

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2015-155458

(P2015-155458A)

(43) 公開日 平成27年8月27日(2015.8.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C O 7 K 14/47 (2006.01)	C O 7 K 14/47	4 B O 2 4
C O 7 K 14/59 (2006.01)	C O 7 K 14/59 Z N A	4 B O 6 5
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 C O 8 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C O 8 7
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 H O 4 5
審査請求 有 請求項の数 33 O L (全 85 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2015-96578 (P2015-96578)	(71) 出願人	508233526
(22) 出願日	平成27年5月11日 (2015.5.11)		オブコ バイオロジクス リミテッド
(62) 分割の表示	特願2008-553393 (P2008-553393) の分割		イスラエル国ネスジونا74140・セカ ンドフロア・ゴルダメア ストリート 7
原出願日	平成19年2月5日 (2007.2.5)	(74) 代理人	110001379
(31) 優先権主張番号	60/764, 761		特許業務法人 大島特許事務所
(32) 優先日	平成18年2月3日 (2006.2.3)	(72) 発明者	ファレス、フアド
(33) 優先権主張国	米国 (US)		イスラエル国アワーフィッシュビレッジ2 5155・ピーオーボックス 423
		(72) 発明者	フィマ、ウディ・エヤル
			イスラエル国ピアシェバ84833・アル ベクストリート 30
		F ターム (参考)	4B024 AA01 BA01 BA03 BA21 BA22 CA01 DA01 DA02 DA05 DA11 EA04 GA11 HA08
			最終頁に続く

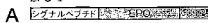
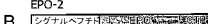
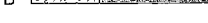
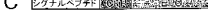
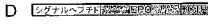
(54) 【発明の名称】 長期間作用型ポリペプチド並びにその製造方法及び投与方法。

(57) 【要約】

【課題】 治療用ポリペプチドの半減期を延長する技術を提供する。

【解決手段】 目的のペプチドに結合した少なくとも2つの絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチド (CTP) を含むポリペプチド及びそれをエンコードするポリヌクレオチドが開示されている。また、本発明の前記ポリペプチド及びポリヌクレオチドを含む医薬組成物、並びにその使用方法が開示されている。少なくとも2つの絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドのうちの第1の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドは、前記目的のペプチドのアミノ末端に結合し、前記少なくとも2つの絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドのうちの第2の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドは、前記目的のペプチドのカルボキシ末端に結合している。

【選択図】 図1

EPO-1	
A	
EPO-2	
B	
EPO-3	
C	
EPO-4	
D	
EPO-5	
E	
EPO-6	
F	

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

目的のペプチド及び少なくとも 2 つの絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドを含むポリペプチドであって、

前記少なくとも 2 つの絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドのうちの第 1 の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドが、前記目的のペプチドのアミノ末端に結合し、

前記少なくとも 2 つの絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドのうちの第 2 の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドが、前記目的のペプチドのカルボキシ末端に結合したポリペプチド。

10

【請求項 2】

請求項 1 に記載のポリペプチドであって、

前記第 2 の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドに直列に結合した第 3 の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドをさらに含むポリペプチド。

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 に記載のポリペプチドであって、

前記目的のペプチドが、hGH ペプチドであるポリペプチド。

【請求項 4】

請求項 1 又は 2 に記載のポリペプチドであって、

前記目的のペプチドが、インターフェロンペプチド及び GLP-1 ペプチドから選択されるポリペプチド。

20

【請求項 5】

請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載のポリペプチドであって、

前記目的のペプチドがグリコシル化されたポリペプチド。

【請求項 6】

請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載のポリペプチドであって、

前記目的のペプチドがグリコシル化されていないポリペプチド。

【請求項 7】

請求項 3 に記載のポリペプチドであって、

前記ペプチドの配列が、配列番号 39 ～ 41 に記載の配列から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチド。

30

【請求項 8】

目的のペプチド及び少なくとも 2 つの絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドを含むポリペプチドをエンコードするコード部分を含むポリヌクレオチドであって、

前記少なくとも 2 つの絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドのうちの第 1 の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドが、前記目的のペプチドのアミノ末端に結合し、

前記少なくとも 2 つの絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドのうちの第 2 の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドが、前記目的のペプチドのカルボキシ末端に結合したポリヌクレオチド。

40

【請求項 9】

請求項 8 に記載のポリヌクレオチドであって、

前記ポリペプチドが、前記第 2 の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドに直列に結合した第 3 の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドをさらに含むポリヌクレオチド。

【請求項 10】

請求項 8 又は 9 に記載のポリヌクレオチドであって、

前記目的のペプチドが、hGH ペプチドであるポリヌクレオチド。

【請求項 11】

請求項 9 ～ 11 のいずれかに記載のポリヌクレオチドであって、

50

前記目的のペプチドが、インターフェロンペプチド及びG L P－1ペプチドから選択されるポリヌクレオチド。

【請求項12】

請求項10に記載のポリヌクレオチドであって、

前記ポリヌクレオチドの配列が、配列番号44～46に記載の配列から選択される配列を含むポリヌクレオチド。

【請求項13】

対象の成長、体重関連又は代謝の状態を治療する方法であって、

治療効果のある量の請求項3に記載のポリペプチド又は請求項10に記載のポリヌクレオチドを前記対象へ投与するステップを含む方法。

10

【請求項14】

目的のペプチドの生物学的半減期を向上させる方法であって、

第1の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドを、前記目的のペプチドのアミノ末端に結合させ、

第2の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドを、前記目的のペプチドのカルボキシ末端に結合させるステップを含む方法。

【請求項15】

目的のペプチドを、それを必要とする療対象に投与する方法であって、

第1の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドを、前記目的のペプチドのアミノ末端に結合させ、

20

第2の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドを、前記目的のペプチドのカルボキシ末端に結合させて、

前記対象への投与用の改良されたポリペプチドを生成するステップを含む方法。

【請求項16】

EPOペプチド及び少なくとも2つの絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドを含むポリペプチドであって、

前記少なくとも2つの絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドのうちの第1の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドが、前記EPOペプチドのアミノ末端に結合し、

前記少なくとも2つの絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドのうちの第2の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドが、前記EPOペプチドのカルボキシ末端に結合したポリペプチド。

30

【請求項17】

請求項16に記載のポリペプチドであって、

前記ポリペプチドが、前記第2の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドに直列に結合した第3の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドをさらに含むポリペプチド。

【請求項18】

請求項16又は17に記載のポリペプチドであって、

前記少なくとも2つの絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドのうちの少なくとも1つの配列が、配列番号17及び18に記載の配列から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチド。

40

【請求項19】

請求項1～7又は16～18のいずれかに記載のポリペプチドであって、

前記少なくとも2つの絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドのうちの少なくとも1つの配列が切断されたポリペプチド。

【請求項20】

請求項1～7及び16～19のいずれかに記載のポリペプチドであって、

前記少なくとも2つの絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドのうちの少なくとも1つが、グリコシル化されたポリペプチド。

50

【請求項 21】

請求項 1～7 及び 16～20 のいずれかに記載のポリペプチドであって、シグナルペプチドをさらに含むポリペプチド。

【請求項 22】

請求項 21 に記載のポリペプチドであって、前記シグナルペプチドの配列が、配列番号 19 に記載の配列であるポリペプチド。

【請求項 23】

請求項 16～22 に記載のポリペプチドであって、前記ポリペプチドの配列が、配列番号 3 及び 6 に記載の配列から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチド。

10

【請求項 24】

請求項 1～7 及び 16～23 のいずれかに記載のポリペプチドを含む薬学的組成物。

【請求項 25】

EPO ペプチド及び少なくとも 2 つの絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドを含むポリペプチドをエンコードするコード配列を含むポリヌクレオチドであって、前記少なくとも 2 つの絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドのうちの第 1 の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドが、前記 EPO ペプチドのアミノ末端に結合し、

前記少なくとも 2 つの絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドのうちの第 2 の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドが、前記 EPO ペプチドのカルボキシ末端に結合したポリヌクレオチド。

20

【請求項 26】

請求項 25 に記載のポリペプチドであって、前記ポリペプチドが、前記第 2 の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドに直列に結合した第 3 の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドをさらに含むポリヌクレオチド。

【請求項 27】

請求項 8～12 及び 25～26 のいずれかに記載のポリヌクレオチドであって、前記ポリペプチドが、シグナルペプチドをさらに含むポリヌクレオチド。

【請求項 28】

請求項 27 に記載のポリヌクレオチドであって、前記シグナルペプチドの配列が、配列番号 19 に記載の配列であるポリヌクレオチド。

30

【請求項 29】

請求項 8～12 及び 25～28 のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項 30】

請求項 29 に記載の発現ベクターを含む細胞。

【請求項 31】

請求項 29 に記載の発現ベクターを含む薬学的組成物。

【請求項 32】

対象の貧血を治療する又は貧血の発生率を低下させる方法であって、前記対象に、治療効果のある量の請求項 16～23 のいずれかに記載のポリペプチド又は請求項 25～28 のいずれかに記載のポリヌクレオチドを投与するステップを含む方法。

40

【請求項 33】

EPO ペプチドの生物学的半減期を向上させる方法であって、第 1 の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドを、前記 EPO ペプチドのアミノ末端に結合させ、第 2 の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドを、前記 EPO ペプチドのカルボキシ末端に結合させるステップを含む方法。

50

【請求項 3 4】

EPOペプチドを、それを必要とする対象に投与する方法であって、

第1の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドを、前記EPOペプチドのアミノ末端に結合させ、

第2の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドを、前記EPOペプチドのカルボキシ末端に結合させて、

前記治療対象への投与用の改良されたポリペプチドを生成するステップを含む方法。

【請求項 3 5】

請求項 1 3～1 5 及び 3 2～3 4 のいずれかに記載の方法であって、

前記第2の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドに、第3の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドを直列に結合させるステップをさらに含む方法。

10

【請求項 3 6】

請求項 1 3～1 5 及び 3 2～3 5 のいずれかに記載の方法であって、

前記少なくとも2つの絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドのうちの少なくとも1つの配列が、配列番号 1 7 及び 1 8 に記載の配列から選択されるアミノ酸配列を含む方法。

【請求項 3 7】

目的の非ヒトペプチド及び少なくとも2つの絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドを含むポリペプチドであって、

前記少なくとも2つの絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドのうちの第1の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドが、前記目的のペプチドのアミノ末端に結合し、

20

前記少なくとも2つの絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドのうちの第2の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドが、前記目的のペプチドのカルボキシ末端に結合したポリペプチド。

【請求項 3 8】

請求項 3 7 に記載のポリペプチドであって、

前記ポリペプチドが、前記第2の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドに直列に結合した第3の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドをさらに含むポリペプチド。

30

【請求項 3 9】

請求項 3 7 又は 3 8 に記載のポリペプチドであって、

前記目的の非ヒトペプチドが、hGHペプチドであるポリペプチド。

【請求項 4 0】

請求項 3 7 又は 3 8 に記載のポリペプチドであって、

前記目的の非ヒトペプチドが、EPOペプチドであるポリペプチド。

【請求項 4 1】

請求項 3 7 又は 3 8 に記載のポリペプチドであって、

前記目的の非ヒトペプチドが、組み換えタンパク質、GLP-1、又はインターフェロンから選択されるポリペプチド。

40

【請求項 4 2】

目的の非ヒトペプチド及び少なくとも2つの絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドを含むポリペプチドをエンコードするコード部分を含むポリヌクレオチドであって、

前記少なくとも2つの絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドのうちの第1の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドが、前記目的のペプチドのアミノ末端に結合し、

前記少なくとも2つの絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドのうちの第2の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドが、前記目的のペプチドのカルボキシ末端に結合したポリヌクレオチド。

50

【請求項 4 3】

請求項 4 2 に記載のポリヌクレオチドであって、

前記第 2 の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドに直列に結合した第 3 の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドをさらに含むポリヌクレオチド。

【請求項 4 4】

請求項 4 2 又は 4 3 に記載のポリヌクレオチドであって、

前記目的の非ヒトペプチドが、hGH ペプチドであるポリヌクレオチド。

【請求項 4 5】

請求項 4 2 ～ 4 4 のいずれかに記載のポリヌクレオチドであって、

前記目的の非ヒトペプチドが、組み換えペプチド、インターフェロンペプチド、又は G L P - 1 ペプチドから選択されるポリヌクレオチド。 10

【請求項 4 6】

非ヒト対象の成長、体重関連又は代謝の状態を治療する方法であって、

治療効果のある量の請求項 3 7 に記載のポリペプチド又は請求項 4 2 に記載のポリヌクレオチドを前記治療対象へ投与するステップを含む方法。

【請求項 4 7】

目的のペプチドを、それを必要とする非ヒト対象に投与する方法であって、

第 1 の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドを、前記目的のペプチドのアミノ末端に結合させ、

第 2 の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドを、前記目的のペプチドのカルボキシ末端に結合させて、 20

前記対象への投与用に改良されたポリペプチドを生成するステップを含む方法。

【請求項 4 8】

非ヒト EPO ペプチド及び少なくとも 2 つの絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドを含むポリペプチドであって、

前記少なくとも 2 つの絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドのうちの第 1 の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドが、前記 EPO ペプチドのアミノ末端に結合し、

前記少なくとも 2 つの絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドのうちの第 2 の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドが、前記 EPO ペプチドのカルボキシ末端に結合したポリペプチド。 30

【請求項 4 9】

請求項 3 7 ～ 4 1 のいずれかに記載のポリペプチドを含む薬学的組成物。

【請求項 5 0】

EPO ペプチド及び少なくとも 2 つの絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドを含む非ヒトポリペプチドをエンコードするコード配列を含むポリヌクレオチドであって、

前記少なくとも 2 つの絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドのうちの第 1 の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドが、前記非ヒト EPO ペプチドのアミノ末端に結合し、 40

前記少なくとも 2 つの絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドのうちの第 2 の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドが、前記非ヒト EPO ペプチドのカルボキシ末端に結合したポリヌクレオチド。

【請求項 5 1】

請求項 5 0 に記載のポリヌクレオチドであって、

前記第 2 の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドに直列に結合した第 3 の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドをさらに含むポリヌクレオチド。

【請求項 5 2】

請求項 5 0 又は 5 1 に記載の発現ベクターを含む細胞。

【請求項 5 3】

請求項 5 2 に記載の発現ベクターを含む薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

目的のペプチドに結合した少なくとも 2 つの絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチド (CTP) を含むポリペプチド及びそれをエンコードするポリヌクレオチドが開示されている。また、本発明の前記ポリペプチド及びポリヌクレオチドを含む薬学的組成物、並びにその使用方法が開示されている。

【背景技術】

【0002】

ポリペプチドは、血液、肝臓又は腎臓内で、変性や酵素分解の影響を受けやすい。したがって、一般に、ペプチドの循環半減期は数時間と短い。従ってペプチドの安定性は低いので、活性ペプチドの有効血漿中濃度を維持するために、ペプチド薬は通常は持続的に投与される。さらに、ペプチド薬は通常は注入によって投与されるが、ペプチド薬の頻繁な注射は治療対象に対して著しい不快感をもたらす。そのため、治療用ポリペプチドの薬理効果を維持しつつ、前記治療用ポリペプチドの半減期を延長する技術が求められている。また、そのような望ましいペプチド薬は、治療対象に注射した際の、血清安定性の向上、高活性、及び望ましくない免疫反応が発生する可能性の低減という要求を満たすべきである。

【0003】

短い血中半減期などの好ましくない薬物動態は、多くの他の有望な薬候補の薬学的開発を阻害する。血中半減期は分子の実験的特性であるため、有望な新薬のそれぞれの血中半減期は実験的に測定する必要がある。例えば、低分子量ポリペプチド薬の場合は、要求される投与計画のコスト又は頻度の理由で、腎臓ろ過などの生理学的クリアランス機構で薬剤の治療レベルを維持することは不可能である。逆に、長い血中半減期は、薬剤又はその代謝産物が中毒性副作用を有するので望ましくない。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

ある実施形態では、本発明は、目的のポリペプチド配列に結合した少なくとも 2 つの絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチド (carboxy terminal peptide: CTP) アミノ酸配列を含むポリペプチドを提供する。

【0005】

他の実施形態では、本発明は、目的のポリペプチド配列のアミノ末端に結合した第 1 の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチド (CTP) アミノ酸配列と、目的のポリペプチド配列のカルボキシ末端に結合した第 2 の CTP アミノ酸配列とを含むポリペプチドを提供する。

【0006】

他の実施形態では、本発明は、目的のポリペプチド配列のカルボキシ末端に結合した 2 つの絨毛性ゴナドトロピン・CTP 配列を含むポリペプチドを提供する。

【0007】

他の実施形態では、本発明は、目的のポリペプチド配列のアミノ末端に結合した第 1 の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチド (CTP) アミノ酸配列と、目的のポリペプチド配列のカルボキシ末端に結合した第 2 及び第 3 の CTP アミノ酸配列とを含むポリペプチドを提供する。

【0008】

他の実施形態では、本発明は、目的のポリペプチド配列に結合した少なくとも 3 つの絨毛性ゴナドトロピン・CTP アミノ酸配列を含むポリペプチドを提供する。

【0009】

他の実施形態では、本発明は、目的のポリペプチド配列に結合した少なくとも 2 つの絨

10

20

30

40

50

毛性ゴナドトロピン・C T Pアミノ酸配列を含むポリペプチドをエンコードする配列を含むポリヌクレオチドを提供する。

【0010】

他の実施形態では、本発明は、目的のポリペプチド配列のアミノ末端に結合した第1の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチド(C T P)アミノ酸配列と、目的のポリペプチド配列のカルボキシ末端に結合した第2のC T Pアミノ酸配列とをエンコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを提供する。

【0011】

他の実施形態では、本発明は、目的のポリペプチド配列のカルボキシ末端に結合した2つの絨毛性ゴナドトロピン・C T Pアミノ酸配列をエンコードする配列を含むポリヌクレオチドを提供する。

10

【0012】

他の実施形態では、本発明は、目的のポリペプチド配列のアミノ末端に結合した第1の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチド(C T P)アミノ酸配列と、目的のポリペプチド配列のカルボキシ末端に結合した第2及び第3のC T Pアミノ酸配列とをエンコードする配列を含むポリヌクレオチドを提供する。

【0013】

他の実施形態では、本発明は、目的のポリペプチド配列に結合した少なくとも3つの絨毛性ゴナドトロピン・C T Pアミノ酸配列をエンコードする配列を含むポリヌクレオチドを提供する。

20

【0014】

他の実施形態では、本発明は、治療対象の成長、体重関連又は代謝の状態を治療する方法であって、治療効果のある量のC T P-h G Hを前記治療対象へ投与するステップを含む方法を提供する。h G Hは、一般に成長疾患に使用され、特に成長ホルモン欠損症関連疾患に使用される。本明細書では、下垂体摘出ラット(成長ホルモンを分泌しないラット)における、C T P-h G H注射後の成長度合いについて実証している。

【0015】

他の実施形態では、本発明は、目的のポリペプチド配列の生物学的半減期を向上させる方法であって、少なくとも2つの絨毛性ゴナドトロピン・C T Pアミノ酸配列を目的のポリペプチド配列へ結合させるステップを含む方法を提供する。

30

【0016】

他の実施形態では、本発明は、目的のポリペプチド配列を、それを必要とする治療対象に投与する方法であって、少なくとも2つの絨毛性ゴナドトロピン・C T Pアミノ酸配列を目的のポリペプチド配列へ結合させるステップを含む方法を提供する。

【0017】

他の実施形態では、本発明は、E P Oペプチドに結合した少なくとも2つの絨毛性ゴナドトロピン・C T Pアミノ酸配列を含むポリペプチドを提供する。

【0018】

他の実施形態では、本発明は、E P Oペプチドのアミノ末端に結合した第1の絨毛性ゴナドトロピン・C T Pアミノ酸配列と、E P Oペプチドのカルボキシ末端に結合した第2のC T Pアミノ酸配列とを含むポリペプチドを提供する。

40

【0019】

他の実施形態では、本発明は、E P Oペプチドのカルボキシ末端に結合した2つの絨毛性ゴナドトロピン・C T Pアミノ酸配列を含むポリペプチドを提供する。

【0020】

他の実施形態では、本発明は、E P Oペプチドのアミノ末端に結合した第1の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチド(C T P)アミノ酸配列と、E P Oペプチドのカルボキシ末端に結合した第2及び第3のC T Pアミノ酸配列とを含むポリペプチドを提供する。

【0021】

50

他の実施形態では、本発明は、EPOペプチドに結合した少なくとも3つの絨毛性ゴナドトロピン・CTPアミノ酸配列を含むポリペプチドを提供する。

【0022】

他の実施形態では、本発明は、EPOペプチドに結合した少なくとも2つの絨毛性ゴナドトロピン・CTPアミノ酸配列をエンコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを提供する。

【0023】

他の実施形態では、本発明は、EPOペプチドのアミノ末端に結合した第1の絨毛性ゴナドトロピン・CTPアミノ酸配列と、EPOペプチドのカルボキシ末端に結合した第2のCTPアミノ酸配列とをエンコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを提供する。

10

【0024】

他の実施形態では、本発明は、目的のポリペプチド配列のカルボキシ末端に結合した2つの絨毛性ゴナドトロピン・CTPアミノ酸配列をエンコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを提供する。

【0025】

他の実施形態では、本発明は、目的のポリペプチド配列のアミノ末端に結合した第1の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチド(CTP)アミノ酸配列と、目的のポリペプチド配列のカルボキシ末端に結合した第2及び第3のCTPアミノ酸配列とをエンコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを提供する。

20

【0026】

他の実施形態では、本発明は、目的のポリペプチド配列に結合した少なくとも3つの絨毛性ゴナドトロピン・CTPアミノ酸配列をエンコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを提供する。

【0027】

他の実施形態では、本発明は、治療対象の貧血を治療又は予防する方法であって、治療対象に治療効果のある量のEPO-CTPを投与するステップを含む方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0028】

【図1】A~Fは、6つのEPO-CTP構築物を示す略図である。Aは、配列番号1のポリペプチドの略図である。Bは、配列番号2のポリペプチドの略図である。Cは、配列番号3のポリペプチドの略図である。Dは、配列番号4のポリペプチドの略図である。Eは、配列番号5のポリペプチドの略図である。Fは、配列番号6のポリペプチドの略図である。

30

【図2】トランスフェクトされたDG44細胞からの変異型EPO-CTPの発現を示す図である。トランスフェクトされた細胞からの最終試験サンプルは、上記の「サンプルの調製」で説明したように調整し、SDS/PAGEで泳動させた。ウエスタンブロットでタンパク質を検出した。

【図3】組み換え型hEPO誘導体及びEPO-3(配列番号3)のインビボ生物活性を示すグラフである。ICRマウス(7匹/1群)に、15µg/kgのEPO-3、rhEPO-WT(配列番号16)、若しくはRecormon(市販のEPO)を週1回、又は5µg/kgのRecormonを週3回、3週間にわたって静脈注射した。対照動物には、PBSを静脈注射した。週3回血液のサンプルを採取し、ヘマトクリットレベルを検出した。各点は、各群の平均ヘマトクリット値(%)±標準誤差を表す。

40

【図4】組み換え型hEPO誘導体及びEPO-1(配列番号1)のインビボ生物活性を示すグラフである。ICRマウス(7匹/1群)に、15µg/kgのEPO-1、rhEPO-WT(配列番号16)、若しくはRecormonを週1回、又は5µg/kgのRecormonを週3回、3週間にわたって静脈注射した。対照動物には、PBSを静脈注射した。週3回血液のサンプルを採取し、ヘマトクリットレベルを検出した。各点は、各群の平均ヘマトクリット値(%)±標準誤差を表す。

50

【図5】組み換え型hEPO誘導体及びEPO-2（配列番号2）のインビボ生物活性を示すグラフである。ICRマウス（7匹／1群）に、15μg/kgのEPO-2（配列番号2）、rhEPO-WT（配列番号16）、若しくはRecormonを週1回、又は5μg/kgのRecormonを週3回、3週間にわたって静脈注射した。対照動物には、PBSを静脈注射した。週3回血液のサンプルを採取し、ヘマトクリットレベルを検出した。各点は、各群の平均ヘマトクリット値（%）±標準誤差を表す。

【図6】EPO-0（配列番号16）、EPO-3（配列番号3）、及びAranespを1回注射した後の網状赤血球レベルにおける変化を示す時間グラフである。

【図7】EPO-0（配列番号16）、EPO-3（配列番号3）、及びAranespを1回注射した後のヘモグロブリンレベルにおける変化（ベースラインからの変化量として表されている）を示す時間グラフである。

【図8】EPO-0（配列番号16）、EPO-3（配列番号3）、及びAranespを1回注射した後のヘマトクリットレベルにおける変化を示す時間グラフである。

【図9】EPO-0（SEQ ID NO: 16）、EPO-3（配列番号3）、及びAranespを静脈注射した後の血清濃度の変化を示すグラフである。

【図10】MOD-4020（配列番号36）、MOD-4021（配列番号37）、MOD-4022（配列番号38）、MOD-4023（配列番号39）、及びMOD-4024（配列番号40）の分子量の検出及びそれぞれのタンパク質の同定を示すウエスタンブロットである。抗hGH抗体を使用してPAGE-SDSゲルをブロット及び染色した。この写真は、市販及び野生型のhGHと同様に、変異型MOD-7020-4もまた、抗hGH抗体によって認識されることを示す。

【図11】本発明のGH-CTPポリペプチドの投与後の下垂体摘出ラットの体重増加を示す棒グラフである。

【発明を実施するための形態】

【0029】

ある実施形態では、本発明は、長期間作用型ポリペプチド並びにその製造方法及び使用方法を提供する。ある実施形態では、長期間作用型ポリペプチドは、ヒト絨毛性ゴナドトロピン（human Chorionic Gonadotropin: hCG）のカルボキシ末端ペプチド（carboxy terminal peptide: CTP）を含む。ある実施形態では、CTPは、それに由来するタンパク質又はペプチドの分解に対する保護剤として作用する。ある実施形態では、CTPは、それに由来するタンパク質又はペプチドの循環半減期を延長する。いくつかの実施形態では、CTPは、それに由来するタンパク質又はペプチドの効力を高める。

【0030】

他の実施形態では、「CTPペプチド」、「カルボキシ末端ペプチド」、及び「CTP配列」は、本明細書中では同じ意味で使用される。他の実施形態では、前記カルボキシ末端ペプチドは、全長CTPである。他の実施形態では、前記カルボキシ末端ペプチドは、切断されたCTPである。各可能な形態は、本発明の異なる実施形態に相当する。

【0031】

他の実施形態では、「EPOペプチド」及び「EPO配列」は、本明細書中では同じ意味で使用される。他の実施形態では、前記EPOペプチドは、EPOタンパク質である。他の実施形態では、前記カルボキシ末端ペプチドは、切断されたEPOタンパク質である。各可能な形態は、本発明の異なる実施形態に相当する。

【0032】

他の実施形態では、「シグナル配列」及び「シグナルペプチド」は、本明細書中では同じ意味で使用される。他の実施形態では、ポリヌクレオチドに関する場合、「配列」はコード部分を意味する。各可能な形態は、本発明の異なる実施形態に相当する。

【0033】

他の実施形態では、「目的のペプチド」及び「目的のポリペプチド配列」は、本明細書中では同じ意味で使用される。他の実施形態では、目的のペプチドは、全長タンパク質である。他の実施形態では、前記目的のペプチドは、タンパク質断片である。各可能な形態

は、本発明の異なる実施形態に相当する。

【0034】

ある実施形態では、目的のポリペプチド配列に結合した少なくとも2つの絨毛性ゴナドトロピンのカルボキシ末端ペプチド（CTP）配列を含むポリペプチドであって、前記少なくとも2つのCTP配列のうちの第1のCTP配列が前記目的のポリペプチド配列のアミノ末端に結合され、前記少なくとも2つのCTP配列のうちの第2のCTP配列が前記目的のポリペプチド配列のカルボキシ末端に結合したポリペプチドが提供される。他の実施形態では、前記カルボキシ末端ペプチド（CTP）配列は、ヒト絨毛性ゴナドトロピンのCTP配列である。

【0035】

他の実施形態では、カルボキシ末端ペプチド（CTP）は、目的のポリペプチド配列に、リンカーを介して結合している。他の実施形態では、前記CTP配列を前記目的のポリペプチド配列に結合する前記リンカーは、共有結合である。他の実施形態では、前記CTP配列を前記目的のポリペプチド配列に結合する前記リンカーは、ペプチド結合である。他の実施形態では、前記CTP配列を前記目的のポリペプチド配列に結合する前記リンカーは、置換されたペプチド結合である。

【0036】

「目的のポリペプチド配列」という用語は、他の実施形態では、生物学的活性を有するポリペプチド配列を意味する。他の実施形態では、前記ペプチドは、グリコシル化されている。他の実施形態では、前記ペプチドは、グリコシル化されていない。循環半減期延長の利益を得るポリペプチドの例としては、これらに限定されるものではないが、エリスロポエチン（erythropoietin：EPO）、インターフェロン、ヒト成長ホルモン（human growth hormone：hGH）、及びグルカゴン様ペプチド-1（glucagon-like peptide-1：GLP-1）がある。

【0037】

他の実施形態では、前記ヒト絨毛性ゴナドトロピン（hCG）のカルボキシ末端ペプチド（CTP）は、タンパク質に融合している。他の実施形態では、前記ヒト絨毛性ゴナドトロピン（hCG）のカルボキシ末端ペプチド（CTP）は、糖タンパク質に融合している。他の実施形態では、前記ヒト絨毛性ゴナドトロピン（hCG）のカルボキシ末端ペプチド（CTP）は、糖タンパク質ホルモンに融合している。他の実施形態では、前記ヒト絨毛性ゴナドトロピン（hCG）のカルボキシ末端ペプチド（CTP）は、糖タンパク質ホルモンの由来するペプチドに融合している。いくつかの実施形態では、糖タンパク質ホルモンは、EPO、FSH又はTSH、或いはそれらに由来するペプチドを含む。

【0038】

いくつかの実施形態では、ポリペプチドのアミノ末端及びカルボキシ末端の両方のCTP配列は、タンパク質の分解に対する保護を向上させる。ある実施形態では、ポリペプチドのアミノ末端及びカルボキシ末端の両方のCTP配列は、結合したタンパク質の半減期を延長させる。

【0039】

いくつかの実施形態では、ポリペプチドのアミノ末端のCTP配列、前記ポリペプチドのカルボキシ末端のCTP配列、及び前記カルボキシ末端の前記CTP配列に直列に結合した少なくとも1つのさらなるCTP配列は、前記結合したタンパク質の分解に対する保護を向上させる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドのアミノ末端のCTP配列、前記ポリペプチドのカルボキシ末端のCTP配列、及び前記カルボキシ末端の前記CTP配列に直列に結合した少なくとも1つのさらなるCTP配列は、結合したタンパク質の半減期を延長させる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドのアミノ末端のCTP配列、前記ポリペプチドのカルボキシ末端のCTP配列、及び前記カルボキシ末端の前記CTP配列に直列に結合した少なくとも1つのさらなるCTP配列は、結合したタンパク質の活性を向上させる。

【0040】

いくつかの実施形態では、ポリペプチドのアミノ末端の C T P 配列、前記ポリペプチドのカルボキシ末端の C T P 配列、及び前記アミノ末端の前記 C T P 配列に直列に結合した少なくとも 1 つのさらなる C T P 配列は、前記結合したタンパク質の分解に対する保護を向上させる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドのアミノ末端の C T P 配列、前記ポリペプチドのカルボキシ末端の C T P 配列、及び前記アミノ末端の前記 C T P 配列に直列に結合した少なくとも 1 つのさらなる C T P 配列は、結合したタンパク質の半減期を延長させる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドのアミノ末端の C T P 配列、前記ポリペプチドのカルボキシ末端の C T P 配列、及び前記アミノ末端の前記 C T P 配列に直列に結合した少なくとも 1 つのさらなる C T P 配列は、結合したタンパク質の活性を向上させる。

10

【0041】

他の実施形態では、本発明のカルボキシ末端ペプチド (C T P) は、配列番号 17 番に記載のヒト絨毛性ゴナドトロピンのアミノ酸位置 112 ~ 145 から成るアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、本発明のカルボキシ末端ペプチド (C T P) は、配列番号 18 番に記載のヒト絨毛性ゴナドトロピンのアミノ酸位置 118 ~ 145 から成るアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、前記 C T P 配列はまた、ヒト絨毛性ゴナドトロピンのアミノ酸位置 112 ~ 118 の間の任意の位置から始まり、アミノ酸位置 145 で終端する。いくつかの実施形態では、前記 C T P 配列ペプチドは、C T P アミノ酸配列の位置 112、113、114、115、116、117 又は 118 から始まり、28、29、30、31、32、33 又は 34 のアミノ酸長さを有する。

20

【0042】

他の実施形態では、前記 C T P ペプチドは、米国特許第 5、712、122 号に開示されているように、1 ~ 5 個の同類アミノ酸置換によって天然 C T P と異ならせた、絨毛性ゴナドトロピン C T P の変異型である。他の実施形態では、前記 C T P ペプチドは、1 個の同類アミノ酸置換によって天然 C T P と異ならせた、絨毛性ゴナドトロピン C T P の変異型である。他の実施形態では、前記 C T P ペプチドは、2 個の同類アミノ酸置換によって天然 C T P と異ならせた、絨毛性ゴナドトロピン C T P の変異型である。他の実施形態では、前記 C T P ペプチドは、3 個の同類アミノ酸置換によって天然 C T P と異ならせた、絨毛性ゴナドトロピン C T P の変異型である。他の実施形態では、前記 C T P ペプチドは、4 個の同類アミノ酸置換によって天然 C T P と異ならせた、絨毛性ゴナドトロピン C T P の変異型である。他の実施形態では、前記 C T P ペプチドは、5 個の同類アミノ酸置換によって天然 C T P と異ならせた、絨毛性ゴナドトロピン C T P の変異型である。他の実施形態では、本発明の C T P ペプチドアミノ酸配列は、天然 C T P アミノ酸配列又はそのペプチドと少なくとも 70 % 相同する。他の実施形態では、本発明の C T P ペプチドアミノ酸配列は、天然 C T P アミノ酸配列又はそのペプチドと少なくとも 80 % 相同する。他の実施形態では、本発明の C T P ペプチドアミノ酸配列は、天然 C T P アミノ酸配列又はそのペプチドと少なくとも 90 % 相同する。他の実施形態では、本発明の C T P ペプチドアミノ酸配列は、天然 C T P アミノ酸配列又はそのペプチドと少なくとも 95 % 相同する。

30

【0043】

他の実施形態では、本発明の C T P ペプチドの D N A 配列は、天然 C T P 又はそのペプチドの D N A 配列と少なくとも 70 % 相同する。他の実施形態では、本発明の C T P ペプチドの D N A 配列は、天然 C T P 又はそのペプチドの D N A 配列と少なくとも 80 % 相同する。他の実施形態では、本発明の C T P ペプチドの D N A 配列は、天然 C T P 又はそのペプチドの D N A 配列と少なくとも 90 % 相同する。他の実施形態では、本発明の C T P ペプチドの D N A 配列は、天然 C T P 又はそのペプチドの D N A 配列と少なくとも 95 % 相同する。

40

【0044】

他の実施形態では、前記絨毛性ゴナドトロピン・C T P アミノ酸配列の少なくとも 1 つが切断されている。他の実施形態では、前記絨毛性ゴナドトロピン・C T P アミノ酸配列

50

の両方が切断されている。他の実施形態では、前記絨毛性ゴナドトロピン・C T Pアミノ酸配列の2つが切断されている。他の実施形態では、前記絨毛性ゴナドトロピン・C T Pアミノ酸配列の2つ以上が切断されている。他の実施形態では、前記絨毛性ゴナドトロピン・C T Pアミノ酸配列の全てが切断されている。他の実施形態では、前記切断されたC T Pは、配列番号43に記載の配列における最初の10個のアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、前記切断されたC T Pは、配列番号43に記載の配列における最初の11個のアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、前記切断されたC T Pは、配列番号43に記載の配列における最初の12個のアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、前記切断されたC T Pは、配列番号43に記載の配列における最初の13個のアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、前記切断されたC T Pは、配列番号43に記載の配列における最初の14個のアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、前記切断されたC T Pは、配列番号43に記載の配列における最初の15個のアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、前記切断されたC T Pは、配列番号43に記載の配列における最初の16個のアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、前記切断されたC T Pは、配列番号43に記載の配列における最初の17個のアミノ酸配列を含む。各可能な形態は、本発明の異なる実施形態に相当する。

【0045】

他の実施形態では、前記絨毛性ゴナドトロピン・C T Pアミノ酸配列の少なくとも1つがグリコシル化されている。他の実施形態では、前記絨毛性ゴナドトロピン・C T Pアミノ酸配列の両方がグリコシル化されている。他の実施形態では、前記絨毛性ゴナドトロピン・C T Pアミノ酸配列の2つがグリコシル化されている。他の実施形態では、前記絨毛性ゴナドトロピン・C T Pアミノ酸配列の2つ以上がグリコシル化されている。他の実施形態では、前記絨毛性ゴナドトロピン・C T Pアミノ酸配列の全てがグリコシル化されている。他の実施形態では、本発明のC T P配列は、少なくとも1つの糖鎖付加部位を含む。他の実施形態では、本発明のC T P配列は、2つの糖鎖付加部位を含む。他の実施形態では、本発明のC T P配列は、3つの糖鎖付加部位を含む。他の実施形態では、本発明のC T P配列は、4つの糖鎖付加部位を含む。

【0046】

いくつかの実施形態では、エリスロポエチン（erythropoietin：E P O）が、本発明の教示に従って使用される。いくつかの実施形態では、アミノ酸配列をエンコードする任意のE P OがE P O配列である。いくつかの実施形態では、核酸配列をエンコードする任意のE P OがE P O配列である。いくつかの実施形態では、C T P配列を、E P Oタンパク質のアミノ末端及びカルボキシ末端の両方に結合させることにより、組み換え型E P O並びにE P O及びC T Pの他の組み合わせと比較して、赤血球生成を促進する効力が高まる（図3～5、及び実施例4の表6）。いくつかの実施形態では、3つのC T P配列と結合したE P Oはその受容体との結合を妨げない。このことは、3つのC T P配列と結合したE P Oが野生型E P Oと同じ程度でT F-1細胞の増殖促進に対して効果的であることを実証した、実施例3の表4に証明されている。いくつかの実施形態では、本発明のE P O-C T Pポリペプチドは、配列番号3及び配列番号6に記載の配列である。

【0047】

ある実施形態では、「エリスロポエチン」は、哺乳類のエリスロポエチンである。ある実施形態では、「エリスロポエチン」は、遺伝子バンク・アクセス番号A A A 5 2 4 0 0に記載されているような、ヒトのエリスロポエチンである。

【0048】

ある実施形態では、本発明のエリスロポエチン（E P O）配列は、その相同体を含む。ある実施形態では、本発明のエリスロポエチン・アミノ酸配列は、国立バイオテクノロジー情報センター（National Center of Biotechnology Information：N C B I）のB l a s t Pソフトウェアを使用し、デフォルトパラメータを用いて測定した際に、遺伝子バンク・アクセス番号A A A 5 2 4 0 0に記載のエリスロポエチン配列と少なくとも50%相同する。ある実施形態では、本発明のエリスロポエチン・アミノ酸配列は、国立バイオテクノロジー情報センター（N C B I）のB l a s t Pソフトウェアを使用し、デフォルト

パラメータを用いて測定した際に、遺伝子バンク・アクセス番号 A A A 5 2 4 0 0 に記載のエリスロポエチン配列と少なくとも 6 0 % 相同する。ある実施形態では、本発明のエリスロポエチン・アミノ酸配列は、国立バイオテクノロジー情報センター (N C B I) の B l a s t P ソフトウェアを使用し、デフォルトパラメータを用いて測定した際に、遺伝子バンク・アクセス番号 A A A 5 2 4 0 0 に記載のエリスロポエチン配列と少なくとも 7 0 % 相同する。ある実施形態では、本発明のエリスロポエチン・アミノ酸配列は、国立バイオテクノロジー情報センター (N C B I) の B l a s t P ソフトウェアを使用し、デフォルトパラメータを用いて測定した際に、遺伝子バンク・アクセス番号 A A A 5 2 4 0 0 に記載のエリスロポエチン配列と少なくとも 8 0 % 相同する。ある実施形態では、本発明のエリスロポエチン・アミノ酸配列は、国立バイオテクノロジー情報センター (N C B I) の B l a s t P ソフトウェアを使用し、デフォルトパラメータを用いて測定した際に、遺伝子バンク・アクセス番号 A A A 5 2 4 0 0 に記載のエリスロポエチン配列と少なくとも 9 0 % 相同する。ある実施形態では、本発明のエリスロポエチン・アミノ酸配列は、国立バイオテクノロジー情報センター (N C B I) の B l a s t P ソフトウェアを使用し、デフォルトパラメータを用いて測定した際に、遺伝子バンク・アクセス番号 A A A 5 2 4 0 0 に記載のエリスロポエチン配列と少なくとも 9 5 % 相同する。

【0049】

他の実施形態では、本発明の方法は、貧血を治療するための E P O ペプチドであって、その N 末端に少なくとも 1 つの C T P アミノ酸ペプチドを有し、その C 末端に少なくとも 1 つの C T P アミノ酸ペプチドを有する E P O ペプチドを提供する。他の実施形態では、本発明の方法は、貧血を治療するための E P O ペプチドであって、その N 末端に 1 つの C T P アミノ酸ペプチドを有し、その C 末端に 2 つの C T P アミノ酸ペプチドを有する E P O ペプチドを提供する。他の実施形態では、本発明の方法は、貧血を治療するための E P O ペプチドであって、その N 末端に少なくとも 1 つの C T P アミノ酸ペプチドを有する配列番号 1 に記載の E P O ペプチドを提供する。他の実施形態では、本発明の方法は、貧血を治療するための E P O ペプチドであって、その N 末端に少なくとも 1 つの C T P アミノ酸ペプチドを有し、その C 末端に少なくとも 1 つの C T P アミノ酸ペプチドを有する配列番号 1 に記載の E P O ペプチドを提供する。他の実施形態では、本発明の方法は、貧血を治療するための E P O ペプチドであって、その N 末端に少なくとも 1 つの C T P アミノ酸ペプチドを有し、その C 末端に少なくとも 1 つの C T P アミノ酸ペプチドを有する配列番号 2 に記載の E P O ペプチドを提供する。他の実施形態では、本発明の方法は、貧血を治療するための E P O ペプチドであって、その N 末端に少なくとも 1 つの C T P アミノ酸ペプチドを有し、その C 末端に少なくとも 1 つの C T P アミノ酸ペプチドを有する配列番号 3 に記載の E P O ペプチドを提供する。他の実施形態では、本発明の方法は、貧血を治療するための E P O ペプチドであって、その N 末端に少なくとも 1 つの C T P アミノ酸ペプチドを有し、その C 末端に少なくとも 1 つの C T P アミノ酸ペプチドを有する配列番号 4 に記載の E P O ペプチドを提供する。他の実施形態では、本発明の方法は、貧血を治療するための E P O ペプチドであって、その N 末端に少なくとも 1 つの C T P アミノ酸ペプチドを有し、その C 末端に少なくとも 1 つの C T P アミノ酸ペプチドを有する配列番号 5 に記載の E P O ペプチドを提供する。他の実施形態では、本発明の方法は、貧血を治療するための E P O ペプチドであって、その N 末端に少なくとも 1 つの C T P アミノ酸ペプチドを有し、その C 末端に少なくとも 1 つの C T P アミノ酸ペプチドを有する配列番号 6 に記載の E P O ペプチドを提供する。他の実施形態では、本発明の方法は、貧血を治療するための E P O ペプチドであって、その N 末端に少なくとも 1 つの C T P アミノ酸ペプチドを有し、その C 末端に少なくとも 1 つの C T P アミノ酸ペプチドを有する配列番号 1 6 に記載の E P O ペプチドを提供する。他の実施形態では、本発明の方法は、貧血を治療するための E P O ペプチドであって、その N 末端に少なくとも 1 つの C T P アミノ酸ペプチドを有し、その C 末端に少なくとも 1 つの C T P アミノ酸ペプチドを有する配列番号 2 2 に記載の E P O ペプチドを提供する。

【0050】

他の実施形態では、本発明に係る方法は、貧血を治療するための核酸配列であって、そのN末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有するEPOペプチドをエンコードする核酸配列を提供する。他の実施形態では、本発明に係る方法は、貧血を治療するための核酸配列であって、そのN末端に1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に2つのCTPアミノ酸ペプチドを有するEPOペプチドをエンコードする核酸配列を提供する。他の実施形態では、本発明に係る方法は、貧血を治療するための核酸配列であって、そのN末端に1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有するEPOペプチドをエンコードする配列番号20に記載の核酸配列を提供する。他の実施形態では、本発明に係る方法は、貧血を治療するための核酸配列であって、そのN末端に1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に2つのCTPアミノ酸ペプチドを有するEPOペプチドをエンコードする配列番号21に記載の核酸配列を提供する。

【 0 0 5 1 】

[illegible]

【 0 0 5 2 】

他の実施形態では、本発明に係る方法は、貧血を抑制するための核酸配列であって、そのN末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有するEPOペプチドをエンコードする核酸配列を提供する。他の実施形態では、本発明に係る方法は、貧血を抑制するための核酸配列であって、

そのN末端に1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に2つのCTPアミノ酸ペプチドを有するEPOペプチドをエンコードする核酸配列を提供する。他の実施形態では、本発明に係る方法は、貧血を抑制するための核酸配列であって、そのN末端に1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有するEPOペプチドをエンコードする配列番号20に記載の核酸配列を提供する。他の実施形態では、本発明に係る方法は、貧血を抑制するための核酸配列であって、そのN末端に1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に2つのCTPアミノ酸ペプチドを有するEPOペプチドをエンコードする配列番号21に記載の核酸配列を提供する。

【 0 0 5 3 】

[illegible]

【 0 0 5 4 】

他の実施形態では、本発明に係る方法は、腫瘍関連貧血を治療するための核酸配列であって、そのN末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有するEPOペプチドをエンコードする核酸配列を提供する。他の実施形態では、本発明に係る方法は、腫瘍関連貧血を治療するための核酸配列であって、そのN末端に1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に2つのCTPアミノ酸ペプチドを有するEPOペプチドをエンコードする核酸配列を提供する。

【 0 0 5 5 】

【 0 0 5 6 】

他の実施形態では、本発明に係る方法は、腫瘍関連貧血を抑制するための核酸配列であって、そのN末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有するEPOペプチドをエンコードする核酸配列を提供する。他の実施形態では、本発明に係る方法は、腫瘍関連貧血を抑制するための核酸配列であって、そのN末端に1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に2つのCTPアミノ酸ペプチドを有するEPOペプチドをエンコードする核酸配列を提供する。他の実施形態では、本発明に係る方法は、腫瘍関連貧血を抑制するための核酸配列であ

【 0 0 5 7 】

【 0 0 5 8 】

他の実施形態では、本発明に係る方法は、腫瘍低酸素症を治療するための核酸配列であって、そのN末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有するEPOペプチドをエンコードする核酸配列を提供する。他の実施形態では、本発明に係る方法は、腫瘍低酸素症を治療するための核酸配列であって、そのN末端に1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に2つのCTPアミノ酸ペプチドを有するEPOペプチドをエンコードする核酸配列を提供する。他の実施形態では、本発明に係る方法は、腫瘍低酸素症を治療するための核酸配列であって、そのN末端に1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に少なくとも1つ

【 0 0 5 9 】

40

【 0 0 6 0 】

50

10

20

30

40

10

【 0 0 6 3 】

20

30

40

50

【 0 0 6 4 】

10

【 0 0 6 5 】

20

30

40

【0066】

他の実施形態では、本発明に係る方法は、幹細胞移植を向上させるための核酸配列であって、そのN末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有するEPOペプチドをエンコードする核酸配列を提供する。他の実施形態では、本発明に係る方法は、幹細胞移植を向上させるための核酸配列であって、そのN末端に1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に2つのCTPアミノ酸ペプチドを有するEPOペプチドをエンコードする核酸配列を提供する。他の実施形態では、本発明に係る方法は、幹細胞移植を向上させるための核酸配列であって、そのN末端に1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有するEPOペプチドをエンコードする配列番号20に記載の核酸配列を提供する。他の実施形態では、本発明に係る方法は、幹細胞移植を向上させるための核酸配列であって、そのN末端に1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に2つのCTPアミノ酸ペプチドを有するEPOペプチドをエンコードする配列番号21に記載の核酸配列を提供する。

10

【0067】

他の実施形態では、本発明に係る方法は、再生不良性貧血又は骨髓異形成症候群の患者の生存率を増加させるためのEPOペプチドであって、そのN末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有するEPOペプチドを提供する。他の実施形態では、本発明に係る方法は、再生不良性貧血又は骨髓異形成症候群の患者の生存率を増加させるためのEPOペプチドであって、そのN末端に1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に2つのCTPアミノ酸ペプチドを有するEPOペプチドを提供する。他の実施形態では、本発明に係る方法は、再生不良性貧血又は骨髓異形成症候群の患者の生存率を増加させるためのEPOペプチドであって、そのN末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有する配列番号1に記載のEPOペプチドを提供する。他の実施形態では、本発明に係る方法は、再生不良性貧血又は骨髓異形成症候群の患者の生存率を増加させるためのEPOペプチドであって、そのN末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有する配列番号1に記載のEPOペプチドを提供する。他の実施形態では、本発明に係る方法は、再生不良性貧血又は骨髓異形成症候群の患者の生存率を増加させるためのEPOペプチドであって、そのN末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有する配列番号2に記載のEPOペプチドを提供する。他の実施形態では、本発明に係る方法は、再生不良性貧血又は骨髓異形成症候群の患者の生存率を増加させるためのEPOペプチドであって、そのN末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有する配列番号3に記載のEPOペプチドを提供する。他の実施形態では、本発明に係る方法は、再生不良性貧血又は骨髓異形成症候群の患者の生存率を増加させるためのEPOペプチドであって、そのN末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有する配列番号4に記載のEPOペプチドを提供する。他の実施形態では、本発明に係る方法は、再生不良性貧血又は骨髓異形成症候群の患者の生存率を増加させるためのEPOペプチドであって、そのN末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有する配列番号5に記載のEPOペプチドを提供する。他の実施形態では、本発明に係る方法は、再生不良性貧血又は骨髓異形成症候群の患者の生存率を増加させるためのEPOペプチドであって、そのN末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有する配列番号6に記載のEPOペプチドを提供する。他の実施形態では、本発明に係る

20

30

40

50

方法は、再生不良性貧血又は骨髓異形成症候群の患者の生存率を増加させるためのEPOペプチドであって、そのN末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有する配列番号22に記載のEPOペプチドを提供する。

【0068】

他の実施形態では、本発明に係る方法は、再生不良性貧血又は骨髓異形成症候群の患者の生存率を増加させるための治療するための核酸配列であって、そのN末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有するEPOペプチドをエンコードする核酸配列を提供する。他の実施形態では、本発明に係る方法は、再生不良性貧血又は骨髓異形成症候群の患者の生存率を増加させるための核酸配列であって、そのN末端に1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に2つのCTPアミノ酸ペプチドを有するEPOペプチドをエンコードする核酸配列を提供する。他の実施形態では、本発明に係る方法は、再生不良性貧血又は骨髓異形成症候群の患者の生存率を増加させるための核酸配列であって、そのN末端に1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有するEPOペプチドをエンコードする配列番号20に記載の核酸配列を提供する。他の実施形態では、本発明に係る方法は、再生不良性貧血又は骨髓異形成症候群の患者の生存率を増加させるための核酸配列であって、そのN末端に1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に2つのCTPアミノ酸ペプチドを有するEPOペプチドをエンコードする配列番号21に記載の核酸配列を提供する。

【0069】

いくつかの実施形態では、本発明における相同体は、その欠損変異型、挿入変異型、又は置換変異型（アミノ酸置換型を含む）、及びその生物活性ポリペプチド断片を包含する。ある実施形態では、前記置換変異型は、エリスロポエチン・アミノ酸配列において、位置104のグリシンがセリンに置換されたものを含む（配列番号22）。

【0070】

いくつかの実施形態では、ヒト成長ホルモン（human growth hormone：hGH）が、本発明の教示に従って使用される。ある実施形態では、CTP配列を、hGHタンパク質のアミノ末端及びカルボキシ末端の両方に結合させることにより、効力が増大される（図11）。いくつかの実施形態では、CTP配列を、hGHタンパク質のアミノ末端及びカルボキシ末端の両方に結合させることにより、インビボ活性が長期間持続される。ある実施形態では、本発明のCTP-hGHポリペプチドは、配列番号39～41に記載のものである。

【0071】

ある実施形態では、「ヒト成長ホルモン（human growth hormone：hGH）」は、遺伝子バンク・アクセス番号P01241（配列番号47）に記載のポリペプチドであり、hGH活性を示す（すなわち、成長を促進する）。

【0072】

ある実施形態では、「ヒト成長ホルモン（hGH）」は、遺伝子バンク・アクセス番号P01241（配列番号47）に記載のポリペプチドであり、hGH活性を示す（すなわち、成長を促進する）。ある実施形態では、本発明のhGHは、その相同体を含む。ある実施形態では、国立バイオテクノロジー情報センター（NCBI）のBLASTソフトウェアを使用し、デフォルトパラメータを用いて測定した際に、本発明のhGHアミノ酸配列は、遺伝子バンク・アクセス番号P01241に記載のhGH配列と少なくとも50%相同する。ある実施形態では、国立バイオテクノロジー情報センター（NCBI）のBLASTソフトウェアを使用し、デフォルトパラメータを用いて測定した際に、本発明のhGHアミノ酸配列は、遺伝子バンク・アクセス番号P01241に記載のhGH配列と少なくとも60%相同する。ある実施形態では、国立バイオテクノロジー情報センター（NCBI）のBLASTソフトウェアを使用し、デフォルトパラメータを用いて測定した際に、本発明のhGHアミノ酸配列は、遺伝子バンク・アクセス番号P01241に

記載の h G H 配列と少なくとも 70 % 相同する。ある実施形態では、国立バイオテクノロジー情報センター (NCBI) の B l a s t P ソフトウェアを使用し、デフォルトパラメータを用いて測定した際に、本発明の h G H アミノ酸配列は、遺伝子バンク・アクセス番号 P 0 1 2 4 1 に記載の h G H 配列と少なくとも 80 % 相同する。ある実施形態では、国立バイオテクノロジー情報センター (NCBI) の B l a s t P ソフトウェアを使用し、デフォルトパラメータを用いて測定した際に、本発明の h G H アミノ酸配列は、遺伝子バンク・アクセス番号 P 0 1 2 4 1 に記載の h G H 配列と少なくとも 90 % 相同する。ある実施形態では、国立バイオテクノロジー情報センター (NCBI) の B l a s t P ソフトウェアを使用し、デフォルトパラメータを用いて測定した際に、本発明の h G H アミノ酸配列は、遺伝子バンク・アクセス番号 P 0 1 2 4 1 に記載の h G H 配列と少なくとも 95 % 相同する。

10

【0073】

本発明の C T P - h G H ポリペプチドの例示的なものは、配列番号 39、40 及び 41 に記載のものである。

【0074】

他の実施形態では、本発明に係る方法は、筋成長を促進するための h G H ペプチドであって、その N 末端に少なくとも 1 つの C T P アミノ酸ペプチドを有し、その C 末端に少なくとも 1 つの C T P アミノ酸ペプチドを有する h G H ペプチドを提供する。他の実施形態では、本発明に係る方法は、筋成長を促進するための h G H ペプチドであって、その N 末端に 1 つの C T P アミノ酸ペプチドを有し、その C 末端に 2 つの C T P アミノ酸ペプチドを有する h G H ペプチドを提供する。他の実施形態では、本発明に係る方法は、筋成長を促進するための h G H ペプチドであって、その N 末端に少なくとも 1 つの C T P アミノ酸ペプチドを有し、その C 末端に少なくとも 1 つの C T P アミノ酸ペプチドを有する配列番号 23 に記載の h G H ペプチドを提供する。他の実施形態では、本発明に係る方法は、筋成長を促進するための h G H ペプチドであって、その N 末端に少なくとも 1 つの C T P アミノ酸ペプチドを有し、その C 末端に少なくとも 1 つの C T P アミノ酸ペプチドを有する配列番号 36 に記載の h G H ペプチドを提供する。他の実施形態では、本発明に係る方法は、筋成長を促進するための h G H ペプチドであって、その N 末端に少なくとも 1 つの C T P アミノ酸ペプチドを有する配列番号 37 に記載の h G H ペプチドを提供する。他の実施形態では、本発明に係る方法は、筋成長を促進するための h G H ペプチドであって、その N 末端に少なくとも 1 つの C T P アミノ酸ペプチドを有する配列番号 38 に記載の h G H ペプチドを提供する。他の実施形態では、本発明に係る方法は、筋成長を促進するための h G H ペプチドであって、配列番号 39 に記載の h G H ペプチドを提供する。他の実施形態では、本発明に係る方法は、筋成長を促進するための h G H ペプチドであって、配列番号 40 に記載の h G H ペプチドを提供する。他の実施形態では、本発明に係る方法は、筋成長を促進するための h G H ペプチドであって、配列番号 41 に記載の h G H ペプチドを提供する。他の実施形態では、本発明に係る方法は、筋成長を促進するための h G H ペプチドであって、その N 末端に少なくとも 1 つの C T P アミノ酸ペプチドを有する配列番号 42 に記載の h G H ペプチドを提供する。他の実施形態では、本発明に係る方法は、筋成長を促進するための h G H ペプチドであって、配列番号 44 に記載の h G H ペプチドを提供する。

20

30

40

【0075】

他の実施形態では、本発明に係る方法は、筋成長を促進するための核酸配列であって、その N 末端に少なくとも 1 つの C T P アミノ酸ペプチドを有し、その C 末端に少なくとも 1 つの C T P アミノ酸ペプチドを有する h G H ペプチドをエンコードする核酸配列を提供する。他の実施形態では、本発明に係る方法は、筋成長を促進するための核酸配列であって、その N 末端に 1 つの C T P アミノ酸ペプチドを有し、その C 末端に 2 つの C T P アミノ酸ペプチドを有する h G H ペプチドをエンコードする核酸配列を提供する。他の実施形態では、本発明に係る方法は、筋成長を促進するための核酸配列であって、その N 末端に 1 つの C T P アミノ酸ペプチドを有し、その C 末端に 2 つの C T P アミノ酸ペプチドを有

50

【 0 0 7 6 】

【 0 0 7 7 】

【 0 0 7 8 】

【 0 0 7 9 】

50

0

20

30

40

50

10

20

30

40

50

【 0 0 8 8 】

10

20

30

40

50

【 0 0 9 4 】

20

【 0 0 9 5 】

30

40

【 0 0 9 6 】

50

10

20

30

40

50

50

他の実施形態では、本発明に係る方法は、レム睡眠を回復させるためのhGHペプチドであって、そのN末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有するhGHペプチドを提供する。他の実施形態では、本発明に係る方法は、レム睡眠を回復させるためのhGHペプチドであって、そのN末端に1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に2つのCTPアミノ酸ペプチドを有するhGHペプチドを提供する。他の実施形態では、本発明に係る方法は、レム睡眠を回復させるためのhGHペプチドであって、そのN末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有する配列番号23に記載のhGHペプチドを提供する。他の実施形態では、本発明に係る方法は、レム睡眠を回復させるためのhGHペプチドであって、そのN末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有する配列番号36に記載のhGHペプチドを提供する。他の実施形態では、本発明に係る方法は、レム睡眠を回復させるためのhGHペプチドであって、そのN末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有する配列番号37に記載のhGHペプチドを提供する。他の実施形態では、本発明に係る方法は、レム睡眠を回復させるためのhGHペプチドであって、そのN末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有する配列番号38に記載のhGHペプチドを提供する。他の実施形態では、本発明に係る方法は、レム睡眠を回復させるためのhGHペプチドであって、配列番号39に記載のhGHペプチドを提供する。他の実施形態では、本発明に係る方法は、レム睡眠を回復させるためのhGHペプチドであって、配列番号40に記載のhGHペプチドを提供する。他の実施形態では、本発明に係る方法は、レム睡眠を回復させるためのhGHペプチドであって、配列番号41に記載のhGHペプチドを提供する。他の実施形態では、本発明に係る方

法は、レム睡眠を回復させるためのhGHペプチドであって、そのN末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有する配列番号42に記載のhGHペプチドを提供する。他の実施形態では、本発明に係る方法は、レム睡眠を回復させるためのhGHペプチドであって、配列番号44に記載のhGHペプチドを提供する。

【0102】

他の実施形態では、本発明に係る方法は、レム睡眠を回復させるための核酸配列であって、そのN末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有するhGHペプチドをエンコードする核酸配列を提供する。他の実施形態では、本発明に係る方法は、レム睡眠を回復させるための核酸配列であって、そのN末端に1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に2つのCTPアミノ酸ペプチドを有するhGHペプチドをエンコードする核酸配列を提供する。他の実施形態では、本発明に係る方法は、レム睡眠を回復させるための核酸配列であって、そのN末端に1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に2つのCTPアミノ酸ペプチドを有するhGHペプチドをエンコードする配列番号45に記載の核酸配列を提供する。他の実施形態では、本発明に係る方法は、レム睡眠を回復させるための核酸配列であって、そのN末端に1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に2つのCTPアミノ酸ペプチドを有するhGHペプチドをエンコードする配列番号46に記載の核酸配列を提供する。

【0103】

いくつかの実施形態では、本発明における相同体は、その欠損変異型、挿入変異型、又は置換変異型（アミノ酸置換型を含む）、及びその生物活性ポリペプチド断片を包含する。ある実施形態では、前記置換変異型は、hGHの位置65のグルタミンがバリンに置換されたものを含む（配列番号23）（Gellerfors et al., J Pharm Biomed Anal 1989, 7:173-83）。

【0104】

いくつかの実施形態では、インターフェロンが、本発明の教示に従って使用される。いくつかの実施形態では、CTP配列を、インターフェロンのアミノ末端及びカルボキシ末端の両方に結合させることにより、効力が増大される。ある実施形態では、CTP配列を、インターフェロタンパク質のアミノ末端及びカルボキシ末端の両方に結合させることにより、インビボ活性が長期間持続される。

【0105】

ある実施形態では、「インターフェロン」は、哺乳類のインターフェロンI型ポリペプチドである。ある実施形態では、「インターフェロン」は、哺乳類のインターフェロンII型ポリペプチドである。いくつかの実施形態では、当業者に周知の他の適切なインターフェロン・ポリペプチドが使用される。いくつかの実施形態では、前記インターフェロンは、アルファ・インターフェロンである。いくつかの実施形態では、前記インターフェロンは、ベータ・インターフェロンである。いくつかの実施形態では、前記インターフェロンは、ガンマ・インターフェロンである。いくつかの実施形態では、前記インターフェロンは、オメガ・インターフェロンである。いくつかの実施形態では、前記インターフェロンは、亜種インターフェロンである。ある実施形態では、前記亜種インターフェロン（interferon: IFN）は、IFN- α 2aである。ある実施形態では、前記亜種インターフェロン（IFN）は、IFN- α 2bである。ある実施形態では、前記亜種インターフェロン（IFN）は、IFN- β 1aである。ある実施形態では、前記亜種インターフェロン（IFN）は、IFN- β 1bである。

【0106】

ある実施形態では、本発明のインターフェロンは、抗ウイルス作用又は抗増殖作用などのインターフェロン活性を示す。いくつかの実施形態では、これらに限定されるものではないが、インターフェロンの例の遺伝子バンク・アクセス番号が下記の表1に記載されている。

【0107】

ある実施形態では、本発明のインターフェロンは、その相同体も含む。ある実施形態では、国立バイオテクノロジー情報センター（NCBI）のBLASTソフトウェアを使用し、デフォルトパラメータを用いて測定した際に、本発明のインターフェロンアミノ酸配列は、表1に記載されたインターフェロン配列と少なくとも50%相同する。ある実施形態では、国立バイオテクノロジー情報センター（NCBI）のBLASTソフトウェアを使用し、デフォルトパラメータを用いて測定した際に、本発明のインターフェロンアミノ酸配列は、表1に記載されたインターフェロン配列と少なくとも60%相同する。ある実施形態では、国立バイオテクノロジー情報センター（NCBI）のBLASTソフトウェアを使用し、デフォルトパラメータを用いて測定した際に、本発明のインターフェロンアミノ酸配列は、表1に記載されたインターフェロン配列と少なくとも70%相同する。ある実施形態では、国立バイオテクノロジー情報センター（NCBI）のBLASTソフトウェアを使用し、デフォルトパラメータを用いて測定した際に、本発明のインターフェロンアミノ酸配列は、表1に記載されたインターフェロン配列と少なくとも80%相同する。ある実施形態では、国立バイオテクノロジー情報センター（NCBI）のBLASTソフトウェアを使用し、デフォルトパラメータを用いて測定した際に、本発明のインターフェロンアミノ酸配列は、表1に記載されたインターフェロン配列と少なくとも90%相同する。ある実施形態では、国立バイオテクノロジー情報センター（NCBI）のBLASTソフトウェアを使用し、デフォルトパラメータを用いて測定した際に、本発明のインターフェロンアミノ酸配列は、表1に記載されたインターフェロン配列と少なくとも95%相同する。いくつかの実施形態では、本発明における相同体は、その欠損変異型、挿入変異型、又は置換変異型（アミノ酸置換型を含む）、及びその生物活性ポリペプチド断片を包含する。ある実施形態では、インターフェロン β の位置17のシステインがセリンに置換されたものを含む（配列番号24）。

10

20

【0108】

下記の表1は、インターフェロンの例と、そのNCBI配列番号を示す。

【0109】

表1

インターフェロンの名称	NCBI 配列番号
インターフェロン, α 1	NP_076918.1
インターフェロン, α 10	NP_002162.1
インターフェロン, α 13	NP_008831.2
インターフェロン, α 14	NP_002163.1
インターフェロン, α 16	NP_002164.1
インターフェロン, α 17	NP_067091.1
インターフェロン, α 2	NP_000596.2
インターフェロン, α 21	NP_002166.1
インターフェロン, α 4	NP_066546.1
インターフェロン, α 5	NP_002160.1
インターフェロン, α 6	NP_066282.1
インターフェロン, α 7	NP_066401.2
インターフェロン, α 8	NP_002161.2
インターフェロン, β 1	NP_002167.1
インターフェロン, ϵ 1	NP_795372.1
インターフェロン, γ	NP_000610.2
インターフェロン, ϵ	NP_064509.1
インターフェロン, Ω 1	NP_002168.1

10

20

30

【0110】

他の実施形態では、本発明に係る方法は、多発性硬化症を治療又は抑制するためのインターフェロン β 1 ペプチドであって、そのN末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有するインターフェロン β 1 ペプチドを提供する。他の実施形態では、本発明に係る方法は、多発性硬化症を治療又は抑制するためのインターフェロン β 1 ペプチドであって、そのN末端に1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に2つのCTPアミノ酸ペプチドを有するインターフェロン β 1 ペプチドを提供する。他の実施形態では、本発明に係る方法は、多発性硬化症を治療又は抑制するためのインターフェロン β 1 ペプチドであって、そのN末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有する配列番号24に記載のインターフェロン β 1 ペプチドを提供する。他の実施形態では、本発明に係る方法は、多発性硬化症を治療又は抑制するためのインターフェロン β 1 ペプチドであって、そのN末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有する配列番号26に記載のインターフェロン β 1 ペプチドを提供する。

40

【0111】

いくつかの実施形態では、グルカゴン様ペプチド-1が、本発明の教示に従って使用される。いくつかの実施形態では、CTP配列を、「グルカゴン様ペプチド-1」のアミノ末端及びカルボキシ末端の両方に結合させることにより、効力が増大される。いくつかの

50

実施形態では、C T P 配列を、ペプチドのアミノ末端及びカルボキシ末端の両方に結合させることにより、インビボ活性が長期間持続される。いくつかの実施形態では、C T P 配列を、グルカゴン様ペプチドのアミノ末端及びカルボキシ末端の両方に結合させることにより、インビボ活性が長期間持続される。

【0112】

ある実施形態では、「グルカゴン様ペプチド-1 (glucagon-like peptide-1: G L P-1)」は、哺乳類のポリペプチドである。いくつかの実施形態では、「グルカゴン様ペプチド-1 (G L P-1)」は、ヒトのポリペプチドである。ある実施形態では、G L P-1 は、G L P-1 受容体と結合し、信号伝達経路を形成する能力を有するグルカゴンのプレプロタンパク質 (遺伝子バンク・I D 番号 N P 0 0 2 0 4 5) から切断され、その結果、インスリン分泌促進作用がもたらされる。ある実施形態では、「インスリン分泌促進作用」は、グルコースレベルの上昇に応じて、インスリンの分泌を促進する作用を意味する。このことにより、細胞によるグルコース摂取が誘導され、血漿グルコース値が減少する。いくつかの実施形態では、G L P-1・ポリペプチドは、これに限定されるものではないが、米国特許第 5、118、666 号に開示されているものを含む (この参照により本明細書に組み込まれる)。

【0113】

ある実施形態では、「G L P-1」は、配列番号 25 に記載のポリペプチドである。ある実施形態では、「G L P-1」は、G L P-1 の相同体である。ある実施形態では、本発明のエリスロポエチン又は E P O 配列は、その相同体を含む。ある実施形態では、本発明の G L P-1 アミノ酸配列は、国立バイオテクノロジー情報センター (N C B I) の B l a s t P ソフトウェアを使用し、デフォルトパラメータを用いて測定した際に、配列番号 25 に記載の G L P-1 配列と少なくとも 50 % 相同する。ある実施形態では、本発明の G L P-1 アミノ酸配列は、国立バイオテクノロジー情報センター (N C B I) の B l a s t P ソフトウェアを使用し、デフォルトパラメータを用いて測定した際に、配列番号 25 に記載の G L P-1 配列と少なくとも 60 % 相同する。ある実施形態では、本発明の G L P-1 アミノ酸配列は、国立バイオテクノロジー情報センター (N C B I) の B l a s t P ソフトウェアを使用し、デフォルトパラメータを用いて測定した際に、配列番号 25 に記載の G L P-1 配列と少なくとも 70 % 相同する。ある実施形態では、本発明の G L P-1 アミノ酸配列は、国立バイオテクノロジー情報センター (N C B I) の B l a s t P ソフトウェアを使用し、デフォルトパラメータを用いて測定した際に、配列番号 25 に記載の G L P-1 配列と少なくとも 80 % 相同する。ある実施形態では、本発明の G L P-1 アミノ酸配列は、国立バイオテクノロジー情報センター (N C B I) の B l a s t P ソフトウェアを使用し、デフォルトパラメータを用いて測定した際に、配列番号 25 に記載の G L P-1 配列と少なくとも 90 % 相同する。ある実施形態では、本発明の G L P-1 アミノ酸配列は、国立バイオテクノロジー情報センター (N C B I) の B l a s t P ソフトウェアを使用し、デフォルトパラメータを用いて測定した際に、配列番号 25 に記載の G L P-1 配列と少なくとも 95 % 相同する。

【0114】

他の実施形態では、本発明に係る方法は、2 型糖尿病を治療又は抑制するための G L P-1 ペプチドであって、その N 末端に少なくとも 1 つの C T P アミノ酸ペプチドを有し、その C 末端に少なくとも 1 つの C T P アミノ酸ペプチドを有する G L P-1 ペプチドを提供する。他の実施形態では、本発明に係る方法は、2 型糖尿病を治療又は抑制するための G L P-1 ペプチドであって、その N 末端に 1 つの C T P アミノ酸ペプチドを有し、その C 末端に 2 つの C T P アミノ酸ペプチドを有する G L P-1 ペプチドを提供する。他の実施形態では、本発明に係る方法は、2 型糖尿病を治療又は抑制するための配列番号 25 に記載の G L P-1 ペプチドであって、その N 末端に少なくとも 1 つの C T P アミノ酸ペプチドを有し、その C 末端に少なくとも 1 つの C T P アミノ酸ペプチドを有する、G L P-1 ペプチドを提供する。

【0115】

ある実施形態では、本発明における相同体は、その欠損変異型、挿入変異型、又は置換変異型（アミノ酸置換型を含む）、及びその生物活性ポリペプチド断片を包含する。

【0116】

ある実施形態では、前記目的のポリペプチド配列は、EPOである。ある実施形態では、前記目的のポリペプチド配列は、インターフェロンである。ある実施形態では、前記目的のポリペプチド配列は、hGHである。ある実施形態では、前記目的のポリペプチド配列は、GLP-1である。ある実施形態では、前記目的のポリペプチド配列は、インスリンである。ある実施形態では、前記目的のポリペプチド配列は、エンケファリンである。ある実施形態では、前記目的のポリペプチド配列は、ACTHである。ある実施形態では、前記目的のポリペプチド配列は、グルカゴンである。ある実施形態では、前記目的のポリペプチド配列は、インスリン様成長因子である。ある実施形態では、前記目的のポリペプチド配列は、上皮成長因子である。ある実施形態では、前記目的のポリペプチド配列は、酸性又は塩基性の線維芽細胞成長因子である。ある実施形態では、前記目的のポリペプチド配列は、血小板由来成長因子である。ある実施形態では、前記目的のポリペプチド配列は、顆粒球CSFである。ある実施形態では、前記目的のポリペプチド配列は、マクロファージCSFである。ある実施形態では、前記目的のポリペプチド配列は、IL-2である。ある実施形態では、前記目的のポリペプチド配列は、IL-3である。ある実施形態では、前記目的のポリペプチド配列は、腫瘍壊死因子である。ある実施形態では、前記目的のポリペプチド配列は、LHRHである。ある実施形態では、前記目的のポリペプチド配列は、LHRH類似体である。ある実施形態では、前記目的のポリペプチド配列は、ソマトスタチンである。ある実施形態では、前記目的のポリペプチド配列は、成長ホルモン放出ホルモンである。ある実施形態では、前記目的のポリペプチド配列は、エンドルフィンである。ある実施形態では、前記目的のポリペプチド配列は、肺胞界面活性タンパク質である。ある実施形態では、前記目的のポリペプチド配列は、ナトリウム排出増加因子である。ある実施形態では、前記目的のポリペプチド配列は、付着因子である。ある実施形態では、前記目的のポリペプチド配列は、アンギオスタチンである。ある実施形態では、前記目的のポリペプチド配列は、エンドスタチンである。ある実施形態では、前記目的のポリペプチド配列は、受容体ペプチドである。ある実施形態では、前記目的のポリペプチド配列は、受容体結合リガンドである。ある実施形態では、前記目的のポリペプチド配列は、抗体である。ある実施形態では、前記目的のポリペプチド配列は、抗体断片である。ある実施形態では、前記目的のポリペプチド配列は、任意の変異型を含むペプチド又はタンパク質である。

【0117】

他の実施形態では、本発明の前記ペプチドは、そのN末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に1つのCTPアミノ酸ペプチドを有する目的のペプチドを含む。そのN末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に1つのCTPアミノ酸ペプチドを有する前記目的のペプチドは、次のリストから選択されるタンパク質を含む。インスリン、アルブテイン／アルブミン、Activase (alteplase) / tPA、アデノシンデアミナーゼ、免疫グロブリン、グルコセレブロシダーゼ、Leukine (sargraraostira) / GM-CSF、G-CSF、ベノグロブリン-S / IgG、プロリュウキン（アルデスロイキン）、DNase、第VII因子、Helixate、L-アスパラギナーゼ、WinRho SDF Rh I、Retavase (reteplase) / tPA、第IX因子、FSH、グロブリン、フィブリン、インターロイキン-11、ベカプレルミン / PDGF、レピルジン／ヒルジン、TNF、サイモグロブリン、第VIIa活性化因子、インターフェロン α -2a、インターフェロン α -n1、インターフェロン α -n3、インターフェロン β -1b、インターフェロン γ -1b、インターロイキン-2、hGH、又はモノクローナル抗体。

【0118】

他の実施形態では、本発明に係る方法は、糖尿病を治療するためのインスリンであって、そのN末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に少なくと

も1つのCTPアミノ酸ペプチドを有するインスリンを提供する。

【0119】

他の実施形態では、本発明に係る方法は、血液量減少性ショックの治療、血液透析又は心肺バイパスのためのアルブミンであって、そのN末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有するアルブミンを提供する。

【0120】

他の実施形態では、本発明に係る方法は、急性心筋梗塞、重症急性肺塞栓症、又は（通じて変化する）虚血性脳卒を治療するためのActivase (alteplase) / tPAであって、そのN末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有するActivase (alteplase) / tPAを提供する。

10

【0121】

他の実施形態では、本発明に係る方法は、重症複合型免疫不全症を治療するためのアデノシンデアミナーゼであって、そのN末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有するアデノシンデアミナーゼを提供する。

【0122】

他の実施形態では、本発明に係る方法は、移植者を治療するための免疫グロブリンであって、そのN末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有する免疫グロブリンを提供する。他の実施形態では、本発明に係る方法が提供する免疫グロブリンは、CMV免疫グロブリンである。

20

【0123】

他の実施形態では、本発明に係る方法は、ゴーシェ病を治療するためのグルコセレブロシダーゼであって、そのN末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有するグルコセレブロシダーゼを提供する。

【0124】

他の実施形態では、本発明に係る方法は、造血系前駆細胞を刺激するためのLeukine (sargraraostira) / GM-CSFであって、そのN末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有するLeukine (sargraraostira) / GM-CSFを提供する。

30

【0125】

他の実施形態では、本発明に係る方法は、好中球減少症を治療するためのG-CSFであって、そのN末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有するG-CSFを提供する。

【0126】

他の実施形態では、本発明に係る方法は、免疫不全症を治療するためのベノグロブリン-S / IgGであって、そのN末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有するベノグロブリン-S / IgGを提供する。

40

【0127】

他の実施形態では、本発明に係る方法は、腎臓癌又は転移性メラノーマを治療するためのプロリュウキン（アルデスロイキン）であって、そのN末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有するプロリュウキン（アルデスロイキン）を提供する。

【0128】

他の実施形態では、本発明に係る方法は、嚢胞性線維症を治療するためのDNaseであって、そのN末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有するDNaseを提供する。

【0129】

50

他の実施形態では、本発明に係る方法は、血友病 A を治療するための第 V I I I 因子であって、その N 末端に少なくとも 1 つの C T P アミノ酸ペプチドを有し、その C 末端に少なくとも 1 つの C T P アミノ酸ペプチドを有する第 V I I I 因子を提供する。

【0130】

他の実施形態では、本発明に係る方法は、急性リンパ性白血病を治療するための Helixate であって、その N 末端に少なくとも 1 つの C T P アミノ酸ペプチドを有し、その C 末端に少なくとも 1 つの C T P アミノ酸ペプチドを有する Helixate を提供する。

【0131】

他の実施形態では、本発明に係る方法は、急性リンパ性白血病を治療するための L-アスパラギナーゼであって、その N 末端に少なくとも 1 つの C T P アミノ酸ペプチドを有し、その C 末端に少なくとも 1 つの C T P アミノ酸ペプチドを有する L-アスパラギナーゼを提供する。

【0132】

他の実施形態では、本発明に係る方法は、Rh 同種免疫及び免疫性血小板減少性紫斑病を治療するための WinRho SDF Rh IgG であって、その N 末端に少なくとも 1 つの C T P アミノ酸ペプチドを有し、その C 末端に少なくとも 1 つの C T P アミノ酸ペプチドを有する WinRho SDF Rh IgG を提供する。

【0133】

他の実施形態では、本発明に係る方法は、急性心筋梗塞を治療するための Retavase (reteplase) / t P A であって、その N 末端に少なくとも 1 つの C T P アミノ酸ペプチドを有し、その C 末端に少なくとも 1 つの C T P アミノ酸ペプチドを有する Retavase (reteplase) / t P A を提供する。

【0134】

他の実施形態では、本発明に係る方法は、B 型血友病を治療するための第 I X 因子であって、その N 末端に少なくとも 1 つの C T P アミノ酸ペプチドを有し、その C 末端に少なくとも 1 つの C T P アミノ酸ペプチドを有する第 I X 因子を提供する。

【0135】

他の実施形態では、本発明に係る方法は、生殖補助中の排卵を促進するため F S H であって、その N 末端に少なくとも 1 つの C T P アミノ酸ペプチドを有し、その C 末端に少なくとも 1 つの C T P アミノ酸ペプチドを有する F S H を提供する。

【0136】

他の実施形態では、本発明に係る方法は、呼吸器合胞体ウイルス疾患を治療するためのグロブリンであって、その N 末端に少なくとも 1 つの C T P アミノ酸ペプチドを有し、その C 末端に少なくとも 1 つの C T P アミノ酸ペプチドを有するグロブリンを提供する。

【0137】

他の実施形態では、本発明に係る方法は、創傷管理及び止血のためのフィブリンであって、その N 末端に少なくとも 1 つの C T P アミノ酸ペプチドを有し、その C 末端に少なくとも 1 つの C T P アミノ酸ペプチドを有するフィブリンを提供する。

【0138】

他の実施形態では、本発明に係る方法は、化学療法による血小板減少症を治療するためのインターロイキン-11 であって、その N 末端に少なくとも 1 つの C T P アミノ酸ペプチドを有し、その C 末端に少なくとも 1 つの C T P アミノ酸ペプチドを有するインターロイキン-11 を提供する。

【0139】

他の実施形態では、本発明に係る方法は、足の糖尿病性壊疽を治療するためのベカプレルミン / P D G F であって、その N 末端に少なくとも 1 つの C T P アミノ酸ペプチドを有し、その C 末端に少なくとも 1 つの C T P アミノ酸ペプチドを有するベカプレルミン / P D G F を提供する。

【0140】

他の実施形態では、本発明に係る方法は、ヘパリン起因性血小板減少症での抗凝固のた

10

20

30

40

50

めを治療するためのレピルジン／ヒルジンであって、そのN末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有するレピルジン／ヒルジンを提供する。

【0141】

他の実施形態では、本発明に係る方法は、リウマチ性関節炎を治療するための溶解性TNFであって、そのN末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有する溶解性TNFを提供する。

【0142】

他の実施形態では、本発明に係る方法は、移植臓器拒絶症を治療するためのサイモグロブリンであって、そのN末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有するサイモグロブリンを提供する。

10

【0143】

他の実施形態では、本発明に係る方法は、血友病を治療するための第VIIa因子であって、そのN末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有する第VIIa因子を提供する。

【0144】

他の実施形態では、本発明に係る方法は、ヘアリー細胞白血病及びエイズに関連するカポジ肉腫を治療するためのインターフェロン $\alpha-2a$ であって、そのN末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有するインターフェロン $\alpha-2a$ を提供する。

20

【0145】

他の実施形態では、本発明に係る方法は、ヘアリー細胞白血病、陰部疣贅、エイズに関連するカポジ肉腫、C型肝炎、B型肝炎、悪性黒色腫、及び濾胞性リンパ腫を治療するためのインターフェロン $\alpha-2b$ であって、そのN末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有するインターフェロン $\alpha-2b$ を提供する。

【0146】

他の実施形態では、本発明に係る方法は、陰部疣贅を治療するためのインターフェロン $\alpha-n3$ であって、そのN末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有するインターフェロン $\alpha-n3$ を提供する。

30

【0147】

他の実施形態では、本発明に係る方法は、慢性肉芽腫症を治療するためのインターフェロン $\gamma-1b$ であって、そのN末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有するインターフェロン $\gamma-1b$ を提供する。

【0148】

他の実施形態では、本発明に係る方法は、C型肝炎を治療するためのインターフェロン $\alpha-n1$ であって、そのN末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有するインターフェロン $\alpha-n1$ を提供する。

40

【0149】

他の実施形態では、本発明に係る方法は、腎臓癌及び転移性メラノーマを治療するためのインターロイキン-2であって、そのN末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有するインターロイキン-2を提供する。

【0150】

他の実施形態では、本発明に係る方法は、多発性硬化症を治療するためのインターフェロン $\beta-1b$ であって、そのN末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有するインターフェロン $\beta-1$

50

bを提供する。

【0151】

また、他の実施形態では、本発明に係る方法は、消耗性疾患、エイズ、悪液質、又はhGH欠乏の治療用のhGHであって、そのN末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有するhGHを提供する。

【0152】

他の実施形態では、本発明に係る方法は、臓器移植に使用されるOKT3モノクローナル抗体であって、そのN末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有するOKT3モノクローナル抗体を提供する。

10

【0153】

他の実施形態では、本発明に係る方法は、冠状動脈インターベンション及び血管形成からの合併症を防止するためのReoモノクローナル抗体であって、そのN末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有するReoモノクローナル抗体を提供する。

【0154】

他の実施形態では、本発明に係る方法は、結腸直腸癌、非ホジキンリンパ腫、腎移植拒絶反応若しくは転移性乳癌を治療するための、又は呼吸器合胞体ウイルス疾患を予防するためのモノクローナル抗体であって、そのN末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有し、そのC末端に少なくとも1つのCTPアミノ酸ペプチドを有するモノクローナル抗体を提供する。

20

【0155】

ある実施形態では、本発明は、獣医学に用いられる。ある実施形態では、本発明は、ペット（例えば、イヌ、ネコ、ウマ）、商業的価値が高いもの（例えば、乳牛、肉牛、スポーツ用動物）、科学的価値が高いもの（絶滅危惧種の飼育下若しくは自由環境下の標本）、又は他の価値のある家畜哺乳類の治療に利用される。

【0156】

ある実施形態では、本発明のポリペプチド、抗体又ポリヌクレオチドは、動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター、モルモット、ブタ、マイクロブタ、ニワトリ、ラクダ、ヤギ、ウマ、ウシ、ヒツジ、イヌ、ネコ、非ヒト霊長類）に投与される。ある実施形態では、前記に列挙した用途は、様々なホストに使用される。ある実施形態では、前記ホストとしては、これらに限定されるものではないが、マウス、ウサギ、ヤギ、モルモット、ラクダ、ウマ、マウス、ラット、ハムスター、ブタ、マイクロブタ、ニワトリ、ヤギ、ウシ、ヒツジ、イヌ、ネコ、又は非ヒト霊長類がある。

30

【0157】

ある実施形態では、家畜が、本発明に係る方法により治療される。ある実施形態では、前記家畜は、ブタ、ウシ、乳牛、ウマ、ヤギ、ヒツジ、ニワトリ、七面鳥、ガチョウ、アヒル、及び関連種を含む。ある実施形態では、実験動物が、本発明に係る方法により治療される。ある実施形態では、前記実験動物は、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヤギ、サル、イヌ、ネコなどを含む。ある実施形態では、動物園の動物が、本発明に係る方法により治療される。ある実施形態では、前記動物園の動物は、動物園で飼育されている全ての脊椎動物を含む。ある実施形態では、水生動物が、本発明に係る方法により治療される。ある実施形態では、前記水生動物は、魚、ウナギ、カメ、アザラシ、ペンギン、サメ、クジラ、及び関連種を含む。ある実施形態では、家畜が本発明に係る方法により治療される。ある実施形態では、前記家畜は、ペット（ネコ、イヌなど）や人間に飼われている動物（ウマ、ウシ、ブタ、ヤギ、ウサギ、ニワトリ、七面鳥、ガチョウ、アヒルなど）を含む。

40

【0158】

本発明では、ブタという用語は、豚、子豚、成豚、未經産雌豚、経産雌、去勢雄豚、去

50

勢雄豚を含む。他の実施形態では、「ウシ」という用語は、子牛、乳牛、未経産雌牛、経産雌牛、未去勢雄牛、去勢雄牛を含む。

【0159】

ある実施形態では、ウシ成長ホルモンが、本発明に係る方法で使用される。ある実施形態では、人工的ウシ成長ホルモンが、本発明に係る方法で使用される。ある実施形態では、前記人工的ウシ成長ホルモンは、NCBIの配列ID番号A A A 7 2 2 6 2に記載の配列を有する。他の実施形態では、前記人工的ウシ成長ホルモンは、当該技術分野で公知の他の人工的ウシ成長ホルモンである。各可能な形態は、本発明の異なる実施形態に相当する。

【0160】

ある実施形態では、ヒツジ成長ホルモンが、本発明に係る方法で使用される。ある実施形態では、前記ヒツジ成長ホルモンは、NCBIの配列ID番号N P _ 0 0 1 0 0 9 3 1 5に記載の配列を有する。他の実施形態では、前記ヒツジ成長ホルモンは、当該技術分野で公知の他のヒツジ成長ホルモンである。各可能な形態は、本発明の異なる実施形態に相当する。

【0161】

ある実施形態では、ウマ成長ホルモンが、本発明に係る方法で使用される。ある実施形態では、前記ウマ成長ホルモンは、NCBIの配列ID番号A A A 2 1 0 2 7に記載の配列を有する。他の実施形態では、前記ウマ成長ホルモンは、当該技術分野で公知の他のウマ成長ホルモンである。各可能な形態は、本発明の異なる実施形態に相当する。

【0162】

ある実施形態では、ニワトリ成長ホルモンが、本発明に係る方法で使用される。ある実施形態では、前記ニワトリ成長ホルモンは、NCBIの配列ID番号C A A 3 5 6 1に記載の配列を有する。他の実施形態では、前記ニワトリ成長ホルモンは、当該技術分野で公知の他のニワトリ成長ホルモンである。各可能な形態は、本発明の異なる実施形態に相当する。

【0163】

ある実施形態では、マウス成長ホルモンが、本発明に係る方法で使用される。ある実施形態では、前記マウス成長ホルモンは、NCBIの配列ID番号N P _ 0 3 2 1 4 3に記載の配列を有する。また、他の実施形態では、前記マウス成長ホルモンは、当該技術分野で公知の他のマウス成長ホルモンである。各可能な形態は、本発明の異なる実施形態に相当する。

【0164】

ある実施形態では、テラピア (tilapia) 成長ホルモンが、本発明に係る方法で使用される。ある実施形態では、前記テラピア成長ホルモンは、NCBIの配列ID番号C A A 0 0 8 1 8に記載の配列を有する。他の実施形態では、前記テラピア成長ホルモンは、当該技術分野で公知の他のテラピア成長ホルモンである。各可能な形態は、本発明の異なる実施形態に相当する。

【0165】

ある実施形態では、ウシEPOが、本発明に係る方法で使用される。ある実施形態では、人工的ウシEPOが、本発明に係る方法で使用される。ある実施形態では、前記人工的ウシEPOは、NCBIの配列ID番号N P _ 7 7 6 3 3 4に記載の配列を有する。他の実施形態では、前記人工的ウシEPOは、当該技術分野で公知の他の人工的ウシEPOである。各可能な形態は、本発明の異なる実施形態に相当する。

【0166】

ある実施形態では、ブタEPOが、本発明に係る方法で使用される。ある実施形態では、前記ブタEPOは、NCBIの配列ID番号N P _ 9 9 9 2 9 9に記載の配列を有する。他の実施形態では、前記ブタEPOは、当該技術分野で公知の他のブタEPOである。各可能な形態は、本発明の異なる実施形態に相当する。

【0167】

ある実施形態では、ヒツジ E P O が、本発明に係る方法で使用される。ある実施形態では、ヒツジ成長ホルモンは、N C B I の配列 I D 番号 N P _ 0 0 1 0 1 9 9 0 8 に記載の配列を有する。他の実施形態では、前記ヒツジ成長ホルモンは、当該技術分野で公知の他のヒツジ成長ホルモンである。各可能な形態は、本発明の異なる実施形態に相当する。

【0168】

ある実施形態では、マウス E P O が、本発明に係る方法で使用される。ある実施形態では、前記マウス成長ホルモンは、N C B I の配列 I D 番号 C A A 7 2 7 0 7 に記載の配列を有する。他の実施形態では、前記マウス成長ホルモンは、当該技術分野で公知の他のマウスホルモンである。各可能な形態は、本発明の異なる実施形態に相当する。

【0169】

ある実施形態では、ウシ G L P - 1 が、本発明に係る方法で使用される。ある実施形態では、前記ウシ G L P - 1 は、N C B I の配列 I D 番号 P 0 1 2 7 2 に記載の配列を有する。他の実施形態では、前記ウシ G L P - 1 は、当該技術分野で公知の他のウシ G L P - 1 である。各可能な形態は、本発明の異なる実施形態に相当する。

【0170】

ある実施形態では、ヒツジ G L P - 1 が、本発明に係る方法で使用される。ある実施形態では、前記ヒツジ G L P - 1 は、N C B I の配列 I D 番号 Q 8 M J 2 5 に記載の配列を有する。他の実施形態では、前記ヒツジ G L P - 1 は、当該技術分野で公知の他のヒツジ G L P - 1 である。各可能な形態は、本発明の異なる実施形態に相当する。

【0171】

ある実施形態では、ニワトリ G L P - 1 が、本発明に係る方法で使用される。ある実施形態では、前記ニワトリ G L P - 1 は、N C B I の配列 I D 番号 P 0 1 2 7 4 に記載の配列を有する。他の実施形態では、前記ニワトリ G L P - 1 は、当該技術分野で公知の他のニワトリ G L P - 1 である。各可能な形態は、本発明の異なる実施形態に相当する。

【0172】

ある実施形態では、マウス G L P - 1 が、本発明に係る方法で使用される。ある実施形態では、前記マウス G L P - 1 は、N C B I の配列 I D 番号 N P _ 0 3 2 1 2 7 に記載の配列を有する。他の実施形態では、前記マウス G L P - 1 は、当該技術分野で公知の他のマウス G L P - 1 である。各可能な形態は、本発明の異なる実施形態に相当する。

【0173】

ある実施形態では、ウシインターフェロン α が、本発明に係る方法で使用される。ある実施形態では、前記ウシインターフェロン α は、N C B I の配列 I D 番号 A B D 5 7 3 1 1 に記載の配列を有する。他の実施形態では、前記ウシインターフェロン α は、当該技術分野で公知の他のウシインターフェロン α である。各可能な形態は、本発明の異なる実施形態に相当する。

【0174】

ある実施形態では、ヒツジインターフェロン α が、本発明に係る方法で使用される。ある実施形態では、前記ヒツジインターフェロン α は、N C B I の配列 I D 番号 C A A 4 1 7 9 0 に記載の配列を有する。他の実施形態では、前記ヒツジインターフェロン α は、当該技術分野で公知の他のヒツジインターフェロン α である。各可能な形態は、本発明の異なる実施形態に相当する。

【0175】

ある実施形態では、ブタインターフェロン α が、本発明に係る方法で使用される。ある実施形態では、前記ブタインターフェロン α は、N C B I の配列 I D 番号 A A P 9 2 1 1 8 に記載の配列を有する。他の実施形態では、前記ブタインターフェロン α は、当該技術分野で公知の他のブタインターフェロン α である。各可能な形態は、本発明の異なる実施形態に相当する。

【0176】

ある実施形態では、マウスインターフェロン α が、本発明に係る方法で使用される。ある実施形態では、前記マウスインターフェロン α は、N C B I の配列 I D 番号 A A A 3 7

10

20

30

40

50

886に記載の配列を有する。他の実施形態では、前記マウスインターフェロン α は、当該技術分野で公知の他のマウスインターフェロン α である。各可能な形態は、本発明の異なる実施形態に相当する。

【0177】

いくつかの実施形態では、CTPの修飾は、投与量を低下させることが可能になる点で有益である。

【0178】

いくつかの実施形態では、本明細書で使用される「ポリペプチド」は、未変性ポリペプチド（分解産物、人工的に合成されたポリペプチド、又は組換えポリペプチドのいずれか）及びペプチド様物質（典型的には、人工的に合成されたポリペプチド）と、ポリペプチド類似体であるペプトイド及びセミペプトイドとを含み、これらは、いくつかの実施形態では、ポリペプチドを、体内で更に安定させる又は細胞への浸透をより可能にするようにする修飾を有する。

【0179】

いくつかの実施形態では、修飾は、限定されるものではないが、N末端修飾、C末端修飾、ポリペプチド結合修飾（限定されるものではないが、 CH_2-NH 、 CH_2-S 、 $\text{CH}_2-\text{S}=\text{O}$ 、 $\text{O}=\text{C}-\text{NH}$ 、 CH_2-O 、 CH_2-CH_2 、 $\text{S}=\text{C}-\text{NH}$ 、 $\text{CH}=\text{CH}$ 又は $\text{CF}=\text{CH}$ を含む）、主鎖修飾及び残基修飾を含む。ペプチド様化合物を作製する方法は、当該技術分野では公知であり、例えば、「Quantitative Drug Design, CA. Rarnsd en Gd., Chapter 17.2, F. Choplin Pergamon Press (1992)」に記載されている（この参照により、本明細書中に組み込まれるものとする）。以下、この点について、更に詳しく説明する。

【0180】

いくつかの実施形態では、ポリペプチド内のポリペプチド結合（ $-\text{CO}-\text{NH}-$ ）が置換される。いくつかの実施形態では、前記ポリペプチド結合は、N-メチル化結合（ $-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CO}-$ ）によって置換される。いくつかの実施形態では、前記ポリペプチド結合は、エステル結合（ $-\text{C}(\text{R})\text{H}-\text{C}-\text{O}-\text{O}-\text{C}(\text{R})-\text{N}-$ ）によって置換される。いくつかの実施形態では、前記ポリペプチド結合は、ケトメチレン結合（ $-\text{CO}-\text{CH}_2-$ ）によって置換される。いくつかの実施形態では、前記ポリペプチド結合は、 α アザ結合（ $-\text{NH}-\text{N}(\text{R})-\text{CO}-$ ）によって置換される（Rは任意のアルキルであり、例えば、メチル、カルバ結合（ $-\text{CH}_2-\text{NH}-$ ）である）。いくつかの実施形態では、前記ポリペプチド結合は、ヒドロキシエチレンジアミン結合（ $-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$ ）によって置換される。いくつかの実施形態では、前記ポリペプチド結合は、チオアミド結合（ $-\text{CS}-\text{NH}-$ ）によって置換される。いくつかの実施形態では、前記ポリペプチド結合は、オレフィン二重結合（ $-\text{CH}=\text{CH}-$ ）によって置換される。いくつかの実施形態では、前記ポリペプチド結合は、レトロアミド結合（ $-\text{NH}-\text{CO}-$ ）によって置換される。いくつかの実施形態では、前記ポリペプチド結合は、ポリペプチド誘導体（ $-\text{N}(\text{R})-\text{CH}_2-\text{CO}-$ ）によって置換される（Rは、炭素原子に天然に存在する「直鎖状」側鎖である）。いくつかの実施形態では、これらの修飾は、ポリペプチド鎖における前記結合のいずれかで生じ、いくつかの結合（2～3個の結合）において同時に生じる場合もある。

【0181】

いくつかの実施形態では、ポリペプチドの天然芳香族アミノ酸（Trp、Tyr及びPheなど）は、フェニルグリシン、TIC、ナフチルアミン（Nol）、Pheの環メチル化誘導体、Pheのハロゲン化誘導体、又はo-メチル-Tyrなどの非天然の合成酸に置換される。いくつかの実施形態では、本発明のポリペプチドは、1つ以上の修飾アミノ酸又は1つ以上の非アミノ酸単量体（例えば、脂肪酸、複合糖質など）を含む。

【0182】

ある実施形態では、「アミノ酸」は、20種類の天然に存在するアミノ酸を含み、これらのアミノ酸は、多くの場合、翻訳後にインビボで修飾され、例えば、ヒドロキシプロリ

10

20

30

40

50

ン、ホスホセリン及びホスホスレオニンを含み、他の異常アミノ酸は、限定されるものではないが、2-アミノアジピン酸、ヒドロキシリジン、イソデスモシン、ノルバリン、ノルロイシン及びオルニチンを含むことを理解されたい。ある実施形態では、「アミノ酸」は、D-アミノ酸及びL-アミノ酸の両方を含む。

【0183】

いくつかの実施形態では、本発明のポリペプチドは、ポリペプチドが水溶性であることが要求される治療に利用される。いくつかの実施形態では、本発明のポリペプチドは、これに限定されるものではないが、ヒドロキシル含有側鎖によってポリペプチドの溶解性を増大させることができるセリン及びスレオニンを含む1つ以上の非天然又は天然の極性アミノ酸を含む。

10

【0184】

いくつかの実施形態では、本発明のポリペプチドは、直鎖状で利用される。ただし、環状にしてもポリペプチド特性を著しく妨げないような場合は、環状ポリペプチドも利用可能であることは当業者には理解されるであろう。

【0185】

いくつかの実施形態では、本発明のポリペプチドは、例えば標準的な固相技術を用いることによって、生化学的に合成される。いくつかの実施形態では、これらの生化学的方法には、独占的固相合成法、部分的固相合成法、フラグメント縮合、又は古典的な液相合成法が含まれる。いくつかの実施形態では、これらの方法は、ポリペプチドが比較的短い（約5～15kDa）とき、及び／又はポリペプチドが組換え技術によって合成することができず（即ち、核酸配列によってコード化されない）、それゆえに異なる化学的性質を含むときに用いられる。

20

【0186】

いくつかの実施形態では、固相ポリペプチド合成手順は、当業者に公知であり、さらにまた「John Morrow Stewart and Janis Dillaha Young, Solid Phase Polypeptide Syntheses (2nd Ed., Pierce Chemical Company, 1984)」に記載されている。いくつかの実施形態では、合成ポリペプチドは、分取高速液体クロマトグラフィーによって精製され（Creighton T. (1983) Proteins, structures and molecular principles. WH Freeman and Co. N.Y.）、その成分は、当業者に知られている方法によってアミノ酸配列決定法によって確認することができる。

30

【0187】

いくつかの実施形態では、組換えタンパク質技術が、本発明のポリペプチドを産生するために用いられる。いくつかの実施形態では、組換えタンパク質技術は、比較的長いポリペプチド（例えば18～25アミノ酸より長い）の産生のために用いられる。いくつかの実施形態では、組換えタンパク質技術は、本発明のポリペプチドを大量に産生するのに用いられる。いくつかの実施形態では、組換え技術は、「Bitter et al., (1987) Methods in Enzymol. 153:516-544, Studier et al. (1990) Methods in Enzymol. 185:60-89, Brisson et al. (1984) Nature 310:511-514, Takamatsu et al. (1987) EMBO J. 6:307-311, Coruzzi et al. (1984) EMBO J. 3: 1671-1680, Brogli et al., (1984) Science 224:838-843, Gurley et al. (1986) Mol. Cell. Biol. 6:559-565, Weissbach & Weissbach, 1988, Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, Section Vm, pp 421-463」に記載されている。

40

【0188】

ある実施形態では、本発明のポリペプチドは、本発明のポリペプチドをエンコードするポリヌクレオチドを用いて合成される。いくつかの実施形態では、本発明のポリペプチドをエンコードするポリヌクレオチドは、発現ベクターに連結されて、シス制御配列（例えばプロモータ配列）の転写調節を含む。いくつかの実施形態では、シス制御配列は、本発明のポリペプチドの構成的な発現を調整するのに適している。いくつかの実施形態では、シス制御配列は、本発明のポリペプチドの組織特異的な発現を調整するのに適している。いくつかの実施形態では、シス制御配列は、本発明のポリペプチドの誘導性発現を調整す

50

るのに適している。

【0189】

いくつかの実施形態では、本発明のポリペプチドを発現するポリヌクレオチドは、配列番号20、21、44、45及び46に記載されている。

【0190】

いくつかの実施形態では、本発明と併用するのに適する組織特異的プロモータは、特定の細胞集団において機能し得る配列を含み、例を挙げれば、これらに限定されるものではないが、肝臓特異的であるアルブミンなどのプロモータ (Pinkert et al., (1987) Genes Dev. 1:268-277)、リンパ球特異的プロモータ (Calame et al., (1988) Adv. Immunol. 43:235-275)、とりわけ、T細胞受容体 (Winoto et al., (1989) EMBO J. 8:729-733) 及び免疫グロブリン (Banerji et al. (1983) Cell 33:729-740) のプロモータ、ニューロフィラメントプロモータなどのニューロン特異的プロモータ (Byrne et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5473-5477) 膵臓特異的プロモータ (Edlunch et al. (1985) Science 230:912-916) 又は乳漿プロモータなどの乳腺特異的プロモータ (米国特許第4, 873, 316号及び欧州出願公開第264, 166号明細書) が含まれる。本発明と併用するのに適する誘導プロモータは、例えば、テトラサイクリン誘導プロモータを含む (Srour, M.A., et al., 2003. Thromb. Haemost. 90: 398-405)。

【0191】

ある実施形態では、「ポリヌクレオチド」という用語は、単離され、RNA配列、相補的ポリヌクレオチド配列 (cDNA)、ゲノムポリヌクレオチド配列及び／又は合成ポリヌクレオチド配列 (例えば上記の組合せ) の形で提供される、一本鎖又は二本鎖の核酸配列を指す。

【0192】

ある実施形態では、「相補的ポリヌクレオチド配列」は、逆転写酵素又は任意の他のRNA依存性DNAポリメラーゼを用いてメッセンジャーRNAの逆転写によって生じる配列を指す。ある実施形態では、前記配列は、その後、DNAポリメラーゼを用いてインビボ又はインビトロで増幅させることができる。

【0193】

ある実施形態では、「ゲノムポリヌクレオチド配列」は、染色体由来の (染色体から単離された) 配列を指し、それゆえ、染色体の隣接部分を表す。

【0194】

ある実施形態では、「合成ポリヌクレオチド配列」は、少なくとも部分的に相補的かつ少なくとも部分的にゲノミックであるような配列を指す。ある実施形態では、合成配列は、本発明のポリペプチドをエンコードするのに必要なエキソンの配列と、それらの間に介在するイントロンの配列とを含むことができる。ある実施形態では、イントロンの配列は、他の遺伝子由来である場合があり、典型的には、保存されたスプライシングシグナル配列を含む。ある実施形態では、イントロンの配列は、シス発現調整エレメントを含む。

【0195】

ある実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドの分泌のためのシグナルペプチドをコード化するシグナル配列を更に含む。いくつかの実施形態では、前記シグナル配列は、限定されるものではないが、配列番号19に記載されているEPOのための内在シグナル配列又は配列番号26に記載されているIFN- γ のための内在シグナル配列を含む。他の実施形態では、前記シグナル配列は、CTP配列のN末端であり、CTP配列は目的のポリペプチド配列のN末端であって、例えば配列は (a) シグナル配列 - (b) CTP - (c) 目的の配列 - (d) 1つ以上のさらなるCTP配列 (随意的) である。他の実施形態では、1つ以上のCTP配列は、目的のポリペプチド配列のシグナル配列と目的のポリペプチド配列それ自体の間に挿入されており、それ故に、目的の野生型配列を中断する。各可能性な形態は、本発明の異なる実施形態を表す。

【0196】

ある実施形態では、発現及び分泌に続いて、シグナルペプチドは前駆体タンパク質から

10

20

30

40

50

切断され、成熟タンパク質を生じさせる。

【0197】

いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、実施例1で説明するPCR法又は任意の他の方法又は当業者に周知の手順を用いて作製される。いくつかの実施形態では、前記手順は、2つの異なるDNA配列の連結反応を含む（例えば "Current Protocols in Molecular Biology", eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons, 1992 を参照されたい）。

【0198】

ある実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、組換えポリペプチドの発現を可能にするように発現ベクター（即ち核酸構築物）に挿入される。ある実施形態では、本発明の発現ベクターは、このベクターを原核生物における複製及び組込みに適したものにしような追加配列を含む。ある実施形態では、本発明の発現ベクターは、このベクターを真核生物における複製及び組込みに適したものにしような追加配列を含む。ある実施形態では、本発明の発現ベクターは、このベクターを原核生物及び真核生物の両方における複製及び組込みに適したものにしようなシャトルベクターを含む。いくつかの実施形態では、クローニングベクターは、転写及び翻訳開始配列（例えば、プロモータ、エンハンサー）及び転写及び翻訳ターミネーター（例えば、ポリアダニレーションシグナル）を含む。

【0199】

ある実施形態では、様々な原核又は真核細胞が、本発明のポリペプチドを発現するために宿主発現系として用いることができる。いくつかの実施形態では、宿主発現系として、これらに限定されるものではないが、微生物（例えば、ポリペプチドコード配列を含む組換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNA又はコスミドDNA発現ベクターで形質転換された細菌）、ポリペプチドコード配列を含む組換え酵母発現ベクターで形質転換された酵母、組換えウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルスCaMV、タバコモザイクウイルス、TMV）に感染した或いはポリペプチドコード配列を含むTiプラスミドなどの組換えプラスミド発現ベクターで形質転換された植物細胞系がある。

【0200】

いくつかの実施形態では、本発明のポリペプチドを発現するために、非細菌発現系（例えばCHO細胞などの哺乳動物発現系）が用いられる。ある実施形態では、哺乳動物細胞において本発明のポリヌクレオチドを発現するために用いられる発現ベクターは、CMVプロモータ及びネオマイシン耐性の遺伝子を含むpCI-DHFRベクターである。ある実施形態に係るpCI-dhfrベクターの構築は、実施例1に記載されている。

【0201】

いくつかの実施形態では、本発明の細菌系において、発現を目的とするポリペプチドに応じて、様々な発現ベクターを好適に選択することができる。ある実施形態では、大量のポリペプチドが望まれる。ある実施形態では、タンパク質産物が容易に精製される培地又は細菌のペリプラズム内に発現産物を導くような疎水性シグナル配列との融合体として、高レベルのタンパク質産物の発現を提供するベクターが望まれる。ある実施形態では、特定の融合タンパク質が、ポリペプチドの回収に役立つような特定の切断部位を有するように操作される。ある実施形態では、そのような操作に適応できるベクターは、限定されるものではないが、大腸菌発現ベクターのpETシリーズを含む（Studier et al., Methods in Enzymol. 185:60-89 (1990))。

【0202】

ある実施形態では、酵母発現系が用いられる。ある実施形態では、構成プロモータ又は誘導プロモータを含む多くのベクターは、米国特許出願第5,932,447号明細書に開示されているような酵母において用いることができる。他の実施形態では、外来DNA配列の酵母染色体への組込みを促進するベクターが用いられる。

【0203】

ある実施形態では、本発明の発現ベクターは、例えば単一のmRNAからの幾つかのタ

ンパク質の翻訳を可能にするさらなるポリヌクレオチド配列（内部リボソーム侵入部位（IRES）など）、及びプロモーターキメラポリペプチドのゲノム組込みのための配列を更に含むことができる。

【0204】

いくつかの実施形態では、哺乳動物の発現ベクターは、これらに限定されるものではないが、p cDNA 3、p cDNA 3. 1（+/-）、p GL 3、p Zeo Sv 2（+/-）、p Sec Tag 2、p Display、p EF/myc/cyto、p CMV/myc/cyto、p CR 3. 1、p Sin Rep 5、DH 26 S、DHBB、p NMT 1、p NMT 4 1、p NMT 8 1（これらはInvitrogen社から入手可能である）、p CI（これはPromega社から入手可能である）、p Mb ac、p Pb ac、p BK-RSV、p B K-CMV（これらはストラタジーン社から入手可能である）、p TRES（これはClontech社から入手可能である）、及びそれらの誘導体を含む。

【0205】

いくつかの実施形態では、レトロウイルスなどの真核性ウイルスからの調整要素を含む発現ベクターが本発明によって用いられる。SV 40ベクターは、p SVT 7及びp MT 2を含む。いくつかの実施形態では、ウシ乳頭腫ウイルス由来のベクターはp BV-1 MTHAを含み、エプスタイン・バーウイルス由来のベクターはp HEB O及びp 2 O 5を含む。他の例示的なベクターは、p MSG、p AV 0 0 9/A⁺、p MTO 1 0/A⁺、p MAMneo-5、バキュロウイルスp D SVEを含み、SV-40初期プロモータ、SV-40後期プロモータ、メタロチオネインプロモータ、マウス乳腺癌ウイルスプロモータ、ラウス肉腫ウイルスプロモータ、ポリヘドリンプロモータ、又は真核細胞において発現に対して効果的であることが明らかである他のプロモータの調整下でタンパク質の発現を可能にする任意の他のベクターを含む。

【0206】

いくつかの実施形態では、組換えウイルスベクターは、本発明のポリペプチドのインビボ発現に有用であるが、それというのも、組換えウイルスベクターは、ラテラル感染（lateral infection）及び標的特異性などの利点を提供するからである。ある実施形態では、ラテラル感染は、例えばレトロウイルスの生活環に固有のものであり、そのプロセスによって、1つの感染した細胞が、出芽しかつ近隣の細胞を感染させるような子孫ビリオンを多数産出する。ある実施形態では、その結果として広い領域が急速に感染するが、そのほとんどは最初に原型のウイルス粒子によって感染しなかったところである。ある実施形態では、ラテラルに拡散することができないウイルスベクターが産生される。ある実施形態では、この特性は、目的が特定の遺伝子を限定された数の標的細胞内のみに導入することであるならば、有用であることがある。

【0207】

ある実施形態では、本発明の発現ベクターを細胞に導入するために、種々の方法を用いることができる。そのような方法は、「Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory, New York (1989, 1992)、Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989)、Chang et al., Somatic Gene Therapy, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995)、Vega et al., Gene Targeting, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995)、Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworths, Boston Mass. (1988)、Gilboa et al. [Biotechniques 4 (6): 504-512, 1986]」に概ね記載されており、例えば、安定又は一時的トランスフェクション、リポフェクション、電気穿孔法、及び組換えウイルスベクターによる感染を含む。更に、ポジティブネガティブ選択法に関しては、米国特許第5, 464, 764号及び第5, 487, 992号明細書を参照されたい。

【0208】

いくつかの実施形態では、ウイルス感染による核酸の導入は、ウイルスの感染性のおかげでより高いトランスフェクション効率を得られるので、リポフェクション及び電気穿孔法などの他の方法に比べて幾つかの利点を有する。

10

20

30

40

50

【0209】

ある実施形態では、当然のことながら、本発明のポリペプチドは、上記した任意の適切な投与方法を用いて個体に投与された核酸構築物から発現されることもできる（即ち、インビボ遺伝子治療）。ある実施形態では、核酸構築物は、適切な遺伝子運搬手段／方法（トランスフェクション、形質導入、相同組換えなど）と、必要に応じて発現系とにより、適切な細胞に導入され、その後、改変された細胞は培養液中で増殖して個体に戻される（即ち、エキソビボ遺伝子治療）。

【0210】

ある実施形態では、EPOを用いたインビボ遺伝子治療は、げっ歯類（Bohl et al., Blood, 2000; 95:2793-2798）、霊長類（Gao et al., Blood, 2004, Volume 103, Number 9）などの動物モデルにおいて試みられ、慢性腎不全の患者に対するヒト臨床試験において成功した（Lippin et al Blood 2005, 106, Number 7）。 10

【0211】

ある実施形態では、植物発現ベクターが用いられる。ある実施形態では、配列をコードするポリペプチドの発現は、多くのプロモータによって推進される。いくつかの実施形態では、C a M V の 3 5 S R N A 及び 1 9 S R N A プロモータ（Brisson et al., Nature 310:511-514 (1984)）又は T M V の コートタンパク質プロモータ（Takamatsu et al., EMBO J. 6:307- 311 (1987)）などのウイルスプロモータが用いられる。他の実施形態では、例えば、R U B I S C O 小サブユニット（Coruzzi et al., EMBO J. 3:1671-1.680 (1984); and Brogli et al., Sci&ncQ 224:838-843 (1984)）又は熱ショックプロモータ（例えば、ダイズ h s p 1 7 . 5 - E 又は h s p 1 7 . 3 - B）（Gurley et al., Mol. Cell . Biol. 6:559-565 (1986)）などの植物プロモータが用いられる。ある実施形態では、構築物は、T i プラスミド、R i プラスミド、植物ウイルスベクター、直接 D N A 形質転換、微量注射法、電気穿孔法、及びその他の当業者に公知の技術を用いて、植物細胞に導入される。例えば、「Weissbach & Weissbach [Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, Section VIII, pp 421-463 (1988)]」を参照されたい。当該技術分野で周知である、昆虫及び哺乳動物の宿主細胞系などの他の発現系も、本発明で用いることができる。 20

【0212】

当然のことながら、本発明の発現構築物は、（ポリペプチドをエンコードする）挿入コード配列の転写及び翻訳のための必要要素以外にも、発現されたポリペプチドの安定性、産生、精製、収率又は活性を最適化するように操作された配列を含むこともできる。 30

【0213】

いくつかの実施形態では、本発明の発現ベクターを宿主細胞系に導入するために種々の方法が用いられることができる。いくつかの実施形態では、そのような方法は、「Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory, New York (1989, 1992)、Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989)、Chang et al., Somatic Gene Therapy, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995)、Vega et al., Gene Targeting, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995)、Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworths, Boston Mass. (1988)、Gilboa et al. [Biotechniques 4 (6): 504-512; 1986]」に概ね記載されており、例えば、安定又は一時的トランスフェクション、リポフェクション、電気穿孔法、及び組換えウイルスベクターによる感染を含む。更に、ポジティブネガティブ選択法に関しては、米国特許第 5, 4 6 4, 7 6 4 号及び第 5, 4 8 7, 9 9 2 号明細書を参照されたい。 40

【0214】

いくつかの実施形態では、形質転換された細胞は、豊富な量の組換えポリペプチドの発現を可能にさせるような、効果的な条件下で培養される。いくつかの実施形態では、効果的な培養条件は、限定されるものではないが、タンパク質産出を許すような、効果的な培地、バイオリアクター、温度、pH及び酸素条件を含む。ある実施形態では、効果的な培 50

地は、本発明の組換えポリペプチドを産生するように細胞が培養される任意の培地を指す。いくつかの実施形態では、培地は、通常、同化できる炭素、窒素及びリン酸塩源を有する水溶液と、適切な塩、ミネラル、金属及び他の栄養素、例えばビタミンなどを含む。いくつかの実施形態では、本発明の細胞は、従来の発酵バイオリアクター、振盪フラスコ、試験管、微量定量皿及びベトリ皿において培養されることができる。いくつかの実施形態では、培養は、組換え細胞に適した温度、pH及び酸素含有量で行われる。いくつかの実施形態では、培養条件は、当業者の専門知識の範囲内である。

【0215】

いくつかの実施形態では、産生のために用いられるベクター及び宿主系に応じて、結果として生じる本発明のポリペプチドは、組換え細胞内に留まるか、発酵培地に分泌されるか、2つの細胞性膜間（大腸菌におけるペリプラズムなど）の空間に分泌されるか、細胞又はウイルス性膜の外面上に保持されるかのいずれかである。

10

【0216】

ある実施形態では、所定時間培養した後に、組換えポリペプチドが回収される。

【0217】

ある実施形態では、本明細書で用いられている「組換えポリペプチドを回収する」なる語は、ポリペプチドを含む全発酵培地を集めることを指し、追加の分離又は精製ステップを必ずしも伴わない。

【0218】

ある実施形態では、本発明のポリペプチドは、これらに限定されるものではないが、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、濾過、電気泳動法、疎水性相互作用クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、コンカナバリンAクロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、選択的可溶化などの様々な標準タンパク質精製技術を用いて精製される。

20

【0219】

ある実施形態では、回収を容易にするために、発現したコード配列を、本発明のポリペプチド及び融合切断可能部分をエンコードするように操作することができる。ある実施形態では、融合タンパク質は、ポリペプチドがアフィニティークロマトグラフィーによって容易に単離される（例えば、切断可能な部位に特異的なカラムに固定することによって）ことができるようにデザインすることができる。ある実施形態では、切断部位はポリペプチドと切断可能部分の間に位置するように操作され、この部位で融合タンパク質を特異的に切断するような適切な酵素又は薬剤での処置によってポリペプチドはクロマトグラフィーのカラムから放出することができる（例えば、Booth et al., Immunol. Lett. 19:65-70 (1988)、Gardella et al., J. Biol. Chem. 265:15854-15859 (1990)を参照）。

30

【0220】

ある実施形態では、本発明のポリペプチドは、「実質的に純粋」な形態で回収される。

【0221】

ある実施形態では、「実質的に純粋」という用語は、本明細書に記載の用途において、タンパク質の効果的な利用を可能にするような純度を指す。

【0222】

ある実施形態では、本発明のポリペプチドは、インビトロ発現系を用いて合成することもできる。ある実施形態では、インビトロ合成方法は当該技術分野では公知であり、前記インビトロ発現の構成要素は市販されている。

40

【0223】

ある実施形態では、組換えDNA技術を用いたCTP-EPO-CTPポリペプチドの産出は、実施例1に示されている。

【0224】

いくつかの実施形態では、組換えポリペプチドは、合成及び精製され、その治療効果は、インビボ又はインビトロのいずれかで分析することができる。ある実施形態では、本発明の組換えEPOポリペプチドの結合活性は、実施例2～6及び8～9に記載の様々な分

50

析法を使用して確認することができる。ある実施形態では、インビトロ結合活性は、T F-1 細胞の増殖を刺激するポリペプチドの能力を測定することによって確認される。ある実施形態では、インビボ活性は、ヘマトクリットレベル（図3～図5）を分析することによって、及び／又は網状赤血球のパーセンテージとして導き出される。

【0225】

ある実施形態では、本発明のEPOポリペプチドは、様々なエリスロポエチン関連疾患の対象の治療に使用することができる。いくつかの実施形態では、前記対象は、人間である。

【0226】

ある実施形態では、「エリスロポエチン関連疾患」という用語は、エリスロポエチンの正常以下の、異常な又は不適切な変化に関連するあらゆる病状を意味する。ある実施形態では、前記病状に関連するエリスロポエチンのレベルは、当該技術分野で容認され使用される任意の測定方法によって測定される。ある実施形態では、エリスロポエチン関連疾患は一般に、貧血症を含む。

【0227】

いくつかの実施形態では、「貧血症」は、貧血に関連するあらゆる病状、疾患又は疾病を意味する。いくつかの実施形態では、貧血症は、これらに限定されるものではないが、再生不良性貧血、自己免疫性溶血性貧血、骨髄移植、チャグ・ストラウス症候群、Diamond Blackfan貧血、ファンコーニ貧血、フェルティ症候群、移植片対宿主病、造血幹細胞移植、溶血性尿毒症症候群、骨髄異形成症候群、発作性夜間血色素尿症、骨髄腫症、汎血球減少症、赤芽球癆、シェーンライン・ヘノッホ紫斑病、鉄芽球性貧血、過剰な芽球を伴う不応性貧血、リウマチ性関節炎、シュワッハマン症候群、鎌状赤血球病、サラセミアメジャー、サラセミアマイナー、血小板減少性紫斑病などを含む。

【0228】

ある実施形態では、本発明は、CTP-hGH-CTPポリペプチドを含む。ある実施形態では、実施例7に示すように、CTP-hGH・CTPポリペプチドの生成に組換えDNA技術が使用される。ある実施形態では、本発明のCTP-hGH-CTPポリペプチドの治療効果は、インビボで測定される。ある実施形態では、本発明のCTP-hGH-CTPポリペプチドの治療効果は、インビトロで測定される。ある実施形態では、本発明の組換え型hGHポリペプチドの結合活性は、予めヒト成長ホルモン受容体でトランスフェクトされたNb2（プロラクチン依存性ラットのリンパ腫細胞株（ECCC細胞バンク））又はFCD-P1マウス細胞株を使用して測定される。ある実施形態では、hGHをこれらの受容体と結合させることにより、細胞増殖が誘導される。前記細胞増殖は、ある実施形態では、hGH活性の関数としてのMTT細胞株のレベルにより測定される。ある実施形態では、インビボ活性は、治療した成長ホルモン欠乏動物の所定期間における重量増加を測定することにより推定される。

【0229】

いくつかの実施形態では、本発明のヒト成長ホルモン・ポリペプチドは、次に列記するような成長及び体重に関連する疾患の対象の治療に使用される。発育不全症、AIDS消耗症、老化、HIV感染患者の免疫機能障害、異化作用症術後回復、うっ血性心筋症、肝臓移植、肝切除後の肝再生、慢性腎不全、腎性骨ジストロフィー、骨粗しょう症、軟骨無形成症／軟骨低形成症、骨異形成症、慢性炎症性腸疾患又は栄養障害（例えば、クローン病）、短腸症候群、若年性慢性関節炎、嚢胞性線維症、男性不妊、X連鎖性低リン酸血症性くる病、ダウン症候群、二分脊椎症、ヌーナン症候群、肥満、筋力障害、及び線維筋痛など。

【0230】

いくつかの実施形態では、本発明のインターフェロン・ポリペプチドは、次の疾患を治療するのに使用される。ヘアリー細胞白血病（hairy cell leukemia：HCL）、カポジ肉腫（Kaposi's sarcoma：KS）、慢性骨髄性白血病（chronic myelogenous leukemia：CML）、慢性C型肝炎（chronic hepatitis C：CHC）、尖圭コンジローム（condylo

10

20

30

40

50

mata acuminata: C A)、慢性B型肝炎、悪性黒色腫、濾胞性非ホジキンリンパ腫、多発性硬化症、慢性肉芽腫症、マイコバクテリウム・アビウムコンプレックス (mycobacterium avium complex: M A C) 症、肺線維症、及び骨粗しょう症など。

【0231】

いくつかの実施形態では、本発明のグルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) ポリペプチドが、次の疾患を有する患者を治療するのに使用される。非インスリン依存型糖尿病、肥満、脳卒中、心筋梗塞、脳梗塞、ストレス誘導性高血糖症、又は過敏性腸症候群。

【0232】

ある実施形態では、本発明のポリペプチドは、それ自体が固体に提供される。ある実施形態では、本発明のポリペプチドは、薬学的に許容される担体と混合されて、薬学的組成物の一部として固体に提供される。

【0233】

ある実施形態では、「薬学的組成物」は、本明細書で説明した1つ以上の有効成分を、他の化学成分 (生理学的に適切な担体、賦形剤など) と共に含む製剤である。薬学的組成物は、生物への化合物の投与を容易にすることを目的としている。

【0234】

ある実施形態では、「有効成分」は、生物学的効果に対して責任がある目的のポリペプチド配列を意味する。

【0235】

いくつかの実施形態では、本発明の組成物のいずれも、目的のタンパク質に結合した少なくとも2つの任意のCTP配列を含む (任意の形態で)。ある実施形態では、本発明は、組み合わせられた製剤を提供する。ある実施形態では、「組み合わせられた製剤」は、「キット薬剤 (kit of parts)」を意味する。前記キット薬剤における組み合わせられた成分は、独立して投与することができる。或いは、前記キット薬剤における前記組み合わせられた成分の量を変えた様々な固定された組み合わせを用いて投与可能である。すなわち、前記キット薬剤は、同時に、一斉に、別々に、又は連続して投与可能である。いくつかの実施形態では、前記キット薬剤の任意の部分を、同時に又は経時的に、異なる時点で、同じ若しくは異なる間隔で投与することができる。前記組み合わせる成分の総量の割合は、ある実施形態では、組み合わせられた製剤に処方することができる。ある実施形態では、前記組み合わせられた製剤は、例えば、治療する患者の亜母集団の要求、又は特定の疾患、疾患の重症度、年齢、性別、又は体重に起因して要求が異なる単一の患者の要求に対処するために変更することができ、そのような変更は当業者であれば容易に行うことができる。

【0236】

ある実施形態では、「生理学的に許容される担体」及び「薬学的に許容される担体」という用語は同じ意味で使用され、生体を強く刺激せず、投与した組成物の生物学的活性及び性質を抑制しない担体又は希釈剤を意味する。補助剤は、これらの用語に含まれる。ある実施形態では、薬学的に許容される担体に含まれる成分の1つとしては、例えば、ポリエチレン・グリコール (polyethylene glycol: PEG) や有機及び水性培地の両方に対して幅広い溶解度を示す、生体適合性ポリマーなどがある (Mutter et al. (1979))。

【0237】

ある実施形態では、「賦形剤」は、有効成分の投与をさらに容易にすべく薬学的組成物に加えられる不活性物質を意味する。ある実施形態では、賦形剤は、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、様々な糖質及び種類のでんぷんセルロース誘導体、ゼラチン、直物油、及びポリエチレン・グリコールを含む。

【0238】

薬剤の製剤及び投与の技術は、「Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co., Easton, PA, latest edition)」に開示されている (この参照により本明細書に組み込まれる)。

【0239】

10

20

30

40

50

ある実施形態では、適切な投与経路は、例えば、経口、直腸、経粘膜、経鼻、経腸、又は非経口投与を含む。非経口投与としては、筋肉内、皮下及び髄内注射、並びに、くも膜下、直接の脳室内、静脈内、腹膜内、鼻腔内、眼内注射がある。

【0240】

ある実施形態では、前記製剤は、例えば、前記製剤を患者身体の特定部位に注射することによって、全身ではなく局所に投与される。

【0241】

本発明の様々な実施形態では、様々な投与量の範囲を含む。本発明のポリペプチドの投与量は、ある実施形態では、0.05～80 mg/日の範囲である。他の実施形態では、前記投与量は、0.05～50 mg/日の範囲である。他の実施形態では、前記投与量は、0.1～20 mg/日の範囲である。他の実施形態では、前記投与量は、0.1～10 mg/日の範囲である。他の実施形態では、前記投与量は、0.1～5 mg/日の範囲である。他の実施形態では、前記投与量は、0.5～5 mg/日の範囲である。他の実施形態では、前記投与量は、0.5～50 mg/日の範囲である。他の実施形態では、前記投与量は、5～80 mg/日の範囲である。他の実施形態では、前記投与量は、35～65 mg/日の範囲である。他の実施形態では、前記投与量は、20～60 mg/日の範囲である。他の実施形態では、前記投与量は、40～60 mg/日の範囲である。他の実施形態では、前記投与量は、45～60 mg/日の範囲である。他の実施形態では、前記投与量は、60～120 mg/日の範囲である。他の実施形態では、前記投与量は、120～240 mg/日の範囲である。他の実施形態では、前記投与量は、40～60 mg/日の範囲である。他の実施形態では、前記投与量は、240～400 mg/日の範囲である。他の実施形態では、前記投与量は、45～60 mg/日の範囲である。他の実施形態では、前記投与量は、15～25 mg/日の範囲である。他の実施形態では、前記投与量は、5～10 mg/日の範囲である。他の実施形態では、前記投与量は、55～65 mg/日の範囲である。

【0242】

ある実施形態では、前記投与量は、20 mg/日の範囲である。他の実施形態では、前記投与量は、30 mg/日の範囲である。他の実施形態では、前記投与量は、40 mg/日の範囲である。他の実施形態では、前記投与量は、50 mg/日の範囲である。他の実施形態では、前記投与量は、60 mg/日の範囲である。他の実施形態では、前記投与量は、70 mg/日の範囲である。他の実施形態では、前記投与量は、80 mg/日の範囲である。他の実施形態では、前記投与量は、90 mg/日の範囲である。他の実施形態では、前記投与量は、100 mg/日の範囲である。

【0243】

経口投与は、ある実施形態では、例えば、錠剤、カプセル、トローチ、チュアブル錠、懸濁液、乳剤などの単位投与量形態を含む。そのような単位投与量形態は、安全で有効な量の前記所望の化合物を含む。前記安全で有効な量は、ある実施形態では、約0.7又は3.5 mg～280 mg/70 kgであり、他の実施形態では、約0.5又は10 mg～210 mg/70 kgである。経口投与用の前記単位投与量形態の製剤に適した前記薬学的に許容される担体は、当該技術分野では周知である。ある実施形態では、錠剤は一般に、従来の薬学的に適合する不活性希釈剤としての補助剤（炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、マンニトール、ラクトース、セルロースなど）、結合剤（デンプン、ゼラチン、サッカロースなど）、潤滑剤（ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、タルク）を含む。ある実施形態では、粉状混合体の流動性を向上させるために、例えば二酸化ケイ素などの流動促進剤を使用することができる。ある実施形態では、外観のために、例えばED&C染料などの着色剤を添加することができる。例えばアスパルテーム、サッカリン、メントール、ペパーミント、果実フレーバーなどの甘味料及び芳香料は、チュアブル錠剤にとって有用な補助材である。カプセル剤は一般に、上述した1つ以上の固体希釈剤を含む。ある実施形態では、担体組成物の選択は、本発明の目的には重要ではない、味、コスト及び保存安定性などの二次的な配慮に依存する。また、前記担体組成物は、当業者であれば容

易に作成することができる。

【0244】

ある実施形態では、経口投与剤は、予め定められた放出特性を含む。ある実施形態では、本発明の経口投与剤は、持続放出性の錠剤、カプセル剤、トローチ剤又はチュアブル錠剤を含む。ある実施形態では、本発明の経口投与剤は、徐放性の錠剤、カプセル剤、トローチ剤又はチュアブル錠剤を含む。ある実施形態では、本発明の経口投与剤は、即時放出性の錠剤、カプセル剤、トローチ剤又はチュアブル錠剤を含む。ある実施形態では、前記経口投与剤は、薬学的な有効成分の所望の放出性に従って、当業者に周知の方法によって作成される。

【0245】

非経口投与剤は、いくつかの実施形態では、溶液、乳液、懸濁液などを含む。いくつかの実施形態では、非経口投与剤に適する薬学的に許容される担体は、当該技術分野では周知である。液体の経口投与剤は、いくつかの実施形態では、約0.012~0.933%の、他の実施形態では約0.033~0.7%の目的の組成物を含む。

【0246】

いくつかの実施形態では、本発明に係る方法で使用する組成物は、溶液又は乳液を含む。また、いくつかの実施形態では、前記組成物は、安全で効果的な量の本発明の組成物（随意的に、局所的な経鼻投与用の他の組成物）を含有する水性溶液又は乳液を含む。いくつかの実施形態では、前記組成物は、前記組成物の経鼻投与による全身送達に使用される、約0.01~10.0%w/v、より好ましくは約0.1~2.0%w/vの対象組成物を含む。

【0247】

他の実施形態では、本発明の薬学的組成物は、液体製剤の静脈内注射、動脈内注射又は筋肉内注射によって投与される。いくつかの実施形態では、液体製剤としては、溶液、懸濁液、分散液、乳濁液、油などがある。ある実施形態では、前記薬学的組成物は、静脈内投与に適した形態に作成され、静脈内に投与される。他の実施形態では、本発明に係る薬学的組成物は、動脈内投与に適した形態に作成され、動脈内に投与される。他の実施形態では、本発明に係る薬学的組成物は、筋肉内投与に適した形態に作成され、筋肉内に投与される。

【0248】

さらに、他の実施形態では、本発明の薬学的組成物は、局所投与に適した形態に作成され、体表面に局所的に投与される。適切な局所性製剤としては、ゲル、軟膏、クリーム、ローション、液滴などがある。局所的に投与するために、本発明の薬学的組成物は、さらなる適切な治療物質と組み合わせられ、薬学的に許容される担体を用いて又は用いることなく、生理学的に認容される希釈液を含む溶液、懸濁液、又は乳状液として作成され投与される。

【0249】

ある実施形態では、本発明の薬学的組成物は、当該技術分野で周知の方法（例えば、従来の、混合、溶解、顆粒化、糖衣錠形成、微粒子化、乳化、カプセル化、封入化、又は凍結乾燥化のプロセス）によって製造される。

【0250】

ある実施形態では、本発明に従って使用する薬学的組成物は、前記生理学的に許容される担体は、有効成分を処理して薬学的に使用可能な製剤を作成することを容易にする賦形剤および補助剤を含む1つ以上の生理学的に許容される担体を使用する従来の方法によって作成される。ある実施形態では、製剤の作成は、選択される投与の経路に依存する。

【0251】

ある実施形態では、本発明の注入物質は、水溶液中に配合される。ある実施形態では、本発明の注入物質は、ハanks溶液、リンガー液、又は生理食塩緩衝液などの生理学的に適合する緩衝液中に配合される。ある実施形態では、経粘膜投与のためには、浸透されるべきバリアに対して適した浸透剤が前記製剤に使用される。このような浸透剤は一般に、

10

20

30

40

50

当該分野で公知である。

【0252】

ある実施形態では、本明細書で説明された薬学的組成物は、ボーラス注入や持続注入などの非経口投与用に作成される。いくつかの実施形態では、注入用の製剤は、単位投与量形態（例えば、アンプル）又は複数用量容器の形態で、随意的に添加された保存剤と共に存在する。いくつかの実施形態では、前記組成物は、油性及び水性の賦形剤中の懸濁物、溶液又は乳剤であり、懸濁剤、安定化剤、及び／又は分散剤のような製剤化剤処方剤を含む。

【0253】

本発明に係る薬学的組成物はまた、いくつかの実施形態では、次に列記するようなものを含む。防腐剤（塩化ベンザルコニウム、チメロサルなど）、キレート剤（エデト酸塩など）、緩衝剤（リン酸塩、クエン酸塩、酢酸塩など）、等張化剤（塩化ナトリウム、塩化カリウム、グリセリン、マンニトールなど）、抗酸化物質（アスコルビン酸、アセチルシステイン、メタ重亜硫酸ナトリウムなど）、芳香剤、粘性調整剤（例えば、セルロース及びその誘導体を含むポリマー）、及び、これらの水性組成物のpHを必要に応じて調整するポリビニル・アルコール並びに酸及び塩基。前記薬学的組成物はまた、局部麻酔薬又は他の有効成分を含み得る。前記薬学的組成物は、スプレー、ミスト、液滴などの形態で使用することもできる。

【0254】

いくつかの実施形態では、非経口投与のための薬学的処方物は、水溶性形態での活性製剤の水溶液を含む。さらに、有効成分の懸濁物は、いくつかの実施形態では、適切な油性又は水性の注入用懸濁液として調製される。適切な親油性溶媒又は担体としては、いくつかの実施形態では、油脂（ゴマ油など）又は合成脂肪酸エステル（オレイン酸エチル、トリグリセリド又はリポソーム）がある。水性注入懸濁液は、ある実施形態では、カルボキシルメチル・セルロース・ナトリウム、ソルビトール又はデキストランなどの懸濁液の粘度を増加させ物質を含む。他の実施形態では、必要に応じて、懸濁物はまた、有効成分の溶解度を増加させる適切な安定剤又は薬剤を含み、高度に濃縮された溶液の作成を可能にする。

【0255】

他の実施形態では、活性化合物は、ヘシクル（特にリポソーム）中に存在する状態で送達される。詳細については、「Langer, Science 249: 1527-1533, 1990; Treat et al., in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, 353-365, 1989; Lopez-Berestein, ibid, 317-327」を参照されたい（主にibidを参照されたい）。

【0256】

他の実施形態では、制御放出システムによって送達される医薬組成物は、静脈内注入、植込型浸透圧ポンプ、経皮パッチ、リポソーム、又は他の投与形態で投与するように作成される。ある実施形態では、ポンプが使用される（例えば、「Langer, supra; Sefton, C RC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201, 1987; Buchwald et al., Surgery 88:507, 1980; Saudek et al., N. Engl. J. Med. 321:574, 1989」を参照されたい）。他の実施形態では、高分子材料を使用することができる。さらなる別の実施形態では、制御放出システムは、治療標的すなわち脳の近くに設けることができる。このことにより、必要とされる投与量は、全身投与量と比べるとほんの少量で済む（例えば、「Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp.115-138, 1984」を参照されたい）。他の制御放出システムは、「Langer (Science 249:1527-1533, 1990)」によるレビューに記載されている。

【0257】

いくつかの実施形態では、前記活性物質は、使用前に、適切な担体（例えば、殺菌された無ピロゲン水ベースの溶液）と共に粉末形状に形成される。いくつかの実施形態では、前記組成物は、噴霧又は吸入投与用に作成される。ある実施形態では、前記組成物は、噴

10

20

30

40

50

霧手段に装着された容器内に収容される。

【0258】

ある実施形態では、本発明の製剤は、座薬又は保持浣腸（例えば、カカオバター又は他のグリセリドのような従来の座薬基剤を含む）のような直腸組成物として作成される。

【0259】

いくつかの実施形態では、本発明での使用に適した薬学的組成物は、意図する目的を達成するのに効果的な量の有効成分を含有する組成物を含む。ある実施形態では、治療に効果的な量とは、有効成分が症状を予防、緩和又は改善するのに、又は治療中の患者の生存を延長するのに効果的な量を意味する。

【0260】

ある実施形態では、治療に効果的な量の判断は、当業者の能力の範囲内にある。

【0261】

前記薬学的組成物は、次に列挙するものをさらに含む。防腐剤（塩化ベンザルコニウム、チメロサルなど）、キレート剤（エデト酸ナトリウムなど）、緩衝剤（リン酸塩、クエン酸塩、酢酸塩など）、等張化剤（塩化ナトリウム、塩化カリウム、グリセリン、マンニトールなど）、抗酸化物質（アスコルビン酸、アセチルシステイン、メタ重亜硫酸ナトリウムなど）、芳香剤、粘性調整剤（例えば、セルロース及びその誘導体を含むポリマー）、及び、これらの水性組成物のpHを必要に応じて調整するポリビニル・アルコール並びに酸及び塩基。前記薬学的組成物はまた、局部麻酔薬又は他の有効成分を含み得る。前記薬学的組成物は、スプレー、ミスト、液滴などの形態で使用することもできる。

【0262】

薬学的に許容される担体又はその成分となる物質のいくつかの例としては、次のものがある。糖（ラクトース、グルコース、サッカロースなど）、デンプン（コーンのデンプン、ジャガイモのデンプン）、セルロース及びその誘導体（カルボキシメチルセルロース、エチルセルロース、メチルセルロースなど）、トラガカント粉末、麦芽、ゼラチン、タルク、固体潤滑剤（ステアリン酸、ステアリン酸マグネシウムなど）、硫酸カルシウム、植物性油（ピーナッツ油、綿実油、ゴマ油、オリーブ油、コーンオイル、テオブロマカカオ油など）、ポリオール（プロピレン・グリコール、グリセリン、ソルビトール、マンニトール、ポリエチレン・グリコールなど）、アルギン酸、乳化剤（Tween（登録商標）など）、湿潤剤（ラウリル硫酸ナトリウムなど）、着色剤、芳香料、錠剤成形剤、安定剤、抗酸化物質、防腐剤、無ピロゲン水、等張食塩水、及びリン酸緩衝液。前記組成物と共に使用される薬学的に許容される担体は、基本的には、組成物の投与方法に基づいて選択される。対象組成物を注入する場合は、ある実施形態では、薬学的に許容される担体は、pHが約7.4に調整された血液適合性懸濁化剤を含有する、食塩水、生理食塩水である。

【0263】

さらに、前記薬学的組成物は、次に挙げるものをさらに含む。結合剤（アカシア、コーンスターチ、ゼラチン、カルボマー、エチルセルロース、グアールガム、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポビドンなど）、崩壊剤（コーンスターチ、ジャガイモデンプン、アルギン酸、二酸化ケイ素、クロスカルメロースナトリウム、クロスポビドン、グアールガム、澱粉グリコール酸エステルナトリウムなど）、様々なpH及びイオン強度の緩衝液（トリス-HCl、アセテート、リン酸塩など）、洗剤（例えば、トウィーン20、トウィーン80、プルロニックF68、胆汁酸塩）、プロテアーゼ阻害剤、界面活性剤（ラウリル硫酸ナトリウムなど）、浸透エンハンサー、可溶化剤（グリセロール、ポリエチレングリセロールなど）、抗酸化剤（アスコルビン酸、メタ重亜硫酸ナトリウム、ブチルヒドロキシアニソールなど）、安定剤（ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースなど）、粘度上昇剤（カルボマー、コロイド状二酸化ケイ素、エチルセルロース、グアールガムなど）、甘味料（アスパルテーム、クエン酸など）、防腐剤（チメロサル、ベンジルアルコール、パラオキシ安息香酸エステル類など）、潤滑剤（ステアリン酸、ステアリン酸マグネシウム、ポリエチレン・グリコール、ラウリル硫酸ナトリウムなど）、流動助剤（コロイド状二酸化ケイ素など

）、可塑剤（フタル酸ジエチル、クエン酸トリエチルなど）、乳化剤（カルボマー、ヒドロキシプロピルセルロース、ラウリル硫酸ナトリウムなど）、ポリマー被覆剤（例えば、ポロキサマー、ポロキサミンなど）、被覆剤及び膜形成剤（例えば、エチルセルロース、アクリル酸塩、ポリメタクリル酸塩）、及び／又は、アジュバント。

【0264】

シロップ、エリキシル剤、乳剤及び懸濁液用の担体としての一般的な成分としては、エタノール、グリセロール、プロピレン・グリコール、ポリエチレン・グリコール、サッカロース液、ソルビトール及び水がある。懸濁液の場合は、一般的な懸濁化剤は、メチルセルロース、カルボキシメチル・セルロース・ナトリウム、セルロース（Avicel（登録商標）、RC-591など）、トラガカント及びアルギン酸ナトリウムを含む。一般的な湿潤剤は、レシチン及びポリエチレン・オキシド・ソルビタン（ポリソルベート80など）がある。一般的な防腐剤は、メチルパラベン及び安息香酸ナトリウムを含む。また、他の実施形態では、経口液体組成物は、上述した甘味料、芳香料及び／又は着色剤などの1つ以上の組成物を含む。

【0265】

本発明の薬学的組成物は、活性物質を、ポリマー化合物（ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ヒドロゲルなど）の粒子状製剤や、リボソーム、マイクロエマルジョン、ミセル、単層若しくは多層状の小胞、赤血球ゴースト、又はスフェロプラストなどの活性物質と結合させたものを含む。そのような薬学的組成物は、物理的状态、溶解度、安定性、インビボでの放出速度、及びインビボでの排出速度に影響を及ぼす。

【0266】

ポリマー（ポロキサマー、ポロキサミンなど）で被覆された粒子状組成物も本発明に含まれる。また、組織特異性受容体、リガンド又は抗原に対する抗体と結合した化合物や、組織特異性受容体のリガンドと結合した化合物も本発明に含まれる。

【0267】

また、水溶性ポリマーの共有結合によって修飾された化合物も本発明に含まれる。前記水溶性ポリマーとしては、例えば、ポリエチレン・グリコール、ポリエチレン・グリコールとポリプロピレン・グリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニル・アルコール、ポリビニルピロリドン、及びポリプロリンがある。他の実施形態では、前記修飾された化合物は、対応する修飾されていない化合物と比較すると、静脈注射後に血液中で著しく長い半減期を示す。ある実施形態では、前記修飾は、前記化合物の水溶液中での溶解度を高め、凝集を防止し、前記化合物の物理的及び化学的安定性を向上させ、前記化合物の免疫原性及び反応性を著しく低下させる。他の実施形態では、前記ポリマー化合物を、修飾されていない化合物よりも低い頻度で又は少ない用量で投与することにより、インビボでの望ましい生物学的活性が得られる。

【0268】

いくつかの実施形態では、薬剤の治療に効果的な量又は投与量は、インビトロ試験によって推定することができる。ある実施形態では、投与量は、動物モデルで策定することができ、このような情報は、ヒトにおいて有用な用量をより正確に決定するために使用することができる。

【0269】

ある実施形態では、本明細書で説明された有効成分の毒性及び治療効果は、インビトロ、細胞培養又は実験動物において標準的な薬学的手法によって決定することができる。ある実施形態では、インビトロ及び細胞培養分析並びに動物実験から得られたデータは、ヒトに使用する場合の投薬量範囲を策定するのに使用することができる。ある実施形態では、投薬量は、使用される投薬形態及び利用される投与経路に応じて変更される。ある実施形態では、正確な配合、投与経路、及び投薬量は、患者の状態を参照して、個々の医師によって選択される。（例えば、Finglら、1975、「The Pharmacological Basis of Therapeutics」、第1章、第1ページ）。

【0270】

ある実施形態では、治療する疾患の重症度及び反応性に応じて、薬剤投与は1回又は複数回行われる。薬剤投与を複数回行う場合は、数日から数週間の期間で、治療効果があるまで若しくは病状が改善されるまで続けられる。

【0271】

ある実施形態では、投与される組成物の量は、当然のことながら、処置される対象、疾患の重症度、投与方法、処方医師の判断などに応じる。

【0272】

ある実施形態では、適合する薬学的担体中に配合された本発明の製剤を含む組成物が、適切な容器に入れられ、示された疾患の治療のためにラベルされる。

【0273】

ある実施形態では、本発明の組成物は、所望であれば、活性成分を含有する単位投薬形態を1つ以上収容可能なパック又はディスペンサー装置（例えば、FDA認可キット）に収容される。ある実施形態では、前記パックは、例えば、金属又はプラスチックホイル（例えば、プリスターパック）を含む。ある実施形態では、前記パック又はディスペンサー装置には、投与のための説明書が添付されている。ある実施形態では、前記パック又はディスペンサー装置には、収容物に関する注意文書が、製造、薬剤の使用及び販売を規制する政府機関によって規定された形態で添付されている。前記注意文書は、前記機関による前記組成物又はヒト又は動物への投与形態についての承認を反映している。そのような注意文書は、ある実施形態では、処方薬又は承認された製品挿入について、米国食品医薬品局に承認されてラベルされる。

【0274】

ある実施形態では、本発明のポリペプチドは、各成分のみで治療する場合と比べて治療効果を向上させるために、さらなる有効成分と共に個人に提供することができることに留意されたい。他の実施形態では、併用療法に関連する副作用に対抗するための措置が取られる（例えば、相補製剤の投与及び選択）。

【0275】

本発明のさらなる目的、利点及び新規な特徴は、限定するものではない以下の実施例によって、当業者にはより明らかになるであろう。さらに、上記に明記した及び特許請求の範囲に記載された本発明の各実施形態及び態様は、以下の実施例によって実験的な支持を得るであろう。

【実施例】

【0276】

一般的に、ここで使用する用語、及び本発明で使用する実験手段は、分子技術、生物化学技術、微生物学的技術、及び組み換えDNA技術に関する。そのような技術は、様々な文献に記載されている。例えば、「"Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989)」、「"Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994)」、「Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989)」、「Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988)」、「Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York」、「Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998)」、米国特許第4,666,828号、第4,683,202号、第4,801,531号、第5,192,659号、及び第5,272,057号に記載されている方法論、「"Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volumes I-III Cellis, J. E., ed. (1994)」、「"Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" by Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Third Edition」、「"Current Protocols in Immunology" Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994)」、「"Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" by Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Third Edition」、「"Current Protocols in Immunology" Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994)」、「Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8t

10

20

30

40

50

h Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994)」、並びに「Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., New York (1980)」を参照されたい。利用できるイムノアッセイは、様々な特許及び科学文献に記載されている。例えば、米国特許第3,791,932号、第3,839,153号、第3,850,752号、第3,850,578号、第3,853,987号、第3,867,517号、第3,879,262号、第3,901,654号、第3,935,074号、第3,984,533号、第3,996,345号、第4,034,074号、第4,098,876号、第4,879,219号、第5,011,771号、及び第5,281,521号、「"Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984)」、「"Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1985)」、「"Transcription and Translation" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1984)」、「"Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986)」、「"Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986)」、「"A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) and "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press」、「"PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990)」、並びに「Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996)」を参照されたい（参照により、本明細書に含まれるものとする）。他の一般的な引用文献は、本明細書に記載されている。

10

【0277】

《実施例1：EPO構築物の作成》

20

【0278】

＜材料及び方法＞

【0279】

発現ベクターpCI-dhfrの構築：

【0280】

PromegaからpCI-neo哺乳類発現ベクターを調達した（カタログ番号：E1841）。このベクターは、CMV IEエンハンサー／プロモータとネオマイシン・ホスホトランスフェラーゼ遺伝子とを含む。ATCC（アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション）からpSV2-dhfrクロンを調達した（カタログ番号：37146）。このプラスミドは、マウスのdhfr遺伝子を含む。pCI-dhfrベクターの構築は、下記のように行った。

30

【0281】

a. pSV2-dhfrプラスミドを、制限酵素BglIIで切断した（dhfr遺伝子の3'末端）。DNAポリメラーゼIの大きな（クレノウ）断片を使用して5'の突出部分を補完して平滑末端を形成した。次に、制限酵素AvrIIでDNAを切断した（dhfr遺伝子の5'末端）。AveIIで切断し、平滑末端を有するdhfr遺伝子を単離した。

【0282】

b. pCI-neoベクターを、制限酵素BstXIで切断した（neo遺伝子の3'末端）。DNAポリメラーゼIの大きな（クレノウ）断片を使用して3'の突出部分がないようにして平滑末端を形成した。次に、DNAを制限酵素AvrIIで切断した（neo遺伝子の5'末端）。平滑末端を有する発現ベクターを単離した。

40

【0283】

c. dhfr遺伝子をpCIベクターに連結して、dhfr遺伝子を含む発現ベクター（pCI-dhfr）を作成した。

【0284】

変異型hEPO-CTPの構築：

【0285】

hCGのベータサブユニットのC末端ペプチドを含むカセット遺伝子を、ヒトEPO（

50

NP_000790. 2) 配列に、異なる部位で融合した。図1A～Dに示されている4つの変異型EPO-CTPを構築した。proEPOシグナルペプチドを使用して、変異型分泌EPO-CTPを作成した。Epo配列を含むXbaI-NotI断片を、本発明に係るpCI-dhfr発現ベクターに連結した。

【0286】

下記の表2に、本発明に係るCTP含有ポリペプチドの構築に使用したプライマーを要約した。

表2

プライマー番号	配列番号	配列	制限部位 (配列の下線部分)
1	7	5' AATCTAGAGGTCATCATGGGGGTGC 3'	XbaI
2	8	5' ATTGCGGCCGCGGATCCAGAAGACCTTTATTG 3'	NotI
17 ^R	9	5' TAAATATTGGGGGTGTCCGAGGGCCC 3'	SspI
10	10	5' CCAATATTACCACAAGCCCCACCACGCCTCAT 3'	SspI
11 ^R	11	5' TGCGGCCGCGGATCCTTATCTGTCCCCTGTCCTGC 3'	NotI
15	12	5' GCCCTGCTGTCCGAAGC 3'	
2 ^R	13	5' ATTGCGGCCGCGGATCCAGAAGACCTTTATTG	NotI
23 ^R	14	5' CTTTGAGGAAGAGGAGCCCAGGACTGGGAGGC3'	
24	15	5' CCTGGGCTCCTCTTCCTCAAAGGC 3'	
38 ^R	16	5' GCTTCCGACAGCAGGGC 3'	

【0287】

EPO-1 701-1-p17-6 (Epo-1、配列番号1)：上記のプライマー(配列番号7～16)を使用してPCRを行うことで702bpのXbaI-NotI断片を構築した。次に、EPO-ctp配列を含むXbaI-NotI PCR断片を、pCI-dhfr発現ベクターに連結した。

【0288】

EPO-2 701-2-p24-2 (Epo-2、配列番号2)：pCI-dhfr-401-2-p21-2 (hGH-ctp×2)のXbaI/ApaI断片(hGH-ctp)を、701-1-p17-6のXbaI/ApaI断片(EPO-ctp)で置換してEpo-ctp×2を形成した。

【0289】

EPO-4-701-4-p42-1 (Epo-4、配列番号4)：最初に、プライマー1及び17を使用してpCI-dhfr-EPO-ctp (701-1-p17-6)に対してPCRを行い、その後にPCR産物をXbaI/SspIで切断した。これにより、EPO及びCTPの5'部分を含む断片が得られた。

【0290】

次に、pGT123-hEpoを鋳型として、プライマー10及びプライマー11を使用してPCRを行うことで、新しい断片を構築した。SspI/NotIで切断したところ、CTPの3'部分とEpoとを含む断片が得られた。

【0291】

2つの断片を、pCI-dhfrに連結してp701-4-p42-1クローンを構築した。

【0292】

EPO-3-p56-6 (Epo-3、配列番号3)：プライマーは、Sigma-Genosysから調達した。プライマー15 (配列番号12) 及びプライマー2^R (配列番号13)、並びに鋳型としてのpCI-dhfr-EPO-ctp×2 (701-2-p24-2) プラスミドを使用してPCRを行った。PCR増幅の結果、468bpの産物が形成された。このPCR産物を、TAクローニングベクター (Invitrogen、カタログ番号K2000-01) に連結した。Epo-ctp×2配列を含むStuI-NotI断片を単離した (209bp)。

10

【0293】

3つのPCR反応を連続して行った。最初の反応は、プライマー1 (配列番号7) 及びプライマー23^R (配列番号14)、並びに鋳型としてのpGT123-epo-ctpプラスミドを使用して行った。PCR増幅の結果、80bpの産物が形成された (シグナルペプチド)。

20

【0294】

第2の反応は、プライマー24 (配列番号15) 及びプライマー11^R (配列番号11)、並びに鋳型としての701-4-p42-1プラスミドを使用して行った。PCR増幅の結果、610bpの産物が形成された。

【0295】

最後の反応は、プライマー1 (配列番号7) 及びプライマー11^R (配列番号11)、並びに鋳型としての上記2つの反応で得られた産物の混合物を使用して行った。PCR増幅の結果、700bpの産物が形成された。XbaI-StuIの断片を単離した。

【0296】

2つの断片 (XbaI-StuI及びStuI-NotI) を真核細胞発現ベクターpCI-dhfrに連結して (3連結) 701-3-p56-6クローンを作成した。

30

【0297】

EPO-5-p91-4 (Epo-5、配列番号5、(ctp-Epo))：プライマーは、Sigma-Genosysから調達した。プライマー1 (配列番号7) 及びプライマー11^R (配列番号11)、並びに鋳型としてのpCI-dhfr-ctp-EPO-ctp×2 (701-3-p56-6) DNAプラスミドを使用してPCR反応を行った。PCR増幅の結果、670bpの産物が形成された。この産物をTAクローニングベクター (Invitrogen、カタログ番号K2000-01) に連結した。ctp-EPO配列を含むXbaI-NotI断片を真核細胞発現ベクターpCI-dhfrに連結して701-5-p91-4クローンを作成した。

40

【0298】

EPO-6-p90-1 (Epo-6、配列番号6、(ctp-Epo-ctp))：3つのPCR反応を行った。第1の反応は、プライマー1 (配列番号7) 及びプライマー38^R (配列番号16)、並びに鋳型として701-3-p56-6プラスミドDNAを使用して行った。PCR増幅の結果、400bpの産物が形成された。

【0299】

第2の反応は、プライマー15 (配列番号12) 及びプライマー2^R (配列番号13)、並びに鋳型としての701-1-p17-6プラスミドDNAを使用して行った。PCR増幅の結果、390bpの産物が形成された。

【0300】

50

最後の反応は、プライマー 1（配列番号 7）及びプライマー 2^R（配列番号 13）、並びに鋳型として前の 2 つの反応で得られた産物の混合物を使用して行った。PCR 増幅の結果、787bp の産物が形成された。この産物を TA クローニングベクター（Invitrogen、カタログ番号 K2000-01）に連結した。ctp-EPO-ctp 配列を含む XbaI-NotI 断片を真核細胞発現ベクター pCI-dhfr に連結して、701-6-p90-1 クローンを作成した。

【0301】

《実施例 2：EPO-CTP ポリペプチドの発現及び単離》

【0302】

＜材料及び方法＞

【0303】

DNA トランスフェクション及びクローン選択：

【0304】

FuGENE6 Reagent（FuGENE Transfection Reagent、Roche カタログ番号：11 815 091 001）を使用して変異型 EPO-CTP を含む pCI-DHFR 発現ベクターを DG44 細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションの 48 時間後、細胞を希釈し、50～200 細胞／ウェルになるように、選択培地（8mM の L-グルタミン（Biological Industries、カタログ番号：03-020-1A）及び 18mL/L の 10% プルロニック F-68 溶液（Gibco、カタログ番号：240040-032）が添加された HT 欠失 CD DG44 培地（Gibco、Scotland、カタログ番号 07990111A）（SKU 番号：ME060027））に植種した。市販の ELISA を使用して、選択したクローンから、タンパク質合成の最も高いものをスクリーニングした。各変異型の 3～5 つのクローンを、バックアップ細胞バンクのために凍結した。各変異型に関して選択したクローンを、軌道振盪台上での大きなスケールの培養液（最大 1L フラスコ）での生育に順応させた。上清を回収し、ELISA、SDS-PAGE、及びウエスタンブロットで分析した。アリコートを採取した後、タンパク質含有上清を、次の使用までに凍結保存した。

【0305】

細胞培養：

【0306】

8% の CO₂ を有する加湿されたインキュベータ（37℃）内に、8mM の L-グルタミン（Biological Industries、カタログ番号：03-020-1A）及び 18mL/L の 10% のプルロニック F-68 溶液（Gibco、カタログ番号：240040-032）が添加された HT 含有の DG44 培地（Gibco、カタログ番号：12610-010）にて細胞を維持した。トランスフェクトしたクローンは、HT、ヒポキサンチン、及びチミジンを含むしない、且つプルロニック酸及び L-グルタミンを含む DG44 基礎培地にて維持した。

【0307】

サンプルの調整：

【0308】

上清を回収し、ろ過し、ELISA で分析してタンパク質濃度を測定した。純度の評価及び同定のために、SDS-PAGE 及びウエスタンブロットを使用した。ELISA の後、サンプルの濃度を決定し、PBS に対して透析した。アリコートを採取した後は、タンパク質含有の上清を、次の使用までに -20℃ で凍結保存した。

【0309】

ウエスタンブロット：

【0310】

非変性 15% SDS ポリアクリルアミドゲルでサンプルを電気泳動した。ゲルは、25mM の Tris 及び 192mM グリシン含有の 20%（体積／体積）メタノールで 10 分間平衡化した。Mini Trans-Blot 電気泳動セル（Biorad Laboratories, Richmond, CA

10

20

30

40

50

）を使用して、250 mA、3時間でタンパク質を、0.2 μ mの細孔を有するニトロセルロース膜（Sigma, Saint Louis, MO）に転写した。次に、ニトロセルロース膜を、5%の無脂肪乾燥乳にて、2時間、室温でインキュベートした。膜を、EPO抗血清（タイター1：1000）と共に一晚、4℃でインキュベートし、0.1%のTween含有のPBSで3回洗浄した（10分間／1回の洗浄）。次に、膜を、西洋ワサビペルオキシダーゼ（Horse Radish Peroxidase：HRP）（Zymed, San Francisco, CA）に融合した2次抗体と共に、2時間、室温でインキュベートし、3回洗浄した。最後に、ニトロセルロース膜を強化型化学発光基質（enhanced chemiluminescent substrate：ECL）（Pierce, Rockford, IL）と5分間反応させ、Whatmanシートで乾燥させ、X線フィルムに曝した。

【0311】

<結果>

【0312】

表3：選択した5クローンから得られた、CTPで修飾された様々なEPOの濃度及び、さらなる検査のための調整。

【0313】

表3

バージョン番号	クローン番号	ストックの タイター IU/ml^1	Epo3のタイターに合わせるように Mock supで希釈した後の タイター IU/ml^2	限外ろ過後 IU/ml^3
Epo0 配列番号16	17	3093	102	335
Epo1 配列番号1	47	1049	104	291
Epo2 配列番号2	67	2160	110	303
Epo3 配列番号3	85	105	119	392
Epo4 配列番号4	112	6100	ND	342

1. 変異型EPOのストック濃度は、ELISA（Quantikine IVD Epo ELISA, DEPO0, R & D Systems）で測定した。

2. EPO-0、1、2及び4のサンプルは、偽上清（mock sup）で105 IU/mlに希釈した（Epo3のタイターに合わせた）。Epo0 = CTPが修飾されたEPOと同じ系で発現される野生型EPO。

3. 全てのサンプルを濃縮し、最終濃度が180 IU/mlになるまで限外ろ過法でPBSに対して透析した。

【0314】

図2に示されているように、全てのタンパク質をウェスタンブロット検出した。

【0315】

《実施例3：本発明のEPO-CTPポリペプチドの生物活性》

【0316】

TF-1生物活性テストによって、変異型EPO-CTPが自身の受容体に結合し細胞増殖を引き起こす活性を促進する能力を確認することができる。したがって、本発明に係るEPO-CTPポリペプチドの生物学的な効力を評価する第1のステップとして、このテストを使用した。

【0317】

＜材料及び方法＞

【0318】

細胞増殖の分析：

【0319】

EPO活性に応じた細胞株のMTTレベルを測定する増殖アッセイを細胞株TF-1に対して行った（「Kitarnura et al., Kitamura, T. et al. (1989) Establishment and characterization of a unique human cell line that proliferates; Hammerling U. et al.」及び「In vitro bioassay for human erythropoietin based on proliferative stimulation of an erythroid cell line and analysis of carbohydrate-dependent microheterogeneity. Journal of Pharm. Biomed. Analysis 14(11): 1455-1469 (1996).」を参照）。指数増殖期にあるTF-1細胞を2回洗浄し、マイクロタイタプレートに 10^4 細胞／ウェルになるように播種し、EPO (Recormon)、EPOスタンダード (NIBSCスタンダード)、rhEPO (MOD-7010)、変異型MOD-701 (EPO-1、EPO-2、EPO-3、及びEPO-4)の希釈液を滴定した基礎培地で48時間インキュベートした。細胞増殖分析の4時間前、ウェルにMTT試薬を加え、ELISAリーダーで吸光度を測定した。Eprex（ヒトのホルモンから作成されたエポエチン (Epo)）の投与量－応答標準曲線を用いて、各変異型に関するタンパク質濃度を計算した。

【0320】

＜結果＞

【0321】

EPOポリペプチドのインビトロ生物活性は、EPO依存細胞株であるヒト赤白血細胞株TF-1 (DSMZセルバンク) (Dong et al.. Biochemical and Biophysical Research Communications, Volume 339, Issue 1, 6 January 2006, Pages 380- 385)を使用して評価した。MTTアッセイを行い (Hanimerling U. et al. In vitro bioassay for human erythropoietin based on proliferative stimulation of an erythroid cell line and analysis of carbohydrate-dependent microheterogeneity. Journal of Pharm. Biomed. Analysis 14(11): 1455-1469 (1996))、標準曲線を得るために使用されるEPOの実験室基準を、国際基準 (Epoアンプル (ampoule) コード87／684 (NIBSC)) に対して校正した。

【0322】

結果を下記の表4に要約した。最も優れた効果が、EPO3及びEPO0を2及び0.5 IU／mlの濃度で使用することによって得られることが示された。

【0323】

表4

10

20

30

40

Eprex STD	TF-1 生物活性 IU/ml						
IU/ml	EPO 0	EPO 1	EPO 2	EPO 3	EPO 4	Recormon	EPO st
	配列番号16	配列番号1	配列番号2	配列番号3	配列番号4		
2	4.93	2.32	2.13	6.91	3.55	3.44	7.40
0.5	1.60	0.76	0.53	1.34	0.84	0.87	1.53

10

【0324】

<結論>

【0325】

上記の表4で要約したように、EPO-CTPポリペプチドによって異なるレベルの効果が見られた。これは、受容体結合に相違があることを示す。EPO-CTPポリペプチドは、CTPカセットの数及び融合部位において互いに異なる。EPO-1及びEPO-2はEPOのC末端でそれぞれ1つのCTP配列及び2つのCTP配列を有するのに対し、EPO-3はN末端で1つのCTP配列、C末端で2つのCTP配列を含む。EPO-4は、CTP配列によって互いに連結した2つのEPO分子の二量体である。EPO-3は、WT（野生型）-EPOと非常に類似する効果を示した。一方、EPO-1及びEPO-4は、WT-EPOのものよりも50%低い効果を示し、EPO-2の効果はWT-EPOの効果の50%よりも低かった。

20

【0326】

《実施例4：本発明に係るEPO-CTPポリペプチドのマウスモデルにおける評価》

【0327】

本発明に係るEPO-CTPポリペプチドの生物活性と市販のEPOの生物活性とを比較するために、下記の実験を行った。

30

【0328】

<材料及び方法>

【0329】

動物：

種：約20～25gの雌雄のICR又はCD-1マウス

群の規模：n=7

群の数：9

動物の総数：n=63

【0330】

本研究の実験設計：下記の表5で要約したように実験を行った。

40

【0331】

表5

群の 番号	群当たりの マウスの数	処置		投与方式
		化合物	投与量	
1		賦形剤	0	
2		MOCK		
3		MOD-7010	15 µg/kg	
4		MOD-7011		
5		MOD-7012		
6		MOD-7013		
7		MOD-7014		
8		市販の rhEPO	15 µg/kg	
9			5 µg/kg	週3回

10

20

【0332】

動物の処理：

【0333】

全ての動物に、対照又は本発明に係るEPOポリペプチドを、ボーラス注入法で投与した。注入量は、10ml/kg以下であった。実験は、22日間にわたって行った。毎日、疾病率及び死亡率を確認した。

【0334】

網状赤血球の計測及びヘマトクリット(hct)測定：

【0335】

最初の賦形剤又は治療剤の注入後の14時間目又は2日目に、全ての実験動物に網状赤血球を計測した。最初の治療の前(「0」ベースライン対照)、及び賦形剤又は治療剤の最初の注入の24時間後に1回HCTを測定した。その後、研究終了(22日目)までに週2回HCTを測定した。

30

【0336】

<結果>

【0337】

図3～5に示されているヘマトクリットの結果から、EPO1、EPO2、Recormon1、Recormon3、rhEPO、及び賦形剤に比べて、EPO3が最も高いヘマトクリットの変化率を示すことが確認された。EPO-CTPポリペプチドで処理されたマウスにおけるヘマトクリットの割合は、表6に示されている。これらの結果は、EPO-3が赤血球生成の最も強力な促進剤であることを示す。

40

【0338】

表6

	網状赤血球の%	
日	2	14
対照	3.72	3.46
	1.08	0.8
Mock	3.5	3.64
	0.6	1.13
7010 配列番号16	3.5	3.9
	0.6	1.54
7011 配列番号1	3.52	1.94
	1.38	1.08
7012 配列番号2	3.82	3.0
	1.02	0.88
7013 配列番号3	2.66	5.20
	0.97	2.96
7014 配列番号4	3.48	3.82
	0.71	0.90
Recormon 週1回	3.23	3.27
	0.73	0.59
Recormon 週3回	4.13	4.24
	1.21	1.14

10

20

30

40

【0339】

< 結論 >

【0340】

インビボ実験は、2つのパラメータを測定するために設計した。第1のパラメータは、網状赤血球の割合、ヘモグロビン、RBC、及びヘマトクリットレベルの増加などの赤血球生成パラメータである。第2のパラメータは、週1回に投与した場合の各変異型EPOの生物活性の持続期間である。

【0341】

50

赤血球生成の促進に関してEPO-3が優れた機能を有することが正常なマウスで確認された。

【0342】

《実施例5：本発明に係るEPO-CTPポリペプチドとAranespとの比較》

【0343】

下記の実験は、本発明に係る幾つかのEPO-CTPポリペプチド、市販のEPO、及びAranespを1回ボーラス投与した場合のそれぞれの生物活性を比較するために行ったものである。Aranespは、長期間作用する組み換え型のエリスロポエチンであり、2つの部位に変異が導入されている結果、2つのN-糖鎖付加部位をさらに有し、シアル酸残基がさらに多く組み込まれている。

【0344】

＜材料及び方法＞

動物：

種：約20～25gの雌のCD-1マウス

群の規模：n=3

【0345】

本研究の実験設計：下記の表7で要約したように実験を行った。

【0346】

表7

群の 番号	被験物質	群当たりの 動物の数	投与溶液の 濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	投与量 (mL/kg)	時点* (投与後の時間)
1	MOD-7010 配列番号11	3	1.5	10	0(投与前)、投与後の0.25、0.5、1、2、6、24、48、96、168、216、264及び336時間
2	MOD-7013 配列番号3	3	1.5	10	投与後の0.25、0.5、1、2、6、24、48、96、168、216、264及び336時間
3	Aranesp	3	1.5	10	投与後の0.25、0.5、1、2、6、24、48、96、168、216、264及び336時間

【0347】

動物の処理：

【0348】

全ての動物に、対照又は本発明に係るEPOポリペプチドを、ボーラス注入法で投与した。注入量は、 $10\text{ mL}/\text{kg}$ 以下であった。実験は、14日間にわたって行った。毎日、疾病率及び死亡率を確認した。

【0349】

網状赤血球の計測及びヘマトクリット(hct)測定：

【0350】

上記と同様に網状赤血球の計測及びヘマトクリット測定を行った。

【0351】

<結果>

【0352】

結果は、図6～9に示されている。15 μ g/kgのEPO3の静脈注入後、エリスロポエチンに関連する全てのパラメータ（すなわち、網状赤血球の数、ヘモグロビンレベル、及びヘマトクリット）は、同様にrhEPO又はAranserpを注入したものに比べて、向上した。

【0353】

《実施例6：本発明に係るEPO-CTPポリペプチド及びAranserpの薬物動態の比較》

【0354】

本発明に係るEPO-CTPポリペプチド、市販のEPO及びAranserpの薬物動態を比較するために下記の実験を行った。

【0355】

<材料及び方法>

【0356】

各血清サンプルを分析してそれぞれの具体的な濃度を測定した。WinNonLinノンコンパートメンタル解析を使用して濃度及びタイムポイント・データを処理した。AUC、CL、Ke、 $t_{1/2}$ 、Cmax、及びVd_zなどのパラメータを測定した。

【0357】

2つのELISAキットを並行して使用することで血清の濃度を測定した。EPO-3の血清濃度は、StemCellのELISAキットで測定したのに対して、EPO-0及びAranserpの血清濃度は、R&D systemのELISAキットを使用して測定した。

【0358】

<結果>

【0359】

下記の表8に薬物動態の結果を要約した。例えばAUC、 $t_{1/2}$ 、及びCmaxの測定結果から示されるように、EPO-3は優れた薬物動態値を示した。Tmax測定値は、EPO-0、EPO-3、及びAranserpの間で等しかった。

【0360】

表8

10

20

30

パラメータ	単位	EPO-0	EPO-3	Aranesp
AUClast	hr*mIU/mL	31739	306072	178661
CL ^Λ	mL/hr/kg	1.1152	0.2188	0.1207
Ke	1/hr	0.157	0.0529	0.0639
t1/2	hr	4.4139	13.1141	10.84
Cmax	mIU/mL	10766	16466	13266
Tmax	Hr	0.25	0.25	0.25
Vdz	mL/kg	7.1017	4.1394	1.8877

10

20

【0361】

図9に血清濃度の解析結果が示されている。これらの結果は、EPO-3の血清濃度が190時間後も検出可能であったことを示す。EPO-0及びAransepの血清濃度は、それぞれ約50時間後及び140時間後には検出不可能であった。

【0362】

<結論>

【0363】

CD-1マウスの血液からのEPO-3のクリアランスは、rhEPO又はAransepのものよりも著しく遅かった。rhEPO、Aransep、及びMOD-7013の半減期を計算したところ、それぞれ4.41h、0.84h、及び13.11hであった。

30

【0364】

<実施例7：hGH構築物の作成>

【0365】

<材料及び方法>

【0366】

4つのhGHクローン(20kDのタンパク質の変異体)を合成した。4つの変異体からのhGH配列を含むXbaI-NotI断片を、予めXbaI/NotIで切断した真核細胞発現ベクターpC1-dhfrに連結した。4つのクローン(401-0、1、2、3、及び4)からのDNAを調製した。22kDのタンパク質からの他の部分的なhGHクローン(1-242bp)をも合成した(0606114)。プライマーは、Sigma-Genosysから調達した。本発明に係るhGH-CTPポリペプチドを生成するために使用したプライマーは、下記の表9に示した。

40

【0367】

表9

プライマー の番号	配列 番号	配列	制限部位 (配列の下線部分)
25	27	5' <u>CTCTAGAGG</u> ACATGGCCAC 3'	XbaI
32 ^R	28	5' ACAGGGAGGTCTGGGGGTTCTGCA 3'	
33	29	5' TGCAGAACCCCCAGACCTCCCTGTGC 3'	
4 ^R	30	5' CCAAACATCATCAATGTATCTTA 3'	
25	31	5' <u>CTCTAGAGG</u> ACATGGCCAC 3'	XbaI
35 ^R	32	5' CGAACTCCTGGTAGGTGTCAAAGGC 3'	
34	33	5' GCCTTTGACACCTACCAGGAGTTCG 3'	
37 ^R	34	5' <u>ACGCGGCCG</u> CATCCAGACCTTCATCACTGAGGC 3'	NotI
39 ^R	35	5' <u>GCGGCCGCGG</u> ACTCATCAGAAGCCGCAGCTGCCC 3'	

10

20

【0368】

402-0-p69-1 (hGH) (配列番号36) の構築：

30

【0369】

MOD-4020は、野生型組み換え型のヒト成長ホルモン (CTPを有さない) であり、下記の実験で対照として使用した。

【0370】

3つのPCR反応を行った。第1の反応は、プライマー25及びプライマー32^R、並びに鑄型としての0606114 (hGHの部分的クローン：1～242bp) のプラスミドDNAを使用して行った。PCR増幅の結果、245bpの産物が形成された。

【0371】

第2の反応は、プライマー33及びプライマー4^R、並びに鑄型としての401-0-p57-2のプラスミドDNAを使用して行った。PCR増幅の結果、542bpの産物が形成された。

40

【0372】

最後の反応は、プライマー25及び4^R、並びに鑄型としての前の2つの反応における産物の混合物を使用して行った。PCR増幅の結果、705bpの産物が形成された。この産物をTAクローニングベクター (Invitrogen、カタログ番号K2000-01) に連結した。hGH-0配列を含むXbaI-NotI断片を、真核細胞の発現ベクターpCI-dhfrに連結した。このベクターをDG-44 CHO細胞にトランスフェクトした。細胞は、タンパク質を含有しない培地で培養した。

【0373】

402-1-p38-5 (hGH-CTP) (配列番号37) 及び402-2-p72

50

－ 3 (hGH－CTP×2) (配列番号38) の構築：

【0374】

MOD－4021は、ヒト絨毛性ゴナドトロピンのベータ鎖の1コピーのC末端ペプチド(CTP)に融合した組み換え型ヒト成長ホルモンである。MOD－4021のCTPカセットは、C末端に結合している(1カセット)。MOD－4022は、ヒト絨毛性ゴナドトロピン(CTP)のベータ鎖の2コピーのC末端ペプチドに融合した組み換え型ヒト成長ホルモンである。MOD－4022の2つのCTPカセットは、C末端に結合している(2カセット)。

【0375】

hGF－CTP及びhGF－CTP－CTPの構築は、hGH－0と同様に行った。pCI－dhfr－401－1－p20－1(hGH*－CTP)及びpCI－dhfr－401－2－p21－2(hGH*－CTP×2)を鋳型として第2のPCR反応で行った。

【0376】

MOD－4021及びMOD－4022をDG－44 CHO細胞で発現させた。細胞は、タンパク質を含有しない培地で培養した。MOD－4021の分子量は、約30.5 kDである。hGHの分子量が22 kDであるので、各「CTPカセット」は、全分子量の内の8.5 kDである(図10を参照)。MOD－4022の分子量は、39 kD(図10を参照)。

【0377】

402－3－p81－4(CTP－hGH－CTP－CTP、配列番号39)及び402－4－p82－9(CTP* hGH－CTP－CTP、配列番号40)の構築：

【0378】

MOD－4023は、ヒト絨毛性ゴナドトロピンのベータ鎖の3コピーのC末端ペプチド(CTP)に融合した組み換え型ヒト成長ホルモンである。MOD－4023の3つのCTPカセットのうち、1カセットがN末端に結合し、2カセットがC末端に結合している。MOD－4024は、ヒト絨毛性ゴナドトロピンのベータ鎖の1コピーの切断されたC末端ペプチド及び2コピーの完全なC末端ペプチド(CTP)の両方に融合している。MOD－4024の切断されたCTPカセットは、N末端に結合しており、2つのカセットはC末端に結合している。

【0379】

3つのPCR反応を行った。第1の反応は、プライマー25、プライマー35^R、及び鋳型としてのプラスミドDNAであるp401－3－p12－5又は401－4－p22を使用して行った。PCR増幅の結果として265又は220bpの産物が形成された。第2の反応は、プライマー34、プライマー37^R、及び鋳型としてのプラスミドDNAであるTA－hGH－2－q65－1を使用して行った。PCRの増幅の結果、695bpの産物が形成された。最後の反応は、プライマー25、プライマー37^R、及び鋳型としての前の2つの反応における産物の混合物を使用して行った。PCR増幅の結果、938又は891bpの産物が形成された。この産物をTAクローニングベクター(Invitrogen、カタログ番号K2000－01)に連結した。hGH配列を含むXbaI－NotIを、真核細胞発現ベクターであるpCI－dhfrに連結した。

【0380】

MOD－4023及びMOD－4024を、DG－44 CHO細胞で発現させた。細胞は、タンパク質欠失培地で生育させた。MOD－4023の分子量は約47.5 Kdであり(図10を参照)、MOD－4024の分子量は約43.25 Kdである(図10を参照)。

【0381】

402－6－p95a－8(CTP－hGH－CTP、配列番号41)の構築：

【0382】

hGH－6の構築は、hGH－3の構築と同様に行った。第2のPCR反応では、pC

10

20

30

40

50

I - d h f r - 4 0 2 - 1 - p 3 8 - 5 (h G H - C T P) を鋳型として使用した。

【0383】

4 0 2 - 5 - p 9 6 - 4 (C T P - h G H 、配列番号42) の構築、：

【0384】

P C R 反応は、プライマー25、プライマー39^R、及び鋳型としてのプラスミドD N Aであるp C I - d h f r - c t p - E P O - c t p (402-6-p95a-8) を使用して行った。P C R増幅の結果、763bpの産物が形成された。この産物を、T Aクロニングベクター (Invitrogen、カタログ番号K2000-01) に連結した。c t p - h G H配列を含むX b a I - N o t I断片を、真核細胞発現ベクターp C I - d h f r に連結して402-5-p96-4クローンを得た。

10

【0385】

《実施例8》

【0386】

<本発明のhGH-CTPポリペプチドのインビボ生物活性試験>

【0387】

hGH-CTPポリペプチドの潜在的な長期作用型生物活性を、市販の組み換え型ヒトGH及びMOD-4020のものと比較するために、下記の実験を行った。

【0388】

<材料及び方法>

【0389】

20

メスの下垂体摘出ラット (60~100g) に、週1回21.7μgのhGH-CTPポリペプチド又は1日1回5μgの対照用の市販rhGHを皮下注射した。

【0390】

全ての動物の体重を、処理前、最初の注射の24時間後、かつその後に21日目の試験終了までに1日おきに測定した。各点は、群の平均体重増加率 (0日目における体重-最終日における体重/0日目における体重) を表す。平均体重増加を、1日おきの市販hGHの注射による結果に対して正規化した。

【0391】

表10

番号	薬剤	数	経路	処置の スケジュール	等モル投与量 (μg /ラット)	累積投与量	投与容量 (ml)
1	賦形剤	7	皮下	1、7及び 13日目、 週1回	NA	NA	0.25
2	Mock	7	皮下	1、7及び 13日目、 週1回	NA	NA	0.25
3	MOD-4020 配列番号36	7	皮下	1、7及び 13日目、 週1回	21.7	65	0.25
4	MOD-4021 配列番号37	7	皮下	1、7及び 13日目、 週1回	21.7	65	0.25
5	MOD-4022 配列番号38	7	皮下	1、7及び 13日目、 週1回	21.7	65	0.25
6	MOD-4023 配列番号39	7	皮下	1、7及び 13日目、 週1回	21.7	65	0.25
7	MOD-4024 配列番号40	7	皮下	1、7及び 13日目、 週1回	21.7	65	0.25
8	市販の hGH v.1	7	皮下	1、7及び 13日目、 週1回	21.7	65	0.25
9	市販の hGH v.1	7	皮下	1~13日、 毎日	5	65	0.25

10

20

30

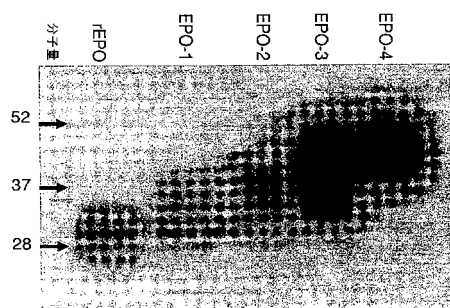
40

【0392】

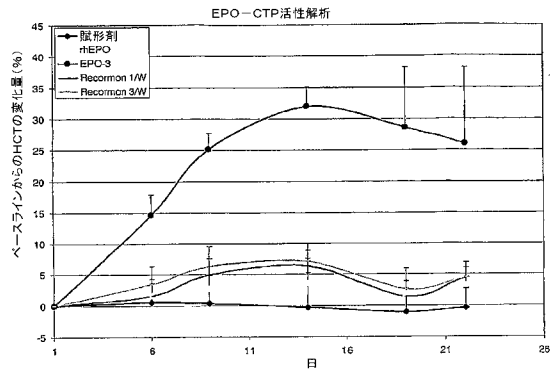
<結果>

50

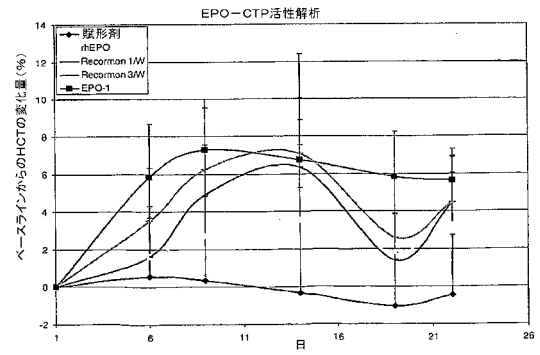
10



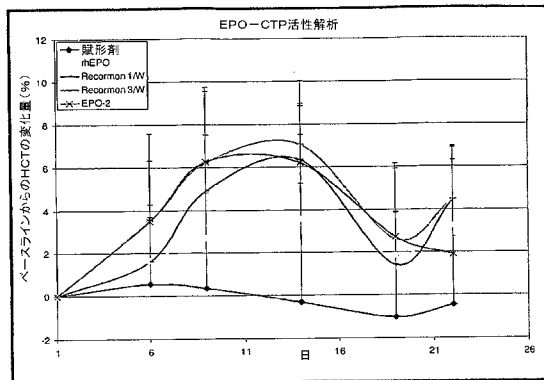
【図 3】



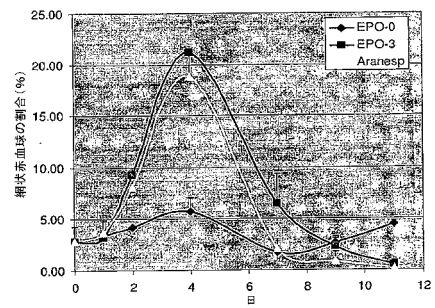
【図 4】



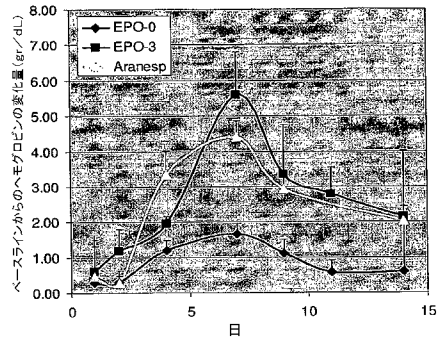
【図 5】



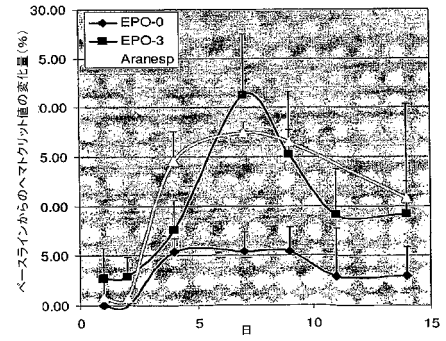
【図 6】



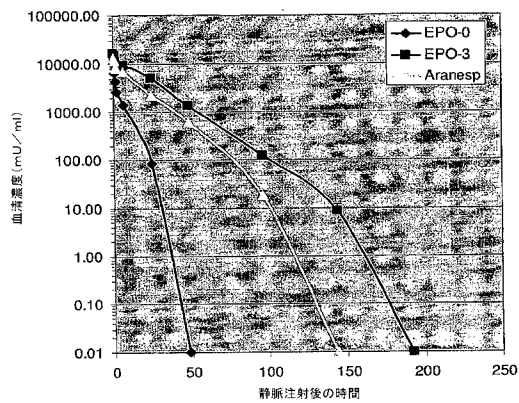
【図 7】



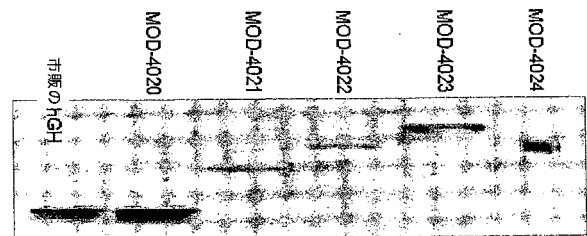
【図 8】



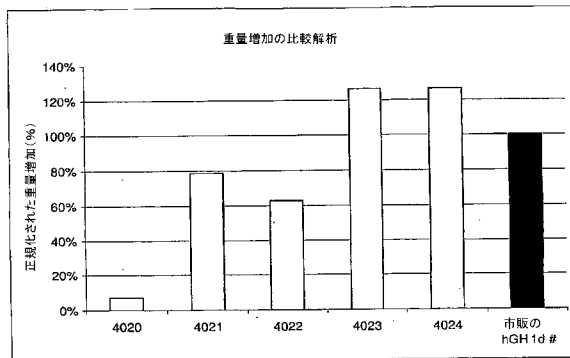
【図 9】



【図 10】



【図 1 1】



【配列表】

2015155458000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成27年5月11日(2015.5.11)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生物学的活性を有するポリペプチドであって、

目的のペプチドと、少なくとも 2 つの絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドとを含み、

前記少なくとも 2 つの絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドのうちの第 1 の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドは、前記目的のペプチドのアミノ末端に結合し、

前記少なくとも 2 つの絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドのうちの第 2 の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドは、前記目的のペプチドのカルボキシ末端に結合し、

前記目的のペプチドが、エリスロポエチン（EPO）ペプチド又はインターフェロンペプチドであることを特徴とするポリペプチド。

【請求項 2】

請求項 1 に記載のポリペプチドであって、

前記第 2 の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドに直列に結合した第 3 の絨

毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドをさらに含むことを特徴とするポリペプチド。

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 に記載のポリペプチドであって、
前記目的のペプチドがグリコシル化されたことを特徴とするポリペプチド。

【請求項 4】

請求項 1 又は 2 に記載のポリペプチドであって、
前記目的のペプチドがグリコシル化されていないことを特徴とするポリペプチド。

【請求項 5】

請求項 1～4 に記載のいずれかのポリペプチドであって、
前記目的のペプチドが前記 EPO であり、該 EPO の配列が、配列番号 3 及び 6 に記載の配列から選択されるアミノ酸配列を含むことを特徴とするポリペプチド。

【請求項 6】

請求項 1～5 に記載のいずれかのポリペプチドであって、
前記少なくとも 2 つの絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドのうちの少なくとも 1 つにおける配列が、配列番号 17 及び 18 に記載の配列から選択されるアミノ酸配列からなることを特徴とするポリペプチド。

【請求項 7】

請求項 1～6 のいずれかに記載のポリペプチドであって、
前記目的のペプチドのアミノ末端に結合した前記絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドが切断されたことを特徴とするポリペプチド。

【請求項 8】

請求項 1～7 のいずれかに記載のポリペプチドであって、
前記少なくとも 2 つの絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドのうちの少なくとも 1 つが、グリコシル化されたことを特徴とするポリペプチド。

【請求項 9】

請求項 1～8 のいずれかに記載のポリペプチドであって、
シグナルペプチドをさらに含むことを特徴とするポリペプチド。

【請求項 10】

請求項 9 に記載のポリペプチドであって、
前記シグナルペプチドの配列が、配列番号 19 又は配列番号 26 に記載の配列であることを特徴とするポリペプチド。

【請求項 11】

請求項 1～10 のいずれかに記載のポリペプチドであって、
前記少なくとも 2 つの絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドのうちの少なくとも 1 つが、リンカーを介して前記目的のペプチドに結合していることを特徴とするポリペプチド。

【請求項 12】

請求項 11 に記載のポリペプチドであって、
前記リンカーがペプチド結合であることを特徴とするポリペプチド。

【請求項 13】

目的のペプチド及び少なくとも 2 つの絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドを含むポリペプチドをエンコードするコード部分を含むポリヌクレオチドであって、

前記少なくとも 2 つの絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドのうちの第 1 の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドが、前記目的のペプチドのアミノ末端に結合し、

前記少なくとも 2 つの絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドのうちの第 2 の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドが、前記目的のペプチドのカルボキシ末端に結合し、

前記目的のペプチドが、エリスロポエチン（EPO）ペプチド又はインターフェロンペ

プチドであることを特徴とするポリヌクレオチド。

【請求項 14】

請求項 13 に記載のポリヌクレオチドであって、

前記第 2 の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドに直列に結合した第 3 の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドをさらに含むことを特徴とするポリヌクレオチド。

【請求項 15】

請求項 13 又は 14 に記載のポリヌクレオチドであって、

シグナルペプチドをさらに含むことを特徴とするポリヌクレオチド。

【請求項 16】

請求項 15 に記載のポリヌクレオチドであって、

前記シグナルペプチドの配列が、配列番号 19 に記載の配列であることを特徴とするポリヌクレオチド。

【請求項 17】

請求項 13～16 のいずれかに記載のポリヌクレオチドであって、

前記少なくとも 2 つの絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドのうちの少なくとも 1 つが、リンカーを介して前記目的のペプチドに結合していることを特徴とするポリヌクレオチド。

【請求項 18】

請求項 17 に記載のポリヌクレオチドであって、

前記リンカーがペプチド結合であることを特徴とするポリヌクレオチド。

【請求項 19】

請求項 13～18 のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含むことを特徴とする発現ベクター。

【請求項 20】

請求項 19 に記載の発現ベクターを含むことを特徴とする細胞。

【請求項 21】

請求項 1～12 のいずれかに記載のポリペプチド、請求項 13～18 のいずれかに記載のポリヌクレオチド、請求項 19 に記載の発現ベクター、又はそれらの組み合わせを含むことを特徴とする薬学的組成物。

【請求項 22】

目的のペプチドの生物学的半減期を向上させる方法であって、

第 1 の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドを、前記目的のペプチドのアミノ末端に結合させ、第 2 の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドを、前記目的のペプチドのカルボキシ末端に結合させるステップを含み、

前記目的のペプチドが、エリスロポエチン（EPO）ペプチド又はインターフェロンペプチドであり、

それにより前記目的のペプチドの生物学的半減期を向上させることを特徴とする方法。

【請求項 23】

貧血の治療用の又は赤血球生成の刺激用の薬剤を製造するための請求項 21 に記載の薬学的組成物の使用であって、

前記薬学的組成物を構成する前記ポリペプチドの前記目的のペプチドが前記 EPO ペプチドであることを特徴とする使用。

【請求項 24】

生物活性を有し、目的の非ヒトペプチド及び少なくとも 2 つの絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドを含むポリペプチドであって、

前記少なくとも 2 つの絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドのうちの第 1 の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドが、前記目的のペプチドのアミノ末端に結合し、

前記少なくとも 2 つの絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドのうちの第 2 の

絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドが、前記目的のペプチドのカルボキシ末端に結合したことを特徴とするポリペプチド。

【請求項 25】

請求項 24 に記載のポリペプチドであって、

前記目的のペプチドが、エリスロポエチン（EPO）ペプチド又はインターフェロンペプチドであることを特徴とするポリペプチド。

【請求項 26】

請求項 24 又は 25 に記載のポリペプチドであって、

前記第 2 の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドに直列に結合した第 3 の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドをさらに含むことを特徴とするポリペプチド。

【請求項 27】

生物活性を有し、目的の非ヒトペプチド及び少なくとも 2 つの絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドを含むポリペプチドをエンコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドであって、

前記少なくとも 2 つの絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドのうちの第 1 の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドが、前記目的のペプチドのアミノ末端に結合し、

前記少なくとも 2 つの絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドのうちの第 2 の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドが、前記目的のペプチドのカルボキシ末端に結合したことを特徴とするポリヌクレオチド。

【請求項 28】

非ヒト対象の、貧血を治療し又は赤血球生成を刺激する方法であって、

治療効果のある量の請求項 24 に記載のポリペプチド又は請求項 27 に記載のポリヌクレオチドを前記対象へ投与するステップを含み、それにより、前記ヒト対象の貧血を治療し又は赤血球生成を刺激することを特徴とする方法。

【請求項 29】

請求項 28 に記載の方法であって、

前記目的のペプチドが、エリスロポエチン（EPO）ペプチド又はインターフェロンペプチドであることを特徴とするポリペプチド。

【請求項 30】

請求項 28 又は 29 に記載の方法であって、

前記第 2 の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドに直列に結合した第 3 の絨毛性ゴナドトロピン・カルボキシ末端ペプチドをさらに含むことを特徴とする方法。

【請求項 31】

請求項 24 に記載のポリペプチドを含むことを特徴とする薬学的組成物。

【請求項 32】

請求項 27 に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクターを含むことを特徴とする細胞。

【請求項 33】

請求項 27 に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクターを含むことを特徴とする薬学的組成物。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0044

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0044】

他の実施形態では、前記絨毛性ゴナドトロピン・CTPアミノ酸配列の少なくとも 1 つが切断されている。他の実施形態では、前記絨毛性ゴナドトロピン・CTPアミノ酸配列の両方が切断されている。他の実施形態では、前記絨毛性ゴナドトロピン・CTPアミノ

酸配列の２つが切断されている。他の実施形態では、前記絨毛性ゴナドトロピン・ＣＴＰアミノ酸配列の２つ以上が切断されている。他の実施形態では、前記絨毛性ゴナドトロピン・ＣＴＰアミノ酸配列の全てが切断されている。他の実施形態では、前記切断されたＣＴＰは、配列番号４３に記載の配列における最初の１０個のアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、前記切断されたＣＴＰは、配列番号４３に記載の配列における最初の１１個のアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、前記切断されたＣＴＰは、配列番号４３に記載の絨毛性ゴナドトロピン・ＣＴＰ配列における最初の１２個のアミノ酸配列を含む。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		テーマコード (参考)	
<i>C 1 2 N</i>	<i>1/21</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i>	<i>1/21</i>		
<i>C 1 2 N</i>	<i>5/10</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i>	<i>5/00</i>	<i>1 0 1</i>	
<i>C 0 7 K</i>	<i>19/00</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 0 7 K</i>	<i>19/00</i>		
<i>C 0 7 K</i>	<i>14/61</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 0 7 K</i>	<i>14/61</i>		
<i>C 0 7 K</i>	<i>14/555</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 0 7 K</i>	<i>14/555</i>		
<i>C 0 7 K</i>	<i>14/505</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 0 7 K</i>	<i>14/505</i>		
<i>A 6 1 K</i>	<i>38/00</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 K</i>	<i>37/02</i>		
<i>A 6 1 K</i>	<i>48/00</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 K</i>	<i>48/00</i>		
<i>A 6 1 K</i>	<i>35/76</i>	<i>(2015.01)</i>	<i>A 6 1 K</i>	<i>35/76</i>		
<i>A 6 1 K</i>	<i>38/21</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 K</i>	<i>37/66</i>	<i>G</i>	
<i>A 6 1 P</i>	<i>7/06</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>7/06</i>		

F ターム (参考) 4B065 AA01X AA57X AA87X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44
 4C084 AA01 AA02 AA07 AA13 BA44 DA21 NA14 ZA551 ZA552
 4C087 AA01 AA02 BC83 NA14 ZA55
 4H045 AA10 BA09 CA40 DA15 DA30 EA20 FA74