

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-527613
(P2024-527613A)

(43)公表日 令和6年7月25日(2024.7.25)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00		4 B 0 6 4
C 0 7 K	16/18 (2006.01)	C 0 7 K	16/18	Z N A	4 B 0 6 5
C 0 7 K	14/50 (2006.01)	C 0 7 K	14/50		4 C 0 7 6
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13		4 C 0 8 4
C 1 2 N	15/19 (2006.01)	C 1 2 N	15/19		4 H 0 4 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全77頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-501848(P2024-501848)			(71)出願人	523115450
(86)(22)出願日	令和4年7月14日(2022.7.14)				ベイジン キューエル バイオファーマシ
(85)翻訳文提出日	令和6年3月12日(2024.3.12)				ューティカル カンパニー, リミテッド
(86)国際出願番号	PCT/CN2022/105686				中華人民共和国 1 0 2 2 0 6 ベイジン
(87)国際公開番号	WO2023/284822				, チャンピン ディストリクト ライフ
(87)国際公開日	令和5年1月19日(2023.1.19)				サイエンス パーク ロード 2 0 , ビル
(31)優先権主張番号	PCT/CN2021/106316				ディング 7 , # 1 0 1
(32)優先日	令和3年7月14日(2021.7.14)			(74)代理人	100149076
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)				弁理士 梅田 慎介
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA			(74)代理人	100119183
	,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(				弁理士 松任谷 優子
	AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A			(74)代理人	100173185
	T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR				弁理士 森田 裕
	,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,			(74)代理人	100162503
	最終頁に続く				弁理士 今野 智介
					最終頁に続く

(54)【発明の名称】 代謝性障害のための融合ポリペプチド

(57)【要約】

ポリペプチドリンカーによって連結されたナノボディおよびF G F 2 1を含むポリペプチドのコンジュゲートが提供される。それぞれ2種のポリペプチドリンカーによって連結されたG L P − 1、ナノボディ、およびF G F 2 1を含むポリペプチドのコンジュゲートがさらに提供される。それを含む医薬組成物、および疾患を処置する方法も提供される。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

N 末端から C 末端への方向に、
血清アルブミンに結合し得るナノボディドメインを含む第 1 のフラグメント；および
生物学的に活性な F G F 2 1 ドメインを含む第 2 のフラグメント
を含むポリペプチドであって、
前記第 1 のフラグメントおよび前記第 2 のフラグメントは第 1 のリンカーを介して接続
されている、ポリペプチド。

【請求項 2】

前記 F G F 2 1 ドメインが、それぞれが、配列番号 1 との関係で、1 2 1、1 6 8、1
7 1、および 1 8 0 位からなる群から選択される位置から選択される位置にある 1 つまたは
複数のアミノ酸残基変異を含む、請求項 1 に記載のポリペプチド。

10

【請求項 3】

前記 F G F 2 1 ドメインにおける前記 1 つまたは複数のアミノ酸残基変異が、N 1 2 1
Q、M 1 6 8 L、P 1 7 1 G、および A 1 8 0 E、またはその任意の組み合わせを含む、
請求項 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 4】

前記 F G F 2 1 ドメインが、コンジュゲート可能な残基をさらに含む、前記いずれかの
請求項に記載のポリペプチド。

【請求項 5】

前記コンジュゲート可能な残基が、配列番号 1 との関係で、1 6 9 位から 1 8 1 位に及
ぶ C 末端フラグメント内の位置にあり；かつ任意で、

20

前記コンジュゲート可能な残基が、配列番号 1 との関係で、1 6 9、1 7 0、1 7 1、
1 7 2、1 7 3、1 7 4、1 8 0、および 1 8 1 位からなる群から選択される位置にある
、
請求項 4 に記載のポリペプチド。

【請求項 6】

前記 F G F 2 1 ドメインが、配列番号 6 ～ 1 3、1 6 ～ 1 9、および 9 2 のアミノ酸配
列を含む、請求項 4 または 5 に記載のポリペプチド。

【請求項 7】

前記第 2 のフラグメントにおける前記コンジュゲート可能な残基で、機能的部分とコン
ジュゲートされている、請求項 4 から 6 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

30

【請求項 8】

前記機能的部分が、グリコシル部分または合成化学部分を含む、請求項 7 に記載のポリ
ペプチド。

【請求項 9】

前記機能的部分がグリコシル部分を含み、前記コンジュゲート可能な残基が、グリコシ
ル化可能である導入残基である、請求項 7 から 8 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 10】

前記コンジュゲート可能な残基が、配列番号 1 との関係で、1 7 2 位もしくは 1 7 3 位
における導入 T、または 1 7 0 位もしくは 1 7 4 位における導入 N 残基を含む、請求項 9
に記載のポリペプチド。

40

【請求項 11】

前記機能的部分が合成化学部分を含む、請求項 7 から 8 のいずれか一項に記載のポリペ
プチド。

【請求項 12】

前記コンジュゲート可能な残基が導入システイン残基を含む、請求項 11 に記載のポリ
ペプチド。

【請求項 13】

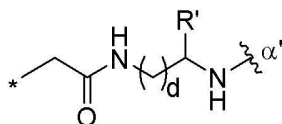
前記合成化学部分が、* - X - Y - Z の構造を含み、式中、X、Y、および Z は、結合

50

を介して相互接続され、Xの*末端は、前記ポリペプチド上の前記コンジュゲート可能な残基に接続され、式中：

X は、

【化 1】



であり得；Yは、

【化 2】



であり得； Z は、

【化 3】



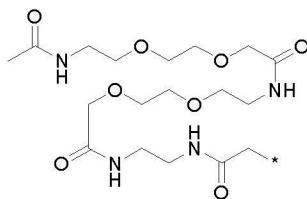
であり得、

式中、 α 位は α' 位に連結され、 β 位は β' 位に連結され、R 1 は水素または $-COOH$ であり；d は 1、2、または 3 であり；a は 1、2、または 3 であり；b は 1、2、または 3 であり；c は 1 または 2 であり；d は 1、2、または 3 であり；e は 1、2、または 3 である、請求項 12 に記載のポリペプチド。

【請求項 14】

前記合成化学部分が、以下の構造：

【化 4】



を有する、請求項 13 に記載のポリペプチド。

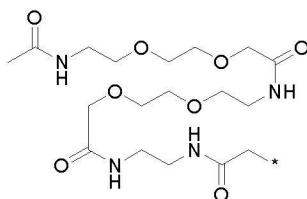
【請求項 15】

前記導入システインが、配列番号 1 との関係で、169、170、171、172、173、174、180、および 181 からなる群から選択される位置にある、請求項 12 から 14 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 16】

前記導入システムが 171 位にあり、前記合成化学部分が、以下の構造：

【化 5】



を有する、請求項 15 に記載のポリペプチド。

【請求項 17】

前記 F G F 2 1 ドメインが配列番号 8 のアミノ酸配列を含み、任意で、前記導入システインが 1 7 1 位にある、請求項 1 6 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 8】

i) 前記 F G F 2 1 ドメインが配列番号 6 のアミノ酸配列を含み、前記導入システインが 1 6 9 位にある；

i i) 前記 F G F 2 1 ドメインが配列番号 7 のアミノ酸配列を含み、前記導入システインが 1 7 0 位にある；

i i i) 前記 F G F 2 1 ドメインが配列番号 9 のアミノ酸配列を含み、前記導入システインが 1 7 2 位にある；

i v) 前記 F G F 2 1 ドメインが配列番号 1 0 のアミノ酸配列を含み、前記導入システインが 1 7 3 位にある；

v) 前記 F G F 2 1 ドメインが配列番号 1 1 のアミノ酸配列を含み、前記導入システインが 1 7 4 位にある；

v i) 前記 F G F 2 1 ドメインが配列番号 1 2 のアミノ酸配列を含み、前記導入システインが 1 8 0 位にある；

v i i) 前記 F G F 2 1 ドメインが配列番号 1 3 のアミノ酸配列を含み、前記導入システインが 1 8 1 位にある、または

v i i i) 前記 F G F 2 1 ドメインが配列番号 9 2 のアミノ酸配列を含み、前記導入システインが 1 7 4 位にある、

請求項 1 5 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 9】

前記 F G F 2 1 ドメインが、配列番号 1 との関係で、置換 P 1 7 1 G をさらに含む、請求項 1 から 1 5 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 2 0】

前記ナノボディドメインが V H H ドメインを含む、前記いずれかの請求項に記載のポリペプチド。

【請求項 2 1】

前記 V H H ドメインがヒト化されている、請求項 2 0 に記載のポリペプチド。

【請求項 2 2】

前記 V H H ドメインが、相補性決定領域 1 (C D R 1)、相補性決定領域 2 (C D R 2)、および相補性決定領域 3 (C D R 3) を含み、

前記 C D R 1 は、配列番号 2 0 の配列、または最高 3、2、もしくは 1 個のアミノ酸変異を有するそのバリエーションを含み；

前記 C D R 2 は、配列番号 2 1 の配列、または最高 3、2、もしくは 1 個のアミノ酸変異を有するそのバリエーションを含み；かつ／あるいは

前記 C D R 3 は、配列番号 2 2 の配列、または最高 3、2、もしくは 1 個のアミノ酸変異を有するそのバリエーションを含み、

前記 V H H ドメインは、血清アルブミンへの、任意でヒト血清アルブミンへの結合特異性を実質的に保持する、

請求項 2 0 または 2 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 2 3】

前記 V H H ドメインが、配列番号 2 0 の配列を含む相補性決定領域 1 (C D R 1)、配列番号 2 1 の配列を含む C D R 2、および配列番号 2 2 の配列を含む C D R 3 を含む、請求項 2 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 2 4】

前記 V H H ドメインが、配列番号 2 3 のアミノ酸配列、または配列番号 2 3 と少なくとも 7 0 % (例えば、少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 9 %) の同一性を有するそのバリエーションを含み、前記バリエーションは、血清アルブミンへの結合特異性および／またはアフィニティを実質的に保持する、請求項 2 0 から 2 3 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 25】

前記配列番号 23 のバリエーションが、配列番号 23 との関係で、最高 10、9、8、7、6、5、4、3、2、または 1 個のアミノ酸変異を有する、請求項 24 に記載のポリペプチド。

【請求項 26】

前記ナノボディドメインが、前記 VHH ドメインの N 末端に付着した N 末端伸長をさらに含む、請求項 20 から 25 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 27】

前記 N 末端伸長が、SG、AG、S、または A のアミノ酸残基を含む、請求項 26 に記載のポリペプチド。

10

【請求項 28】

前記ナノボディドメインが、配列番号 24～27 から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 27 に記載のポリペプチド。

【請求項 29】

前記第 1 のリンカーが、少なくとも 4 個のアミノ酸残基の長さを有する、前記いずれかの請求項に記載のポリペプチド。

【請求項 30】

前記第 1 のリンカーが、酸性アミノ酸残基を含まない、請求項 29 に記載のポリペプチド。

20

【請求項 31】

前記第 1 のリンカーが、D 残基または E 残基のいずれも含まない、請求項 30 に記載のポリペプチド。

【請求項 32】

前記第 1 のリンカーが、第 1 のリピート配列の 1 つまたは複数の単位を含む、請求項 29 に記載のポリペプチド。

【請求項 33】

前記第 1 のリピート配列が、G、Q、A、P、T、および S からなる群から選択される多くとも 4 または 6 タイプのアミノ酸残基からなる、請求項 32 に記載のポリペプチド。

【請求項 34】

前記第 1 のリピート配列が、 $G_f S_g$ 、配列番号 35 (GAQP)、配列番号 36 (GQAP)、配列番号 37 (GPAQ)、配列番号 38 (GPQA)、配列番号 39 (GSQP)、配列番号 40 (GASP)、配列番号 41 (GPAS)、配列番号 42 (GPSA)、配列番号 43 (GGGS)、配列番号 44 (GSGS)、配列番号 45 (GGGGS)、配列番号 46 (GSAPGSPAGSPTGSAPGSPA)、および GS からなる群から選択されるアミノ酸配列を含みまたはそれからなり、式中、f および g のそれぞれは、独立して、1～5 から選択される整数である、請求項 33 に記載のポリペプチド。

30

【請求項 35】

前記第 1 のリピート配列が、配列番号 35 (GAQP) に記載されるアミノ酸配列を有し、前記 1 つまたは複数の単位の数が 1～10 の整数である、請求項 34 に記載のポリペプチド。

40

【請求項 36】

前記第 1 のリンカーが、配列番号 35 (GAQP)、配列番号 49 ((GAQP)₂)、配列番号 50 ((GAQP)₅)、配列番号 51 ((GAQP)₁₀)、および配列番号 48 (GGGGS GGGS) からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 35 に記載のポリペプチド。

【請求項 37】

前記第 1 のフラグメントの N 末端を越えて、別の機能的ドメインを含む第 3 のフラグメントをさらに含むポリペプチドであって、

前記第 1 のフラグメントおよび前記第 3 のフラグメントは第 2 のリンカーを介して接続されている、前記いずれかの請求項に記載のポリペプチド。

50

【請求項 38】

前記第3のフラグメントの前記別の機能的ドメインが、グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1)、インスリン、レプチン、グルカゴン、ガストリン、胃阻害性ポリペプチド (GIP)、アミリン、カルシトニン、コレシストキニン、ペプチドYY、神経ペプチドY、骨形成タンパク質-6 (BMP-6)、骨形成タンパク質-9 (BMP-9)、オキシントモジュリン、オキシトシン、グルカゴン様ペプチド-2 (GLP-2)、イリシン、フィブロンクチンIII型ドメイン含有タンパク質5 (FND C5)、アペリン、アディポネクチン、C1qおよび腫瘍壊死因子関連タンパク質 (CTRPファミリー)、レジスチン、ビスファチン、オメンチン、レチノール結合タンパク質-4 (RBP-4)、グリセンチン、アンジオポエチン、インターロイキン-22 (IL-22)、エクセンディン-4、ならびに成長ホルモンからなる群から選択されるものの、生物学的に活性なタンパク質またはそのフラグメントを含む、請求項37に記載のポリペプチド。

10

【請求項 39】

前記第3のフラグメントの前記別の機能的ドメインが、GLP-1の生物学的に活性なペプチドまたはそのフラグメントを含み、前記別の機能的ドメインが、配列番号28と少なくとも70%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、一方でその実質的な生物学的活性を保持する、請求項38に記載のポリペプチド。

【請求項 40】

前記別の機能的ドメインが、配列番号28との関係で、8、22、26、34、および36位、またはその任意の組み合わせにおける1つまたは複数の変異を含む、請求項39に記載のポリペプチド。

20

【請求項 41】

前記1つまたは複数の変異が、A8G、G22E、K26R、K34R、R36G、またはその任意の組み合わせを含む、請求項40に記載のポリペプチド。

【請求項 42】

前記別の機能的ドメインが、配列番号29および配列番号31~34からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項41に記載のポリペプチド。

【請求項 43】

前記第2のリンカーが、少なくとも8個のアミノ酸残基（例えば、少なくとも12、16、または20個のアミノ酸残基）の長さを有する、請求項37から42のいずれか一項に記載のポリペプチド。

30

【請求項 44】

前記第2のリンカーが、第2のリピート配列の1つまたは複数の単位を含む、請求項43に記載のポリペプチド。

【請求項 45】

前記第2のリピート配列が、G、Q、A、E、P、T、およびSからなる群から選択される多くとも4または6タイプのアミノ酸残基からなる、請求項41に記載のポリペプチド。

【請求項 46】

前記第2のリピート配列が、G_hS_i、配列番号35 (GAQP)、配列番号55 (GQEP)、配列番号56 (GEQP)、配列番号57 (GPQE)、配列番号58 (GPEQ)、配列番号59 (GSEP)、配列番号60 (GES P)、配列番号61 (GPS E)、配列番号62 (GPES)、配列番号36 (GQAP)、配列番号37 (GPAQ)、配列番号38 (GPQA)、配列番号39 (GSQP)、配列番号40 (GASP)、配列番号41 (GPAS)、配列番号42 (GPSA)、配列番号43 (GGGS)、配列番号44 (GSGS)、配列番号45 (GGGGS)、配列番号46 (GSAPGS P AGSPTGSAPGS PA)、およびGSからなる群から選択されるアミノ酸配列を含みまたはそれからなり、式中、hおよびiのそれぞれは、独立して、1~5から選択される整数である、請求項45に記載のポリペプチド。

40

【請求項 47】

50

前記第2のリピート配列が、配列番号35 (GAQP) に記載されるアミノ酸配列を有し、前記1つまたは複数の単位の数に1～15の整数である、請求項46に記載のポリペプチド。

【請求項48】

前記第2のリンカーが、配列番号49 ((GAQP)₂)、配列番号50 ((GAQP)₅)、配列番号51 ((GAQP)₁₀)、および配列番号52 ((GAQP)₁₄)、および配列番号47 (GGGGS)₄ からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項43に記載のポリペプチド。

【請求項49】

配列番号63～68、93、99、100、101、および107から選択されるアミノ酸配列を含む、前記いずれかの請求項に記載のポリペプチド。

10

【請求項50】

配列番号70、74、75、79～83、85、94～98、および108～109から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項37から48のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項51】

前記いずれかの請求項に記載の前記ポリペプチド、および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項52】

請求項1から50のいずれか一項に記載の前記ポリペプチド、または請求項51に記載の前記医薬組成物の治療有効量を投与することを含む、それを必要とする対象における代謝性障害を阻止するまたは処置する方法。

20

【請求項53】

前記代謝性障害が、糖尿病、肥満、非アルコール性脂肪性肝炎 (NAFLD)、心血管様脂質異常症、アテローム性動脈硬化症、アルコール性脂肪性肝炎 (ASH)、糖尿病性腎症、妊娠性糖尿病、メタボリックシンドローム X 等のメタボリックシンドローム、非アルコール性脂肪肝疾患 (NAFLD)、末期肝疾患、肝臓脂肪症 (脂肪肝)、肝硬変、原発性胆汁性肝硬変 (PBC)、または重度の高トリグリセリド血症 (SHTG) である、請求項52に記載の方法。

【請求項54】

請求項1から50のいずれか一項で定義される前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

30

【請求項55】

請求項54に記載の前記ポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項56】

請求項55に記載の前記ベクターを含む宿主細胞。

【請求項57】

請求項54の前記ポリヌクレオチド、または除去可能なタグをさらに含むその前駆体の発現を可能にする条件下で、請求項56の前記宿主細胞を培養すること；ならびに

前記宿主細胞から前記ポリペプチドまたはその前駆体を回収するおよび精製することを含む、請求項1から50のいずれか一項で定義される前記ポリペプチドを産生するためのプロセス。

40

【請求項58】

前記ポリペプチドが、前記第2のフラグメントにおけるコンジュゲート可能な残基で機能的部分とコンジュゲートされ、前記プロセスが、前記宿主細胞から前記ポリペプチドを回収するおよび精製することの後に、

前記ポリヌクレオチドに前記機能的部分をコンジュゲートすることを含む、請求項57に記載のプロセス。

【請求項59】

前記宿主細胞が E. coli であり、前記ベクターが E. coli 適合性ベクターを含む

50

み、前記ベクターにおける前記ポリヌクレオチドによってコードされる前記ポリペプチドが、E. coli 発現のためにコドン最適化されている、請求項 57 または請求項 58 に記載のプロセス。

【請求項 60】

前記宿主細胞から前記ポリペプチドを回収するおよび精製することが、
そこから前記ポリペプチドの前駆体を回収すること；
前記ポリペプチドの前記前駆体をリフォールディングさせること；
前記ポリペプチドの前記リフォールディングされた前駆体を処理して前記タグを除去し、それによって前記ポリペプチドを獲得すること；および
前記ポリペプチドを精製すること
を含む、請求項 57 から 59 のいずれか一項に記載のプロセス。

10

【請求項 61】

前記精製されたポリペプチドと前記機能的部分とをコンジュゲートすることをさらに含む、請求項 58 から 60 のいずれか一項に記載のプロセス。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、疾患、とりわけ代謝性疾患を阻止しかつ／または処置するためのポリペプチドおよびその産生方法、医薬組成物、ならびにそのようなものを使用する方法に関する。

【背景技術】

20

【0002】

線維芽細胞増殖因子 (FGF) ファミリーのメンバーである線維芽細胞増殖因子 21 (FGF 21) は、いくつかの代謝的に活性な臓器において合成されるホルモンであり、グルコースおよび脂質恒常性を調節する。FGF 21 の生物学は、複数の標的臓器におけるその多様な代謝機能のおかげで本質的に複雑である。FGF 21 は、肝臓、脂肪細胞、膵臓、視床下部、および筋肉組織等の臓器において機能すると報告されている (Fish er FM, Annu Rev Physiol, 2016, 78:223)。

【0003】

グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) の主要な生物活性フラグメントは、プログルカゴンペプチドの翻訳後プロセッシングにより生じる 30 または 31 アミノ酸ペプチドフラグメント (GLP-1 のアミノ酸 7~36 または 7~37) である。初期 GLP-1 産物 GLP-1 は、インスリン合成および分泌を刺激し、糖尿病、とりわけ 2 型糖尿病における高血糖症を阻止することが示されている。しかしながら、内因性 GLP-1 は、おおよそ 2 分間の半減期を有するのみであり、それは、ほんの 0~15 pmol/L という GLP-1 の空腹時血漿レベルをもたらす。

30

【0004】

代謝性障害は、一般に、インスリン抵抗性、内臓脂肪症、アテローム性脂質異常症等と関連しており、それは、世界的に大きくかつ高まる公衆衛生および臨床課題を提起している。しかしながら、代謝性疾患に対する既存の処置は、短い半減期および／または低い効力等の問題に直面している。

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

したがって、代謝性疾患を処置するための治療的解決策の向上の必要性がある。

【課題を解決するための手段】

【0006】

第 1 の態様では、本開示は、1 種または 2 種のリンカーを介して接続されている 2 種または 3 種の機能的ドメインを含む、実質的に融合ポリペプチドまたは融合タンパク質であるポリペプチドを提供する。

【0007】

50

具体的には、N末端からC末端方向に、ポリペプチドは、第1のリンカーを介して接続されている、第1のフラグメントおよび第2のフラグメントを含む。第1のフラグメントは、血清アルブミン（例えば、ヒト血清アルブミン）に結合し得るナノボディドメインを含み、第2のフラグメントは、生物学的に活性なFGF21ドメインを含む。

【0008】

本明細書において、FGF21ドメインは、配列番号1と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、一方でその生物学的活性を実質的に保持する。そのため、FGF21ドメインは、配列番号1との関係で多くとも（no more than）12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、または2個のアミノ酸残基変異を、そのような変異含有FGF21バリエーションが、FGF21の生物学的活性を依然として保持する限りにおいて含み得る。本明細書において、アミノ酸残基変異は、置換、挿入、または欠失であり得る。

10

【0009】

ポリペプチドの一部の実施形態によれば、FGF21ドメインは、それぞれが、配列番号1との関係で、121、168、171、および180位から選択される位置にある1つまたは複数のアミノ酸残基変異を含み得る。任意で、FGF21ドメインにおける1つまたは複数のアミノ酸残基変異は、以下の3種の置換：N121Q、M168L、P171G、およびA180Eのうちの1、2、3、または4種を含み得る。

【0010】

ポリペプチドの一部の実施形態によれば、FGF21ドメインは、N121Q、M168L、およびA180Eの3種すべての置換を含み得、FGF21ドメインのアミノ酸配列は、配列番号5に記載される。FGF21ドメインにおける他のアミノ酸残基は、3種の変異に加えて付加的に変異され得る。ある特定の実施形態において、FGF21ドメインは、置換P171Gをさらに含む。ポリペプチドの一部の実施形態によれば、FGF21ドメインは、配列番号14のアミノ酸配列を含む。

20

【0011】

ポリペプチドの一部の実施形態によれば、FGF21ドメインは、コンジュゲート可能な残基をさらに含む。本明細書において、コンジュゲート可能な残基は、任意で、配列番号1との関係で、169位から181位に及ぶC末端フラグメント内の位置にあり得る。ある特定の実施形態によれば、コンジュゲート可能な残基は、配列番号1との関係で、169、170、171、172、173、174、180、および181位からなる群から選択される位置にある。ポリペプチドの一部の実施形態によれば、FGF21ドメインは、配列番号1との関係で、169位から181位に及ぶC末端フラグメント内の位置におけるコンジュゲート可能な残基への変異を除いて、配列番号2～5、89～91、14、および102～105のアミノ酸配列を含む。

30

【0012】

ポリペプチドの一部の実施形態によれば、FGF21ドメインは、配列番号6～13、16～19、および92のアミノ酸配列を含む。

【0013】

一部の実施形態によれば、ポリペプチドは、FGF21ドメインを含有する第2のフラグメントにおけるコンジュゲート可能な残基で機能的部分とコンジュゲートされる。

40

【0014】

本明細書において、FGF2ドメインにコンジュゲートされる機能的部分は、グリコシル部分または合成化学部分を任意で含み得る。

【0015】

ポリペプチドの一部の実施形態によれば、機能的部分はグリコシル部分を含み、コンジュゲート可能な残基は、トレオニン（T）またはアスパラギン（N）残基等、グリコシル化可能である導入残基であり得る。より具体的には、コンジュゲート可能な残基は、配列番号1との関係で、任意で172位もしくは173位における導入Tであり得る、または170位もしくは174位における導入N残基であり得る。ポリペプチドの一部の実施形

50

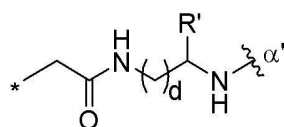
態によれば、F G F 2 1 ドメインは、配列番号 1 6 ～ 1 9 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【 0 0 1 6 】

ポリペプチドの一部の他の実施形態によれば、機能的部分は合成化学部分を含む。そのため、コンジュゲート可能な残基は導入システイン（C）を任意で含み得、合成化学部分は、 $*-X-Y-Z$ の構造を含み得る。本明細書において、X、Y、および Z は、結合を介して相互接続され、X の * 末端は、ポリペプチド上のコンジュゲート可能な残基に接続されている。X は、

【 0 0 1 7 】

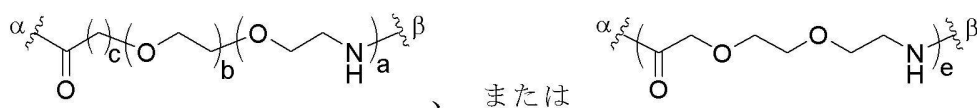
【化 1】



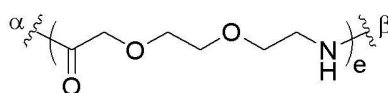
であり得；Y は、

【 0 0 1 8 】

【化 2】



、または



であり得；Z は、

【 0 0 1 9 】

【化 3】



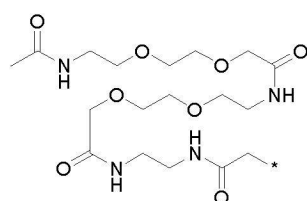
であり得、式中、 α 位は α' 位に連結され、 β 位は β' 位に連結される。本明細書において、R 1 は水素または $-COOH$ であり得；d は 1、2、または 3 であり得；a は 1、2、または 3 であり得；b は 1、2、または 3 であり得；c は 1 または 2 であり得；d は 1、2、または 3 であり得；e は 1、2、または 3 であり得る。

【 0 0 2 0 】

ポリペプチドの一部のより具体的な実施形態によれば、合成化学部分は、本明細書において $Ac-2XADO-EDA-CO-CH_2-*$ と称される以下の構造：

【 0 0 2 1 】

【化 4】



を有する。

【 0 0 2 2 】

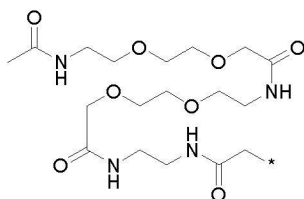
任意で、導入システインは、配列番号 1 との関係で、1 6 9、1 7 0、1 7 1、1 7 2、1 7 3、1 7 4、1 8 0、および 1 8 1 からなる群から選択される位置にあり得る。ある特定の実施形態によれば、コンジュゲート可能な残基は、配列番号 1 との関係で 1 7 1 または 1 7 4 位にある。ポリペプチドのこれらの実施形態の一部によれば、F G F 2 1 ドメインは、配列番号 6 ～ 1 3 および 9 2 のアミノ酸配列を含む。

【0023】

ポリペプチドの一部の実施形態において、FGF21ドメインは、以下の構造：

【0024】

【化5】



10

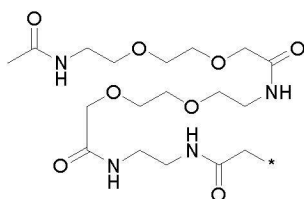
(本明細書においてAc-2XADO-EDA-CO-CH₂*とも称される)を有する合成化学部分と導入システイン残基でコンジュゲートされた、171位に導入システインを有する配列番号8のアミノ酸配列を含む。

【0025】

ポリペプチドの一部の実施形態において、FGF21ドメインは、以下の構造：

【0026】

【化6】



20

(本明細書においてAc-2XADO-EDA-CO-CH₂*とも称される)を有する合成化学部分と導入システイン残基でコンジュゲートされた、174位に導入システインを有する配列番号92のアミノ酸配列を含み得る。

【0027】

ポリペプチドの他の実施形態は、代替的に、

i) FGF21ドメインは配列番号6のアミノ酸配列を含み、導入システインは169位にある；

30

ii) FGF21ドメインは配列番号7のアミノ酸配列を含み、導入システインは170位にある；

iii) FGF21ドメインは配列番号8のアミノ酸配列を含み、導入システインは171位にある；

iv) FGF21ドメインは配列番号9のアミノ酸配列を含み、導入システインは172位にある；

v) FGF21ドメインは配列番号10のアミノ酸配列を含み、導入システインは173位にある；

vi) FGF21ドメインは配列番号11のアミノ酸配列を含み、導入システインは174位にある；

40

vii) FGF21ドメインは配列番号12のアミノ酸配列を含み、導入システインは180位にある；または

viii) FGF21ドメインは配列番号13のアミノ酸配列を含み、導入システインは181位にある、

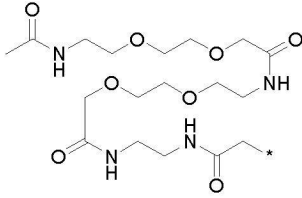
ix) FGF21ドメインは配列番号92のアミノ酸配列を含み、導入システインは174位にある、

を含み得、以下の構造：

【0028】

50

【化 7】



(本明細書において $Ac-2XADO-EDA-CO-CH_2^*$ とも称される)を有する合成化学部分と導入システイン残基で任意でコンジュゲートされる。

【0029】

付加的にかつ代替的に、ポリペプチドの一部の他の実施形態において、FGF21ドメインは、配列番号1との関係で、P171Gの置換をさらに含む。そのような実施形態において、FGF21ドメインは、配列番号14および92からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0030】

ポリペプチドの上記の実施形態のいずれかにおいて、ナノボディドメインはVHHドメインを任意で含み得、任意でVHHドメインはヒト血清アルブミン(HSA)に結合し得る。

【0031】

さらに任意で、VHHドメインはヒト化され得る。

【0032】

一部の実施形態によれば、VHHドメインは、相補性決定領域1(CDR1)、相補性決定領域2(CDR2)、および相補性決定領域3(CDR3)を含み得る。本明細書において、CDR1は、配列番号20の配列、または最高3、2、もしくは1個のアミノ酸変異を有するそのバリエーションを含み得；CDR2は、配列番号21の配列、または最高3、2、もしくは1個のアミノ酸変異を有するそのバリエーションを含み得；かつ／あるいはCDR3は、配列番号22の配列、または最高3、2、もしくは1個のアミノ酸変異を有するそのバリエーションを含み得、VHHドメインは、血清アルブミンへの、任意でヒト血清アルブミンへの結合特異性を実質的に保持する。

【0033】

ポリペプチドのある特定の具体的な実施形態において、VHHドメインは、配列番号20の配列を含む相補性決定領域1(CDR1)、配列番号21の配列を含むCDR2、および配列番号22の配列を含むCDR3を含む。

【0034】

ポリペプチドのある特定の具体的な実施形態において、VHHドメインは、配列番号23のアミノ酸配列、または配列番号23と少なくとも70%(例えば、少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、99%)の同一性を有するそのバリエーションを含み、バリエーションは、血清アルブミンへの結合特異性および／またはアフィニティーを実質的に保持する。

【0035】

本明細書において、任意で、配列番号23のバリエーションは、配列番号23との関係で、最高10、9、8、7、6、5、4、3、2、または1個のアミノ酸変異を有し得る。

【0036】

上記の実施形態のいずれかにおいて、ナノボディドメインは、VHHドメインのN末端に付着したN末端伸長を任意でさらに含み得、N末端伸長は、SG、AG、S、またはAのアミノ酸残基を任意で含み得る。

【0037】

ポリペプチドの一部の具体的な実施形態によれば、ナノボディドメインは、配列番号24～27から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0038】

10

20

30

40

50

上で記載されるポリペプチドの任意の実施形態において、第1のリンカーは、少なくとも4個のアミノ酸残基の長さを有し得る。

【0039】

一部の実施形態によれば、第1のリンカーは、酸性アミノ酸残基を含まなくてもよく、より具体的には、第1のリンカーは、D残基またはE残基のいずれも含まなくてもよい。

【0040】

任意で、第1のリンカーは、第1のリピート配列の1つまたは複数の単位を含み得、一部の実施形態によれば、第1のリピート配列は、G、Q、A、P、T、およびSからなる群から選択される多くとも4または6タイプのアミノ酸残基からなり得る。

【0041】

ポリペプチドの一部の具体的な実施形態によれば、第1のリピート配列は、 $G_f S_g$ （ここで、fおよびgのそれぞれは、独立して、1～5から選択される整数である）、配列番号35（GAQP）、配列番号36（GQAP）、配列番号37（GPAQ）、配列番号38（GPQA）、配列番号39（GSQP）、配列番号40（GASP）、配列番号41（GPAS）、配列番号42（GPSA）、配列番号43（GGGS）、配列番号44（SGGS）、配列番号45（GGGGS）、配列番号46（GSAPGSPAGSPTGSAPGSPA）、およびGSからなる群から選択されるアミノ酸配列を含み得るまたはそれからなり得る。

【0042】

ある特定の実施形態において、第1のリピート配列は、配列番号35（GAQP）に記載されるアミノ酸配列を有し得、単位の数1～10の整数であり得る。

【0043】

ポリペプチドのある特定の具体的な実施形態によれば、第1のリンカーは、配列番号35（GAQP）、配列番号49（ $(GAQP)_2$ ）、配列番号50（ $(GAQP)_5$ ）、配列番号51（ $(GAQP)_{10}$ ）、および配列番号48（GGGSGGGGS）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0044】

上で記載されるポリペプチドの実施形態のいずれかにおいて、ポリペプチドは、第1のフラグメントのN末端を越えて、別の機能的ドメインを含む第3のフラグメントをさらに含み得る。本明細書において、第1のフラグメントおよび第3のフラグメントは、第2のリンカーを介して接続されている。

【0045】

本明細書において、第3のフラグメントの別の機能的ドメインは、グルカゴン様ペプチド-1（GLP-1）、インスリン、レプチン、グルカゴン、ガストリン、胃阻害性ポリペプチド（GIP）、アミリン、カルシトニン、コレシストキニン、ペプチドYY、神経ペプチドY、骨形成タンパク質-6（BMP-6）、骨形成タンパク質-9（BMP-9）、オキシントモジュリン、オキシトシン、グルカゴン様ペプチド-2（GLP-2）、イリシン、フィブロネクチンIII型ドメイン含有タンパク質5（FND C5）、アペリン、アディポネクチン、Clqおよび腫瘍壊死因子関連タンパク質（CTRPファミリー）、レジスチン、ビスファチン、オメンチン、レチノール結合タンパク質-4（RBP-4）、グリセンチン、アンジオポエチン、インターロイキン-22（IL-22）、エクセンディン-4、ならびに成長ホルモンからなる群から選択されるものの生物学的に活性なタンパク質またはそのフラグメントを任意で含み得る。

【0046】

ポリペプチドの一部の実施形態によれば、第3のフラグメントの別の機能的ドメインは、GLP-1の生物学的に活性なペプチドまたはそのフラグメントを含み、配列番号28と少なくとも70%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得、一方でその実質的な生物学的活性を保持する。

【0047】

本明細書において、任意で、別の機能的ドメインは、配列番号28との関係で、8、2

10

20

30

40

50

2、26、34、および36位、またはその任意の組み合わせにおける1つまたは複数の変異を含み得る。

【0048】

ポリペプチドの一部の実施形態によれば、ポリペプチドの第3のフラグメントの別の機能的ドメインにおける1つまたは複数の変異は、A8G、G22E、K26R、K34R、およびR36G、またはその任意の組み合わせを含み得る。ポリペプチドの一部の実施形態によれば、ポリペプチドの第3のフラグメントの別の機能的ドメインにおける1つまたは複数の変異は、A8G、G22E、およびR36G、またはその任意の組み合わせを含み得る。

【0049】

ポリペプチドの一部の具体的な実施形態によれば、第3のフラグメントの別の機能的ドメインは、配列番号29および配列番号31～34からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0050】

第2のリンカーを介して第1のフラグメントのN末端と接続する第1のフラグメントを含むポリペプチドの上述の実施形態のいずれかにおいて。

【0051】

ある特定の実施形態において、第2のリンカーは、少なくとも4個のアミノ酸残基の長さを有し得る。ある特定の実施形態において、第2のリンカーは、少なくとも8、12、16、または20個のアミノ酸残基の長さを有し得る。

【0052】

本明細書において、第2のリンカーは、第2のリピート配列の1つまたは複数の単位を含み得、第2のリピート配列は、G、Q、A、E、P、T、およびSからなる群から選択される多くとも4または6タイプのアミノ酸残基からなり得る。

【0053】

ポリペプチドの一部の具体的な実施形態によれば、第2のリピート配列は、G_hS_i（ここで、hおよびiのそれぞれは、独立して、1～5から選択される整数である）、配列番号35（GAQP）、配列番号55（GQEP）、配列番号56（GEQP）、配列番号57（GPQE）、配列番号58（GPEQ）、配列番号59（GSEP）、配列番号60（GESp）、配列番号61（GPSE）、配列番号62（GPES）、配列番号36（GQAP）、配列番号37（GPAQ）、配列番号38（GPQA）、配列番号39（GSQP）、配列番号40（GASP）、配列番号41（GPAS）、配列番号42（GPSA）、配列番号43（GGGS）、配列番号44（GSGS）、配列番号45（GGGS）、配列番号46（GSAPGSPAGSP TGSAPGSPA）、およびGSからなる群から選択されるアミノ酸配列を含み得るまたはそれからなり得る。

【0054】

さらに一部の実施形態によれば、第2のリピート配列は、配列番号35（GAQP）に記載されるアミノ酸配列を有し得、1つまたは複数の単位の数は1～15の整数であり得る。

【0055】

ポリペプチドのある特定の具体的な実施形態によれば、第2のリンカーは、配列番号49（（GAQP）2）、配列番号50（（GAQP）5）、配列番号51（（GAQP）10）、および配列番号52（（GAQP）14）、および配列番号47（（GGGS）4）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0056】

第1および第2のフラグメントからなるポリペプチドのある特定の具体的な実施形態によれば、ポリペプチドは、配列番号63～68、93、99、100、101、および107からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。ポリペプチドのある特定の具体的な実施形態によれば、ポリペプチドは、配列番号63、68、および100からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、本明細書において提供される合成化学部分と、配列番号

10

20

30

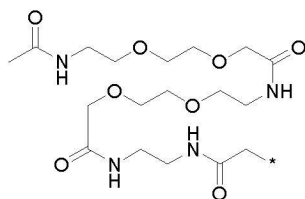
40

50

1との関係で171位における導入システイン残基でコンジュゲートされる。ポリペプチドのある特定の具体的な実施形態によれば、ポリペプチドは、配列番号93のアミノ酸配列を含み、本明細書において提供される合成化学部分と、配列番号1との関係で174位における導入システイン残基でコンジュゲートされる。ポリペプチドのある特定のこれらの具体的な実施形態によれば、合成化学部分は、以下の構造：

【0057】

【化8】



10

(本明細書においてAc-2XADO-EDA-CO-CH₂*とも称される)を有する。ポリペプチドのある特定の具体的な実施形態によれば、ポリペプチドは、配列番号64～67、93、および107からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、コンジュゲートされない。

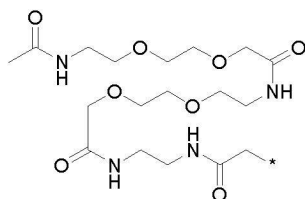
【0058】

第1、第2、および第3のフラグメントからなるポリペプチドのある特定の具体的な実施形態によれば、ポリペプチドは、配列番号70、74、75、79～83、85、94～98、および108～109からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。ポリペプチドのある特定の具体的な実施形態によれば、ポリペプチドは、配列番号74、81～83、85、および96～97からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、本明細書において提供される合成化学部分と、配列番号1との関係で171位における導入システイン残基でコンジュゲートされる。ポリペプチドのある特定の具体的な実施形態によれば、ポリペプチドは、配列番号94のアミノ酸配列を含み、合成化学部分と、配列番号1との関係で174位における導入システイン残基でコンジュゲートされる。ポリペプチドのある特定のこれらの具体的な実施形態によれば、合成化学部分は、以下の構造：

20

【0059】

【化9】



30

(本明細書においてAc-2XADO-EDA-CO-CH₂*とも称される)を有する。ポリペプチドのある特定の具体的な実施形態によれば、ポリペプチドは、配列番号70、75、79～80、85、94、95、98、および108～109からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、コンジュゲートされない。

40

【0060】

本開示の第2の態様では、医薬組成物がさらに提供される。医薬組成物は、上で記載される任意の実施形態に従ったポリペプチド、および薬学的に許容される担体を含む。

【0061】

本開示の第3の態様では、上で記載される任意の実施形態に従ったポリペプチド、または上で記載される医薬組成物の治療有効量を投与する工程を含む、それを必要とする対象における代謝性障害を阻止するまたは処置する方法も提供される。

【0062】

本明細書において、代謝性障害は、糖尿病、肥満、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)、心血管様脂質異常症、アテローム性動脈硬化症、アルコール性脂肪性肝炎(ASH)

50

）、糖尿病性腎症、妊娠性糖尿病、メタボリックシンドロームX等のメタボリックシンドローム、非アルコール性脂肪肝疾患（NAFLD）、末期肝疾患、肝臓脂肪症（脂肪肝）、肝硬変、原発性胆汁性肝硬変（PBC）、または重度の高トリグリセリド血症（SHTG）であり得る。

【0063】

本開示の第4の態様では、上で記載される任意の実施形態に従って規定されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドがさらに提供される。

【0064】

本開示の第5の態様では、上で記載されるポリヌクレオチドを含むベクターがさらに提供される。

【0065】

本開示の第6の態様では、上で記載されるベクターを含む宿主細胞がさらに提供される。

【0066】

本開示の第7の態様では、上で記載されるポリペプチドを産生するためのプロセスがさらに提供される。プロセスは、

S100：上で規定されるポリヌクレオチド、または除去可能なタグをさらに含むその前駆体の発現を可能にする条件下で、上で記載される宿主細胞を培養する工程；ならびに
S200：宿主細胞からポリペプチドまたはその前駆体を回収する工程および精製する工程

を含む。

【0067】

プロセスの一部の実施形態によれば、ポリペプチドは、第2のフラグメントにおけるコンジュゲート可能な残基で機能的部分とコンジュゲートされ、プロセスは、宿主細胞からポリペプチドを回収するおよび精製する工程S200の後に、以下の工程：

S300：ポリヌクレオチドに機能的部分をコンジュゲートする工程をさらに含む。

【0068】

プロセスの一部の実施形態によれば、宿主細胞はE. coliであり、ベクターはE. coli適合性ベクターを含み、ベクターにおけるポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドは、E. coli発現のためにコドン最適化されている。

【0069】

プロセスの一部の実施形態によれば、宿主細胞からポリペプチドを回収するおよび精製する工程S200は、以下の下位工程：

S210：ポリペプチドの前駆体を回収する工程；

S220：ポリペプチドの前駆体をリフォールディングさせる工程；

S230：ポリペプチドのリフォールディングされた前駆体を処理してタグを除去し、それによってポリペプチドを獲得する工程；および

S240：ポリペプチドを精製する工程を含む得る。

【0070】

ポリペプチド産生プロセスの一部の実施形態によれば、プロセスは、精製されたポリペプチドと機能的部分とをコンジュゲートすることをさらに含む。ある特定の実施形態において、ポリペプチドにコンジュゲートされる対象となる機能的部分は、

【0071】

10

20

30

40

50

【図 1 A - 1 B】図 1 A および図 1 B は、本開示の 2 つの異なる実施形態に従ったポリペプチドを図解する。

【図 2 A - 2 B】図 2 A および図 2 B は、分子 M L C # 9、M L C # 1 0、M L C # 1 4、対照 # 6、および参照化合物 Y H - d u a l のインビトロ F G F 2 1 活性を示す。

【図 3 A - 3 B】図 3 A および図 3 B は、D I O ラットにおける、体重低下（図 3 A）および食物摂取量抑制（図 3 B）に対する、分子対照 # 2、対照 # 6、M L C # 9、および M L C # 1 0 の効力を示す。

【図 4 A - 4 L】図 4 A ~ 図 4 L は、D I O マウスにおける、肝臓 T G（図 4 I）、肝臓 T C（図 4 J）、およびインスリン感受性（図 4 K）の向上、ならびにアディポネクチンレベルの増加（図 4 L）とともに、体重低下（図 4 A）、グルコース制御（図 4 B）、血漿におけるトリグリセリド（図 4 C）、L D L - C（図 4 D）、総コレステロール（図 4 E）、および A L T（図 4 F）濃度の低下、ならびに脂肪重量（図 4 G）および肝臓重量（図 4 H）の低下に対する、分子 M L C # 9、M L C # 1 4、M L C # 1 6、および M L C # 1 7、ならびに参照化合物セマグルチド、Y H - d u a l、およびチルゼパチドの効力を示す。

10

【図 5 A - 5 M】図 5 A ~ 図 5 M は、D I O マウスにおける、肝臓 T G（図 5 J）、肝臓 T C（図 5 K）、およびインスリン感受性（図 5 L）の向上、ならびにアディポネクチンレベルの増加（図 5 M）とともに、体重低下（図 5 A）、グルコース制御（図 5 B）、血漿におけるトリグリセリド（図 5 C）、L D L - C（図 5 D）、総コレステロール（図 5 E）、A L T（図 5 F）、および A S T（図 5 G）濃度の低下、ならびに脂肪重量（図 5 H）および肝臓重量（図 5 I）の低下に対する、参照化合物セマグルチド、Y H - d u a l、およびチルゼパチドと比較した、種々の投薬量の分子 M L C # 1 4 および M L C # 1 6 の効力を示す。

20

【図 6 A - 6 H】図 6 A ~ 図 6 H は、肝臓 T G の向上（図 6 H）とともに、血漿における血清トリグリセリド（図 6 C）、L D L - C（図 6 D）、および総コレステロール（図 6 E）濃度、ならびに脂肪重量（図 6 F）および肝臓重量（図 6 G）の低下に対する、参照化合物セマグルチドと比較した、種々の投薬量の分子 M L C # 1 6、M L C # 1 9、M L C # 6、および M L C # 2 3 の効力を示す。

【図 7】図 7 は、本開示に開示されるすべてのアミノ酸配列を示す。

【発明を実施するための形態】

30

【0079】

本発明の以下の説明は、本発明の様々な実施形態を例示することが意図されるにすぎない。そのため、論じられる具体的な改変は、本発明の範囲に対する限定として解釈されるべきではない。本発明の範囲から逸脱することなく、様々な均等物、変形形態、および改変形態が実現され得ることは当業者に明白であると考えられ、そのような均等の実施形態は本明細書に含まれるべきであることが理解される。刊行物、特許、および特許出願を含めた、本明細書において引用されるすべての参考文献は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み入れられる。

【0080】

定義

40

「タンパク質」、「ペプチド」、および「ポリペプチド」という用語は、本明細書において互換可能に使用され、ペプチド結合等の共有結合によって連結されたアミノ酸残基のポリマーを指す。本明細書において提供されるタンパク質またはポリペプチドは、天然に存在するもしくは非天然のアミノ酸残基、またはその両方を含み得る。本明細書において提供されるポリペプチド、ペプチド、およびタンパク質は、任意の適切な長さのアミノ酸残基、例えば長さが少なくとも 3、4、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000 個、またはそれを上回るアミノ酸残基を含み得る。

【0081】

本明細書において使用される「天然に存在する」アミノ酸残基という用語は、それらの

50

構造がそのような立体異性体形態を可能にする場合にはそれらのDおよびL立体異性体すべて込みで、天然タンパク質またはペプチドに見出されるアミノ酸残基を指す。天然に存在するアミノ酸残基の例は、グリシン（GlyまたはG）、アラニン（AlaまたはA）、バリン（ValまたはV）、ロイシン（LeuまたはL）、イソロイシン（IleまたはI）、セリン（SerまたはS）、システイン（CysまたはC）、トレオニン（ThrまたはT）、メチオニン（MetまたはM）、プロリン（ProまたはP）、フェニルアラニン（PheまたはF）、チロシン（TyrまたはY）、トリプトファン（TrpまたはW）、ヒスチジン（HisまたはH）、リジン（LysまたはK）、アルギニン（ArgまたはR）、アスパラギン酸（AspまたはD）、グルタミン酸（GluまたはE）、アスパラギン（AsnまたはN）、およびグルタミン（GlnまたはQ）を含めた20種の標準アミノ酸、ならびにカナバニン、ピロリジン（PYL）、セレノシステイン、ピロリン-カルボキシ-リジン（PCL）、サルコシン、ベーターアラニン、ホスホセリン、γ-カルボキシグルタミン酸、およびオルニチン等、それらの天然類似体を含むが、それらに限定されるわけではない。それらのD立体異性体にある天然に存在するアミノ酸残基の例は、例えばD-アスパラギン酸、D-セリン、D-システイン、D-アラニン、D-グルタミン酸等を含む。

10

【0082】

「アミノ酸類似体」とは、天然に存在するアミノ酸と同じ基本的化学構造、すなわち水素に結合している炭素、カルボキシル基、アミノ基、およびR基を有する化合物、例えばホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウムである。そのような類似体は、改変されたR基〔例えば、ノルロイシン〕または改変されたペプチド骨格を有し得るが、天然に存在するアミノ酸と同じ基本的化学構造を保持するであろう。

20

【0083】

本明細書において使用される「非天然」アミノ酸残基とは、限定されることなく、公知の天然に存在するアミノ酸の1種ではないが、天然に存在するアミノ酸と同様の様式で機能する改変アミノ酸残基および／またはアミノ酸模倣体を含めた、天然に見出されない任意のアミノ酸残基を指す。改変アミノ酸または模倣体は、炭水化物基、リン酸基、ファルネシル基、イソファルネシル〔isofarnesyl〕基、脂肪酸基、コンジュゲーションのためのリンカー、官能基化、または他の改変等の化学的実体の付加によって作出され得る。非天然アミノ酸は、化学合成によって製造されたアミノ酸も指し得る。例示的な非天然アミノ酸は、2-アミノイソ酪酸（Aib）、イミダゾール-4-アセテート（IA）、イミダゾールプロピオン酸（IPA）、α-アミノ酪酸（Abu）、tert-ブチルグリシン（Tle）、3-アミノメチル安息香酸、アントラニル酸、デス-アミノ-ヒスチジン（DesaminoHisと略される、代替名イミダゾプロピオン酸、Imprと略される）、β-アラニン等のアミノ酸のベータ類似体、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、Nα-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、α, α-ジメチル-グルタミン酸、m-CF₃-フェニルアラニン、α, β-ジアミノプロピオン酸（Dapと略される）、3-ピリジルアラニン、2-ピリジルアラニンまたは4-ピリジルアラニン、（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、および（1-アミノシクロオクチル）カルボン酸を含むが、それらに限定されるわけではない。融合ポリペプチド、ポリペプチドフラグメント、および／またはポリペプチド複体内への非天然アミノ酸の導入は、Wang et al., Science 292: 498-500, 2001; Deiters et al., J Am Chem Soc 125: 11782-11783, 2003; Wang and Schultz, Science 301: 964-967, 2003; Zhang et al., Science 303: 371-373, 2004、または米国特許第7,083,970号に記載される技術によって実現され得る。簡潔には、これらの発現

30

40

50

システムの一部は、本開示の融合ポリペプチドをコードするオープンリーディングフレームに、アンバー（UAG）、オーカー（UAA）、およびオパール（UGA）コドン等の終止コドンを導入する部位指向性変異導入を伴う。4塩基コドン（例えば、AGGA、AGGU、CGGU、CGCU、CGAU、CCCU、CUCU、CUAU、およびGGGU）、5塩基コドン、6塩基コドン等の他のコドンも、非天然アミノ酸に対する発現システムに導入され得る。次いで、そのような発現ベクターは、導入された終止コドンまたは他のコドンに特異的にかつ選定対象の非天然アミノ酸を担持したtRNAを利用し得る宿主に導入される。

【0084】

「融合」または「融合された」という用語は、アミノ酸配列（例えば、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質）に関して使用される場合、天然には存在しない単一アミノ酸配列への、例えば化学結合または組み換え手段による、2種以上のアミノ酸配列の組み合わせを指す。融合アミノ酸配列は、2種のコードポリヌクレオチド配列の遺伝的組み換えによって産生され得、宿主細胞に、組み換えポリヌクレオチドを含有する構築物を導入する方法によって発現され得る。

【0085】

「配列同一性パーセント（%）」とは、配列をアラインし、必要な場合にはギャップを導入して、最大数の同一アミノ酸（または核酸）を達成した後の、参照配列におけるアミノ酸（または核酸）残基と同一である、候補配列におけるアミノ酸（または核酸）残基のパーセンテージとして定義される。言い換えれば、アミノ酸配列（または核酸配列）の配列同一性パーセント（%）は、それが比較されている参照配列との関係で同一であるアミノ酸残基（または塩基）の数を、いずれか短いほうの、候補配列におけるまたは参照配列におけるアミノ酸残基（または塩基）の総数で割ることによって算出され得る。アミノ酸残基の保存的置換は、同一の残基と見なされない。アミノ酸（または核酸）配列同一性パーセントを決定する目的のためのアライメントは、例えば、BLASTN、BLASTp（米国国立生物工学情報センター（NCBI）のウェブサイトで利用可能、Altschul S. F. et al, J. Mol. Biol., 215: 403-410 (1990); Stephen F. et al, Nucleic Acids Res., 25: 3389-3402 (1997)も参照されたい）、ClustalW2（欧州バイオインフォマティクス研究所のウェブサイトで利用可能、Higgins D. G. et al, Methods in Enzymology, 266: 383-402 (1996); Larkin M. A. et al, Bioinformatics (Oxford, England), 23 (21): 2947-8 (2007)も参照されたい）、およびALIGNまたはMegalign（DNASTAR）ソフトウェア等の公的に利用可能なツールを使用して達成され得る。当業者であれば、ツールによって提供される初期設定パラメーターを使用し得る、または例えば適切なアルゴリズムを選択する等によって、アライメントに対して必要に応じてパラメーターをカスタマイズし得る。

【0086】

1つの態様において、本開示は、2種または3種の機能的ドメインを含む実質的に融合ポリペプチド／タンパク質であるポリペプチドを提供し、あらゆる2種の近接する機能的ドメインは、リンカーを介して作動可能に接続されている。任意で、融合ポリペプチド／タンパク質はコンジュゲートされ得る。

【0087】

図1Aおよび図1Bは、本開示において提供されるポリペプチドの2つの主要な実施形態を図解する。図1Aに示されるように、ポリペプチド001Aの第1の実施形態は、N末端からC末端方向に、第1のリンカー10を介して接続されている、第1のフラグメント100および第2のフラグメント200を含む。第1のフラグメント100は、ヒト血清アルブミン（HSA）等の血清アルブミンに結合し得るナノボディドメインを実質的に含む。第2のフラグメント200は、FGF21の機能的形態を実質的に含む生物学的に活性なFGF21ドメインを含み、本開示のある特定の具体的な実施形態によれば、配列

10

20

30

40

50

番号 1 と少なくとも 90 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、一方でその生物学的活性を実質的に保持する。

【0088】

任意で、ポリペプチドは、第 1 のフラグメント 100 におけるナノボディドメインおよび第 2 のフラグメント 200 における FGF21 ドメインの他に、さらに 1 種の付加的な機能的ドメインをさらに含み得る。図 1 B に示されるように、図 1 A に図解される第 1 の実施形態にある第 1 のフラグメント 100 および第 2 のフラグメント 200 に加えて、ポリペプチド 001 B のこの第 2 の実施形態は、第 1 のフラグメント 100 の N 末端を越えて、第 3 のフラグメント 300 をさらに含む。第 3 のフラグメント 300 は、第 2 のフラグメント 200 における FGF21 ドメインに相加的であるまたはそれと相乗的である生物学的活性を発揮し得る付加的な機能的ドメインを含む。第 1 のフラグメント 100 および第 3 のフラグメント 300 は、第 2 のリンカー 20 を介して接続されている。本開示の一部の実施形態によれば、第 3 のフラグメント 300 におけるこの付加的な機能的ドメインは、グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) の機能的形態を実質的に含む、生物学的に活性な GLP-1 ドメインである。一部の実施形態によれば、配列番号 28 と少なくとも 70 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、一方でその生物学的活性を実質的に保持する。

10

【0089】

本明細書において使用される「機能的形態」という用語は、アミノ酸配列のまたは化学構造の違いを有するにも関わらず、親分子の実質的な生物学的活性を依然として保持する、親分子の種々の形態（バリエーション、フラグメント／部、融合体、誘導体、および模倣体等）を指す。本明細書において使用される「実質的な生物学的活性を保持する」という表現は、親分子の生物学的活性の少なくとも一部（例えば、少なくとも (no less than) 約 20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、または 90 %) またはすべてを呈することを意味する。親ポリペプチドの機能的形態は、天然に存在するバリエーション形態、および組み換え法または化学合成によって獲得されたもの等の天然に存在しない形態の両方を含み得る。機能的形態は、非天然アミノ酸残基を含有し得る。

20

【0090】

本明細書において使用される「バリエーション」という用語は、親ポリペプチドと少なくとも 70 % の配列同一性を有し、親ポリペプチドの少なくとも部分的機能を保持するポリペプチドを指す。バリエーションは、親ポリペプチドと 1 つまたは複数のアミノ酸残基とは異なり得る。例えば、バリエーションは、親ポリペプチドの 1 つまたは複数のアミノ酸残基の置換、付加、欠失、挿入、または切り取りを有し得る。

30

【0091】

本明細書において使用される「フラグメント」または「部」という用語は、任意の長さの親ポリペプチドの部分配列を指す。フラグメントは、親ポリペプチドの少なくとも部分的機能を依然として保持し得る。

【0092】

本明細書において使用される「誘導体」という用語は、1 つまたは複数の明確に規定された置換基が、ポリペプチドまたは融合ポリペプチドの 1 つまたは複数の特異的なアミノ酸残基に共有結合で付着している、化学修飾されたポリペプチドまたは融合ポリペプチドを指す。例示的な化学修飾は、例えばアルキル化、アシル化、エステル化、アミド化、リン酸化、グリコシル化、標識化、1 つもしくは複数のアミノ酸のメチル化、または 1 つもしくは複数の部分とのコンジュゲーションであり得る。

40

【0093】

本明細書において使用される「模倣体」という用語は、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、または融合ポリペプチドの代わりになるものとして働く分子構造を指す。例えば、本明細書において使用されるアミノ酸模倣体は、アミノ酸であってもなくてもよいが、親アミノ酸の機能的特質を保持し、一方でアミノ酸模倣体の構造は親アミノ酸の構造とは異なる、合成構造（公知のまたは未知の）であり得る。例は、アミド、 β -、 γ -、 δ -イ

50

ミノ酸（ピペリジン-4-カルボン酸等）のメタクリロイルまたはアクリロイル誘導体等を含む。

【0094】

FGF21ドメイン

本明細書に開示されるポリペプチドは、FGF21ドメインを含む。例えば、本明細書に開示され、図1Aおよび1Bに図解されるポリペプチドの第1および第2の実施形態のそれぞれは、FGF21ドメインを含む。

【0095】

本明細書において使用される「FGF21」という用語は、「線維芽細胞増殖因子21」を指し、その省略であり、天然ヒトFGF21、ならびにその機能的バリエーション、フラグメント、融合体、誘導体、または模倣体を含めたすべての機能的形態を広く包含することが意図される。天然ヒトFGF21は、アミノ酸残基1～28がシグナルポリペプチドであり、アミノ酸残基29～209が、181個の残基の成熟ポリペプチドである、209個のアミノ酸残基からなる（アクセッション番号Q9NSA1を有するUniProtデータベース）。本開示において提供される「生物学的に活性なFGF21ドメイン」という表現は、成熟ポリペプチド、またはその機能的バリエーション、フラグメント、融合体、誘導体、もしくは模倣体であり得るFGF21の機能的形態を指す。ヒトFGF21の成熟ポリペプチドは、本明細書において配列番号1として含まれる。本明細書において使用するとき、FGF21における残基の番号付けは、1位におけるHisおよび181位におけるSerから始まる配列番号1の配列を参照する。

【0096】

FGF21の成熟ポリペプチドの機能的形態は、天然ヒトFGF21の成熟ポリペプチドのものに匹敵するまたはその少なくとも（no less than）約20%（または少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%）のレベルで、FGF21受容体を活性化し得る。FGF21受容体の活性化は、例えば脂肪細胞におけるグルコース取り込みを活性化する能力、血中グルコースおよびトリグリセリドレベルを下げる能力、または体重を下げる能力等の生物学的活性につながり得る（Tezze et al., Front Physiol. 2019, 10:419）。FGF21の成熟ポリペプチドの多くの機能的形態、例えば、限定されることなく、その開示がそれらの全体によって本明細書に組み入れられるWO2019043457A2、WO2018088838A1、WO2018039081A1、WO2017220706A1、WO2017180988A2、WO2017116207A1、WO2017093465、WO2017059371A1、WO2016102562A1、WO2016065326A、WO2013173158A1、WO2013052311A1、WO2013033452A2、WO2012066075A1、WO2012059873A2、WO2012010553A1、WO2011140086A2、WO2010084169A2、WO2010065439A1、WO2008121563A2、WO2006028595A2、WO2006028714A1、WO2005113606A2、WO2016102562Aに開示されるものが当技術分野において公知である。

【0097】

ある特定の実施形態において、本明細書において提供されるFGF21ドメインは、配列番号1と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、一方でその実質的な生物学的活性を保持する。

【0098】

ある特定の実施形態において、FGF21ドメインは、配列番号1との関係で、多くとも12、11、10、9、8、7個のアミノ酸変異（例えば、置換、挿入、または欠失）を含み、一方で配列番号1の実質的な生物学的活性を保持する。ある特定の実施形態において、FGF21ドメインは、配列番号2～14、16～19、89～92、および102～105のアミノ酸配列を含む。

【0099】

ある特定の実施形態において、F G F 2 1 は 1 つまたは複数の変異を含む。ある特定の
実施形態において、1 つまたは複数の変異は保存的置換を含む。ある特定の実施形態にお
いて、1 つまたは複数の変異は、配列番号 1 との関係で、1 2 1、1 6 8、1 7 1、およ
び 1 8 0 からなる位置から選択される位置にある。

【0100】

ある特定の実施形態において、F G F 2 1 ドメインにおける 1 つまたは複数の変異は、
N 1 2 1 Q、M 1 6 8 L、P 1 7 1 G、および A 1 8 0 E、またはその任意の組み合わせ
から選択される。例えば、本明細書に開示されるポリペプチドにおける F G F 2 1 ドメ
インは、4 種の変異のうちの 1 種、4 種の変異のうちの 2 種、4 種の変異のうちの 3 種、ま
たは変異のうちの 4 種を任意で含有し得る。

10

【0101】

ある特定の実施形態において、F G F 2 1 ドメインは、

- 1) N 1 2 1 Q、
 - 2) M 1 6 8 L；
 - 3) A 1 8 0 E；
 - 4) N 1 2 1 Q および M 1 6 8 L；
 - 5) N 1 2 1 Q および A 1 8 0 E；
 - 6) M 1 6 8 L および A 1 8 0 E；
 - 7) N 1 2 1 Q、P 1 7 1 G、および A 1 8 0 E；
 - 8) N 1 2 1 Q、M 1 6 8 L、および P 1 7 1 G；
 - 9) M 1 6 8 L、P 1 7 1 G、および A 1 8 0 E；ならびに
 - 10) N 1 2 1 Q、M 1 6 8 L、P 1 7 1 G、および A 1 8 0 E
- からなる群から選択される、配列番号 1 との関係における変異の組み合わせを含む。

20

【0102】

ある特定の実施形態において、F G F 2 1 ドメインは、配列番号 2 (N 1 2 1 Q)、配
列番号 3 (M 1 6 8 L)、配列番号 4 (A 1 8 0 E)、配列番号 5 (N 1 2 1 Q、M 1 6
8 L、および A 1 8 0 E)、配列番号 8 9 (N 1 2 1 Q および M 1 6 8 L)、配列番号 9
0 (N 1 2 1 Q および A 1 8 0 E)、配列番号 9 1 (M 1 6 8 L および A 1 8 0 E)、ま
たは配列番号 1 4 (N 1 2 1 Q、M 1 6 8 L、P 1 7 1 G、および A 1 8 0 E) に記載さ
れるアミノ酸配列を含み得る。

30

【0103】

ある特定の実施形態において、ポリペプチドにおける F G F 2 1 ドメインは、機能的部
分がコンジュゲートされるコンジュゲート可能な残基または最高 1 個のコンジュゲート可
能な残基をさらに含む。

【0104】

本明細書において使用される「コンジュゲート可能な残基」という用語は、化学的部分
に化学的にまたは酵素的にコンジュゲートし得る官能基を有するだけでなく、ポリペプチ
ドにおけるその位置が、その特定の官能基に対するコンジュゲート反応においてそのよう
なコンジュゲーションを起こしやすくさせる、ポリペプチド内の特定の位置におけるアミ
ノ酸残基を指す。本明細書において使用される「コンジュゲーション」とは、1 つの物理
的実体を形成するために 2 種の分子と一緒に接合する反応を指す。例えば、2 種の分子を
連結する共有結合が、コンジュゲーションにおいて形成され得る。コンジュゲート可能な
残基は、天然アミノ酸残基、非天然アミノ酸残基、修飾されたアミノ酸残基、またはアミ
ノ酸模倣体であり得る。コンジュゲート可能な残基の例は、限定されることなく、リジン
、システイン、または非天然アミノ酸残基を含む。

40

【0105】

当業者であれば、残基がコンジュゲート可能な残基であるかどうかは、所与のコンジュ
ゲート反応、および／またはコンジュゲートされる対象となる官能基に依存するであろう
ことを理解するであろう。例えば、コンジュゲートされる対象となる官能基がチオール基
であり、かつ／またはコンジュゲーション反応がチオール基に特異的もしくは選択的であ

50

る場合には、リジン（すなわち、その側鎖に官能性チオール基を有しない）は、その位置に関わらずコンジュゲート可能な残基ではないと考えられ、一方で、ジスルフィド結合（鎖内結合または鎖間結合に関わらず）を形成しない不對システイン残基は、コンジュゲート可能な残基であり得る。

【0106】

ある特定の実施形態において、ポリペプチドは、チオール基に特異的または選択的なコンジュゲーション反応（例えば、マレイミド反応、またはジスルフィド結合形成のための反応）のためのコンジュゲート可能な残基を含む。「コンジュゲート可能な」という表現は、アミノ酸残基に言及する場合、ポリペプチドにおける特定の位置における残基が、コンジュゲーションのために十分に使用可能であることを意味することが意図される。例えば、ジスルフィド架橋の一部としてのシステイン残基は、本開示におけるコンジュゲート可能な残基ではない。

10

【0107】

ある特定の実施形態において、コンジュゲート可能な残基は、システイン残基、好ましくは、ジスルフィド架橋の一部ではない遊離システイン残基である。

【0108】

ある特定の実施形態において、本明細書において提供されるポリペプチドの F G F 2 1 ドメインにおけるコンジュゲート可能な残基 C R は、F G F 2 1 ドメイン、例えば配列番号 1 との関係で 1 6 9 位～1 8 1 位に及ぶ C 末端フラグメント内の位置にあり得る。さらに任意で、コンジュゲート可能な残基は、配列番号 1 との関係で、1 6 9、1 7 0、1 7 1、1 7 2、1 7 3、1 7 4、1 8 0、および 1 8 1 位からなる群から選択される位置にあり得る。いかなる理論によっても拘束されることを望むことなく、F G F 2 1 ドメインの C 末端フラグメントにおけるコンジュゲーションは、F G F 2 1 ドメインの C 末端分解を低下させることが本発明者らによって見出される。

20

【0109】

ある特定の実施形態において、ポリペプチドにおける F G F 2 1 ドメインは、1) N 1 2 1 Q および M 1 6 8 L、2) N 1 2 1 Q、M 1 6 8 L、および P 1 7 1 G、3) N 1 2 1 Q、M 1 6 8 L、および A 1 8 0 E、または 4) N 1 2 1 Q、M 1 6 8 L、P 1 7 1 G、および A 1 8 0 E の変異の組み合わせを有し、配列番号 1 との関係で、1 6 9、1 7 0、1 7 1、1 7 2、1 7 3、1 7 4、または 1 8 0、1 8 1 位におけるコンジュゲート可能な残基（例えば、システイン残基）をさらに含む。

30

【0110】

ある特定の実施形態において、ポリペプチドにおける F G F 2 1 ドメインは、N 1 2 1 Q および M 1 6 8 L の変異の組み合わせ、または N 1 2 1 Q、M 1 6 8 L、および P 1 7 1 G の変異の組み合わせを有し、配列番号 1 との関係で 1 8 0 位におけるコンジュゲート可能な残基（例えば、システイン残基）をさらに含む。

【0111】

ある特定の実施形態において、ポリペプチドにおける F G F 2 1 ドメインは、N 1 2 1 Q、P 1 7 1 G、および M 1 6 8 L の変異の組み合わせ、または N 1 2 1 Q、M 1 6 8 L、P 1 7 1 G、および A 1 8 0 E の変異の組み合わせを有し、以下に挙げられた、配列番号 1 との関係における位置におけるコンジュゲート可能な残基：1 6 9 位、1 7 0 位、1 7 2 位、1 7 3 位、または 1 7 4 位における導入システイン残基（例えば、置換による）をさらに含む。

40

【0112】

ある特定の実施形態において、ポリペプチドにおける F G F 2 1 ドメインは、1 6 9 位（例えば、配列番号 6）、1 7 0 位（例えば、配列番号 7）、1 7 1 位（例えば、配列番号 8）、1 7 2 位（例えば、配列番号 9）、1 7 3 位（例えば、配列番号 10）、1 7 4 位（例えば、配列番号 11 または配列番号 92）、1 8 0 位（例えば、配列番号 12）、または 1 8 1 位（例えば、配列番号 13）における導入システイン残基を含むアミノ酸配列を有する。ある特定の実施形態において、F G F 2 1 は、配列番号 1 との関係で、それ

50

それが、１２１、１６８、１７１、および１８０位から選択される位置にある１つまたは複数のアミノ酸残基変異を除いて、配列番号２～５、８９～９１、１４、および１０２～１０５のアミノ酸配列を含む。

【０１１３】

ある特定の実施形態において、ポリペプチドにおけるＦＧＦ２１ドメインは、１７１位に導入Ｇを有する（例えば、配列番号１４）。いかなる理論によっても拘束されることを望むことなく、ＦＧＦ２１ドメインにおける１７１Ｇの導入も、ＦＧＦ２１ドメインのＣ末端分解を低下させるのに有用であり得ることが本発明者らによって見出される。

【０１１４】

ある特定の実施形態において、ポリペプチドにおけるＦＧＦ２１ドメインは、Ｎ１２１Ｑ、Ｐ１７１Ｇ、およびＭ１６８Ｌの変異の組み合わせ、またはＮ１２１Ｑ、Ｍ１６８Ｌ、Ｐ１７１Ｇ、およびＡ１８０Ｅの変異の組み合わせを有し、以下に挙げられた、配列番号１との関係における位置におけるコンジュゲート可能な残基：位置は配列番号１との関係におけるものである、１７２位、１７３位、１７４位における導入Ｔ；または位置は配列番号１との関係におけるものである、１７０位もしくは１７４位における導入Ｎをさらに含む。

【０１１５】

ある特定の実施形態において、ポリペプチドにおけるＦＧＦ２１ドメインは、配列番号１との関係で、１７２位（例えば、配列番号１６）もしくは１７３位（例えば、配列番号１７）における導入Ｔ；または１７０位（例えば、配列番号１８）もしくは１７４位（例えば、配列番号１９）における導入Ｎを有する。ある特定の実施形態において、ポリペプチドにおけるＦＧＦ２１ドメインは、配列番号１６～１９からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する。

【０１１６】

ＦＧＦ２１ドメイン上の機能的部分

図１Ａおよび図１Ｂに示されるポリペプチドの第１および第２の実施形態において、ポリペプチド００１Ａおよび００１Ｂのいずれかまたは両方を、第２のフラグメント２００（すなわち、ＦＧＦ２１ドメイン）におけるコンジュゲート可能な残基ＣＲ（両図において「＊」によって図解される）で機能的部分８００と任意でコンジュゲートし、それによって、ポリペプチドコンジュゲートを形成し得る。ある特定の他の実施形態において、ポリペプチドは、例えばポリペプチドが１７１位に導入Ｇを有する場合、機能的部分とコンジュゲートされない。

【０１１７】

本明細書において使用される「コンジュゲート」という用語は、１つの物理的実体を形成するために一緒に接合された２種以上の分子の結果としての化合物を指す。例えば、本開示のポリペプチドは、ある特定の実施形態によれば、一緒に接合されるポリペプチドおよび機能的部分から生じる実質的に化合物であるポリペプチドコンジュゲートを形成し得る。分子（例えば、機能的部分およびポリペプチド）は、共有結合、非共有結合、リンカー、化学修飾、もしくはタンパク質融合によって、または当業者に公知の任意の手段によって一緒に付着し得る。好ましくは、分子は、共有結合によって一緒に付着し得る。付着は、永続的または可逆的であり得る。一部の実施形態において、ある特定の切断可能なまたは切断不能なリンカーが含まれ得る。

【０１１８】

本明細書において使用される「機能的部分」という用語は、生物学的、薬物動態学的（ＰＫ）、薬力学的（ＰＤ）特性を機能的に変更し得る（例えば、生物学的活性を増強する、インビトロにおける安定性を増加させる、インビボにおける半減期を増加させる、または標的受容体への結合を増強する等）部分を指す。ＦＧＦ２１ドメインにコンジュゲートされる機能的部分は、グリコシル部分または合成化学部分を任意で含み得る。

【０１１９】

任意で、機能的部分８００は合成化学部分を含み得、コンジュゲート可能な残基ＣＲは

10

20

30

40

50

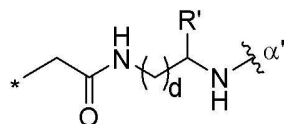
、合成化学部分とコンジュゲートされ得る導入残基であり得る。

【0120】

一部の実施形態によれば、コンジュゲート可能な残基CRは、配列番号1との関係で、上述の169、170、171、172、173、174、180、および181位のいずれかにおける導入システイン残基であり得る。本明細書において、合成化学部分は、 $^*-X-Y-Z$ の構造を任意で含み得、式中、X、Y、およびZは、結合を介して相互接続され、Xの*末端は、ポリペプチド上のコンジュゲート可能な残基に接続されている。本明細書において、Xは、

【0121】

【化11】

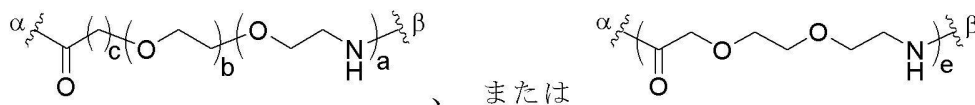


10

であり得；Yは、

【0122】

【化12】



20

であり得；Zは、

【0123】

【化13】



であり得、式中、 α 位は α' 位に連結され、 β 位は β' 位に連結される。本明細書において、R1は水素または $-COOH$ であり得；dは1、2、または3であり得；aは1、2、または3であり得；bは1、2、または3であり得；cは1または2であり得；dは1、2、または3であり得；eは1、2、または3であり得る。

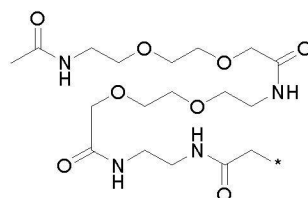
30

【0124】

一部の実施形態によれば、合成化学部分は、 $Ac-2XADO-EDA-CO-CH_2^*$ であり得、式中、*末端は、

【0125】

【化14】



40

の構造を有する、ポリペプチド上のコンジュゲート可能なシステイン残基に接続されている。

【0126】

配列が配列番号6～13および92に記載される、上で示されるそれらそれぞれの位置に導入システイン残基を含むFGF21ドメインの上記の実施形態のそれぞれにおいて、 $Ac-2XADO-EDA-CO-CH_2^*$ 等の合成化学部分を、導入システイン残基（例えば、置換による）でコンジュゲートし、それによって、合成化学部分を担持するポ

50

リペプチドコンジュゲートを獲得し得る。

【0127】

コンジュゲートされた機能的部分を担持するポリペプチドにおいて、機能的部分800はグリコシル部分を任意で含み得、それに応じて、コンジュゲート可能な残基CRは、グリコシル化可能である（すなわち、グリコシル化され得る）導入残基であり得、それは、配列番号1との関係で、172位もしくは173位における導入T、または170位もしくは174位における導入N残基であり得る。

【0128】

配列が配列番号16～19に記載される、上で示されるそれらそれぞれの位置に導入TまたはNを含むFGF21ドメインの上記の実施形態のそれぞれにおいて、グリコシル部分を導入システイン残基でコンジュゲートし、それによって、グリコシル部分を担持するポリペプチドコンジュゲートを獲得し得る。

【0129】

ある特定の実施形態において、FGF21ドメインは、配列番号1との関係で171位に導入Gを含み、機能的部分とコンジュゲートされない。ある特定の実施形態において、そのようなFGF21ドメインは、配列番号14のアミノ酸配列を含み得る。

【0130】

ナノボディドメイン

本明細書に開示され、図1Aおよび1Bに図解されるポリペプチドの第1および第2の実施形態のそれぞれは、ナノボディドメインを含む。

【0131】

本明細書において使用される「ナノボディ」という用語は、「単一ドメイン抗体」と互換可能であると見なされ、それは、重鎖の単一可変ドメインまたは軽鎖の単一可変ドメインを含有する抗体フラグメントを指す。ナノボディは、3つの相補性決定領域（CDR）を含有する。ある特定の実施形態において、ナノボディは、特異的抗原（例えば、血清アルブミン）に結合し得る。

【0132】

本明細書において使用される「血清アルブミン」という用語は、脊椎動物血液に見出されるアルブミン（球状タンパク質のタイプ）を指す。血清アルブミンは肝臓によって産生され、血漿中に溶解して存在し、哺乳類において最も豊富な血中タンパク質である。血清アルブミンは、典型的に3週間前後の半減期を有し、それは胎児性Fc受容体（FcRn）によって主に調節される。FcRnは、血清アルブミンを、それに高いアフィニティーで結合し、それをリソソーム経路からそらし、それを細胞外コンパートメントに戻すことによって、細胞内分解から保護する。一部の実施形態において、血清アルブミンは、ヒト血清アルブミン（HSA）、カニクイザル血清アルブミン、およびマウス血清アルブミンから選択される。一部の実施形態において、本明細書において提供される血清アルブミンはHSAである。

【0133】

本明細書において使用される「抗体」という用語は、特異的抗原に結合する任意の免疫グロブリンを含む。従来の抗体（例えば、ヒトまたはマウス由来の抗体）は、2本の重（H）鎖および2本の軽（L）鎖を含む。重鎖は、 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 、および μ として分類され、各重鎖は、可変ドメイン（VHドメイン）、ならびに第1、第2、第3、および任意で第4の定常領域（それぞれCH1、CH2、CH3、CH4）からなる；軽鎖は、 λ または κ として分類され、一方で各軽鎖は、可変ドメイン（VLドメイン）および定常ドメインからなる。抗体は「Y」の形状を有し、Yのステムは、ジスルフィド結合を介して一緒に結合している2本の重鎖の第2および第3の定常ドメインからなる。Yの各アームは、単一軽鎖の可変および定常ドメインに結合している、単一重鎖の可変ドメインおよび第1の定常ドメインを含む。軽鎖および重鎖の可変ドメインは、抗原結合に関与する。両鎖における可変ドメインは、相補性決定領域と呼ばれる3つの超可変領域（CDR、つまり軽鎖または重鎖のCDR1、CDR2、およびCDR3）を一般的に含有する。本明細書

10

20

30

40

50

に開示される抗体および抗原結合フラグメントに対するCDR境界は、Kabat、IMGT、Chothia、またはAl-Lazikaniの慣習によって規定され得るまたは特定され得る (Al-Lazikani, B., Chothia, C., Lesk, A. M., J. Mol. Biol., 273 (4), 927 (1997); Chothia, C. et al., J Mol Biol. Dec 5; 186 (3): 651-63 (1985); Chothia, C. and Lesk, A. M., J. Mol. Biol., 196, 901 (1987); Chothia, C. et al., Nature. Dec 21-28; 342 (6252): 877-83 (1989); Kabat E. A. et al., Sequences of Proteins of immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Marie-Paule Lefranc et al., Developmental and Comparative Immunology, 27: 55-77 (2003); Marie-Paule Lefranc et al., Immunome Research, 1 (3), (2005); Marie-Paule Lefranc, Molecular Biology of B cells (second edition), chapter 26, 481-514, (2015))。3つのCDRは、CDRよりも高度に保存され、高度に可変のループを支持する足場を形成するフレームワーク領域 (FR、つまり軽鎖または重鎖のFR1、FR2、FR3、およびFR4) として公知の隣接する伸張の間に介在する。重鎖および軽鎖の定常ドメインは抗原結合に関わらないが、様々なエフェクター機能を呈する。従来の抗体は、それらの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に基づいてクラスに割り振られる。

10

20

30

40

50

【0134】

単一可変ドメインは、ラクダ科抗体の可変ドメイン (VHHドメイン)、または軟骨魚類抗体の可変ドメイン (VNARDドメイン) に由来し得る。ラクダ科抗体および軟骨魚類抗体の両方とも、軽鎖を天然に欠如し、1対の重鎖からなる。代替的に、単一可変ドメインは、従来の抗体 (例えば、ヒトまたはマウス由来) 重鎖の可変ドメイン (VHドメイン)、または共通の抗体軽鎖の可変ドメイン (VLドメイン) に由来し得る。単一ドメイン抗体は、サイズがかなり小さく、例えば多くとも25 kD、多くとも20 kD、多くとも15 kD、または多くとも10 kDの分子量を有することが企図される。

【0135】

「ナノボディ」または「単一ドメイン抗体」という用語は、本明細書においてその最も広い意味で使用され、具体的な生物学的供給源にまたは調製の具体的な方法に限定されないことが留意されるべきである。例えば、単一ドメイン抗体は、例えば、(1) 天然に存在する重鎖抗体のVHHドメインもしくはVNARDドメインを単離することによって；(2) 天然に存在するVHHドメインもしくはVNARDドメインをコードするヌクレオチド配列の発現によって；(3) 天然に存在するVHHドメインもしくはVNARDドメインの「ヒト化」(下で記載される) によって、またはそのようなヒト化VHHドメインもしくはVNARDドメインをコードする核酸の発現によって；(4) 人間由来等、任意の動物種、特に哺乳類の種由来の天然に存在するVHドメインの「ラクダ化」によって、またはそのようなラクダ化VHドメインをコードする核酸の発現によって；5) タンパク質、ポリペプチド、もしくは他のアミノ酸配列を調製するための合成もしくは半合成技法を使用し；および／あるいは(6) 前述のものの任意の組み合わせによって獲得され得る。前述のものを実施するための適切な方法および技法は、当業者に明らかであろう。

【0136】

一部の実施形態において、本明細書に記載される単一ドメイン抗体は、Camelid a e 種において、例えばラクダ、ヒトコブラクダ、アルパカ、およびグアナコにおいて作られた抗体に由来するVHHドメインを含む。VHHドメインを含む単一ドメイン抗体は、高溶解性であり、熱、pH、プロテアーゼ、および他の変性剤または条件に高度に安定

である。

【0137】

一部の実施形態において、第1のポリペプチドフラグメントは、血清アルブミンに特異的に結合し得る1種または複数の単一ドメイン抗体を含む。

【0138】

結合分子、例えば抗体、およびその結合パートナー、例えば抗原の相互作用に関連した「結合特異性」、「特異的結合」、または「特異的に結合する」という用語は、相互作用が、結合パートナー上の特定の構造、例えば抗原決定基またはエピトープの存在に依存することを意味する。言い換えれば、抗体は、結合パートナーが、他の分子または生物の混合物に存在する場合でさえ、結合パートナーに優先的に結合するまたは認識する。抗原に免疫特異的に結合する抗体またはそのフラグメントは、同じエピトープを担持する関連抗原と交差反応性であり得る。「結合特異性」は、一般的に、非特異的バックグラウンド結合に対して測定される。典型的に、抗体は、それが、バックグラウンド結合を上回って少なくとも10倍標的抗原に結合する場合に特異的と見なされる。

【0139】

本明細書において企図される血清結合性単一ドメイン抗体は、血清アルブミンに、FcRnへの前記血清アルブミン分子の結合が（有意に）（すなわち、単一ドメイン抗体がそれに結合していない場合の、FcRnへの前記アルブミン分子の結合と比較して）低下しないまたは阻害されないように結合し得るまたは代わりに結び付き得る。本発明のこの態様において、「有意に低下しないまたは阻害されない」とは、FcRnへの血清アルブミンに関する結合アフィニティー（SPR等の適切なアッセイを使用して測定される）が、50%を上回って低下しない、好ましくは30%を上回って低下しない、さらにより好ましくは5%を上回って低下しない等の10%を上回って低下しない、または本質的に全く低下しないことを意味する。この態様において、「有意に低下しないまたは阻害されない」は、血清アルブミン分子の半減期が有意に低下しない（例えば、それ自体公知の適切な技法を使用して測定される、50%を上回って低下しない、好ましくは30%を上回って低下しない、さらにより好ましくは5%を上回って低下しない等の10%を上回って低下しない、または本質的に全く低下しない）ことも意味し得る。一部の実施形態において、単一ドメイン抗体は、FcRnへの血清アルブミンの結合に関わらない、血清アルブミン上のアミノ酸残基に結合し得る。

【0140】

一部の実施形態において、本明細書に記載される単一ドメイン抗体は、HSA、カニクイザル血清アルブミン、およびマウス血清アルブミンから選択される血清アルブミンに結合する。一部の実施形態において、マウス血清アルブミンに対する結合アフィニティーは、ヒトまたはカニクイザル血清アルブミンに対するものよりもほぼ弱い。一部の実施形態において、単一ドメイン抗体はHSAに特異的に結合する。

【0141】

一部の実施形態において、本明細書に記載される単一ドメイン抗体は、十分な結合アフィニティーで血清アルブミンに結合する。本明細書において使用される「アフィニティー」という用語は、免疫グロブリン分子（すなわち、抗体）またはそのフラグメントと抗原との間の非共有結合性相互作用の強度を指す。アフィニティーは、「K_d」値を使用して数値的に表現され得る。一般的に、より低いK_d値ほど、より強い結合に相当する。K_dは、ラジオイムノアッセイ（RIA）、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、表面プラズモン共鳴（SPR）法、マイクロスケール熱泳動法、HPLC-MS法、およびフローサイトメトリー（FACS等）法を含むがそれらに限定されない、当技術分野において公知の任意の従来の方法を使用することによって決定され得る。一部の実施形態において、本明細書に開示される抗体は、特異的抗原との、 $\leq 10^{-6}$ M（例えば、 $\leq 5 \times 10^{-7}$ M、 $\leq 2 \times 10^{-7}$ M、 $\leq 10^{-7}$ M、 $\leq 5 \times 10^{-8}$ M、 $\leq 2 \times 10^{-8}$ M、 $\leq 10^{-8}$ M、 $\leq 5 \times 10^{-9}$ M、 $\leq 4 \times 10^{-9}$ M、 $\leq 3 \times 10^{-9}$ M、 $\leq 2 \times 10^{-9}$ M、または $\leq 10^{-9}$ M）のK_d値を有する。

【0142】

ある特定の実施形態において、本明細書において提供される単ドメイン抗体は、 $10^{-5} \text{ M} \sim 1 \times 10^{-12} \text{ M}$ 未満、 $10^{-7} \text{ M} \sim 1 \times 10^{-12} \text{ M}$ 未満、または $10^{-8} \text{ M} \sim 1 \times 10^{-12} \text{ M}$ 未満のKd値でHSAに結合し得る。一部の実施形態において、Kdは、多くとも $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ （例えば、多くとも $5 \times 10^{-7} \text{ M}$ 、多くとも $2 \times 10^{-7} \text{ M}$ 、多くとも 10^{-7} M 、多くとも $5 \times 10^{-8} \text{ M}$ 、多くとも $2 \times 10^{-8} \text{ M}$ 、多くとも 10^{-8} M 、多くとも $5 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、多くとも $4 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、多くとも $3 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、多くとも $2 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、または多くとも 10^{-9} M ）である。

【0143】

一部の実施形態において、本明細書において提供される単ドメイン抗体はヒト化抗体である。本明細書において使用される「ヒト化」という用語は、単ドメイン抗体が、非ヒト動物に由来するCDR、およびヒトに由来するFR領域を含むことを意味する。ヒト化抗体ポリペプチドは、ヒトにおけるその低下した免疫原性において望ましい。ヒト化抗体ポリペプチドは、非ヒトCDR配列が、ヒトまたは実質的にヒトのFR配列に接ぎ木されることから、その可変領域においてキメラである。抗体ポリペプチドのヒト化は、ヒト免疫グロブリン遺伝子における対応するヒトCDR遺伝子の代わりに、非ヒト（ラクダ科等）CDR遺伝子を置換することによって本質的に実施され得る（例えば、Jones et al. (1986) Nature 321:522-525; Riechmann et al. (1988) Nature 332:323-327; Verhoeyen et al. (1988) Science 239:1534-1536を参照されたい）。

【0144】

ファージディスプレイを使用して単離された完全ヒトドメイン抗体、camelid aeファミリーから開発されたVHH抗体、および軟骨魚類から開発されたVNAR抗体等、高いアフィニティーでHSAに特異的に結合し得る様々な単ドメイン抗体が当技術分野において公知であり、Zorzi, A et al, Med Chem Commun, 2019, 10, 1068を参照されたい。例示的なHSA結合性単ドメイン抗体は、US8188223B2、US9067991B2、US9321832B2、PCT出願WO2008028977A2、WO2008043822A2、WO2020099871A1、G. Winter, et al, Annu. Rev. Immunol., 1994, 12, 433-455、L. J. Holt, et al., Protein Eng., Des. Sel., 2008, 21(5), 283-288、A. Walker, et al., Protein Eng., Des. Sel., 2010, 23(4), 271-278、L. J. Goodall, et al., PLoS One, 2015, 10(9), e0137065、R. L. O'Connor-Semmes, et al., Clin. Pharmacol. Ther., 2014, 96(6), 704-712、C. Read, et al., Basic Clin. Pharmacol. Toxicol., 2019, 1-8、R. Adams, et al., mAbs, 2016, 8(7), 1336-1346、E. Dave, et al., mAbs, 2016, 8(7), 1319-1335、S. Steeland, et al., Drug Discovery Today, 2016, 21(7), 1076-1113、K. Coppieters, et al., Arthritis Rheum., 2006, 54(6), 1856-1866、M. Van Roy, et al., Arthritis Res. Ther., 2015, 17, 135、C. McMahon, et al., Nat. Struct. Mol. Biol., 2018, 25(3), 289-296、M. R. Muller, et al., mAbs, 2012, 4(6), 673-685に開示されており、そのすべては、本開示の範囲内で企図され、参照により組み入れられる。

【0145】

一部の実施形態において、単ドメイン抗体はVHHドメインを含む。一部の実施形態

において、VHHドメインはヒト化される。

【0146】

一部の実施形態において、VHHドメインは、相補性決定領域1 (CDR1)、CDR2、およびCDR3を含み、CDR1は、配列番号20 (SFGMS)の配列、または最高3、2、もしくは1個のアミノ酸変異を有するそのバリエーションを含み、CDR2は、配列番号21 (SISGSGSDTL YADSVKG)の配列、または最高3、2、もしくは1個のアミノ酸変異を有するそのバリエーションを含み、かつ／あるいはCDR3は、配列番号22 (GGSLSR)の配列、または最高3、2、もしくは1個のアミノ酸変異を有するそのバリエーションを含み、VHHドメインは、血清アルブミンへの、任意でヒト血清アルブミンへの結合特異性を保持する。

10

【0147】

一部の実施形態において、VHHドメインは、配列番号20の配列を含む相補性決定領域1 (CDR1)、配列番号21の配列を含むCDR2、および配列番号22の配列を含むCDR3を含む。

【0148】

一部の実施形態において、VHHドメインは、配列番号20の配列からなる相補性決定領域1 (CDR1)、配列番号21の配列からなるCDR2、および配列番号22の配列からなるCDR3を含む。

【0149】

一部の実施形態において、VHHドメインは、配列番号23の配列、または配列番号23と少なくとも70% (例えば、少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、99%)の同一性を有するそのバリエーションを含み、バリエーションは、血清アルブミンへの結合特異性および／またはアフィニティを保持する。

20

【0150】

一部の実施形態において、配列番号23のバリエーションは、配列番号23との関係で、最高10、9、8、7、6、5、4、3、2、または1個のアミノ酸変異を有する。

【0151】

図1Aに図解されるポリペプチドのある特定の実施形態において、血清アルブミン結合性ナノボディドメインは、VHHドメインに付着したN末端伸長をさらに含む。ある特定の実施形態において、N末端伸長は、SG、AG、S、またはAのアミノ酸残基を含み、ゆえに配列番号24～27から選択されるアミノ酸配列を含み得る。

30

【0152】

ある特定の実施形態において、N末端伸長は、タグ、任意で切断可能なタグを含む。いかなる理論によっても拘束されることを望むことなく、ある特定のN末端伸長は、発現および翻訳後プロセッシングに有用であり得ると思われる。

【0153】

ある特定の実施形態において、血清アルブミン結合性ナノボディドメインは、VHHドメインに付着したN末端伸長を含まない。例えば、VHHドメインは、切断後もはや最終産物に存在しない切断可能なタグに付着され得る。

【0154】

一部の実施形態において、第1のフラグメントは、1つまたは複数の血清アルブミン結合性ナノボディドメインを含み得る。

40

【0155】

GLP-1ドメイン

本明細書に開示され、図1Bに図解されるポリペプチドの第2の実施形態は、第2のフラグメント200における上で記載されるFGF21ドメイン、および第1のフラグメント100における血清アルブミン結合性ナノボディドメインに加えて、付加的な機能的ドメインを含む第3のフラグメント300をさらに含む。

【0156】

一部の実施形態によれば、付加的な機能的ドメインは、生物学的に活性なGLP-1ド

50

メインを含む。

【0157】

本明細書において使用される「グルカゴン様ペプチド-1」または「GLP-1」という用語は、天然GLP-1ペプチド、ならびにその機能的バリエーション、フラグメント、融合体、誘導体、および模倣体等のすべてのその機能的形態を広く包含することが意図される。

【0158】

本明細書において使用される「天然GLP-1ペプチド」という用語は、その配列が配列番号28に記載される天然ヒトグルカゴン様ペプチド-1（GLP-1（7～37））を指す。GLP-1における残基の番号付けは、7位におけるH残基から始まり、37位におけるG残基で終わる、配列番号28の配列を参照する。

10

【0159】

天然GLP-1ペプチドの機能的形態は、天然GLP-1ペプチドのものに匹敵するまたはその少なくとも20%（または少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%）のレベルで、GLP-1受容体を活性化し得る。GLP-1受容体の活性化は、典型的に、当技術分野において公知であるように、インスリン分泌刺激作用または他の生理学的効果をもたらすシグナル変換経路を開始する。GLP-1ペプチドの多くの機能的形態、例えば、限定されることなく、リラグルチド、セマグルチド、デュラグルチド、アルビグルチド、およびその開示全体が本明細書に組み入れられるWO2000055203A1、WO98/08871、WO2006/097537、WO2007139589A1、WO1998019698A1、WO2001098331A2、WO2003040309A2、WO2005000892A2、WO2015000942A1、WO2016083499A1に開示されるものが当技術分野において公知である。

20

【0160】

ある特定の実施形態において、本明細書において提供されるGLP-1ドメインは、配列番号28と少なくとも70%（例えば、少なくとも71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%）の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、一方で配列番号28の実質的な生物学的活性を保持する。

30

【0161】

ある特定の実施形態において、GLP-1ドメインは、配列番号28との関係で多くとも9、8、7、6、5、4、3、または2個の置換を含み、一方で配列番号28の実質的な生物学的活性を保持する。ある特定の実施形態において、GLP-1ドメインは、配列番号28との関係で少なくとも2、3、4、5、6、7、8、または9個の置換を含み、一方で配列番号28の実質的な生物学的活性を保持する。

【0162】

ある特定の実施形態において、GLP-1ドメインは、1つまたは複数の変異をさらに含む。アミノ酸置換の例は、その対応するD-アミノ酸の代わりにL-アミノ酸を置換すること、チオール含有側鎖を有するホモシステインもしくは他の非天然アミノ酸の代わりにシステインを置換すること、アミノ含有側鎖を有するホモリジン、ジアミノ酪酸、ジアミノプロピオン酸、オルニチン、もしくは他の非天然アミノ酸の代わりにリジンを置換すること、またはノルバリンもしくは同様のものの代わりにアラニンを置換することを含む。

40

【0163】

様々な置換が天然GLP-1ペプチドに導入されており、その生物学的活性を保持し得るまたはさらに向上させ得ることが示されている。ある特定の実施形態において、GLP-1は、配列番号28と比べた、A8、G22、K34、R36、およびH7、ならびに／またはその任意の組み合わせからなる群から選択される位置における1つまたは複数の

50

変異を含む。例えば、A 8における置換は、該残基におけるD P P 4酵素的切断を阻止するのに有用であり、G 2 2における置換は、活性および溶解度を向上させるのに望ましく、ならびにR 3 6における置換は、免疫原性を低下させるのに有用であると思われる。ある特定の実施形態において、G L P - 1は、配列番号2 8との関係で、A 8、G 2 2、K 2 6、K 3 4、およびR 3 6、ならびに／またはその任意の組み合わせからなる群から選択される位置における1つまたは複数の変異を含む。これらの位置における置換の例は、限定されることなく、A 8 G、A 8 S、A 8 V、A 8 A i b、A 8 T、A 8 I、A 8 L、G 2 2 E、K 2 6 R、K 3 4 R、R 3 6 G、またはその任意の組み合わせ、ならびにその全体によって本明細書に組み入れられる米国特許第8, 2 7 3, 8 5 4号に記載される置換を含む。ある特定の実施形態において、1つまたは複数の付加的な置換は保存的置換を含む。

10

【0 1 6 4】

ある特定の実施形態において、G L P - 1ドメインは、A 8 G、A 8 S、A 8 V、A 8 A i b、A 8 T、およびA 8 Lからなる群から選択されるA 8の置換を含む。ある特定の実施形態において、G L P - 1ドメインはG 2 2 Eの置換を含む。ある特定の実施形態において、G L P - 1ドメインはR 3 6 Gのn置換を含む。ある特定の実施形態において、G L P - 1ドメインは、K 2 6 RであるK 2 6の置換を含む。ある特定の実施形態において、G L P - 1ドメインは、K 3 4 RであるK 3 4の置換を含む。

【0 1 6 5】

ある特定の実施形態において、G L P - 1は、A 8 G、K 2 6 R、K 3 4 R、G 2 2 E、およびR 3 6 Gからなる群から選択される1つまたは複数の置換を含むまたはそれからなる。ある特定の実施形態において、G L P - 1は、A 8 G、G 2 2 E、およびR 3 6 Gからなる群から選択される1つまたは複数の置換を含むまたはそれからなる。

20

【0 1 6 6】

本開示において、図1 Bにおける第3のフラグメント3 0 0における生物学的に活性なG L P - 1ドメインについての少なくとも以下の実施形態が提供される：

【0 1 6 7】

(1) G L P - 1の野生型の機能的形態を表す配列番号2 8；

【0 1 6 8】

(2) 置換A 8 G、G 2 2 E、およびR 3 6 Gを含む、G L P - 1の3置換機能的形態を表す配列番号2 9；

30

【0 1 6 9】

(3) 置換A 8 G、G 2 2 E、K 3 4 R、およびR 3 6 Gを含む、G L P - 1の4置換機能的形態を表す配列番号3 1；

【0 1 7 0】

(4) 置換A 8 G、G 2 2 E、K 2 6 R、K 3 4 R、およびR 3 6 Gを含む、G L P - 1の5置換機能的形態を表す配列番号3 2；

【0 1 7 1】

(4) 置換A 8 G、G 2 2 E、K 2 6 R、K 3 4 R、およびR 3 6 Kを含む、G L P - 1の5置換機能的形態を表す配列番号3 3；ならびに

40

【0 1 7 2】

(5) 置換A 8 G、G 2 2 E、K 2 6 R、およびR 3 6 Gを含む、G L P - 1の4置換機能的形態を表す配列番号3 4。

【0 1 7 3】

G L P - 1に加えて、図1 Bに図解される第3のフラグメント3 0 0の付加的な機能的ドメインは、インスリン、C - ペプチド、レプチン、グルカゴン、ガストリン、胃阻害性ポリペプチド (G I P)、アミリン、カルシトニン、コレシストキニン、ペプチドY Y、神経ペプチドY、骨形成タンパク質 - 6 (B M P - 6)、骨形成タンパク質 - 9 (B M P - 9)、オキシントモジュリン、オキシトシン、グルカゴン様ペプチド - 2 (G L P - 2)、イリシン、フィブロネクチンI I I型ドメイン含有タンパク質5 (F N D C 5)、ア

50

ペリン、アディポネクチン、C l q および腫瘍壊死因子関連タンパク質（C T R P ファミリー）、レジスチン、ビスファチン、オメンチン、レチノール結合タンパク質-4（R B P - 4）、グリセンチン、アンジオポエチン、インターロイキン-22（I L - 22）、エクセンディン-4、または成長ホルモンの生物学的に活性な形態（すなわち、機能的形態）を代替的に含み得ることが留意されるべきである。

【0174】

第1および／または第2のリンカー

本明細書に開示され、図1Aおよび1Bに図解されるポリペプチドの第1および第2の実施形態のそれぞれは、第1のリンカー10を利用して、第1のフラグメント100（血清アルブミンに結合し得るナノボディドメインを含む）および第2のフラグメント200（生物学的に活性なF G F 2 1ドメインを含む）を接続し、図1Bに図解されるポリペプチドの第2の実施形態は、第2のリンカー20を利用して、第1のフラグメント100および第3のフラグメント300（F G F 2 1ドメインに対する相加的または相乗的効果を有する生物学的に活性な付加的な機能的ドメイン、例えばG L P - 1ドメインを含む）を接続する。

10

【0175】

第1のリンカー10および／または第2のリンカー20等、本明細書において使用される「リンカー」という用語は、概して、2種の実体に結合し得、それによって1つの分子を形成する、または十分に接近して2種の実体の結び付きを維持し得、しかし2種の実体のそれぞれの生物学的活性への実質的な干渉のない、任意の適切なポリペプチドであり得る「ポリペプチドリンカー」を指す。

20

【0176】

リンカーは、結果として生じる連結された分子または構造に組み込まれ得る。本明細書において、第1のリンカー10は、2種の機能的ドメインのそれぞれの生物学的活性への実質的な干渉なく、ナノボディドメイン100およびF G F 2 1ドメイン200を作動可能に分離し、第2のリンカー20は、2種の機能的ドメインのそれぞれの生物学的活性への実質的な干渉なく、G L P - 1ドメインおよびナノボディドメイン100を作動可能に分離する。リンカーは、ペプチド結合によって一緒に連結されたアミノ酸残基から構成され得るが、1種または複数の非天然アミノ酸を任意でさらに含み得る。

【0177】

一般的に、第1のリンカー10および第2のリンカー20のそれぞれは、少なくとも4個のアミノ酸残基の長さを有する。そのため、ある特定の実施形態において、各リンカーは、少なくとも4、8、10、20、24、28、30、40、48、50、60、70、80、90、100、110、120個、またはそれを上回るアミノ酸残基の長さを有する。いかなる理論によっても拘束されることを望むことなく、リンカーの適切な長さは、ポリペプチド分子全体における、それによってそのように連結された2種の機能的ドメインのそれぞれの生物学的活性、安定性、または薬物動態学的パラメーターをさらに向上させ得ると思われる。

30

【0178】

任意の適切なポリペプチドがリンカーとして使用され得る。例えば、ポリペプチドリンカーは、アミノ酸グリシン（G）、セリン（S）、アラニン（A）、メチオニン（M）、アスパラギン（N）、グルタミン（Q）、システイン（C）、プロリン（P）、グルタミン酸（E）、トレオニン（T）およびリジン（K）から選択されるアミノ酸残基を含み得るまたはそれからなり得る。一部の実施形態において、ポリペプチドリンカーは、グリシンおよびアラニン等、立体障害のないアミノ酸の大多数から構成され得る。一部の実施形態において、リンカーは、ポリグリシン、ポリアラニン、グリシンとアラニンとの組み合わせ（ポリ（G l y - A l a）等）、またはグリシンとセリンとの組み合わせ（ポリ（G l y - S e r）等）である。

40

【0179】

ある特定の実施形態において、第1のリンカーおよび第2のリンカーのそれぞれは、リ

50

ピート配列の1つまたは複数のリピートを含むまたはそれからなる。ある特定の実施形態において、ポリペプチドリンカーは、リピート配列の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、もしくは30リピートの、または上で挙げられる任意の2つの数によって規定される任意の数の範囲内のリピートを含むまたはそれからなる。

【0180】

本明細書において、下の実施例に示される実験データに基づき、以下の構成が提供され、それにも関わらず、それは任意であり、範囲において非限定的である。

【0181】

第1のリンカーに関して、それは、一部の実施形態によれば、酸性アミノ酸残基（例えば、DまたはE）を含まなくてもよい。第1のリンカーは、第1のリピート配列の1つまたは複数の単位を任意で含み得、第1のリピート配列は、G、Q、A、P、T、およびSからなる群から選択され得る多くとも4または6タイプのアミノ酸残基からなり得る。ポリペプチドの一部の実施形態によれば、第1のリピート配列は、G_fS_g（fおよびgのそれぞれは、独立して、1～5から選択される整数である）、配列番号35（GAQP）、配列番号36（GQAP）、配列番号37（GPAQ）、配列番号38（GPQA）、配列番号39（GSQP）、配列番号40（GASP）、配列番号41（GPAS）、配列番号42（GPSA）、配列番号43（GGGS）、配列番号44（SGGS）、配列番号45（GGGGS）、配列番号46（GSAPGSPAGSPTGSAPGSPA）、およびGSからなる群から選択されるアミノ酸配列を含むまたはそれからなる。ポリペプチドのある特定の実施形態において、第1のリピート配列は、配列番号35（GAQP）に記載されるアミノ酸配列を有し、1つまたは複数の単位の数は1～10の整数である。ある特定の実施形態において、第1のリンカーは、配列番号35（GAQP）、配列番号49（（GAQP）₂）、配列番号50（（GAQP）₅）、配列番号51（（GAQP）₁₀）、および配列番号48（GGGSGGGS）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0182】

第2のリンカーに関して、それは、第2のリピート配列の1つまたは複数の単位を同様に含み得、第2のリピート配列は、G、Q、A、E、P、T、およびSからなる群から選択される多くとも4または6タイプのアミノ酸残基からなり得る。ポリペプチドのある特定の実施形態において、第2のリピート配列は、G_hS_i（hおよびiのそれぞれは、独立して、1～5から選択される整数である）、配列番号35（GAQP）、配列番号55（GQEP）、配列番号56（GEQP）、配列番号57（GPQE）、配列番号58（GPEQ）、配列番号59（GSEP）、配列番号60（GESp）、配列番号61（GPSE）、配列番号62（GPES）、配列番号36（GQAP）、配列番号37（GPAQ）、配列番号38（GPQA）、配列番号39（GSQP）、配列番号40（GASP）、配列番号41（GPAS）、配列番号42（GPSA）、配列番号43（GGGS）、配列番号44（SGGS）、配列番号45（GGGGS）、配列番号46（GSAPGSPAGSPTGSAPGSPA）、およびGSからなる群から選択されるアミノ酸配列を含むまたはそれからなる。ある特定の実施形態において、第2のリピート配列は、配列番号35（GAQP）に記載されるアミノ酸配列を有し、1つまたは複数の単位の数は1～15の整数、任意で1、2、5、10、または14である。ある特定の実施形態において、第2のリンカーは、配列番号49（（GAQP）₂）、配列番号50（（GAQP）₅）、配列番号51（（GAQP）₁₀）、および配列番号52（（GAQP）₁₄）、および配列番号47（（GGGGS）₄）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0183】

ある特定の実施形態において、第1のリンカーおよび第2のリンカーのそれぞれは、1つを上回るリピート配列を含み得るまたはそれからなり得る。例えば、1つのそのような

10

20

30

40

50

リンカーは、2、3、または4種の異なるリピート配列を含み得るまたはそれからなり得る。ある特定の実施形態において、1つのそのようなリンカーは、異なるリピート配列の連続または縦列リピートを含み得るまたはそれからなり得る。各リピート配列のリピートの数は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30個、またはそれを上回る数からなる群から独立して選択され得る。

【0184】

他の注記

上で記載されるFGF21ドメイン、ナノボディドメイン、GLP-1ドメイン、および第1／第2のリンカーのそれぞれに関して、以下のことが留意される。当業者であれば、様々なアミノ酸置換、例えば保存的アミノ酸置換は、必ずしもその活性を減少させることなく、本明細書に記載されるポリペプチドフラグメントのいずれかの配列において行われ得ることを解するであろう。アミノ酸置換の例は、その対応するD-アミノ酸の代わりにL-アミノ酸を置換すること、チオール含有側鎖を有するホモシステインもしくは他の非天然アミノ酸の代わりにシステインを置換すること、アミノ含有側鎖を有するホモリジン、ジアミノ酪酸、ジアミノプロピオン酸、オルニチン、もしくは他の非天然〔non-natural〕アミノ酸の代わりにリジンを置換すること、またはノルバリンもしくは同様のものの代わりにアラニンを置換することを含む。

【0185】

アミノ酸配列に関連した「保存的置換」とは、アミノ酸残基を、同様の生化学的特性を有する側鎖を有する異なるアミノ酸残基で置き換えることを指す。例えば、保存的置換は、疎水性側鎖を有するアミノ酸残基（例えば、Met、Ala、Val、Leu、およびIle）の間で、中性親水性側鎖を有する残基（例えば、Cys、Ser、Thr、Asn、およびGln）の間で、酸性側鎖を有する残基（例えば、Asp、Glu）の間で、塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えば、His、Lys、およびArg）の間で、または芳香族側鎖を有する残基（例えば、Trp、Tyr、およびPhe）の間で行われ得る。当技術分野において公知のように、保存的置換は、通常、タンパク質立体構造の重大な変化を引き起こさず、したがって、タンパク質の生物学的活性を保持し得る。

【0186】

以下の全長配列が、第1の実施形態（図1Aに図解される）および第2の実施形態（図1Bに図解される）についての特定の実施形態に対して提供される。

【0187】

ポリペプチドのある特定の実施形態は、N末端からC末端方向での、血清アルブミン結合性ナノボディドメインとFGF21ドメインとの間の実質的に融合ポリペプチドであり、配列番号63～68、93、99～101、および107から選択されるアミノ酸配列を有し得る。ある特定のこれらの実施形態において、ポリペプチドは、本明細書において提供される合成化学部分にコンジュゲートされる（例えば、図1Aに基づく、を参照されたい）。合成化学部分は、例えばAc-2XADO-EDA-CO-CH₂-*であり得、それは、配列番号63、68、93、および100からなる群から選択される配列を有するポリペプチドに関して、配列番号1との関係で171位または174位における導入システイン残基とコンジュゲートされる。ある特定の代替的な実施形態において、ポリペプチドは、配列番号64～67、69、99、および108からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、コンジュゲートされない。

【0188】

下の表1Aは、例示的な融合ポリペプチド配列の配列番号、ならびに融合ポリペプチドに含有されるナノボディ、FGF21、ならびに第1のポリペプチドリinkerおよび第2のポリペプチドリinkerに対する配列番号を示している。

【0189】

10

20

30

40

50

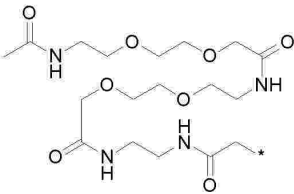
【表 1 A】

表 1A. 例示的な融合ポリペプチド配列

分子 コード (MLC)	融合ポリ ペプチド	ナノボディ	第1の リンカー	FGF21 (変異#)	コンジュゲ ーション部 位; 機能的 部分
MLC#1	配列番号63	配列番号27	(GAQP)10 (配列番号51)	121Q,168L,171C, 180E (配列番号8)	171C; 部分A##
MLC#2	配列番号64	配列番号27	(GAQP)10 (配列番号51)	121Q,168L,171G, 180E (配列番号14)	なし
MLC#3	配列番号65	配列番号27	(GAQP)5 (配列番号50)	121Q,168L,171G, 180E (配列番号14)	なし
MLC#4	配列番号66	配列番号27	(GAQP)2 (配列番号49)	121Q,168L,171G, 180E (配列番号14)	なし
MLC#5	配列番号67	配列番号27	(GAQP) (配列番号35)	121Q,168L,171G, 180E (配列番号14)	なし
MLC#6	配列番号68	配列番号27	(GAQP) (配列番号35)	121Q,168L,171C, 180E(配列番号8)	171C; 部分A##
MLC#7	配列番号93	配列番号27	(GAQP) (配列番号35)	121Q,168L,171G, 174C,180E (配列番号92)	174C; 部分A##
MLC#22	配列番号99	配列番号27	(GAQP) (配列番号35)	121Q,168L,180E (配列番号5)	なし
MLC#23	配列番号100	配列番号27	G4S (配列番号45)	121Q,168L,171C, 180E (配列番号8)	171C; 部分A##
MLC#25	配列番号101	配列番号27	G4S (配列番号45)	121Q,168L,180E (配列番号5)	なし
MLC#26	配列番号107	配列番号27	G4S (配列番号45)	121Q,168L,171G, 180E (配列番号14)	なし

#:変異位置は、配列番号 1 と比べたものである。

##部分 A とは Ac-2XADO-EDA-CO-CH₂*を指し、式中、*末端は、



の構造を有する、ポリペプチド上のコンジュゲート可能なシステイン残基に接続されている。

【0190】

ポリペプチドのある特定の実施形態は、N末端からC末端方向での、GLP-1ドメイン、血清アルブミン結合性ナノボディドメイン、およびFGF21ドメインの間の実質的に融合ポリペプチドであり、それは、配列番号70、74、75、79～83、85、94～98、および108～109から選択されるアミノ酸配列を有し得る。ある特定のこれらの実施形態において、ポリペプチドは、本明細書において提供される合成化学部分にコンジュゲートされる（例えば、図1Bに基づく、を参照されたい）。合成化学部分は、例えばAc-2XADO-EDA-CO-CH₂-*であり得、それは、配列番号74、81～83、85、94、96、および97からなる群から選択されるアミノ酸配列に関

して、配列番号 1 との関係で 1 7 1 位または 1 7 4 位における導入システイン残基とコンジュゲートされる。ある特定の代替的な実施形態において、ポリペプチドは、配列番号 7 0、7 5、7 9、8 0、9 5、9 8、および 1 0 8 ~ 1 0 9 から選択されるアミノ酸配列を含み、コンジュゲートされない。

【0 1 9 1】

下の表 1 B は、例示的な融合ポリペプチド配列の配列番号、ならびに融合ポリペプチドに含有される G L P - 1 ドメイン、第 1 のポリペプチドリンカー、ナノボディ、F G F 2 1 ドメイン、ならびに第 1 のポリペプチドリンカーおよび第 2 のポリペプチドリンカーに対する配列番号を示している。

【0 1 9 2】

10

20

30

40

50

【表 1 B - 1】

表1B. 例示的な融合ポリペプチド配列

分子コード(MLC); 融合ポリペプチド(配列番号)	GLP1 ドメイン (変異&)	第2のリンカー	ナノボ ディ	第1のリンカー	FGF21 ドメイン (変異#)	コンジ ュゲー ション 部位; 機 能的部 分
MLC#8 (配列 番号70)	8G, 22E, 36G (配列番号 29)	(G4S)4 (配列 番号47)	配列 番号27	G4SG3S (配列 番号48)	121Q,168L,171G, 180E (配列番号14)	なし
MLC#9 (配列 番号74)	8G, 22E, 36G (配列番号 29)	(GAQP)5 (配列 番号50)	配列 番号27	(GAQP)10 (配列 番号51)	121Q,168L,171C, 180E (配列番号8)	171C; 部分A##
MLC#10 (配列 番号75)	8G, 22E, 36G (配列番号 29)	(GAQP)5 (配列 番号50)	配列 番号27	(GAQP)10 (配列 番号51)	121Q,168L,171G, 180E (配列番号14)	なし
MLC#11 (配列 番号79)	8G, 22E, 36G (配列番号 29)	(GAQP)10 (配列 番号51)	配列 番号27	(GAQP)10 (配列 番号51)	121Q,168L,171G, 180E (配列番号14)	なし
MLC#12 (配列 番号80)	8G, 22E, 36G (配列番号 29)	(GAQP)5 (配列 番号50)	配列 番号27	(GAQP) (配列 番号35)	121Q,168L,171G, 180E (配列番号14)	なし
MLC#13 (配列 番号81)	8G, 22E, 36G (配列番号 29)	(GAQP)5 (配列 番号50)	配列 番号27	(GAQP) (配列 番号35)	121Q,168L,171C, 180E(配列番号8)	171C; 部分A##
MLC#14 (配列 番号82)	8G, 22E, 36G (配列番号 29)	(GAQP)10 (配列 番号51)	配列 番号27	(GAQP) (配列 番号35)	121Q,168L,171C, 180E (配列番号8)	171C; 部分A##
MLC#15 (配列 番号83)	8G, 22E, 36G (配列番号 29)	(GAQP)2 (配列 番号49)	配列 番号27	(GAQP) (配列 番号35)	121Q,168L,171C, 180E (配列番号8)	171C; 部分A##
MLC#16 (配列 番号85)	8G, 22E, 36G (配列番号 29)	(GAQP)14 (配列 番号52)	配列 番号27	(GAQP) (配列 番号35)	121Q,168L,171C, 180E (配列番号8)	171C; 部分A##
MLC#17 (配列 番号94)	8G, 22E, 36G (配列番号 29)	(GAQP)14 (配列 番号52)	配列 番号27	(GAQP) (配列 番号35)	121Q,168L,171G, 174C,180E (配列番号92)	174C; 部分A##
MLC#18 (配列 番号95)	8G,22E, 36G (配列番号 29)	(GAQP)14 (配列 番号52)	配列 番号27	(GAQP) (配列 番号35)	121Q,168L,180E (配列番号5)	なし
MLC#19 (配列 番号96)	8G,22E, 36G (配列番号 29)	(GAQP)14 (配列 番号52)	配列 番号27	(G4S) (配列 番号45)	121Q,168L,171C, 180E (配列番号8)	171C; 部分A##

10

20

30

40

50

【表 1 B - 2】

MLC#20 (配列 番号97)	8G,22E, 36G (配列番号 29)	(GAQP)13 (G4S) (配列 番号106)	配列 番号27	(G4S) (配列 番号45)	121Q,168L,171C, 180E (配列番号8)	171C; 部分A##
MLC#21 (配列 番号98)	8G,22E, 36G (配列番号 29)	(GAQP)14 (配列 番号52)	配列 番号27	(G4S) (配列 番号45)	121Q,168L,180E (配列番号5)	なし
MLC#27 (配列 番号108)	8G,22E, 36G (配列番号 29)	(GAQP)14 (配列 番号52)	配列 番号27	(GAQP) (配列 番号35)	121Q,168L,171G, 180E (配列番号14)	なし
MLC#28 (配列 番号109)	8G,22E, 36G (配列番号 29)	(GAQP)14 (配列 番号52)	配列 番号27	(G4S) (配列 番号45)	121Q,168L,171G, 180E (配列番号14)	なし

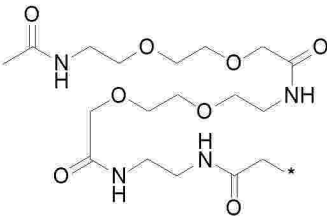
10

&:変異位置は、配列番号 28 と比べたものである。

#:変異位置は、配列番号 1 と比べたものである。

##部分 A とは Ac-2XADO-EDA-CO-CH₂*を指し、式中、*末端は、

20



の構造を有する、ポリペプチド上のコンジュゲート可能なシステイン残基に接続されている。

30

【0193】

医薬組成物

別の態様において、本開示は、上で記載される実施形態のいずれかに従ったポリペプチド、および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物をさらに提供する。

【0194】

「薬学的に許容される」という用語は、指定された担体、ビヒクル、希釈剤、賦形剤、および／または塩が、製剤を含む他の成分と概ね化学的かつ／または物理的に適合し、かつそのレシピエントと生理学的に適合することを示す。

【0195】

「薬学的に許容される担体」とは、対象に許容されかつ非毒性な生物活性である、活性成分以外の医薬製剤中の成分を指す。本明細書に開示される医薬組成物における使用のための薬学的な許容される担体は、例えば薬学的に許容される液体、ゲル、もしくは固体担体、水性ビヒクル、非水性ビヒクル、抗微生物剤、等張剤、緩衝剤、抗酸化物質、麻酔薬、懸濁化剤／分散剤〔dispending agent〕、封鎖剤もしくはキレート剤、希釈剤、アジュバント、賦形剤、または非毒性の補助物質、当技術分野において公知の他の構成要素、あるいはその様々な組み合わせを含み得る。

40

【0196】

適切な構成要素は、例えば抗酸化物質、充填剤、結合剤、崩壊剤、緩衝剤、防腐剤、潤滑剤、香味料、増粘剤、着色剤、乳化剤、または糖類およびシクロデキストリン等の安定剤を含み得る。適切な抗酸化物質は、例えばメチオニン、アスコルビン酸、EDTA、チオ硫酸ナトリウム、白金、カタラーゼ、クエン酸、システイン、チオグリセロール、チオ

50

グリコール酸、チオソルビトール、ブチル化ヒドロキシアニソール〔hydroxanisol〕、ブチル化ヒドロキシトルエン、および／または没食子酸プロピルを含み得る。本明細書に開示されるように、本明細書において提供される医薬組成物における、メチオニン等の1種または複数の抗酸化物質の内包は、ポリペプチド複合体または二重特異性ポリペプチド複合体の酸化を減少させる。この酸化の低下は、結合アフィニティーの減少を阻止しまたは低下させ、それによってタンパク質安定性を向上させかつ貯蔵寿命を最大限に高める。したがって、ある特定の実施形態において、本明細書に開示されるポリペプチド、ポリペプチド複合体、またはコンジュゲート、およびメチオニン等の1種または複数の抗酸化物質を含む組成物が提供される。

【0197】

さらに例示するために、薬学的な許容される担体は、例えば塩化ナトリウム注射液、リンゲル注射液、等張デキストロース注射液、滅菌水注射液、またはデキストロース、および乳酸リンゲル注射液等の水性ビヒクル、植物起源の固定油、綿実油、トウモロコシ油、ゴマ油、または落花生油等の非水性ビヒクル、静菌または静真菌濃度の抗微生物剤、塩化ナトリウムまたはデキストロース等の等張剤、リン酸またはクエン酸緩衝剤等の緩衝剤、重硫酸ナトリウム等の抗酸化物質、塩酸プロカイン等の局所麻酔薬、カルボキシメチルセルロースナトリウム〔sodium carboxymethylcellulose〕、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、またはポリビニルピロリドン等の懸濁化剤および分散剤、ポリソルベート80（TWEEN-80）等の乳化剤、EDTA（エチレンジアミン四酢酸）またはEGTA（エチレングリコール四酢酸）、エチルアルコール、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、水酸化ナトリウム、塩酸、クエン酸、または乳酸等の封鎖剤またはキレート剤を含み得る。フェノールまたはクレゾール、水銀剤、ベンジルアルコール、クロロブタノール、メチルおよびプロピルp-ヒドロキシ安息香酸エステル、チメロサル、塩化ベンザルコニウム、ならびに塩化ベンゼトニウムを含む、担体として利用される抗微生物剤は、複数回投薬用容器中の医薬組成物に添加され得る。適切な賦形剤は、例えば水、生理食塩水、デキストロース、グリセロール、またはエタノールを含み得る。適切な非毒性の補助物質は、例えば湿潤剤または乳化剤、pH緩衝化剤、安定剤、溶解度増強剤、または酢酸ナトリウム、ソルビタンモノラウレート、オレイン酸トリエタノールアミン、もしくはシクロデキストリン等の作用物質を含み得る。

【0198】

医薬組成物は、液体溶液、懸濁液、乳濁液、丸薬、カプセル、錠剤、持続放出製剤、または粉末であり得る。経口製剤は、医薬品グレードのマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン〔polyvinyl pyrrolidone〕、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウム等の標準的担体を含み得る。

【0199】

実施形態において、医薬組成物は、注射可能な組成物に製剤化される。注射可能な医薬組成物は、例えば液体溶液、懸濁液、乳濁液、または液体溶液、懸濁液、もしくは乳濁液を作出するのに適切な固体形態等、任意の従来の形態で調製され得る。注射用の調製物は、注射の準備ができていない無菌でかつ／または非発熱性の溶液、皮下注射用錠剤を含めた、使用の直前に溶媒と組み合わせられる準備ができていない凍結乾燥粉末等の無菌の乾燥した可溶性産物、注射の準備ができていない無菌懸濁液、使用の直前にビヒクルと組み合わせられる準備ができていない無菌の乾燥した不溶性産物、および無菌でかつ／または非発熱性の乳濁液を含み得る。溶液は、水性または非水性のいずれかであり得る。

【0200】

ある特定の実施形態において、単位用量の非経口調製物は、アンプル、バイアル、または針を有する注射器にパッケージされる。非経口投与のためのすべての調製物は、当技術分野において公知でありかつ実践されるように、無菌でかつ非発熱性でなければならない。

【0201】

ある特定の実施形態において、無菌の凍結乾燥粉末は、適切な溶媒に本明細書に開示さ

10

20

30

40

50

れるポリペプチド、ポリペプチド複合体またはコンジュゲートを溶かすことによって調製される。溶媒は、粉末または粉末から調製された復元溶液の安定性または他の薬理学的構成要素を向上させる賦形剤を含有し得る。使用され得る賦形剤は、水、デキストロース、ソルビトール〔sorbital〕、フルクトース、コーンシロップ、キシリトール、グリセリン、グルコース、スクロース、または他の適切な作用物質を含むが、それらに限定されるわけではない。溶媒は、1つの実施形態ではおよそ中性のpHにおける、クエン酸塩、リン酸ナトリウムもしくはカリウム等の緩衝剤、または当業者に公知の他のそのような緩衝剤を含有し得る。溶液の後続の滅菌濾過、それに続く当業者に公知の標準的条件下での凍結乾燥は、望ましい製剤を提供する。1つの実施形態において、結果として生じる溶液は、凍結乾燥用のバイアルに分配されるであろう。各バイアルは、本明細書において提供されるポリペプチド、ポリペプチド複合体、もしくはコンジュゲート、またはその組成物の単回投薬量または複数回投薬量を含有し得る。1回の投薬または一連の投薬に必要とされるものを上回るわずかな量（例えば、約10%）をバイアルに過剰充填することは、正確なサンプル引き出しおよび正確な投薬を容易にするために許容される。凍結乾燥粉末は、約4℃～室温等、適当な条件下で保管され得る。

10

【0202】

注射用水を用いた凍結乾燥粉末の復元は、非経口投与における使用のための製剤を提供する。1つの実施形態において、復元のために、無菌でかつ／または非発熱性の水または他の液体の適切な担体が凍結乾燥粉末に添加される。正確な量は、与えられている選択された療法に依存し、経験的に決定され得る。

20

【0203】

本明細書に記載される医薬組成物の投与は、通常、の技能を有する医師によって有効であることが既知の任意の経路を介したものであり得る。1つの例は、無菌の注射器、または注入ポンプ等の何らかの他の機械的装置による、末梢静脈〔peripheral parenteral〕投与である。ある特定の実施形態において、末梢静脈経路は、静脈内、筋肉内、皮下、または腹腔内の投与の経路である。

【0204】

ある特定の実施形態において、本明細書に記載されるポリペプチド、ポリペプチド複合体またはコンジュゲートは、経口、直腸、経鼻、または下気道経路投与等、非経口経路投与に適切な形態に製剤化される。

30

【0205】

ある特定の実施形態において、本明細書に記載されるポリペプチド、ポリペプチド複合体またはコンジュゲートは、凍結乾燥または噴霧乾燥等、固体製剤に製剤化され、それは次いで、投与前に適切な希釈溶液中で復元される。Remington: The Science and Practice of Pharmacy (D. B. Troy, Editor, 21st Edition, Lippincott, Williams & Wilkins, 2006)に記載されるもの等、標準的な医薬製剤技法が採用され得る。代替的に、本明細書に記載されるポリペプチド、ポリペプチド複合体またはコンジュゲートは、舌、舌下、頬側を通じた、口内の、経口の、胃および腸における、経鼻、肺内、例えば細気管支および肺胞もしくはその組み合わせを通じた、表皮、皮膚、経皮、腔内、直腸、眼球、例えば結膜、尿管、経皮、または肺内経路を通じた投与のために製剤化され得る。なおさらなる選択肢として、本明細書に記載されるポリペプチド、ポリペプチド複合体またはコンジュゲートは、例えば無針注射によるもしくはパッチ、任意でイオン導入のパッチからの経皮投与、または経粘膜的、例えば頬側投与を通じた投与のために製剤化され得る。

40

【0206】

処置の方法

さらに別の態様において、本開示は、それを必要とする対象における代謝性障害を阻止するまたは処置する方法およびキットをさらに提供する。

【0207】

50

方法は、対象に、上で記載されるポリペプチドまたは医薬組成物の治療有効量を投与することを実質的に含む。

【0208】

本明細書において使用される病態の「処置すること」または「処置」は、病態を阻止することもしくは緩和すること、病態の発生もしくは進行の速度を遅らせること、病態を発症するリスクを低下させること、病態と関連した症状の発症を阻止することもしくは遅延させること、病態と関連した症状を低下させることもしくは終わらせること、病態の完全もしくは部分退縮を生じさせること、病態を治すこと、またはその一部の組み合わせを含む。

【0209】

本明細書において使用される「対象」または「個体」または「動物」または「患者」という用語は、疾患または障害の診断、予後、改善、阻止、および／または処置を必要とする、哺乳類または霊長類を含めたヒトまたは非ヒト動物を指す。哺乳類対象は、ヒト、飼育慣らされた動物、農業用動物、および動物園用、運動用、またはペット用動物、例えばイヌ、ネコ、モルモット、ウサギ、ラット、マウス、ウマ、ブタ、ウシ、クマ等を含む。

【0210】

ある特定の実施形態において、対象は、本明細書において提供されるポリペプチドまたは医薬組成物に応答する可能性がある障害または病態を有すると同定されている。

【0211】

ある特定の実施形態において、代謝性障害は、糖尿病、肥満、非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）、心血管様脂質異常症、アテローム性動脈硬化症、アルコール性脂肪性肝炎（ASH）、糖尿病性腎症、妊娠性糖尿病、メタボリックシンドロームX等のメタボリックシンドローム、非アルコール性脂肪肝疾患（NAFLD）、末期肝疾患、肝臓脂肪症（脂肪肝）、肝硬変、原発性胆汁性肝硬変（PBC）または重度の高トリグリセリド血症（SHTG）である。

【0212】

例えば、本明細書において提供されるポリペプチドまたは医薬組成物を使用して処置され得るまたは改善され得る代謝性病態または障害は、ヒト対象が、 125 mg/dL またはそれを上回る、例えば130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、または 200 mg/dL を上回る空腹時血中グルコースレベルを有する病態を含む。血中グルコースレベルは、食事摂取もしくは絶食状態で、または無作為に決定され得る。代謝性病態または障害は、対象が、代謝性病態を発症する増加したリスクがある病態も含み得る。ヒト対象に関して、そのような病態は、 100 mg/dL の空腹時血中グルコースレベルを含む。

【0213】

本明細書において提供されるポリペプチドまたは医薬組成物の治療有効量は、例えば対象の体重、年齢、既往歴、現在の医薬、健康の状態、ならびに交差反応、アレルギー、感受性、および有害な副作用の潜在性、ならびに投与経路および疾患進行の程度等、当技術分野において公知の様々な因子に依存するであろう。投薬量は、これらのおよび他の状況または要件によって示されるように、当業者（例えば、医師または獣医）によって比例的に低下し得るまたは増加し得る。治療有効量は、処置されている疾患または障害の症状の緩和または改善を含む、研究者、医師、または他の臨床医によって探求されている、組織系、動物、またはヒトにおいて生物学的または医薬的応答を引き出す、本明細書において提供されるポリペプチドコンジュゲートまたは医薬組成物の量、すなわち観察可能なレベルの、1種または複数の所望の生物学的または医薬的応答、例えば血中グルコース、インスリン、トリグリセリド、もしくはコレステロールレベルの低下；体重の低下；または耐糖能、エネルギー消費、もしくはインスリン感受性の向上を支持する量であり得る。

【0214】

ある特定の実施形態において、本明細書において提供されるポリペプチドまたは医薬組成物は、約 0.01 mg/kg ～約 100 mg/kg （例えば、約 0.01 mg/kg 、

10

20

30

40

50

約 0.5 mg/kg、約 1 mg/kg、約 2 mg/kg、約 5 mg/kg、約 10 mg/kg、約 15 mg/kg、約 20 mg/kg、約 25 mg/kg、約 30 mg/kg、約 35 mg/kg、約 40 mg/kg、約 45 mg/kg、約 50 mg/kg、約 55 mg/kg、約 60 mg/kg、約 65 mg/kg、約 70 mg/kg、約 75 mg/kg、約 80 mg/kg、約 85 mg/kg、約 90 mg/kg、約 95 mg/kg、または約 100 mg/kg) の治療有効投薬量で投与され得る。ある特定のこれらの実施形態において、本明細書において提供されるポリペプチドまたは医薬組成物は、約 50 mg/kg またはそれ未満の投薬量で投与され、ある特定のこれらの実施形態において、投薬量は、10 mg/kg もしくはそれ未満、5 mg/kg もしくはそれ未満、1 mg/kg もしくはそれ未満、0.5 mg/kg もしくはそれ未満、または 0.1 mg/kg もしくはそれ未満である。ある特定の実施形態において、投与投薬量は、処置の経過にわたって変化し得る。例えば、ある特定の実施形態において、初回の投与投薬量は、後続の投与投薬量よりも高くてもよい。ある特定の実施形態において、投与投薬量は、対象の反応に応じて処置の経過にわたって変動し得る。

10

【0215】

投薬レジメンは、最適な所望の応答（例えば、治療応答）を提供するように調整され得る。例えば、単回投薬が投与され得る、または数回の分割された投薬が経時的に投与され得る。

【0216】

本明細書において提供されるポリペプチドまたは医薬組成物は、例えば非経口（例えば、皮下、腹腔内、静脈内注入を含めた静脈内、筋肉内、または皮内注射）または非経口以外（例えば、経口、鼻腔内、眼内、舌下、直腸、または局部）経路等、当技術分野において公知の任意の経路によって投与され得る。

20

【0217】

ポリペプチドまたは医薬組成物は、単独で、または 1 種もしくは複数の付加的な治療手段もしくは治療剤との組み合わせで投与され得る。

【0218】

ある特定の実施形態において、代謝性疾患を処置するために使用される場合、本明細書において提供されるポリペプチドまたは医薬組成物は、代謝性疾患または関連する任意の医学的障害の処置における使用のための任意の他の治療剤との組み合わせで投与され得る。本明細書において使用される「組み合わせで投与される」は、同じ医薬組成物の一部として同時での、別個の組成物として同時での、または別個の組成物として異なるタイミングでの投与を含む。別の作用物質の前または後に投与される組成物は、たとえ組成物および第 2 の作用物質が異なる経路を介して投与されるとしても、該語句が本明細書において使用されるように、その作用物質との「組み合わせで」投与されると見なされる。可能な場合、本明細書において提供される融合ポリペプチド、ポリペプチド複合体、またはコンジュゲートとの組み合わせで投与される付加的な治療剤は、付加的な治療剤の製品情報シートに挙げられたスケジュールに従って、または Physicians' Desk Reference (Physicians' Desk Reference, 70th Ed (2016)) もしくは当技術分野において周知のプロトコールに従って投与される。

30

40

【0219】

キット

上で記載される医薬組成物を投与するための方法を実践するためのキットも提供される。そのようなキットは、無菌容器中に提供され得る、本明細書に記載されるもの等の医薬組成物を含み得る。任意で、代謝性障害の処置において、提供される医薬組成物をどのように採用するかについての使用説明書も含まれ得る、または患者もしくは医療提供者に使用可能にされ得る。

【0220】

そのようなキットは、(a) 融合ポリペプチドコンジュゲートの治療有効量を含む医薬

50

組成物；および（b）医薬組成物のための1つまたは複数の容器、を含み得る。そのようなキットは、その使用のための使用説明書も含み得；使用説明書は、処置されている正確な代謝性障害に合わせられ得る。使用説明書は、キットにおいて提供される材料の使用および性質を記載し得る。ある特定の実施形態において、キットは、グルコースレベルの上昇、インスリンレベルの上昇、糖尿病、肥満、非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）、心血管様脂質異常症、アテローム性動脈硬化症、アルコール性脂肪性肝炎（ASH）、糖尿病性腎症、メタボリックシンドロームX等のメタボリックシンドローム、非アルコール性脂肪肝疾患（NAFLD）、末期肝疾患、肝臓脂肪症（脂肪肝）、肝硬変、原発性胆汁性肝硬変（PBC）または重度の高トリグリセリド血症（SHTG）等の代謝性障害を処置する投与を行うための、患者に対する使用説明書を含む。

10

【0221】

使用説明書は、紙またはプラスチック等の基板に印刷され得、添付文書としてキット内に、キットの容器またはその構成要素（例えば、パッケージングと関連した）のラベル等に存在し得る。他の実施形態において、使用説明書は、適切なコンピューター可読の記憶媒体、例えばCD-ROM、ディスク等が存在する電子記憶データファイルとして存在する。さらに他の実施形態において、実際の使用説明書はキットに存在しないが、インターネットを通じて等、遠隔の供給元から使用説明書を獲得するための手段が提供される。この実施形態の例は、使用説明書を見ることができかつ／またはそこから使用説明書をダウンロードし得るウェブアドレスを含むキットである。しばしば、キットの一部またはすべての構成要素は、無菌性を維持する適切なパッケージングにパッケージされることが望ましいであろう。キットの構成要素は、単一の容易に扱われる単位を作るキット格納要素にパッケージされ得、キット格納要素、例えば箱または類似構造は、例えばキットの構成要素の一部またはすべてについての無菌性をさらに保つために、密閉容器であってもなくともよい。

20

【0222】

ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

さらに他の態様において、本開示は、上で記載されるポリペプチド（または任意で、ポリペプチドコンジュゲート）を調製するための方法をさらに提供する。この目的のために、以下のものが本開示において提供される。

【0223】

第1に、本開示は、本明細書に記載される融合ポリペプチドをコードする単離された核酸またはポリヌクレオチドを提供する。

30

【0224】

本明細書において使用される「核酸」または「ポリヌクレオチド」という用語は、一本鎖または二本鎖形態のいずれかにあるデオキシリボ核酸（DNA）またはリボ核酸（RNA）およびそのポリマーを指す。具体的に限定されない限り、該用語は、参照核酸と同様の結合特性を有し、天然に存在するヌクレオチドと同様の様式で代謝される、天然ヌクレオチドの公知の類似体を含むポリヌクレオチドを包含する。別様に示されない限り、特定のポリヌクレオチド配列は、その保存的に改変されたバリエーション（例えば、縮重コドン置換）、アレル、オルソログ、SNP、および相補的配列、ならびに明示的に示された配列も黙示的に包含する。具体的には、縮重コドン置換は、1つまたは複数の選択された（またはすべての）コドンの3番目の位置が、混合塩基および／またはデオキシイノシン残基で置換されている配列を作出することによって達成され得る（Batzler et al., Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); および Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994) を参照されたい）。

40

【0225】

本明細書に記載される融合ポリペプチドをコードする核酸またはポリヌクレオチドは、組み換え技法を使用して構築され得る。この目的のために、血清アルブミン結合性ナノボ

50

ディをコードするDNA、FGF21ドメインをコードするDNA、および任意でGLP-1ドメインをコードするDNAが獲得され得、宿主細胞における転写および発現を可能にするように作動可能に連結されて、ポリペプチドが産生され得る。ポリペプチドリナーをコードするポリヌクレオチド配列も、所望の産物の発現を可能にするように作動可能に連結される。

【0226】

コードポリヌクレオチド配列は、融合ポリペプチドの発現または産生が実現可能でありかつ適正な制御下にあるように、任意で発現ベクターにおける、1種または複数の調節配列にさらに作動可能に連結され得る。

【0227】

コードポリヌクレオチド配列は、当技術分野において公知の組み換え技法を使用して、さらなるクローニング（DNAの増幅）のためのまたは発現のためのベクターに挿入され得る。多くのベクターが使用可能である。ベクター構成要素は、一般的に、以下のもの：シグナル配列、複製の起点、1種または複数のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター（例えば、T7、T7lac、Sp6、araBAD、trp、lac、tac、pLm、A3、lac、lpp、npr、pac、syn、trc、およびT3等の原核生物プロモーター、またはSV40、CMV、およびEF-1 α 等の真核生物プロモーター）、および転写終結配列、のうちの1種または複数を含むが、それらに限定されるわけではない。

【0228】

ベクターおよび宿主細胞

第2におよび第3に、本開示は、上で提供されるポリヌクレオチドを含むベクター、および本明細書に記載されるベクターを含む宿主細胞をさらに提供する。

【0229】

本明細書において使用される「ベクター」という用語は、タンパク質をコードするポリヌクレオチドが、そのタンパク質の発現をもたらすように作動可能に挿入され得るビヒクルを指す。ベクターを使用して、それが宿主細胞内に運ぶ遺伝要素の発現をもたらすように宿主細胞を形質転換し得る、形質導入し得る、またはトランスフェクトし得る。ベクターの非限定的な例は、プラスミド、ファージミド、コスミド、酵母人工染色体（YAC）、細菌人工染色体（BAC）、またはP1由来人工染色体（PAC）等の人工染色体、ラムダファージまたはM13ファージ等のバクテリオファージ、および動物ウイルスを含む。ベクターとして使用される動物ウイルスのカテゴリーは、レトロウイルス（レンチウイルスを含む）、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス（例えば、単純ヘルペスウイルス）、ポックスウイルス、バキュロウイルス、パピローマウイルス、およびパポバウイルス（例えば、SV40）を含む。ベクターは、プロモーター配列、転写開始配列、エンハンサー配列、選択可能なエレメント、およびレポーター遺伝子を含めた、発現を制御するための多様なエレメントを含有し得る。加えて、ベクターは複製の起点を含有し得る。ベクターは、ウイルス粒子、リポソーム、またはタンパク質コーティングを含むがそれらに限定されない、細胞内へのその進入を支援する材料も含み得る。ベクターは、発現ベクターまたはクローニングベクターであり得る。本開示は、融合ポリペプチドをコードする本明細書において提供される核酸配列、核酸配列に作動可能に連結された少なくとも1種のプロモーター（例えば、SV40、CMV、EF-1 α ）、および少なくとも1種の選択マーカーを含有するベクター（例えば、発現ベクター）を提供する。ベクターの例は、レトロウイルス（レンチウイルスを含む）、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス（例えば、単純ヘルペスウイルス）、ポックスウイルス、バキュロウイルス、パピローマウイルス、パポバウイルス（例えば、SV40）、ラムダファージ、およびM13ファージ、プラスミドpcDNA3.3、pMD18-T、pOptiVec、pCMV、pEGFP、pIRES、pQD-Hyg-GSeu、pALTER、pBAD、pcDNA、pCal、pL、pET、pGEMEX、pGEX、pCI、pEGFT、pSV2、pFUSE、pVITRO、pVIVO、pMAL、pMON

10

20

30

40

50

O、pSELECT、pUNO、pDUO、Psg5L、pBABE、pWPXL、pBI、p15TV-L、pPro18、pTD、pRS10、pLexA、pACT2.2、pCMV-SCRIPT.RTM.、pCDM8、pCDNA1.1/amp、pCDNA3.1、pRc/RSV、PCR2.1、pEF-1、pFB、pSG5、pXT1、pCDEF3、pSVSPORT、pEF-Bos等を含むが、それらに限定されるわけではない。

【0230】

本明細書において使用される「宿主細胞」という語句は、外因性ポリヌクレオチドおよび／またはベクターが導入されている細胞を指す。

【0231】

本明細書において提供されるポリヌクレオチド配列を含むベクターは、クローニングまたは遺伝子発現のための宿主細胞に導入され得る。本明細書において使用される「宿主細胞」という語句は、外因性ポリヌクレオチドおよび／またはベクターが導入されている細胞を指す。他の実施形態において、ベクターは染色体外性である。所望の場合、宿主細胞は単離され得る。ある特定の実施形態において、宿主細胞は原核細胞であり、一部の他の実施形態において、宿主細胞は真核細胞である。

【0232】

本明細書におけるベクターにおけるDNAをクローニングするまたは発現させるための適切な宿主細胞は、主に原核生物である。この目的のための適切な原核生物は、グラム陰性またはグラム陽性生物等の真正細菌、例えば、*Escherichia*、例えば *E. coli* 等の *Enterobacteriaceae*、*Enterobacter*、*Erwinia*、*Klebsiella*、*Proteus*、*Salmonella*、例えば *Salmonella typhimurium*、*Serratia*、例えば *Serratia marcescans*、および *Shigella*、ならびに *B. subtilis* および *B. licheniformis* 等の *Bacilli*、*P. aeruginosa* 等の *Pseudomonas*、ならびに *Streptomyces* を含む。一部の実施形態において、宿主細胞は、酵母および哺乳類細胞（例えば、不死化哺乳類細胞）等の真核生物である。

【0233】

本明細書において提供されるポリヌクレオチド配列を含むベクターは、当業者に公知の任意の適切な方法、例えば形質転換、トランスフェクション、または形質導入を使用して、宿主細胞に導入され得る。1つの例において、融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列は発現ベクター内にサブクローニングされ得、それは宿主細胞において封入体として発現される。ベクターはウイルスベクターであり得、任意の適切なウイルスベクターがこの能力において使用され得る。

【0234】

本明細書において、宿主細胞は、原核細胞または真核細胞であり得る。上で記載される発現またはクローニングベクターで形質転換された宿主細胞は、プロモーターを誘導する、形質転換体を選択する、またはクローニングベクターを増幅するための、必要に応じて改変された従来の栄養培地中で培養され得る。

【0235】

別の態様において、本開示は、本明細書に記載される融合ポリペプチドの発現を可能にする条件下で本明細書において提供される宿主細胞を培養することを含む、本明細書に記載される融合ポリペプチドを産生する方法を提供する。

【0236】

本明細書に記載される融合ポリペプチドの産生のために、発現ベクターで形質転換された宿主細胞は、多様な培地中で培養され得る。テリフィックブロス、LBブロス、LB寒天、M9最小培地、*Magma Media* 培地、および *ImMedia* 培地 (*ThermoFisher*) 等の市販の細菌成長培地は、細菌宿主細胞を培養するのに適切である。*Ham's F10* (*Sigma*)、最小必須培地 (*MEM*) (*Sigma*)、*RPMI*

10

20

30

40

50

ー1640 (Sigma)、およびダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) (Sigma) 等の市販の培地は、真核宿主細胞を培養するのに適切である。これらの培地のいずれも、必要に応じて、ホルモンおよび／または他の成長因子 (インスリン、トランスフェリン、または上皮成長因子等)、塩 (塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、およびリン酸塩等)、緩衝剤 (HEPES等)、ヌクレオチド (アデノシンおよびチミジン等)、抗生物質 (GENTAMYCIN (商標) 薬物等)、微量元素 (マイクロモル域内の最終濃度で通常存在する無機化合物として定義される)、ならびにグルコースまたは等価のエネルギー源を補給され得る。任意の他の必要な補給剤も、当業者に公知であろう適当な濃度で含まれ得る。温度、pH等の培養条件は、発現のために選択された宿主細胞とともに以前に使用されたものであり、当業者に明白であろう。

10

【0237】

ポリペプチドを産生するための方法

1つの態様において、本開示は、本明細書に記載される融合ポリペプチドが発現される条件下で本明細書において提供される宿主細胞を培養することを含む、本明細書に記載される融合ポリペプチドを発現させる方法を提供する。

【0238】

ある特定の実施形態において、融合ポリペプチドは封入体として発現される。ある特定の実施形態において、方法は、封入体から融合ポリペプチドを復元することをさらに含む。

【0239】

組み換え技法を使用する場合、本明細書に記載される融合ポリペプチドは、細胞内に、ペリプラズム空間において産生され得る、または培地に直接分泌され得る。産物が細胞内に産生される場合、第1の工程として、宿主細胞でも溶解されたフラグメントでも、微粒子残屑が、例えば遠心分離または限外濾過によって除去される。Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992) は、E. coli のペリプラズム空間に分泌されるタンパク質を単離するための手順を記載する。簡潔には、細胞ペーストを、酢酸ナトリウム (pH 3.5)、EDTA、およびフッ化フェニルメチルスルホニル (PMSF) の存在下で約30分間にわたって融解する。細胞残屑は遠心分離によって除去され得る。産物が培地に分泌される場合、そのような発現システムからの上清は、一般的にまず市販のタンパク質濃縮フィルター、例えばAmiconまたはMillipore Pellicon限外濾過ユニットを使用して濃縮される。タンパク質分解を阻害するために、PMSF等のプロテアーゼ阻害剤が前述の工程のいずれかに含まれ得、偶発的な夾雑物の成長を阻止するために抗生物質が含まれ得る。

20

30

【0240】

ある特定の実施形態において、方法は、融合ポリペプチドを単離することをさらに含む。

【0241】

細胞から調製された本明細書に記載される融合ポリペプチドは、例えばヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、DEAE-セルロースイオン交換クロマトグラフィー、硫酸アンモニウム沈殿、塩析、およびアフィニティークロマトグラフィーを使用して精製され得る。

40

【0242】

イオン交換カラムでの分画、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカでのクロマトグラフィー、アニオンまたはカチオン交換樹脂 (ポリアスパラギン酸カラム等) でのヘパリンSEPHAROSE (商標) クロマトグラフィーでのクロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、SDS-PAGE、およびリン酸アンモニウム沈殿等のタンパク質精製のための他の技法も、回収される対象となるタンパク質に応じて使用可能である。

【0243】

上で記載されるポリペプチドを産生するための方法またはプロセスも本開示において提供され、それは、以下の2つの工程を実質的に含む：

50

【0244】

S100：上で規定されるポリヌクレオチド、または除去可能なタグをさらに含むその前駆体の発現を可能にする条件下で、上で記載される宿主細胞を培養する工程；および

【0245】

S200：宿主細胞からポリペプチドまたはその前駆体を回収するおよび精製する工程。

【0246】

ある特定の実施形態において、ポリペプチドは封入体として発現される。ある特定の実施形態において、方法は、封入体からポリペプチドを復元して、そのリフォールディングを可能にすることをさらに含む。さらに一部の実施形態によれば、宿主細胞は *E. coli* であり、ベクターは *E. coli* 適合性ベクターを含み、ベクターにおけるポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドは、*E. coli* 発現のためにコドン最適化されている。

【0247】

組み換え技法を使用する場合、本明細書に記載されるポリペプチドは、細胞内に、ペリプラズム空間において産生され得る、または培地に直接分泌され得る。産物が細胞内に産生される場合、第1の工程として、宿主細胞でも溶解されたフラグメントでも、微粒子残屑が、例えば遠心分離または限外濾過によって除去される。

【0248】

一部の実施形態によれば、宿主細胞からポリペプチドを回収するおよび精製する工程 S200 は、以下の下位工程を含み得る：

【0249】

S210：ポリペプチドの前駆体を回収する工程；

【0250】

S220：ポリペプチドの前駆体をリフォールディングさせる工程；

【0251】

S230：ポリペプチドのリフォールディングされた前駆体を処理してタグを除去し、それによってポリペプチドを獲得する工程；および

【0252】

S240：ポリペプチドを精製する工程。

【0253】

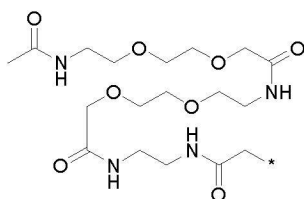
ある特定の実施形態において、宿主細胞は溶解され、ポリペプチドまたはポリペプチドの前駆体は、ポリペプチドまたはポリペプチドの前駆体を含有する不溶性画分から獲得される。

【0254】

ポリペプチド産生プロセスの一部の実施形態によれば、プロセスは、精製されたポリペプチドと機能的部分をコンジュゲートすることをさらに含む。ある特定の実施形態において、ポリペプチドにコンジュゲートされる対象となる機能的部分は、

【0255】

【化15】



(Ac-2XADO-EDA-CO-CH₂-*)である。

【実施例】

【0256】

【実施例1】

ナノボディー F G F 2 1 タンパク質および G L P - 1 - ナノボディー F G F 2 1 の組み換え発現

表 1 A および 1 B、ならびに表 1 C に挙げられた G L P - 1 - ナノボディー F G F 2 1 タンパク質またはナノボディー F G F 2 1 融合タンパク質を、B L 2 1 (D E 3) 誘導体システムを使用した細菌 E . c o l i 発現システムから産生した。G L P - 1 - ナノボディー F G F 2 1 融合前駆体またはナノボディー F G F 2 1 融合タンパク質をコードする D N A を、E . c o l i 発現のためにコドン最適化し、デノボ合成し、P E T 誘導体発現ベクター (N o v a g e n) にサブクローニングした。対応する遺伝子コードの改変によってアミノ酸置換を遂行した。細胞密度がテリフィックブロス (T B) 培地において 2 . 0 の O D 6 0 0 に到達した時点で、G L P - 1 - ナノボディー F G F 2 1 融合前駆体またはナノボディー F G F 2 1 融合タンパク質の過剰発現を 0 . 5 m M イソプロピル b - d - チオガラクトシド (I P T G) で誘導した。2 0 ~ 2 2 時間の 3 7 ° C でのタンパク質誘導の後、細胞を収集した。

【 0 2 5 7 】

10

20

30

40

50

【表 1 C】

表 1C GLP-1/FGF21 タンパク質の対照分子

分子コード(MLC); 融合ポリペプチド (配列番号)	注記	FGF21ドメイン 上でのコンジュ ゲーション
対照#1 (配列番号71)	GLP1(del7-8, 22E, 36G)-(G4S)4- ALB8-G4SG3S-FGF21 (121Q,168L,171G,180E) MLC#8に対する対照, GLP1無効	なし
対照#2 (配列番号72)	GLP1(del7-8, 22E, 36G)-(GAQP)5- ALB8-(GAQP)10-FGF21 (121Q,168L,171G,180E) GLP1無効	なし
対照#3 (配列番号73)	GLP1(del7-8, 22E, 36G)-(GAQP)5- ALB8-(GQEPGAQP)6-FGF21 (121Q,168L,171G,180E) GLP1無効	なし
対照#4 (配列番号76)	GLP1(del7-8, 22E, 36G)-(GAQP)5- ALB8-(GAQP)5-FGF21 (121Q,168L,171G,180E) GLP1無効	なし
対照#5 (配列番号77)	GLP1(del7-8, 22E, 36G)-(GAQP)5- ALB8-(GAQP)2-FGF21 (121Q,168L,171G,180E) GLP1無効	なし
対照#6 (配列番号78)	GLP1(del7-8, 22E, 36G)-(GAQP)5- ALB8-(GAQP)-FGF21 (121Q,168L,171G,180E) GLP1無効	なし
対照#7 (配列番号84)	GLP1(del7-8, 22E, 36G)-(GAQP)5- ALB8-FGF21 (121Q,168L,171G,180E) GLP1無効	なし
対照#8 (配列番号86)	GLP1(del 7-8, 22E, 36G)-(GAQP)14- ALB8-(GAQP)-FGF21 (121Q,168L,171C,180E) 171CにおけるAc-2XADO-EDA-CO- CH2 (0025 GLP1無効)	コンジュゲート された
対照#9 (配列番号87)	GLP1(8G,22E, 36G)-(GAQP)14- ALB8-(GAQP)-FGF21 (L137P,121Q,168L,171C,180E) 171CにおけるAc-2XADO-EDA-CO- CH2 (0025 FGF21無効)	コンジュゲート された
対照#10 (配列番号88)	GLP1(del7-8, 22E, 36G)-(GAQP)14- ALB8-(GAQP)-FGF21 (L137P,121Q,168L,171C,180E) 171CにおけるAc-2XADO-EDA-CO- CH2 (0025 GLP1無効, FGF21無効)	コンジュゲート された

10

20

30

40

【0258】

【実施例2】

ナノボディー FGF21 タンパク質の精製

細胞を収集し、細胞粉碎器（900パール、2回）によって20mM Tris pH 8.0、0.15M NaCl緩衝液に溶解した。ナノボディー FGF21 融合タンパク質を含有する不溶性画分を遠心分離（8,000×g、30分間）によって回収した。リフォールディングの後、融合タンパク質をアニオン交換クロマトグラフィーによって精製した。各工程におけるサンプルをLC/MSによって特徴付けして、正しい分子量を確認した。

50

【0259】

【実施例3】

GLP-1-ナノボディーFGF21の精製

細胞を収集し、細胞粉碎器（900バール、2回）によって20mM Tris pH 8.0、0.15M NaCl緩衝液に溶解した。GLP-1-ナノボディーFGF21融合前駆体を含む不溶性画分を遠心分離（8,000×g、30分間）によって回収した。リフォールディングの後、融合タンパク質前駆体をアニオン交換クロマトグラフィーによって捕捉した。プロテアーゼによってタグを除去した後、タンパク質を疎水性相互作用クロマトグラフィーによって精製した。各工程におけるサンプルをLC/MSによって特徴付けして、正しい分子量を確認した。

10

【0260】

【実施例4】

ナノボディーFGF21およびGLP-1-ナノボディーFGF21融合タンパク質コンジュゲートの調製

Tris緩衝液中ナノボディーFGF21またはGLP-1-ナノボディーFGF21融合タンパク質の溶液に、有機溶媒中Ac-2XADO-EDA-CO-CH₂-Brを液滴で添加した。反応液を室温で1時間攪拌した。次いで、産物をアニオン交換クロマトグラフィーに適用した。これは、上で示される表1に挙げられる化合物を提供した。

【0261】

コンジュゲートした融合タンパク質を、供給元のマニュアルに従って、種々のコンジュゲートに対して最適化された条件を使用して、Waters BioAccord LC-MSシステムを用いたLC-MS法によって、またはWaters Acquity UPLCシステムを用いたUPLCによって検出しかつ特徴付けした。

20

【0262】

【実施例5】

インビトロ活性

方法：融合タンパク質のインビトロGLP-1活性を、1%ヒト血清アルブミン（HSA）の有無で、ヒトGLP-1受容体およびCRELシフェラーゼレポーターを過剰発現するBHK細胞株を使用して測定した。試験融合タンパク質を、3倍連続希釈を用いて、1% HSAの存在下において、最上位濃度としての100nMで測定した。細胞を分子で4時間処理した後、ルシフェラーゼ活性をSteadyLight plusキット（Perkin Elmer、6066751）によって測定した。

30

【0263】

各融合タンパク質の活性を、非線形回帰分析から導き出されるEC₅₀によって表した。

【0264】

融合タンパク質のインビトロFGF21活性を、ヒトベクタークロトーを過剰発現するHEK293細胞株を使用して査定した。試験融合タンパク質コンジュゲートを、1% HSAの存在下で、4倍連続希釈を用いて、400nMの最上位濃度で測定した。細胞を融合タンパク質コンジュゲートで12分間処理した後、p-ERKレベルをp-ERKキット（Cisbio、64ERKPEH）によって測定した。

40

【0265】

各融合タンパク質の活性を、非線形回帰分析から導き出されるEC₅₀によって表した。

【0266】

結論：表2および3に示されるように、すべての融合タンパク質は、天然FGF21と匹敵する効能を示した。しかしながら、融合分子（MLC#9、MLC#10、MLC#12、MLC#13、MLC#14、MLC#15、MLC#16、MLC#17、MLC#19、およびMLC#21）は、異なるGLP-1活性を呈した。分子MLC#14、MLC#16、MLC#17、MLC#19、およびMLC#21は、MLC#9、M

50

LC#12、MLC#13、およびMLC#15よりも有意に高いGLP1活性を示した。試験された他の融合分子と比較して、MLC#15は、相対的により短い第2のリンカーを有し、GLP-1活性もより低い。まとめると、このことは、より長い第2のリンカーを有する融合分子ほど、より高いGLP1活性を有し得ることを示し得る。図2Aおよび2Bに示されるように、融合分子（MLC#9、MLC#10、対照#6、およびMLC#14）は、YH-dual分子（すなわち、WO2017/074123において配列番号66として開示される分子）よりも有意に高いFGF21効力を示した。

【0267】

【表2】

表2. GLP-1-ナノボディ-FGF21 融合タンパク質コンジュゲートのインビトロ GLP1 活性および FGF21 活性

分子コード	第2の リンカー	第1の リンカー	FGF21ド メイン上 でのコン ジュゲー ション	GLP-1 活性 (EC ₅₀ , pM)	FGF21 活性 (EC ₅₀ , nM)
セマグルチド	なし	なし	なし	282	NA
天然FGF21	なし	なし	なし	NA	0.96
対照#1	(G4S)4	G4SG3S	なし	>50000	1.04
対照#2	(GAQP)5	(GAQP)10	なし	>50000	2.10
対照#13	(GAQP)5	(GQEPGAQP)6	なし	>50000	3.47
対照#4	(GAQP)5	(GAQP)5	なし	>50000	1.47
対照#5	(GAQP)5	(GAQP)2	なし	>50000	1.35
対照#6	(GAQP)5	(GAQP)	なし	>50000	2.26
MLC#10	(GAQP)5	(GAQP)10	なし	654	1.83
MLC#9	(GAQP)5	(GAQP)10	171C	2184	4.26
MLC#12	(GAQP)5	(GAQP)	なし	2220	1.78
MLC#13	(GAQP)5	(GAQP)	171C	3854	5.06
MLC#14	(GAQP)10	(GAQP)	171C	416	4.01
MLC#15	(GAQP)2	(GAQP)	171C	9711	1.01
MLC#16	(GAQP)14	(GAQP)	171C	118	2.31
MLC#17	(GAQP)14	(GAQP)	174C	207	3.75
MLC#21	(GAQP)14	G4S	なし	128	5.28
MLC#19	(GAQP)14	G4S	171C	192	4.98

NA:入手不能。

【0268】

10

20

30

40

50

【表 3】

表 3. ナノボディ-FGF21 融合タンパク質コンジュゲートの
インビトロ FGF21 活性

分子コード	第1のリンカー	FGF21ドメイン 上でのコンジュ ゲーション	FGF21活性 (EC ₅₀ , nM)
MLC#5	(GAQP)	なし	7.65
MLC#6	(GAQP)	171C	6.65
MLC#25	G4S	なし	7.45
MLC#23	G4S	171C	5.83

10

【0269】

【実施例 6】

疾患モデルにおける効力調査

選択された分子を疾患動物モデル（db/db マウス、食餌誘導性肥満（DIO）マウス等）において査定して、慢性調査における用量応答に関して体重、食物摂取量、グルコース効力を決定する。血漿インスリン、血漿トリグリセリド、血漿コレステロール、血漿 LDL-c、血漿アディポネクチン、肝臓トリグリセリド、肝臓コレステロール、および肝機能指数（ALT、AST）を含めた、いくつかのバイオマーカーも測定する。

20

【0270】

A) 食物摂取量および体重低下

方法：

22 週齢の DIO 雄 C57BL/6 マウス（約 50 g）に、指定された GLP-1 ポリペプチドコンジュゲート（すなわち、分子 012）を 25 日間皮下に 1 日おきに（Q2D）注射した。食物摂取量および体重を 1 週間に 2 回測定し、空腹時血中グルコースを 1 週間に 1 回測定した。5 匹の動物を各処理群に使用した。体重および空腹時血中グルコースは、それぞれ個々の動物に関してモニターされたが、各群動物に関する食物摂取量は一緒に測定された。1 日目および 25 日目が、分子投薬の初日および最終日である。データは、平均値および標準誤差（SEM）またはプールされた値として示される。統計分析を一元配置 ANOVA によって実施した。25 日目の体重低下を、 $-1 * (BW \text{ 喪失 \% } - \text{ビヒクル群の } BW \text{ 喪失 \%})$ によって算出し；累積的食物摂取量低下を、 $-100 * (\text{累積的食物摂取量} - \text{ビヒクルの累積的食物摂取量}) / \text{ビヒクルの累積的食物摂取量}$ によって算出する。

30

【0271】

結論：DIO 調査において、図 3A、3B、および表 8 に示されるように、分子対照 #2、対照 #6、MLC #9、および MLC #10 は、体重低下および食物摂取量抑制に対する有意な効果を有する。

40

【0272】

50

【表 8】

表8 11日目のDIOマウスにおける食物摂取量および体重低下

群	累積的食物摂取量低下 (ビヒクルと比較した 低下%)(11日目)	体重低下(ビヒクルと比 較した低下%)(11日目)
対照#2 10nmol/kg QD	19.1	21.7
対照#6 10nmol/kg QD	13.1	24.6
MLC#9 10nmol/kg QD	27.1	30.3
MLC#10 10nmol/kg QD	28.0	30.9

10

【0273】

B) DIO動物モデルにおける代謝パラメーター

方法：

16週齢のDIO雄C57BL/6マウス(35~40g)に、指定されたGLP-1/FGF21コンジュゲート(すなわち、MLC#9、MLC#14、MLC#16、およびMLC#17)を21日間皮下に1日1回(QD)注射した。食物摂取量および体重を毎日1回測定し、非空腹時血中グルコースを3日ごとに1回測定した。5匹の動物を各処理群に使用した。体重および血中グルコースは、それぞれ個々の動物に関してモニターされたが、動物の各群に関する食物摂取量は一緒に測定された。1日目および21日目が、処理のそれぞれ初日および最終日である。終末部血液を回収し、EDTA-K3血漿を調製し、バイオマーカー測定(LDL-C、TC、TG、ALT、インスリン、アディポネクチン)のために-80℃で凍結した。肝臓および脂肪組織も回収し、液体窒素中で凍結し、-80℃で保管した。データは、平均値および標準誤差(SEM)またはプールされた値として示される。統計分析を一元配置ANOVAによって実施した。21日目の体重低下を、 $-1 \times (BW \text{ 喪失 \%} - \text{ビヒクル群の } BW \text{ 喪失 \%})$ によって算出し；累積的食物摂取量低下を、 $-100 \times (\text{累積的食物摂取量} - \text{ビヒクルの累積的食物摂取量}) / \text{ビヒクルの累積的食物摂取量}$ によって算出する。

20

【0274】

結論：

DIOマウス調査において、図4Aに示されるように、分子MLC#9、MLC#14、MLC#16、およびMLC#17は、セマグルチド、チルゼパチド、およびYH-dua1(WO2017/074123における配列番号66)と比較して、体重低下に対するはるかに良好な効力を示した。MLC#9、MLC#14、MLC#16、およびMLC#17は、調査において約30~35%分の体重喪失を誘導した。対照的に、セマグルチド、チルゼパチド、およびYH-dua1は、約20%~25%分の体重喪失を誘導した。

30

【0275】

図4Bにおいて、MLC#9、MLC#14、MLC#16、およびMLC#17群は、セマグルチド、チルゼパチド、およびYH-dua1よりも良好なグルコース制御を示した。MLC#9、MLC#14、MLC#16、およびMLC#17は、非空腹時グルコースレベルを7mmol/Lよりも低くまで減少させた。対照的に、セマグルチドは、非空腹時グルコースを約7.5~10mmol/Lまで減少させた。

40

【0276】

MLC#9、MLC#14、MLC#16、およびMLC#17は、肝臓TG(図4I)、肝臓TC(図4J)、およびインスリン感受性(図4K)の向上とともに、血漿におけるトリグリセリド(図4C)、LDL-C(図4D)、総コレステロール(図4E)、およびALT(図4F)濃度の低下、ならびに脂肪重量(図4G)および肝臓重量(図4H)の低下も誘導した。

【0277】

50

インビボにおいて、FGF21は、インスリン増感剤であると報告されるアディポネクチンの分泌を誘導し得る。融合分子MLC#9、MLC#14、MLC#16、およびMLC#17は、より良好なFGF21活性を示すYH-dua1よりも、アディポネクチンレベルの増加に対する良好な効果を示した（図4L）。

【0278】

C) 種々の投薬量でのob/ob動物モデルにおける代謝パラメーター

方法：10週齢のob/ob雄マウス（42～55g）に、指定されたGLP-1/FGF21コンジュゲート（すなわち、MLC#14およびMLC#16）を14日間皮下に1日1回（QD）注射した。食物摂取量および体重を毎日1回測定した。非空腹時血中グルコースを3日ごとに1回測定した。血漿トリグリセリド（TG）レベルを毎週1回測定した。5匹または6匹の動物を各処理群に使用した。体重および血中グルコースは、それぞれ個々の動物に関してモニターされたが、各群動物に関する食物摂取量は一緒に測定された。1日目および14日目が、分子投薬の初日および最終日である。処理後14日目に、マウスを麻酔下での心穿刺により殺した。終末部血液を回収し、バイオマーカー測定（LDL-C、TC、TG、ALT/AST、インスリン、アディポネクチン）のために-80℃で凍結した。肝臓および脂肪組織も回収し、液体窒素中で凍結し、-80℃で保管した。データは、平均値および標準誤差（SEM）またはプールされた値として示される。統計分析を一元配置ANOVAによって実施した。14日目の体重低下を、-1*（BW喪失%-ビヒクル群のBW喪失%）によって算出し；累積的食物摂取量低下を、-100*（累積的食物摂取量-ビヒクルの累積的食物摂取量）/ビヒクルの累積的食物摂取量によって算出する。

【0279】

結論：ob/obマウス調査において、図5A～5Mに示されるように、融合分子MLC#14およびMLC#16は、体重低下（図5A）、グルコース引き下げ、およびバイオマーカー変化に対する用量依存的効力を示した。図5Aにおいて、分子MLC#14およびMLC#16は、同じ投薬量のセマグルチド、チルゼパチド、およびYH-dua1（WO2017/074123における配列番号66）と比較して、体重低下に対するはるかにより良好な効力を示した。図5Bにおいて、MLC#14およびMLC#16群は、同じ投薬量のセマグルチドと、グルコース制御に対する同様の効果に到達した。図5Cに示されるように、MLC#14およびMLC#16は、同じ投薬量のセマグルチド、チルゼパチド、およびYH-dua1と比較して、血漿トリグリセリドのより良好な低下を誘導した。MLC#14およびMLC#16は、肝臓TG（図5J）、肝臓TC（図5K）、およびインスリン感受性（図5L）の向上とともに、血漿におけるLDL-C（図5D）、総コレステロール（図5E）、ALT（図5F）、およびAST（図5G）濃度のレベル、ならびに脂肪重量（図5H）および肝臓重量（図5I）の低下も低下させた。融合分子MLC#14およびMLC#16は、より良好なFGF21活性を示す同じ投薬量のYH-dua1よりも、アディポネクチンレベルの増加に対する有意に良好な効果を示した（図5M）。

【0280】

D) DIO動物モデルにおける代謝パラメーター

方法：16週齢のDIO雄C57BL/6マウス（35～50g）に、指定されたGLP-1/FGF21コンジュゲートおよびFGF21コンジュゲート（すなわち、MLC#16、MLC#19、MLC#6、およびMLC#23）を22日間皮下に1日1回（QD）注射した。食物摂取量および体重を3日ごとに1回測定し、空腹時血中グルコースを毎週測定した。5匹の動物を各処理群に使用した。体重および血中グルコースは、それぞれ個々の動物に関してモニターされたが、動物の各群に関する食物摂取量は一緒に測定された。1日目および22日目が、処理のそれぞれ初日および最終日である。終末部血液を回収し、EDTA-K3血漿を調製し、バイオマーカー測定（LDL-C、TC、TG）のために-80℃で凍結した。肝臓および脂肪組織も回収し、液体窒素中で凍結し、-80℃で保管した。データは、平均値および標準誤差（SEM）またはプールされた値と

して示される。統計分析を一元配置 A N O V A によって実施した。

【0281】

結論

D I O マウス調査において、図 6 A に示されるように、G L P - 1 - ナノボディー F G F 2 1 融合タンパク質コンジュゲート (M L C # 1 6 および M L C # 1 9) およびナノボディー F G F 2 1 融合コンジュゲート (M L C # 6 および M L C # 2 3) は、体重低下に対する良好な効力を示した。図 6 B において、M L C # 1 6、M L C # 1 9、M L C # 6、および M L C # 2 3 群は、セマグルチドよりも良好なグルコース制御を示し、肝臓 T G の向上 (図 6 H) とともに、血漿における血清トリグリセリド (図 6 C)、L D L - C (図 6 D)、および総コレステロール (図 6 E) 濃度の低下、ならびに脂肪重量 (図 6 F) および肝臓重量 (図 6 G) の低下も誘導した。

10

【0282】

【実施例 7】

ラットにおける薬物動態学的調査

方法：6～8 週齢の雄 S D ラットに、15 n m o l / k g のタンパク質 M L C # 9 (コンジュゲートされた) または M L C # 1 0 (コンジュゲートされていない) の単回皮下投薬で投与した (n = 3 / 群)。血漿サンプルを、投薬前 (-5 分)、皮下投与の 0.5 時間、1 時間、2 時間、4 時間、6 時間、8 時間、12 時間、24 時間、32 時間、48 時間、72 時間、96 時間後に回収した。血漿におけるポリペプチドコンジュゲートの濃度を E L I S A 法によって測定した。皮下注射後の各ポリペプチドコンジュゲートの血漿濃度対時間を示したグラフに基づき、薬物動態学的パラメーターを W i n N o n l i n によって算出した。

20

【0283】

結論：M L C # 9 は、ラットにおいて 14.3 時間の半減期 $T_{1/2}$ を有し、それは、9.5 時間の半減期 $T_{1/2}$ を有する M L C # 1 0 よりも長い半減期を示す。

【0284】

【実施例 8】

ミニブタにおける P K 調査

選択された分子の薬物動態をミニブタにおいて査定する。皮下および静脈内注射の両方を実施する。

30

【0285】

【実施例 9】

非ヒト霊長類における P K 調査

選択された分子の薬物動態をサルにおいて査定する。皮下および静脈内注射の両方を実施する。

【0286】

方法：4～5 年齢の雄カニクイザルに、5 m g / k g (123 n m o l / k g) の M L C # 1 6 の単回皮下投薬によって投与した (n = 2 / 群)。血漿サンプルを、投薬前 (-5 分)、皮下投与の 0.5 時間、1 時間、2 時間、4 時間、6 時間、8 時間、12 時間、24 時間、36 時間、48 時間、72 時間、96 時間、120 時間、144 時間、および 168 時間後に回収した。血漿における M L C # 1 6 を L C - M S / M S 法によって測定した。皮下注射後の M L C # 1 6 の血漿濃度対時間を示したグラフに基づき、薬物動態学的パラメーターを W i n N o n l i n によって算出した。

40

【0287】

結論：M L C # 1 6 は、サルにおいて 54.3 時間の半減期を示し、それは、ヒトにおける週 1 回投薬頻度を潜在的に支持する (表 9)。

【0288】

50

【表 9】

表 9: サルにおける MLC#16 の薬物動態学的パラメーター。薬物動態学的データを WinNonlin ソフトウェアによって分析した。 $T_{\max}$ 、 $C_{\max}$ 、 $T_{1/2}$ 、AUC を算出した。

PKパラメーター	単位	MLC#16
$T_{\max}$	hr	12
$C_{\max}$	nmol/L	671
終末相 $t_{1/2}$	hr	54.3
AUC_{0-t}	hr*nmol/L	47851 (t=168h)

10

【0289】

【実施例 10】

免疫原性査定

選択された GLP-1 ポリペプチドコンジュゲートを、インシリコ (iTope および TCED 法) およびエクスビポ (EpiScreen) 法によって免疫原性についても査定する。

【0290】

【実施例 11】

安定性査定

安定性を試験するために、種々の GLP-1 ポリペプチドコンジュゲートを、種々の組成 (pH 6、7、7.4、および 8.0) を有する緩衝液において製剤化し、種々の温度 (4℃および 25℃等) で 2~4 週間保管する。%HMWP および %LMW を、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) -HPLC によって分析する。濃度および改変を、逆相 (RP) -UPLC および LC/MS によって分析した。

【0291】

【実施例 12】

ヒト血清アルブミン結合

方法：血清アルブミンへの分子の結合を、Biacore 8K 機器において表面プラズモン共鳴によって特徴付けした。ヒト血清アルブミンを、4000 RU に到達するまで、CM5 センサーチップ表面に共有結合させた。チップを、10 μL/分の流速で 420 秒間 1 M エタノールアミンによってブロッキングした。各分子サンプルを希釈し、30 μL/分の流速でインジェクトして、チップに結合しているアルブミンへの結合を 120 秒間、および解離を 300 秒間可能にした。分子を有しない結合緩衝液を 20 秒間の流速でチップ上に送って、結合している分子の自発的解離を 30 秒間可能にした。

30

【0292】

結論：すべての融合分子 (MLC#9、MLC#10、対照#4、対照#5、対照#6、MLC#12、および MLC#16) は、ヒト血清アルブミンへの同様の結合アフィニティーを示す (表 10 を参照されたい)。

40

【0293】

【表 1 0】

表10:ヒト血清アルブミン結合アフィニティー

分子	KD (μ M)	Rmax (RU)
MLC#9 (コンジュゲートされた)	0.28	1507.8
MLC#10 (コンジュゲートされていない)	0.28	1391.0
対照#4	0.27	1252.0
対照#5	0.22	1604.0
対照#6	0.22	1289.8
MLC#12 (コンジュゲートされていない)	0.25	1248.6
MLC#13 (コンジュゲートされた)	0.27	1393.3
MLC#14 (コンジュゲートされた)	0.22	1513.5
MLC#15 (コンジュゲートされた)	0.31	1341.8
MLC#16 (コンジュゲートされた)	0.27	1625.6
MLC#19 (コンジュゲートされた)	0.22	450.0

【 0 2 9 4】

【実施例 1 3】

融合タンパク質上での F A P 酵素切断

方法：線維芽細胞活性化タンパク質（F A P）はセリンプロテアーゼである。この酵素は、F G F 2 1 の分解を調節することが報告されている。F A P 酵素による融合タンパク質の C 末端分解を試験するために、融合タンパク質（M L C # 2 3、M L C # 2 5）および F A P 酵素を 2 0 0：1 の比で 3 7℃で 2 0 時間インキュベートした。L C－M S を実施して、融合タンパク質の分解パーセンテージを分析した。

【 0 2 9 5】

結論：コンジュゲーションなしの融合タンパク質（M L C # 2 5、M L C # 1 8、および M L C # 2 1）は、3 7℃で 2 0 時間の F A P 酵素とのインキュベーション時に 5 0．6～6 5．2 %の C 末端分解を示した。しかしながら、融合タンパク質コンジュゲート（M L C # 2 3、M L C # 1 6、および M L C # 1 9）、および 1 7 1 G 置換を有する融合タンパク質（M L C # 1 0）は、F A P 酵素に対する抵抗性を示した。

【 0 2 9 6】

10

20

30

40

50

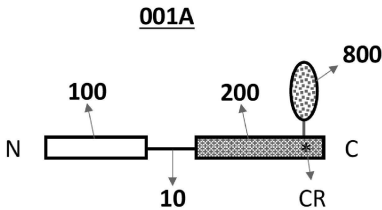
【表 1 1】

表11: FAP酵素切断による融合タンパク質の結果

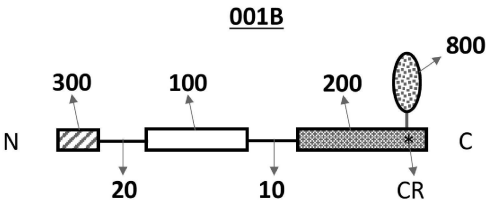
分子	C末端分解
MLC#23 (コンジュゲートされた)	検出されない
MLC#25 (コンジュゲートされていない, 171P)	58.9%
MLC#16 (コンジュゲートされた)	検出されない
MLC#18 (コンジュゲートされていない, 171P)	65.2%
MLC#19 (コンジュゲートされた)	検出されない
MLC#21 (コンジュゲートされていない, 171P)	50.6%
MLC#10 (コンジュゲートされていない, 171G)	検出されない

【図面】

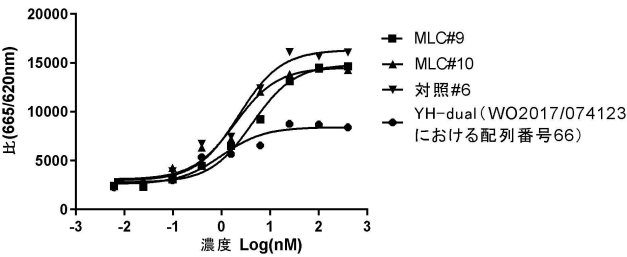
【図 1 A】



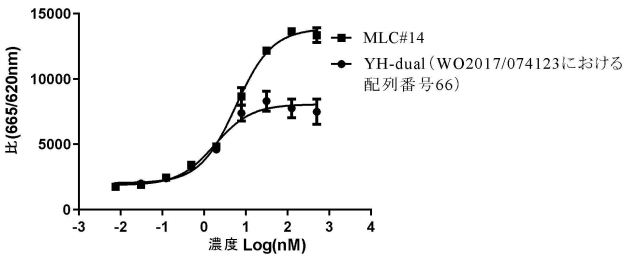
【図 1 B】



【図 2 A】



【図 2 B】



10

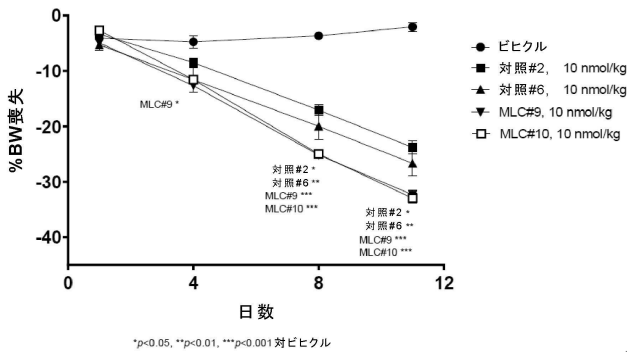
20

30

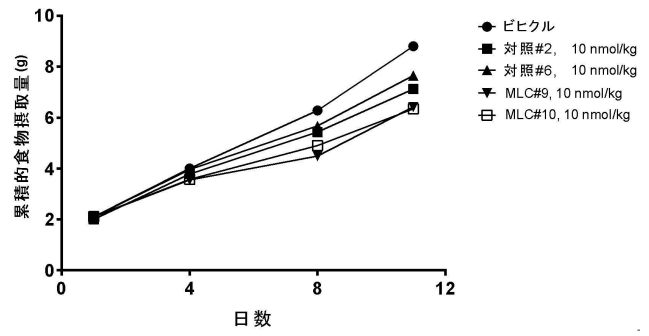
40

50

【図 3 A】

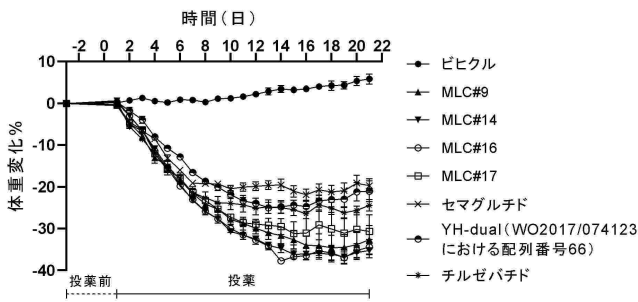


【図 3 B】

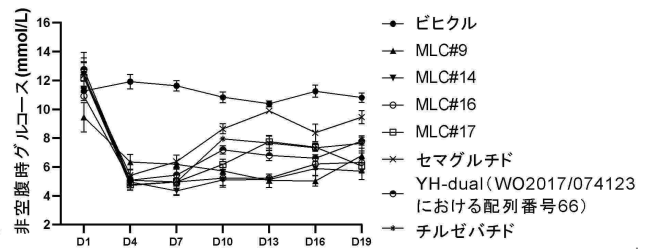


10

【図 4 A】

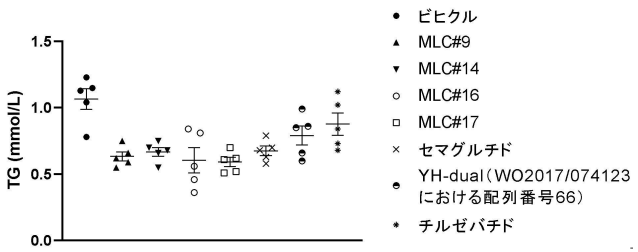


【図 4 B】

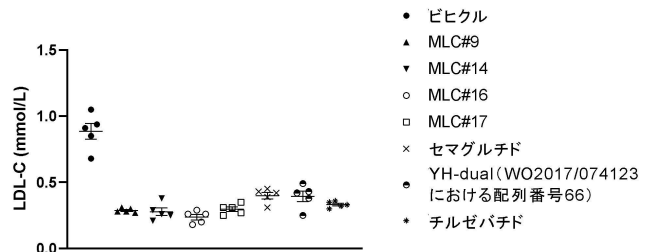


20

【図 4 C】



【図 4 D】

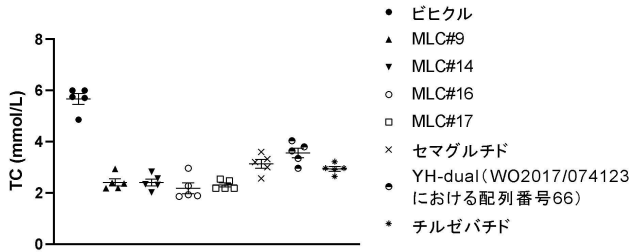


30

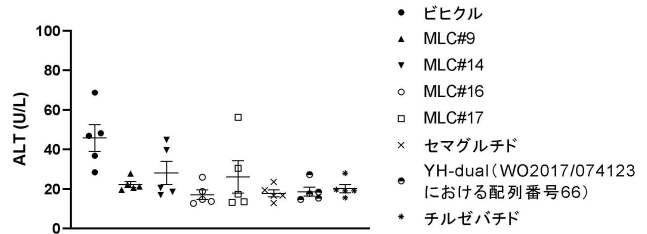
40

50

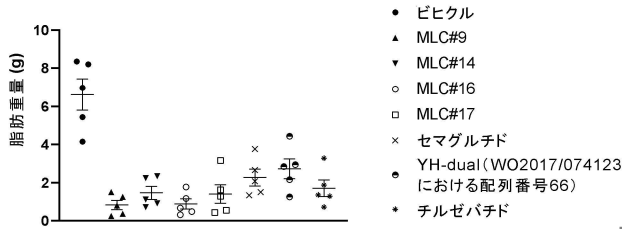
【図 4 E】



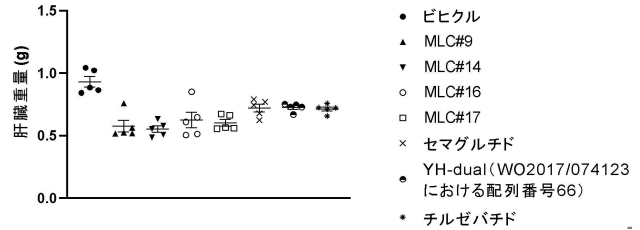
【図 4 F】



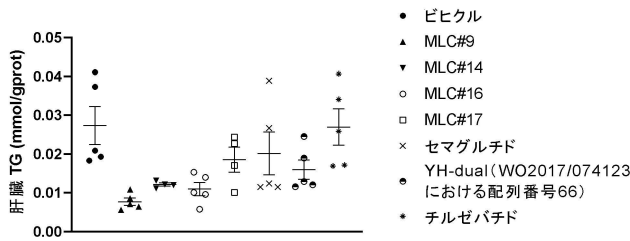
【図 4 G】



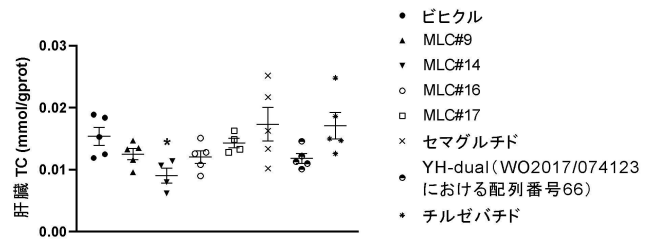
【図 4 H】



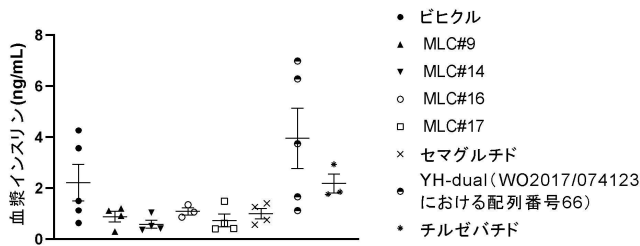
【図 4 I】



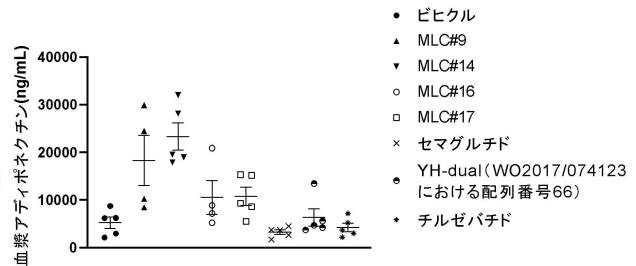
【図 4 J】



【図 4 K】



【図 4 L】



10

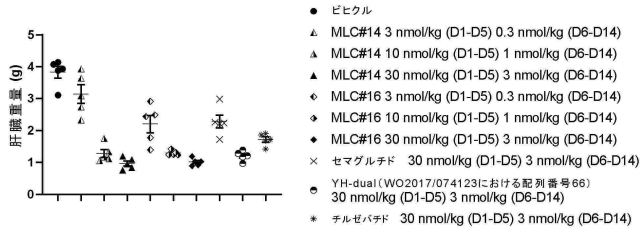
20

30

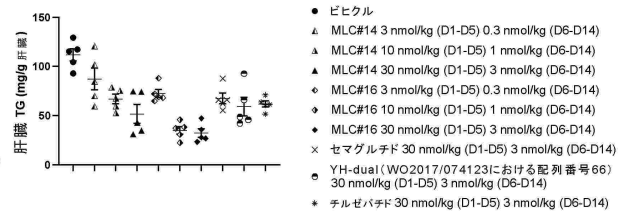
40

50

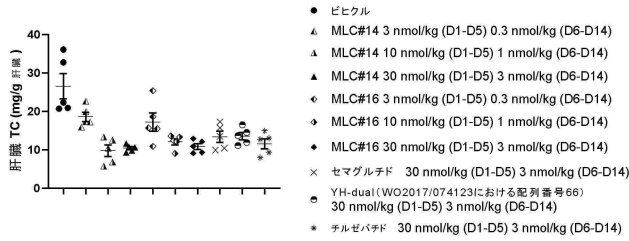
【図 5 I】



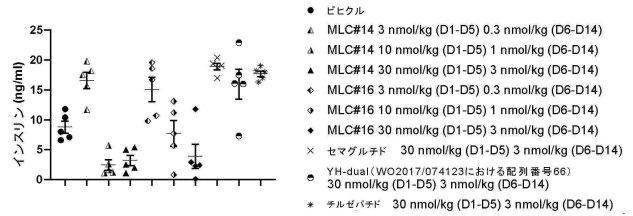
【図 5 J】



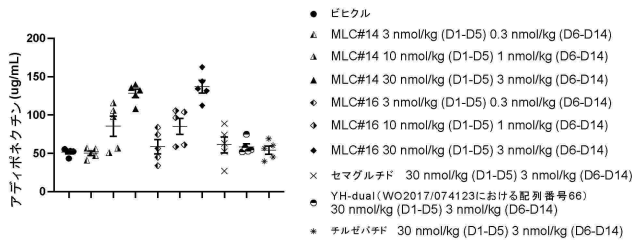
【図 5 K】



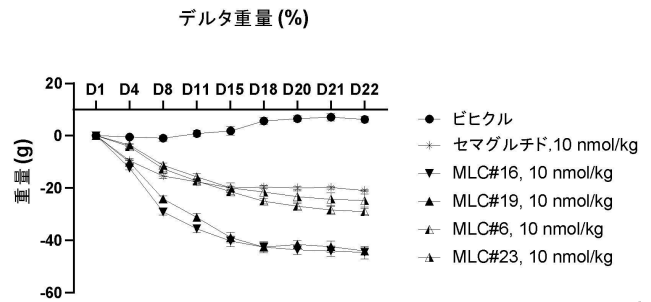
【図 5 L】



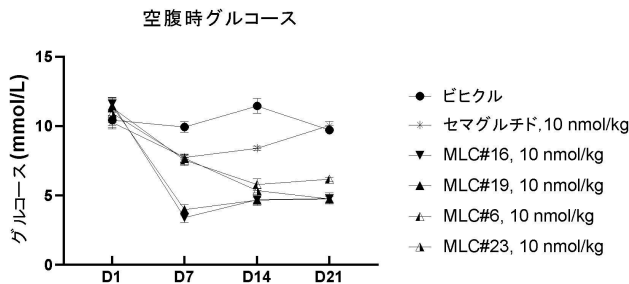
【図 5 M】



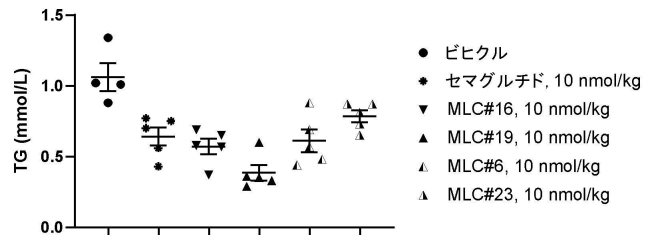
【図 6 A】



【図 6 B】



【図 6 C】



10

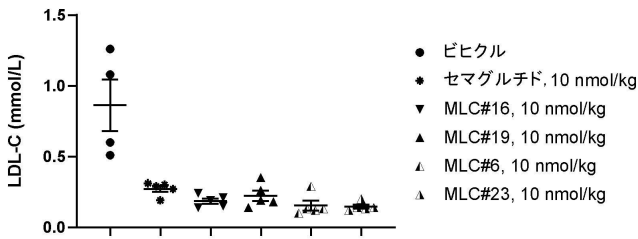
20

30

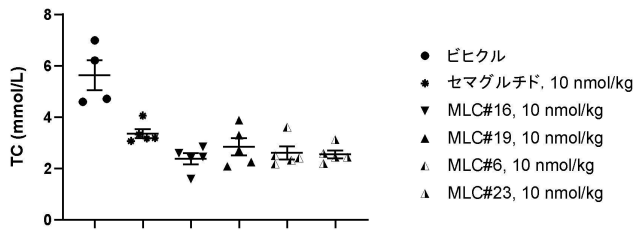
40

50

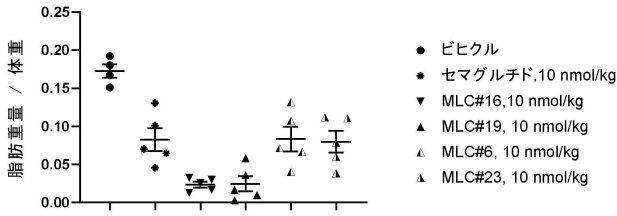
【図 6 D】



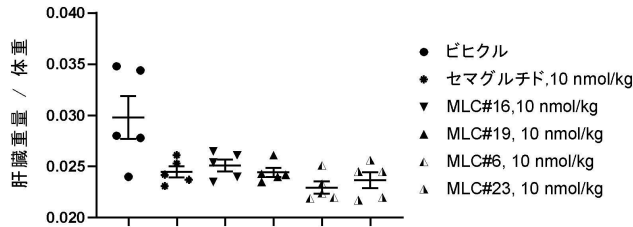
【図 6 E】



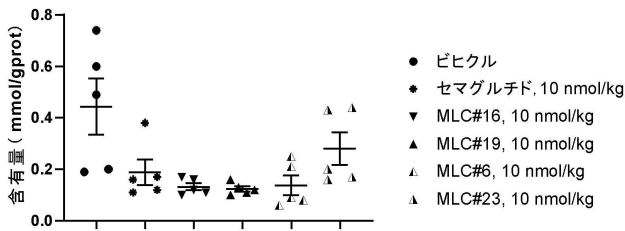
【図 6 F】



【図 6 G】



【図 6 H】



【図 7 - 1】

FGF21

配列番号	FGF21 配列	FGF21 特質
1	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYGSLSHF DPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPR GPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS	WT
2	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYGSLSHF DPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGQKSPHRDPAPR GPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS	121Q
3	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYGSLSHF DPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPR GPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSLVGPSQGRSPSYAS	168L
4	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYGSLSHF DPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPR GPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYES	180E
5	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYGSLSHF DPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGQKSPHRDPAPR GPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSLVGPSQGRSPSYES	N121Q, M168L, A180E
6	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYGSLSHF DPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGQKSPHRDPAPR GPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSLCGPSQGRSPSYES	N121Q, M168L, 169C, A180E
7	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYGSLSHF DPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGQKSPHRDPAPR GPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSLVCGPSQGRSPSYES	N121Q, M168L, 170C, A180E

10

20

30

40

50

【図 7 - 2】

8	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGG AADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGS ~~L~~ H DPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLP ~~G~~ Q KSPHRDPAPR GPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLS ~~L~~ VGP C SQGR SPSY E S	N121Q, M168L, 171C, A180E
9	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGG AADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGS ~~L~~ H DPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLP ~~G~~ Q KSPHRDPAPR GPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLS ~~L~~ VGP C QGR SPSY E S	N121Q, M168L, 172C, A180E
10	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGG AADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGS ~~L~~ H DPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLP ~~G~~ Q KSPHRDPAPR GPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLS ~~L~~ VGP S CGRS PSY E S	N121Q, M168L, 173C, A180E
11	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGG AADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGS ~~L~~ H DPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLP ~~G~~ Q KSPHRDPAPR GPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLS ~~L~~ VGP S C R S PSY E S	N121Q, M168L, 174C, A180E
12	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGG AADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGS ~~L~~ H DPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLP ~~G~~ Q KSPHRDPAPR GPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLS ~~L~~ VGP S CGRS PSY C S	N121Q, M168L, 180C, (註記: A180E 消失)
13	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGG AADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGS ~~L~~ H DPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLP ~~G~~ Q KSPHRDPAPR GPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLS ~~L~~ VGP S CGRS PSY E C	N121Q, M168L, A180E, 181C
14	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGG AADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGS ~~L~~ H DPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLP ~~G~~ Q KSPHRDPAPR GPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLS ~~L~~ VGP S CQGR SPSY E S	N121Q, M168L, 171G , A180E
15	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGG AADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGS ~~L~~ H DPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLP ~~G~~ Q KSPHRDPAPR GPARF P PLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLS ~~L~~ VGP S CQGR SPSY E S	N121Q, L137P , M168L, 171C, A180E

【図 7 - 3】

16	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGG AADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGS ~~L~~ H DPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLP ~~G~~ Q KSPHRDPAPR GPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLS ~~L~~ VGP T QGR SPSY E S	N121Q, M168L, 172T, A180E
17	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGG AADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGS ~~L~~ H DPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLP ~~G~~ Q KSPHRDPAPR GPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLS ~~L~~ VGP S TGRS PSY E S	N121Q, M168L, 173T, A180E
18	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGG AADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGS ~~L~~ H DPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLP ~~G~~ Q KSPHRDPAPR GPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLS ~~L~~ V N PSQGRS PSY E S	N121Q, M168L, 170N, A180E
19	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGG AADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGS ~~L~~ H DPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLP ~~G~~ Q KSPHRDPAPR GPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLS ~~L~~ VGP S Q N RS PSY E S	N121Q, M168L, 174N, A180E
89	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGG AADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGS ~~L~~ H DPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLP ~~G~~ Q KSPHRDPAPR GPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLS ~~L~~ VGP S CGRS PSY A S	121Q および 168L
90	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGG AADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGS ~~L~~ H DPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLP ~~G~~ Q KSPHRDPAPR GPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVG S CQGR SPSY E S	121Q および 180E
91	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGG AADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGS ~~L~~ H DPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLP G KNKSPHRDPAPR GPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLS ~~L~~ VGP S CGRS PSY E S	168 および 180E
92	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGG AADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGS ~~L~~ H DPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLP ~~G~~ Q KSPHRDPAPR GPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLS ~~L~~ VGP S C C R SPSY E S	121Q, 168L, P171G, 174C, および 180E

10

20

【図 7 - 4】

102	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGG AADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGS ~~L~~ H DPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLP G KNKSPHRDPAPR GPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLS ~~L~~ VGP G SQGR SPSY E S	168L, P171G, および 180E
103	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGG AADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGS ~~L~~ H DPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLP G KSPHRDPAPR GPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLS ~~L~~ VGP G SQGR SPSY A S	121Q, P171G, および 168L
104	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGG AADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGS ~~L~~ H DPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLP G KSPHRDPAPR GPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVG G SQGR SPSY E S	121Q, P171G および 181E
105	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGG AADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGS ~~L~~ H DPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLP G KSPHRDPAPR GPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLS ~~L~~ VGP G SQGR SPSY E S	N121Q, M168L, P171G, A180E

ナノボディ配列

配列 番号	配列
20	SFGMS
21	SISGSGSDTYADSVKG
22	GGSLSR
23	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSAASGFTFSSFGMSW VRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTYADSVKGRFTISR NAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGT LTVSS
24	AEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSAASGFTFSSFGMS WVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTYADSVKGRFTISR DNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGT LTVSS

【図 7 - 5】

25	SEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSAASGFTFSSFGMS WVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTYADSVKGRFTISR DNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGT LTVSS
26	AGEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSAASGFTFSSFGMS WVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTYADSVKGRFTISR DNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGT LTVSS
27	SGEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSAASGFTFSSFGMS WVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTYADSVKGRFTISR DNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGT LTVSS

GLP-1 配列

配列 番号	GLP-1 配列	GLP-1 特質
28	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFI ~~A~~ WLVKGRG	GLP1-WT
29	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFI ~~A~~ WLVKGGG	8G, 22E, 36G
30	EGTFTSDVSSYLEEQAAKEFI ~~A~~ WLVKGGG	del7-8 (不活性), 22E, 36G
31	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFI ~~A~~ WLVRGGG	8G, 22E, 34R,36G
32	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFI ~~A~~ WLVRGGG	8G, 22E, 26R, 34R,36G
33	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFI ~~A~~ WLVRGKG	8G, 22E, 26R, 34R,36K
34	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFI ~~A~~ WLVRGGG	8G, 22E, 26R,36G

30

40

50

【圖 7 - 6】

第1および第2のリンカー

[illegible]

【圖 7-8】

	MDKTHTCPCPAPPELLGGPSVFLPPPKPDKTLMISRTPEVTCVV/DVSHDEPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTRYRVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPT VLDSGGSFHYRLSKLTVDKSRWQQGNVFCSMHEALHNNHYTKSLSPDGKGGGGGS GGGSGGGGSHPIPDSSPLLQFGGQVQRQRYLTDDAQQTEAHLREIDGTVGGAADQS PESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLLHDFPEACSFRELLLEDGYNVYQS EAHGLPLHLPGNKSPhRDPAPRGPARFLPLGPLPAPPEPPGILAPQPDPVGSDDLPSLM
69	VGGSQGRSPSYES SGEVQLVESGGGLVPGQNSLRSLCAASGFTTSSFGMSWVRQAPGKLEWVSSISGSGS DTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLVQMNSLRPEDTAVYCTIGGSLRSSQGTIVTVSSG AQHPHIPDSSPLLQFGGQVQRQRYLTDDAQQTEAHLREIDGTVGGAADQSPESLLQL KALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLLHDFPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPL HLPGQKSPHRDPAPRGPARFLPLGPLPAPPEPPGILAPQPDPVGSDDLPSLVGSGQGR
93	SPSYES SGEVQLVESGGGLVPGQNSLRSLCAASGFTTSSFGMSWVRQAPGKLEWVSSISGSGS DTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLVQMNSLRPEDTAVYCTIGGSLRSSQGTIVTVSSG AQHPHIPDSSPLLQFGGQVQRQRYLTDDAQQTEAHLREIDGTVGGAADQSPESLLQL KALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLLHDFPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPL HLPGQKSPHRDPAPRGPARFLPLGPLPAPPEPPGILAPQPDPVGSDDLPSLVGSGQGRS
99	PSYES SGEVQLVESGGGLVPGQNSLRSLCAASGFTTSSFGMSWVRQAPGKLEWVSSISGSGS DTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLVQMNSLRPEDTAVYCTIGGSLRSSQGTIVTVSSG GGGSHPIPDSSPLLQFGGQVQRQRYLTDDAQQTEAHLREIDGTVGGAADQSPESLLQ LKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLLHDFPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPL HLPGQKSPHRDPAPRGPARFLPLGPLPAPPEPPGILAPQPDPVGSDDLPSLVGSGQGRS
100	SPSYES SGEVQLVESGGGLVPGQNSLRSLCAASGFTTSSFGMSWVRQAPGKLEWVSSISGSGS DTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLVQMNSLRPEDTAVYCTIGGSLRSSQGTIVTVSSG GGGSHPIPDSSPLLQFGGQVQRQRYLTDDAQQTEAHLREIDGTVGGAADQSPESLLQ LKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLLHDFPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPL HLPGQKSPHRDPAPRGPARFLPLGPLPAPPEPPGILAPQPDPVGSDDLPSLVGSGQGR
101	SPSYES SGEVQLVESGGGLVPGQNSLRSLCAASGFTTSSFGMSWVRQAPGKLEWVSSISGSGS DTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLVQMNSLRPEDTAVYCTIGGSLRSSQGTIVTVSSG GGGSHPIPDSSPLLQFGGQVQRQRYLTDDAQQTEAHLREIDGTVGGAADQSPESLLQ LKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLLHDFPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPL HLPGQKSPHRDPAPRGPARFLPLGPLPAPPEPPGILAPQPDPVGSDDLPSLVGSGQGR
107	RPSYES SGEVQLVESGGGLVPGQNSLRSLCAASGFTTSSFGMSWVRQAPGKLEWVSSISGSGS DTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLVQMNSLRPEDTAVYCTIGGSLRSSQGTIVTVSSG GGGSHPIPDSSPLLQFGGQVQRQRYLTDDAQQTEAHLREIDGTVGGAADQSPESLLQ LKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLLHDFPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPL HLPGQKSPHRDPAPRGPARFLPLGPLPAPPEPPGILAPQPDPVGSDDLPSLVGSGSQG

【圖 7-7】

ナノボディー-FGF21 配列

配列番号	配列
63	SGEVQLVESGGGLVPGNSLRSLCAASGFTFSFGMSWVRQAPKGKLEWVSSISGSGS DTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVVYCTIGGSLRRSSQGTlVTVSSG AQPGAQPAQGAQPGAQGAQPGAQGAQPGAQGAQPHPIPDSSPLLQFGGQV VRQRYLYTDDAQQTEAHLREIDGTVGGAADQSPESLLQKALKPGVIQILGVKTSRFLC QRPDGALYGSILHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGQKSPHRDPAPRGP ARFLPLGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSLVGGSQGRSPSYES
64	SGEVQLVESGGGLVPGNSLRSLCAASGFTFSFGMSWVRQAPKGKLEWVSSISGSGS DTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVVYCTIGGSLRRSSQGTlVTVSSG AQPGAQPAQGAQPGAQGAQPGAQGAQPGAQGAQPHPIPDSSPLLQFGGQV VRQRYLYTDDAQQTEAHLREIDGTVGGAADQSPESLLQKALKPGVIQILGVKTSRFLC QRPDGALYGSILHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGQKSPHRDPAPRGP ARFLPLGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSLVGGSQGRSPSYES
65	SGEVQLVESGGGLVPGNSLRSLCAASGFTFSFGMSWVRQAPKGKLEWVSSISGSGS DTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVVYCTIGGSLRRSSQGTlVTVSSG AQPGAQPAQGAQPGAQGAQPHPIPDSSPLLQFGGQVQRQRYLYTDDAQQTEAHLREID GTVGGAADQSPESLLQKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSILHFDPEACSFRE LLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGQKSPHRDPAPRGPARFLPLGLPPALPEPPGILAPQPP DVGSSDPLSLVGGSQGRSPSYES
66	SGEVQLVESGGGLVPGNSLRSLCAASGFTFSFGMSWVRQAPKGKLEWVSSISGSGS DTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVVYCTIGGSLRRSSQGTlVTVSSG AQPGAQPHPIPDSSPLLQFGGQVQRQRYLYTDDAQQTEAHLREIDGTVGGAADQSPES LQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSILHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAH GLPLHLPGQKSPHRDPAPRGPARFLPLGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSLVGG SQGRSPSYES
67	SGEVQLVESGGGLVPGNSLRSLCAASGFTFSFGMSWVRQAPKGKLEWVSSISGSGS DTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVVYCTIGGSLRRSSQGTlVTVSSG AQPHPIPDSSPLLQFGGQVQRQRYLYTDDAQQTEAHLREIDGTVGGAADQSPESLLQ KALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSILHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPL HLPQKSPHRDPAPRGPARFLPLGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSLVGGSQGR SPSYES
68	SGEVQLVESGGGLVPGNSLRSLCAASGFTFSFGMSWVRQAPKGKLEWVSSISGSGS DTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVVYCTIGGSLRRSSQGTlVTVSSG AQPHPIPDSSPLLQFGGQVQRQRYLYTDDAQQTEAHLREIDGTVGGAADQSPESLLQ KALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSILHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPL HLPQKSPHRDPAPRGPARFLPLGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSLVGGSQGR SPSYES

【圖 7-9】

GLP-1-ナノボディ-FGF21 配列

配列番号	配列
70	HGEFTTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGGSGGGGSGGGGS GGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRISCAASGFTFSFGMSWWRQAP KGLEWVSSISGSGSDTLVADSVKGRFTISRDNAKITYLQMNSLRPE DTAVYVCTIGGSLRSSQGTGLTVTSSGGGGGGSHIPDSSPLLQFG GQVRRQRYLYTDDAQGEAHLEIREDTVGGAADQSPESLLQLKALKPQ VIQLGVKTSRFLCRPQPDGALYGSILHDFEACSFRELLDGYNVYQSE AHGLPLHLPGQKSPHRDPAPRGPARFLPLPLPALPEPPGILAPQP DVGSSDPLSLVGGSQGRSPSYE EGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRISCAASGFTFSFGMSWWRQAPGK GLEWVSSISGSGSDTLVADSVKGRFTISRDNAKITYLQMNSLRPE VYVCTIGGSLRSSQGTGLTVTSSGGGGGGSHIPDSSPLLQFGGQV RQRYLYTDDAQGEAHLEIREDTVGGAADQSPESLLQLKALKPQVIQ LGVKTSRFLCRPQPDGALYGSILHDFEACSFRELLDGYNVYQSEAHG LPLHLPGQKSPHRDPAPRGPARFLPLPLPALPEPPGILAPQPPDVGS SDPLSLVGGSQGRSPSYE
71	EGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGAQPGAQPGAQPGAQPEVQL VESGGGLVQPGNSLRISCAASGFTFSFGMSWWRQAPKGLEWVSSISGSGSDTL YADSVKGRFTISRDNAKITYLQMNSLRPEDTAVYCTIGGSLRSSQGTGLTVSSG AQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPHPIPDSSPLLQF GGQVRQRYLYTDDAQGEAHLEIREDTVGGAADQSPESLLQLKALKPQVIQIL VKTSRFLCRPQPDGALYGSILHDFEACSFRELLDGYNVYQSEAHGLPLHPQKS PHRDPAPRGPARFLPLPLPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSLVGGSQGRSPSYE S
72	EGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPEVQL VESGGGLVQPGNSLRISCAASGFTFSFGMSWWRQAPKGLEWVSSISGSGSDTL YADSVKGRFTISRDNAKITYLQMNSLRPEDTAVYCTIGGSLRSSQGTGLTVSSG QPEGAQPGQPEGAQPGQPEGAQPGQPEGAQPGQPEGAQPGQPEGAQPHPI DSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQGEAHLEIREDTVGGAADQSPESLLQLKALK PGVILQVTKTSRFLCRPQPDGALYGSILHDFEACSFRELLDGYNVYQSEAHGLPL HLPQKSPHRDPAPRGPARFLPLPLPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSLVGGS QGRSPSYE
73	HGEFTTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPEV QLVESGGGLVQPGNSLRISCAASGFTFSFGMSWWRQAPVYCTIGGSLRSSQGTGLTV SSGAQVQQAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPHPIPDSSPLL QFGGQVRQRYLYTDDAQGEAHLEIREDTVGGAADQSPESLLQLKALKPQVIQ LGVKTSRFLCRPQPDGALYGSILHDFEACSFRELLDGYNVYQSEAHGLPLHPQ KSPHRDPAPRGPARFLPLPLPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSLVGGSQGRSPS YES
74	

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/105686

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K 19/00(2006.01)i; C07K 14/435(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; C12N 15/62(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; A61P 1/16(2006.01)i; A61P 3/04(2006.01)i; A61P 3/06(2006.01)i; A61P 3/10(2006.01)i; A61P 13/12(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K, A61K, C12N, A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS, VEN, CNKI, CNTXT, USTXT, EPTXT, PUBMED, ISI WEB, NCBI, EMBL-EBI, STNext, BEIJING QL BIOPHARMACEUTICAL, nanobody, serum albumin, HSA, VHH, FGF21, fibroblast growth factor 21, glucagon-like peptide 1, GLP-1, mutation, variant, fusion, fused, linker, half-life, conjugate, SEQ ID NOs:1, 6-13, 16-29,31-52, 55-68,70,74-75,79-83,85,92-101,107-109		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	AU 2016203044 A1 (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY) 16 June 2016 (2016-06-16) description, page 2 lines 1-7, page 5 lines 8-27, page 12 lines 26-32, page 40 line 19 - page 41 line 35	1-61
Y	US 2009028880 A1 (ABLYNX N. V.) 29 January 2009 (2009-01-29) claims 1-24, description, paragraph 21	1-61
Y	WO 2017093465 A1 (SANOFT) 08 June 2017 (2017-06-08) claims 1-27	1-61
Y	US 2014228546 A1 (Ablynx N.V.) 14 August 2014 (2014-08-14) claims 1-21	1-61
Y	CN 110028587 A (ANYUAN BIOTECHNOLOGY SHANGHAI CO., LTD.) 19 July 2019 (2019-07-19) claims 1-20	1-61
Y	AU 2013202856 A1 (Ablynx N.V.) 02 May 2013 (2013-05-02) claims 1-34	1-61
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 27 September 2022	Date of mailing of the international search report 10 October 2022	
Name and mailing address of the ISA/CN National Intellectual Property Administration, PRC 6, Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing 100088, China	Authorized officer WANG,Yao	
Facsimile No. (86-10)62019451	Telephone No. 86-(10)-53961926	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

10

20

30

40

50

International application No.

PCT/CN2022/105686

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	OMAR, B.A. et al. "Fibroblast Growth Factor 21 (FGF21) and Glucagon-Like Peptide 1 Contribute to Diabetes Resistance in Glucagon Receptor-Deficient Mice." <i>DIABETES</i> , Vol. 63, No. 1, 23 September 2013 (2013-09-23), pages 101-110	1-61

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2022/105686
Box No. I	Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)	
1.	With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing: a. ☒ forming part of the international application as filed: ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file. ☐ on paper or in the form of an image file. b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file. c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only: ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)). ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).	
2.	☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.	
3.	Additional comments: [1] The sequence listing actually submitted is in the form of an Annex C/ST.26 text file.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2022/105686
Box No. II	Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)	
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	☒ Claims Nos.: 52-53 because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: [1] Claims 52-53 relate to a method of preventing or treating a metabolic disorder. The subject-matter of claims 52-53 relates to the treatment of human or animal bodies, and therefore does not warrant an international search according to the criteria set out in PCT Rule 39.1(iv). An international search has been carried out and based on the manufacturing of a medicament.	10
2.	☐ Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:	
3.	☐ Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	20
		30
		40
		50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/105686

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)
AU	2016203044	A1	16 June 2016	None		
US	2009028880	A1	29 January 2009	JP	2017186318	A 12 October 2017
				LT	2949668	T 11 November 2019
				SI	1888641	T1 31 May 2012
				JP	2008539772	A 20 November 2008
				ZA	201100385	B 26 September 2012
				ZA	200709867	B 29 October 2008
				EP	3613767	A1 26 February 2020
				AT	537188	T 15 December 2011
				MX	2007014359	A 06 February 2008
				RU	2017133794	A 28 March 2019
				HU	E045710	T2 28 January 2020
				ES	2384164	T3 02 July 2012
				JP	2012167112	A 06 September 2012
				HK	1113685	A1 10 October 2008
				HK	1215953	A1 30 September 2016
				EP	1888640	A2 20 February 2008
				US	2020079844	A1 12 March 2020
				PL	2949668	T3 31 March 2020
				CR	9519	A 17 October 2008
				AU	2006249144	A1 23 November 2006
				PT	1888641	E 19 March 2012
				CA	2608770	A1 23 November 2006
				IL	186941	D0 09 February 2008
				ES	2778123	T3 07 August 2020
				EP	2365000	A2 14 September 2011
				RU	2007142444	A 27 June 2009
				KR	20080011395	A 04 February 2008
				IL	250946	D0 30 April 2017
				US	2015353635	A1 10 December 2015
				EP	2949668	A1 02 December 2015
				NZ	562695	A 27 May 2011
				SI	1888640	T1 31 July 2012
				BR	P10609224	A2 18 October 2011
				DK	1888640	T3 18 June 2012
				US	2014335101	A1 13 November 2014
				RU	2012126722	A 10 January 2014
				PL	1888640	T3 31 August 2012
				CN	103254309	A 21 August 2013
				EP	2479191	A2 25 July 2012
				NO	20161028	A1 19 November 2007
				NI	200700291	A 12 May 2008
				TW	200716671	A 01 May 2007
				TW	201321410	A 01 June 2013
				BR	122013001996	B1 01 February 2022
				MX	342271	B 21 September 2016
				CN	101248087	A 20 August 2008
				DK	2949668	T3 11 November 2019
				WO	2006122787	A1 23 November 2006
				SI	2949668	T1 29 November 2019

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2015)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/105686

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2017093465	A1	08 June 2017	MX	2018005387	A	14 August 2018
				KR	20180083938	A	23 July 2018
				EP	3383890	A1	10 October 2018
				TW	201731867	A	16 September 2017
				IL	259675	A	31 July 2018
				US	2022227825	A1	21 July 2022
				EP	3693382	A1	12 August 2020
				CN	108602869	A	28 September 2018
				RU	2018123704	A	14 January 2020
				JP	2022068275	A	09 May 2022
				BR	112018011002	A2	04 December 2018
				US	2018371041	A1	27 December 2018
				SG	11201804577R	A	28 June 2018
				JP	2019506138	A	07 March 2019
				AU	2016361912	A1	19 July 2018
				CA	3006689	A1	08 June 2017
US	2014228546	A1	14 August 2014	IN	414CHN2014	A	03 April 2015
				US	2017210789	A1	27 July 2017
				AU	2012271974	A1	12 December 2013
				LT	2723771	T	10 December 2019
				PL	2723771	T3	30 April 2020
				DK	2723771	T3	02 December 2019
				HU	E047238	T2	28 April 2020
				JP	2021088585	A	10 June 2021
				HR	P20192160	T1	21 February 2020
				CN	103619878	A	05 March 2014
				ES	2759936	T3	12 May 2020
				SI	2723771	T1	31 December 2019
				EP	2723771	A1	30 April 2014
				PT	2723771	T	11 December 2019
				EP	3466972	A1	10 April 2019
				HR	P20170535	T1	16 June 2017
				JP	2014520129	A	21 August 2014
				JP	2018127478	A	16 August 2018
				WO	2012175400	A1	27 December 2012
				CA	2839779	A1	27 December 2012
				CN	106046168	A	26 October 2016
CN	110028587	A	19 July 2019	None			
AU	2013202856	A1	02 May 2013	None			

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2015)

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	Z
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	H
C 0 7 K 14/605 (2006.01)	C 0 7 K 14/605	
A 6 1 K 38/18 (2006.01)	A 6 1 K 38/18	
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 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
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	1 0 1
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 K 47/68 (2017.01)	A 6 1 K 47/68	
A 6 1 K 38/26 (2006.01)	A 6 1 K 38/26	
A 6 1 K 47/65 (2017.01)	A 6 1 K 47/65	

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

- (74)代理人 100144794
弁理士 大木 信人
- (74)代理人 100204582
弁理士 大栗 由美
- (72)発明者 チャン, ユアンユアン
中華人民共和国 1 0 2 2 0 6 ベイジン, チャンピン ディストリクト, ライフ サイエンス パー
ク ロード 2 0, ビルディング 7, # 1 0 1
- (72)発明者 ウー, ボー
中華人民共和国 1 0 2 2 0 6 ベイジン, チャンピン ディストリクト, ライフ サイエンス パー
ク ロード 2 0, ビルディング 7, # 1 0 1
- (72)発明者 グオ, ウェイ
中華人民共和国 1 0 2 2 0 6 ベイジン, チャンピン ディストリクト, ライフ サイエンス パー
ク ロード 2 0, ビルディング 7, # 1 0 1
- (72)発明者 ドン, シャオナ
中華人民共和国 1 0 2 2 0 6 ベイジン, チャンピン ディストリクト, ライフ サイエンス パー
ク ロード 2 0, ビルディング 7, # 1 0 1
- (72)発明者 チャン, ユイン
中華人民共和国 1 0 2 2 0 6 ベイジン, チャンピン ディストリクト, ライフ サイエンス パー
ク ロード 2 0, ビルディング 7, # 1 0 1

F ターム (参考) 4B064 AG13 AG15 AG27 BH07 CA02 CA19 CC06 CC10 CC15 CC24
CE03 CE10 CE11 DA01
4B065 AA26X AA90Y AA93X AB01 AC14 BA02 BC03 BC11 BD01 BD14
BD15 CA24 CA25 CA44
4C076 AA95 CC04 CC11 CC16 CC17 CC21 EE41 EE59

F ターム (参考)

4C084 AA02 AA03 BA44 CA17 DB35 DB54 NA05 ZA45 ZA70 ZA75
ZA81 ZB11 ZC33 ZC35
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA41 DA01 DA30 DA76 EA20 FA74
GA23 GA25 GA45