

ELPI-120=(VPGXG)₁₂₀, 式中: X=V, G, A.

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

融合タンパク質と、薬学的に許容可能な担体と、を含む、治療用組成物であって、
前記融合タンパク質は、V I Pと、少なくとも1つのエラスチン様ペプチド（E L P）成分と、を含み、前記V I Pは、半減期の延長を呈し、1日1回以下の投薬頻度を支援する、治療用組成物。

【請求項 2】

前記E L P成分は、配列番号：1－12によって定義される、1個以上のアミノ酸の反復単位から構成される、請求項1に記載の治療用組成物。

【請求項 3】

前記E L P成分は、V P G X G（配列番号：3）、I P G X G（配列番号：5）、および／またはL P G X G（配列番号：7）の反復を含み、Xは、遺伝的にコードされたアミノ酸である、請求項2に記載の治療用組成物。

【請求項 4】

前記E L P成分は、V P G X G（配列番号：3）反復を含み、Xは、は、V、A、およびGから独立して選択される、または、K、V、およびFから独立して選択される、請求項3に記載の治療用組成物。

【請求項 5】

Xは、約V 5、A 2、およびG 3の比率における、V、A、およびGである、請求項4に記載の治療用組成物。

【請求項 6】

前記E L P成分は、V P G X G（配列番号：3）の60個の反復単位を含む、請求項5に記載の治療用組成物。

【請求項 7】

前記E L P成分は、V P G X G（配列番号：3）の120個の反復単位を含む、請求項6に記載の治療用組成物。

【請求項 8】

Xは、約V 1、A 8、およびG 7の比率における、V、A、およびGである、請求項4に記載の治療用組成物。

【請求項 9】

前記E L P成分は、V P G X G（配列番号：3）の60個の反復単位を含む、請求項8に記載の治療用組成物。

【請求項 10】

前記E L P成分は、V P G X G（配列番号：3）の120個の反復単位を含む、請求項9に記載の治療用組成物。

【請求項 11】

Xは、約K 1、V 2、およびF 1の比率における、K、V、およびFである、請求項4に記載の治療用組成物。

【請求項 12】

前記E L P成分は、V P G X G（配列番号：3）の60個の反復単位を含む、請求項11に記載の治療用組成物。

【請求項 13】

前記E L P成分は、V P G X G（配列番号：3）の120個の反復単位を含む、請求項12に記載の治療用組成物。

【請求項 14】

Xは、Vである、請求項4に記載の治療用組成物。

【請求項 15】

前記E L P成分は、V P G X G（配列番号：3）の60個の反復単位を含む、請求項14に記載の治療用組成物。

【請求項 16】

10

20

30

40

50

前記 E L P 成分は、V P G X G（配列番号：3）の120個の反復単位を含む、請求項14に記載の治療用組成物。

【請求項17】

前記 V I P は、配列番号：13のアミノ酸配列を有する、請求項1に記載の治療用組成物。

【請求項18】

前記 V I P は、配列番号：21－27のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を有する、請求項1に記載の治療用組成物。

【請求項19】

前記 E L P 成分は、V I P のC－末端にある、請求項1に記載の治療用組成物。

10

【請求項20】

V I P と前記 E L P 成分との間にスペーサ配列をさらに含む、請求項1に記載の治療用組成物。

【請求項21】

前記スペーサペプチドは、プロテアーゼ耐性またはプロテアーゼ切断可能である、請求項20に記載の治療用組成物。

【請求項22】

前記スペーサペプチドは、プロテアーゼ切断可能であって、トロンビン切断部位、X a 因子切断部位、金属プロテアーゼ切断部位、エンテロキナーゼ切断部位、T e v 切断部位、またはカテプシン切断部位を含む、請求項21に記載の治療用組成物。

20

【請求項23】

前記組成物は、非経口的投与のために調合される、請求項1に記載の治療用組成物。

【請求項24】

前記組成物は、皮下、筋肉内、または静脈内投与のために調合される、請求項23に記載の治療用組成物。

【請求項25】

非修飾 V I P と比較して、V P A C 2 対 V P A C 1 に対する、前記 V I P の選好性を修飾するように、V I P またはその機能的類似体と、N－末端部分と、を含む、治療剤。

【請求項26】

前記 V I P は、配列番号：13のアミノ酸配列を有する、請求項25に記載の治療剤。

30

【請求項27】

前記 V I P は、配列番号：21－27のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を有する、請求項25に記載の治療剤。

【請求項28】

前記治療剤は、V P A C 1 より V P A C 2 に対して、少なくとも約2：1の相対結合選好性を有する、請求項25－27のいずれか1つに記載の治療剤。

【請求項29】

前記治療剤は、V P A C 1 より V P A C 2 に対して、少なくとも約50：1の相対結合選好性を有する、請求項25－27のいずれか1つに記載の治療剤。

【請求項30】

前記治療剤は、V P A C 2 より V P A C 1 に対して、少なくとも約2：1の相対結合選好性を有する、請求項25－27のいずれか1つに記載の治療剤。

40

【請求項31】

前記治療剤は、V P A C 2 より V P A C 1 に対して、少なくとも約50：1の相対結合選好性を有する、請求項25－27のいずれか1つに記載の治療剤。

【請求項32】

V I P を必要とする対象を治療する方法であって、前記対象に、請求項1－31に記載の治療上有効量の組成物を投与することを含む、方法。

【請求項33】

前記対象は、ヒト対象である、請求項32に記載の方法。

50

【請求項 34】

前記組成物は、皮下投与のために調合される、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

前記組成物は、1 日 1 回の投薬のために調合される、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 36】

前記組成物は、週 3 回の投薬のために調合される、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 37】

前記組成物は、週 2 回の投薬のために調合される、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 38】

前記組成物は、週 1 回の投薬のために調合される、請求項 33 に記載の方法。

10

【請求項 39】

対象における高血圧症を治療または防止する方法であって、前記対象に、請求項 1－38 のいずれかに記載の治療上有効量の組成物を投与することを含む、方法。

【請求項 40】

前記高血圧症は、肺高血圧症、制御不良本態性高血圧症、および抵抗性高血圧症から選択される、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

対象における心臓病を治療または防止する方法であって、前記対象に、請求項 1－38 のいずれかに記載の治療上有効量の組成物を投与することを含む、方法。

20

【請求項 42】

前記心臓病は、心筋線維症、心不全、および心筋症から選択される、請求項 41 に記載の方法。

【請求項 43】

対象における 2 型真性糖尿病を治療または防止する方法であって、前記対象に、請求項 1－38 のいずれかに記載の治療上有効量の組成物を投与することを含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、35 U. S. C. § 119 (e) に基づいて、2009 年 8 月 14 日出願の米国特許仮出願第 61/234, 151 号（参照することによって、全体として本明細書に組み込まれる）に対する優先権を請求するものである。

30

【0002】

本発明は、循環半減期の延長を有し、かつ非修飾成熟ペプチドと異なる、受容体結合プロファイルを有する、VIP を含む、血管作動性腸管ペプチド (VIP) およびそれを含む医薬組成物に関する。

電子的に提出されたテキストファイルの説明

【0003】

本明細書とともに電子的に提出されたテキストファイルのコンテンツは、参照することによって、全体として本明細書に組み込まれる：配列リストのコンピュータ可読フォーマットコピー（ファイル名：PHAS__019__01US__SeqList__ST25. txt、データ記録日：2010 年 8 月 4 日、ファイルサイズ 44 キロバイト）。

40

【背景技術】

【0004】

血管作動性腸管ペプチド (VIP) は、止血、免疫系、および神経系に関するものを含め、いくつかの生物学的効果を有する。Delgado et al., The Significance of Vasoactive Intestinal Peptide in Immunomodulation, Pharmacol. Reviews 56 (2): 249-290 (2004) を参照されたい。例えば、VIP は、血液および肺動脈圧ならびに広範囲に及ぶ免疫系および炎症状態に有益な影響を有する。

50

V I Pは、いくつかを挙げると、肺高血圧症、慢性閉塞性肺疾患（C O P D）、関節炎、炎症性腸疾患（I B D）、およびぜんそくのための活性剤としての大きな潜在性を有する。

【0005】

V P A C 1およびV P A C 2を含め、V I Pに対して、少なくとも2つの受容体が存在する。これらの受容体は、両V I Pと関連分子である下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド（P A C A P）をある程度結合する。両受容体は、7つの膜貫通性Gタンパク質共役型受容体ファミリーの員である。V P A C 1は、例えば、C N S、肝臓、肺、小腸、およびTーリンパ球に分布する。V P A C 2は、例えば、C N S、脾臓、骨格筋、心臓、腎臓、脂肪組織、精巣、および胃に認められる。

10

【0006】

V I Pの短半減期は、このペプチドを治療剤として非実用的にする。P o z o D, et al., Tuning immune tolerance with vasoactive intestinal peptide: A new therapeutic approach for immune disorders. *Peptides* 28 (9): 1833-1846 (2007)を参照されたい。実際、研究において、血液中のV I Pの半減期は、2分未満であることが示されている（D o m s c h k e et al., 1978, *Gut* 19: 1049-53; B u r h o l e t et al., 1978, *Scand J Gastroent* 13: 807-813）。さらに、V I Pの多数の生物学的効果は、あらゆる特定の適応症のためのその開発を複雑にし得る。したがって、修飾型のV I Pは、例えば、半減期を延長する、および／または望ましい受容体結合プロファイルを有するように分子を設計することによって、剤を治療上実践的にする必要がある。

20

【発明の概要】

【0007】

本発明は、修飾された血管作動性腸管ペプチド（V I P）、ならびにコードされたポリヌクレオチドおよびベクター、および修飾されたV I Pを含む、医薬組成物を提供する。本発明はさらに、修飾されたV I P分子を生成する方法、および患者の治療のために、修飾されたV I P剤を使用する方法を提供する。本発明によると、修飾されたV I Pは、体内における循環半減期または持続性の延長、および／または非修飾V I Pに対して、同程度の受容体結合および／または生物学的有効性、および／または受容体結合プロファイルの改変を呈する。

30

【0008】

一態様において、本発明は、修飾されたV I P分子およびそれを含む医薬組成物を提供する。修飾されたV I P分子は、体内におけるより長い循環半減期または持続性、同程度の生物学的有効性、および／または修飾された受容体結合プロファイルを提供するように、1つ以上のアミノ酸の付加によって、および／または異種アミノ酸配列の融合によって、Nーおよび／またはCー末端において、組み換えで、または化学的に、修飾される。例えば、いくつかの実施形態では、Nー末端H i sから開始する、28個のアミノ酸成熟V I Pは、Nー末端（例えば、M e t）において、単一アミノ酸等の付加的Nー末端アミノ酸を含む。これらまたは他の実施形態において、修飾されたV I Pは、本明細書に説明されるように、エラスチン様ペプチド（E L P）へのNーまたはCー末端融合を含有する。かかる修飾されたV I P分子は、体内における循環半減期または持続性の向上、および／またはV P A C 1よりV P A C 2に対して結合選好性の改変を示し得る。

40

【0009】

例えば、V I Pは、（例えば、組み換え手段によって）E L PのNー末端に融合されてもよい。天然成熟V I Pのヒスチジンが、Nー末端にあってもよい。かかる治療剤は、週に約1ー7回の投薬（例えば、毎日または毎週投薬）等の融合されていない相当物より有意に低頻度の投薬を要求し得る。

【0010】

50

代替実施形態において、VIP-ELP融合は、2位に天然成熟VIP生成物のHisを伴うN-末端に、メチオニンを含ってもよい。さらに他の実施形態において、VIP-ELP分子は、メチオニンアラニンアラニンから開始する。細菌内で生産されると、第1のメチオニンは、失われ、生成物は、N-末端に、Ala-Alaを含有する。Ala-Alaは、DPP-IVペプチダーゼの作用によって、インビトロまたはインビボで除去され、それによって、天然成熟VIP N-末端を残す。N-末端に付加的アミノ酸を含有するこれらの構成物は、VPAC1およびVPAC2受容体における結合活性に対して試験されると、有意に異なる活性を呈する。例えば、両構成物は、VPAC2受容体を類似EC50によって活性化可能であるが、N-末端（および2位におけるHis）にメチオニンを伴う構成物は、少なくとも100倍、VPAC1受容体において低活性である。

10

【0011】

種々の実施形態において、N-末端Metを有する本発明の修飾されたVIPは、天然または所望のVIP N-末端を露出させるためのさらなる発現後製造プロセスを伴わずに、E. coliまたは他の発現系における生産によって等、組み換え手段によって、得ることが可能な利点を有する。

【0012】

さらに他の実施形態において、VIPは、例えば、本明細書に詳細に説明されるように、1つ以上のPEGまたは他の化学部分（例えば、N-末端またはその近傍）の付加によって、化学的に修飾されてもよい。

20

【0013】

他の態様では、本発明は、本発明の修飾されたVIPをコードする、ポリヌクレオチドおよびベクター、ならびにそれを含有する宿主細胞を提供する。宿主細胞は、既知の発現系と併用するために好適な細菌または酵母細胞等、修飾されたVIPの組み換え生産のために好適であり得る。

【0014】

他の態様では、本発明は、哺乳類におけるある状態を治療、緩和、または防止する方法を提供する。かかる状態は、種々の心臓血管系、免疫系（例えば、自己免疫系）、および神経系状態を含む。例えば、修飾されたVIPは、自己免疫系疾患または炎症状態に罹患する患者を含め、患者における炎症誘発性と抗炎症性エフェクタとの間の均衡を調節するために使用されてもよい。修飾されたVIPに対する例示的適応症は、とりわけ、高血圧症、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、糖尿病、心筋線維症、心不全、心筋症、関節炎、炎症性腸疾患（IBD）、およびぜんそくを含む。

30

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】N-末端にMetを有する、修飾されたVIP-ELP融合タンパク質のアミノ酸配列（M-VIP-ELP1-120、配列番号：14）、及びC-末端でVIPに融合された、120 ELP1単位（VPGXG、配列番号：3）を示す図である。

【図2】天然成熟VIPペプチドに対して活性化可能である、N-末端にMet-Ala-Alaを有する、修飾されたVIP-ELP融合タンパク質のアミノ酸配列（MAA-VIP-ELP1-120、配列番号：15）と、C-末端でVIPに融合された、120 ELP1単位（VPGXG、配列番号：3）を示す図である。

40

【図3】組み換え融合の便宜的生産のために、ELP1-120をコードする、pPB1031のプラスミドマップである。

【図4】M-VIP-ELP1-120（配列番号：39および40）融合タンパク質をコードする、pPB1046を描写する図である。組み換え遺伝子の構成のためのプライマー（P0045、配列番号：31、P0048、配列番号：32、およびP0065、配列番号：34）が、示される。

【図5】MAA-VIP-ELP1-120（配列番号：41および42）融合タンパク質をコードする、pPB1047を描写する図である。組み換え遺伝子の構成のためのプ

50

ライマー（P0066、配列番号：35、P0064、配列番号：33、P0067、配列番号：36）が、示される。

【図6】ELP1-120-VIP（配列番号：43および44）融合タンパク質をコードする、pPB1048を描写する図である。組み換え遺伝子を構成するためのプライマー（P0068、配列番号：37、P0069、配列番号：38）が、示される。

【図7】熱変性を伴う、または伴わない、精製されたVIP-ELP融合タンパク質の10% Tris-Acetate NuPAGEゲル分析の図である。

【図8】VPAC2受容体に対する、未変性VIPおよびVIP-ELP融合タンパク質PB1046ならびにPB1047のインビトロ活性を示す図である。

【図9】VPAC1受容体に対する、未変性VIPおよびVIP-ELP融合タンパク質PB1046ならびにPB1047のインビトロ活性を示す図である。

【図10】ラット血圧に及ぼす、VIP-ELP融合タンパク質のインビボ効果を示す図である。左側のパネルは、収縮期血圧を示す。右側のパネルは、拡張期血圧を示す。VIP-ELPは、12時間周期にわたって、血圧を降下させる。

【図11】VIP-ELP1-120をコードする、pPB1120（配列番号：48）のプラスミドマップである。

【図12】VPAC1受容体に対する、未変性VIPおよびVIP-ELP融合タンパク質PB1120ならびにPB1046のインビトロ活性を示す図である。

【図13】VPAC2受容体に対する、未変性VIPおよびVIP-ELP融合タンパク質PB1120ならびにPB1046のインビトロ活性を示す図である。

【図14】図14Aは、線形軸を伴う、3mg/kgの単回皮下注射後のサル（n=3）におけるVIP-ELP融合タンパク質PB1120の薬物動態プロファイルを示す図である。図14Bは、片対数軸を伴う、VIP-ELP融合タンパク質PB1120の薬物動態プロファイルを示す図である。

【図15A】0.1mg/kg、1mg/kg、または5mg/kg用量によって、皮下注射されたラットにおける、3時間間隔にわたる収縮期圧の平均変化を示す図である。

【図15B】0.1mg/kg、1mg/kg、または5mg/kg用量によって、皮下注射されたラットにおける、3時間間隔にわたる拡張期圧の平均変化を示す図である。

【図15C】0.1mg/kg、1mg/kg、または5mg/kg用量によって、皮下注射されたラットにおける、3時間間隔にわたる平均動脈圧の平均変化を示す図である。

【図15D】PB1120の投与後、3時間間隔にわたる、対象ラットの平均心拍数を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0016】

本発明は、修飾された血管作動性腸管ペプチド（VIP）、コードポリヌクレオチドおよびベクター、ならびに修飾されたVIPを含む医薬組成物を提供する。本発明はさらに、患者の治療のために、修飾されたVIP剤を生成および使用する方法を提供する。本発明によると、VIPは、非修飾VIPに対して、体内における循環半減期または持続性の延長、同程度の受容体結合、または生物学的有効性、および／または受容体結合プロファイルの改変を呈し得る。種々の実施形態において、本発明の化合物は、非修飾相当物と比較して、投薬頻度の減少を呈する。

血管作動性腸管ペプチド

【0017】

血管作動性腸管ペプチド（VIP）は、28個のアミノ酸残基を含有する、ペプチドホルモンであって、消化管、膵臓、および脳内の視床下部の視交叉上核を含む、人体の多くの領域で生産される。VIPは、動物およびヒトにおいて、全身血管拡張、低血圧症、心拍出量の増加、呼吸刺激、高血糖症、冠血管拡張、気管支拡張を含む、広範囲に及ぶ生物学的作用を呈する。VIPはまた、免疫系の均衡にも影響を及ぼす。

【0018】

VIPは、身体の一部に及ぼす。消化系に対して、VIPは、円滑な

10

20

30

40

50

筋肉の弛緩（下部食道括約筋、胃、胆嚢）を誘発し、膵液および胆汁内への水分の分泌を刺激し、腸管腔からの胃酸の分泌および吸収を阻害させ得る。小腸におけるその役割は、水分および電解液の分泌を刺激すること、ならびに腸管平滑筋を拡張し、末梢血管を拡張し、膵臓の重炭酸塩分泌を刺激し、かつガストリン刺激性の胃酸の分泌を阻害することである。これらの効果は、協働し、運動性を向上させる。VIPは、主細胞によるペプシノゲン分泌を刺激する機能を有する。

【0019】

VIPは、心臓に認められており、心臓血管系に有意な効果を及ぼす。冠動脈拡張をもたらし、かつ陽性変力および変時効果を有する。

【0020】

VIPは、炎症およびTH1-型自己免疫疾患を治療するために有用な免疫調節ペプチドである（Delgado et al., The Significance of Vasoactive Intestinal Peptide in Immunomodulation, Pharmacol. Reviews 56 (2): 249-290 (2004) を参照されたい）。VIPは、神経変性疾患の治療に有用である（米国特許第5, 972, 883号を参照されたい（参照することによって、全体として本明細書に組み込まれる））。VIPおよびその構造的に関連するペプチド下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド（PACAP）は、疾患の炎症および自己免疫成分の両方を下方調整することによって、骨関節炎（OA）ならびにリウマチ性関節炎（RA）等の慢性炎症リウマチ性疾患に重要な治療効果を有する（Juarraz et al., Vasoactive Intestinal Peptide modulates proinflammatory mediator synthesis in osteoarthritic and rheumatoid synovial cells, Rheumatology, 2004, 43: 416-422）。加えて、VIPは、炎症誘発性と抗炎症性エフェクタとの間の均衡を調整することによって、または自己反応性T-細胞に対する抑制活性を有するT-細胞の出現を誘発することによって、免疫耐性を維持することに関与する（Pozo et al., Tuning immune tolerance with Vasoactive Intestinal Peptide: A new therapeutic approach for immune disorders, peptide, 2007, 28 (9): 1833-1846）。

【0021】

成熟VIPは、以下の配列：HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSLN（配列番号：13）を伴う、28個のアミノ酸残基を有する。VIPは、170個のアミノ酸前駆体分子である処理前VIPの処理からもたらされる。VIPおよび例示的類似体の構造は、米国特許第4, 835, 252号、第4, 939, 224号、第5, 141, 924号、第4, 734, 400号、第4, 605, 641号、第6, 080, 837号、第6, 316, 593号、第5, 677, 419号、第5, 972, 883号、第6, 489, 297号、第7, 094, 755号、および第6, 608, 174号に説明されており、それぞれ、あらゆる目的に対して、参照することによって、全体として本明細書に組み込まれる。

【0022】

プロテアーゼ等に対するペプチド安定性を改良するためのいくつかの突然変異体は、文献に詳述されている（Onune et al. Physicochemical and pharmacological characterization of novel vasoactive intestinal peptide derivatives with improved stability, Eur. J. Pharm. Biopharm. 2009（参照することによって、あらゆる目的に対して、全体として本明細書に組み込まれる）を参照されたい）。これらの修飾されたVIPペプチドは、配列番号21（M17L、Metの酸化を防止するため）、配列番号2

10

20

30

40

50

2 (K 1 5 R、K 2 0 R、および K 2 1 R、タンパク質分解安定性を増加させるため)、および配列番号 2 3 (N 2 4 A および S 2 5 A、タンパク質分解／熱安定性を増加させるため) の配列を有する。本発明は、これらの修飾のうちの 1 つ以上を含む、修飾された V I P ペプチドとともに、本明細書に説明される、付加的 V I P 修飾を提供する。修飾された V I P 分子の実施例は、配列番号 1 4 - 1 5、1 7 - 2 7、4 0、4 2、4 4、および 5 0 の修飾された V I P ペプチドを含む。

【0023】

本明細書に説明される種々の実施形態において、修飾された V I P (例えば、配列番号: 1 3 を含む) (または本明細書に説明される機能的類似体) が、提供される。概して、V I P の機能的類似体は、1、2、3、または最大約 5 個のアミノ酸を含む、1 から 1 0 個のアミノ酸によって、N-または C-末端で切断される、機能的フラグメントを含む (配列番号: 1 3 に対して)。かかる機能的類似体は、未変性配列 (例えば、配列番号: 1 3) に対して、1 から 5 個のアミノ酸挿入、欠失、および／または置換 (集合的に) を含有してもよく、いずれの場合も、ペプチドの活性を留保する (例えば、V P A C 2 および／または V P A C 1 結合を通して)。かかる活性は、本明細書に説明されるアッセイ、および Delgado et al., The Significance of Vasoactive Intestinal Peptide in Immunomodulation, Pharmacol. Reviews 56 (2): 249-290 (2004) に説明される、活性を判定または定量化するためのあらゆる好適なアッセイを含め、あらゆる利用可能なアッセイを使用して、確認あるいはアッセイが行われてもよい。これらまたは他の実施形態において、本発明の修飾された V I P の V I P 成分は、未変性成熟配列 (配列番号: 1 3) と少なくとも約 5 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、または 9 7 % の同一性を有する。2 つの配列 (例えば、未変性配列と機能的類似体) の間の配列同一性の判定は、Tatusova et al., Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences, FEMS Microbiol Lett. 174: 247-250 (1999) を含む、あらゆる整合ツールを使用して達成することができる。

【0024】

一態様では、本発明は、非修飾 V I P (例えば、配列番号: 1 3 のアミノ酸配列から成るペプチド) と比較して、V P A C 2 または V P A C 1 に対して、受容体選好性を有する、修飾された V I P 分子を提供する。例えば、修飾された V I P は、V P A C 1 より V P A C 2 に対して、少なくとも約 2 : 1、約 5 : 1、約 1 0 : 1、約 2 5 : 1、約 5 0 : 1、約 1 0 0 : 1、約 5 0 0 : 1 以上の相対結合選好性を有してもよい。他の実施形態において、修飾された V I P は、V P A C 2 より V P A C 1 に対して、少なくとも約 2 : 1、約 5 : 1、約 1 0 : 1、約 2 5 : 1、約 5 0 : 1、約 1 0 0 : 1、約 5 0 0 : 1 以上の相対結合選好性を有してもよい。例えば、ある実施形態において、修飾された V I P は、実質的に、成熟非修飾ヒト V I P として、すなわち、成熟非修飾ヒト V I P (配列番号: 1 3) の約 2 倍以内の E C 5 0 によって、V P A C 2 受容体を活性化する。しかしながら、この同一の修飾された V I P は、V P A C 1 受容体を活性化する際、成熟非修飾ヒト V I P より、5 0 または 1 0 0 倍以上、有効性が低い。

【0025】

かかる修飾された V I P 分子は、異種哺乳類アミノ酸配列を含み得る、1 から約 5 0 0 個のアミノ酸を V I P の N-末端ヒスチジンへの付加等、修飾された N-末端領域を含有してもよい。例えば、修飾された V I P は、成熟 V I P の天然 N-末端ヒスチジンの N-末端側に、単一メチオニンを含含有してもよい。メチオニンは、隣接するアミノ酸がヒスチジンである時、E c o l i によって除去されないため、この分子もまた、E . c o l i または他の細菌発現系内で便宜的に調製される。代替として、N-末端アミノ酸は、天然に存在するアミノ酸、すなわち、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グルタミン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイ

シン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、バリン、およびプロリンのいずれかであってもよい。

【0026】

V I PのN-末端に付加される付加的配列は、1から約100個、1から約50個、1から約20個、1から約10個、および1から約5個のアミノ酸の生物学的に活性および生物学的に不活性配列を含む、あらゆる配列であってもよい。

【0027】

修飾されたV I PのN-末端は、構造M-Nを有してもよく、式中、Mは、メチオニンであって、Nは、V I P分子のN-末端である（例えば、配列番号14、図1）。このメチオニンは、細菌または真核性宿主細胞内のタンパク質の翻訳を支援する。したがって、修飾されたV I Pは、細菌および酵母発現系（例えば、E. coli）を含む、生物系中で生成され得る。メチオニンは、時として、細菌発現系内のメチオニンアミノペプチダーゼ（MA）によって除去される可能性があるが、ヒスチジン（H）は、MAに対して、最も有利に働かない2位における残基のうちの1つである。

【0028】

さらに他の実施形態において、N-末端は、治療分子の半減期を延長させるのに有効な哺乳類タンパク質等の哺乳類異種タンパク質との融合によって修飾される。かかる配列は、アルブミン、トランスフェリン、または抗体Fc配列等の哺乳類配列であってもよい。かかる配列は、米国特許第7,238,667号（特に、アルブミン共役物に関して）、米国特許第7,176,278号（特に、トランスフェリン共役物に関して）、および米国特許第5,766,883号に説明されており、それぞれ、参照することによって、全体として本明細書に組み込まれる。

【0029】

他の実施形態において、V I Pは、内因性ペプチダーゼまたはプロテアーゼ等のペプチダーゼまたはプロテアーゼによって、活性化可能である。かかる活性化可能配列は、国際特許出願第PCT/US2009/068656号に説明されており、参照することによって、全体として本明細書に組み込まれる。本明細書で使用されるように、用語「ペプチダーゼ」および「プロテアーゼ」は、互換性がある。例えば、V I Pは、ジペプチジルペプチダーゼによって活性化可能であるように設計されてもよい。例示的ジペプチジルペプチダーゼとして、ジペプチジルペプチダーゼ-1（DPP-I）、ジペプチジルペプチダーゼ-3（DPP-III）、ジペプチジルペプチダーゼ-4（DPP-IV）、ジペプチジルペプチダーゼ-6（DPP-VI）、ジペプチジルペプチダーゼ-7（DPP-VII）、ジペプチジルペプチダーゼ-8（DPP-VIII）、ジペプチジルペプチダーゼ-9（DPP-IX）、ジペプチジルペプチダーゼ-10（DPP-X）を含む。かかるジペプチダーゼのための基質配列は、周知である。

【0030】

活性化可能V I PのN-末端は、構造Z-Nを有してもよく、式中、Zは、ジペプチダーゼのための基質であって（例えば、Zは、ジペプチダーゼ露出によって除去される）、Nは、V I PのN-末端である。活性化可能V I Pは、式M-X-Nを伴う、N-末端配列を有してもよく、式中、Mは、メチオニンであって、Xは、Pro、Ala、またはSerであって、Nは、V I PまたはV I P類似体のN-末端である。このように、MおよびXは、宿主細胞（例えば、E. coli.）に対して、および／または、その後、ジペプチダーゼ（例えば、DPP-IV）に感応し、それらによって除去されるであろう。代替として、活性化可能V I PのN-末端配列は、X1-X2-Nであってもよく、式中、X1は、Gly、Ala、Ser、Cys、Thr、Val、またはProであって、X2は、Pro、Ala、またはSerであって、Nは、V I PのN-末端である。X1-X2は、ジペプチダーゼ（例えば、DPP-IV）のための基質であって、ジペプチダーゼ消化は、V I PまたはV I P類似体（例えば、配列番号15、図2）の所望のN-末端である、Nを露出させるであろう。かかる実施形態において、第2位におよびけるGly、Ala、Ser、Cys、Thr、Val、またはProは、Metの除去を信号伝達

10

20

30

40

50

し、それによって、ジペプチダーゼ（例えば、DPP-IV）によって、インビボで活性化され得る、X1-X2をN-末端上に残すため、タンパク質は、宿主細胞（例えば、E. coli.）中のM-X1-X2-N（式中、Mは、メチオニンである）をコードする構成物の発現によって生産されてもよい。天然成熟VIP N-末端を保有するように活性化される、かかる活性化可能VIP分子は、受容体選好性を示さない。

【0031】

別の実施形態において、修飾された活性化可能VIPのN-末端は、構造M-Z-Nを有してもよく、式中、Mは、メチオニンであって、Zは、ジペプチダーゼ（例えば、Zは、ジペプチダーゼ露出によって除去される）のための基質であって、Nは、活性VIP（修飾されたVIP）の非His N-末端である。例えば、修飾された活性化可能VIPは、式M-X-Nを伴う、N-末端配列を有してもよく、式中、Mは、メチオニンであって、Xは、Pro、Ala、またはSerであって、Nは、活性VIPの非His N-末端である。このように、MおよびXは、宿主細胞（例えば、E. coli.）、および／または、続いて、ジペプチダーゼ（例えば、DPP-IV）に対して感応し、および／または、続いて、それらによって除去されるであろう。代替として、活性化可能VIPのN-末端配列は、X1-X2-Nであってもよく、式中、X1は、Gly、Ala、Ser、Cys、Thr、Val、またはProであって、X2は、Pro、Ala、またはSerであって、Nは、活性VIPの非His N-末端である。X1-X2は、ジペプチダーゼ（例えば、DPP-IV）のための基質であって、ジペプチダーゼ消化は、VIPの所望の非His N-末端である、Nを露出させるであろう。

【0032】

さらに別の実施形態において、修飾された活性化可能VIPのN-末端は、構造M-Z-S-Nを有してもよく、式中、Mは、メチオニンであって、Zは、ジペプチダーゼ（例えば、Zは、ジペプチダーゼ露出によって除去される）のための基質であって、Nは、成熟VIP（His）のN-末端であって、Sは、ジペプチダーゼ消化後に露出され、前述のように、修飾されたVIPを提供する、1つ以上のアミノ酸である。例えば、修飾された活性化可能VIPは、式M-X-S-Nを伴う、N-末端配列を有してもよく、式中、Mは、メチオニンであって、Xは、Pro、Ala、またはSerであって、Nは、成熟VIPのN-末端であって、Sは、ジペプチダーゼ消化後に露出され、受容体選好性を提供するであろう、1つ以上のアミノ酸である。代替として、活性化可能VIPのN-末端配列は、X1-X2-S-Nであってもよく、式中、X1は、Gly、Ala、Ser、Cys、Thr、Val、またはProであって、X2は、Pro、Ala、またはSerであって、Nは、VIPの非His N-末端であって、Sは、ジペプチダーゼ消化後に露出されるであろう、1つ以上のアミノ酸である。X1-X2は、ジペプチダーゼ（例えば、DPP-IV）のための基質であって、ジペプチダーゼ消化は、Sを露出させるであろう。

【0033】

これらまたは他の実施形態において、VIP N-末端に対するN-末端化学修飾は、受容体選好性を提供してもよい。タンパク質の化学修飾およびその方法は、当技術分野において周知である。限定されない例示的化学修飾は、ペグ化、メチルグリオキサル化、還元的アルキル化、過ギ酸酸化、サクシニル化、アミノエチル化、および脂質化である（Clifton, New Protein Techniques, New Jersey: Humana Press, 1985. ISBX. 0-89603-126-8. Volume. 3 of. Methods in Molecular Biology）。システイン、メチオニン、ヒスチジン、リシン、アルギニン、トリプトファン、チロシン、カルボキシル基の修飾によって付着され得る、ペグ化等の化学基については、以前に説明されている（Lundblad, Techniques in Protein Modification, CRC Press, 1995参照）。

【0034】

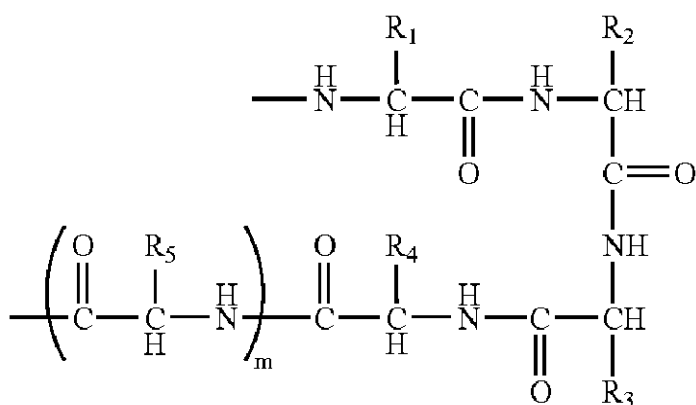
いくつかの実施形態において、本発明のVIPは、N-末端および／またはC-末端生体弾性ポリマー成分を含有する。「生体弾性ポリマー」は、逆温度転移を呈し得る。生体弾性ポリマーは、周知であって、例えば、Urryらの米国特許第5,520,672号に説明されている。生体弾性ポリマーは、ペントペプチド、テトラペプチド、および／またはノナペプチド（例えば、「エラスチン様ペプチド」）のエラストマー単位を含む、ポリペプチドであってもよい。本発明を實踐するために使用され得る生体弾性ポリマーは、米国特許第4,474,851号に記載されており、生体弾性ポリマーを形成するために使用することができる、いくつかのテトラペプチドおよびペントペプチドの反復単位を説明している。具体的生体弾性ポリマーもまた、米国特許第4,132,746号、第4,187,852号、第4,500,700号、第4,589,882号、および第4,870,055号に説明されている。生体弾性ポリマーのさらに他の実施例は、米国特許第6,699,294号、米国特許第6,753,311号、および米国特許第6,063,061号に記載されている。かかる生体弾性ポリマーの構造は、参照することによって、本明細書に組み込まれる。

【0035】

一実施形態において、生体弾性ポリマーは、一般式(VPGXG)_mのポリペプチドであって、式中、Xは、任意のアミノ酸（例えば、Ala、Leu、Phe）であって、mは、約20から約2000、または約50から約180である。例示的实施形態において、mは、60、90、120、150、または180である。第4アミノ酸としての種々のアミノ酸の頻度だけではなく、Xの同一性も変化する可能性がある。

【0036】

例えば、生体弾性ポリマーは、生体弾性ペントペプチドおよびテトラペプチドから選択される、反復エラストマー単位を含んでもよく、反復単位は、疎水性アミノ酸およびグリシン残基から成る群から選択される、アミノ酸残基を含み、反復単位は、以下の式のベータ回転を有する、配座に存在する。



式中、R₁－R₅は、アミノ酸残基1－5の側鎖を表し、mは、反復単位がテトラペプチドである時、0であって、または反復単位がペントペプチドである時、1である。ノナペプチド反復単位は、概して、連続テトラおよびペントペプチドから成る。疎水性アミノ酸残基は、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、およびメチオニンから選択される。多くの場合、反復単位の第1アミノ酸残基は、バリン、ロイシン、イソロイシン、またはフェニルアラニンの残基であって、第2アミノ酸残基は、プロリンの残基であって、第3アミノ酸残基は、グリシンの残基であって、第4アミノ酸残基は、グリシン、あるいはトリプトファン、フェニルアラニン、またはチロシン等の超疎水性残基である。特定の実施例は、テトラペプチドVal-Pro-Gly-Gly、テトラペプチドGGVP、テトラペプチドGGFP、テトラペプチドGGAPを含み、ペントペプチドは、Val-Pro-Gly-Val-Gly、ペントペプチドGVGV P、ペントペプチドGKGV P、ペントペプチドGVGF P、ペントペ

プチド G F G F P、ペンタペプチド G E G V P、ペンタペプチド G F G V P、およびペンタペプチド G V G I P である。例えば、米国特許第 6, 6 9 9, 2 9 4 号を参照されたい。

【0037】

ある例示的实施形態において、本発明の V I P は、N-末端および／または C-末端 E L P 成分を含有する。E L P 成分は、エラスチンタンパク質に関連する、またはそこから誘導される、構造的ペプチド単位または配列を含む、あるいはそれから成る。かかる配列は、生物学的利用能、治療的有效用量および／または投与頻度、生物学的作用、製剤適合性、タンパク質分解に対する抵抗、溶解度、半減期または投与後の体内における持続性の他の測定基準、および／または体内からのクリアランス速度のうちの 1 つ以上における、

10

【0038】

E L P が、V I P の C-末端に位置付けられると、前述のように、1 つ以上のアミノ酸の付加等、付加的修飾が、V I P N-末端において行われてもよい。代替実施形態において、V I P N-末端におけるかかる修飾は存在しない。

【0039】

E L P 成分は、3 個から約 2 0 個のアミノ酸、またはいくつかの実施形態において、5 個または 6 個のアミノ酸等、4 個から 1 0 個のアミノ酸の構造単位から構成される。個々の構造単位の長さは、特定の E L P 成分では、変動してもよく、または均一であってもよい。ある実施形態において、E L P 成分は、反復構造単位のポリテトラ、ポリペンタ、ポリヘキサ、ポリヘプタ、ポリオクタ、およびポリノナペプチドモチーフから構成される。例示的構造単位は、タンデム反復単位を含む、反復構造単位として採用され、またはいくつかの組み合わせにおいて採用され、治療成分の特性を改良するために有効な E L P を生成し得る、配列番号：1-12（以下参照）によって定義される単位を含む。したがって、E L P 成分は、以下に定義されるように、配列番号：1-12 から選択される、構造単位を含む、または本質的に、それから成ってもよい。

20

【0040】

かかる構造単位を含む、E L P 成分は、可変サイズであってもよい。例えば、E L P 成分は、配列番号：1-12 によって定義される単位の 1 つまたは組み合わせを含む、約 1 0 から約 5 0 0 個の構造単位、またはある実施形態において、約 2 0 から約 2 0 0 個の構造単位、またはある実施形態において、約 5 0 から約 1 5 0 個の構造単位、または約 7 5 から約 1 3 0 個の構造単位を含む、または本質的に、それから成ってもよい。E L P 成分は、配列番号：3（以下に定義される）によって定義される構造単位の反復等、約 1 2 0 個の構造単位を含んでもよい。したがって、E L P 成分は、約 5 0 から約 2 0 0 0 個のアミノ酸残基、または約 1 0 0 から約 6 0 0 個のアミノ酸残基、または約 2 0 0 から約 5 0 0 個のアミノ酸残基、または約 2 0 0 から約 4 0 0 個のアミノ酸残基の長さを有してもよい。

30

【0041】

いくつかの実施形態において、E L P 成分、またはある場合には、治療剤は、約 1 5 0 k D a 未満、または約 1 0 0 k D a 未満、または約 5 5 k D a 未満、または約 5 0 k D a 未満、または約 4 0 k D a 未満、または約 3 0 または 2 5 k D a 未満のサイズを有する。

40

【0042】

いくつかの実施形態において、非転移状態にある E L P 成分は、腎臓濾過から逃れるように、伸長された、比較的的非構造化かつ非球状形態を有してもよい。かかる実施形態において、本発明の治療剤は、約 6 0 k D 未満、またはいくつかの実施形態において、約 5 5、5 0、4 5、4 0、3 0、または 2 5 k D a 未満等、概して認知されている腎臓を通した濾過に対するカットオフ未満の分子量を有し、それでもなお、非結合（例えば、非融合または非共役）治療相当物より少なくとも 2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、1 0 倍、2 0 倍、または 1 0 0 倍長く、体内に存在する。

50

【0043】

これらまたは他の実施形態において、ELP成分は、治療ペプチドの生物学的作用に実質的または有意に影響を及ぼさない。したがって、本発明のELP融合を伴うVIPは、その非融合相当物と同一または類似の有効性（生物学的作用）を呈してもよい。本発明のELP融合を伴うVIPは、同一アッセイにおける非融合相当物によって呈されるものの10-100%の生物学的作用（例えば、インビトロまたはインビボで試験されるように）の有効性またはレベルを呈してもよい。種々の実施形態において、（活性化された）本発明のELP融合を伴うVIPは、非融合相当物によって呈されるものの少なくとも50%、60%、75%、80%、90%、95%以上の生物学的作用（例えば、インビトロまたはインビボで試験されるように）の有効性またはレベルを呈してもよい。

10

【0044】

ある実施形態において、ELP成分は、可逆的逆相転移を受ける。すなわち、ELP成分は、構造的に無秩序であって、転移温度（ T_t ）を下回る水中において、非常に可溶性であるが、温度が T_t を上回って上昇されると、急激な（2-3°C範囲）無秩序から秩序への相転移を呈し、ELP成分の脱溶媒和および凝集につながる。例えば、ELPは、遠心分離によって、溶液から容易に除去および単離され得る、十分なサイズに到達すると、不溶性ポリマーを形成する。かかる相転移は、可逆的であって、単離された不溶性ELPは、温度がELPの T_t を下回るように戻ると、緩衝溶液中に完全に再溶解され得る。したがって、本発明の治療剤は、いくつかの実施形態において、逆転移循環手順を使用して、例えば、治療剤の温度依存性溶解度、または媒体への塩付加を利用して、他の汚染タンパク質から高純度に分離され得る。連続逆相転移サイクルは、高純度を得るために使用することができる。温度およびイオン強度に加え、治療剤の逆転移を変調するために有用な他の環境変数は、pH、無機および有機溶質ならびに溶媒の添加、側鎖イオン化または化学修飾、および圧力を含む。

20

【0045】

ある実施形態において、ELP成分は、可逆的逆相転移を受けない、または生物学的に関連する T_t においてかかる転移を受けない。したがって、分子の生物学的および／または生理学的特性（本明細書のいずれかに説明されるように）における改良は、あらゆる相転移特性から完全または実質的に独立し得る。それでもなお、かかる相転移特性は、例えば、かかる分子の復元および精製に関連して、付加的実践的利点を付与し得る。

30

【0046】

本発明の実践では、ELP成分は、治療用組成物中のVIP成分を安定化させる、または別様に改良するように機能する。VIP治療剤を必要とする患者への結合されたVIP-ELP構成物の投与後、VIP成分およびELPは、相互に結合したままである一方、VIPは、例えば、疾患状態または生理学的状態の治療あるいは予防、もしくは他の治療介入に対して、治療的に活性である。

【0047】

ある実施形態において、ELP成分は、以下を含むが、それらに限定されない、構造単位から形成されてもよい。

40

(a) テトラペプチドVal-Pro-Gly-Gly、またはVPGG（配列番号：1）；

(b) テトラペプチドIle-Pro-Gly-Gly、またはIPGG（配列番号：2）；

(c) ペンタペプチドVal-Pro-Gly-X-Gly（配列番号：3）、またはVPGXG、式中、Xは、任意の天然または非天然アミノ酸残基であって、式中、Xは、随意に、ポリマーまたはオリゴマー反復間を変動する；

(d) ペンタペプチドAla-Val-Gly-Val-Pro、またはAVGV（配列番号：4）；

(e) ペンタペプチドIle-Pro-Gly-X-Gly、またはIPGXG（配列番号：5）、式中、Xは、任意の天然または非天然アミノ酸残基であって、式中、Xは

50

、随意に、ポリマーまたはオリゴマー反復間を変動する；

(e) ペンタペプチド I l e - P r o - G l y - V a l - G l y、または I P G V G (配列番号：6)；

(f) ペンタペプチド L e u - P r o - G l y - X - G l y、または L P G X G (配列番号：7)、式中、Xは、任意の天然または非天然アミノ酸残基であって、式中、Xは、随意に、ポリマーまたはオリゴマー反復間を変動する；

(g) ペンタペプチド L e u - P r o - G l y - V a l - G l y、または L P G V G (配列番号：8)；

(h) ヘキサペプチド V a l - A l a - P r o - G l y - V a l - G l y、または V A P G V G (配列番号：9)；

(I) オクタペプチド G l y - V a l - G l y - V a l - P r o - G l y - V a l - G l y、または G V G V P G V G (配列番号：10)；

(J) ノナペプチド V a l - P r o - G l y - P h e - G l y - V a l - G l y - A l a - G l y、または V P G F G V G A G (配列番号：11)；および

(K) ノナペプチド V a l - P r o - G l y - V a l - G l y - V a l - P r o - G l y - G l y、または V P G V G V P G G (配列番号：12)。

【0048】

配列番号：1-12によって定義されるかかる構造単位は、本発明によると、構造的な反復単位を形成してもよく、またはELP成分を形成するように組み合わせて使用されてもよい。いくつかの実施形態において、ELP成分は、全体的に（または、略全体的に）、配列番号：1-12から選択される構造単位の1つまたは組み合わせ（例えば、2、3、または4）から形成される。他の実施形態において、ELP成分の少なくとも75%、または少なくとも80%、または少なくとも90%が、配列番号：1-12から選択される構造単位の1つまたは組み合わせから形成され、反復単位として存在してもよい。

【0049】

ある実施形態において、ELP成分は、ペンタペプチド V a l - P r o - G l y - X - G l y (配列番号：3)のタンデム反復単位を含む、反復単位を含有し、式中、Xは、前述に定義されるようなものであって、ELP成分全体（V P G X G (配列番号：3)以外の構造単位を含んでもよい）に対して考慮される、V a l - P r o - G l y - X - G l y (配列番号：3)ペンタペプチド単位の割合は、ELP成分の約75%を上回る、または約85%を上回る、または約95%を上回る。ELP成分は、各反復内の構造単位の少なくとも2個または少なくとも3個間で変動するゲスト残基Xとともに、配列番号：3のペンタペプチドの5から15単位反復（例えば、約10単位または約12単位反復）を有する、モチーフを含有してもよい。ゲスト残基は、アミノ酸V、I、L、A、G、およびW等から独立選択されてもよい（かつ、所望の逆相転移特性を留保するように選択されてもよい）。例示的モチーフとして、V P G X G (配列番号：3)を含み、式中、ゲスト残基は、V（構造単位の40%から60%中に存在し得る）、G（構造単位の20%から40%中に存在し得る）、およびA（構造単位の10%から30%中に存在し得る）である。反復モチーフ自体が、例えば、約8から15回（例えば、約12回）等、約5から約20回反復され、例示的ELP成分を生成してもよい。ELP成分は、この段落に説明されるように、当然ながら、配列番号：1-12によって定義される構造単位のうちのいずれか1つ、またはそれらの組み合わせから構成されてもよい。例示的ELP成分は、V I PのC-末端に融合された、図1に示される。

【0050】

いくつかの実施形態において、ELP単位は、エラスチン様特性（例えば、逆相転移）を提供する、β-ターン構造を形成してもよい。β-ターン構造を生成するために好適な例示的ペプチド配列は、国際特許出願P C T / U S 9 6 / 0 5 1 8 6に説明されており、参照することによって、全体として本明細書に組み込まれる。例えば、エラスチンペンタペプチド配列、V P G X G (配列番号：3)における第4残基(X)は、β-ターンの形成を排除せずに、改変され得る。

10

20

30

40

50

【0051】

ある実施形態において、ELP成分は、ペンタペプチドVPGXG（配列番号：3）のポリマーまたはオリゴマー反復を含み、式中、ゲスト残基Xは、任意のアミノ酸である。Xは、自然発生または非自然発生アミノ酸であってもよい。いくつかの実施形態において、Xは、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グルタミン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リシン、メチオニン、フェニルアラニン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、およびバリンから選択される。いくつかの実施形態において、Xは、プロリンまたはシステイン以外の天然アミノ酸である。

【0052】

ゲスト残基X（例えば、配列番号：3、または他のELP構造単位に対して）は、非古典的（非遺伝的にコードされた）アミノ酸であってもよい。非古典的アミノ酸の実施例は、以下を含む：一般的アミノ酸のD-異性体、2, 4-ジアミノ酪酸、 α -アミノイソ酪酸、A-アミノ酪酸、Abu、2-アミノ酪酸、 γ -Abu、 ϵ -Ahx、6-アミノヘキサン酸、Aib、2-アミノイソ酪酸、3-アミノプロピオン酸、オルニチン、ノルロイシン、ノルバリン、ヒドロキシプロリン、サルコシン、シトルリン、ホモシトルリン、システイン酸、 ϵ -ブチルグリシン、 ϵ -ブチルアラニン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、 β -アラニン、フルオロアミノ酸、デザイナーアミノ酸、例えば、 β -メチルアミノ酸、 α -メチルアミノ酸、N α -メチルアミノ酸、および一般のアミノ酸類似体。

【0053】

Xの選択は、各ELP構造単位において（例えば、ゲスト残基Xを有する、本明細書に定義される各構造単位に対して）独立であってもよい。例えば、Xは、いくつかの実施形態において、疎水性側鎖を含め、正電荷を持つ側鎖を有するアミノ酸、負電荷を持つ側鎖を有するアミノ酸、または中性側鎖を有するアミノ酸として、各構造単位に対して独立して選択されてもよい。

【0054】

さらに他の実施形態において、ELP成分は、ペンタペプチドVPGXG（配列番号：3）、IPGXG（配列番号：5）、またはLPGXG（配列番号：7）、あるいはそれらの組み合わせのポリマーまたはオリゴマー反復を含んでもよく、式中、Xは、前述に定義されるようなものである。

【0055】

各実施形態において、ELP配列の構造単位、またはある場合には、ポリマーまたはオリゴマー反復は、分子の全体的効果を排除しない、1つ以上のアミノ酸残基によって、すなわち、説明されるように、治療成分にある改良を付与する際、分離されてもよい。ある実施形態において、かかる1つ以上のアミノ酸はまた、ELP成分の相転移特性を排除しない、または実質的に影響を及ぼさない（かかる1つ以上のアミノ酸の欠失と比較して）。

【0056】

結果として生じるELP成分の構造は、表記ELPk [X_iY_j-n]を使用して説明されてもよく、式中、kは、特定のELP反復単位を指し、括弧内の大文字は、1文字のアミノ酸コードであって、それらの対応する添字は、構造単位中の各ゲスト残基Xの相対比率を指し（該当する場合）、nは、構造的反復の数において、ELPの全長を示す。例えば、ELP1 [V₅A₂G₃-10]は、ペンタペプチドVPGXG（配列番号：3）の10個の反復単位を含有するELP成分を指し、式中、Xは、相対比率5：2：3のバリン、アラニン、およびグリシンであって、ELP1 [K₁V₂F₁-4]は、ペンタペプチドVPGXG（配列番号：3）の4個の反復単位を含有するELP成分を指し、式中、Xは、相対比率1：2：1のリシン、バリン、およびフェニルアラニンであって、ELP1 [K₁V₇F₁-9]は、ペンタペプチドVPGXG（配列番号：3）の9個の反復単位を含有するポリペプチドを指し、式中、Xは、相対比率1：7：1のリシン、バリン

、およびフェニルアラニンであって、E L P 1 [V ₁ A ₈ G ₇ - 1 0] は、ペントペプチド V P G X G (配列番号 : 3) の 1 0 個の反復単位を含有する E L P 成分を指し、式中、X は、相対比率 1 : 8 : 7 のバリン、アラニン、およびグリシンであって、E L P 1 [V - 5] は、ペントペプチド V P G X G (配列番号 : 3) の 5 個の反復単位を含有するポリペプチドを指し、式中、X は、排他的に、バリンであって、E L P 1 [V - 2 0] は、ペントペプチド V P G X G (配列番号 : 3) の 2 0 個の反復単位を含有するポリペプチドを指し、式中、X は、排他的に、バリンであって、E L P 2 [5] は、ペントペプチド A V G V P (配列番号 : 4) の 5 個の反復単位を含有するポリペプチドを指し、E L P 3 [V - 5] は、ペントペプチド I P G X G (配列番号 : 5) の 5 個の反復単位を含有するポリペプチドを指し、式中、X は、排他的に、バリンであって、E L P 4 [V - 5] は、ペントペプチド L P G X G (配列番号 : 7) の 5 個の反復単位を含有するポリペプチドを指し、式中、X は、排他的に、バリンである。この段落に説明されるかかる E L P 成分は、本発明と併用され、治療成分の治療特性を増加させ得る。

10

【 0 0 5 7 】

さらに、T t は、ゲスト残基の疎水性の関数である。したがって、ゲスト残基の同一性およびそれらのモル分率を変動させることによって、0 - 1 0 0 ° C 範囲にわたって逆転移を呈する E L P が合成され得る。したがって、所与の E L P 長さにおける T t は、E L P 配列における疎水性ゲスト残基のより大きな分率を組み込むことによって、低下されてもよい。好適な疎水性ゲスト残基の実施例は、バリン、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、トリプトファン、およびメチオニンを含む。中等度に疎水性である、チロシンもまた、使用されてもよい。反対に、T t は、グルタミン酸、システイン、リシン、アスパラギン酸塩、アラニン、アスパラギン、セリン、トレオニン、グリシン、アルギニン、およびグルタミンから成る群から選択される、好ましくは、アラニン、セリン、トレオニン、およびグルタミン酸から選択されるもの等、残基を組み込むことによって、向上されてもよい。

20

【 0 0 5 8 】

いくつかの実施形態において、E L P 成分は、約 3 5 から約 6 0 ° C、または約 3 8 から約 4 5 ° C 等の約 1 0 から約 8 0 ° C の範囲の T t (生理学的状態下) を提供するように選択または設計される。いくつかの実施形態において、T t は、約 4 0 ° C を上回る、または約 4 2 ° C を上回る、または約 4 5 ° C を上回る、または約 5 0 ° C を上回る。転移温度は、いくつかの実施形態において、対象または患者の体温を上回り (例えば、> 3 7 ° C)、それによって、インビボで可溶性のままであって、または他の実施形態において、T t は、体温を下回り (例えば、< 3 7 ° C)、治療剤の徐放のための薬物デポのインビボ形成等の代替利点を提供する。例えば、U S 2 0 0 7 / 0 0 0 9 6 0 2 を参照されたい (参照することによって、全体として本明細書に組み込まれる)。

30

【 0 0 5 9 】

T t は、概して、MW の減少に伴って上昇するため、E L P 成分の T t は、可変 E L P 鎖長を変動させることによって、修正され得る。分子量 > 1 0 0, 0 0 0 を有するポリペプチドの場合、U r r y らによって開発された疎水性スケール (P C T / U S 9 6 / 0 5 1 8 6、参照することによって、全体として本明細書に組み込まれる) は、具体的 E L P 配列の概算 T t を予測するための 1 つの手段を提供する。しかしながら、いくつかの実施形態において、E L P 成分長は、E L P 配列に、疎水性ゲスト残基 (例えば、疎水性側鎖を有するアミノ酸残基) のより大きな分率を組み込むことによって、標的 T t を維持しながら、比較的小さく保つことができる。分子量 < 1 0 0, 0 0 0 を有するポリペプチドの場合、T t は、以下の二次関数 : $T t = M_0 + M_1 X + M_2 X^2$ によって、予測または判定されてもよく、式中、X は、融合タンパク質の MW であって、 $M_0 = 1 1 6 . 2 1$ 、 $M_1 = - 1 . 7 4 9 9$ 、 $M_2 = 0 . 0 1 0 3 4 9$ である。

40

【 0 0 6 0 】

E L P 成分、したがって、治療成分と結合された E L P 成分の T t は、ゲスト残基 X の同一性および疎水性によって影響を受けるが、分子の付加的特性もまた、影響を受け得る

50

。かかる特性は、分子の溶解度、生物学的利用能、持続性、半減期、有効性、および安全性を含むが、それらに限定されない。

【0061】

以下の実施例セクションでは、ELP結合VIP剤が、VIPの非融合形態と比較して、有意な量の未変性VIPの生物学的活性を留保することが分かる。加えて、ELPが、長半減期を呈することが示される。対応して、ELPは、本発明にしたがって、治療剤の遊離（非共役）形態の半減期と比較して、ELPと共役されるVIPの半減期を実質的に増加させる（例えば、具体的実施形態において、10%、20%、30%、50%、100%、200%以上を上回って）ために使用され得る。循環半減期の延長を有する、修飾されたVIPは、週1から約5回、または1から約3回等、週1から約10回、投与されてもよい。それを含む、修飾されたVIPまたは医薬組成物は、約1日1回、または約1日おき、または約3日おき、または約週1回（すなわち、週1回投薬）投与されてもよい。

10

共役および結合

【0062】

本発明のある実施形態による組み換えで生産されたVIP融合タンパク質は、融合成分（例えば、ELP）と、VIPまたは遺伝子融合によって相互に関連付けられたVIPの類似体と、を含む。例えば、融合タンパク質は、VIPまたはELP成分によってインフレーションでクロニングされたVIPの類似体をコードするポリヌクレオチドの翻訳によって、発生されてもよい。

20

【0063】

ある実施形態において、ELP成分およびVIPまたはVIPの類似体は、種々の長さのリンカーペプチドを使用して融合され、より大きな物理的分離を提供し、融合された部分間の空間移動をより可能にし、したがって、例えば、その同種受容体に結合するために、VIPまたはVIPの類似体の近接性を最大限にすることができる。リンカーペプチドは、柔軟性またはより剛性である、アミノ酸から成ってもよい。例えば、柔軟性リンカーは、比較的に小さい側鎖を有し、かつ親水性であり得る、アミノ酸を含んでもよい。限定ではないが、柔軟性リンカーは、グリシンおよび／またはセリン残基を含んでもよい。より剛性であるリンカーは、例えば、（限定ではないが）チロシンまたはヒスチジン等のより立体障害のあるアミノ酸側鎖を含有してもよい。リンカーは、約50、40、30、20、10、または5個未満のアミノ酸残基であってもよい。リンカーは、例えば、組み換え融合を介して、VIPまたはVIPの類似体とELP成分に、かつそれらの間に共有結合され得る。

30

【0064】

リンカーまたはペプチドスペーサは、プロテアーゼ開裂可能または非開裂可能であってもよい。一例として、開裂可能ペプチドスペーサは、限定ではないが、Tev、トロンビン、Xa因子、プラスミン（血液プロテアーゼ）、金属プロテアーゼ、カテプシン（例えば、GFLG、配列番号：47等）、および他の身体区画に認められるプロテアーゼ等、可変タイプのプロテアーゼ（インビトロまたはインビボ）によって認識されるペプチド配列を含む。開裂可能リンカーを採用するいくつかの実施形態において、融合タンパク質は、不活性、低活性、または低融合能であってもよく、次いで、スペーサの開裂に応じて、インビボで活性化される。代替として、治療剤が融合として十分に活性である場合、非開裂可能スペーサが、採用されてもよい。非開裂可能スペーサは、例えば、式 $[(Gly)_n-Ser]_m$ を有する、非開裂可能スペーサ部分を含む、任意の好適なタイプであってもよく、式中、nは、1から4（含有）であって、mは、1から4（含有）である。代替として、主鎖ELPと異なる短ELP配列が、必要な効果を達成しながら、リンカーまたはスペーサの代わりに採用され得る。

40

【0065】

さらに他の実施形態において、治療剤は、ELP成分によって、各末端の側面に位置された治療成分を有する、組み換え融合物である。上記ELP成分のうちの少なくとも1つ

50

は、治療成分が、不活性であるが、単一ELP成分のタンパク質分解除去によって、インビボで活性化されるように、開裂可能スペーサを介して、付着されてもよい。結果として生じる単一ELP融合は、活性であって、インビボで半減期（または、本明細書に説明される他の特性）の向上を有する。

【0066】

他の実施形態において、本発明は、VIPまたはVIPの類似体およびELP成分の化学共役物を提供する。共役物は、当技術分野において周知の任意多くの方法によって、ELP成分をVIPまたはVIPの類似体に化学的に結合することによって作成され得る（例えば、Nilsson et al., 2005, Ann Rev Biophys Bio Structure 34:91-118参照）。いくつかの実施形態において、化学共役物は、直接、あるいは短または長リンカー部分を通して、治療タンパク性成分上の1つ以上の官能基、例えば、アミン、カルボキシル、フェニル、チオール、またはヒドロキシル基を通して、VIPまたはVIPの類似体をELP成分に共有結合し、共有結合共役物を形成することによって、形成され得る。例えば、ジイソシアネート、ジイソチオシアナート、カルボジイミド、ビス（ヒドロキシスクシンイミド）エステル、マレイミド-ヒドロキシスクシンイミドエステル、グルタルアルデヒド等の種々の従来のリンカーが、使用され得る。

【0067】

加えて、非ペプチド化学スペーサは、例えば、Academic Press, Inc. から出版されているBioconjugate Techniques, Greg T. Hermanson (1995) に説明されている官能性リンカー、およびPierce Biotechnology, Inc. (Rockford, Illinois) から入手可能なCross-Linking Reagents Technical Handbookに規定されているものを含め（その開示は、それらのそれぞれ全体として、参照することによって、本明細書に組み込まれる）、あらゆる好適なタイプであることができる。例証的化学スペーサは、Lysのアミン基に付着することができる、ホモ二官能性リンカー、ならびに一方の末端において、Cysに、他方の末端において、Lysに付着することができる、ヘテロ二官能性リンカーを含む。

【0068】

ある実施形態において、室温（または、ヒト体温、例えば、 $T_t > 37^\circ\text{C}$ ）で転移しない、比較的にかさいELP成分（例えば、約30 kDa、25 kDa、20 kDa、15 kDa、または10 kDa未満のELP成分）は、化学的に連結される、または架橋結合される。例えば、同一または異なる特性を有する、2つの比較的にかさいELP成分は、化学的に結合されてもよい。かかる結合は、いくつかの実施形態において、ELPのC-末端またはその周囲において、単一システイン残基の付与によって、インビボで行われてもよい。かかるELP成分はそれぞれ、標的における活性または親和性を増加させるように、1つ以上の治療成分に融合されてもよい。

ポリヌクレオチド、ベクター、宿主細胞、および生産のための方法

【0069】

別の態様では、本発明は、本発明の修飾されたVIPをコードするヌクレオチド配列を含む、ポリヌクレオチドを提供する。かかるポリヌクレオチドはさらに、VIPまたはVIP類似体をコードする配列および融合配列に加え、1つ以上の発現制御要素を含んでもよい。例えば、ポリヌクレオチドは、発現制御要素として、1つ以上のプロモーターまたは転写エンハンサー、リボソーム結合部位、転写終結信号、およびポリアデニル化信号を含んでもよい。ポリヌクレオチドはE. coli. 等の発現のための任意の好適な宿主細胞内に含有され得る、任意の好適なベクター内に挿入されてもよい。

【0070】

概して、ポリヌクレオチドを含むベクターは、治療剤の発現のための細胞中に導入され得る。ベクターは、治療剤をコードする挿入が、転写されることができるとの限り、エピソーム性のままである、または染色体に組み込まれた状態になることができる。ベクターは、

標準的組み換えDNA技術によって構成され得る。ベクターは、プラスミド、ファージ、コスミド、ファージミド、ウイルス、または原核または真核性細胞における複製および発現のために使用される、当技術分野において周知の任意の他のタイプであることができる。当業者は、プロモーター上へのRNAポリメラーゼの結合を調整する、プロモーターおよび他の配列等の広範囲に及ぶ転写信号を含む、当技術分野において周知の広範囲に及ぶ成分（発現制御要素等）が、かかるベクターに含まれてもよいことを理解するであろう。ベクターが発現される細胞内で有効であることが知られている任意のプロモーターは、治療剤の発現を開始させるために使用され得る。好適なプロモーターは、誘発性または構成性であってもよい。

【0071】

10

ある実施形態において、修飾されたVIPは、E. coliまたは他の細菌発現系から発現される。E. coliは、概して、修飾されたVIP分子が受容体特異性を維持するように、発現の際、N-末端メチオニンを除去しないであろう。本発明にしたがって、酵母発現系、哺乳類細胞発現系、およびバキュロウイルス系を含め、他の発現系が採用されてもよい。

【0072】

治療タンパク質は、ELP融合配列を採用する時、逆温度循環によって、復元されてもよい。具体的には、前述のように、ELP成分は、可逆的逆相転移を受ける。すなわち、ELP成分は、転移温度（ T_t ）を下回る場合、構造的に無秩序であって、水に非常に可溶性であるが、温度が T_t を上回って上昇されると、急激な（2–3 °C範囲）無秩序から秩序への相転移を呈し、ELP成分の脱溶媒和および凝集につながる。例えば、ELPは、遠心分離によって、溶液から容易に除去および単離され得る、十分なサイズに到達すると、不溶性ポリマーを形成する。かかる相転移は、可逆的であって、単離された不溶性ELPは、温度がELPの T_t を下回るように戻ると、緩衝溶液中に完全に再溶解され得る。したがって、本発明の治療剤は、いくつかの実施形態において、逆転移循環手順を使用して、例えば、治療剤の温度依存性溶解度、または媒体への塩付加を利用して、他の汚染タンパク質から高純度に分離され得る。連続逆相転移サイクルは、高純度を得るために使用され得る。温度およびイオン強度に加え、治療剤の逆転移を変調するために有用な他の環境変数として、pH、無機および有機溶質ならびに溶媒の添加、側鎖イオン化または化学修飾、および圧力を含む。

20

30

医薬組成物および投与の方法

【0073】

本発明はさらに、効果的量の本発明の修飾されたVIP（前述のように）とともに、薬学的に許容可能な担体、希釈剤、または賦形剤を含む、医薬組成物を提供する。かかる医薬組成物は、本明細書に説明されるように、例えば、自己免疫または炎症疾患を治療あるいは寛解するために有効である。

【0074】

本発明の治療剤は、それ自体で、ならびに薬学的に許容可能なエステル、塩、およびそれらの他の生理学的官能性誘導体を含む、種々の形態で投与されてもよい。かかる医薬製剤では、治療剤は、単独で、または（抗炎症剤または免疫抑制剤等の他の治療原料とともに使用される（それとともに調合されることを含む）ことができる。

40

【0075】

担体は、製剤の他の原料との適合性の観点から、薬学的に許容可能であって、それらの受容体に過度に有害となつてはならない。

【0076】

治療剤の製剤は、非経口ならびに経口投与のために好適なものを含む。例示的投与モダリティは、とりわけ、経口、頬、局所、経鼻、皮下、筋肉内、および静脈内を含む。非経口投与のための好適な製剤が、好ましい。

【0077】

本発明の治療剤を含む製剤は、便宜上、単位用量形態として存在してもよく、薬学分野

50

において周知の方法のいずれかによって調製されてもよい。かかる方法は、概して、治療剤を1つ以上の付属原料を形成する担体と結び付けるステップを含む。典型的には、製剤は、均一かつ密接に治療剤を液体担体、微粉化された固体担体、または両方と結び付け、次いで、必要に応じて、生成物を所望の製剤の用量形態に成形することによって、調製される。

【0078】

非経口投与のために好適な製剤は、便宜上、好ましくは、レピシエントの血液と等浸透圧である、治療剤の滅菌水溶液調製を含む（例えば、生理食塩水）。かかる製剤は、循環または1つ以上の器官に治療剤を標的化するように設計される、懸濁剤および濃化剤または他の微粒子系を含んでもよい。製剤は、単回投薬または複数回投薬形態として存在してもよい。

10

【0079】

前述の原料に加え、本発明の製剤はさらに、希釈剤、緩衝剤、香味剤、崩壊剤、表面活性剤、増粘剤、潤滑剤、保存料（抗酸化物質を含む）等から選択される、1つ以上の付属原料を含んでもよい。

【0080】

当業者は、各場合において（デポー投与のための単位用量を含む）望ましい用量を判定することができるが、治療利点を達成するための治療剤の好適な用量は、例えば、レピシエントの体重1キログラムあたり約1マイクログラム（ μg ）から約100ミリグラム（ mg ）の範囲内、または体重1キログラムあたり約10 μg から約50 mg の範囲内、または体重1キログラムあたり約10 μg から約10 mg の範囲内であってもよい。所望の用量は、投薬周期（例えば、1週間、2週間等…）を通して、適切な間隔において投与される、単回用量または2回以上のサブ用量として存在してもよい。これらのサブ用量は、例えば、単位用量形態あたり約10 μg から約500 mg 、または約50 μg から約200 mg 、または約50 μg から約100 mg の活性原料を含有する、単位用量形態で投与されることが可能である。代替として、レピシエントの状態がそのように要求する場合、用量は、継続注入として投与されてもよい。

20

【0081】

投与のモードおよび用量形態は、当然ながら、所与の治療用途に望ましく、かつ有効である、ペプチド活性治療剤の治療量に影響を及ぼすであろう。例えば、経口的に投与される用量は、非経口投与方法において使用される用量レベルの少なくとも2倍、例えば、2-10倍である可能性がある。デポー製剤はまた、剤が経時的徐放を有するように、有意により多くの治療剤が送達されることを可能にするであろう。

30

【0082】

正常な個人の血漿中に循環するVIPは、胃腸管内のVIP含有神経線維から生じ、かつ、脈管神経からのペプチド溢流を反映する（Cugini et al., 1991, Reg Pept 34:141-8）。大部分の血管作動性タンパク質のように、VIPは、比較的短い半減期を有する。血液中のVIPの半減期は、2分未満である（Domschke et al., 1978, Gut 19:1049-53; Burhol et al., 1978, Scand J Gastroent 13:807-813）。本明細書に説明される修飾されたVIPの利点の1つは、体内における半減期または持続性の延長である。本発明のある実施形態によると、VIPは、週1から約5回、または1から約3回等、週1から約10回、投与されてもよい。それを含む、修飾されたVIPまたは医薬組成物は、約1日1回、または約1日おき、または約3日おき、または約週1回、投与されてもよい。

40

【0083】

ある実施形態において、修飾されたVIPは、皮下または筋肉内注射によって、非経口投与される。投与は、本明細書に説明されるように、修飾されたVIPの単位用量であってもよい。

【0084】

50

修飾されたVIPは、非経口投与されると、1日1回、または週1回または2回、または月1回から5回、投与されてもよい。これらの実施形態において、修飾されたVIPは、本明細書に説明されるように、循環中に存続する、可溶性融合ペプチドとして投与され、比較的低頻度投与によって、持続的活性を提供してもよい。修飾されたVIPは、同様に本明細書に説明されるように、薬物デポーとして投与され、経時的に、循環中に融合ペプチドの徐放を提供してもよい。参照することによって、本明細書に組み込まれる、US 2007/0009602を参照されたい。

使用の方法

【0085】

他の態様では、本発明は、哺乳類における状態を治療、寛解、または防止する方法を提供する。かかる状態は、種々の心臓血管、免疫系（例えば、自己免疫）、および神経系状態を含む。例えば、修飾されたVIPは、自己免疫疾患または炎症状態に罹患する患者を含む、患者において、炎症誘発性と抗炎症性エフェクタとの間の均衡を調節するために使用されてもよい。修飾されたVIPに対する例示的適応症は、とりわけ、高血圧症、心筋線維症、心不全、心筋症、糖尿病、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、関節炎、炎症性腸疾患（IBD）、パーキンソン病、脳外傷、およびぜんそくを含む。

【0086】

したがって、本発明は、自己免疫または炎症によって特徴付けられる状態を含む、種々の状態を治療するための方法を提供する。方法は、本発明の有効量の修飾されたVIPをそれを必要とする患者に投与することを含む。

高血圧症

【0087】

本明細書に説明される種々の実施形態において、本発明は、有効量の修飾されたVIPを投与することを含む、それを必要とする患者における高血圧症を治療または防止する方法を提供する。本発明の修飾されたVIPによって治療可能な高血圧症の形態は、肺高血圧症、制御不良本態性高血圧症、および抵抗性高血圧症を含む。

【0088】

肺高血圧症は、比較的稀であるが、進行性肺動脈高血圧症ならびにより小さい肺動脈および細動脈の増加した厚さによって特徴付けられ、右心（RV）不全に至らせる、高度致死病である（Said et al., 2007, Circulation 115:1260-8）。VIPは、肺および体循環に関連している。肺血管床およびその肺高血圧症の変化に対して、VIPは、いくつかの哺乳類種の肺血管平滑筋をインビトロで弛緩させ、エンドセリンおよび他の血管収縮の作用を無力化または軽減し、低酸素性肺血管収縮を低減させ、肺高血圧症患者の肺血管平滑筋の増殖を阻害する。さらに、VIPは、肺血管平滑筋弛緩の生理学的非アドレナリン、非コリン系の共存伝達物質である。さらに、VIP含有神経は、通常、肺動脈に豊富であるが、肺高血圧症患者の肺動脈には存在せず、ペプチドの吸入が、それらの患者に有益な治療効果を及ぼしたことが報告されている（Petkov et al., 2003, J. Clin Invest. 111:1339-1346）。最後に、研究は、VIP^{-/-}マウスにおけるVIP補充療法が、肺高血圧症において重要となる病理変化の進行を防止または少なくとも減速させることが可能であることを示した（Said et al., 2007, Circulation 115:1260-8）。したがって、肺高血圧症患者へのVIPの適用は、疾患の血液動態および予後パラメータの実質的改善をもたらすことが期待される可能性がある（Petkov et al., 2003, J. Clin Invest. 111:1339-1346）。

【0089】

制御不良本態性高血圧症は、血圧が一貫して正常値より高く、高血圧の原因が見出され得ない。本態性高血圧症は、最も一般的高血圧症タイプであって、高血圧症患者の90-95%に影響を及ぼしており（Carretero et al., 2000, Circulation 101:329-35）、専門家らは、いくつかの未発見要因に

よって生じていると考えている。VIPの濃度は、発作誘発性本態性高血圧症ラットでは、低下しており（Mori et al., 1993, Jpn Heart J. 34:785-94）、ヒトVIPと立体的に安定化したリポソームの併用によって、自然発生高血圧ハムスターにおいて、全身動脈血圧を正常化することができる（Onyuk sel et al., 2006, Peptides 27:2271-5）。

【0090】

抵抗性高血圧症は、治療に応答しない、高血圧の形態である（すなわち、薬物の組み合わせが投与される場合でも、血圧は、高いままである）。血圧制御不良の原因は、多数ある。最も可能性のある原因は、過剰なナトリウム摂取、薬物への不耐性、服薬不履行、および二次性高血圧症のいずれかによる循環血液量の増加である（Graves JW, 2000, Mayo Clin Prac 75:278-84）。潜在的全身血管拡張剤として、VIPは、抵抗性高血圧症の顕著な特徴を生産する患者において、高血圧症の治療および防止のための有用性を有する。

心臓病

【0091】

付加的実施形態において、本発明は、有効量の修飾されたVIPを投与することを含む、それを必要とする患者における心臓病を治療または防止する方法を提供する。本発明の修飾されたVIPによって治療可能な心臓病の形態は、心筋線維症、心不全、および心筋症を含む。

【0092】

心臓におけるVIPの合成および分泌の変化は、心不全および心筋線維症等のいくつかの疾患の病因に役割を果たすと考えられる（Dvorakova MC, 2005, Drug News Perspect. 18:387-91）。例えば、VIPの濃度は、心筋症患者の組織および心不全の動物モデルの心臓組織の両方において、有意に低下される（Unverferth et al., 1986, J. Lab Clin Med 108:11-16）。さらに、VIPの減成は、線維症を伴う心臓において増加し、その結果、心筋VIP濃度が低下する。したがって、減少したVIPは、疾患の病因における重要な要因であると考えられ（Ye et al., 2003, Acta Physiol Scand 179:353-60）、低下したVIP濃度は、心不全の進行性悪化と関連付けられる。VIPの代謝クリアランス速度を低下させることが知られている、バソペプチダーゼ阻害薬オマバトリートの使用は、対照と比較して、収縮期血圧の低下、ならびに心筋線維症の減少をもたらした（Ye et al., 2004, Eur J Pharmacol 485:235-42）。VIPの防止効果もまた、虚血性および再灌流心筋において報告された（Kalfin et al., 1994, J Pharmacol Exp Ther 268:952-8）。したがって、本発明の修飾されたVIPの適用は、心不全、心筋症、および心筋線維症を含む、種々の病理学的状態において、有益な効果を有すると期待され得る。

2型真性糖尿病

【0093】

付加的実施形態において、本発明は、有効量の修飾されたVIPを投与することを含む、それを必要とする患者に、糖尿病を治療または防止する方法を提供する。具体的には、本発明の修飾されたVIPは、2型真性糖尿病の治療および防止のための有用性を有する。

【0094】

研究は、糖尿病ラットの胃洞および十二指腸のVIP含有量が、正常ラットのものより有意に低いことを示している（Gozes et al., 2004, Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 18:623-640）。胃十二指腸管におけるVIPの低組織レベルは、糖尿病患者において観察された異常消化管運動性に、部分的に寄与し得る（Adeghate et al., 2001, Arch Phys Bioc 109:246-51）。VIPは、インスリノー

マ細胞、マウス膵島、および灌流ラット膵臓からのインスリン分泌を刺激する。V P A C 1 の活性化は、グルコース生産の向上に参与している (G o z e s e t a l . , 2 0 0 4 , B e s t P r a c t R e s C l i n E n d o c r i n o l M e t a b 1 8 : 6 2 3 - 6 4 0) 一方、V I P 受容体 V P A C 2 は、膵島 β -細胞内に発現され、その活性化は、循環 A M P の向上およびインスリン分泌の刺激を生じさせる (D e S o u z a e t a l . , 2 0 0 9 , N a t u r e R e v i e w s 8 : 3 6 1 - 7) 。さらに、V I P は、ヒトにおけるグルカゴン分泌を刺激し、肝臓からのグルコース放出をもたらす。統合すると、これらの研究は、V I P が、グルコース代謝に広範囲に及ぶ直接的効果を有することを明らかにする。故に、V I P および本明細書に開示される融合ペプチド等の修飾された形態の V I P は、2 型糖尿病の治療および防止のために有用な療法であることが期待され得る。

10

V P A C 2 受容体選好性

【0095】

いくつかの実施形態において、修飾された V I P が、非修飾 V I P と比較して、V P A C 2 に対してより高い選好性を有する場合等、修飾された V I P は、患者において、遅延型過敏性反応等、炎症応答を減少させ得る。いくつかのかかる実施形態において、修飾された V I P は、自己反応性 T-細胞の発達を低減させる。これらの実施形態において、患者は、関節炎 (R A を含む)、炎症性腸疾患 (例えば、クローン病)、1 型糖尿病、多発性硬化症、移植拒絶反応、シェーグレン症候群、膵炎、ぶどう膜網膜炎、角膜炎、および敗血性ショック等、T H 1 型炎症または T H 1 自己免疫によって定義される、1 つ以上の状態を有し得る。

20

V P A C 1 受容体選好性

【0096】

いくつかの実施形態において、修飾された V I P が非修飾 V I P と比較して、V P A C 1 に対してより高い選好性を有する場合等、修飾された V I P は、患者において、遅延型過敏性反応等、T H 1 炎症応答を助長し得る。これらの実施形態において、患者は、ぜんそくまたは慢性閉塞性肺疾患 (C O P D) 等の T H 2 免疫と関連付けられた 1 つ以上の状態を有し得る。

【0097】

C O P D は、先進工業国における個人の 8 % にも影響を及ぼしている、気道の慢性炎症疾患である。C O P D に罹患する女性および男性の数が増加している。肺高血圧症は、慢性気道閉塞の一般的症状であるが、増加した血管抵抗の正確な機構は、不明である。C O P D における肺高血圧症の潜在的原因は、毛細血管床の気腫性破壊、肺血管のリモデリング、および低酸素性肺血管収縮を含む。

30

【0098】

V I P は、気道に認められる最も豊富な分子のうちの 1 つである。その抗炎症性および気管支拡張特性によって、C O P D およびぜんそくのための新規治療として提案されている。V P A C 1 上方調整が優勢であるが、両 V P A C 1 および V P A C 2 が、最適な抗炎症性信号伝達のために必要である (B u r i a n e t a l . , 2 0 1 0 , P e p t i d e s 3 1 : 6 0 3 - 8) 。故に、V I P および本明細書に開示される融合ペプチド等の修飾された形態の V I P による治療は、C O P D およびぜんそく患者の肺における慢性炎症を低減させるのに有用であることが期待され得る。

40

【0099】

本発明はさらに、限定として解釈されるべきではない、以下の実施例によって例証される。本願全体を通して引用される、すべての参考文献、特許、および公開特許出願の内容は、図面とともに、あらゆる目的に対して、参照することによって、全体として、本明細書に組み込まれる。

【実施例】

【0100】

実施例 1

50

VIP-ELP 構成物のクローニング

【0101】

VIPペプチドに対するDNA配列は、Simoncsits et al. (Synthesis, cloning and expression in Escherichia coli of artificial genes coding for biologically active elongated precursors of the vasoactive intestinal polypeptide, Eur. J. Biochem. 1988, 178 (2): 343-350、あらゆる目的に対して、参照することによって、全体として本明細書に組み込まれる)に説明されるようなものであるが、残基17は、未変性メチオニンであって、説明されるC-末端伸張のいずれも有しなかった(配列番号16参照)。

10

【0102】

2つの初期変異体を生成し、1つは、必要とされるATG開始コドンによって、N-末端にメチオニンを伴い(PB1046、配列番号17)、1つは、N-末端にトリペプチドMAAを伴う(PB1047、配列番号18)ものとした。PB1046上のメチオニンは、通常、メチオニンアミノペプチダーゼ(MA)によって除去されるが、ヒスチジンは、第2残基であって、MAに対するこの位置において、最も好ましくないアミノ酸のうちの1つであるため、メチオニンは、除去されない。PB1047上のメチオニンを除去し、AAを残し、次いで、DPPIVによって、インビトロまたはインビボで除去し、N-末端残基として、ヒスチジンを得ることができる。ELP1-120 DNA配列を担持する、VIP DNA配列をベクターpPB1031(図3参照)にクローニングし、T7プロモーターの制御下、発現カセットを得た。

20

【0103】

合成オリゴヌクレオチドP0045(配列番号31)、P0048(配列番号32)、P0064(配列番号33)、およびP0065(配列番号34)をともにアニールし、制限酵素XbaIで消化し、制限酵素XbaI/KpnIで消化し、発現プラスミドpPB1046を得た、プラスミドpPB1031に結合した(図4参照)。

【0104】

合成オリゴヌクレオチドP0066(配列番号35)、P0064(配列番号33)、P0067(配列番号36)、およびP0065(配列番号34)をともにアニールし、制限酵素XbaIで消化し、制限酵素XbaI/KpnIで消化し、発現プラスミドpPB1047を得た、プラスミドpPB1031に結合した(図5参照)。

30

【0105】

加えて、N-末端が活性のための絶対的要件ではないと仮定して、C-末端融合は、pPB1048もまた、生成した(図6参照)。合成オリゴヌクレオチドP0068(配列番号37)およびP0069(配列番号38)をともにアニールし、制限酵素BglI/NheIで消化し、発現プラスミドpPB1048を得た、プラスミドpPB1031に結合した。

実施例 2

VIP-ELP 構成物の発現

40

【0106】

E. coli生産菌株BLR(Novogen)を、プラスミドpPB1046、pPB1047、およびpPB1048で形質転換し、振とうフラスコ内において、37℃で、一晩かけて、富栄養培地で成長させた。細胞ペレットを、TEpH8.0緩衝剤に再懸濁させ、マイクロフルイダイザー(Microfluidics)を通して溶解し、遠心分離し、NaClの3Mへの添加による「転移」(参照)によって、結果として生じる可溶性溶解物から精製された不溶性材料および生成物を除去した。試料をさらに2回の転移に通し、最終精製試料を得た。これらをSDS-PAGEによって分析し、PB1046ならびにPB1047は、2つのバンドを得たことが認められた(図7参照)。これは、タンパク質分解の結果であると仮定し、培養物を再び成長させたが、今回は、溶解前に、1

50

5 分間、60℃まで加熱した。10% Tris-Acetate NuPAGEゲルによる分析は、タンパク質分解が阻害されたことを示した（図7参照）。

【0107】

タンパク質分解は、分解がC-末端融合PB1048上で見られなかったため、ペプチド内と、可能性として、ペプチドとELPの接合部近傍で生じた可能性が最も高い。そのタンパク質分解は、細胞質プロテアーゼ、あるいは溶解に応じて、活性化された、または異なって挙動する、細胞質プロテアーゼよりも、ペリプラスムプロテアーゼに関与する傾向にあるであろう、細胞の溶解前のプロテアーゼの熱変性によって防止され得る。

実施例 3

修飾されたVIP-ELP融合タンパク質のインビトロ活性

10

【0108】

VIPまたはVIP-ELP融合タンパク質のインビトロ生物学的活性および有効性を測定するために、細胞ベースのバイオアッセイを使用した。アッセイは、ヒト血管作動性腸管ペプチド受容体2（VPAC2）またはヒト血管作動性腸管ペプチド受容体1（VPAC1）のいずれかを発現するように操作されたチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞において、VIPまたはVIP-ELP融合タンパク質による治療にตอบสนองして、細胞内環状アデノシンリン酸（cAMP）濃度の増加を測定する。両VIPおよびVIP-ELP融合タンパク質は、これらの細胞において、cAMPの生産を刺激することができ、融合タンパク質が、受容体を結合し、活性化する能力を留保することを示す。受容体媒介リガンド結合および活性化後の細胞内のcAMP蓄積量は、存在する無傷ペプチドまたは融合タンパク質の量に直接比例するため、アッセイは、生体活性および相対的有效性を判定するために使用することができる。

20

【0109】

本実施例では、VIP-ELP融合タンパク質PB1046ならびにPB1047の活性を試験した。構成物PB1046は、N-末端にMetを伴うVIPを含有し、構成物PB1047は、そのN-末端にAla-Alaを伴うVIPを含有する。両構成物は、それらのC-末端にELP（1-120）を有する。第1の実験では、構成物の活性を、VIP受容体VPAC2を発現するCHO細胞を使用して試験した。細胞による種々の濃度の融合タンパク質の培養の30分後、細胞を溶解し、生産されたcAMPの量を、市販のキットを使用して、測定した。PB1047は、細胞への添加に先立って、DPP-IV処理された。図8は、その結果を示す。示されるように、修飾されたVIP融合タンパク質PB1046は、未変性VIPタンパク質より幾分活性である一方、PB1047は、活性が少ない。

30

【0110】

PB1046ならびにPB1047の活性はまた、VIP受容体VPAC1を発現するCHO細胞を使用して試験した。細胞による種々の濃度の融合タンパク質の培養の30分後、細胞を溶解し、生産されたcAMPの量を、市販のキットを使用して、測定した。PB1047は、細胞への添加に先立って、DPP-IV処理された。図9は、その結果を示す。今回、修飾されたVIP融合タンパク質PB1046は、未変性VIPタンパク質より遥かに活性が少ない一方、未変性VIPに対するPB1047の相対的活性は、VPAC2受容体に対する試験のものと略同一である。これらの結果は、PB1046が、VPAC1受容体よりVPAC2受容体を選択的に活性化させることを示唆する。

40

実施例 4

VIP-ELP融合タンパク質の血圧効果

【0111】

修飾されたVIP-ELP融合タンパク質PB1047の活性もまた、インビボで試験した。具体的には、血圧に及ぼすVIP-ELP融合タンパク質の効果を試験した。自然発生高血圧ラットを、PB1047（10mg/kg）または緩衝対照で皮下処理し、それらの血圧を、融合タンパク質の投与後、いくつかの時点で測定した。各群に対して、5匹の動物を使用し、グラフは、平均および標準偏差を示す。PB1047は、投与後少な

50

くとも12時間の間、これらの動物において、収縮期および拡張期血圧を有意に低下させ（図10参照）、VIP-ELP融合タンパク質が活性であって、VIP関連疾患の治療における医薬品として、潜在的に使用される可能性があることを示した。

実施例 5

付加的VIP-ELP融合タンパク質

【0112】

PB1047のDPPIV治療は、N-末端から両AAおよびHSの除去ならびにペプチドの不活性化をもたらした。したがって、プラスミドpPB1064は、HGが、HSよりDPPIVに対して抵抗性があるため、N-末端が、MAAHS、配列番号：46の代わりに、MAAHG、配列番号：45に変更されるように構成される。

10

【0113】

プラスミドpPB1056はまた、VPGXG、配列番号：3に基づいて、逆帯電したリンカー（配列番号20）によって、VIPをコードし、ELP前で反復するように構成される。

実施例 6

付加的VIP-ELP融合タンパク質PB1120のクローニング、発現、および分析

【0114】

VIP DNA配列をELP1-120 DNA配列を担持するベクターpPB1120（配列番号：48）（図11参照）にクローニングし、T7プロモーターの制御下、発現カセットを得た。次に、E. coli生産菌株BLRを、前述のように、pPB1120プラスミドによって形質転換し、富栄養培地で成長させた。結果として生じるVIP-ELP1-120融合ペプチドPB1120の試料を精製し、SDS-PAGEを介して分析した。

20

【0115】

PB1120融合ペプチドの活性を、インビトロで試験した。実施例3に前述のように、VIP受容体（VPAC1）を発現するCHO細胞を利用したアッセイを使用して、活性を試験した。図12が実証するように、PB1120は、VPAC1受容体上の未変性VIPペプチドより約1.4倍活性が低かった。比較すると、N-末端メチオニン残基を含有する構成物PB1046は、未変性VIPペプチドより約11倍活性が低かった。複数の実験の過程にわたって、PB1120は、VPAC1受容体上の未変性VIPペプチドより1.4から6倍活性が低かった。

30

【0116】

図13は、VPAC2受容体に対するPB1120の活性を例証する。VPAC1受容体に対して見られた結果同様に、PB1120は、VPAC2に対する未変性VIPペプチドより若干低い活性を示す（約1.5倍未満）。しかしながら、VPAC1に関して見られた結果と対照的に、PB1046は、未変性ペプチドと比較して、VPAC2に対して等しい効力を有した。複数の実験の過程にわたって、PB1120は、VPAC2受容体上の未変性VIPペプチドより1.5から7倍活性が低かった。

実施例 7

修飾されたVIP-ELP融合タンパク質PB1120の薬物動態プロファイル

40

【0117】

前述の生物学的有効性アッセイに加え、VIP-ELP融合タンパク質PB1120の薬物動態プロファイルもまた、検証した。サルに、PB1120の単回皮下（SC）注射（3mg/kgで投薬）を与え、血漿薬物濃度を、1週間にわたって、毎日測定した。3匹の動物を使用し、グラフは、平均および標準偏差を示す。PB1120の初期用量の半分以上が、第4日目まで循環中に残留した（図14Aおよび14B参照、それぞれ、線形および片対数軸を使用して、SC投与後のPB1120の平均血漿濃度を例証する）。

【0118】

このデータに基づいて、投与部位からの緩慢な吸収に一致して、PB1120の皮下投与後の吸収相が延長されたと考えられる。明白な消失半減期（ $t_{1/2}$ ）は、血漿濃度の減

50

衰に基づいて、9.9から45.8時間の範囲に及んでおり、真の消失より緩慢な吸収を反映している可能性が高い。これらのデータは、VIP-ELP融合タンパク質が、未変性VIPと比較して、劇的半減期の延長を有し、潜在的に、間隔を延長して投与することができることを示す（例えば、約1日1回、約1日おき、約3日おき、または約週1回、投与されてもよい）。

実施例 8

血圧に及ぼす修飾されたVIP-ELP融合タンパク質PB1120の効果

【0119】

収縮期、拡張期、および平均動脈血圧に及ぼす修飾されたVIP-ELP融合タンパク質PB1120の効果を測定するために、ラットに、0.1mg/kg、1mg/kg、または5mg/kgのPB1120の単回皮下注射を与え、3時間間隔にわたって評価した。図15A、15B、および15Cは、それぞれ、収縮期、拡張期、および平均動脈圧における平均変化を示す。図15Dは、PB1120の投与後の3時間間隔にわたる平均心拍数を示す。図15A-Cが実証するように、1mg/kgまたは5mg/kgのPB1120を注射されたラットは、注射9時間後、収縮期、拡張期、および平均動脈圧に有意な低下を示し、VIP-ELP融合タンパク質PB1120が、潜在的に、罹患した個人において、高血圧症を治療または防止する目的のために投与され得ることを示す。

【0120】

別様に定義されない限り、本明細書のすべての技術および科学用語は、本発明が属する当業者によって一般的に理解されているものと同一意味を有する。本明細書に説明されるものと類似または同等のあらゆる方法および材料が、本発明の実践または試験において使用することができるが、好ましい方法および材料が、本明細書に説明される。引用されるすべての刊行物、特許、および特許公開は、あらゆる目的に対して、参照することによって、全体として本明細書に組み込まれる。

【0121】

本明細書に論じられる刊行物は、本願の出願日に先立つそれらの開示に対してのみ提供される。本発明は、本発明が、先行発明を理由として、かかる刊行物に先行する権利が与えられないことの承認として、いかようにも解釈されるものではない。

【0122】

本発明は、その具体的実施形態と関連して説明されたが、さらなる修正も可能であって、本願は、一般に、本発明の原理に従う、本発明のあらゆる変形例、使用、または適応を網羅することを意図し、本発明が属する当技術分野において周知または慣行の範囲内であって、前述および後続の添付の請求項の範囲内の本質的特徴に適用され得る、本開示からの逸脱も含むことを理解されるであろう。

【図 1】

配列番号 14

M-VIP ELP1-120(MをVIPのN末端に付加)

MHSDAVFTDNYTRLRKOMAVKKYLSILN

VPGV_G VPGV_G VPGG_G VPG_AG VPGV_G VPGV_G VPGV_G VPGG_G VPG_AG VPGG_G
 VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGVG VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGGG
 VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGVG VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGGG
 VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGVG VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGGG
 VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGVG VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGGG
 VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGVG VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGGG
 VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGVG VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGGG
 VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGVG VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGGG
 VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGVG VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGGG
 VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGVG VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGGG
 VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGVG VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGGG
 VPGWP(配列番号:14)

ELP1-120 = (VPGXG)₁₂₀、式中、X = V₅G₃A₂

【図 2】

配列番号 15

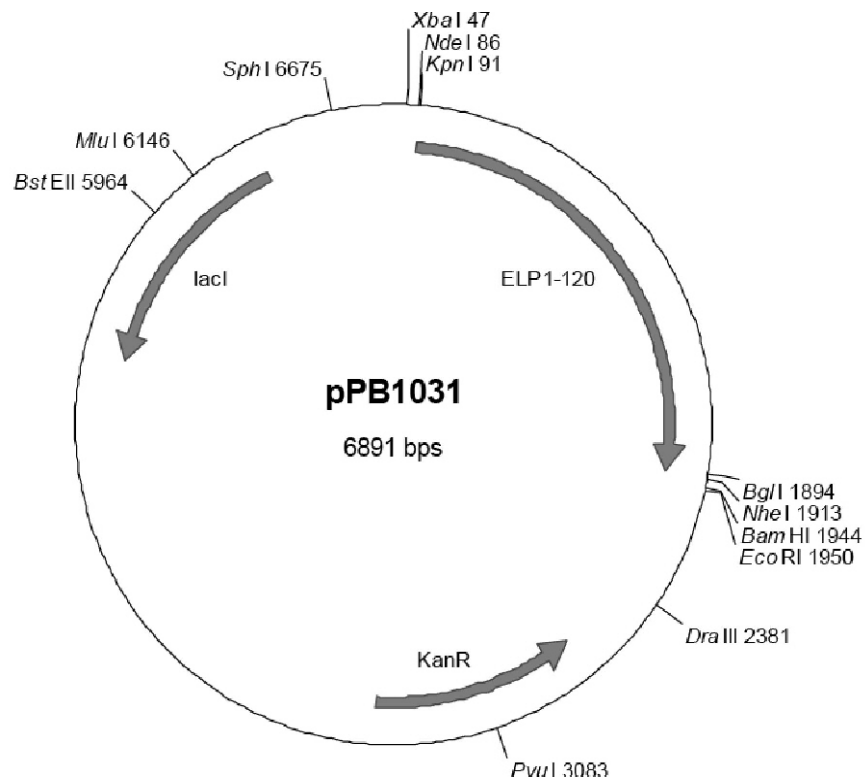
MAA-VIP ELP1-120(処理前、MAAをVIPのN末端に付加)

MAAHSDAVFTDNYTRLRKOMAVKKYLSILN

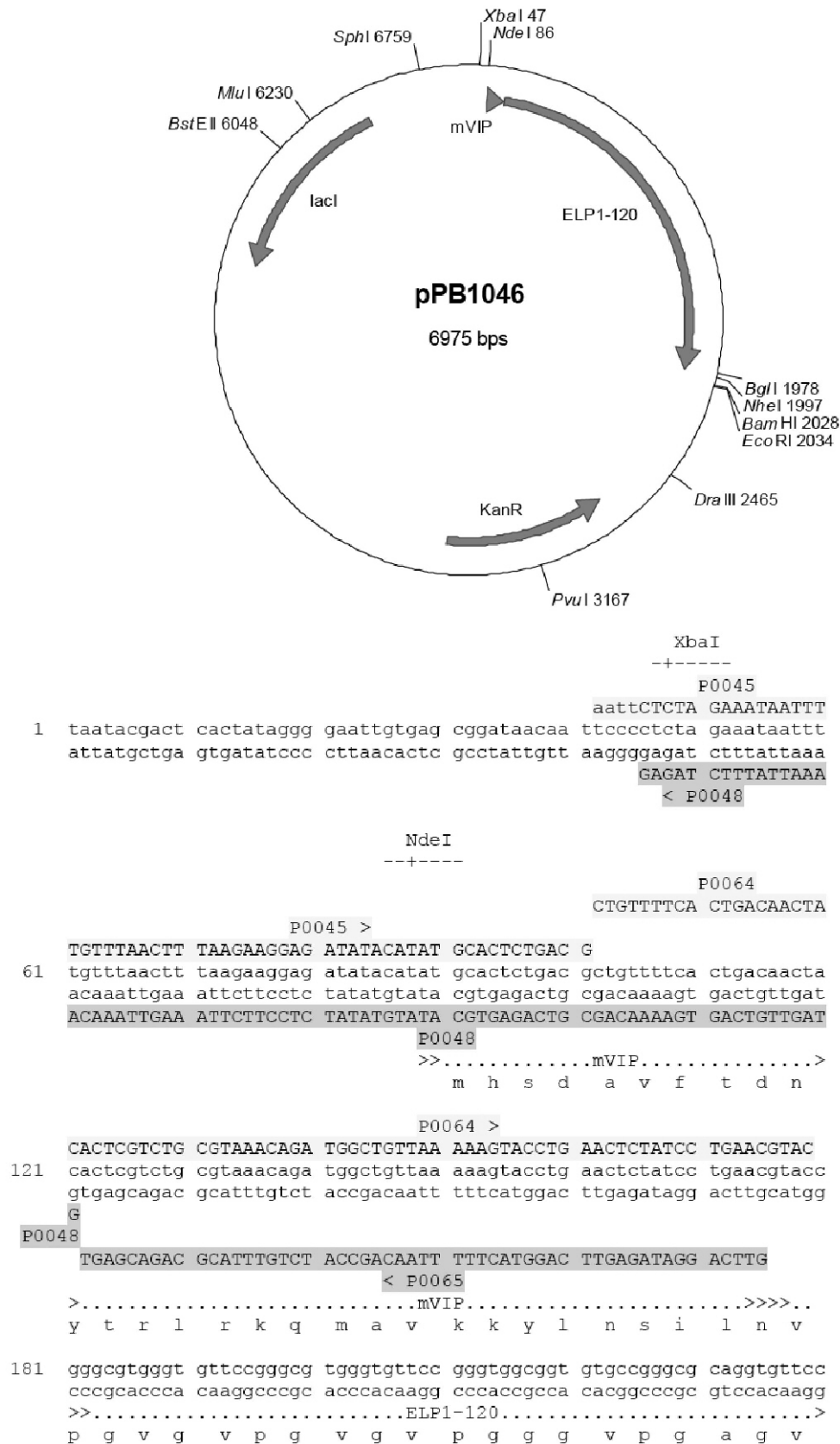
VPGV_G VPGV_G VPGG_G VPG_AG VPGV_G VPGV_G VPGV_G VPGG_G VPG_AG VPGG_G
 VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGVG VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGGG
 VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGVG VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGGG
 VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGVG VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGGG
 VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGVG VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGGG
 VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGVG VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGGG
 VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGVG VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGGG
 VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGVG VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGGG
 VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGVG VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGGG
 VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGVG VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGGG
 VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGVG VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGGG
 VPGWP(配列番号:15)

ELP1-120 = (VPGXG)₁₂₀、式中、X = V₅G₃A₂

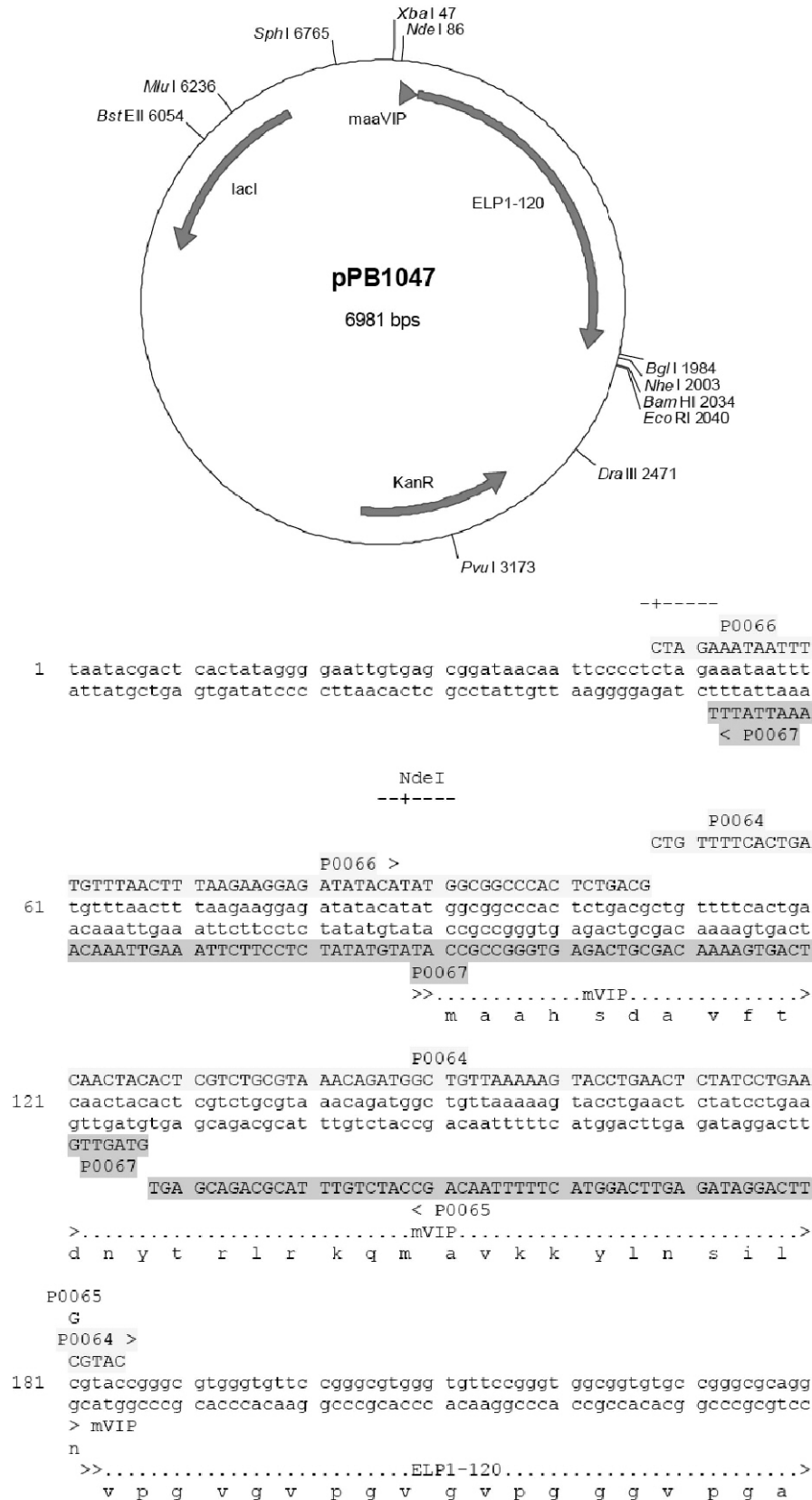
【図 3】



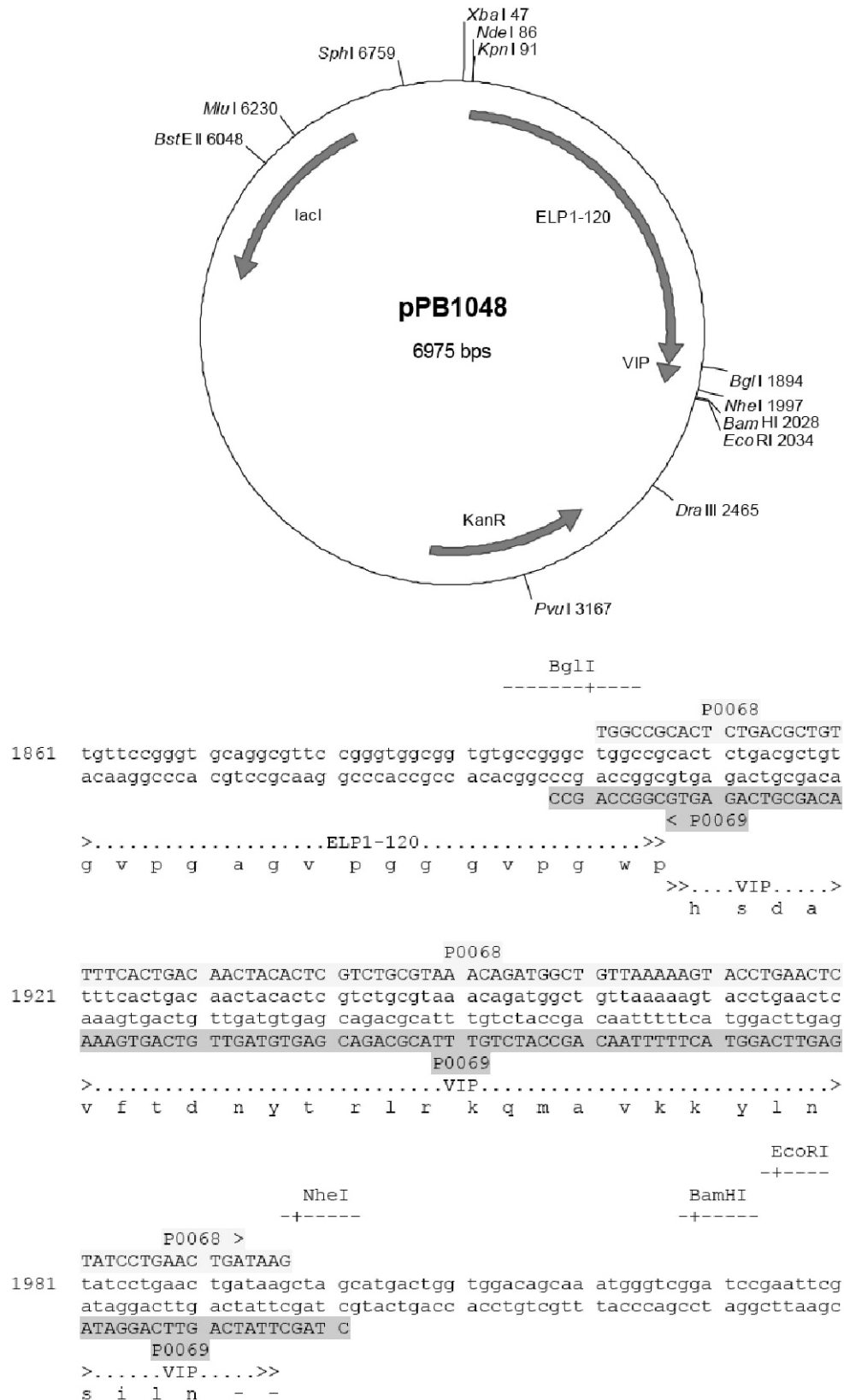
【 図 4 】



【図 5】

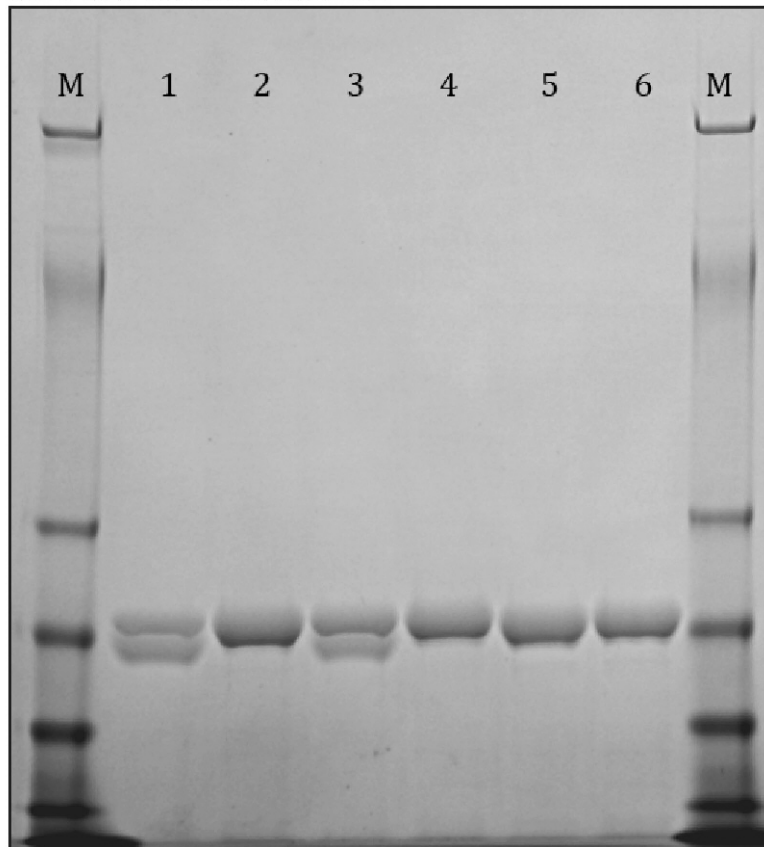


【図 6】



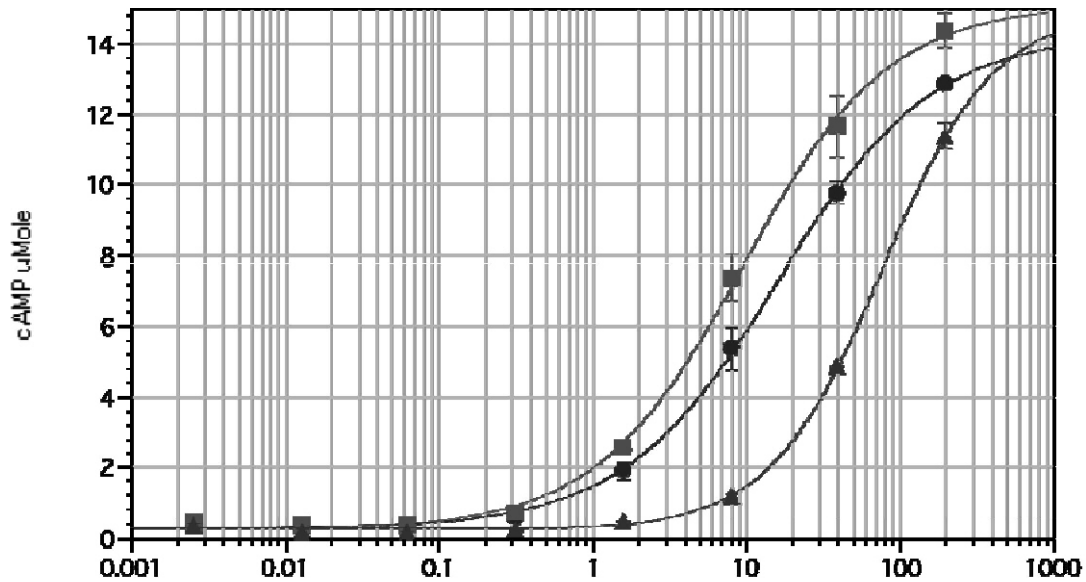
【図 7】

10% Tris-Acetate NuPAGE



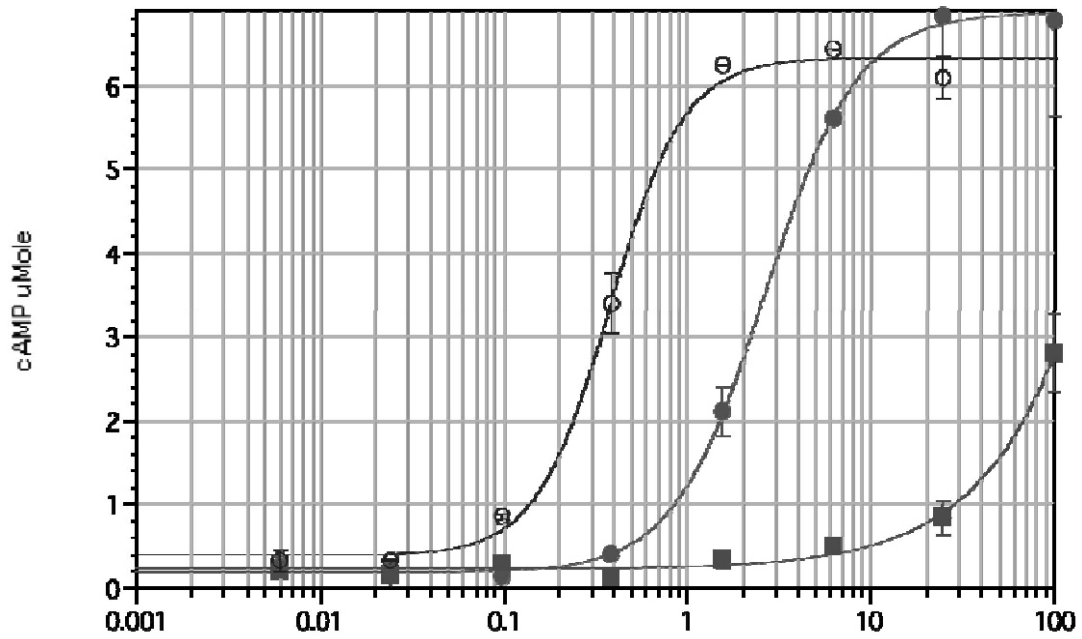
M. Mol. Wt. マーカ
 1. PB1046
 2. PB1046 加熱*
 3. PB1047
 4. PB1047 加熱*
 5. PB1048
 6. PB1048 加熱*
 M. Mol. Wt. マーカ

【図 8】



4-P Fit: $y = (A - D) / (1 + (x/C)^B) + D$:	A	B	C	D	R ²
● VIP-ペプチド (VIP2: 濃度 vs 平均結果...)	0.269	0.859	16.2	14.3	0.999
■ PB1046 (A2: 濃度 vs 平均結果)	0.248	0.909	9.53	15.1	0.999
▲ PB1047 (C2: 濃度 vs 平均結果)	0.237	1.19	77.3	15	1

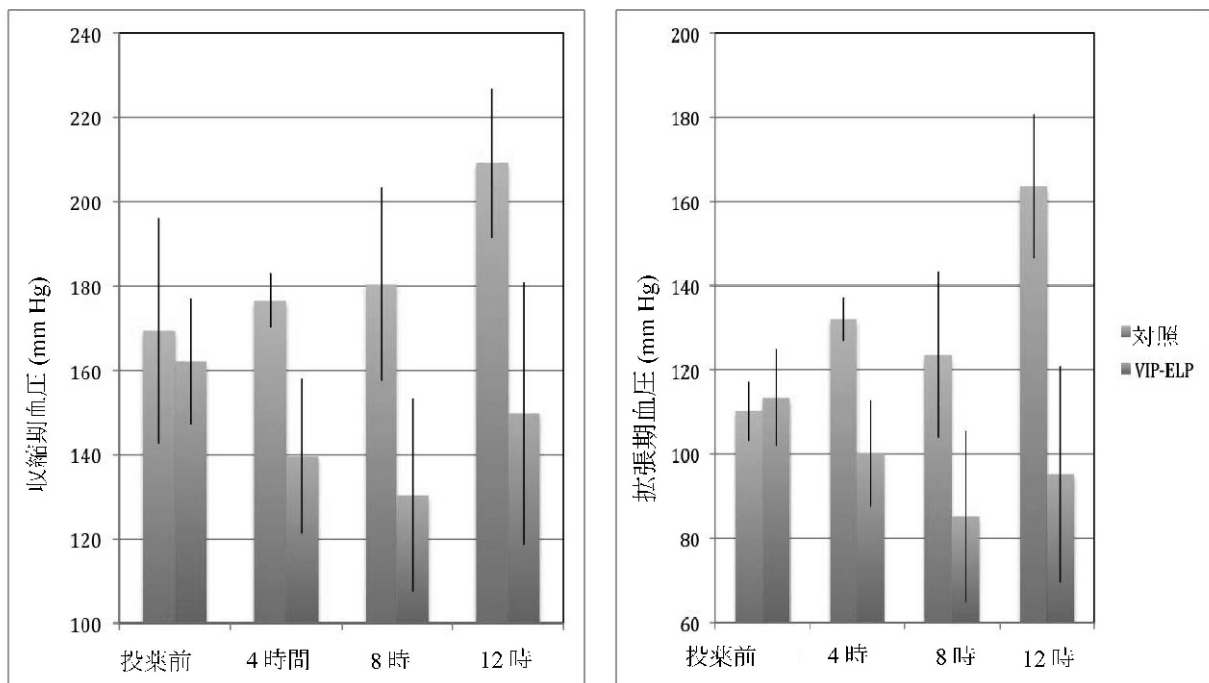
【図 9】



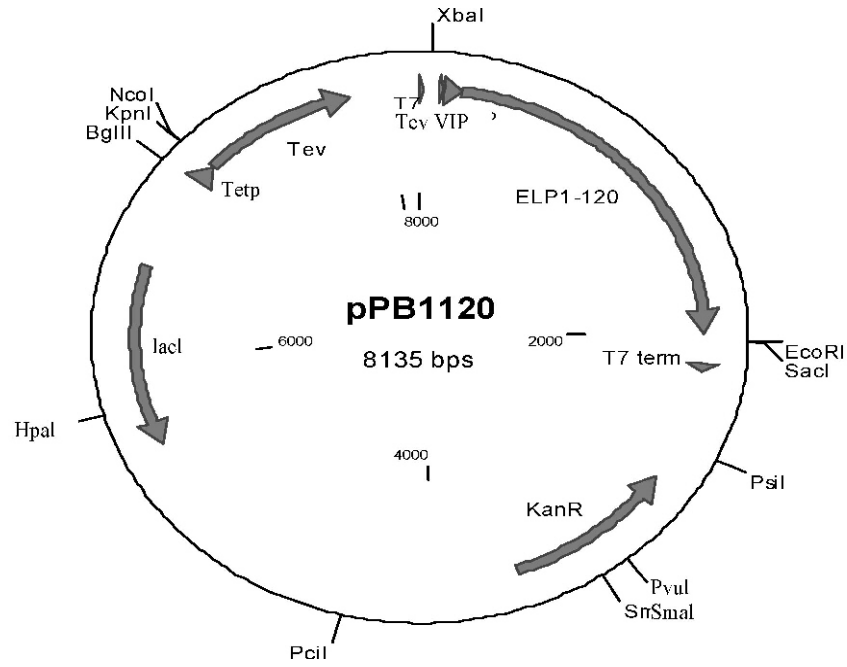
4-P Fit: $y = (A - D) / (1 + (x/C)^B) + D$

	A	B	C	D	R ²
● PB1047 (B: 濃度 vs 平均結果)	0.182	1.73	2.66	6.87	1
■ PB1046 (C: 濃度 vs 平均結果)	0.224	0.96	1.88e+08	2.72e+06	0.993
○ VIP-ペプチド (VIP: 濃度 vs 平均結果)	0.386	2.15	0.379	6.32	0.997

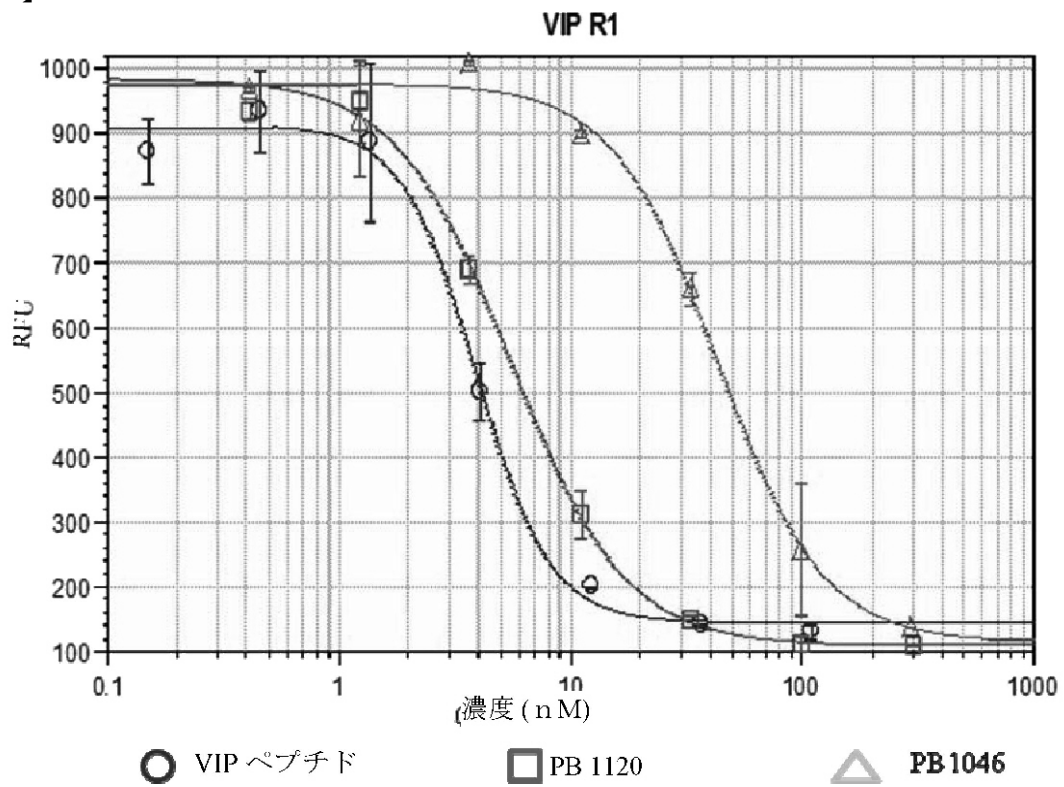
【図 10】



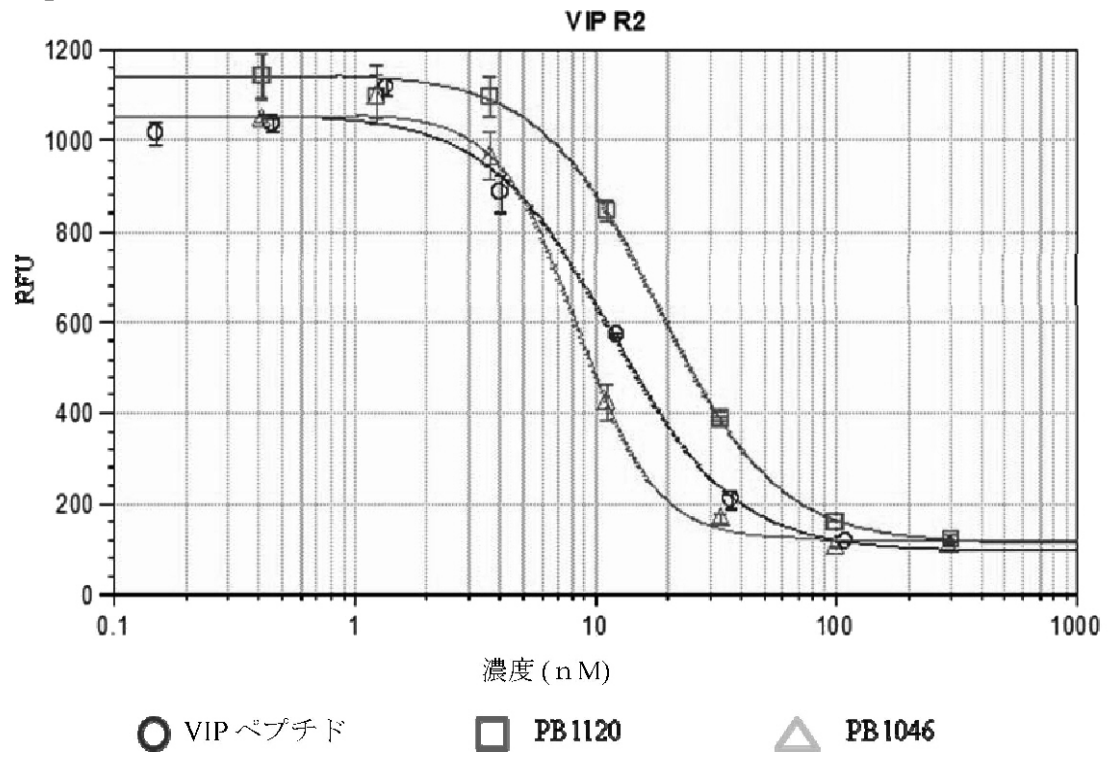
【図 1 1】



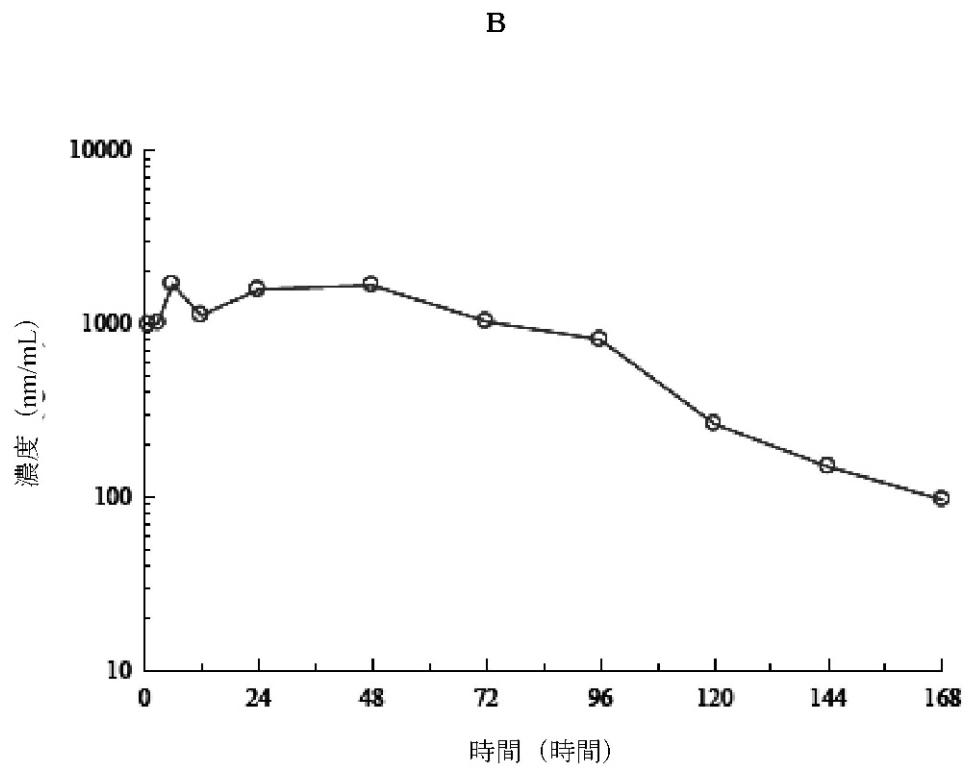
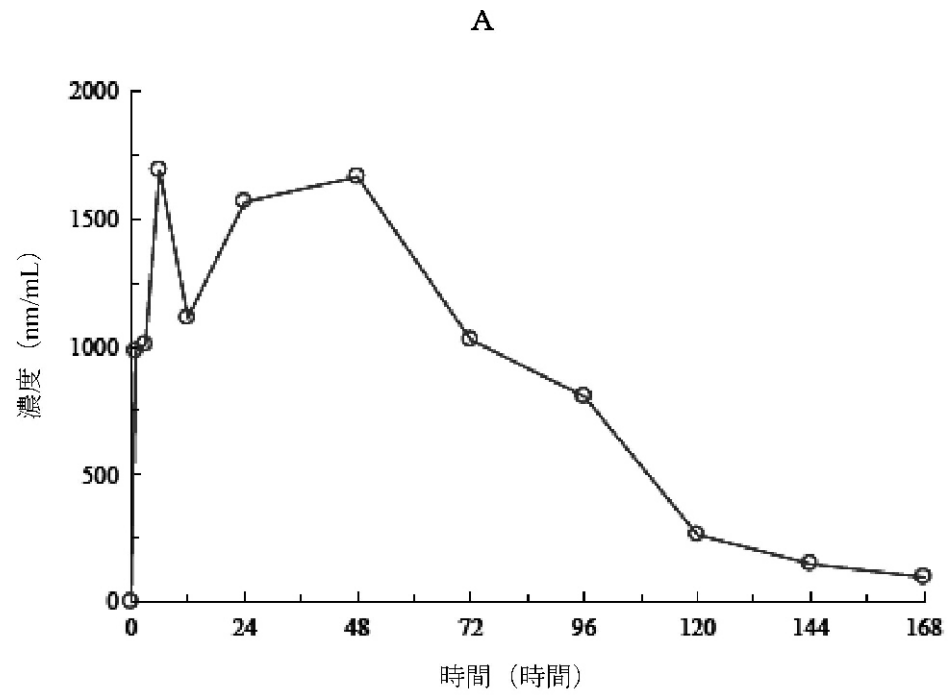
【図 1 2】



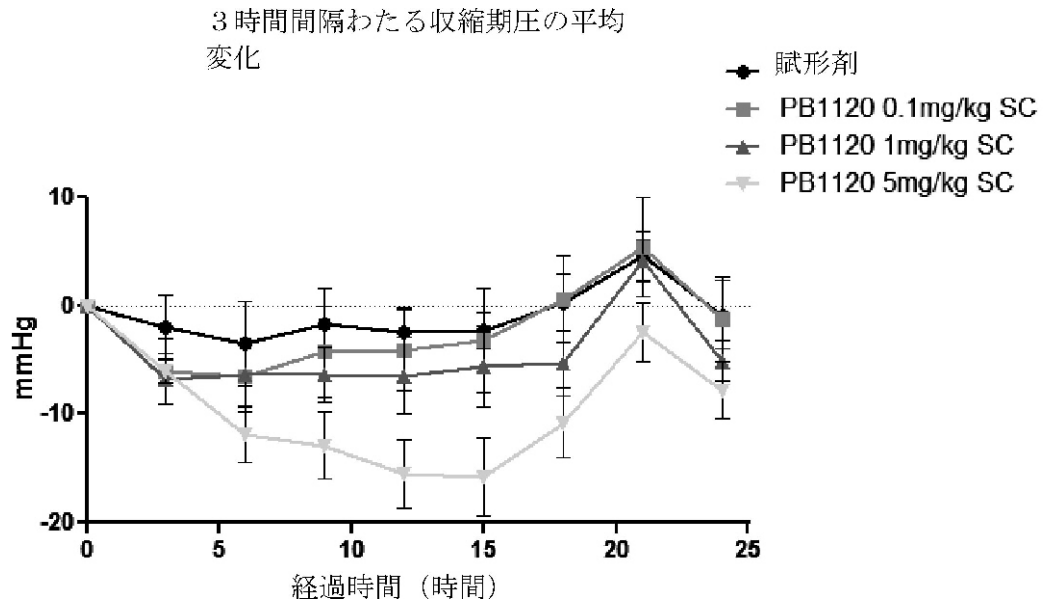
【図 1 3】



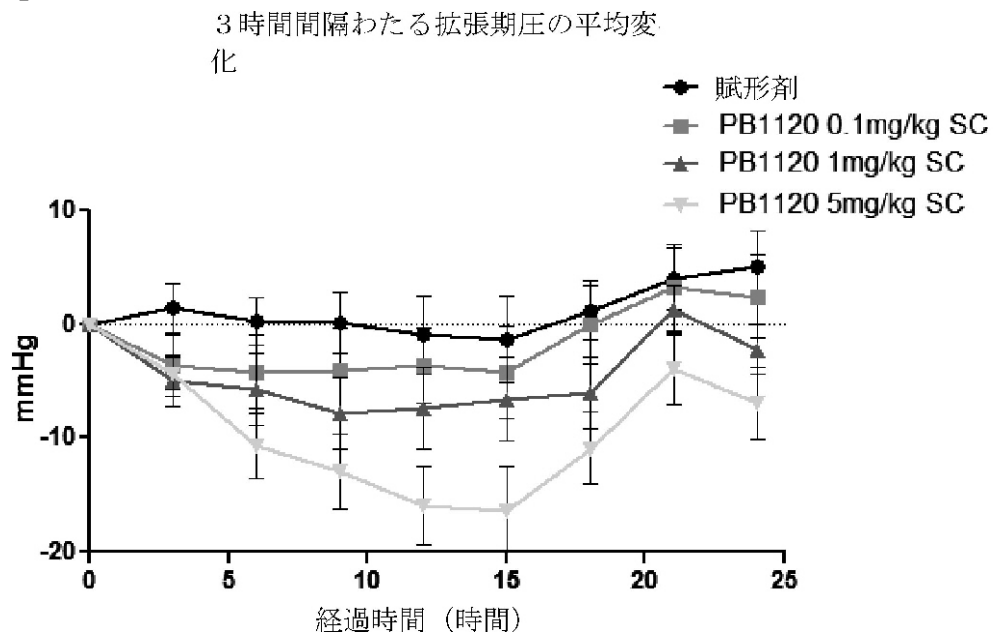
【図 1 4】



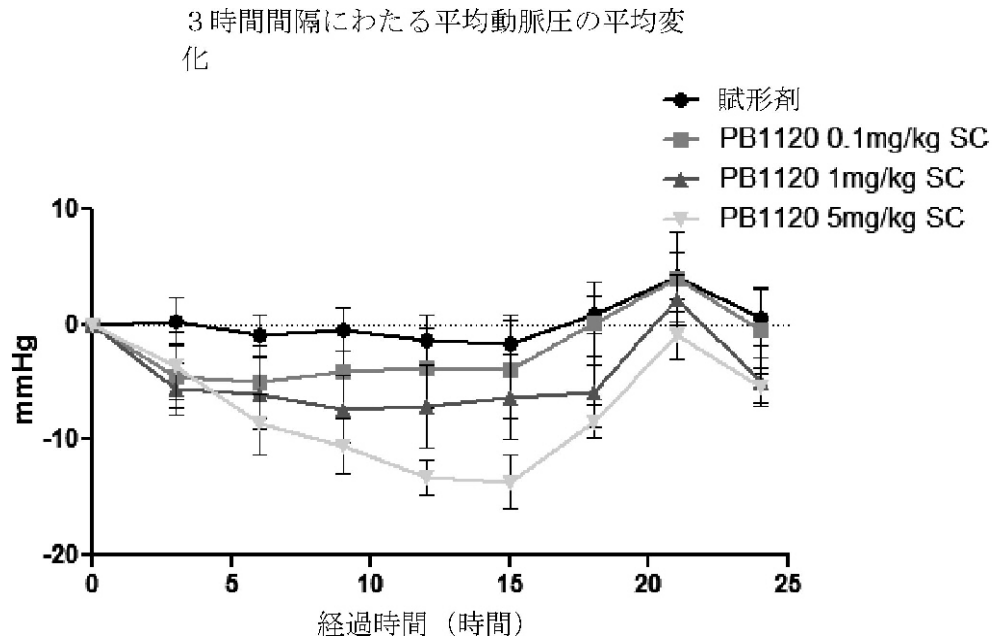
【図 1 5 A】



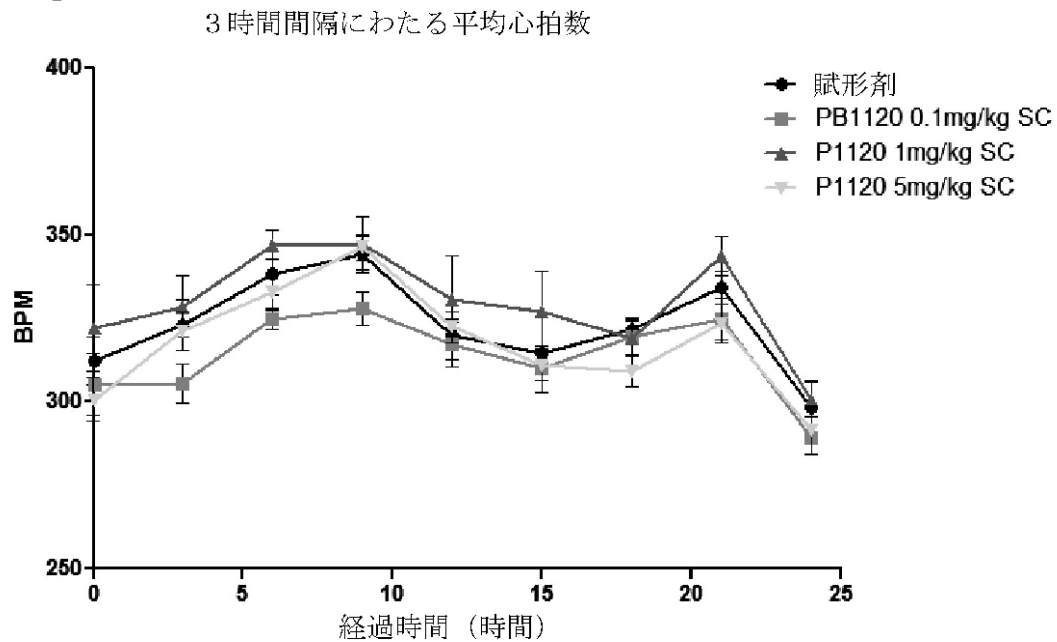
【図 1 5 B】



【図 1 5 C】



【図 1 5 D】



【配列表】

2016000751000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成27年9月25日(2015.9.25)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

心臓病を治療するための医薬組成物であって、

配列番号13のアミノ酸配列を含む組み換えVPAC2-選択的受容体アゴニストであって、VPAC2対VPAC1に対する、前記アゴニストの選択性を増大させるN末端メ

チオニンを有し、そして、注入部位からの吸収の相を延長し、また、循環半減期を延長するエラスチン様ポリペプチド（E L P）を有するアゴニストと、

1 又は複数の薬学的に許容可能な賦形剤とを含み、

前記 E L P が V P G X G（配列番号：3）の少なくとも 60 個の反復単位を含み、X が、V a l、A l a、および G l y から独立して選択される、医薬組成物。

【請求項 2】

X が 5：2：3 の比率の V a l、A l a、および G l y である、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 3】

非経口投与される、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 4】

皮下、筋肉内、または静脈内投与される、請求項 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 5】

前記 E L P が V P G X G（配列番号：3）の少なくとも 120 個の反復単位を含む、請求項 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

X が 5：2：3 の比率の V a l、A l a、および G l y である、請求項 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

前記 V P A C 2－選択的受容体アゴニストが配列番号 14 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

前記心臓病が心筋線維症、心不全、および心筋症からなる群から選択される、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

心臓病を治療するための医薬組成物であって、

配列番号 13 のアミノ酸配列を含む組み換え V P A C 2－選択的受容体アゴニストであって、V P A C 2 対 V P A C 1 に対する、前記アゴニストの選択性を増大させる N 末端メチオニンを有し、そして、注入部位からの吸収の相を延長し、また、循環半減期を延長するエラスチン様ポリペプチド（E L P）を有するアゴニストと、

1 又は複数の薬学的に許容可能な賦形剤とを含み、

前記 E L P が V P G X G（配列番号：3）の少なくとも 60 個の単位を含み、X が 5：2：3 の比率の V a l、A l a、および G l y である、医薬組成物。

【請求項 10】

前記エラスチン様ポリペプチドが V P G X G（配列番号：3）の 75～130 個の単位を含む、請求項 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

前記エラスチン様ポリペプチドが V P G X G（配列番号：3）の 120 個の単位を含む、請求項 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

非経口投与される、請求項 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 13】

皮下、筋肉内、または静脈内投与される、請求項 12 に記載の医薬組成物。

【請求項 14】

前記 V P A C 2－選択的受容体アゴニストが配列番号 14 のアミノ酸配列を含む、請求項 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 15】

前記心臓病が心筋線維症、心不全、および心筋症からなる群から選択される、請求項 9 に記載の医薬組成物。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
C 0 7 K 14/575 (2006.01)		C 0 7 K 14/575		
C 1 2 N 15/09 (2006.01)		C 1 2 N 15/00	A	

(72)発明者 サデギ, ホマヨン
 アメリカ合衆国, ペンシルベニア州 1 9 3 5 5, マルベルン, ワン グレート バレー パーク
 ウェイ, スイート 3 0, フェーズバイオ ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド内

(72)発明者 ターナー, アンドリュー
 アメリカ合衆国, ペンシルベニア州 1 9 3 5 5, マルベルン, ワン グレート バレー パーク
 ウェイ, スイート 3 0, フェーズバイオ ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド内

(72)発明者 ダゲール, スザンヌ
 アメリカ合衆国, ペンシルベニア州 1 9 3 5 5, マルベルン, ワン グレート バレー パーク
 ウェイ, スイート 3 0, フェーズバイオ ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド内

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA01 CA07 EA03 EA04 FA02
 4C084 AA01 AA02 BA01 BA22 DA40 MA55 MA66 NA14 ZA361 ZA371
 ZC021
 4H045 AA30 BA10 BA41 CA40 DA30 EA20 FA74

【外国語明細書】
2016000751000001.pdf