLQDRLRKKE (配列番号: 1)

を含む、ブタインターフェロン- (pINF-)変異体であって、  
 X<sub>a</sub>X<sub>b</sub>が不在、プロリン及びプロリン-セリンジペプチドからなる群から選択され、  
 残基E103、E107、L112、Y136、またはQ102(配列番号: 4に対する番号付け)が合成  
 アミノ酸で置換され、

合成アミノ酸がペグ化される、ブタインターフェロン- (pINF-)変異体。

**【請求項2】**

合成アミノ酸が、パラアセチルフェニルアラニン(pAF)である、請求項1に記載のpINF-  
 变異体。

**【請求項3】**

变異体が、配列番号: 7からなる、請求項1に記載のpINF- 变異体。

**【請求項 4】**

変異体が、配列番号：10からなる、請求項1に記載のpINF- 变異体。

**【請求項 5】**

変異体が、配列番号：13からなる、請求項1に記載のpINF- 变異体。

**【請求項 6】**

変異体が、配列番号：16からなる、請求項1に記載のpINF- 变異体。

**【請求項 7】**

変異体が、配列番号：19からなる、請求項1に記載のpINF- 变異体。

**【請求項 8】**

変異体が、配列番号：8からなる、請求項1に記載のpINF- 变異体。

10

**【請求項 9】**

変異体が、配列番号：11からなる、請求項1に記載のpINF- 变異体。

**【請求項 10】**

変異体が、配列番号：14からなる、請求項1に記載のpINF- 变異体。

**【請求項 11】**

変異体が、配列番号：17からなる、請求項1に記載のpINF- 变異体。

**【請求項 12】**

変異体が、配列番号：20からなる、請求項1に記載のpINF- 变異体。

**【請求項 13】**

ペグ化pINF- 变異体が、5kDa ~ 40kDaのPEGでペグ化される、請求項1 ~ 12のいずれかに記載のpINF- 变異体。

20

**【請求項 14】**

PEGが、30kDaのPEGである、請求項13に記載のpINF- 变異体。

**【請求項 15】****【表 2】**

PSCDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRI SPF SCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKAQAMALVHEMLQQTFQL  
FSTEGSAAWNESLLHQFYTG LDQQLRDLEACVMQEAGL-pAF-

GTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTLYLQEKS YSPCAWEIVRAEV MRSFSSSRNLQDRLRKKE (配列番号

30

: 14)

からなる、ブタインターフェロン- (pINF- )变異体であって、  
E107(配列番号：4に対する番号付け)に対応する残基が、パラアセチルフェニルアラニン(pAF)で置換され、該pAF残基が、30kDaの直鎖状PEGでペグ化される、ブタインターフェロン- (pINF- )变異体。

**【請求項 16】**

請求項1 ~ 15のいずれかに記載のpINF- 变異体を含む製剤であって、さらに20mMの酢酸ナトリウム、100mMの塩化ナトリウム及び5%のグリセロールをpH5.0で含み、2.0 ~ 6.0g/Lの力価のpINF- 变異体を含む、製剤。

40

**【請求項 17】**

請求項1に記載のpINF- 变異体を製造する方法であって、

以下の工程：

(a)pINF- を精製する工程；

(b)精製pINF- 变異体を、pH8にて、50mM Tris、6Mゲアニジンに可溶化する工程；

(c)可溶化pINF- A变異体を、pH8にて、20mM Tris、1Mアルギニン、10mMメチオニン(met)、1mM EDTA中、室温にて16-24時間インキュベートする工程；

(d)残留アセチル化变異体を除去する工程；

(e)pINF- 变異体を、1：1 ~ 1：2のPEG：タンパク質比にてPEGでコンジュゲートさせ

50

る工程；および

(f)ペグ化pINF- 変異体を精製する工程；

を含む方法。

【請求項 18】

それを必要とするブタに、請求項 1～15 のいずれかに記載のpINF- 変異体を皮下投与することを含む、ブタのウイルス感染を予防または治療する方法。

【請求項 19】

pINF- 変異体が、動物の体重kg当たり $25 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 150 \mu\text{g}/\text{kg}$ の範囲で投与される、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

動物の体重kg当たり $25 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 150 \mu\text{g}/\text{kg}$ のpINF- 変異体の第二の投与を含む、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

第二の投与が、第一の投与の7～14日後である、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

ウイルス感染が、ブタ生殖器および呼吸器疾患ウイルス、口蹄疫ウイルス、ブタインフルエンザウイルス、ブタサーコウイルス、ブタ流行性下痢ウイルスおよび伝染性胃腸炎ウイルスからなる群から選択される、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 23】

ブタが、新生ブタであるか、または妊娠中のブタである、請求項 18～22 のいずれかに記載の方法。

【請求項 24】

請求項 16 に記載の製剤を含有する複数回投与用バイアル。

【請求項 25】

ウイルス感染を治療するためのブタにおける療法における、請求項 1～15 のいずれかに記載のpINF- 変異体の使用。

【請求項 26】

ブタにおけるウイルス感染を治療するための、請求項 16 に記載の製剤または請求項 1～15 のいずれかに記載のpINF- 変異体の使用。

【請求項 27】

ブタにおけるウイルス感染を治療するための医薬の製造における使用のための、請求項 16 に記載の製剤または請求項 1～15 のいずれかに記載のpINF- 変異体の使用。

【請求項 28】

ブタが、新生ブタまたは妊娠中のブタである、請求項 26 または 27 のいずれかに記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、EFS-Web を介してASCIIフォーマットで提出された配列表を含み、その全体が参考により本明細書に組み入れられる。2017年6月15日に作成された前述のASCIIコピーの名前は、204257\_0028\_561478\_SL\_ST25.txtであり、サイズは45,280バイトである。

【背景技術】

【0002】

インターフェロンアルファ(INF-)を投与することは、評価され管理される必要がある医学的後遺症を有する。たとえば、自己免疫は、ヒトの慢性ウイルス性肝炎に対するINF-療法によっても引き起こされる可能性がある。したがって、治療は既存の自己免疫を悪化させ、無症候性の自己免疫プロセスを顕にするか、または新たな自己免疫疾患を誘発することさえありうるので、一般にヒトの治療は、治療を必要とする患者に限定されてきた。F.L. Dumoulinら、“Autoimmunity induced by interferon- therapy for chronic

10

20

30

40

50

viral hepatitis," Biomed. & Pharmacother., 53 : 242-54(1999)。インターフェロンは、ヒトのC型肝炎ウイルス感染の治療に失敗したことも観察されている。

#### 【0003】

インターフェロンは、いくつかのヒトC型肝炎ウイルス(HCV)を治療するのに有効であると見られており、2つのペグ化型のインターフェロンアルファ((INF-))、すなわち、それPEGASYS(登録商標)およびPEGINTRON(登録商標)としても知られるペグインターフェロン- -2aおよびペグインターフェロン- -2bが、現在ヒトに対して臨床的に使用されている。それにもかかわらず、INF- がどのようにHCV複製を阻害するのかは不明でのまある。さらに興味深いことに、ペグインターフェロン- -2aおよびペグインターフェロン- -2bは、それらの天然(野生型)形態と比較して、それぞれ7%および28%の活性しか示さない。

10

#### 【0004】

インターフェロンを製造する過程において、バイオアベイラビリティを拡張し、タンパク質産生を補佐するヒトの治療のために、さまざまな変異体が創製されてきた。1つの例は、米国特許第8,106,160号に記載され、これは、非天然ジスルフィド結合の形成を減少させ、それによって構造アイソフォームのレベルを低下させるための、成熟ヒトインターフェロンアルファ-2bのN末端システインへの1つ以上のアミノ酸残基の付加を論じている。これは、N末端にプロリン残基を付加することを含む。

20

#### 【0005】

タンパク質のサイトに挿入された非天然アミノ酸を導入する方法は、たとえば、国際公開第2010/011735号および国際公開第2005/074650号に記載されている。

#### 【0006】

野生型ブタインターフェロンアルファ-1は、189アミノ酸の長さであり、GenBank X57191に位置する。

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0007】

動物や畜産に使用するためのインターフェロン- の形態が、特にウイルス感染しやすい豚集団の治療において、さらにより具体的には、豚集団をウイルス感染に伴う病状から保護するための、活発で進行中のウイルス感染を有する豚集団の治療において必要である。利益は、長期的に作用し、ウイルス複製、群れの病理およびウイルス感染に関連する動物の死を抑制または低減するのに有用である、ブタ動物に使用するためのIFN- 变異体の発見であろう。該ブタIFN- 变異体は生物活性を維持し、より長いバイオアベイラビリティを有し、そしてより簡単な精製を可能にするアイソフォームをほとんど有さないであろう。

30

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0008】

【図1】プロリン-セリンN末端挿入を含む、pIFN- -PS-E107アンバーを有するプラスミドpKG0083を示す。このプラスミドは、AXID2820細胞株による配列番号：14のタンパク質変異体の產生を指示する。

【図2】残基Q102、E103、E107、L112、およびY136を置換された合成アミノ酸pAFを有するpINF- 变異体の配列アラインメントおよび配列識別子を示す。これらの配列は全てpINF- に対するシグナル配列を欠いている。配列は、N末端にアミノ酸が付加されていない(配列番号：6、9、12、15、および18)か、あるいはN末端に付加されたプロリン(配列番号：7、10、13、16、および19)またはプロリン-セリン(配列番号：8、11、14、17、および20)を有するかのいずれかである。

40

【図3】配列番号：1のモチーフ配列を示す。配列番号：2は、配列番号：1と同じであるが、成熟pIFN- 变異体の成熟時に通常切断されるN末端メチオニンを含む。配列番号：3はシグナル配列を含むが、プロリン、プロリン-セリン、および/またはメチオニンの挿入を欠いている。配列番号：4は、野生型成熟pIFN- である。配列番号：5は、N末端にメチオニンを有する野生型である。

50

【図4】位置X<sub>a</sub>およびX<sub>b</sub>に示されるように、付加残基を有さないか、またはN末端に付加されたプロリンもしくはプロリン-セリンを有するかのいずれかであるQ102、E103、E107、L112、および136のさまざまなpIFN- 变異体変異体を表に示す。「abs」は存在しないことを意味する。参照として配列番号：1を示す。

【図5】pAFが、H7、R34、およびH40で置換されている、3つのさらなるpIFN- 变異体についての配列アラインメントを示す。これらの配列は、N末端にプロリンまたはプロリン-セリンを有さないか、またはN末端メチオニンを有する。突然変異のサイトは、表の上のWT pIFN-アルファ配列において四角囲みによって示され、表中、それらは、四角で囲まれた「X」によって示される。X<sub>a</sub>およびX<sub>b</sub>は、チャート中で定義される。「abs」は存在しないことを意味する。10

【図6】E107(四角で囲まれた「X」によって示される)で置換されたpAFを有するIFN-变異体のアミノ末端にセリン(配列番号：24)、セリン-グリシン(配列番号：25)、およびヒスチジン(配列番号：26)が付加される、さらなる合成E107突然変異を示す。X<sub>a</sub>およびX<sub>b</sub>は、チャート中で定義される。「abs」は存在しないことを意味する。

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0009】

本明細書は、ワクチン未接種の新生子ブタならびに免疫抑制動物、すなわち、妊娠中のブタ(妊娠中の雌ブタまたは未経産ブタ)などのワクチン接種されていない動物；予防接種が不十分な防御しか付与しない動物；有効なワクチンが入手できないウイルスによる感染を受けやすい動物；および現在感染している動物に使用することができるブタインターフェロン- (pINF-) 变異体およびその使用方法を提供する。これらの組成物および使用方法は、ウイルス発生という事実において感染を防ぐためのものであろう。組成物は、感染したブタの疾患の重症度を低下させるためにも使用することができる。一般に、単回投与計画が投与される。あるいは、そして必要に応じて、投与量は、約1～3週間、または2週間間隔で、最適には1～2回の投与量のみで、提供されうる。20

##### 【0010】

23残基のシグナル配列を含む野生型ブタインターフェロン- (pINF-) は：

##### 【表1】

```
maptsafltta lvvllscnaic slgcdlpqth slahtralrl laqmrrispf scldhrrdfg  
spheafgggnq vqkaqamalv hemlqqtfql fstegsaaaw nesllhqfct gldqqlrdle  
acvmqeagle gtplleedsi lavrkyfhrl tlylqeksys pcaweivrae vmrsfsssrn  
1qdr1rkke (配列番号：3)
```

30

である。

##### 【0011】

二重下線部は、成熟型の野生型pIFN- には存在しないシグナル配列である。

##### 【0012】

本明細書は、(pINF-) 变異体を提供する。変異体は、23アミノ酸シグナル配列を除外する。変異体は、アミノ末端にメチオニン残基を有することができ、これはタンパク質の成熟形態において切断することができる。このメチオニンは、野生型のpIFN- には存在しない。pIFN- 变異体はさらに、シグナル配列メチオニンとN末端システインとの間に1または2個のアミノ酸挿入を有する。挿入は、プロリンまたはプロリン-セリンのいずれかである。配列は、下記：40

40

50

## 【表2】

MX<sub>a</sub>X<sub>b</sub>CDLPQTHSLAHLTRALRLLAQMRRIISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKAQAMALVHEMLQQTF  
QLFSTEGSAAWNESLLHQFYTG LDQQLRDLEACVMQEAGLEGTPLEEDSIRAVRKYFHRLTLYLQEK  
SYSPCAWEIVRAEV MRSFSSSRNLQDRLRKKE (配列番号：2)

で示される。「X<sub>b</sub>」(配列番号：2の3位)は、プロリン、セリンまたは不在のいずれかである。X<sub>a</sub>(配列番号：2の2位)は、不在またはプロリンのいずれかである。X<sub>b</sub>が不在である場合、X<sub>a</sub>は不在であり、X<sub>b</sub>がプロリンである場合、X<sub>a</sub>は不在であり、X<sub>b</sub>がセリンである場合、X<sub>a</sub>はプロリンである。X<sub>a</sub>およびX<sub>b</sub>の下流に位置する太字のグルタミン酸残基「E」は、合成アミノ酸、すなわち、pAFの置換のサイトである。

## 【0013】

pINF- 変異体はさらに、配列番号：1の5つの位置：残基E103(それぞれ配列番号：9～11)、E107(それぞれ配列番号：12～14)、L112(それぞれ配列番号：15～17)、Y136(配列番号：18～20)、またはQ102(それぞれ配列番号：6～8)(番号付けは、N末端Metを有さない配列番号：4に示された配列に対するものである)の1つにおいて置換された合成アミノ酸であるパラアセチルフェニルアラニン(pAF)を有する。

## 【0014】

pINF- 変異体は、pAF上でさらにペグ化することができる。pINF- 変異体は、約5～約40kDaのPEG、または30kDaのPEGでペグ化することができる。pINF- 変異体は、直鎖状の30kDaのオキシアミノ-PEGでペグ化することができる。活性化オキシアミノ基は、パラアセチルフェニルアラニンなどの合成アミノ酸上に存在するアセチル側鎖と化学選択的に反応する。pINF- 変異体は、E107(配列番号：12～14)で置換されたpAFに共有結合した直鎖状の30kDaのPEGを有する(番号付けは、配列番号：4に示された配列に対するものである)。E107 pINF- 変異体は、それぞれ配列番号：13および14に反映されるように、N末端にプロリンまたはプロリンとセリンをさらに有する。

## 【0015】

pINF- 変異体を製剤に配合することができる。pINF- 変異体を含む製剤は、20mMの酢酸ナトリウム、100mMの塩化ナトリウム、5%のグリセロール、pH5.0で2.0～6.0g/Lの力価のブタINF- を含みうる。

## 【0016】

製剤は、以下の工程：

- (a)pINF- を精製する工程；
  - (b)精製pINF- 変異体を、pH8にて、50mM Tris、6Mグアニジンに可溶化する工程；
  - (c)可溶化pINF- A変異体を、pH8にて、20mM Tris、1Mアルギニン、10mMメチオニン(met)、1mM EDTA(エチレンジアミン四酢酸)中、室温にて16-24時間インキュベートして、タンパク質のリフォールディングを可能にする工程；
  - (d)残留アセチル化変異体を、強陰イオン交換樹脂上のクロマトグラフィー分割によって除去する工程；
  - (e)pINF- 変異体を、1：1～1：8または1：1～1：2のPEG：タンパク質比にてPEGでコンジュゲートさせる工程；および
  - (f)ペグ化pINF- 変異体を精製する工程；
- を含む方法によって製造することができる。

## 【0017】

pINF- 変異体およびその製剤は、ウイルス感染を治療するために使用することができる。ブタインターフェロン- (pINF-) 変異体のいずれかの25μg/kg～150μg/動物体重kgの量で、pINF- 変異体をブタに皮下投与することを含む、ブタにおけるウイルス感染を治療する方法。該方法は、約25μg/kg～約150μg/動物体重kgのpINF- A変異体の第2の投与をさらに含みうる。方法が2回目の投与を含む場合、2回目の投与は、1回目の投与

10

20

30

40

50

の約7、14、または21日後に起こりうる。

**【 0 0 1 8 】**

ウイルス感染を治療する方法は、ブタ生殖器および呼吸器系疾患ウイルス、口蹄疫ウイルス、ブタインフルエンザウイルス、ブタサーコウイルス、ブタ流行性下痢ウイルス、および伝染性胃腸炎ウイルスからなる群から選択されるウイルス感染を治療するために使用することができる。方法は、新生ブタまたは妊娠中のブタを治療するために使用することができる。

**【 0 0 1 9 】**

ウイルス感染を治療するためのブタにおける療法におけるpIFN- 変異体(またはその変異体を含む製剤)のいずれかの使用もまた企図され、ここで感染は本明細書で論じられるウイルスのいずれかによって引き起こされうる。

10

**【 0 0 2 0 】**

ブタにおけるウイルス感染を治療するための医薬の製造における使用のためのpINF- 変異体の使用もまた記載される。ブタは、新生ブタまたは妊娠中のブタでありうる。

**【 0 0 2 1 】**

「投与すること」は、治療有効量の開示された化合物および該化合物を含む組成物の注射を意味する。投与は、筋肉内(i.m)または皮下(s.c.)でありうる。投与されるpINF- 変異体変異体の量は、動物の体重に基づいて与えられ、たとえば、妊娠中のブタが新生ブタより多く投与される。

**【 0 0 2 2 】**

本明細書に開示される製剤はまた、単回投与または複数回投与用バイアルに入れることができる。

20

**【 0 0 2 3 】**

本明細書に記載の方法によって治療されるブタは、新生ブタ、または妊娠中のブタ(妊娠中の雌ブタまたは未経産ブタ)である。

**【 0 0 2 4 】**

「治療する」、「治療すること」、または「治療」とは、本明細書に記載のウイルスのうちの1つによる感染症に関連する1つ以上の症状を軽減または改善することを意味する。組成物はさらに、ブタのウイルス感染を治療するための医薬の製造に使用することができる。組成物または医薬は、ブタを治療するために使用することができる。ブタは、新生ブタまたは妊娠中のブタでありうる。

30

**【 0 0 2 5 】**

ここで、化合物、該化合物の製剤、該製剤の製造方法、ならびにウイルス感染しているブタ(pig)(porcineまたはswine)を治療するための該化合物および製剤の使用方法について詳細に言及する。

**【 0 0 2 6 】**

本明細書および添付の特許請求の範囲で使用されるように、単数形「a」、「an」および「the」は、文脈が明らかにそうでないことを示さない限り、複数形の言及を含み、複数形の使用法は、単数形の使用法も含むことができる。

40

**【 0 0 2 7 】**

「合成アミノ酸」とは、20種の一般的なアミノ酸の1つではないアミノ酸、またはピロリシンまたはセレノシステインを示す。そのような合成アミノ酸の例として、パラアセチルフェニルアラニン(pAF)、アセチルグルコサミニル-L-セリン、およびN-アセチルグルコサミニル-L-トレオニンが挙げられるが、これらに限定されない。そのような合成アミノ酸ならびにそれらの取り込みおよび修飾に関するさらなる詳細については、国際公開第2010/011735号および国際公開第2005/074650号を参照のこと。

**【 0 0 2 8 】**

本明細書で使用される「対象」という用語は、ブタ、特に家庭用ブタ(*Sus scrofa domesticus*または*Sus domesticus*)を示し、ミニブタおよび肉生産用に飼育された品種を含むことができる。「pig」、「swine」または「porcine」は、すべてのブタ品種を含むこと

50

を意味する。

【0029】

使用される「有効量」という用語は、感染した動物から未感染の動物へのブタウイルスの伝染を予防する、治療する、もしくは減少させるか、またはブタウイルスの感染によって引き起こされる病気の症状を軽減するであろう、投与されるpINF- 变異体の量を示す。本明細書は、ブタインターフェロンアルファ(pIFN-)变異体を開示する。これらの変異体は、ブタIFN- 配列上のさまざまな位置で置換されている合成アミノ酸を有している。以下に示すように、下線を引いたリーダー配列(配列番号：3の1-23残基)が除去される(アミノからカルボキシ末端方向)Sus scrofa domestica pIFN- 遺伝子(GenBank X5719 1)：

10

【表3】

MAPTSAFLTALVLLSCNAICSLGCDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGN  
QVQKAQAMALVHEMLQQTFQLFSTEGSAAWNESLLHQFYTG LDQQLRDLEACVMQEAGLEGTPPLLEED  
SIRAVRKYFHRLTLYLQEKSYSPCAWEIVRAEV MRSFSSSRNLQDRLRKKE (配列番号：3)

【0030】

成熟配列は、

【表4】

20

CDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKAQAMALVHEMLQQTFQLF  
STEGSAAWNESLLHQFYTG LDQQLRDLEACVMQEAGLEGTPPLLEEDSIRAVRKYFHRLTLYLQEKSYSP  
CAWEIVRAEV MRSFSSSRNLQDRLRKKE (配列番号：4)

である。配列番号：3のN末端の下線を引いたシグナル配列は、たとえば、インビトロ転写のために、他のシグナル配列または単一のメチオニン残基でも置換することができ、その結果、以下の配列：

【表5】

30

MCDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKAQAMALVHEMLQQTFQLF  
STEGSAAWNESLLHQFYTG LDQQLRDLEACVMQEAGLEGTPPLLEEDSIRAVRKYFHRLTLYLQEKSYSP  
PCAWEIVRAEV MRSFSSSRNLQDRLRKKE (配列番号：5)

が得られるか、またはN末端メチオニンとシステインとの間に、プロリンもしくはプロリントセリン残基を包含することができる(配列番号：2参照)。他の関連するブタ配列を使用することができる。

【0031】

pIFN- 变異体は、Sus scrofa domestica上のある位置(配列番号：4で示される成熟配列に対する番号付けを用いる)：Q102(配列番号：6)、E103(配列番号：9)、E107(配列番号：12)、L112(配列番号：15)、およびY136(配列番号：18)(上記では太字で下線が引かれている)の1つに導入された合成アミノ酸を有しており、図2～4にも示す。成熟pIFN- は、成熟時に切断されるN末端メチオニン残基(たとえば、配列番号：5の残基1)を有してもよい。

40

【0032】

合成アミノ酸およびそれらの取り込みは、たとえば、WO2010/011735に議論されている。合成アミノ酸は、大腸菌(E. coli)(たとえば、L. Wang, et al., (2001)、Science 292 : 498-500)、および真核生物である出芽酵母(S. cerevisiae)(たとえば、J. Chinら、Science 301 : 964-7(2003))において使用することができ、インビオでのタンパク質

50

への合成アミノ酸の取り込みを可能にしている。

**【 0 0 3 3 】**

生物学的活性を有する5つの列挙された合成アミノ酸置換変異体(5つのE103、E107、L112、Y136、またはQ102残基のうちの1つにおけるpAFの置換は、配列中、下線が引かれる)において、これらの変異体は、分子のN末端にアミノ酸を挿入することによってさらに修飾されうる。たとえば、プロリン(Pro)またはプロリン-セリン(Pro-Ser)をN末端のMetとCysの間に挿入することができる。

**【 0 0 3 4 】**

変異体の成熟は、N末端メチオニンを除去する。

**【 0 0 3 5 】**

本明細書は、水溶性ポリマーに結合したpINF- ポリペプチドを作製する方法を記載する。「ペグ化すること」および「ペグ化された」は、特定の合成アミノ酸のポリエチレングリコール(PEG)分子への共有結合を示すことを意味する。該方法は、合成アミノ酸を含む単離されたpINF- ポリペプチドを、合成アミノ酸と反応する部分を含む水溶性ポリマーと接触させることを含みうる。

10

**【 0 0 3 6 】**

ポリ(エチレングリコール)分子は、約0.1kDaから約100kDaの間の分子量を有することができる。ポリ(エチレングリコール)分子は、0.1kDa～50kDa、20kDa～40kDa、および25kDa～35kDaの任意の整数値の分子量を有することができる。ポリ(エチレングリコール)分子は、約30kDaの分子量を有することができる。ポリ(エチレングリコール)分子は、0.1kDa～50kDa、20kDa～40kDa、および25kDa～35kDaの任意の整数値の分子量を有する直鎖状分子でありうる。ポリ(エチレングリコール)分子は、30kDaの分子量を有する直鎖状分子でありうる。ポリ(エチレングリコール)分子は、合成アミノ酸上のアセチル基と反応することができるアミノオキシ基を有しうる。ポリ(エチレングリコール)分子は、パラアセチルフェニルアラニンのアセチル側鎖とオキシム結合を形成することができる30kDaのアミノオキシ活性化直鎖状PEGでありうる。

20

**【 0 0 3 7 】**

1つのpINF- は、pAF残基に結合した約30kDaである直鎖状PEGを有する。

**【 0 0 3 8 】**

上記および下記でさらに論じられる変異体は、動物への投与のために、さまざまな賦形剤、安定化剤、緩衝剤、および他の成分と共に、製剤にさらに混合することができる。安定性、動物への投与、および活性に適した製剤を特定することは簡単なことではない。代わりに、製剤は、各化合物、その化合物を精製するための必要性、化合物を維持するために必要な安定剤、および他のさまざまな製剤成分に合わせて調整されなければならない。

30

**【 0 0 3 9 】**

製剤に配合するのに適切な塩として、塩化ナトリウム、塩化カリウムまたは塩化カルシウムが挙げられる。

**【 0 0 4 0 】**

緩衝剤および/または安定化剤として、酢酸ナトリウムを使用することができる。

**【 0 0 4 1 】**

適切な緩衝剤として、リン酸-クエン酸緩衝剤、リン酸緩衝剤、クエン酸緩衝剤、L-ヒスチジン、L-アルギニン塩酸塩、重炭酸塩緩衝剤、コハク酸緩衝剤、クエン酸緩衝剤、およびTRIS緩衝剤の単独または組み合わせのいずれかが挙げられる。

40

**【 0 0 4 2 】**

製剤は、抗凍結剤も含みうる。抗凍結剤として、ヒドロキシプロピル- -シクロデキストリン(HPBCD)、スクラロース、およびポリビニルピロリドン4000(PVP 4000)からなる群から選択される抗凍結剤が挙げられる。

**【 0 0 4 3 】**

製剤は、任意に界面活性剤を含んでもよい。適切な界面活性剤として、ポリソルベート(たとえば、ポリソルベート80)、硫酸ドデシル(SDS)、レシチンの単独または組み合わせのい

50

ずれかが挙げられる。

**【 0 0 4 4 】**

製剤は、水性組成物、または再構成された液体組成物の形態もしくは粉末としてであります。製剤は、対象への投与を容易にするために、バイアルもしくはカートリッジまたは予め充填された滅菌注射器にさらに保管することができる。

**【 0 0 4 5 】**

製剤が液体形態である場合、製剤のpHは、4.0～7.0または4.5～6.5の範囲であります。

**【 0 0 4 6 】**

治療されうる適切なウイルス感染として、コロナウイルス、ペストウイルス(ブタ熱ウイルスまたは古典的ブタ熱、CSF)、伝染性胃腸炎コロナウイルス(TGEV)、ブタ動脈炎ウイルス(PoAV)、ブタ生殖器および呼吸器症候群ウイルス(PPRSV)、ブタサーコウイルス(PCV)、ブタ流行性下痢ウイルス(PEDV)、口蹄疫ウイルス(FMDV)、ブタデルタコロナウイルス(PDCoV)などのブタコロナウイルス、およびブタインフルエンザウイルス(SIV)が挙げられるが、これらに限定されない。

10

**【 0 0 4 7 】**

変異体または変異体を含有する製剤の投与は、単回投与または単回投与と、それに続く初回投与の7～21日後、たとえば、初回投与の約14日後の第二の投与であります。動物は、動物の体重kg当たり、約25 μg/kg～約150 μg/kgの変異体の量で、変異体を投与される。pINF- 变異体の他の有効量は、動物の体重に対して約50 μg/kg～約100 μg/kgである。変異体は、製剤で、またはそれ自体で投与することができる。変異体は、たとえば、発生前に1回投与することができる。変異体はまた、さらなる群れの喪失を防ぐために、群れへのウイルス発生後に投与することもできる。変異体またはその製剤は、2回目に投与することができる。第二の投与は、初回投与の7～21日後、たとえば、初回投与の約14日後に投与することができる。ウイルス感染に関連する疾患を軽減または予防するために必要ならば、さらなる投与が企図されてもよい。

20

**【 0 0 4 8 】**

本明細書に開示される組成物、化合物、および方法の真の趣旨または範囲から逸脱することなく、さまざまな修正および変更を加えることができることは当業者には明らかであろう。したがって、本発明は、添付の特許請求の範囲およびそれらの均等物の範囲内にある限り、本発明の修正形態および変形形態を網羅することを意図している。

30

**【実施例 1】**

**【 0 0 4 9 】**

**pAF変異体**

11のpAF変異体を作製し、野生型pINF- (wt)と比較する。これらのうち、3つのpINF- 变異体は、pINF- 内のさまざまな位置で置換された合成アミノ酸についての乏しいタンパク質発現 / 產生の問題が原因で、継続的な試験から除外される。

**【 0 0 5 0 】**

AXID2820は、pIFN- -E107アンバーおよびプロリン-セリンN末端挿入を有するプラスミドpKG0083を有する(図1)。残基の番号付けは、野生型pIFN- 配列(配列番号：4)に対応するように標準化されている。野生型ブタインターフェロン-1のアミノ酸配列は、GenBank(登録番号X57191)から得られる。対応する核酸配列を合成し、そして発現ベクターにクローニングする。アンバー終止コドン(TAG)は、成熟野生型コード領域のアミノ酸位置107(または示される他の位置)に対応するグルタミン酸コドンに挿入される。Pro-Serをコードする核酸は、開始メチオニンコドン(AUG)の後のアミノ末端に挿入される。クローニングおよびその後の突然変異誘発が、望まれない突然変異の導入なしに予想通りに進行したことを確認するために、pKG0083の全プラスミドDNA配列を配列決定する。

40

**【 0 0 5 1 】**

第1表中の8つのpINF- 变異体は、タンパク質発現が可能であった。これらの8つの変異体はまた、30kDのアミノオキシ活性化直鎖状PEGでペグ化される。変異体のPEG化は、10%氷酢酸を用いてタンパク質溶液(約20mg/mL以上のタンパク質濃度にて)をpH4.0に調

50

整することによって達成される。酢酸ヒドラジドを最終濃度100mMまで添加し、オキシアミノPEGを、pINF 変異体に対して1：1～2：1の間、または約8：1までのモル比で添加する。反応は、暗所で28～30 ℃にて1～3日間進行させる。反応物を30mM酢酸ナトリウム、pH5.0で5倍希釈することにより反応を停止させる。第1表に示すように、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)を用いて、これらの8つのペグ化変異体を分析する。pINF- 変異体は、たとえば、His7がpAFで置換され、Arg34がpAFで置換されたなどの示された残基においてのpAF置換を除いて、野生型pINF- と同じである。タンパク質濃度は、mg/mLで示される。「RP」は、逆相(すなわち、逆相クロマトグラフィー、またはRP-HPLC)を表す。

## 【0052】

第1表：ペグ化pIFN 変異体の製造

## 【表6】

サンプル	タンパク質濃度(mg/mL)	RPによる主ピーク%	SECによるモノマー%
pIFN-α wt 配列番号：4	1.5	69.4	99.5
pIFN α -H7-PEG30 配列番号：21	2.6	67.0	94.7
pIFN α -R34-PEG30 配列番号：22	2.2	73.8	99.6
pIFN α -Q102-PEG30 配列番号：6	1.9	68.1	97.7
pIFN α -E103-PEG30 配列番号：9	2.1	58.2	96.3
pIFN α -E107-PEG30 配列番号：12	1.9	60.2	98.2
pIFN α -L112-PEG30 配列番号：15	3.4	60.1	98.3
pIFN α -Y136-PEG30 配列番号：18	2.1	51.9	99.1
pIFN α -H40-PEG30 配列番号：23	1.9	52.1	98.7

SECは、多波長検出が可能なHPLCシステム(Agilent 1100もしくは1200、または同等物)を使用して達成される。移動相は、200mMリン酸カリウム、250mM塩化カリウム、pH 6.0、10%イソプロパノール(IPA)である。

## 【0053】

これらの8つの変異体をインビトロ生物活性アッセイで試験する。Pestka Biomedical Laboratories, Inc. (Piscataway, NJ, USA)製の市販のインターフェロンアッセイキットiLite(登録商標)hIFN キットを使用して、pIFN- の生物学的活性を試験する。以下

10

20

30

40

50

のとおり、PEG-変異体の活性における損失倍数を、Ambrx WTタンパク質に対して算出する：

【数1】

$$\text{PEG-変異体 損失倍数} = \frac{\text{EC50 PEG-変異体}}{\text{EC50 Ambrx WT}}$$

【0054】

第2表に示すように、試験した8つのうち、3つのpINF- 変異体は、野生型の非PEG化pINF- よりも実質的に活性が低かった：

第2表

【表7】

順位	試験サンプル	WT pIFN $\alpha$ に対する活性の損失倍数	EC50 [ng/mL] 試験サンプル	EC50 [ng/mL] Ambrx WT pIFN $\alpha$
1	pIFN $\alpha$ E103-PEG30K	8x	184	22
2	pIFN $\alpha$ L112-PEG30K	15x	475	32
3	pIFNa $\alpha$ E107-PEG30K	23x	731	32
4	pIFNa $\alpha$ Y136-PEG30K	26x	874	33
5	pIFNa $\alpha$ Q102-PEG30K	32x	693	22
6	pIFNa $\alpha$ H40-PEG30K	171x	5662	33
7	pIFNa $\alpha$ H7- PEG30K	387x	8761	23
活性なし	pIFNa $\alpha$ R34-PEG30K	活性なし	活性なし	23

【0055】

野生型pINF- 対照は、シグナルペプチドを欠き、N末端アミノ酸(メチオニン、プロリンまたはセリン)が挿入されておらず、いかなるアミノ酸もpAF置換されておらず、そしてペグ化されていない(配列番号：4)。

【0056】

これらの実験の結果として、H40(配列番号：23)、H7(配列番号：21)、およびR34(配列番号：22)にpAF置換を有するペグ化pINF- 変異体は、iLite(登録商標)hULFN アッセイにおいて、野生型と比較して活性レベルが低いことから、ブタにおけるウイルス感染の治療には有用なpINF- 変異体ではないと考えられる。

【0057】

第2表の結果についてのペグ化および非ペグ化変異体の両方のRP-HPLC分析は、移動相A(0.05% TFA/水)および移動相B(0.05% TFA/ACN)を使用する。

【実施例2】

10

20

30

40

50

**【 0 0 5 8 】****インビオ試験**

18匹のスプラーグドーリーラット( $n=3$ グループ)は、6つの試験サンプル(20mM酢酸ナトリウム、pH5.0、100mM NaCl、および5%グリセロール中に再懸濁されたもの)のそれぞれ0.2mg/kgを、首の首筋に、カテーテルの遠位で皮下投与される：(1)pIFN -E103-PEG30K(ペグ化された配列番号：9)、(2)pIFN -L112-PEG30K(ペグ化された配列番号：15)、(3)pIFN -E107-PEG30K(ペグ化された配列番号：12)、(4)pIFN -Y136-PEG30K(ペグ化された配列番号：18)、および(5)pIFN -a-Q102-PEG30K(ペグ化された配列番号：6)。

**【 0 0 5 9 】**

pIFN- 変異体を、20mM酢酸ナトリウム、pH5.0、100mM NaClおよび5%グリセロールに可溶化する。各動物に、5つの変異体または野生型pIFN- (実施例1で使用したものと同じ)のいずれかを皮下(すなわち、背頸内)注射して、3匹ずつのラットからなる6つの試験群を形成する。

**【 0 0 6 0 】**

サンプリング時点は、投与前および投与後1時間、6時間、24時間、48時間、72時間、144時間、192時間、および240時間である。血液サンプルは、頸静脈カテーテルまたは外側尾静脈を介して、あるいは心臓穿刺による実験終了時に採取し、血液を凝固させて得られた血清を除去することによって処理する。各ペグ化されたpIFN- 変異体の濃度は、抗PEGモノクローナル捕捉抗体およびヤギ抗ブタIFN- ポリクローナル検出抗体を用いたリガンド結合アッセイを用いて決定される。AUC<sub>last</sub>、C<sub>max</sub>、T<sub>max</sub>は、WINNONLIN(登録商標)PKモデリングソフトウェア(Pharsight Corporation、現在、Certara USA、Inc.)を用いて生データを分析することによって計算される。ペグ化変異体のb(AUC<sub>last</sub>)を野生型pIFN(WT pIFN)の暴露量で割って差異倍数を得た。ペグ化変異体についての結果は、下記第3表のとおりである：

第3表：ペグ化されたIFN- 変異体のバイオアベイラビリティ

10

20

30

40

50

【表 8】

化合物	動物番号	AUC <sub>last</sub>	WT pIFNに 対する差異 倍数	C <sub>max</sub>	T <sub>max</sub>	推定 T <sub>1/2</sub>
		(ng*h/mL)		(ng/mL)	h	h
PEG Q102 pIFN $\alpha$	平均	12500	133	339	24	16.3
	SD	686		14.4	0	2.10
PEG E107 pIFN $\alpha$	平均	9420	100	246	24	17.6
	SD	2590		77.6	0	3.93
PEG L112 pIFN $\alpha$	平均	6000	64	165	24	12.7
	SD	510		15.6	0	1.11
PEG E103 pIFN $\alpha$	平均	5210	55	147	18	11.7
	SD	365		12.5	10.4	0.479
PEG Y136 pIFN $\alpha$	平均	5140	55	141	24	12.4
	SD	788		23.2	0	0.987
WT pIFN $\alpha$ 配列番号：4	平均	94.2	1	81	1	NC
	SD	49.3		49.9	0	NC

## 【0061】

「DN」は「正規化用量」を表し；DN AUC<sub>last</sub>の単位は(ng\*h/mL)/(mg/kg)であり、DN C<sub>max</sub>の単位は(ng/mL)/(mg/kg)である。C<sub>max</sub>は、半減期の計算に使用される。それにもかかわらず、E107ペグ化されたpIFN- $\alpha$ 変異体は、5つの変異体の中で最も高い半減期を有する。「NC」は、濃度が2つの時点でのみ測定可能であったので、「計算不可能」を意味する。

## 【0062】

証明されているように、そして暴露量の降順で該表に示されているように、暴露量(AUC<sub>last</sub>に関する)は、PEG30K-Q102およびPEG30K-E107で最も高い。試験した5つのpIFN- $\alpha$ 変異体はすべて、野生型pIFN- $\alpha$ 型(配列番号：4)よりも高いpIFN- $\alpha$ 暴露量を示した。T<sub>max</sub>は一般に、ペグ化されたpIFN- $\alpha$ 変異体については投与後24時間で観察され、野生型pIFN- $\alpha$ については投与後1時間であった。この実験では、終末相におけるデータポイントが不十分なため、C<sub>max</sub>を半減期の計算に含める。C<sub>max</sub>での時間は真の排出相を表していないので、半減期の推定値は近似値として考慮されるべきである。

## 【0063】

このタイプの研究では、種の異種性が影響を及ぼさないことに注意する必要がある。

## 【実施例3】

## 【0064】

pIFN- $\alpha$ -E107pAFの生成物関連汚染物質の特徴決定

pIFN- $\alpha$ -E107(配列番号：12)の質量分析(MS)に基づいて、アセチル化形態、58Da形態および酸化汚染物質が存在する。変異体は、大腸菌産生株内で合成中にアセチル化される。したがって、pIFN- $\alpha$ -E107生成のための1つの選択肢は、適切な生成時にアセチルトランスフェラーゼを添加するか、またはノックアウトリボソーム-タンパク質-アラニンアセチルトランスフェラーゼ(RimJ)(N末端アセチルトランスフェラーゼ)を使用することである。さらに、小規模および大規模クロマトグラフィーを精製のために使用すること

10

20

30

40

50

ができる。別法として、および本明細書に示されるように、アセチル化が変異体上で完全には起こらないように、N末端配列をさらに修飾することができる。

#### 【0065】

クロマトグラフィー手段については、1つの方法は、強陰イオン交換マルチモーダルBIOP ROCESSクロマトグラフィー媒体(樹脂)である、CAPTO Adhere Impres(GE Healthcare Lifesciences)を使用することである。この方法は、修飾されていない(すなわち、ペグ化されていない)pIFN- 变異体を1-5mg/mL樹脂の濃度に充填して、25mM酢酸アンモニウムの移動相とともに使用される(pH6.5にて)。カラムを、pH6.5にて、5カラム体積(CV)の25mM酢酸アンモニウムで洗浄する。pIFN- A变異体の溶離は、100%溶離緩衝液(5mM酢酸)へ向かう直線勾配、および40CVにわたる0~100%Bの直線勾配によるものであり、それによって酸化されたpIFN- ピークが除去される。ピーク1は、システインアセチル化なしのN末端pIFN- を有するが、ピーク2は、アセチル化型(+42 Da)、+58 Da型、+58+1 Ox型(おそらくアセチル化され、1回酸化された種)、および+58Da+2 Ox型(おそらく少なくとも2回酸化したアセチル化型)を含む。

#### 【0066】

これらの結果により、pIFN- のアミノ末端にプロリンを挿入してアセチル化型を妨げた。このようにして、Pro-pIFN -E107pAF(配列番号：配列番号：13)は作成された。明確化のために、アミノ酸位置の番号付けは、常にN末端システイン(C1)で始まる。付加されたプロリンは残基-1になり、N末端メチオニン(もしあれば)は残基-2になる。Pro-Ser挿入もまた可能であり、ここで、ペプチドは、N末端システインに対して-1位にセリン、-2位にプロリン、そしておそらく-3位にメチオニンを含む。プロリンを付加すると、質量分析法で分析したときに以前の変異体について見られた他のピークが除去された。

#### 【0067】

下記第4表において、Pro-pIFN -E107pAFは、N末端にプロリンを有し、E107にpAF置換を有する。Pro-pIFN -E107pAF変異体の活性を、N末端にプロリンが付加されていない変異体であるpIFN -E107pAFの活性と比較する。付加されたプロリンを有する変異体は、より少ないアセチル化および酸化変異体しか有さない。これらの変異体はペグ化されておらず、それらはシグナル配列メチオニンを含まないことに留意されたい。

#### 【0068】

第4表

#### 【表9】

	Pro-pIFN $\alpha$ -E107pAF EC50, ng/mL	pIFN $\alpha$ -E107pAF EC50, ng/mL
実行1	6.46	8.08
実行2	4.55	7.01

#### 【実施例4】

#### 【0069】

#### 他のN末端変異体

pIFN -E107pAFのN末端へのプロリン付加の成功を前提として、pIFN -E107pAFへのセリン(Ser、S)付加、Pro-Ser(PS)付加、His(H)、およびSer-Gly(SG)付加を含む他のN末端変異体もまた評価した。これらのN末端変異体は、ペグ化されない。次いで、これらのN末端変異体(全てE107-pAF変異体である)の活性を、上述のPestka Biomedical LaboratoriesによるiLite(登録商標)huIFN キットを用いるインビトロバイオアッセイにおいて評価し、結果を表5に示す。

#### 【0070】

10

20

30

40

50

第5表  
【表10】

突然変異	EC50 (ng/mL)
Pro-pINF α 配列番号：13	18.3
S (-1) pINF α 配列番号：24	34.2
SG (-2/-1) pINF α 配列番号：25	69.1
PS (-2/-1) pINF α 配列番号：14	28.7
H (-1) pINF α 配列番号：26	25.4

10

## 【0071】

pINF- は、メチオニン(未成熟ペプチド中の)とシステインとの間のアミノ末端に付加されたプロリンを有する変異体である。

20

## 【実施例5】

## 【0072】

pINF- 変異体とPEGのコンジュゲーション

pINF- -PS-E107変異体(配列番号：14)を、製造業者の指示にしたがってCaptoクロマトグラフィーを使用した後にカプト(Capto)クロマトグラフィープールから取り出し、精製形態に0.2Mグリシンを添加する。混合物のペプチドを酢酸で4.0に調整する。次いで、製造者の指示にしたがって、アミコン・ウルトラ(Amicon Ultra)遠心フィルターを用いてpINF- 変異体を8.2mg/mLに濃縮する。濃縮したら、30K直鎖状PEG(PEGは、たとえば、NOF America CorporationまたはEMD Merckから購入可能である)を、PEG:pINF- 変異体のモル比8:1で付加する。次いで、PEG/pINF- 変異体混合物を28にて約18時間インキュベートする。この方法は、18時間のインキュベーション後に95%を超えるpINF- 変異体がPEGとコンジュゲートすることをもたらす。

30

## 【0073】

次いで、ペグ化変異体(pINF- -PS-E107-PEG30K)を以下のように精製することができる。143mLのSP650S Tosohカラムを用いて、以下の移動相を用い、ペグ化変異体を精製することができる：

A : 30mM酢酸ナトリウム、pH5.0

B : 30mM酢酸ナトリウム、5%エチレングリコール、pH5.0

20カラム体積にわたって0~100% B。

40

## 【実施例6】

## 【0074】

異なるN末端変異体の比較試験

E107で置換されたpAFを有し、アミノ末端でプロリン-セリンを有する変異体(配列番号：14)に対するペグ化の影響を評価するために、それらのペグ化(30KDa直鎖状PEG)および非ペグ化形態の両方におけるいくつかの変異体について、活性アッセイを実施する。結果を下記第6表に提供する。タンパク質濃度、SEC、RP、およびEC50値は、上記のように決定される。pIFN- -P-E107-pAFを、アミノ末端伸長なしのタンパク質についての結果を反映するための比較サンプルとして使用する。

## 【0075】

50

第6表  
【表11】

サンプル	タンパク質濃度 (mg/mL)	モノマー SEC%	主ピーク RP%	EC50 (ng/mL)
pIFN $\alpha$ -PS-E107-pAF	8.2	99.8	84.8	5.96
pIFN $\alpha$ -PS-E107-30KPEG	7.3	99.0	98.2	409.7
pIFN $\alpha$ -P-E107-pAF				4.27
pIFN $\alpha$ -P-E107-30KPEG	3.3	99.3	99.7	641.2

10

## 【0076】

変異体の特徴決定を試験している間に、ノルロイシンが誤って取り込まれていることが観察された。ノルロイシンは、大腸菌との高密度発酵においてアミノ酸メチオニンに誤って取り込まれることが知られている。これは行われた発酵実験において観察された。ノルロイシン取り込みは、1つ以上の以下の工程を用いることによって低減化された：メチオニンを含む溶液を供給する工程；複合培地 対 限定培地で発酵させる工程(複合培地は、グリセロール、塩、アミノ酸、ビタミン、酵母エキス、動植物の加水分解物、ペプトン、およびトリプトンを含むがこれらに限定されない1つ以上の不定成分を含む)；および／または誘導後の反応混合物の温度を下げる工程。L-メチオニンを1.2mMの濃度でバッヂ培地に添加するとともに、20mMのL-メチオニンを含有する供給溶液を介して連続的に供給する。

20

## 【0077】

pINF- 变異体は、T7プロモーターの制御下にある。アラビノース(誘導物質)を発酵に添加すると、変異体の産生を可能にするカスケードが生じる。したがって、誘発後とは、誘発剤、この場合はアラビノースを添加した後のことを意味する。

## 【実施例7】

## 【0078】

ペグ化および非ペグ化変異体における凍結融解の影響

30

サンプルを1.5mLチューブ中で0℃にて凍結し、室温の水浴中で解凍することにより、5サイクルにわたって凍結および解凍した。下記の第7表において証明されるように、5サイクルの凍結融解にわたって、高分子量(HMW)タンパク質プロファイルについて有意な影響は観察されなかった。

第7表

## 【表12】

	pIFN $\alpha$ -PS-E107pAF		pIFN $\alpha$ -PS-E107-30KPEG	
凍結/解凍 サイクル	主ピーク%	HMW%	主ピーク%	HMW%
0	99.8	0.2	99.0	0.7
1	99.8	0.2	99.0	0.8
3	99.8	0.2	99.0	0.9
5	99.8	0.2	99.0	0.9

40

50

## 【0079】

第7表は、N末端にプロリン-セリンを有し、かつE107に置換されたpAFを有する、PEG化変異体および非PEG化変異体の間の差異を反映し、ここで、変異体は、アミノ末端、すなわち、残基-2および-1に、プロリン-セリン挿入(pIFN -PS-E107-30)を有する。

## 【図面】

## 【図1】

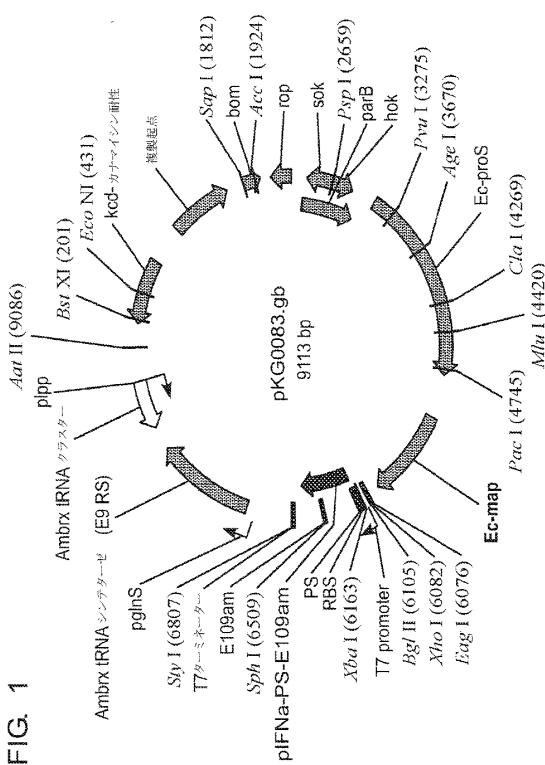


FIG. 1

## 【図2】

pAF サイト	配列	配列番号	X=
Q102	CDLPOTHSLAHTRALRLLAOMRRISPFSCLDHRRDFGSPEAFGGNOVQKAQAMALV HEMLQQTFLFSTEGSAAAWNESSLHQFTYGLDQQLRLEACVMQEAGLEGTPLL EDSIRAVRKYFHRLTLYQEKSYSPCAWEIVRAEVYMRSSSRNLQDRLRKKE	6	102
Q102	PCDLPOTHSLAHTRALRLLAOMRRISPFSCLDHRRDFGSPEAFGGNOVQKAQAMALV HEMLQQTFLFSTEGSAAAWNESSLHQFTYGLDQQLRLEACVMQEAGLEGTPLL EDSIRAVRKYFHRLTLYQEKSYSPCAWEIVRAEVYMRSSSRNLQDRLRKKE	7	103
Q102	PCDLPOTHSLAHTRALRLLAOMRRISPFSCLDHRRDFGSPEAFGGNOVQKAQAMALV HEMLQQTFLFSTEGSAAAWNESSLHQFTYGLDQQLRLEACVMQEAGLEGTPLL EDSIRAVRKYFHRLTLYQEKSYSPCAWEIVRAEVYMRSSSRNLQDRLRKKE	8	104
E103	CDLPOTHSLAHTRALRLLAOMRRISPFSCLDHRRDFGSPEAFGGNOVQKAQAMALV HEMLQQTFLFSTEGSAAAWNESSLHQFTYGLDQQLRLEACVMQEAGLEGTPLL EDSIRAVRKYFHRLTLYQEKSYSPCAWEIVRAEVYMRSSSRNLQDRLRKKE	9	105
E103	PCDLPOTHSLAHTRALRLLAOMRRISPFSCLDHRRDFGSPEAFGGNOVQKAQAMALV HEMLQQTFLFSTEGSAAAWNESSLHQFTYGLDQQLRLEACVMQEAGLEGTPLL EDSIRAVRKYFHRLTLYQEKSYSPCAWEIVRAEVYMRSSSRNLQDRLRKKE	10	104
E103	PCDLPOTHSLAHTRALRLLAOMRRISPFSCLDHRRDFGSPEAFGGNOVQKAQAMALV HEMLQQTFLFSTEGSAAAWNESSLHQFTYGLDQQLRLEACVMQEAGLEGTPLL EDSIRAVRKYFHRLTLYQEKSYSPCAWEIVRAEVYMRSSSRNLQDRLRKKE	11	105
E107	CDLPOTHSLAHTRALRLLAOMRRISPFSCLDHRRDFGSPEAFGGNOVQKAQAMALV HEMLQQTFLFSTEGSAAAWNESSLHQFTYGLDQQLRLEACVMQEAGLEGTPLL EDSIRAVRKYFHRLTLYQEKSYSPCAWEIVRAEVYMRSSSRNLQDRLRKKE	12	107
E107	PCDLPOTHSLAHTRALRLLAOMRRISPFSCLDHRRDFGSPEAFGGNOVQKAQAMALV HEMLQQTFLFSTEGSAAAWNESSLHQFTYGLDQQLRLEACVMQEAGLEGTPLL EDSIRAVRKYFHRLTLYQEKSYSPCAWEIVRAEVYMRSSSRNLQDRLRKKE	13	108
E107	PCDLPOTHSLAHTRALRLLAOMRRISPFSCLDHRRDFGSPEAFGGNOVQKAQAMALV HEMLQQTFLFSTEGSAAAWNESSLHQFTYGLDQQLRLEACVMQEAGLEGTPLL EDSIRAVRKYFHRLTLYQEKSYSPCAWEIVRAEVYMRSSSRNLQDRLRKKE	14	109
L112	CDLPOTHSLAHTRALRLLAOMRRISPFSCLDHRRDFGSPEAFGGNOVQKAQAMALV HEMLQQTFLFSTEGSAAAWNESSLHQFTYGLDQQLRLEACVMQEAGLEGTPLL EDSIRAVRKYFHRLTLYQEKSYSPCAWEIVRAEVYMRSSSRNLQDRLRKKE	15	112
L112	PCDLPOTHSLAHTRALRLLAOMRRISPFSCLDHRRDFGSPEAFGGNOVQKAQAMALV HEMLQQTFLFSTEGSAAAWNESSLHQFTYGLDQQLRLEACVMQEAGLEGTPLL EDSIRAVRKYFHRLTLYQEKSYSPCAWEIVRAEVYMRSSSRNLQDRLRKKE	16	113
L112	PCDLPOTHSLAHTRALRLLAOMRRISPFSCLDHRRDFGSPEAFGGNOVQKAQAMALV HEMLQQTFLFSTEGSAAAWNESSLHQFTYGLDQQLRLEACVMQEAGLEGTPLL EDSIRAVRKYFHRLTLYQEKSYSPCAWEIVRAEVYMRSSSRNLQDRLRKKE	17	114
Y136	CDLPOTHSLAHTRALRLLAOMRRISPFSCLDHRRDFGSPEAFGGNOVQKAQAMALV HEMLQQTFLFSTEGSAAAWNESSLHQFTYGLDQQLRLEACVMQEAGLEGTPLL EDSIRAVRKYFHRLTLYQEKSYSPCAWEIVRAEVYMRSSSRNLQDRLRKKE	18	136
Y136	PCDLPOTHSLAHTRALRLLAOMRRISPFSCLDHRRDFGSPEAFGGNOVQKAQAMALV HEMLQQTFLFSTEGSAAAWNESSLHQFTYGLDQQLRLEACVMQEAGLEGTPLL EDSIRAVRKYFHRLTLYQEKSYSPCAWEIVRAEVYMRSSSRNLQDRLRKKE	19	137
Y136	PCDLPOTHSLAHTRALRLLAOMRRISPFSCLDHRRDFGSPEAFGGNOVQKAQAMALV HEMLQQTFLFSTEGSAAAWNESSLHQFTYGLDQQLRLEACVMQEAGLEGTPLL EDSIRAVRKYFHRLTLYQEKSYSPCAWEIVRAEVYMRSSSRNLQDRLRKKE	20	138

FIG. 2

10

20

30

40

50

(19)

【図3】

X <sub>a</sub>	X <sub>b</sub>	DAF μ <sub>af</sub> μ <sub>bf</sub>	規則	SIN	長さ	X=
abs	abs	H7	COPOTISLAHTRALLAUMRISCLDHRDFGSPEAFGENOKVADAMALVHEMLOQFOL TESSAAWNESLHOFYGLDQLROLEACMAGLTPLEDSRAVKYFHRLTYLQESYS	21	166	7
abs	abs	R34	COPOTISLAHTRALLAUMRISCLDHRDFGSPEAFGENOKVADAMALVHEMLOQFOL TESSAAWNESLHOFYGLDQLROLEACMAGLTPLEDSRAVKYFHRLTYLQESYS	22	166	34
abs	abs	H40	COPOTISLAHTRALLAUMRISCLDHRDFGSPEAFGENOKVADAMALVHEMLOQFOL TESSAAWNESLHOFYGLDQLROLEACMAGLTPLEDSRAVKYFHRLTYLQESYS	23	166	40

FIG. 3

【図5】

166種類別別  
WT UP- $\alpha$   
1 COLDPLAHTAURLLAUMRISCLDIRRDGSPEAFGENOKVADAMALVHEMLOQFOL  
81 LIHOFTTLDQRLDACEYMEAGLTPLEDSRAVKYFHRLTYLQESYS  
161 RURKE

X <sub>a</sub>	X <sub>b</sub>	DAF μ <sub>af</sub> μ <sub>bf</sub>	規則	SIN	長さ	X=
abs	abs	E107	SODPOTISLAHTRALLAUMRISCLDHRDFGSPEAFGENOKVADAMALVHEMLOQFOL STESEAANWESLHOFYGLDQLROLEACMAGLTPLEDSRAVKYFHRLTYLQESYS	24	167	108
Ser	Gly	E107	SODPOTISLAHTRALLAUMRISCLDHRDFGSPEAFGENOKVADAMALVHEMLOQFOL FSTESSAAWNESLHOFYGLDQLROLEACMAGLTPLEDSRAVKYFHRLTYLQESYS	25	168	109
abs	abs	E107	HDPOTISLAHTRALLAUMRISCLDHRDFGSPEAFGENOKVADAMALVHEMLOQFOL STESEAANWESLHOFYGLDQLROLEACMAGLTPLEDSRAVKYFHRLTYLQESYS	26	167	108

FIG. 5

【図4】

X <sub>a</sub>	X <sub>b</sub>	DAF μ <sub>af</sub> μ <sub>bf</sub>	規則	SIN	長さ	X=
abs	abs	H7	X <sub>a</sub> b COLPOTHS LAHTR ALLAUMRIS CLDHRDF GSPEAF GENOKVADAMALVHEMLOQFOL FSTESSAAWNESLHOFYGLDQLROLEACMAGLTPLEDSRAVKYFHRLTYLQESYS	1	168	-1(N-末端側を有する); -IN(末端側を有する); SUS scrofa domestica DfN- $\alpha$ (GenBank X57191)
abs	abs	R34	X <sub>a</sub> b COLPOTHS LAHTR ALLAUMRIS CLDHRDF GSPEAF GENOKVADAMALVHEMLOQFOL FSTESSAAWNESLHOFYGLDQLROLEACMAGLTPLEDSRAVKYFHRLTYLQESYS	2	169	SIN上位にあるが、下未記載を 有する(後述よりアーチでは 通常用語される)。
abs	abs	H40	X <sub>a</sub> b COLPOTHS LAHTR ALLAUMRIS CLDHRDF GSPEAF GENOKVADAMALVHEMLOQFOL FSTESSAAWNESLHOFYGLDQLROLEACMAGLTPLEDSRAVKYFHRLTYLQESYS	3	189	SUS scrofa domestica DfN- $\alpha$ (GenBank X57191) 付加されたN-末端 N-結合する成熟配列
abs	abs	E107	X <sub>a</sub> b MAPTSAFLT VLLSCNAIGLGPOTISLAHTR ALLAUMRIS CLDHRDF GSPEAF GENOKVADAMALVHEMLOQFOL FSTESSAAWNESLHOFYGLDQLROLEACMAGLTPLEDSRAVKYFHRLTYLQESYS	4	166	SUS scrofa domestica DfN- $\alpha$ (GenBank X57191) 成熟配列
abs	abs	E107	X <sub>a</sub> b MDPOTISLAHTR ALLAUMRIS CLDHRDF GSPEAF GENOKVADAMALVHEMLOQFOL FSTESSAAWNESLHOFYGLDQLROLEACMAGLTPLEDSRAVKYFHRLTYLQESYS	5	167	SUS scrofa domestica DfN- $\alpha$ (GenBank X57191)

FIG. 4

【図6】

X <sub>a</sub>	X <sub>b</sub>	DAF μ <sub>af</sub> μ <sub>bf</sub>	規則	SIN	長さ	X=
abs	abs	E102	COLPOTHS LAHTR ALLAUMRIS CLDHRDF GSPEAF GENOKVADAMALVHEMLOQFOL FSTESTGAAWNESLHOFYGLDQLROLEACMAGLTPLEDSRAVKYFHRLTYLQESYS	6	166	102
Pro	Ser	E102	FETDPTTISLAHTR ALLAUMRIS CLDHRDF GSPEAF GENOKVADAMALVHEMLOQFOL FSTESTGAAWNESLHOFYGLDQLROLEACMAGLTPLEDSRAVKYFHRLTYLQESYS	7	167	103
Pro	Ser	E102	FSDLPTOTISLAHTR ALLAUMRIS CLDHRDF GSPEAF GENOKVADAMALVHEMLOQFOL FSTESTGAAWNESLHOFYGLDQLROLEACMAGLTPLEDSRAVKYFHRLTYLQESYS	8	168	104
abs	abs	E103	COLPOTHS LAHTR ALLAUMRIS CLDHRDF GSPEAF GENOKVADAMALVHEMLOQFOL FSTESTGAAWNESLHOFYGLDQLROLEACMAGLTPLEDSRAVKYFHRLTYLQESYS	9	166	103
Pro	Ser	E103	FDPOTISLAHTR ALLAUMRIS CLDHRDF GSPEAF GENOKVADAMALVHEMLOQFOL FSTESTGAAWNESLHOFYGLDQLROLEACMAGLTPLEDSRAVKYFHRLTYLQESYS	10	167	104
Pro	Ser	E103	PSDLPOTISLAHTR ALLAUMRIS CLDHRDF GSPEAF GENOKVADAMALVHEMLOQFOL FSTESTGAAWNESLHOFYGLDQLROLEACMAGLTPLEDSRAVKYFHRLTYLQESYS	11	168	105
abs	abs	L107	COLPOTHS LAHTR ALLAUMRIS CLDHRDF GSPEAF GENOKVADAMALVHEMLOQFOL FSTESTGAAWNESLHOFYGLDQLROLEACMAGLTPLEDSRAVKYFHRLTYLQESYS	12	166	107
abs	abs	L107	PFDLPOTISLAHTR ALLAUMRIS CLDHRDF GSPEAF GENOKVADAMALVHEMLOQFOL FSTESTGAAWNESLHOFYGLDQLROLEACMAGLTPLEDSRAVKYFHRLTYLQESYS	13	167	108
Pro	Ser	L107	PSDLPTOTISLAHTR ALLAUMRIS CLDHRDF GSPEAF GENOKVADAMALVHEMLOQFOL FSTESTGAAWNESLHOFYGLDQLROLEACMAGLTPLEDSRAVKYFHRLTYLQESYS	14	168	109
abs	abs	L112	COLPOTHS LAHTR ALLAUMRIS CLDHRDF GSPEAF GENOKVADAMALVHEMLOQFOL FSTESTGAAWNESLHOFYGLDQLROLEACMAGLTPLEDSRAVKYFHRLTYLQESYS	15	166	112
Pro	Ser	L112	PFGLDLPOTISLAHTR ALLAUMRIS CLDHRDF GSPEAF GENOKVADAMALVHEMLOQFOL FSTESTGAAWNESLHOFYGLDQLROLEACMAGLTPLEDSRAVKYFHRLTYLQESYS	16	167	113
Pro	Ser	L112	PSDLPTOTISLAHTR ALLAUMRIS CLDHRDF GSPEAF GENOKVADAMALVHEMLOQFOL FSTESTGAAWNESLHOFYGLDQLROLEACMAGLTPLEDSRAVKYFHRLTYLQESYS	17	168	114
abs	abs	L136	COLPOTHS LAHTR ALLAUMRIS CLDHRDF GSPEAF GENOKVADAMALVHEMLOQFOL FSTESTGAAWNESLHOFYGLDQLROLEACMAGLTPLEDSRAVKYFHRLTYLQESYS	18	166	136
Pro	Ser	L136	PCPDLPOTISLAHTR ALLAUMRIS CLDHRDF GSPEAF GENOKVADAMALVHEMLOQFOL FSTESTGAAWNESLHOFYGLDQLROLEACMAGLTPLEDSRAVKYFHRLTYLQESYS	19	167	137
Pro	Ser	L136	PCDLPOTHS LAHTR ALLAUMRIS CLDHRDF GSPEAF GENOKVADAMALVHEMLOQFOL FSTESTGAAWNESLHOFYGLDQLROLEACMAGLTPLEDSRAVKYFHRLTYLQESYS	20	168	138

FIG. 6

(配列番号：1)

【配列表】

0007093311000001.app

10

20

30

40

50

---

フロントページの続き

## (51)国際特許分類

A 6 1 K	38/21 (2006.01)	F I
C 1 2 N	15/21 (2006.01)	A 6 1 K      38/21 C 1 2 N      15/21

P i n e s R o a d , S u i t e 1 0 0 , L a J o l l a , C a l i f o r n i a 9 2 0 3  
7 , U n i t e d S t a t e s o f A m e r i c a

(74)代理人 100145403

弁理士 山尾 憲人

(74)代理人 100126778

弁理士 品川 永敏

(74)代理人 100162684

弁理士 吳 英燦

(74)代理人 100162695

弁理士 釜平 双美

(74)代理人 100156155

弁理士 水原 正弘

(72)発明者 ピーター・コナー・カニング

アメリカ合衆国 4 6 2 0 6 - 6 2 8 8 インディアナ州インディアナポリス、ポスト・オフィス・ボックス 6 2 8 8 、イーライ・リリー・アンド・カンパニー内

(72)発明者 ニコラス・ヌードセン

アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア州ラ・ホヤ、ノース・トーリー・パインズ・ロード 1 0 9 7 5 番、アンブルックス・インコーポレイテッド内

(72)発明者 リリアン・スキッドモア

アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア州ラ・ホヤ、ノース・トーリー・パインズ・ロード 1 0 9 7 5 番、アンブルックス・インコーポレイテッド内

審査官 玉井 真人

(56)参考文献 特表平 0 9 - 5 0 6 0 8 7 ( J P , A )

特表 2 0 0 8 - 5 4 1 7 6 9 ( J P , A )

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 0 7 K      1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

C a p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

U n i P r o t / G e n e S e q