

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-519250
(P2020-519250A)

(43) 公表日 令和2年7月2日(2020.7.2)

(51) Int.Cl.	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	4 B 0 6 4
C 0 7 K 14/72 (2006.01)	C 0 7 K 14/72 Z N A	4 B 0 6 5
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	4 C 0 7 6
C 0 7 K 14/635 (2006.01)	C 0 7 K 14/635	4 C 0 8 4
C 1 2 N 15/16 (2006.01)	C 1 2 N 15/16	4 C 0 8 6

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 36 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2019-558571 (P2019-558571)
 (86) (22) 出願日 平成30年4月27日 (2018. 4. 27)
 (85) 翻訳文提出日 令和1年11月20日 (2019. 11. 20)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2018/051120
 (87) 国際公開番号 W02018/197895
 (87) 国際公開日 平成30年11月1日 (2018. 11. 1)
 (31) 優先権主張番号 1706781.0
 (32) 優先日 平成29年4月28日 (2017. 4. 28)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 英国 (GB)

(71) 出願人 598157421
 ユニバーシティ・オブ・シェフィールド
 University of Sheff
 i e l d
 イギリス、エス10・2ティエヌ、シェフ
 ィールド、ウエスタン・バンク、ファース
 ・コート
 (74) 代理人 100114188
 弁理士 小野 誠
 (74) 代理人 100119253
 弁理士 金山 賢教
 (74) 代理人 100124855
 弁理士 坪倉 道明
 (74) 代理人 100129713
 弁理士 重森 一輝

最終頁に続く

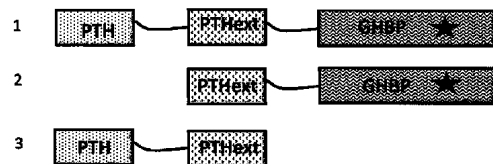
(54) 【発明の名称】 副甲状腺ホルモン融合ポリペプチド

(57) 【要約】

本開示は、受容体ポリペプチドを含む長時間作用性の副甲状腺または副甲状腺ホルモン様融合ポリペプチドと、副甲状腺機能低下症及び骨粗しょう症の処置におけるその使用とに関する。

【選択図】 図 1

Figure 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

融合ポリペプチドであって、

副甲状腺ホルモンまたはその生物学的活性断片もしくはアナログのアミノ酸配列を含むポリペプチドと、

受容体ポリペプチドまたはその断片もしくはアナログのアミノ酸配列を含むポリペプチドとを含み、前記副甲状腺ホルモンまたはその生物学的活性断片もしくはアナログが、翻訳融合体として、直接的または間接的に、前記受容体ポリペプチドに連結している、前記融合ポリペプチド。

【請求項 2】

前記融合ポリペプチドが、配列番号 10 に記載のアミノ酸配列を含むまたはそれからなる副甲状腺ホルモンを含む、請求項 1 に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 3】

前記融合ポリペプチドが、アミノ酸 1 - 28、1 - 29、1 - 30、1 - 31、1 - 32、1 - 33、1 - 34、または 1 - 35 を含む配列番号 10 の断片を含む、請求項 1 または 2 に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 4】

前記融合ポリペプチドが、配列番号 9 に記載の配列を含む副甲状腺ホルモンを含む、請求項 1 または 2 に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 5】

前記融合ポリペプチドが、アミノ酸 1 - 28、1 - 29、1 - 30、1 - 31、1 - 32、1 - 33、1 - 34、または 1 - 35 を含む配列番号 9 の断片を含む、請求項 4 に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 6】

前記融合ポリペプチドが、配列番号 54 に記載のアミノ酸配列を含むまたはそれからなる副甲状腺ホルモンを含む、請求項 5 に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 7】

前記融合ポリペプチドが、式 (I) のアミノ酸配列：

Xaa01 - Val - Xaa03 - Glu - Ile - Gln - Leu - Xaa08 - His - Xaa10 - Xaa11 - Xaa12 - Xaa13 - Xaa14 - Leu - Xaa16 - Xaa17 - Xaa18 - Arg - Arg - Arg - Xaa22 - Phe - Leu - Xaa25 - Xaa26 - Leu - Ile - Ala - Glu - Ile - His - Thr - Ala - Glu - Ile (配列番号 8)

((II)において、Xaa01は、SerまたはAlaであり、Xaa03は、SerまたはAlaであり、Xaa08は、MetまたはLeuであり、Xaa10は、Asn、Ala、Val、Asp、Glu、またはGlnであり、Xaa11は、Leu、Ala、Val、Met、Lys、Arg、またはTrpであり、Xaa12は、Gly、Ala、His、またはArgであり、Xaa13は、Lys、Ala、Leu、Gln、Arg、His、またはTrpであり、Xaa14は、His、Leu、Arg、Phe、Trp、またはSerであり、Xaa16は、GlnまたはAsnであり、Xaa17は、AspまたはSerであり、Xaa18は、Ala、Leu、Met、Glu、Ser、またはPheであり、Xaa22は、Ala、Phe、Glu、Ser、Leu、Asn、Trp、またはLysであり、Xaa25は、His、Arg、Leu、Trp、またはLysであり、Xaa26は、Lys、His、Ala、Ser、Asn、またはArgである)

を含むもしくはそれからなる副甲状腺ホルモンアナログ、またはXaa18のうちの少なくとも1つがLeuでもMetでもなく、Xaa22がPheではなく、Xaa26がHisではないことを条件に、式 (I) のアミノ酸 1 - 28、1 - 29、1 - 30、1 - 31、1 - 32、1 - 33、1 - 34、もしくは 1 - 35 を含むその断片を含む、請求項 1 または 2 に記載の融合ポリペプチド。

10

20

30

40

50

【請求項 8】

前記融合ポリペプチドが、副甲状腺ホルモンと、配列番号 37 に記載のアミノ酸配列を含むまたはそれからなる副甲状腺ホルモンアナログアミノ酸配列とを含む、請求項 1 または 2 に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 9】

前記融合ポリペプチドが、配列番号 40 に記載のアミノ酸配列を含む副甲状腺ホルモン関連タンパク質またはその生物学的活性断片もしくはアナログを含む、請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 10】

前記融合ポリペプチドが、副甲状腺ホルモン受容体細胞外ドメインを含む受容体ポリペプチドを含む、請求項 1 から 9 のいずれか 1 項に記載の融合ポリペプチド。

10

【請求項 11】

前記融合ポリペプチドが、配列番号 3 に記載のアミノ酸配列を含むまたはそれからなる副甲状腺ホルモン受容体細胞外ドメインを含む、請求項 10 に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 12】

前記融合ポリペプチドが、配列番号 3 に記載の全長アミノ酸配列に対し 10 - 99 % 同一であるアミノ酸配列を含む副甲状腺ホルモン受容体細胞外ドメインまたはその断片を含み、前記ドメインまたは断片が、副甲状腺ホルモン、その断片またはアナログに結合する、請求項 10 に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 13】

前記融合ポリペプチドが、配列番号 3 に記載のアミノ酸配列に対し 10、15、20、30、40、50、60、70、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、または 99 % 同一であるアミノ酸配列を含む副甲状腺ホルモン受容体細胞外ドメインまたはその断片を含み、前記ドメインが、副甲状腺ホルモン、その断片またはアナログに結合する、請求項 12 に記載の融合ポリペプチド。

20

【請求項 14】

前記融合ポリペプチドが、前記副甲状腺ホルモン受容体細胞外ドメインをコードする修飾されたアミノ酸配列を含み、前記修飾が、配列番号 3 に記載の I 107K、D 109A、P 104L、または L 159A からなる群より選択される 1 つ以上のアミノ酸置換である、請求項 11 から 13 のいずれか 1 項に記載の融合ポリペプチド。

30

【請求項 15】

前記融合ポリペプチドが、配列番号 3 に記載の I 07K 置換を含む副甲状腺ホルモン受容体細胞外ドメインを含む、請求項 14 に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 16】

前記融合ポリペプチドが、修飾された副甲状腺ホルモン受容体細胞外ドメインを含み、前記修飾が、少なくとも 1 つのアミノ酸残基の付加、欠失、または置換によるものであり、前記修飾されたポリペプチドが、副甲状腺ホルモン結合活性を実質的に欠いているか、副甲状腺ホルモン結合活性が低減している、請求項 10 から 15 のいずれか 1 項に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 17】

受容体ポリペプチドを含む前記融合ポリペプチドが、成長ホルモン受容体の成長ホルモン結合ドメインポリペプチドを代替的または追加的に含む、請求項 1 から 16 のいずれか 1 項に記載の融合ポリペプチド。

40

【請求項 18】

前記融合ポリペプチドが、ヒト成長ホルモン受容体の細胞外成長ホルモン結合ドメインポリペプチドを含む、請求項 17 に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 19】

前記融合ポリペプチドが、配列番号 5 に記載のアミノ酸配列から構成される細胞外成長ホルモン結合ドメインポリペプチドを含む、請求項 18 に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 20】

50

前記融合ポリペプチドが、修飾された細胞外成長ホルモン結合ドメインポリペプチドを含み、前記修飾が、少なくとも1つのアミノ酸残基の付加、欠失、または置換によるものであり、前記修飾されたポリペプチドが、成長ホルモン結合活性を実質的に欠いているか、成長ホルモン結合活性が低減している、請求項19に記載の融合ポリペプチド。

【請求項21】

前記融合ポリペプチドが、配列番号5に記載のW169、R43、E44、I103、W104、I105、P106、I164、及びD165からなる群より選択されるアミノ酸残基のうちの一つ以上の修飾を含む、請求項20に記載の融合ポリペプチド。

【請求項22】

前記融合ポリペプチドが、配列番号5に記載のアミノ酸配列のアミノ酸残基トリプトファン104の欠失を含む、請求項21に記載の融合ポリペプチド。

10

【請求項23】

前記融合ポリペプチドが、配列番号5に記載のアミノ酸配列のトリプトファン104の置換を含む、請求項22に記載の融合ポリペプチド。

【請求項24】

前記融合ポリペプチドが、配列番号7に記載のアラニンに対するトリプトファン104の置換を含む、請求項23に記載の融合ポリペプチド。

【請求項25】

前記融合ポリペプチドが、配列番号8のアミノ酸残基1-28、1-29、1-30、1-31、1-32、1-33、1-34、または1-35を含むまたはそれからなる副甲状腺ホルモン断片を含むまたはそれからなる、請求項1から24のいずれか1項に記載の融合ポリペプチド。

20

【請求項26】

前記融合ポリペプチドが、配列番号54に記載のアミノ酸配列を含むまたはそれからなり、前記副甲状腺ホルモンアミノ酸配列が、少なくとも1つのアミノ酸残基の付加、欠失、または置換によって修飾され、前記修飾された融合ポリペプチドが、副甲状腺ホルモン活性を保持する、請求項25に記載の融合ポリペプチド。

【請求項27】

前記融合ポリペプチドが、副甲状腺受容体ドメインポリペプチドを含み、前記副甲状腺受容体ドメインポリペプチドが、前記融合ポリペプチドのカルボキシル末端端部に位置する、請求項1から26のいずれか1項に記載の融合ポリペプチド。

30

【請求項28】

前記融合ポリペプチドが、副甲状腺受容体ドメインポリペプチドを含み、前記副甲状腺受容体ドメインポリペプチドが、前記融合ポリペプチドのアミノ末端端部に位置する、請求項1から26のいずれか1項に記載の融合ポリペプチド。

【請求項29】

前記融合ポリペプチドが、成長ホルモン結合ドメインポリペプチドを含み、前記成長ホルモン結合ドメインポリペプチドが、前記融合ポリペプチドのカルボキシル末端端部に位置する、請求項1から26のいずれか1項に記載の融合ポリペプチド。

【請求項30】

前記融合ポリペプチドが、成長ホルモン結合ドメインポリペプチドを含み、前記成長ホルモン結合ドメインポリペプチドが、前記融合ポリペプチドのアミノ末端端部に位置する、請求項1から26のいずれか1項に記載の融合ポリペプチド。

40

【請求項31】

前記融合ポリペプチドが、配列番号12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、または36に記載のアミノ酸配列を含むまたはそれからなる、請求項1に記載の融合ポリペプチド。

【請求項32】

前記融合ポリペプチドが、配列番号15または20に記載のアミノ酸配列を含むまたは

50

それからなる、請求項 3 1 に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 3 3】

前記融合ポリペプチドが、配列番号 4 2、4 3、4 4、4 5、4 6、4 7、4 8、4 9、5 0、5 1、5 2、または 5 3 に記載のアミノ酸配列を含むまたはそれからなる、請求項 1 に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 3 4】

前記融合ポリペプチドが、プロペプチドを含む、請求項 1 から 3 3 のいずれか 1 項に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 3 5】

前記融合ポリペプチドが、ペプチド分泌シグナルをさらに含む、請求項 1 から 3 3 のいずれか 1 項に記載の融合ポリペプチド。

10

【請求項 3 6】

前記融合ポリペプチドが、副甲状腺ホルモン、その断片またはアナログを含み、ペプチドリンカーによって前記受容体ポリペプチドに直接的または間接的に連結している、請求項 1 から 3 3 のいずれか 1 項に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 3 7】

前記副甲状腺ホルモン、断片、またはアナログが、インフレーション翻訳融合体として前記受容体ポリペプチドに直接的に連結している、請求項 1 から 3 3 のいずれか 1 項に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 3 8】

請求項 1 から 3 7 のいずれか 1 項に記載の融合ポリペプチドをコードする核酸分子。

20

【請求項 3 9】

請求項 3 8 に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 4 0】

請求項 3 8 または 3 9 に記載の核酸分子またはベクターを用いてトランスフェクションまたは形質転換された、単離細胞。

【請求項 4 1】

融合ポリペプチドの産生のための方法であって、

i) 請求項 4 0 に記載の細胞及び細胞培地を提供することと、

i i) 前記細胞を培養することと、

i i i) 前記細胞または培地から本発明における融合ポリペプチドを単離することと

からなるステップを含む、前記方法。

30

【請求項 4 2】

賦形剤または担体を含む請求項 1 から 3 7 のいずれか 1 項に記載の融合ポリペプチドを含む、薬学的組成物。

【請求項 4 3】

対象における副甲状腺機能低下症の処置における使用のための、請求項 1 から 3 7 のいずれか 1 項に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 4 4】

ヒト対象における骨粗しょう症の処置における使用のための、請求項 1 から 3 7 のいずれか 1 項に記載の融合ポリペプチド。

40

【請求項 4 5】

前記融合ポリペプチドが、配列番号 4 0 に記載のアミノ酸配列を含む、請求項 4 4 に記載の使用における融合ポリペプチド。

【請求項 4 6】

前記融合ポリペプチドが、炭酸カルシウム及び/またはビタミン D サプリメント、例えば、カルシトロールまたはアルファカルシトロールと組み合わせて投与される、請求項 4 4 または 4 5 に記載の使用における融合ポリペプチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

【0001】

本開示は、長時間作用性の副甲状腺ホルモン融合ポリペプチドであって、受容体ポリペプチドを含み、当該受容体ポリペプチドが、副甲状腺ホルモン受容体及び/または成長ホルモン受容体である、副甲状腺ホルモン融合ポリペプチドと、当該融合ポリペプチドをコードする核酸分子と、当該融合ポリペプチドを発現するように適合されたベクターと、当該核酸またはベクターを用いて形質転換またはトランスフェクションされた細胞と、副甲状腺機能低下症の処置における当該ポリペプチドの使用とに関する。

【背景技術】

【0002】

副甲状腺ホルモン（PTH）レベルが低いことによって特徴づけられる副甲状腺機能低下症は、まれな状態であり、先天性であるか、またはより高頻度には頸部手術後の後天性のものである。PTHは、頸部内の甲状腺の隣に位置する4つの副甲状腺によって分泌され、カルシウム恒常性、ビタミンD依存的カルシウム吸収、腎臓のカルシウム再吸収、及び腎臓のリン酸クリアランスを調節する。PTHは、骨からのカルシウム放出を刺激し、腸内のカルシウム吸収を強化する。PTHレベルの低減は、低カルシウム血症を招き、神経筋の過敏性などの症状（錯感覚、筋れん縮、咽頭けいれん、テタニー、及び発作を含む）を含み、処置されない場合には死を招く恐れがある。

10

【0003】

現時点での標準治療は、高用量のカルシウム及び活性ビタミンDであるが、処置がカルシウムレベルを変動させるにもかかわらず、多くの患者が抑うつ発生の増加を示し、さらに、感染症のリスクならびに腎臓合併症（例えば、石灰化及び腎機能不全）の増加も示す。PTHは、84アミノ酸長のポリペプチドであり、34の長さのアミノ酸のN末端生物学的活性ドメインを含み、これが有効なPTH受容体アゴニストであることが見いだされた。

20

【0004】

現時点では、組換えPTHが毎日の皮下注射として投与されている。PTHは、*in vitro*で不安定であり、*in vivo*での半減期が短いことが知られており、その結果、吐き気及び嘔吐に関連するPTHレベルの変動がもたらされる。*in vitro*でPTHを安定化する組成物は、US7550434、US7144861、US6770623、WO2006/129995、またはWO2013/108235で開示されており、最大36アミノ酸の修飾PTH断片を含む薬物動態及び薬物力学が強化された組換えPTHアナログは、WO2011143406で開示されている。しかし、毎日皮下注射を行う必要性を最小限にするために、血清カルシウムレベルへの調節増大と副作用の低減とを備えた長時間作用性のPTH生物製剤が緊急に必要とされている。

30

【0005】

医薬品で使用される組換えタンパク質及びペプチドは、多くの場合、血清クリアランスが増加するという難点がある。投与されたタンパク質が循環から除去されるという結果をもたらす要因には、2つの構成要素：腎臓の濾過及びタンパク質分解が存在する。典型的には、70kDaを上回る分子量のタンパク質は、単に濾過するには大き過ぎるため、糸球体濾過により除去されることはないが、低分子量のタンパク質は、糸球体によって濾過され、尿中に見いだされる。有効な分子量のタンパク質を増加させ、免疫原性が低減された製品を生産する方法は、タンパク質をポリエチレングリコール（PEG）でコーティングすることである。PEGは、ペグ化タンパク質の流体力学的体積を増加させることにより、腎クリアランスを緩徐化すると考えられている（Maxfield et al., Polymer, 16:505-509 (1975)）。しかし、タンパク質のペグ化は、タンパク質の受容体に対する親和性の低下をもたらし、生物学的活性を低減する恐れがある。タンパク質生物製剤のPK及びPDを向上させる代替的手段がWO2009/013461に開示されている。ヒト成長ホルモン受容体（GHR）の細胞外ドメインに融合したヒト成長ホルモンは、PK及びPDが強化され、成長ホルモンと比較しておよそ200倍PKが向上している。PCT/GB2016/053218（現時点では未発表）で

40

50

は、レプチン及び顆粒球コロニー刺激因子（G S C F）はG H Rと融合された場合にP K及びP Dが向上するという、G H Rが非成長ホルモンポリペプチドに及ぼす効果が開示されている。

【0006】

本開示は、P T H融合ポリペプチドに関し、受容体（例えば、同族受容体及び/またはG H R）に融合したP T HのP K及びP Dが向上するというものである。P T H融合ポリペプチドは、副甲状腺機能低下症を含めた異常なP T H活性からもたらされる状態の処置と、骨粗しょう症を含めたP T H療法の恩恵を受ける状態の処置とにおいて有用性がある。

【発明の概要】

10

【0007】

本発明の一態様によれば、融合ポリペプチドであって、副甲状腺ホルモンまたはその生物学的活性断片もしくはアナログのアミノ酸配列を含むポリペプチドと、

受容体ポリペプチドまたはその断片もしくはアナログのアミノ酸配列を含むポリペプチドとを含み、当該副甲状腺ホルモンまたはその生物学的活性断片もしくはアナログが、翻訳融合体として、直接的または間接的に、当該受容体ポリペプチドに連結している、融合ポリペプチドが提供される。

【0008】

「アナログ」とは、副甲状腺ホルモン受容体または受容体ポリペプチドアミノ酸配列バリエーションに結合する副甲状腺ホルモンを意味する。副甲状腺ホルモンアナログとしては、以下に限定されないが、副甲状腺ホルモン関連タンパク質及びそのバリエーションをコードするアミノ酸配列が挙げられる。

20

【0009】

本発明の好ましい実施形態において、当該融合ポリペプチドは、配列番号10に記載のアミノ酸配列を含むまたはそれからなる副甲状腺ホルモンを含む。

【0010】

本発明の参照される実施形態において、当該融合ポリペプチドは、アミノ酸1 - 28、1 - 29、1 - 30、1 - 31、1 - 32、1 - 33、1 - 34、または1 - 35を含む配列番号10の断片を含む。

30

【0011】

本発明の好ましい実施形態において、当該融合ポリペプチドは、配列番号9に記載の配列を含む副甲状腺ホルモンを含む。

【0012】

本発明の参照される実施形態において、当該融合ポリペプチドは、アミノ酸1 - 28、1 - 29、1 - 30、1 - 31、1 - 32、1 - 33、1 - 34、または1 - 35を含む配列番号9の断片を含む。

【0013】

本発明の好ましい実施形態において、当該融合ポリペプチドは、配列番号54に記載のアミノ酸配列を含むまたはそれからなる副甲状腺ホルモンを含む。

40

【0014】

本発明の参照される実施形態において、当該融合ポリペプチドは、アミノ酸1 - 28、1 - 29、1 - 30、1 - 31、1 - 32、または1 - 33を含む配列番号54の断片を含む。

【0015】

本発明の好ましい実施形態において、当該融合ポリペプチドは、式（I）のアミノ酸配列：

X a a 0 1 - V a l - X a a 0 3 - G l u - I l e - G l n - L e u - X a a 0 8 - H
i s - X a a 1 0 - X a a 1 1 - X a a 1 2 - X a a 1 3 - X a a 1 4 - L e u - X a a
1 6 - X a a 1 7 - X a a 1 8 - A r g - A r g - A r g - X a a 2 2 - P h e - L e u

50

- X a a 2 5 - X a a 2 6 - L e u - I l e - A l a - G l u - I l e - H i s - T h r
- A l a - G l u - I l e (配列番号 8)

((I) において、X a a 0 1 は、S e r または A l a であり、X a a 0 3 は、S e r
または A l a であり、X a a 0 8 は、M e t または L e u であり、X a a 1 0 は、A s n
、A l a、V a l、A s p、G l u、または G l n であり、X a a 1 1 は、L e u、A l a、V a l、M e t、L y s、A r g、または T r p であり、X a a 1 2 は、G l y、A l a、H i s、または A r g であり、X a a 1 3 は、L y s、A l a、L e u、G l n、A r g、H i s、または T r p であり、X a a 1 4 は、H i s、L e u、A r g、P h e、T r p、または S e r であり、X a a 1 6 は、G l n または A s n であり、X a a 1 7
は、A s p または S e r であり、X a a 1 8 は、A l a、L e u、M e t、G l u、S e r、または P h e であり、X a a 2 2 は、A l a、P h e、G l u、S e r、L e u、A s n、T r p、または L y s であり、X a a 2 5 は、H i s、A r g、L e u、T r p、または L y s であり、X a a 2 6 は、L y s、H i s、A l a、S e r、A s n、または A r g である)

を含むもしくはそれからなる副甲状腺ホルモンアナログ、または X a a 1 8 のうちの少なくとも 1 つが L e u でも M e t でもなく、X a a 2 2 が P h e ではなく、X a a 2 6 が H i s ではないことを条件に、式 (I) のアミノ酸 1 - 2 8、1 - 2 9、1 - 3 0、1 - 3 1、1 - 3 2、1 - 3 3、1 - 3 4、もしくは 1 - 3 5 を含むその断片を含む。

【 0 0 1 6 】

本発明の好ましい実施形態において、当該融合ポリペプチドは、副甲状腺ホルモンと、配列番号 3 7 に記載のアミノ酸配列を含むまたはそれからなる副甲状腺ホルモンアナログアミノ酸配列とを含む。

【 0 0 1 7 】

本発明の代替的な実施形態において、当該融合ポリペプチドは、配列番号 4 0 に記載のアミノ酸配列を含む副甲状腺ホルモン関連タンパク質またはその生物学的活性断片もしくはアナログを含む。

【 0 0 1 8 】

本発明の参照される実施形態において、当該融合ポリペプチドは、アミノ酸 1 - 2 8、1 - 2 9、1 - 3 0、1 - 3 1、1 - 3 2、1 - 3 3、1 - 3 4、または 1 - 3 5 を含む配列番号 4 0 の断片を含む。

【 0 0 1 9 】

本発明の好ましい実施形態において、当該融合ポリペプチドは、副甲状腺ホルモン細胞外ドメインを含む受容体ポリペプチドを含む。

【 0 0 2 0 】

本発明の好ましい実施形態において、当該融合ポリペプチドは、配列番号 3 に記載のアミノ酸配列を含むまたはそれからなる副甲状腺ホルモン受容体細胞外ドメインを含む。

【 0 0 2 1 】

本発明のさらに好ましい実施形態において、当該融合ポリペプチドは、配列番号 3 に記載の全長アミノ酸配列に対し 1 0 - 9 9 % 同一であるアミノ酸配列を含む副甲状腺ホルモン受容体細胞外ドメインまたはその断片を含み、当該ドメインまたは断片は、副甲状腺ホルモン、その断片またはアナログに結合する。

【 0 0 2 2 】

本発明のさらに好ましい実施形態において、当該融合ポリペプチドは、配列番号 3 に記載のアミノ酸配列に対し 1 0、1 5、2 0、3 0、4 0、5 0、6 0、7 0、8 0、8 5、9 0、9 1、9 2、9 3、9 4、9 5、9 6、9 7、9 8、または 9 9 % 同一であるアミノ酸配列を含む副甲状腺ホルモン受容体細胞外ドメインまたはその断片を含み、当該ドメインは、副甲状腺ホルモン、その断片またはアナログに結合する。

【 0 0 2 3 】

本発明の好ましい実施形態において、当該融合ポリペプチドは、副甲状腺ホルモン受容体細胞外ドメインをコードする修飾されたアミノ酸配列を含み、当該修飾は、配列番号 3

10

20

30

40

50

に記載の I 1 0 7 K、D 1 0 9 A、P 1 0 4 L、または L 1 5 9 A からなる群より選択される 1 つ以上のアミノ酸置換である。

【 0 0 2 4 】

本発明のさらに好ましい実施形態において、当該融合ポリペプチドは、配列番号 3 に記載の I 0 7 K 置換を含む副甲状腺ホルモン受容体細胞外ドメインを含む。

【 0 0 2 5 】

本発明の好ましい実施形態において、当該融合ポリペプチドは、配列番号 1 0 に記載の配列のアミノ酸残基 1 - 1 4 を含むまたはそれからなる副甲状腺ホルモンを含む。

【 0 0 2 6 】

本発明の代替的な実施形態において、当該融合ポリペプチドは、修飾された副甲状腺ホルモン受容体細胞外ドメインを含み、当該修飾は、少なくとも 1 つのアミノ酸残基の付加、欠失、または置換によるものであり、当該修飾されたポリペプチドは、副甲状腺ホルモン結合活性を実質的に欠いているか、副甲状腺ホルモン結合活性が低減している。

10

【 0 0 2 7 】

本発明の一実施形態において、受容体ポリペプチドを含む当該融合ポリペプチドは、代替的または追加的に、成長ホルモン受容体の成長ホルモン結合ドメインポリペプチドを含む。

【 0 0 2 8 】

本発明の好ましい実施形態において、当該融合ポリペプチドは、ヒト成長ホルモン受容体の細胞外成長ホルモン結合ドメインポリペプチドを含む。

20

【 0 0 2 9 】

本発明のさらに好ましい実施形態において、当該融合ポリペプチドは、配列番号 5 に記載のアミノ酸配列から構成される細胞外成長ホルモン結合ドメインポリペプチドを含む。

【 0 0 3 0 】

本発明の代替的な実施形態において、当該融合ポリペプチドは、修飾された細胞外成長ホルモン結合ドメインポリペプチドを含み、当該修飾は、少なくとも 1 つのアミノ酸残基の付加、欠失、または置換によるものであり、当該修飾されたポリペプチドは、成長ホルモン結合活性を実質的に欠いているか、成長ホルモン結合活性が低減している。

【 0 0 3 1 】

本発明の好ましい実施形態において、当該融合ポリペプチドは、配列番号 5 に記載の W 1 6 9、R 4 3、E 4 4、I 1 0 3、W 1 0 4、I 1 0 5、P 1 0 6、I 1 6 4、及び D 1 6 5 からなる群より選択されるアミノ酸残基のうちの 1 つ以上の修飾を含む。

30

【 0 0 3 2 】

本発明の好ましい実施形態において、当該融合ポリペプチドは、配列番号 5 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸残基トリプトファン 1 0 4 の欠失を含む。

【 0 0 3 3 】

本発明の代替的な実施形態において、当該融合ポリペプチドは、配列番号 5 に記載のアミノ酸配列のトリプトファン 1 0 4 の置換を含む。

【 0 0 3 4 】

本発明の好ましい実施形態において、当該融合ポリペプチドは、配列番号 7 に記載のアラニンに対するトリプトファン 1 0 4 の置換を含む。

40

【 0 0 3 5 】

本発明のさらに好ましい実施形態において、当該融合ポリペプチドは、配列番号 8 のアミノ酸残基 1 - 2 8、1 - 2 9、1 - 3 0、1 - 3 1、1 - 3 2、1 - 3 3、1 - 3 4、または 1 - 3 5 を含むまたはそれからなる副甲状腺ホルモン断片を含むまたはそれからなる。

【 0 0 3 6 】

さらに好ましい実施形態において、当該融合ポリペプチドは、配列番号 8、9、または 1 0 に記載のアミノ酸配列を含むまたはそれからなる副甲状腺ホルモンまたはそのアナログを含み、当該副甲状腺ホルモンアミノ酸配列は、少なくとも 1 つのアミノ酸残基の付加

50

、欠失、または置換によって修飾され、当該修飾された融合ポリペプチドは、副甲状腺ホルモン活性を保持する。

【0037】

さらに好ましい実施形態において、当該融合ポリペプチドは、配列番号54に記載のアミノ酸配列を含むまたはそれからなる副甲状腺ホルモンまたはそのアナログを含み、当該副甲状腺ホルモンアミノ酸配列は、少なくとも1つのアミノ酸残基の付加、欠失、または置換によって修飾され、当該修飾された融合ポリペプチドは、副甲状腺ホルモン活性を保持する。

【0038】

さらに好ましい実施形態において、当該融合ポリペプチドは、配列番号37または40に記載のアミノ酸配列を含むまたはそれからなる副甲状腺ホルモンアナログを含み、当該副甲状腺ホルモンアミノ酸配列は、少なくとも1つのアミノ酸残基の付加、欠失、または置換によって修飾され、当該修飾された融合ポリペプチドは、副甲状腺ホルモン活性を保持する。

10

【0039】

さらに好ましい実施形態において、当該融合ポリペプチドは、配列番号8、9、または10に記載のアミノ酸配列の全長に対し40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%同一である修飾されたアミノ酸配列を含む。

【0040】

さらに好ましい実施形態において、当該融合ポリペプチドは、配列番号40または37に記載のアミノ酸配列の全長に対し40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%同一である修飾されたアミノ酸配列を含む。

20

【0041】

さらに好ましい実施形態において、当該融合ポリペプチドは、配列番号54に記載のアミノ酸配列の全長に対し40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%同一である修飾されたアミノ酸配列を含む。

【0042】

本発明の好ましい実施形態において、当該融合ポリペプチドは、副甲状腺受容体ドメインポリペプチドを含み、当該副甲状腺受容体ドメインポリペプチドは、当該融合ポリペプチドのカルボキシル末端端部に位置する。

30

【0043】

本発明の代替的な実施形態において、当該融合ポリペプチドは、副甲状腺受容体ドメインポリペプチドを含み、当該副甲状腺受容体ドメインポリペプチドは、当該融合ポリペプチドのアミノ末端端部に位置する。

【0044】

本発明の代替的な実施形態において、当該融合ポリペプチドは、成長ホルモン結合ドメインポリペプチドを含み、当該成長ホルモン結合ドメインポリペプチドは、当該融合ポリペプチドのカルボキシル末端端部に位置する。

40

【0045】

本発明の一実施形態において、当該融合ポリペプチドは、成長ホルモン結合ドメインポリペプチドを含み、当該成長ホルモン結合ドメインポリペプチドは、当該融合ポリペプチドのアミノ末端端部に位置する。

【0046】

本発明の好ましい実施形態において、当該融合ポリペプチドは、配列番号12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、または36に記載のアミノ酸配列を含むまたはそれからなる。

50

【0047】

本発明の好ましい実施形態において、当該融合ポリペプチドは、配列番号15または20に記載のアミノ酸配列を含むまたはそれからなる。

【0048】

本発明の好ましい実施形態において、当該融合ポリペプチドは、配列番号42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、または53に記載のアミノ酸配列を含むまたはそれからなる。

【0049】

本発明の好ましい実施形態において、当該融合ポリペプチドは、プロペプチドを含む。

【0050】

本発明の好ましい実施形態において、当該プロペプチドは、配列番号11を含むまたはそれからなる。

【0051】

本発明の代替的な好ましい実施形態において、当該プロペプチドは、配列番号4を含むまたはそれからなる。

【0052】

本発明の好ましい実施形態において、当該融合ポリペプチドはさらに、ペプチド分泌シグナルを含む。

【0053】

本発明の好ましい実施形態において、当該融合ポリペプチドは、副甲状腺ホルモンペプチド分泌シグナルを含む。

【0054】

本発明の好ましい実施形態において、当該副甲状腺ホルモンペプチド分泌シグナルは、配列番号1に記載のアミノ酸配列を含む。

【0055】

本発明の好ましい実施形態において、当該融合ポリペプチドは、副甲状腺ホルモン関連タンパク質ペプチド分泌シグナルを含む。

【0056】

本発明の好ましい実施形態において、当該副甲状腺ホルモン関連タンパク質ペプチド分泌シグナルは、配列番号41に記載のアミノ酸配列を含む。

【0057】

本発明の代替的な実施形態において、当該融合ポリペプチドは、成長ホルモンペプチド分泌シグナルを含む。

【0058】

本発明の好ましい実施形態において、当該融合ポリペプチドは、配列番号2に記載のアミノ酸配列を含むまたはそれからなる成長ホルモン分泌シグナルを含む。

【0059】

本発明の好ましい実施形態において、当該融合ポリペプチドは、副甲状腺ホルモン、その断片またはアナログを含み、ペプチドリンカーによって当該受容体ポリペプチドに直接的または間接的に連結している。

【0060】

本発明の代替的な実施形態において、当該副甲状腺ホルモン、断片、またはアナログは、インフレーム翻訳融合として当該受容体ポリペプチドに直接的に連結している。

【0061】

好ましくは、当該ペプチドリンカーは、アミノ酸配列 Gly Gly Gly Gly Ser を含む。

【0062】

さらに好ましい実施形態において、当該ペプチドリンカーは、アミノ酸配列 Gly Gly Gly Ser を含むペプチドの1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個の繰返し単位を含む。

10

20

30

40

50

【0063】

さらに好ましい実施形態において、当該ペプチドリンカーは、アミノ酸配列 Gly Gly Gly Ser の4個の繰返し単位を含む。

【0064】

本発明のさらなる態様によれば、本発明における融合ポリペプチドをコードする核酸分子が提供される。

【0065】

本発明のさらなる態様によれば、本発明における核酸分子を含むベクターが提供される。

【0066】

本発明の好ましい実施形態において、当該ベクターは、本発明における核酸分子を発現するように適合された発現ベクターである。

【0067】

本発明における核酸(複数可)を含むベクターは、特に、安定したトランスフェクションのためにゲノムへの組換えで核酸を細胞に導入するのに使用される場合、プロモーターまたはその他の制御配列を含む必要がない。好ましくは、ベクター内の核酸は、宿主細胞における転写のための適切なプロモーターまたは他の制御エレメントに対し作用可能に連結している。ベクターは、複数の宿主内で機能する二機能性発現ベクターであり得る。「プロモーター」とは、転写開始部位の上流にあり、転写に必要とされる全ての制御領域を含有するヌクレオチド配列を意味する。好適なプロモーターとしては、真核及び原核細胞における発現のための構成的、組織特異的、誘導的、発生的、またはその他のプロモーターが挙げられる。「作用可能に連結」とは、同じ核酸分子の一部として結びついており、プロモーターから開始される転写に対し好適に配置され方向づけられていることを意味する。プロモーターに対し作用可能に連結しているDNAは、プロモーターの「転写開始制御下」にある。

【0068】

好ましい実施形態において、プロモーターは、構成的、誘導的、または制御可能なプロモーターである。

【0069】

本発明のさらなる態様によれば、本発明における核酸分子またはベクターを用いてトランスフェクションまたは形質転換された細胞が提供される。

【0070】

好ましくは、当該細胞は真核細胞である。

【0071】

本発明の好ましい実施形態において、当該細胞は、真菌細胞(例えば、*Pichia* spp、*Saccharomyces* spp、*Neurospora* spp)、昆虫細胞(例えば、*Spodoptera* spp)、哺乳類細胞(例えば、COS細胞、CHO細胞)、植物細胞からなる群より選択される。

【0072】

本発明の代替的な実施形態において、当該細胞は原核細胞である。

【0073】

本発明の一態様によれば、本発明における融合ポリペプチドの産生のための方法であって、

- i) 本発明における細胞及び細胞培地を提供することと、
 - ii) 当該細胞を培養することと、
 - iii) 当該細胞または培地から本発明における融合ポリペプチドを単離することと
- からなるステップを含む、方法が開示される。

【0074】

本発明のさらなる態様によれば、賦形剤または担体を含む本発明における融合ポリペプチドを含む薬学的組成物が提供される。

10

20

30

40

50

【0075】

本発明の好ましい実施形態において、当該薬学的組成物は、さらなる治療剤と組み合わせられる。

【0076】

投与される場合、本発明の薬学的組成物は、薬学的に許容される調製物で投与される。このような調製物は、通例的には、薬学的に許容される濃度の塩、緩衝剤、保存料、適合性の担体、及び任意選択によりその他の治療剤（例えば、化学療法剤）を含有し得る。

【0077】

本発明の薬学的組成物は、注射を含めた任意の従来の経路によって投与され得る。投与及び適用は、例えば、皮下であり得る。

10

【0078】

本発明の薬学的組成物は、有効量で投与される。「有効量」とは、単体で、またはさらなる用量の相乗的薬物と共に、所望される応答をもたらす医薬品/組成物の量である。有効量は、疾患進行の一時的な緩徐化を伴うに過ぎない場合もあるが、より好ましくは、永続的な疾患進行の停止を伴う。有効量は、通例的な方法によってモニターすることも、診断方法に従ってモニターすることもできる。

【0079】

対象に投与される薬学的組成物の用量は、種々のパラメーターに従って、特に使用する投与様式及び対象の状態（すなわち、年齢、性別）に従って、選択することができる。投与される場合、本発明の薬学的組成物は、薬学的に許容される量で、及び薬学的に許容される組成物で適用される。医薬に使用される場合、塩は薬学的に許容されるべきであるが、薬学的に許容されない塩も、その薬学的に許容される塩を調製するのに好都合に使用される場合があり、本発明の範囲から除外されない。このような薬理的及び薬学的に許容される塩としては、以下に限定されないが、以下の酸から調製される塩が挙げられる：塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸、マロン酸、酢酸、サリチル酸、クエン酸、ギ酸、マロン酸、コハク酸など。また、薬学的に許容される塩は、ナトリウム、カリウム、またはカルシウム塩などのアルカリ金属またはアルカリ土類金属として調製されてもよい。

20

【0080】

薬学的組成物は、所望される場合、薬学的に許容される担体と組み合わせることができる。本明細書で使用する「薬学的に許容される担体」という用語は、ヒトへの投与に好適な1つ以上の適合性の固体または液体の増量剤、希釈剤、またはカプセル化物質を意味する。「担体」という用語は、適用を容易にするために活性成分と組み合わせられる、天然または合成の有機成分または無機成分を示す。また、薬学的組成物の構成要素は、所望の薬学的効力を実質的に損なう相互作用が存在しないような方法で、本発明の分子と混合すること及び互いに混合することも可能である。

30

【0081】

薬学的組成物は、塩における酢酸、塩におけるクエン酸、塩におけるホウ酸、及び塩におけるリン酸を含めた好適な緩衝剤を含有し得る。また薬学的組成物は、任意選択で、ペンザルコニウム塩化物、クロロブタノール、パラベン、及びチメロサルなどの好適な保存料を含有してもよい。

40

【0082】

薬学的組成物は、単位剤形で好都合に提示することができ、薬学分野で周知されている任意の方法によって調製することができる。全ての方法は、活性薬剤を、1つ以上の補助的成分を構成する担体と連合させるステップを含む。概して、組成物は、活性化化合物を液体担体、微粉固体担体、またはこの両方と一様かつ密接に連合させ、次に、必要な場合は生成物を整形することによって調製される。

【0083】

好都合には、皮下投与に好適な組成物は、好ましくはレシピエントの血液と等張である、無菌の水性または非水性の調製物を含む。この調製物は、公知の方法に従って好適な分散剤または湿潤剤及び懸濁化剤を用いて製剤化することができる。また、無菌の注射用調

50

製物は、無毒の非経口的に許容される希釈剤または溶媒中の無菌の注射用溶液または懸濁液（例えば、1, 3 - ブタンジオール中の溶液）であってもよい。用いられてもよい許容される溶媒に含まれるものとして、水、リンガー液、及び等張塩化ナトリウム溶液がある。加えて、無菌の固定油も、溶媒または懸濁媒体として好都合に用いられる。この目的において、合成のモノグリセリドまたはジグリセリドを含めた任意の無刺激の固定油を用いることができる。加えて、オレイン酸などの脂肪酸も注射液の調製で使用することができる。皮下投与に好適な担体制剤は、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PAに見いだすことができる。

【0084】

本発明の一態様によれば、対象における副甲状腺機能低下症の処置における使用のための、本発明における融合ポリペプチドが提供される。

【0085】

本発明のさらなる態様によれば、副甲状腺機能低下症を患うヒト対象を処置する方法であって、有効量の本発明における融合ポリペプチドを投与することを含み、当該投与によって副甲状腺機能低下症を処置する、方法が提供される。

【0086】

本発明の一態様によれば、ヒト対象における骨粗しょう症の処置における使用のための、本発明における融合ポリペプチドが提供される。

【0087】

本発明のさらなる態様によれば、骨粗しょう症を患うヒト対象を処置する方法であって、有効量の本発明における融合ポリペプチドを投与することを含み、当該投与によって骨粗しょう症を処置する、方法が提供される。

【0088】

本発明の好ましい実施形態または方法において、当該融合ポリペプチドは、配列番号40に記載のアミノ酸配列を含む。

【0089】

好ましい実施形態または本発明の方法において、当該融合ポリペプチドは、炭酸カルシウム及び/またはビタミンDサプリメント、例えば、カルシトロール (calcitriol) またはアルファカルシトロール (alfacalcitriol) と組み合わせて投与される。

【0090】

本発明の好ましい実施形態または方法において、当該副甲状腺機能低下症は、甲状腺もしくは頸部の手術、自己免疫疾患、放射線療法、がん、アジソン病、またはディジョージ症候群によって引き起こされる。

【0091】

本発明の好ましい実施形態または方法において、当該融合ポリペプチドは、少なくとも1日に1回投与される。

【0092】

本発明の一実施形態または方法において、当該融合ポリペプチドは、少なくとも1週間に1回または2回投与される。

【0093】

本明細書の説明及び請求項全体において、「含む (comprise)」及び「含有する (contain)」ならびにこれらの語の変化形態、例えば、「含む (comprising)」及び「含む (comprises)」は、「以下を含むがこれに限定されない」ことを意味し、その他の部分、添加物、構成要素、整数、またはステップを除外するようには意図されていない（かつ除外しない）。

【0094】

本明細書の説明及び請求項全体において、文脈上他の意味が要求されない限り、単数形は複数形を包含する。特に、不定冠詞が使用される場合、文脈上他の意味が要求されない

10

20

30

40

50

限り、本明細書は単数だけではなく複数を企図しているものと理解されるべきである。

【0095】

本発明における特定の態様、実施形態、または例と共に説明される特徴、整数、特性、化合物、化学的部分、または化学基は、矛盾しない限り、本明細書で説明される他の任意の態様、実施形態、または例にも適用可能であると理解されるべきである。

【0096】

ここで、本発明の一実施形態が、単に例として、以下の図面を参照しながら説明される。

【図面の簡単な説明】

【0097】

【図1】PTH(残基1-34)をN末端PTH受容体ドメイン(PTHrExt)及び成長ホルモン結合タンパク質(GHBP)に連結した。GHBPは、分子量を増加させクリアランスを遅延させるように設計された不活性部分である。PTHとPTHrExtとの結合はPTHを分解から保護し、より生理的PTH曝露を生成する活性PTHと平衡下にある「不活性」PTHのプールをもたらす。分子は、PTH分泌シグナル(プロペプチドの包含を伴ってまたは伴わずに)または成長ホルモン分泌シグナルいずれかの調節下で発現し、CHO細胞株内での効率的なプロセッシングを可能にする。

【図2】精製されたタンパク質のSDS-PAGE解析。A)精製された14A1、B)精製された14A2b。タンパク質をCHO細胞株内で発現させ、Q-セファローズと抗成長ホルモン受容体親和性クロマトグラフィーとの組合せを用いて、HyClone SFM4CHO Utility培地からの分泌産物として精製した。タンパク質は、約75~100kDaにて分離し、分解の徴候を伴うことなくインタクトである。

【図3】14A1及び14A2タンパク質のin vitro生体活性。精製されたタンパク質について、PTH応答性細胞株UMR-106(ラット骨芽細胞様細胞株)からのcAMP産生を刺激する能力を試験した。試験分子の存在下で細胞を15分間刺激し、cAMP特異的Elisaを用いて細胞ライセートからcAMPレベルを測定した。PTH 1-34(100nM)、フォルスコリン(100μM)双方の陽性対照及び陰性対照(細胞のみ、緩衝液のみ、及び対照タンパク質、エリスロポエチン)を解析に含めた。データは、pmol cAMP/ml + / - 標準偏差として提示されている。

【図4】副甲状腺ホルモン、LOCUS NM_000315 834bp mRNA linear PRI 13 - JUN - 2016, DEFINITION Homo sapiens parathyroid hormone (PTH), transcript variant 1, mRNA., ACCESSION NM_000315, VERSION NM_000315.3, KEYWORDS RefSeq., SOURCE Homo sapiens (human)。a)シグナルペプチドは下線部、プロペプチドはイタリック体/小文字、成熟タンパク質(1-34)は大文字/太字。b)原配列。シグナルペプチドは下線部(116-190bp)、プロペプチドは小文字/イタリック体、成熟タンパク質は大文字/太字(209-460bp)。

【図5】融合タンパク質で使用されるPTH 1-34。a)PTH 1-34のアミノ酸配列。b)ヌクレオチド配列(102bp)、c)融合タンパク質で使用されるPTHシグナルペプチドのアミノ酸配列及びプロペプチド配列(プロペプチドは小文字/イタリック体)。d)融合タンパク質で使用されるPTHシグナルペプチドのヌクレオチド配列及びプロペプチド配列(プロペプチドは小文字/イタリック体)。

【図6】ヒト副甲状腺ホルモン受容体1。a)LOCUS NM_001184744 2007bp mRNA linear PRI 06 - OCT - 2016, DEFINITION Homo sapiens parathyroid hormone 1 receptor (PTH1R), transcript variant 2, mRNA., ACCESSION NM_001184744 VERSION NM_001184744.1, KEYWORDS RefSeq., SOURCE Homo sapiens (human)。シグナルペプチドは下線部、成熟細胞外ドメインは太字(

10

20

30

40

50

D 2 9 - L 1 8 7)。 b) シグナルペプチドは下線部、成熟細胞外ドメインは太字。

【図 7】融合タンパク質で使用される PTH 受容体細胞外ドメイン。 a) アミノ酸配列 (アミノ酸 D 2 9 - L 1 8 7)。 b) ヌクレオチド配列 (4 7 7 b p)。

【図 8】ヒト成長ホルモン結合タンパク質 (G H B P)。 a) 融合体の G H B P 部分は、アミノ酸残基 1 - 2 3 8 (細胞外ドメイン) から構成され、 W 1 0 4 A 変異を含む。 G H B P のヌクレオチド配列 (7 1 4 b p)。 b) アミノ酸配列 (アミノ酸 1 - 2 3 8)。

【図 9】GH 分泌シグナルの a) アミノ酸配列、 b) ヌクレオチド配列。

【図 10】 PTH - (g 4 s) 4 - PTHrEx - (g 4 s) 4 - G H B P (コード # 1 4 A 1)。 PTHシグナルペプチド：小文字、 PTH (アミノ酸 1 - 3 4)：大文字 / 下線部、 PTHrExt (アミノ酸 1 - 1 5 9)：太字 / 小文字、 G H B P (アミノ酸 1 - 2 3 8)：大文字、リンカー領域 (g 4 s) 4：大文字 / 太字。 a) ヌクレオチド配列、 b) タンパク質配列。

10

【図 11】 PTH - (g 4 s) 4 - PTHrExt - (g 4 s) 4 - G H B P (コード # 1 4 A 2)。 PTHシグナルペプチド及びプロペプチド：小文字、 PTH (アミノ酸 1 - 3 4)：大文字 / 下線部、 PTHrExt (アミノ酸 1 - 1 5 9)：小文字 / 太字、 G H B P (アミノ酸 1 - 2 3 8)：大文字、リンカー領域 (g 4 s) 4：大文字 / 太字。 a) ヌクレオチド配列、 b) タンパク質配列。

【図 12】 PTH - (g 4 s) 4 - PTHrExt - (g 4 s) 4 - G H B P (コード # 1 4 A 3)。 GHシグナルペプチド：小文字、 PTH (アミノ酸 1 - 3 4)：大文字 / 下線部、 PTHrExt (アミノ酸 1 - 1 5 9)：小文字 / 太字、 G H B P (アミノ酸 1 - 2 3 8)：大文字、リンカー領域 (g 4 s) 4：大文字 / 太字。 a) ヌクレオチド配列、 b) タンパク質配列。

20

【図 13】 PTH - (g 4 s) 4 - G H B P (コード # 1 4 A 4)。 GHシグナルペプチド：小文字、 PTH (アミノ酸 1 - 3 4)：大文字 / 下線部、 G H B P (アミノ酸 1 - 2 3 8)：大文字、リンカー領域 (g 4 s) 4：大文字 / 太字。 a) ヌクレオチド配列、 b) タンパク質配列。

【図 14】 PTH - (g 4 s) 4 - PTHrExt__Hist (コード # 1 4 A 5 __Hist)。 GHシグナルペプチド：小文字、 PTH (アミノ酸 1 - 3 4)：大文字 / 下線部、 PTHrExt (アミノ酸 1 - 1 5 9)：小文字 / 太字、リンカー領域 (g 4 s) 4：大文字 / 太字、 C 末端 6 x Hist タグ：大文字 / 下線部。 a) ヌクレオチド配列、 b) タンパク質配列。

30

【図 15】 PTH - (g 4 s) 4 - PTHrExt (コード # 1 4 A 5)。 GHシグナルペプチド：小文字、 PTH (アミノ酸 1 - 3 4)：大文字 / 下線部、 PTHrExt (アミノ酸 1 - 1 5 9)：小文字 / 太字、リンカー領域 (g 4 s) 4：大文字 / 太字。 a) ヌクレオチド配列、 b) タンパク質配列。

【図 16】 PTH - (g 4 s) 4 - PTHrExt__Hist (コード # 1 4 A 6 __Hist)。 PTHシグナルペプチド及びプロペプチド：小文字、 PTH (アミノ酸 1 - 3 4)：大文字 / 下線部、 PTHrExt (アミノ酸 1 - 1 5 9)：小文字 / 太字、リンカー領域 (g 4 s) 4：大文字 / 太字、 C 末端 6 x Hist タグ：大文字 / 下線部。 a) ヌクレオチド配列、 b) タンパク質配列。

40

【図 17】 PTH - (g 4 s) 4 - PTHrExt__Hist (コード # 1 4 A 6)。 PTHシグナルペプチド及びプロペプチド：小文字、 PTH (アミノ酸 1 - 3 4)：大文字 / 下線部、 PTHrExt (アミノ酸 1 - 1 5 9)：小文字 / 太字、リンカー領域 (g 4 s) 4：大文字 / 太字。 a) ヌクレオチド配列、 b) タンパク質配列。

【図 18】 PTH - (g 4 s) 4 - G H B P (コード # 1 4 A 7)。 PTHシグナルペプチド及びプロペプチド：小文字、 PTH (アミノ酸 1 - 3 4)：大文字 / 下線部、 G H B P (アミノ酸 1 - 2 3 8)：大文字、リンカー領域 (g 4 s) 4：大文字 / 太字。 a) ヌクレオチド配列、 b) タンパク質配列。

【図 19】 PTH - (g 4 s) 4 - PTHrExt (I 1 3 5 K) - (g 4 s) 4 - G H B P (コード # 1 4 A 8)。 PTHシグナルペプチド及びプロペプチド：小文字、 PTH

50

(アミノ酸 1 - 34) : 大文字 / 下線部、PTHrExt (アミノ酸 1 - 159) : 小文字 / 太字 (I 135K 変化は下線付き)。GHBP (アミノ酸 1 - 238) : 大文字、リンカー領域 (g 4 s) 4 : 大文字 / 太字。a)ヌクレオチド配列、b)タンパク質配列。

【図 20】PTH - (g 4 s) 4 - GHBP (コード # 14A9)。GHシグナルペプチド : 小文字、PTH (アミノ酸 1 - 34) : 大文字 / 下線部、PTHrExt (I 135K) (アミノ酸 1 - 159) : 小文字 / 太字 (I 135K 変化は下線付き)、GHBP (アミノ酸 1 - 238) : 大文字、リンカー領域 (g 4 s) 4 : 大文字 / 太字。a)ヌクレオチド配列、b)タンパク質配列。

【図 21】PTH - (g 4 s) 4 - PTHrExt (I 135K) - Hist (コード # 14A10)。PTHシグナルペプチド : 小文字、PTH (アミノ酸 1 - 34) : 大文字 / 下線部、PTHrExt (I 135K) (アミノ酸 1 - 159) : 小文字 / 太字 (I 135K 変化は下線付き)、リンカー領域 (g 4 s) 4 : 大文字 / 太字、C末端 6 x Hist タグ : 大文字 / 下線部。a)ヌクレオチド配列、b)タンパク質配列。

【図 22】PTH - (g 4 s) 4 - PTHrExt (I 135K) - Hist (コード # 14A11 - Hist)。GHシグナルペプチド : 小文字、PTH (アミノ酸 1 - 34) : 大文字 / 下線部、PTHrExt (I 135K) (アミノ酸 1 - 159) : 小文字 / 太字 (I 135K 変化は下線付き)、リンカー領域 (g 4 s) 4 : 大文字 / 太字、C末端 6 x Hist タグ : 大文字 / 下線部。a)ヌクレオチド配列、b)タンパク質配列。

【図 23】PTH 配列 (アミノ酸 1 - 84)。

【図 24】配列番号 40 : PTHrP (1 - 36)。

【図 25】配列番号 41 : PTHrPシグナル配列。

【図 26】配列番号 4 : PTHrPプロペプチド。

【図 27】PTH 融合分子の構造を示す図解モデル。1A : PTHrExt (緑色) に連結している PTH (紫色) が、今度は GHBP (橙色) に連結する。リンカーは灰色の線で示されている。W104A 変化は、GHBP 上に青色で示されている。PTHrExt に結合した PTH (不活性状態 : A) と放出され PTHR1 に結合可能な PTH (活性状態 : B) との間に平衡状態が存在すると仮定されている。1B : GHBP (橙色) に連結している PTH (紫色)。リンカーは灰色の線で示されている。W104A 変化は、GHBP 上に青色で示されている。

【図 28】非還元条件下での 10% SDS-PAGE による精製された PTH 融合分子の解析 (クーマシー染色)。図 2A : レーン 1 : 5 μ g の 14A2c。レーン 2 : 5 μ g の 14A3b。14A2c (PTH プレプロペプチドを含有) は、60 - 100 kDa から 2 本の拡散したバンドとして分離する。14A3b (GHss) は、約 75 - 100 kDa の 1 本の拡散したバンドとして分解する。図 2B : レーン 3 : 6 μ g の 14A7。レーン 4 : 3 μ g の 14A4。タンパク質は 90% 超の純度と判定。1 リットルのローラボトル培養装置から精製タンパク質、約 10 mg の 14A2c、約 4 mg の 14A3b、1.42 mg の 14A7、及び 0.29 mg の 14A4 が得られた。C : 抗 PTH 14A2 及び 14A3b のウェスタンブロット。非還元条件下での 10% SDS-PAGE による精製された PTH 融合分子の解析。試料を PVDF メンブレンに移し、抗ヒト PTH (1 - 34) 特異的抗体でプローブした。レーン 1 - 3 : 125 ng、250 ng、及び 500 ng のローディングにおける 14A2c。レーン 4 - 6 : 125 ng、250 ng、及び 500 ng のローディングにおける 14A3b。14A2c は、抗 PTH 抗体による検出に対する感受性がより高い。3 つの独立したウェスタンブロット実験を代表するもの。

【図 29 - 1】A : cAMP の *in vitro* 誘導。UMR - 106 細胞を、37 / 5% CO₂ にて 15 分間、500 nM の PTH 融合体または 100 nM のヒト PTH 1 - 34 のいずれかに曝露した。細胞を溶解し、R & D systems Parameter cAMP Elisa を用いて cAMP レベルを測定した。データは、log pmol cAMP / ml \pm SD として提示されている。14A2 において、14A3b の 11 倍の cAMP レベル増加が見られ、平均 \pm SD は 264 \pm 12 に対し 25 \pm 0

10

20

30

40

50

．95 pmol cAMP/mlであった。いずれの融合体も、PTH 1-34（平均±SDは2551±186 pmol cAMP/ml）と比較すると生物学的活性の低減を示した。二重反復で行ったn=1実験の平均。B：cAMP活性についてのデュアルルシフェラーゼレポーターアッセイ。UMR-106細胞に対し、レポータープラスミドpGL4.29/CRE/Luc2/Hygro及びトランスフェクション対照プラスミドpRL(Renilla)を用いてトランスフェクションし、37/5% CO₂にて5時間、PTH融合体またはヒトPTH 1-34のいずれかに曝露した。細胞を溶解し、Promegaデュアルルシフェラーゼレポーターアッセイキットを用いてルシフェラーゼ活性を測定した。データは、対照±SDの誘導倍数として提示されている。14A2cは、14A3bよりも生物活性が高く、100nM及び500nMにおいてそれぞれ約1.3から1.6倍の増加に等しい。平均誘導倍数±SDは、16.5±1.7、63±5.9に対し12.4±1.0、40.3±3.1である。三重反復の値の平均。いずれの融合体も、100nMの当量濃度におけるPTH 1-34（平均±SDは67.3±1.6）と比較すると生物学的活性の低減を示した。3つの別々の実験を代表するもの。

10

【図29-2】C：4つ全てのPTH融合分子のcAMP活性比較のためのデュアルルシフェラーゼレポーターアッセイ。UMR-106細胞に対し、レポータープラスミドpGL4.29/CRE/Luc2/Hygro及びトランスフェクション対照プラスミドpRL(Renilla)を用いてトランスフェクションし、37/5% CO₂にて5時間、PTH融合体またはヒトPTH 1-34のいずれかに曝露した。細胞を溶解し、Promegaデュアルルシフェラーゼレポーターアッセイキットを用いてルシフェラーゼ活性を測定した。データは、対照±SDの誘導倍数として提示されている。活性のパターンは、PTHに対する14A2c及び14A3bについての先のアッセイと同様である。いずれのPTH-GHBP融合分子も（14A4は49±4.17、14A7は44±0.42）、100nMにおけるPTH-PTHrExt-GHBP融合分子（14A2cは15±0.09、14A3bは7.7±3.13）よりも活性が高い。100nMにおいて、14A4及び14A7の両方がPTH（54±2.7）に匹敵する活性を有する。D：デュアルルシフェラーゼレポーターアッセイを用いたPTH及びPTH融合体におけるEC₅₀値の定量。PTHは、32±10.67nMのEC₅₀を有し（n=4実験）、14A2c（EC₅₀=579±138nM、n=3実験）よりも約18倍強力であり、14A3b（EC₅₀=896nM、n=1）よりも28倍強力であり、14A7（EC₅₀=153nM、n=1実験）よりも4.7倍強力である。

20

30

【0098】

コード (配列番号)	分子の説明
14A1 (12)	PTHss-PTH-(g4s)4-PTHrExt-(g4s)4-GHBP
14A2 (13)	PTHss-pp-PTH-(g4s)4-PTHrExt-(g4s)4-GHBP
14A3 (14)	GHss-PTH-(g4s)4-PTHrExt-(g4s)4-GHBP
14A4 (15)	GHss-PTH-(g4s)4-GHBP
14A5 (16)	GHss-PTH-(g4s)4-PTHrExt
14A5_Hist (17)	GHss-PTH-(g4s)4-PTHrExt-Hist
14A6_Hist (18)	PTHss-pp-PTH-(g4s)4-PTHrExt-Hist
14A6 (19)	PTHss-pp-PTH-(g4s)4-PTHrExt
14A7 (20)	PTHss-pp-PTH-(g4s)4-GHBP
14A8 (21)	PTHss-pp-PTH-(g4s)4-PTHrExt (I135K) - (g4s)4-GHBP
14A9 (22)	GHss-PTH-(g4s)4-PTHrExt (I135K) - (g4s)4-GHBP
14A10_Hist (23)	PTHss-pp-PTH-(g4s)4-PTHrExt (I135K) -Hist
14A11_Hist (24)	GHss-pp-PTH-(g4s)4-PTHrExt (I135K) -Hist
14A12 (25)	PTHss-pp-LA:PTH-(g4s)4-PTHrExt-(g4s)4-GHBP
14A13 (26)	GHss-LA:PTH-(g4s)4-PTHrExt-(g4s)4-GHBP
14A15 (27)	PTHss-pp-LA:PTH-(g4s)4-GHBP
14A16 (28)	GHss-LA:PTH-(g4s)4-GHBP
14A17 (29)	PTHss-pp-LA:PTH-(g4s)4-PTHrExt-Hist
14A18 (30)	GHss-LA:PTH-(g4s)4-PTHrExt-Hist
14A19 (31)	PTHss-pp-PTH(1-84) - (g4s)4-PTHrExt-(g4s)4-GHBP
14A20 (32)	GHss-PTH(1-84) - (g4s)4-PTHrExt-(g4s)4-GHBP
14A21 (33)	PTHss-pp-PTH(1-84) - (g4s)4-

10

20

30

40

	G H B P
1 4 A 2 2 (3 4)	G H s s - P T H (1 - 8 4) - (g 4 s) 4 - G H B P
1 4 A 2 3 (3 5)	P T H s s - p p - P T H (1 - 8 4) - (g 4 s) 4 - P T H r E x t - H i s t
1 4 A 2 4 (3 6)	G H s s - P T H (1 - 8 4) - (g 4 s) 4 - P T H r E x t - H i s t

10

表 1

P T H s s = 副甲状腺ホルモン分泌シグナル； p p = プロペプチド； G H s s = 成長ホルモン分泌シグナル； P T H = (記載通りのアミノ酸 1 - 3 4 もしくは 1 - 8 4 またはその断片)； P T H r E x t = P T H 受容体細胞外ドメイン； G H B P = 成長ホルモン結合タンパク質 (アミノ酸 1 - 2 3 8)； (g 4 s) 4 = アミノ酸 G G G G S の 4 つのリピート； H i s t タグ = H H H H H H； I 1 3 5 K = P T H r E x t におけるイソロイシン - 1 3 5 からリジンへの変異； L A : P T H = 長時間作用性 P T H [テキストに記載されているような P T H 1 - 1 4 と P T H r P との融合体]。

【 0 0 9 9 】

上記の融合体におけるリンカー領域は、 G G G G S の繰返しから構成されている。表 1 に示される例では、リンカー領域は 4 x G G G G S から構成されているが、様々な繰返しが使用されてもよい。

20

【 0 1 0 0 】

選択されたコンストラクトにおける P T H r E x t に存在する I 1 3 5 K 変化は、受容体に対する P T H の結合を低減することが示された。 D 1 3 7 A、 P 1 3 2 L、及び L 1 8 7 A などの他のアミノ酸変化も、組み合わせるまたは単一の点変異として使用され得る (配列番号 5 6)。

【 0 1 0 1 】

下記の配列における P T H r E x t のナンバリングは、アラニン 2 8 にてプロセシングされた成熟タンパク質を意味し、そのため、 D 2 9 - I 1 8 7 は、以下の配列においてアミノ酸 1 - 1 5 9 (配列番号 3) と呼ばれる。

30

【 0 1 0 2 】

上記の P T H 配列の全ては、所望される場合は P T H 1 - 8 4 及びその可変物で置き換えられてもよい。

表 2 : 提唱される全ての P T H r P 融合コンストラクトの一覧 (配列番号 4 2 - 5 3)

	分子の説明
14A25 (42)	PTHrPss - pp - PTHrP - (g4s)4 - PTHrExt - (g4s)4 - GHBP
14A26 (43)	GHss - PTHrP - (g4s)4 - PTHrExt - (g4s)4 - GHBP
14A27 (44)	GHss - PTHrP - (g4s)4 - GHBP
14A28 (45)	GHss - PTHrP - (g4s)4 - PTHrExt
14A29__Hist (46)	GHss - PTHrP - (g4s)4 - PTHrExt - Hist
14A30__Hist (47)	PTHrPss - pp - PTHrP - (g4s)4 - PTHrExt - Hist
14A31 (48)	PTHrPss - pp - PTHrP - (g4s)4 - PTHrExt
14A32 (49)	PTHrPss - pp - PTHrP - (g4s)4 - GHBP
14A33 (50)	PTHrPss - pp - PTHrP - (g4s)4 - PTHrExt (I135K) - (g4s)4 - GHBP
14A34 (51)	GHss - PTHrP - (g4s)4 - PTHrExt (I135K) - (g4s)4 - GHBP
14A35__Hist (52)	PTHrPss - pp - PTHrP - (g4s)4 - PTHrExt (I135K) - Hist
14A36__Hist (53)	GHss - pp - PTHrP - (g4s)4 - PTHrExt (I135K) - Hist

10

20

30

PTHrPss = 副甲状腺ホルモン関連タンパク質分泌シグナル; pp = プロペプチド; GHss = 成長ホルモン分泌シグナル; PTHrP = (アミノ酸1 - 36またはその断片); PTHrExt = PTH受容体細胞外ドメイン; GHBP = 成長ホルモン結合タンパク質 (アミノ酸1 - 238); (g4s)4 = アミノ酸GGGSの4つのリピート; Histタグ = HHHHHH; I135K = PTHrExtにおけるイソロイシン - 135からリジンへの変異

表3 配列番号の概要

配列番号	名称	
1	PTHシグナルペプチド：MIPAKDMAKVMIVMLAICFLT KSDG	
2	GH分泌シグナル：MATGSRTSLLLAFLGLLCLPWLQEGSA	
3	PTH受容体ECO (1-159)： DDVMTKEEQIFLLHRAQAQCEKRLKEVLQRPASIMESDKGWTSASTSGKPRKDK ASGKLYPESEEDKEAPTGSRYRGRPCLEWDHILCWPLGAPGEVVAVPCPDYIY DFNHKGHAYRRCDRNGSWELVPGHNRTWANYS ECVKFLTNETREREVFDRL	10
4	PTHrPプロペプチド：rsvegl srll	
5	GH受容体ECO (1-238)： FSGSEATAAILS SRAPWSLQSVN PGLKTNSSKEPKFTKCRSPERETF SCHWTDEV HHGTKNLGPIQLFYTRRNTQEWTQEWKECPDYVSAGENSCYFNSSFTSIWIPYCI KLTSNGGTVD EKCFSVDEIVQDP PPIALNWTLN VSLTGIHADIQVRWEAPRNADI QKGWMVLE YELQYKEVNETKWK MMDPILTTSPV VYSLKVDKEYEVRVRSKQRN SGNYGEFSEVLYVTLPQMSQ	
7	GH ECO置換：w104a置換 FSGSEATAAILS SRAPWSLQSVN PGLKTNSSKEPKFTKCRSPERETF SCHWTDEV HHGTKNLGPIQLFYTRRNTQEWTQEWKECPDYVSAGENSCYFNSSFTSI AI PYCI KLTSNGGTVD EKCFSVDEIVQDP PPIALNWTLN VSLTGIHADIQVRWEAPRNADI QKGWMVLE YELQYKEVNETKWK MMDPILTTSPV VYSLKVDKEYEVRVRSKQRN SGNYGEFSEVLYVTLPQMSQ	20
8	PTH式 (I)：一般的アミノ酸式 (1-36)	
9	PTH 1-84： SVSEIQLMHN LGKHLNSMER VEWLRK KLQDVHNF VALGAPLAPRDAGSQRPR KK EDNVLVESHEKSLGEADKADVN VLTKAKSQ	
10	PTH定義式 (I)：Ala-Val-Ala-Glu-Ile-Gln -Leu-Met-His-Gln-Arg-Ala-Lys-Trp -Ile-Gln-Asp-Ala-Arg-Arg-Arg-Ala -Phe-Leu-His-Lys-Leu-Ile-Ala-Glu -Ile-His-Thr-Ala-Glu-Ile、または当該配列 (1-36)のアミノ酸1-28、1-29、1-30、1-31、1- 32、1-33、1-34、もしくは1-35を含めたその断片。	30
11	PTHプロペプチド：ksv kk r	
12-36	表1のコンストラクト	
37	PTHショート (LA PTH)：LA-PTH ([Ala1、3、12、 Gln10、Arg11、Trp14] PTH (1-14) / [Ala1 8、22、Lys26] PTHrP (15-36) COOH)	40
40	PTHrP (1-36)： AVSEHQLLHDKGKSIQDLRRRFFLHHLIAEIHTAEI	
41	PTHrPシグナル配列：MQRRLVQQWSVAVFLLSYAVPSCG	
42-	表2のコンストラクト	

5 3		
5 4	P T H 1 - 3 4 : SVSEIQLMHNLGKHLNSMERVEWLRKKLQDVHNF	
5 5	P T H E C O シ グ ナ ル ペ プ チ ド : MGTARIAPGLALLLCCPVLSSAYALVDA	
5 6	P T H 受容体全長 : MGTARIAPGLALLLCCPVLSSAYALVDADDVMTKEEQIFLLHRAQAQCEKRLKEVL QRPASIMESDKGWTSASTSGKPRKDKASGKLYPESEEDKEAPTGSRYRGRPCL PEWDHILCWPLGAPGEWVAVPCPDYIYDFNHKGHAYRRCRNGSWELVPGHNR TWANYSECVKFLTNETREREVDFRLGMIYTVGYSVSLASLTVAVLILAYFRRLHCT RNYIHMHLFLSFMLRAVSIFVKDAVLYSGATLDEAERLTEEELRAIAQAPPPATAA AGYAGCRVAVTFFLYFLATNYYWILVEGLYLHSLIFMAFFSEKKYLWGFTVFGWG LPAVFVAVWWSVRATLANTGCWDLSSGNKKWIIQVPILASIVLNFILFINIVRVLATK LRETNAGRCDRQQYRKLKSTLVLMLPLFGVHYIVFMATPYTEVSGTLWQVQMH YEMLFNSFQGGFFVAIYCFCNGEVQAEIKKSWSRWTLALDFKRKARSGSSSYSG PMVSHTSVTNVGPRVGLGLPLSPRLLPTATTNGHPQLPGHAKPGTPALETLETP PAMAAPKDDGFLNGSCSGLDEEASGPERPPALLQEEWETVM	10
5 7	配列番号 1、11、及び 9 の融合体	
5 8	配列番号 57 をコードする DNA 配列	
5 9	配列番号 59 をコードする DNA 配列	20
6 0	配列番号 1 及び 11 の融合体	
6 1	配列番号 60 をコードする DNA 配列	
6 2	配列番号 56 をコードする DNA 配列	
6 3	配列番号 3 をコードする DNA 配列	
6 4	配列番号 7 をコードする DNA 配列	
6 5	配列番号 2 をコードする DNA 配列	
6 6	配列番号 12 をコードする DNA 配列	
6 7	配列番号 13 をコードする DNA 配列	30
6 8	配列番号 14 をコードする DNA 配列	
6 9	配列番号 15 をコードする DNA 配列	
7 0	配列番号 17 をコードする DNA 配列	
7 1	配列番号 16 をコードする DNA 配列	
7 2	配列番号 18 をコードする DNA 配列	
7 3	配列番号 19 をコードする DNA 配列	
7 4	配列番号 20 をコードする DNA 配列	
7 5	配列番号 21 をコードする DNA 配列	40
7 6	配列番号 22 をコードする DNA 配列	
7 7	配列番号 23 をコードする DNA 配列	
6	配列番号 24 をコードする DNA 配列	

【 0 1 0 3 】

材料及び方法

P T H 融合体の構築 : 遺伝子合成 (Eurofin MWG) と標準的な DNA 操作技法との組合せによって分子を構築した。全長 P T H 融合体をコードする組換え遺伝子を、

修飾された哺乳類発現プラスミド、pSecTag/FRTN5/Hist-TOPO (Invitrogen)にクローニングした。CHO Flp-In細胞株 (Invitrogen)において、製造業者の指示に従って安定した細胞株を産生し、Hyclone SFM4CHO Utility (Thermo Scientific)における無血清培地に適合させた。PTH融合体を、PTHまたはGHシグナルペプチドのいずれかの分泌発現下においた。

【0104】

発現及び精製：ローラーボトル培養装置内のHyclone SFM4CHO Utility培地中で細胞を維持し、2～3日ごとに継代させ、細胞密度を 0.25×10^6 生細胞/ml (VCPM)から 1.5×10^6 VCPMの間に保った。発現試験のために、ローラーボトルを 0.5×10^6 VCPMにて播種し、37、5% CO₂にて成長させ、 1×10^6 VCPMに到達させた。バルブロ酸を添加して2mMの最終濃度とし、温度を31に低減した。細胞を最大8～10日間成長させ、22,000xgでの遠心分離をBeckman JLA 16-25ローターを用いて4にて20分行って採取物を清澄化したところ、生存率は依然約70%であった。EDTA及びベンズアミジン-HClを添加して、最終濃度をそれぞれ5mM及び10mMとし、Vivaflow 200タンジェンシャルフロー濃縮装置を用いて培地を濃縮し、-20にて冷凍保管した。アニオン交換(Q-セファロースFF、GE Healthcare)及びアフィニティークロマトグラフィー(抗GHBP抗体カラム)により、この濃縮物から標的タンパク質を精製した。Bradfordタンパク質アッセイによってタンパク質濃度を測定し、非還元条件下でSDS-PAGEによって試料を解析し、クーマシーブルーで染色するか、または市販の抗PTH 1-34抗体(Abeam 14493)もしくは内製の抗GHBP抗体を用いてウェスタンブロットを行った。精製した試料を分割し、-80にて保管した。

10

20

【0105】

in vitro生物活性：精製されたタンパク質について、PTH応答性細胞株UMR-106(ラット骨芽細胞様細胞株)からのcAMP産生を刺激する能力を試験した。試験分子の存在下で細胞を15分間刺激し、cAMP特異的Elisa(R&D systems)を用いて細胞ライセートからcAMPレベルを測定した。

30

【0106】

副甲状腺機能低下症の動物モデル

Shimizu et al.は、LA-PTにおける研究で副甲状腺機能低下症の動物モデルを使用した。このモデルでは、ラットに対し、処置の前に甲状腺副甲状腺摘出(TPTX)を行った。簡潔に述べると、Charles River Laboratories Japan, Inc.から取得した6週齢のラットに外科的TPTXを実施した。手術後、1.10%のカルシウム及び1.09%のリン酸塩を含有するペレット飼料(CE-2;CLEA Japan, Inc., Tokyo, Japan)を水道水で湿らせたものを、偽手術ラット及びTPTXラットにおいてアクセス及び消化がしやすいように各ケージ内で供給した。TPTX手術から5日後に8.0mg/dL未満のsCaレベルを示した手術後ラットを、翌日からの後続のペプチド注射試験用に選定した。

40

【0107】

実施例1

PTH及びNDメインPTH受容体の結晶構造解析[1]から、PTHが、N末端受容体部分によって形成された溝の中に位置することが示されている。この相互作用様式が、PTHを分解から保護し、PTHの「不活性プール」を創出することでPTHの生物学的活性を持続させて長時間作用性のPTHを創出すると仮定されている。新規分子(図1を参照)は、PTH(残基1-34)、N末端PTH受容体ドメイン(PTHrExt、最も一般的には残基D29-L187、ただしその他の組合せに制限されない)、及び成長ホルモン結合タンパク質(GHBP、残基1-238)の間の融合体となることが提唱される。GHBPは、Mwを増加させ、そのためクリアランスを遅延させるように設計され

50

た不活性部分である。GHBPは、循環におけるGHとの相互作用を予防するためのW104A変異を含有する。

【0108】

実施例2

初期発現研究から、さらなる進行の根拠となるのに十分なレベル(約10mg/L)でCHO細胞株からPTH融合分子を発現及び精製できることが示された。全ての分子は、インタクトでありSDS-PAGEによる判定で95%超の純度と思われる。

【0109】

これまでに試験したPTH融合分子はいずれも、生物学的活性であり、*in vitro*のcAMPアッセイにおいて用量応答をもたらす。

10

【0110】

実施例3

PTH 1-34を、PTH受容体の細胞外ドメイン(PTH_{ext}R)を伴ってまたは伴わずに、成長ホルモン結合タンパク質(GHb_p)と融合させた。次に、分子をGH(GH_{ss})またはPTH(PTH_{ss})シグナル配列のいずれか及びプロペプチド(pp)と共に発現させた。このようにして、以下の4つの分子が生成された。

- ・14A2c = PTH_{ss} - pp - PTH(1-34) - (g4s)₄ - PTH_{ext} - (g4s)₄ - GHb_p (配列番号13)
- ・14A3b = GH_{ss} - PTH(1-34) - (g4s)₄ - PTH_{ext} - (g4s)₄ - GHb_p (配列番号14)
- ・14A4 = GH_{ss} - PTH(1-34) - (g4s)₄ - GHb_p (配列番号15)
- ・14A7 = PTH_{ss} - pp - PTH(1-34) - (g4s)₄ - GHb_p (配列番号20)

20

【0111】

4つ全ての分子に対する安定したクローンを生成し、全ての安定したクローンはタンパク質を発現し、4つ全てのタンパク質をGPbpについてアフィニティーカラムで精製した。GH_{ss}を用いた分子はより低いレベルで発現しており、SDS-PAGE解析及びバイオアッセイからは、N末端における追加のアミノ酸による翻訳産物の不十分なプロセシングと、場合によっては、PTH_{ss}を用いた分子と比べてのGH_{ss}を用いた分子における差次的なグリコシル化とが存在し得ることが示唆される。(図28)このことは、PTHが、プレプロPTH配列を完全にプロセシングするのにそれ自身のシグナル配列を必要とすることと適合し、これはPTH_{ss}を伴う分子の設計には含まれている。全ての分子は、使用した2つのバイオアッセイにおいて生物活性を示しており、エビデンスからは、PTH_{ext}Rを含む分子はより生物活性が低いことが示唆される(図29及び30)。

30

【0112】

PTH融合分子：設計及び仮説

副甲状腺ホルモン(PTH)は、84アミノ酸のペプチドであり、生物学的活性は残基1-34に存在する。PTHは、低い血清カルシウムレベルに应答して副甲状腺により産生される。PTHは、骨及び腎臓上の副甲状腺受容体(PTH_R1)上で作用し、骨からのカルシウム放出を促進し、腎臓からのカルシウム排泄を緩徐化し、腸からの吸収を増加させ、リン酸の腎排泄を促進する。副甲状腺機能低下症(HypoPT)では、副甲状腺は存在しないかまたは損傷しており、そのため、副甲状腺ホルモンを全く産生することができないか、または十分な量を産生することができない。初期的な処置は、経口のカルシウム及び活性VD3のサプリメントを用いる。最近、HypoPTにおいてNatpara(PTH 1-84)によるPTHの置換えが認可されたが、毎日の皮下注射が必要とされ、またカルシウムレベルの変動を併発する。持続ポンプ療法が有効であるが、ほとんどの患者にとっては実際的なものではない。そのため、一定の生理的レベルのPTH活性をもたらす長時間作用性のPTH分子に対するアンメットニーズが存在する。以前、発明者らは、成長ホルモンとその結合タンパク質(GHBP)との融合体が長時間作用性の成

40

50

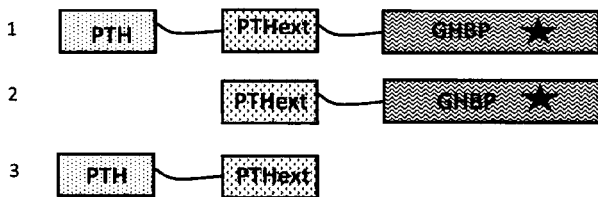
長ホルモンを生成し得ることを示した(1)。この技術を用いて、発明者らは複数のPTH融合分子を生成した(図1A及びBを参照)。PTH融合体は、タンパク質サイズが増加したことによって持続性の循環半減期を有し、その一方で生物学的活性を保持すると予測される。図1Aに示されているPTH融合体のさらなる変更形態として、PTHが、PTHrExtとの分子内相互作用を形成し、分解から保護され、活性PTHの血管内プールをもたらすことが仮定される。GH結合を予防するために、GHBP部分におけるトリプトファン104からアラニンへの単一のアミノ酸変化(W104A)が全てのPTH融合分子に導入されることになる。全てのPTH融合体は、天然存在のPTHプレプロペチド配列またはGH分泌シグナルを用いて発現することになる。

【0113】

参考文献

Shimizu, M., et al., Pharmacodynamic Actions of a Long-Acting PTH Analog (LA-PTH) in Thyroparathyroidectomized (TPTX) Rats and Normal Monkeys. J Bone Miner Res, 2016. 31(7): p. 1405-12

【図1】



【図2】

A: 精製された14A1

KDa
100
75
50
37
25
20



SDS-PAGE解析:
クーマシー染色ゲル

1. 標準物質
2. 1 μgのタンパク質
3. 2 μgのタンパク質
4. 4 μgのタンパク質
5. 8 μgのタンパク質

B: 精製された14A2b

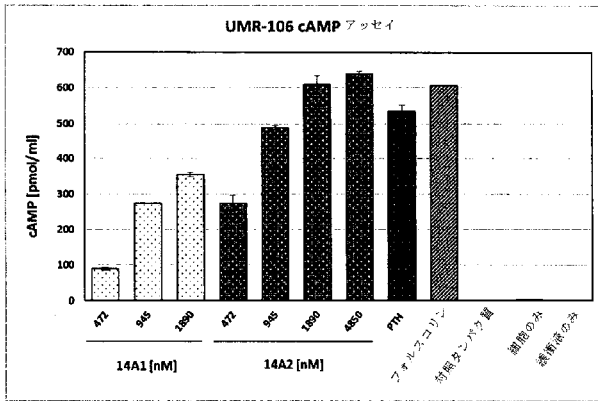
KDa
100
75
50
37
25
20



SDS-PAGE解析:
クーマシー染色ゲル

1. 1.10 μgのタンパク質
2. 標準物質

【 図 3 】



【 図 4 】

a) (配列番号 1、11、及び9) 配列番号 5 7

```

MI PAKDKMKVIMVLAICFLTKSDGksvkr:SVSEIQLHNLGKHLNLSMERVEWLRKKLQDVHNFVALGAFAPDRASSQRER
KRENVLVESHEKSLGACKADVVNLTKASQ

```

b) 配列番号 5 8

```

1 AAAAGTCACC ATTTAAGCGG TCTGCAGTCC AATTCAATGAC TTGTCTTTAG TTTACTCAGC
61 ATCAGCTACT AACATACCTG AACGAGATC TTGTTCTAAG ACATTTGTATG TGAAGATGAT
121 ACTCGAARA GACAGGCTTA AAGTATGAT TGTCTATTTG GCAATTTGTT TTCTTACAA
181 ATCGGATGGG aaatctgta agaagagcpc TGTGATGAA ATACAGCTTA TGCATAACT
241 GGGAAACAT CTGACCTGGA TGGAGAGAT AGAATGCGTG CTAAGAAAGC TGCAGGATGT
361 GCACAATTT GTTGCCTTG GAGCTCTCT AGCTCCAGA GATGCTGTT CCCAGAGCC
361 CCGAAAAAG GAAGCAATG TCTTGGTTGA GACCATGAA AAAAGTCTTG GAGAGCCAGA
421 CAAAGCTGAT GTGAATGAT TAACATAAG TAAATCCAG TGAATGAA AACAGATTT
461 CTCAGATTC TGCTTAGAC AGTGAAGGC AACATACAT GCTGCTAAT CAAAGCTTA
561 TTACATTC CAGTCCAA TATTCTGAT ATACAAAT ACCTGATTC CATGCTTGC
601 CATGTAAC GCATTTAA TTGATATC TGATTCAT TTTATCAT TGAGTATTT
661 TAATATCT TTCTATTT TATCTTTT AAATGATG ATTGCATAT TTAATAAAGA
721 ATAAATGC ACTTTAAC CTCCTTCA CCTTAAATG TAAACAAA ATGTAATGAT
781 CATAAGTCA AATAAATGAA GTATTCTCA CTCATTCGAA GTAAAAAAA AAAA

```

【 図 5 】

a) (配列番号 5 4) SVSEIQLHNLGKHLNLSMERVEWLRKKLQDVHNF

b) 配列番号 5 9

```

TCTGTAGTGAATACAGCTTATGCATAACCTGGAAAACTCTGAACCTGATGGAGAGATGAAATGGCTGGTAAAGAGCT
GCAGATGTCACAAATTTT

```

c) (配列番号 1 及び配列番号 1 1) 配列番号 6 0 MTPAKDKMKVIMVLAICFLTKSDGksvkr

d) 配列番号 6 1

```

ATGATACCTGCAAAAAGCATGGCTAAGTTATGATGTCATGTGGCAATTTGTTTCTCAAAAATCGATGGAGggatc
Tgtaagagagatc

```

【 図 6 】

a) (配列番号 5 6)

```

MGTARIAPGLALLLCCPVLSSAYVALVDVDMTEKIQIFLIRHAQAQCEKRLKELVLRPASINDEKGTSASTSGKPRDKA
SGKLYPSEEDKEAPTGRTRGRCLPEVNDIILWPLGAGEVVAQCFDIIIDFNHKGHAIKRRCDRNSWELVPGHNRTPAN
TSCVYFLNTEHREVEFDRLGMIYTVGVSLSLAVLTVAVLILAYFRRLHCTRYNIHMHLLFSLMRAVSIYFKDAVLYSGAT
LDEARLTELRLAIQAPFPFATAGVAGCVRVATFFFLATNYYIIVFGLYIHSIIFAFSEKRYIMGPTVVGWGLE
AVIVAVWYRATLAWGCDLSSNSKMSQIFLILASIVMILFINVILATKLEINRAGCOTRQYKILLKSTVIMIP
LPGHYIVKACTYTVSSTLMVQMYSKMLFNFSQGFVAIYCFNCEVQAIEIKSWRMTLALDFKMRKSSSSYSYSGP
MVSHVTNVNPGRVLGLFLSPRLLPATITNRPQLGKAKFOTPALETLETPPAMAAKDDGFLNGSCSLDEABGPERP
PALLQEEWETVM

```

b) 配列番号 6 2

```

1 GGAGCGCGAG AGCCCGAGG CCGCGCGCGG CGCCTCGCCG GAGGAGCGCG GCCTAAGCGG
61 GTGGCGATGG GAGCCCGCCG GATCGCACCG GCGCTGGCGG TCTGCTCTG CTGCGCCGCG
121 CTCAGCTCCG GXTACCGCCT GGTGATGGA GATGACTCA TGAATAAGA GAACAGAGTC
181 TTCTCGTGGC ACCCTGCTCA GGCACAGTGG GAAAAAGCGC TCAAGAGAGT COTCGAAGGG
241 CCAGCCAGCA TAATGGAATC AGACAAGGA TGGACATCTG CGTCCACATC AGGGAAGGCC
301 AGGAAGATA AGGCATCTGG GAAGCTCTAC CTTGATCTG AGGAGGACA GAGAGCCACC
361 ACTGGACACA GGTACGAGAG GCGCCCTGTG GTGGGAAAT GGGACACAT CTTGGGCGGG
421 CCGCTGGGGG CACGAGGTGA GGTGTTGCTG GTGCTGTCT CCGACTACAT TTATGACTTC
481 AATCAACAAG GGCATGCCTA CCGAGCTGTG GACCGCAATG CCGACTGGGA GCTGGTGCCT
541 GGGCACACA GAGCTGGGG CAACTACAGG GAGTGTGCA AATTTCTCAC CAATGAGACT
601 CGTGAACGGG AGGTGTTTGA CCGCTGGGCG ATGATTACA CCGTGGGCTA CTCCTGTCC
661 CTGGGCTCCC TCACCCTAGC TGTGCTCATC CTGGCCTACT TTAGCGGCGT GCACGTGCAAG
721 CGAACTACA TCGACTTCCA CTTGCTCTG TCTTTATCG TCGCGCGCGT GAGCATCTC
781 CTCAGGAGCG CTGTCTCTTA CTGCGCGCGC AGCTTGATG AGGTGAGCG CTTGCGCGGG
841 GAGGAGCTGC GAGCCATCGC CAGCGCGCCG CGCCGCGTGG CACCCCGCGC TGCCGCTAC
901 CGGGGCTGCA GGGTGCCTGT GACTCTCTT CTATTACTTC TGGCCACCAA CTACTACTGG
961 ATTCTGGTGG AGGGGCTGTA CTTGACAGG CTCATCTTCA TGGCTTTTCT CTCAGAGAG
1021 AAGTACCTGT GSGCTTCA CATTCTGGG TGGGCTCTG CCGCTGCTT CBTGGCTGTG
1081 TGGTACAGT TCGAGCTCAC CTTGGCCAG ACCGGTGTCT GGGACTTGG CTTGGGAGAC
1141 AAAAAGTGG TACTACAGT GGCATCTCT GCTTCATGT TCGTAACCT CATCTCTTC
1201 ATCAATPYG TCGGCTGSEN GGCACCAAG CTGCGGGAUA UCAAGCGCGG CCGTGTGAC
1261 ACACGCGAGC APTACCGSAA GTCGTCAAA TCCACGCTGG TGCTCATGCG CTTCTTGGC
1321 GTCACATACA TTGCTCTCAT GGCACACCA TACACGAGG TCTCAGGAG GCTCTGGGAA
1381 GTCAGATGC ACTATGAGAT CTTCTCAAC TCTTCCAGG GATTTTTTGT CGCAATCATA
1441 TACTGTTCT GCAATGGCGA GSTACAAGCT GAGATCAAGA AATCTTGGG CCGCTGGACA
1501 CTGGCATGEG ACTTAAAGCG AAAGCACAG AGCGGAGCA GCACATATG CTAAGCGGCT
1561 ATGGTCTCC ACACRATGCT GGCATGTC GCGCCCTCT TGGACTCGG CTTCCCGCTC
1621 AGCCCGCGCG TACGCGCAC TSCACCAAC AACGGCCAC CTAAGTGGC TGGCATGCG
1681 AAGCCAGGGA CCGGACGCT GAGACCCCT GAGACACAC CACTGCGCAT GGCTGCTCC
1741 AAGCAGATG GGTCTCTCAA CGCTCTCTG TCGGCTCTG ACGAGGAGG CTTCTGGGCT
1801 GAGCGCCAC CTGCGCTCTC ACAGGAAGG TGGGAGCAG TCACTGAC AGGCGCTGG
1861 GGTGACACT GCTGACATG TGAATGACA GATGACCAA AAGATGGTG GTTAATGAT
1921 TCCCATCA GGGCTGGCG CAGAGGAA ACNCGGAA AAAAGAAA AAAAGAAA
1981 AAGAAAGA AAAAARAAA AAAAAA

```

【 図 7 】

a) (配列番号 3)

```

DQVMTKEQIFLLHRAQAQCEKRLKELVLRPASINDEKGTSASTSGKPRDKASGKLYPESEEDKEAPTGRTRGR
GRFLPEVDHILWPLGAGEVVAQCFDIIIDFNHKGHAYRCDRNSWELVPGHNRTPANYSKVCVFLNTEHREVEFD

```

b) 配列番号 6 3

```

GATGACGCTA TGAATAAGA GGAACAGATC TTCTGCTG CCGCTGCTCA GGCACAGTGC GAAAAACGGC
TCAAGGAGGT CCGTCAGAGG CCAGCCAGCA TAATGGAATC AGACAAGGA TGGACATCTG CBTCCACATC
AGGGAAGCCC AGGAAGATA AGGCATCTGG GAAGCTCTAC CCGTACTCTG AGGAGGACA GGAGGACCC
ACTGGCAGCA GGTACCGAGG GCGCCCTGTG CTGCGGAA TGGACACAT CCGTCTGCG CCGCTGGGG
CACCAGTGA GGTGGTGGCT GTGCGCTGTG CCGACTACTT TTATGACTTC AATCACAAG CCGATGCGTA
CGAGCTGT GACCGCAATG GCAGCTGGGA GCTGGTGCCT GGCACACA CAACTGCGG CCACTACAG
GAGTGTGCA AATTTCTCAC CAATGAGACT CCGTGAACGG AGTGTGTTA CCGCTG

```

【 図 8 】

a) 配列番号 6 4

```

TTTTCTGGAAGTGGGCGACAGAGTACTCCTAGCAGCAGCCCTGGAGTCTCAAAGTGTAACTCAGGCTTAAGACAAA
TTCTTTAAGAGGCTAAATCAACAGTGGCTTCACTGAGGAGAGACTTTTCATGCCACTGGACAGATGAGTTCATC
ATGTTACAAGAAGACTAGGACCCATACAGCTGTTTATACCAAGAAGAACCTCAAAGATGACTCAAGATGGAAGAATG
CCTGATTAATGTTCTGCTGGGAAACAGCTTACTTTAATTCATGTTTACTCTCATGCCATTCCTTATGTATCAAGCT
AGCTAGAACGGTGTACAGTGGATGAAAGTGTCTCTGCTGATGAAATATGCAACCGACCCAGCTGCTCAACTCAAC
GACTTTACTGAGCTCAGTTACTGGATTCAGCAATTCAGAGTTCAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
AAAGATGATGTTCTGGAGTATGAACTCAATCAAGAAGTAAAGTGAACCTAAATGGAATGATGAGCCCTATATTGAC
AACATGATCCAGTGTACTGATGAAATGATGAAATGAAATGAAATGAAATGAAATGAAATGAAATGAAATGAAATG
ATGGCGAGTCACTGAGTGTCTATGTAACACTCTCTCAGATGACCAA

```

b) (配列番号 7)

```

FSGSEATAAIIISRAFWLQVWVPLKXNSKPKFTKCRSFERETFSCHWTEVHHTKILGILQIFYTRRNTQEWTEQWEC
FDVYSACENSYNSFTSIAIPYCIKLSNGQVDEKFSVDEIVQPDFPIALNWLINVLGTHADIQVWKEAPRNADIQ
KGMVWLEVLQYKVENETKRWMDPILITVSVVSLRVREYEVRSKQRNSGNVGFSEVLVTLFQMSQ

```

【 図 9 】

a) (配列番号 2)

```

MATGSRISLLAFGLICLPLWQEGSA

```

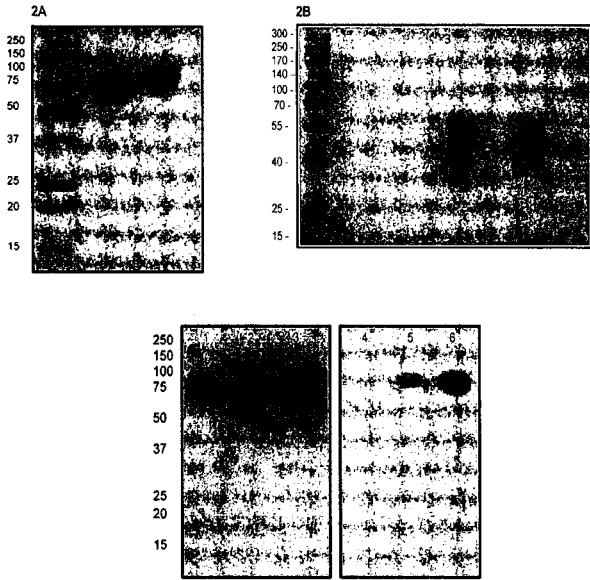
b) 配列番号 6 5

```

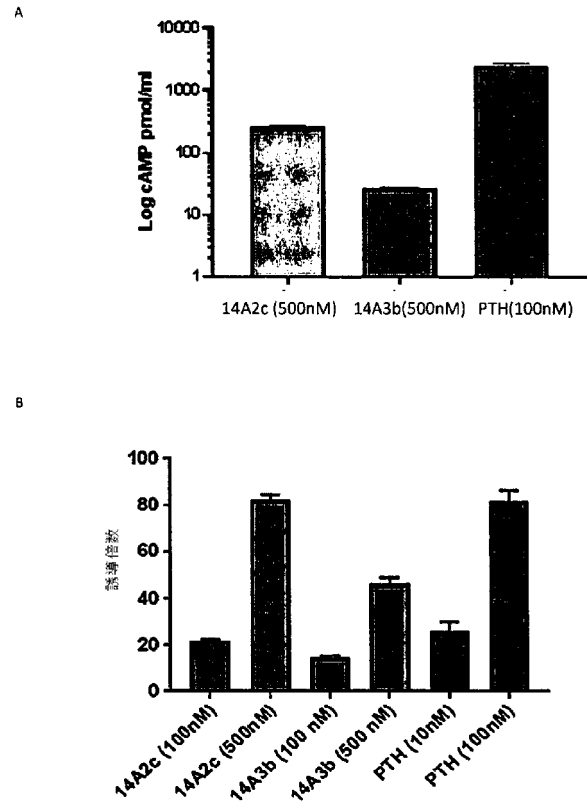
ATGCTACAGGCTCCGGACGTCCTGCTCTGCTCTTGGCTGCTCTGCTGCTGCTTCAAGAGGCGAGTGC

```

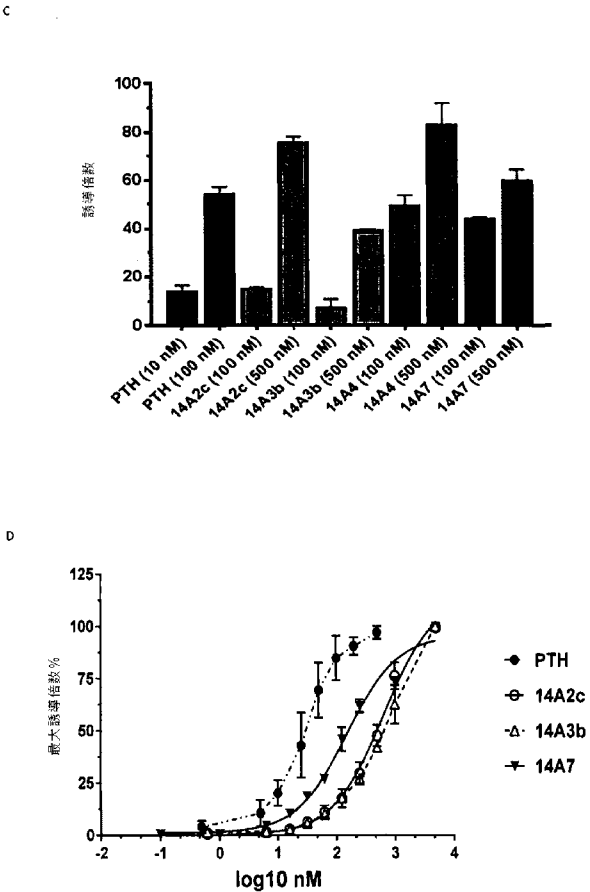

【 図 2 8 】



【 図 2 9 - 1 】



【 図 2 9 - 2 】



【配列表】

2020519250000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2018/051120

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/435 ADD.		
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		
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) EPO-Internal, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SUZUKI ET AL: "High-level production of recombinant human parathyroid hormone 1-34", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 64, no. 2, 1 February 1998 (1998-02-01), pages 526-529, XP002084039, ISSN: 0099-2240 abstract page 526, left-hand column, line 1 - line 29; figure 1; table 1 ----- -/--	1,2,4-8, 25,26, 28, 34-36, 38-42, 44-46
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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		Date of mailing of the international search report
29 November 2018		19/12/2018
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Strobel, Andreas

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2018/051120

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>Paul J Kostenuik ET AL: "Infrequent delivery of a long-acting PTH-Fc fusion protein has potent anabolic effects on cortical and cancellous bone", Journal of bone and mineral research, 18 June 2007 (2007-06-18), pages 1534-1547, XP055524909, DOI: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1359/jbmr.070616 Retrieved from the Internet: URL:https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1359/jbmr.070616 [retrieved on 2018-11-19] abstract page 1535, left-hand column, last paragraph</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1,2,4-8, 25,26, 28, 34-36, 38-42, 44-46
X	<p>RANJITHA KATIKANENI ET AL: "Therapy for Alopecia Areata in Mice by Stimulating the Hair Cycle with Parathyroid Hormone Agonists Linked to a Collagen-Binding Domain", JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY SYMPOSIUM PROCEEDINGS. 75TH., vol. 17, no. 2, 1 November 2015 (2015-11-01), pages 13-15, XP055524754, US ISSN: 1087-0024, DOI: 10.1038/jidsymp.2015.32 abstract; figure 1 page 13, left-hand column, line 13 - line 22</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-5,7,8, 26,34, 35,37, 38,42, 45,46
X	<p>MASARU SHIMIZU ET AL: "Pharmacodynamic Actions of a Long-Acting PTH Analog (LA-PTH) in Thyroparathyroidectomized (TPTX) Rats and Normal Monkeys : PHARMACODYNAMIC ACTIONS OF AN LA-PTH IN TPTX RATS AND NORMAL MONKEYS", JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH, vol. 31, no. 7, 23 May 2016 (2016-05-23), pages 1405-1412, XP055524790, US ISSN: 0884-0431, DOI: 10.1002/jbmr.2811 abstract page 1406, left-hand column, line 1 - line 45 page 1411, right-hand column, line 26 - line 29</p> <p style="text-align: center;">-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-4,7,8, 34,35, 38,42,43

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2018/051120

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	IAN R. WILKINSON ET AL: "A long-acting GH receptor antagonist through fusion to GH binding protein", SCIENTIFIC REPORTS, vol. 6, no. 1, 12 October 2016 (2016-10-12), XP055524836, DOI: 10.1038/srep35072 abstract page 3, line 13 - line 17 -----	1-46
X	XIAO-CHENG WU ET AL: "Collagen-targeting parathyroid hormone-related peptide promotes collagen binding and in vitro chondrogenesis in bone marrow-derived MSCs", INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE, vol. 31, no. 2, 19 December 2012 (2012-12-19), pages 430-436, XP055466989, GR ISSN: 1107-3756, DOI: 10.3892/ijmm.2012.1219 abstract; figure 1 page 431, right-hand column, paragraph 4 -----	1,9
X,P	WILKINSON I ET AL: "Fusion of the peptide parathyroid hormone to growth hormone binding protein retains biological activity", ENDOCRINE REVIEWS 20180401 OXFORD UNIVERSITY PRESS NLD, vol. 39, no. 2, Supplement 1, 1 April 2018 (2018-04-01), XP009509404, ISSN: 0163-769X abstract -----	1-46

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	4 H 0 4 5
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	C
A 6 1 K 38/29 (2006.01)	A 6 1 K 38/29	
A 6 1 K 47/64 (2017.01)	A 6 1 K 47/64	
A 6 1 K 33/06 (2006.01)	A 6 1 K 33/06	
A 6 1 K 31/539 (2006.01)	A 6 1 K 31/539	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
A 6 1 P 19/10 (2006.01)	A 6 1 P 19/10	
A 6 1 P 5/20 (2006.01)	A 6 1 P 5/20	

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, 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, NE, 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, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

- (74)代理人 100137213
弁理士 安藤 健司
- (74)代理人 100143823
弁理士 市川 英彦
- (74)代理人 100151448
弁理士 青木 孝博
- (74)代理人 100183519
弁理士 櫻田 芳恵
- (74)代理人 100196483
弁理士 川崎 洋祐
- (74)代理人 100203035
弁理士 五味淵 琢也
- (74)代理人 100185959
弁理士 今藤 敏和
- (74)代理人 100160749
弁理士 飯野 陽一
- (74)代理人 100160255
弁理士 市川 祐輔
- (74)代理人 100202267
弁理士 森山 正浩
- (74)代理人 100146318
弁理士 岩瀬 吉和
- (74)代理人 100127812
弁理士 城山 康文

(72)発明者 ウィルキンソン, イアン
イギリス国、ヨークシャー・エス10・2アールエックス・シェフィールド、ビーチ・ヒル・ロード、メディカル・スクール、ユニバーシティー・オブ・シェフィールド

(72)発明者 ロス, リチャード
イギリス国、ヨークシャー・エス10・2アールエックス・シェフィールド、ビーチ・ヒル・ロード、メディカル・スクール、ユニバーシティー・オブ・シェフィールド

Fターム(参考) 4B064 AG15 AG20 CA19 CC24 CE11 CE12 DA01 DA13
4B065 AA91X AA93Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44 CA46
4C076 AA94 CC09 CC30 CC41 EE41 EE59 FF31 FF34
4C084 AA02 BA41 CA53 DB32 NA12 ZA97 ZC06 ZC75
4C086 AA01 AA02 DA16 HA04 HA16 MA01 MA02 MA04 NA11 NA12
ZA97 ZC06 ZC75
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA30 DA50 EA30 FA74
GA23 GA26