

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-529059

(P2017-529059A)

(43) 公表日 平成29年10月5日 (2017. 10. 5)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 6 4
C 0 7 K 19/00 (2006. 01)	C 0 7 K 19/00	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/15 (2006. 01)	C 1 2 N 1/15	4 C 0 8 4
C 1 2 N 1/19 (2006. 01)	C 1 2 N 1/19	4 C 0 8 5
C 1 2 N 1/21 (2006. 01)	C 1 2 N 1/21	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 79 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2016-576027 (P2016-576027)
 (86) (22) 出願日 平成27年7月28日 (2015. 7. 28)
 (85) 翻訳文提出日 平成29年2月6日 (2017. 2. 6)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/042510
 (87) 国際公開番号 W02016/018931
 (87) 国際公開日 平成28年2月4日 (2016. 2. 4)
 (31) 優先権主張番号 62/031, 063
 (32) 優先日 平成26年7月30日 (2014. 7. 30)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/195, 908
 (32) 優先日 平成27年7月23日 (2015. 7. 23)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 517000438
 エヌジーエム バイオファーマシューティ
 カルズ インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 94080 カリフォル
 ニア州 サウスサンフランシスコ オイス
 ター ポイント ブールバード 333
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 代謝障害を治療するための組成物および使用方法

(57) 【要約】

グルコース代謝障害および／または体重障害の個体の治療方法およびこれに関係する組成物を提供する。

D I O マウスモデル

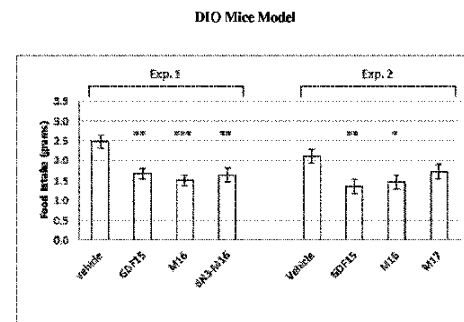
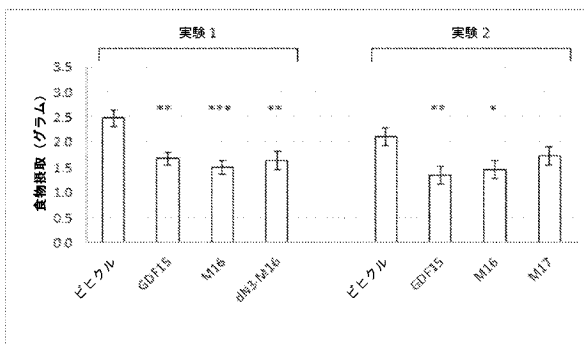


Figure 10

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

SEQ ID NO: 1 のアミノ酸配列と少なくとも 90% 同一である連続アミノ酸配列を含むポリペプチドであって、SEQ ID NO: 1 中の対応するアミノ酸の置換の以下の対:

- i) D 5 T / S および R 2 1 N ;
 - ii) R 1 6 N および H 1 8 T / S ;
 - iii) S 2 3 N および E 2 5 T / S ;
 - iv) S 5 0 N および F 5 2 T / S または F 5 2 N および A 5 4 T / S ;
 - v) R 5 3 N および A 5 5 T / S ;
 - vi) S 6 4 N および H 6 6 T / S ;
 - vii) K 9 1 N および D 9 3 T / S または D 9 3 N および G 9 5 T / S ;
 - viii) T 9 4 N および V 9 6 T / S または V 9 6 N および L 9 8 T / S ;
 - ix) S 9 7 N および Q 9 9 T / S ; ならびに
 - x) A 1 0 6 N および D 1 0 8 T / S
- の少なくとも 1 つを含む、前記ポリペプチド。

10

【請求項 2】

SEQ ID NO: 1 中の対応するアミノ酸の置換の以下の対:

D 5 T および R 2 1 N ;

S 2 3 N および E 2 5 T または S 2 3 N および E 2 5 S ;

R 5 3 N および A 5 5 T または R 5 3 N および A 5 5 S ;

S 6 4 N および H 6 6 T または S 6 4 N および H 6 6 S ;

K 9 1 N および D 9 3 T または K 9 1 N および D 9 3 S ;

D 9 3 N および G 9 5 T または D 9 3 N および G 9 5 S ;

S 9 7 N および Q 9 9 T または S 9 7 N および Q 9 9 S ; ならびに

A 1 0 6 N および D 1 0 8 T または A 1 0 6 N および D 1 0 8 S

の少なくとも 1 つを含む、請求項 1 に記載のポリペプチド。

20

【請求項 3】

SEQ ID NO: 1 中の対応するアミノ酸の置換の以下の対:

D 5 T および R 2 1 N ;

S 6 4 N および H 6 6 T ;

K 9 1 N および D 9 3 T ;

D 9 3 N および G 9 5 T ; ならびに

S 9 7 N および Q 9 9 T

の少なくとも 1 つを含む、請求項 1 に記載のポリペプチド。

30

【請求項 4】

SEQ ID NO: 1 中の対応するアミノ酸の置換の以下の対:

K 9 1 N および D 9 3 T / S ; ならびに

D 9 3 N および G 9 5 T / S

の少なくとも 1 つを含む、請求項 1 に記載のポリペプチド。

40

【請求項 5】

前記連続アミノ酸配列が、SEQ ID NO: 1 のアミノ酸配列と少なくとも 95% 同一である、前記請求項のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 6】

前記連続アミノ酸配列が、少なくとも 98 アミノ酸長であり、SEQ ID NO: 1 のアミノ酸配列と少なくとも 95% 同一であり、前記ポリペプチドの C 末端側アミノ酸が、SEQ ID NO: 1 中の位置 1 1 2 でイソロイシンに対応する、前記請求項のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 7】

前記連続アミノ酸配列が、少なくとも 98 アミノ酸長であり、SEQ ID NO: 1

50

のN末端に存在している最初の3個のアミノ酸に対応する最初の3個のアミノ酸を含まず、前記C末端側アミノ酸が、SEQ ID NO: 1中の位置112でイソロイシンに対応する、前記請求項のいずれか1項に記載のポリペプチド。

【請求項8】

前記連続アミノ酸配列が、少なくとも98アミノ酸長であり、SEQ ID NO: 1のN末端に存在している最初の6個のアミノ酸に対応する最初の6個のアミノ酸を含まず、前記C末端側アミノ酸が、SEQ ID NO: 1中の位置112でイソロイシンに対応する、前記請求項のいずれか1項に記載のポリペプチド。

【請求項9】

前記連続アミノ酸配列が、少なくとも98アミノ酸長であり、SEQ ID NO: 1のN末端に存在している最初の14個のアミノ酸に対応する最初の14個のアミノ酸を含まない、前記請求項のいずれか1項に記載のポリペプチド。

10

【請求項10】

N末端にシグナル配列を含む、前記請求項のいずれか1項に記載のポリペプチド。

【請求項11】

前記シグナル配列が、IgKシグナル配列である、請求項10に記載のポリペプチド。

【請求項12】

前記シグナル配列が、リンカーを介して前記ポリペプチドにコンジュゲートされている、請求項10または11に記載のポリペプチド。

【請求項13】

20

前記リンカーが、開裂可能リンカーである、請求項12に記載のポリペプチド。

【請求項14】

異種ポリペプチドに融合されている、請求項1～13のいずれか1項に記載のポリペプチド。

【請求項15】

前記異種ポリペプチドが、血清アルブミン、マルトース結合タンパク質、または免疫グロブリンFcポリペプチドである、請求項14に記載のポリペプチド。

【請求項16】

前記異種ポリペプチドが、血清アルブミンであり、該血清アルブミンが、ヒト血清アルブミン、カニクイザル(cyno)血清アルブミンまたはウシ血清アルブミンである、請求項15に記載のポリペプチド。

30

【請求項17】

前記異種ポリペプチドが、免疫グロブリンFcポリペプチドである、請求項15に記載のポリペプチド。

【請求項18】

前記異種ポリペプチドが、前記ポリペプチドのN末端にコンジュゲートされている、請求項14～17のいずれか1項に記載のポリペプチド。

【請求項19】

前記異種ポリペプチドが、前記ポリペプチドのC末端にコンジュゲートされている、請求項14～17のいずれか1項に記載のポリペプチド。

40

【請求項20】

N末端からC末端に連続的に、以下：

異種ポリペプチド－[(G₄S)]₅－GDF15；

異種ポリペプチド－[(G₄S)]₅－ΔN3－GDF15；または

異種ポリペプチド－[(G₄S)]₅－ΔN6－GDF15

を含む融合タンパク質。

【請求項21】

前記異種ポリペプチドが、血清アルブミン、マルトース結合タンパク質、または免疫グロブリンFcポリペプチドである、請求項20に記載の融合タンパク質。

【請求項22】

50

前記異種ポリペプチドが、血清アルブミンであり、該血清アルブミンが、ヒト血清アルブミン、カニクイザル血清アルブミンまたはウシ血清アルブミンである、請求項 2 1 に記載の融合タンパク質。

【請求項 2 3】

前記 N 末端にシグナル配列を含む、請求項 2 0 ～ 2 2 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 2 4】

前記シグナル配列が、I g K シグナル配列である、請求項 2 3 に記載の融合タンパク質。

【請求項 2 5】

互いに共有結合した 2 つの請求項 1 に記載のポリペプチドを含み、N-グリコシル化されている、修飾 G D F 1 5 N-グリコシル化二量体。

【請求項 2 6】

前記 2 つのポリペプチドそれぞれが、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18、もしくは SEQ ID NO: 30、または 5 個までのアミノ酸が異なるアミノ酸から選択されるアミノ酸配列を含み；前記ポリペプチドは、N-グリコシル化されている少なくとも 1 つの N-グリコシル化部位を含有する、請求項 2 5 に記載の修飾 G D F 1 5 N-グリコシル化二量体。

【請求項 2 7】

前記 2 つのポリペプチドそれぞれが、SEQ ID NO: 81、SEQ ID NO: 83、SEQ ID NO: 87、SEQ ID NO: 88、SEQ ID NO: 89、SEQ ID NO: 92、SEQ ID NO: 93、SEQ ID NO: 96、SEQ ID NO: 97 または SEQ ID NO: 100 から選択されるアミノ酸配列からなる、請求項 2 6 に記載の修飾 G D F 1 5 N-グリコシル化二量体。

【請求項 2 8】

それぞれ同じアミノ酸配列を含む 2 つのポリペプチドを有するホモ二量体であり、該ポリペプチドが、N-グリコシル化されている少なくとも 1 つの N-グリコシル化部位を含有する、請求項 2 5 ～ 2 7 のいずれか 1 項に記載の修飾 G D F 1 5 N-グリコシル化二量体。

【請求項 2 9】

請求項 1 ～ 1 9 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド、請求項 2 0 ～ 2 4 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質、または請求項 2 5 ～ 2 8 のいずれか 1 項に記載の修飾 G D F 1 5 N-グリコシル化二量体をコードする核酸分子。

【請求項 3 0】

in vitro または *in vivo* で、前記ポリペプチドまたは前記融合タンパク質をコードする前記核酸分子を発現させる発現制御エレメントに機能的に連結されている、請求項 2 9 に記載の核酸分子。

【請求項 3 1】

請求項 2 9 または請求項 3 0 に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 3 2】

ウイルスベクターを含む、請求項 3 1 に記載のベクター。

【請求項 3 3】

請求項 1 ～ 1 9 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド、請求項 2 0 ～ 2 4 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質、または請求項 2 5 ～ 2 8 のいずれか 1 項に記載の修飾 G D F 1 5 N-グリコシル化二量体を発現する宿主細胞。

【請求項 3 4】

請求項 2 9 ～ 3 0 のいずれか 1 項に記載の核酸分子または請求項 3 1 ～ 3 2 のいずれか 1 項に記載のベクターを含む宿主細胞。

10

20

30

40

50

【請求項 35】

請求項 1～19 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド、請求項 20～24 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質、または請求項 25～28 のいずれか 1 項に記載の修飾 G D F 1 5 N－グリコシル化二量体、および製剤的に許容可能な希釈剤、担体、もしくは賦形剤を含む医薬組成物。

【請求項 36】

少なくとも 1 つの追加の予防薬または治療薬を更に含む、請求項 35 に記載の医薬組成物。

【請求項 37】

請求項 1～19 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド、または請求項 20～24 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質、または請求項 25～28 のいずれか 1 項に記載の修飾 G D F 1 5 N－グリコシル化二量体に特異的に結合する抗体。

10

【請求項 38】

請求項 37 に記載の抗体および製剤的に許容可能な希釈剤、担体または賦形剤を含む医薬組成物。

【請求項 39】

少なくとも 1 つの追加の予防薬または治療薬を更に含む、請求項 38 に記載の医薬組成物。

【請求項 40】

請求項 35、36、38 または 39 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物を含む滅菌容器。

20

【請求項 41】

シリンジである、請求項 40 に記載の滅菌容器。

【請求項 42】

請求項 40～41 のいずれか 1 項に記載の滅菌容器を含むキット。

【請求項 43】

請求項 1～19 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド、請求項 20～24 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質、または請求項 25～28 のいずれか 1 項に記載の修飾 G D F 1 5 N－グリコシル化二量体の生成方法であって、

前記ポリペプチドまたは前記融合タンパク質を発現する宿主細胞を培養する工程；および

30

前記発現したポリペプチドまたは融合タンパク質を精製する工程を含む、前記方法。

【請求項 44】

対象の体重障害の治療または予防方法であって、該対象に請求項 1～19 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド、請求項 20～24 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質、または請求項 25～28 のいずれか 1 項に記載の修飾 G D F 1 5 N－グリコシル化二量体を投与する工程を含み、前記ポリペプチドまたは前記融合タンパク質が、前記対象の前記体重障害を治療または予防するのに効果的な量で投与される、前記方法。

【請求項 45】

対象のグルコース代謝障害の治療または予防方法であって、該対象に請求項 1～19 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド、請求項 20～24 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質、または請求項 25～28 のいずれか 1 項に記載の修飾 G D F 1 5 N－グリコシル化二量体を投与する工程を含み、前記ポリペプチドまたは前記融合タンパク質が、前記対象の前記グルコース代謝障害を治療または予防するのに効果的な量で投与される、前記方法。

40

【請求項 46】

前記対象の食物摂取を減少させることを含む、請求項 44～45 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 47】

前記対象の体重を減少させることを含む、請求項 44～45 のいずれか 1 項に記載の方

50

法。

【請求項 4 8】

前記治療または予防が、前記対象の体重の減少を含む、請求項 4 4～4 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記治療または予防が、前記対象の食物摂取の減少を含む、請求項 4 4～4 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 0】

前記治療または予防が、前記対象の血中グルコースの減少を含む、請求項 4 4～4 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 5 1】

前記グルコース代謝障害が、糖尿病である、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 5 2】

前記対象が、ヒトである、請求項 4 4～5 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記対象が、肥満である、請求項 4 4～5 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 4】

前記投与が、非経口的注入によるものである、請求項 4 4～5 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記非経口的注入が、皮下である、請求項 5 4 に記載の方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

テキストファイルとして提供された配列表の参照による組み込み

配列表が、2 0 1 5 年 7 月 2 2 日に作成され、サイズが 1 3 3 K B であるテキストファイル「N G M B - 1 3 9 W O _ S e q L i s t . t x t」として、本明細書に提供される。テキストファイルの内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0 0 0 2】

関連出願の相互参照

30

本出願は、2 0 1 4 年 7 月 3 0 日に提出された米国仮特許出願第 6 2 / 0 3 1 , 0 6 3 号、および 2 0 1 5 年 7 月 2 3 日に提出された米国仮特許出願第 6 2 / 1 9 5 , 9 0 8 号の優先権利益を主張し、これらの出願は、その全体が参照により組み込まれる。

【0 0 0 3】

本発明は、特に、代謝関連状態を治療するのに有用なポリペプチドおよびその組成物に関する。

【背景技術】

【0 0 0 4】

序論

肥満は、エネルギー消費の制限および／または身体運動の欠如に連動して過剰な食物摂取によるものが最も一般的である。肥満は、さまざまな疾患、例えば、糖尿病、高血圧症、アテローム動脈硬化、冠動脈疾患、睡眠時無呼吸、痛風、リウマチおよび関節炎の発現の可能性を増大する。更に、死亡リスクが、肥満と直接関連し、その結果、例えば、ボディマスインデックスが 4 0 を越えると、平均余命が 1 0 年超短くなる。

40

【0 0 0 5】

現在実施されている薬理療法としては、受容体クラス標的食欲抑制剤（例えば、C B 1、5 - H T ₂ c、および N P Y）；視床下部中の食欲回路の調節剤およびグレリンの分子作用；およびリパーゼ標的栄養吸収阻害薬が挙げられる。残念なことに、現在実施されている治療法では、副作用を生じることなく、肥満を効果的に治療することを示しておらず、副作用の一部は、極めて重度である可能性がある。

50

【0006】

血中グルコースレベルが高いと、膵臓ベータ細胞によるインスリンの分泌を刺激する。次にインスリンが、筋肉および脂肪細胞中へのグルコースの流入を刺激し、グリコーゲンおよびトリグリセリドを貯蔵し、タンパク質を合成する。さまざまな細胞型でのインスリン受容体の活性化は、グルコース摂取量および利用度を増大させること、および肝臓グルコース放出を減少させることによって、循環グルコースレベルが減少する。この調節ネットワーク内の混乱の結果、人口に影響を及ぼす割合が大きく、その割合が増大している糖尿病および関連する病的症候群を生じる可能性がある。

【0007】

グルコース代謝障害である患者は、高血糖、高インスリン血症、および／またはグルコース不耐性を来す可能性がある。グルコースおよび／またはインスリンの異常なレベルと関係することが多い障害の例が、インスリン抵抗性であり、これは、肝臓、脂肪、および筋肉細胞中で、正常な血中インスリンレベルに反応する能力を失う。

10

【0008】

肥満、糖尿病および関連代謝障害および非代謝障害の有病率および重症度の点からみて、例えば、患者の食欲、グルコースおよび／またはインスリンレベルを調節し、変動グルコースレベルへの生物学的反応を向上させる治療法に興味が残されている。

【0009】

M I C - 1 (マクロファージ抑制サイトカイン-1)としても知られる野生型 G D F 1 5 が、体重の制御に関連付けられている (T s a i V W, e t a l., P L o S O n e 2 0 1 3 ; 8 (2) : e 5 5 1 7 4 ; U S 8 , 1 9 2 , 7 3 5 (非特許文献1))

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】T s a i V W, e t a l., P L o S O n e 2 0 1 3 ; 8 (2) : e 5 5 1 7 4 ; U S 8 , 1 9 2 , 7 3 5

【発明の概要】

【0011】

概要

30

成熟野生型ヒト G D F 1 5 のアミノ酸配列 (S E Q I D N O : 1) と少なくとも 9 0 % 同一である連続アミノ酸配列を有するポリペプチドが提供される。本開示のポリペプチドは、G D F 1 5 突然変異タンパク質、修飾 G D F 1 5、および修飾 G D F 1 5 突然変異タンパク質を包含する。これらのポリペプチドの組成物も提供される。本開示は、体重関連障害および／またはグルコース代謝障害を治療または予防する場合に、本明細書に記載されたポリペプチド、およびその組成物の使用を企図する。

【0012】

上述のとおり、S E Q I D N O : 1 のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一である連続アミノ酸配列を含むポリペプチドが提供される。連続アミノ酸配列は、S E Q I D N O : 1 中の対応するアミノ酸の置換の以下の対の少なくとも 1 つを含む：i) D 5 T / S および R 2 1 N ; i i) R 1 6 N および H 1 8 T / S ; i i i) S 2 3 N および E 2 5 T / S ; i v) L 2 4 N および D 2 6 T / S ; v) S 5 0 N および F 5 2 T / S または F 5 2 N および A 5 4 T / S ; v i) Q 5 1 N および R 5 3 T / S または R 5 3 N および A 5 5 T / S ; v i i) S 6 4 N および H 6 6 T / S ; v i i i) L 6 5 N および R 6 7 T / S ; v i i i i) S 8 2 N および N 8 4 T / S ; i x) K 9 1 N および D 9 3 T / S または D 9 3 N および G 9 5 T / S ; x) T 9 4 N および V 9 6 T / S または V 9 6 N および L 9 8 T / S ; x i) S 9 7 N および Q 9 9 T / S ; および x i i) A 1 0 6 N および D 1 0 8 T / S。

40

【0013】

例えば、連続アミノ酸配列は、S E Q I D N O : 1 中の対応するアミノ酸の置換の

50

以下の対の少なくとも1つを含んでよい：i) D 5 TおよびR 2 1 NまたはD 5 SおよびR 2 1 N；ii) R 1 6 NおよびH 1 8 TまたはR 1 6 NおよびH 1 8 S；iii) S 2 3 NおよびE 2 5 TまたはS 2 3 NおよびE 2 5 S；iv) L 2 4 NおよびD 2 6 TまたはL 2 4 NおよびD 2 6 S；v) S 5 0 NおよびF 5 2 T；S 5 0 NおよびF 5 2 S；F 5 2 NおよびA 5 4 T；またはF 5 2 NおよびA 5 4 S；vi) Q 5 1 NおよびR 5 3 T；Q 5 1 NおよびR 5 3 S；R 5 3 NおよびA 5 5 T；またはR 5 3 NおよびA 5 5 S；vii) S 6 4 NおよびH 6 6 TまたはS 6 4 NおよびH 6 6 S；viii) L 6 5 NおよびR 6 7 TまたはL 6 5 NおよびR 6 7 S；ix) S 8 2 NおよびN 8 4 TまたはS 8 2 NおよびN 8 4 S；x) K 9 1 NおよびD 9 3 T；K 9 1 NおよびD 9 3 S；D 9 3 NおよびG 9 5 T；またはD 9 3 NおよびG 9 5 S；xi) T 9 4 NおよびV 9 6 T；T 9 4 NおよびV 9 6 S；V 9 6 NおよびL 9 8 T；またはV 9 6 NおよびL 9 8 S；xii) S 9 7 NおよびQ 9 9 TまたはS 9 7 NおよびQ 9 9 S；およびxiii) A 1 0 6 NおよびD 1 0 8 TまたはA 1 0 6 NおよびD 1 0 8 S。

10

【0014】

ある特定の実施形態では、ポリペプチドは、SEQ ID NO：1中の対応するアミノ酸の置換の以下の対の少なくとも1つを含んでよい：D 5 TおよびR 2 1 N；S 2 3 NおよびE 2 5 T／S；R 5 3 NおよびA 5 5 T／S；S 6 4 NおよびH 6 6 T／S；K 9 1 NおよびD 9 3 T／S；D 9 3 NおよびG 9 5 T／S；S 9 7 NおよびQ 9 9 T／S；およびA 1 0 6 NおよびD 1 0 8 T／S。

20

【0015】

ある特定の実施形態では、ポリペプチドは、SEQ ID NO：1中の対応するアミノ酸の置換の以下の対の少なくとも1つを含んでよい：D 5 TおよびR 2 1 N；D 5 SおよびR 2 1 N；S 2 3 NおよびE 2 5 T；S 2 3 NおよびE 2 5 S；R 5 3 NおよびA 5 5 T；R 5 3 NおよびA 5 5 S；S 6 4 NおよびH 6 6 T；S 6 4 NおよびH 6 6 S；K 9 1 NおよびD 9 3 T；K 9 1 NおよびD 9 3 S；D 9 3 NおよびG 9 5 T；D 9 3 NおよびG 9 5 S；S 9 7 NおよびQ 9 9 T；S 9 7 NおよびQ 9 9 S；A 1 0 6 NおよびD 1 0 8 T；およびA 1 0 6 NおよびD 1 0 8 S。

【0016】

ある特定の実施形態では、ポリペプチドは、SEQ ID NO：1中の対応するアミノ酸の置換の以下の対の少なくとも1つを含んでよい：D 5 TおよびR 2 1 N；S 6 4 NおよびH 6 6 T／S；K 9 1 NおよびD 9 3 T／S；D 9 3 NおよびG 9 5 T／S；およびS 9 7 NおよびQ 9 9 T／S。

30

【0017】

他の実施形態では、ポリペプチドは、SEQ ID NO：1中の対応するアミノ酸の置換の以下の対の少なくとも1つを含んでよい：K 9 1 NおよびD 9 3 TまたはK 9 1 NおよびD 9 3 S；およびD 9 3 NおよびG 9 5 TまたはD 9 3 NおよびG 9 5 S。他の実施形態では、ポリペプチドは、SEQ ID NO：1中の対応するアミノ酸の置換の以下の対を含んでよい：K 9 1 NおよびD 9 3 T。

【0018】

例示的な実施形態では、連続アミノ酸配列は、SEQ ID NO：1のアミノ酸配列と少なくとも95%同一でよい。

40

【0019】

他の実施形態では、連続アミノ酸配列は、少なくとも98アミノ酸長でよく、SEQ ID NO：1のアミノ酸配列と少なくとも90%同一でよく、ポリペプチドのC末端側アミノ酸が、SEQ ID NO：1中の位置112でイソロイシンと対応する。

【0020】

他の実施形態では、連続アミノ酸配列は、少なくとも98アミノ酸長でよく、SEQ ID NO：1のアミノ酸配列と少なくとも95%同一でよく、ポリペプチドのC末端側アミノ酸は、SEQ ID NO：1中の位置112でイソロイシンと対応する。

【0021】

50

本明細書に開示された例示的なポリペプチドは、少なくとも98アミノ酸長であり、SEQ ID NO: 1のアミノ酸配列と少なくとも90%同一であり、SEQ ID NO: 1に対してアミノ酸が欠失している連続アミノ酸配列を含む。例えば、ポリペプチドに、SEQ ID NO: 1に対して、N末端側切断があってもよい。切断は、SEQ ID NO: 1に対して、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14以上のアミノ酸の切断でよく、例えば、1-14アミノ酸、3-14アミノ酸、6-14アミノ酸、または3-6アミノ酸である。

【0022】

ある特定の場合では、少なくとも98アミノ酸長であり、SEQ ID NO: 1のアミノ酸配列と少なくとも90%同一であり、SEQ ID NO: 1のN末端に存在する最初の3個のアミノ酸に対応する最初の3個のアミノ酸を含まず、C末端側アミノ酸は、SEQ ID NO: 1の位置112でイソロイシンに対応する、連続アミノ酸配列。

10

【0023】

ある特定の場合では、連続アミノ酸配列は、少なくとも98アミノ酸長であり、SEQ ID NO: 1のアミノ酸配列と少なくとも90%同一であり、SEQ ID NO: 1のN末端に存在する最初の6個のアミノ酸に対応する最初の6個のアミノ酸を含まず、C末端側アミノ酸は、SEQ ID NO: 1の位置112でイソロイシンに対応する。

【0024】

ある特定の場合では、連続アミノ酸配列は、少なくとも98アミノ酸長であり、SEQ ID NO: 1のアミノ酸配列と少なくとも90%同一であり、SEQ ID NO: 1のN末端に存在する最初の14個のアミノ酸に対応する最初の14個のアミノ酸を含まず、C末端側アミノ酸は、SEQ ID NO: 1の位置112でイソロイシンに対応する。

20

【0025】

ある特定の場合では、ポリペプチドは、N末端で、シグナル配列、例えば、IgKシグナル配列を含んでもよい。シグナル配列は、リンカーを介してポリペプチドにコンジュゲートさせてよく、リンカーは、開裂可能リンカーとしてもよい。

【0026】

また、N末端からC末端に連続的に以下を含む融合タンパク質が、本明細書に提供される：異種ポリペプチド-[(G₄S)]₅-GDF15；異種ポリペプチド-[(G₄S)]₅-ΔN3-GDF15；または異種ポリペプチド-[(G₄S)]₅-ΔN6-GDF15。

30

【0027】

例示的な実施形態では、異種ポリペプチドは、血清アルブミン、マルトース結合タンパク質、または免疫グロブリンFcポリペプチドとしてもよい。血清アルブミンは、ヒト血清アルブミン、カニクイザル(cyno)血清アルブミンまたはウシ血清アルブミンとしてもよい。融合タンパク質は、N末端でシグナル配列を含んでもよい。シグナル配列は、IgKシグナル配列としてもよい。

【0028】

また、上記のポリペプチドまたは融合タンパク質をコードする核酸分子が、本明細書に提供される。核酸分子は、in vitroまたはin vivoで、ポリペプチドまたは融合タンパク質をコードする核酸分子を発現させる発現制御エレメントに機能的に連結させてよい。核酸分子を含むベクターもまた企図される。ベクターは、ウイルスベクターとしてもよい。

40

【0029】

いくつかの実施形態では、1個以上の前述したポリペプチドを発現する形質転換または宿主細胞が含まれる。

【0030】

本開示の特定の実施形態では、1個以上の前述したポリペプチドが、医薬組成物を生成するように製剤化され、組成物は、また、1個以上の製剤的に許容可能な希釈剤、担体ま

50

たは賦形剤を含む。ある特定の実施形態では、医薬組成物は、また、少なくとも1つ追加の予防薬または治療薬を含む。

【0031】

本開示のなお更なる実施形態では、前述した突然変異タンパク質ポリペプチドの1つに特異的に結合する抗体を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、別々のポリペプチドまたは単一ポリペプチド中に存在する軽鎖可変領域および重鎖可変領域を含む。ある特定の実施形態では、本開示の抗体は、約 10^7 の M^{-1} ～約 10^{12} の M^{-1} の親和性で、ポリペプチドと結合する。更に他の実施形態では、抗体は、アイソタイプIgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4の重鎖定常領域を含む。更に別の実施形態では、抗体は、検出可能に標識付けされ、他の実施形態では、抗体は、Fv、scFv、Fab、F(ab')₂、またはFab'である。

10

【0032】

本開示は、また、共有結合した非ポリペプチドポリマー（例えば、ポリ（エチレングリコール）ポリマー）を含む抗体を企図する。他の実施形態では、抗体は、脂質部分、脂肪酸部分、多糖部分、および糖質部分から選択される共有結合部分を含む。

【0033】

いくつかの実施形態では、抗体は、単鎖Fv（scFv）抗体であり、他の実施形態では、scFvが、多量体化される。

【0034】

本開示の抗体は、単クローン性抗体、多クローン性抗体、またはヒト化抗体としてよいが、これらに限定されない。

20

【0035】

更に、本開示は、上記のとおり、少なくとも1つの製剤的に許容可能な賦形剤、担体または希釈剤とともに製剤化された抗体を含む医薬組成物を企図する。かかる医薬組成物は、また、少なくとも1つの追加の予防薬または治療薬を含有してよい。

【0036】

本開示のある特定の実施形態では、上記の医薬組成物の1つ、および任意で1つ以上の追加の成分を含有する滅菌容器を企図する。例えば、滅菌容器は、シリンジとしてよく、これに限定されない。なお更なる実施形態では、滅菌容器は、キットの1つの構成部品である；キットは、また、例えば、少なくとも1つの予防薬または治療薬を含有する第2の滅菌容器を含有してよい。

30

【0037】

また、前述したポリペプチドまたは融合タンパク質の生成方法が、本明細書に開示される。本方法は、ポリペプチドまたは融合タンパク質を発現する宿主細胞を培養すること；および発現したポリペプチドまたは融合タンパク質を精製することを含んでよい。

【0038】

本開示は、また、対象に治療有効量の前述したポリペプチドまたは融合タンパク質を投与することによって、対象（例えば、ヒト）のグルコース代謝障害を治療または予防する方法を企図する。いくつかの方法では、治療または予防の結果、対象中の血漿グルコース、対象中の血漿インスリン、体重および／または食物摂取が減少する、または対象中のグルコース耐性が増大する。特定の実施形態では、グルコース代謝障害は、糖尿病である。

40

【0039】

対象の体重障害を治療または予防する方法も開示される。本方法は、対象に本開示のポリペプチドまたは融合タンパク質を投与することを含んでよく、ポリペプチドまたは融合タンパク質は、対象の体重障害を治療または予防するのに有効な量で投与される。いくつかの方法では、治療または予防の結果、対象の体重および／または食物摂取が減少する。

【0040】

いくつかの実施形態では、対象は、肥満である、および／または体重障害を有する。

【0041】

特定の投与経路または投与計画に限定されないが、いくつかの実施形態では、投与は、

50

非経口的（例えば、皮下）注入によるものである。

【図面の簡単な説明】

【0042】

【図1】本明細書に開示されたGDF15突然変異タンパク質のアミノ酸配列の、野生型（WT）成熟ヒトGDF15のアミノ酸配列とのアラインメントを示す。

【図2】本明細書に開示されたΔN3-GDF15突然変異タンパク質のアミノ酸配列の、WT成熟ヒトGDF15のアミノ酸配列とのアラインメントを示す。ΔN3-hGDF15突然変異タンパク質は、成熟hGDF15のN末端に存在する最初の3個のアミノ酸（ARN）を欠いている。

【図3】N末端からC末端に連続的に以下を含む2つの融合タンパク質（コンストラクトM1およびM2）を示す：IgKシグナル配列（小文字）（IgK）-ヒト血清アルブミンアミノ酸（D25-L609）配列（HSA）-非開裂可能（Gly-Gly-Gly-Gly-Ser）₃リンカー〔（G₄S）〕₃（下線）-成熟ヒトGDF15アミノ酸配列（hGDF15）（太字）。コンストラクトM1（IgK-HSA-〔（G₄S）〕₃-hGDF15）は、完全長成熟hGDF15を含有し、一方、コンストラクトM2（IgK-HSA-〔（G₄S）〕₃-ΔN3-hGDF15）は、成熟hGDF15のN末端のアミノ酸に対応する最初の3個のアミノ酸（ARN）が欠失しているΔN3-hGDF15を含有する。

【図4】CHOK1SV GSKO安定細胞株培地からのコンストラクトM1およびM2の非還元、クマシー染色、SDS-PAGE発現ゲルを示す。アスタリスク（*）は、CHOK1SVからの分泌中にM1で生じるクリップ種を示す。クリップ部位のLC/MS同定の結果、成熟hGDF15のN末端に3つのアミノ酸切断（ΔARNまたはΔN3）を含有する安定度向上コンストラクト（M2）のデザインとなった。

【図5】非開裂可能〔（G₄S）〕₅リンカー（下線）を介して成熟ヒトGDF15アミノ酸配列（太字）のN末端に融合されたIgKシグナル配列（小文字）を有するヒト血清アルブミンアミノ酸（D25-L609）配列との2つの融合分子を示す。コンストラクトM3（IgK-HSA-〔（G₄S）〕₅-ΔN3-hGDF15）は、成熟hGDF15のN末端に3つのアミノ酸切断（ΔARN）を含有する；一方、コンストラクトM4（IgK-HSA-〔（G₄S）〕₅-ΔN6-hGDF15）は、成熟hGDF15のN末端に対して6つのアミノ酸切断（ΔARNGDH）を含有する。

【図6】ビヒクル、M1、M3およびM4融合分子（40nmol/kg）の単一急性皮下投与の後の食餌性肥満（DIO）マウスの食物摂取への作用を示す。図に示したとおり、投与後24時間および投与後7日に、食物摂取パラメーターを測定した。マウスの各群（n=8）で、対応のないt検定によって、それぞれの特定の時点で、さまざまな用量群をビヒクル対照群と比較して、p値（*、p<0.05；**、p<0.01；***、p<0.001）を測定した。

【図7】ビヒクル、M1、M3およびM4融合分子（40nmol/kg）の単一急性皮下投与の後のDIOマウスの体重への作用を示す。図に示したとおり、投与後24時間および投与後7日に、投与前群体重に対して、体重パラメーターを測定した。マウスの各群（n=8）で、対応のないt検定によって、それぞれの特定の時点で、さまざまな用量群をビヒクル対照群と比較して、p値（*、p<0.05；**、p<0.01；***、p<0.001）を測定した。

【図8A-1】図8Aは、N結合グリコシル化コンセンサス部位（M5～M21）の導入によって生成されたモノグリコシル化およびジグリコシル化突然変異タンパク質のアミノ酸配列を示す。これらの配列は、成熟ヒトGDF15アミノ酸配列（太字）のN末端に融合されたIgKシグナル配列（小文字）を含む。

【図8A-2】図8Aは、N結合グリコシル化コンセンサス部位（M5～M21）の導入によって生成されたモノグリコシル化およびジグリコシル化突然変異タンパク質のアミノ酸配列を示す。これらの配列は、成熟ヒトGDF15アミノ酸配列（太字）のN末端に融合されたIgKシグナル配列（小文字）を含む。

10

20

30

40

50

【図 8 B-1】図 8 Bは、図 8 Aに示されたアミノ酸配列をコードする核酸配列を示す。
【図 8 B-2】図 8 Bは、図 8 Aに示されたアミノ酸配列をコードする核酸配列を示す。
【図 8 B-3】図 8 Bは、図 8 Aに示されたアミノ酸配列をコードする核酸配列を示す。
【図 8 B-4】図 8 Bは、図 8 Aに示されたアミノ酸配列をコードする核酸配列を示す。
【図 8 B-5】図 8 Bは、図 8 Aに示されたアミノ酸配列をコードする核酸配列を示す。
【図 8 C】図 8 Cは、 $\Delta N 3-M 1 6$ および $\Delta N 3-M 1 6$ をコードする核酸配列のアミノ酸配列を示す。

【図 8 D】図 8 Dは、I g Kシグナル配列 (I g K-W T-G D F 1 5) および I g K-W T-G D F 1 5をコードする核酸配列を含有する W T-成熟ヒト G D F 1 5アミノ酸配列のアミノ酸配列を示す。

【図 9】図 8 Aに記載された各操作された組換え N-グリコシル化ヒト G D F 1 5突然変異タンパク質および $\Delta N 3-M 1 6$ について、相対的溶解度の改善に加え、分泌および二量体形成の概要を提供する。

【図 10】ビヒクル (P B S)、G D F 1 5、M 1 6、 $\Delta N 3-M 1 6$ および M 1 7ポリペプチド ($1 \text{ mg} / \text{kg}$ ($40 \text{ nmol} / \text{Kg}$)) の単一皮下投与後の食餌性肥満 (D I O) マウスの食物摂取への作用を示す。

【図 11】ビヒクル (P B S)、G D F 1 5、M 1 6、 $\Delta N 3-M 1 6$ および M 1 7ポリペプチド ($1 \text{ mg} / \text{kg}$ ($40 \text{ nmol} / \text{Kg}$)) の単一皮下投与後の D I Oマウスの体重への作用を示す。

【発明を実施するための形態】

【0043】

詳細な説明

本開示の方法および組成物を更に記載する前に、本開示は、本明細書に記載した特定の実施形態に限定されるものではないと理解されるべきであり、また、本明細書に用いられる専門用語は、特定の実施形態だけを記載する目的のためにあり、限定することを意図しないものと理解されるべきである。

【0044】

値の範囲が提供される場合、その範囲の上限値と下限値の間の各介在値、文脈が別途明白に記載をしない限り下限値の単位の 10 分の 1 まで、およびその示した範囲内の他の示した値または介在値が、本発明内に包含されるものとする理解される。これより狭い範囲の上限値および下限値は、独立してより狭い範囲に含んでよく、これも、示した範囲内の明確に除外したいずれかの限界値に従う限り、本発明内に包含される。示した範囲が限界値の一方または両方を含む場合、含まれる上限値および下限値のいずれかまたは両方を除外する範囲も本発明に含まれる。別途特に定義しない限り、本明細書に用いられる全技術用語および科学用語は、本発明が関係する当業者によって一般的に理解される意味と同じである。

【0045】

本明細書および添付したクレームに用いる場合、文脈が明らかに別段の指示をしない限り、単数形「a」、「an」および「the」は複数の指示物を含むことに留意しなければならない。したがって、例えば、「突然変異ポリペプチド」への参照は、1 つ以上の突然変異ポリペプチドへの参照を含むなどである。クレームが任意の要素を除外するように作成されてもよいことに更に留意する。したがって、この記述は、クレームの要素の列举に関連した「のみ」、「だけ」などの排他的な用語の使用、すなわち「否定的な」限定の使用と関連のための先の記載としての役目を果たすよう意図している。

【0046】

本明細書で論じられる出版物は、本出願の出願日の前のその開示のためだけに提供される。本明細書におけるいずれの内容も、本発明が、先行発明を理由にかかる出版物に先行する権利を有しないことを認めるものと解釈されるべきではない。更に、提供される出版物の日付は、実際の出版日とは異なる場合があり、別々に確認する必要がある。

【0047】

定義

「患者」または「対象」という用語は、ヒトまたは非ヒト動物（例えば、哺乳動物）を指すように交換可能で用いられる。

【0048】

「治療する (treat)」、「治療すること (treating)」、「治療 (treatment)」などの用語は、一時的または永続的のいずれかで、対象を苦しめる疾患、障害、または状態の少なくとも1つの根底にある原因、または対象を苦しめる疾患、障害、状態に関連した少なくとも1つの症状を除去する、低減する、抑える、緩和する、または改善するために、疾患、障害または状態、またはこれらの症状が、診断、観察などされた後に開始される一連の行動（薬剤、例えば、ポリペプチドまたはポリペプチドを含む医薬組成物を投与することなど）を指す。したがって、治療は、（例えば、血流中のインスリンおよび／またはグルコースのレベルを減少させるように、グルコースレベルの変動を最小化するようにグルコース耐性を増大するため、および／またはグルコース恒常性の崩壊によって引き起こされる疾患を予防するように）活動性疾患を抑制すること（すなわち、疾患、障害もしくは状態またはこれらに関連した臨床的症状が発現する、または更に進行するのを阻止すること）を含む。

10

【0049】

「治療を必要とする」という用語は、本明細書に用いる場合、対象が治療を必要とする、または対象が治療から利益を受けるという、医師または他の看護者による判断を指す。この判断は、医師または看護者の専門的知識の範囲内にあるさまざまな因子に基づいて行われる。

20

【0050】

「予防する (prevent)」、「予防すること (preventing)」、「予防 (prevention)」などの用語は、一般に特定の疾患、障害または状態となる傾向がある対象という状況の中で、一時的または永続的のいずれかで、対象の疾患、障害、状態などを発現するリスク（例えば、臨床的症状がないことによって決定されたとおり）を予防する、抑える、阻害する、または、低減するような様式で（例えば、疾患、障害、状態またはこれらの症状の発症前に）開始される一連の行動（薬剤、例えば、ポリペプチドまたはポリペプチドを含む医薬組成物を投与することなど）を指す。ある特定の場合には、本用語は、疾患、障害もしくは状態の進行を遅らせること、または、これらが有害な状態、もしくはそうでなければ好ましくない状態に進行するのを阻害することも指す。

30

【0051】

「予防を必要とする」という用語は、本明細書に用いる場合、対象が予防的ケア必要とする、または対象が予防的ケアから利益を受けるという、医師または他の看護者による判断を指す。この判断は、医師または看護者の専門的知識の範囲内にあるさまざまな因子に基づいて行われる。

【0052】

「治療有効量」という語句は、患者に投与した場合、疾患、障害または状態の症状、形態、または特性に任意の検出可能な効果があるようにすることができる量で、単独でまたは医薬組成物の一部として、および単回用量または一連の用量の一部として、対象への薬剤の投与を指す。治療有効量は、関係のある生理学的作用を測定することによって確かめることができる。例えば、高血糖状態の場合では、薬剤の量が、高血糖状態を治療するのに有効であるかどうかを決定するために、血中グルコースの低下もしくは減少またはグルコース耐性試験での改善を用いることができる。例えば、治療有効量が、空腹時血漿グルコース (FPG) のレベル（例えば、ベースラインレベル）を低減する、または減少させるのに十分な量であり、例えば、当該量は、FPGレベルを 200 mg/dl 超から 200 mg/dl 未満に低減するのに十分であり、当該量は、FPGレベルを 175 mg/dl から開始レベル未満に低減するのに十分であり、当該量は、FPGレベルを 150 mg/dl から開始レベル未満に低減するのに十分であり、当該量は、FPGレベルを 125 mg/dl から開始レベル未

40

50

満に低減するのに十分である、など（例えば、FPGレベルを125mg/dl未満、120mg/dl未満、115mg/dl未満、110mg/dl未満に低減する、など）である。HbA1cレベルの場合では、有効量は、レベルを約10%～9%超、約9%～8%超、約8%～7%超、約7%～6%超、約6%～5%超など低減する、または減少させるのに十分な量である。更に、具体的に、HbA1cレベルを約0.1%、0.25%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、1.5%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、33%、35%、40%、45%、50%、またはそれ以上低減する、または減少させることが、本開示によって企図される。治療有効量は、投与計画および対象の状態などの診断的分析に関係して調節することができる。

10

【0053】

「変化をもたらすのに十分な量で」という語句は、特定の治療法の実施前（例えば、ベースラインレベル）および実施後に測定した指標のレベル間に検出可能な差があることを意味する。指標としては、客観的パラメーター（例えば、グルコースまたはインスリンのレベルまたは食物摂取）または主観的パラメーター（例えば、対象の良好な状態の感覚または食欲）が挙げられる。

【0054】

「グルコース耐性」という語句は、本明細書に用いる場合、グルコース摂取が変動するときに、血漿グルコースおよび／または血漿インスリンのレベルを制御するための対象の能力を指す。例えば、グルコース耐性は、約120分以内に、血漿グルコースのレベルをグルコースの摂取前に測定したレベルに低減する対象の能力を包含する。

20

【0055】

「糖尿病」および「糖尿病の」という用語は、インスリンの異常な産生または利用に関係する糖質代謝の進行性疾患を指し、高血糖および糖尿によって特徴づけられることが多い。「前糖尿病」および「前糖尿病の」という用語は、対象が、糖尿病で典型的に観察される特性、症状などがないが、治療しないままであれば、糖尿病に進行する可能性がある特性、症状などがある状態を指す。これらの状態にあることは、例えば、空腹時血漿グルコース（FPG）試験または経口グルコース負荷試験（OGTT）を用いて決定してよい。両試験とも通常、対象が試験を開始する前に少なくとも8時間空腹である必要がある。FPG試験では、対象の血中グルコースが、空腹時の終結後に測定される；一般に、対象は、一晩空腹であり、血中グルコースは、対象が食事する前の朝に測定される。健康な対象では、一般にFPG濃度が、約90～約100mg/dlであり、「前糖尿病」の対象では、一般にFPG濃度が、約100～約125mg/dlであり、「糖尿病」の対象では、一般にFPGレベルが、約126mg/dl超である。OGTTでは、対象の血中グルコースが、空腹時に測定され、高グルコース含有飲料を飲んだ後2時間に再び測定される。高グルコース含有飲料の摂取後2時間に、健康な対象では、一般に血中グルコース濃度が、約140mg/dl未満であり、前糖尿病の対象では、一般に血中グルコース濃度が、約140～約199mg/dlであり、糖尿病の対象では、一般に血中グルコース濃度が、約200mg/dl以上である。前述した血糖値は、ヒト対象に関するものであり、正常血糖、中等度高血糖および顕性高血糖は、マウス対象で別様に測られる。4時間空腹後の健康なマウス対象では、一般にFPG濃度が、約100～約150mg/dlであり、「前糖尿病」のマウス対象では、一般にFPG濃度が、約175～約250mg/dlであり、「糖尿病」のマウス対象では、一般にFPG濃度が、約250mg/dl超である。

30

40

【0056】

「インスリン抵抗性」という用語は、本明細書に用いる場合、正常な量のインスリンが、正常な生理学的または分子応答を生じさせることができない状態を指す。いくつかの場合では、体内で産生された、または外因的に投与された過剰生理学的量のインスリンが、全体でまたは一部で、インスリン抵抗性を克服することができ、生物学的応答を生じさせる。

50

【0057】

「メタボリックシンドローム」という用語は、限定されないが、高インスリン血症、異常グルコース耐性、肥満、腹部または上部身体区画への脂肪の再分布、高血圧症、フィブリン溶解反応異常、および高トリグリセリド、低高密度リポタンパク質（HDL）コレステロール、および高低比重低密度リポタンパク質（LDL）粒子によって特徴づけられる脂質異常症を含む関連する特徴群を指す。メタボリックシンドロームである対象は、2型糖尿病および／または他の障害（例えば、アテローム動脈硬化）を発現するリスクがある。

【0058】

「グルコース代謝障害」という語句は、健康な個体と比較して対象中のグルコースのレベルの上昇および／またはインスリンのレベルの上昇と関係している臨床的症状または臨床的症状の組み合わせによって特徴づけられる任意の障害を包含する。グルコースおよび／またはインスリンのレベルの上昇は、以下の疾患、障害および状態に現れる可能性がある：高血糖、2型糖尿病、妊娠性糖尿病、1型糖尿病、インスリン抵抗性、グルコース耐性の低下、高インスリン血症、グルコース代謝の低下、前糖尿病、他の代謝障害（例えば、メタボリックシンドローム、シンドロームXとも称される）、および肥満、など。本開示のポリペプチド、およびこれらの組成物は、例えば、グルコース恒常性を実現する、および／または維持するように、例えば、健康な対象にみられる範囲に血流中のグルコースレベルを低減する、および／またはインスリンレベルを低減するように用いることができる。

【0059】

「高血糖」という用語は、本明細書に用いる場合、健康な個体と比較してグルコースの量が増加して、対象の血漿中を循環する状態を指す。高血糖は、本明細書に記載したとおり、空腹時血中グルコースレベルの測定を含む当技術分野で知られる方法を用いて、診断することができる。

【0060】

「高インスリン血症」という用語は、本明細書に用いる場合、付随的に、血中グルコースレベルが上昇する、または正常である場合、循環インスリンのレベルの上昇がある状態を指す。高インスリン血症は、脂質異常症、例えば、高トリグリセリド、高コレステロール、高低密度リポタンパク質（LDL）および低高密度リポタンパク質（HDL）；高尿酸レベル；多嚢胞性卵巣症候群；2型糖尿病および肥満と関係しているインスリン抵抗性によって引き起こされる可能性がある。高インスリン血症は、血漿インスリンレベルが、約 $2 \mu\text{U}/\text{mL}$ より高い場合に診断することができる。

【0061】

本明細書に用いる場合、「体重障害」という語句は、過剰体重および／または食欲の向上と関係している状態を指す。対象が、参照する健康な個体と比べて、太り過ぎかどうかを決定するために対象の年齢、身長、性別および健康状態を含むさまざまなパラメーターが用いられる。例えば、対象の体重（キログラム）を対象の身長（平方メートル）で割ることによって計算される対象のボディマスインデックス（BMI）の評価によって、対象が、太り過ぎまたは肥満と考えるとよい。BMIが、約 $18.5 \sim 24.9 \text{ kg}/\text{m}^2$ の範囲である成人は、正常な体重であると考えられる；BMIが、約 $25 \sim 29.9 \text{ kg}/\text{m}^2$ である成人は、太り過ぎ（前肥満）と考えるとよい；BMIが約 $30 \text{ kg}/\text{m}^2$ 以上である成人は、肥満と考えるとよい。食欲の向上が、過剰体重をもたらすことが多い。食欲の向上と関係しているいくつかの状態があり、例えば、朝の食欲不振および不眠と関係していることが多い夜の多食によって特徴づけられるが、視床下部の損傷に関係する可能性がある夜食症候群を含む。

【0062】

「アクチベーター」という用語は、例えば、代謝障害を治療するまたは予防するのに用いられる1つ以上の薬剤、例えば、ポリペプチドの機能または活性を刺激する、増大させる、活性化させる、促進する、向上させる、活性を増強する、感作する、または上向き調

10

20

30

40

50

節する薬剤を指す。また、アクチベーターとしては、本発明のポリペプチドと同じ作用の機序により作動し、ポリペプチドの生物学的反応と同等（またはそれ以上）の生物学的反応を誘発することができる薬剤（すなわち、ポリペプチドのシグナリング経路に類似した方法で、ポリペプチドと同じようなシグナリング経路を調節する薬剤）が挙げられる。アクチベーターの例としては、アゴニスト、例えば、小分子化合物が挙げられる。

【0063】

「モジュレーター」という用語は、ひとまとめにして本発明のポリペプチドおよびアクチベーターを指す。

【0064】

「調節する」、「調節」などの用語は、直接にまたは間接に1つ以上のポリペプチド（またはこれをコードする核酸分子）の機能または活性を増大させる薬剤（例えば、アクチベーター）の能力；または1つ以上のポリペプチドと同等の作用を生じさせる薬剤の能力を指す。

【0065】

「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」という用語は、本明細書に交換可能で用いられ、任意の長さのアミノ酸のポリマー形態を指し、遺伝子的にコード化されたアミノ酸および非遺伝子的にコード化されたアミノ酸、化学的にまたは生化学的に修飾されたまたは誘導体化されたアミノ酸、および修飾されたポリペプチド主鎖を有するポリペプチドを含むことができる。本用語としては、融合タンパク質、を含み、これには、限定されないが、異種アミノ酸配列を有する融合タンパク質、異種および同種リーダー配列を有する、N末端メチオニン残基を有するまたはN末端メチオニン残基を有しない融合タンパク質；免疫学的に標識を付けられたタンパク質；などが挙げられる。特定の実施形態では、本用語は、遺伝子的にコード化されたアミノ酸を含む任意の長さのアミノ酸のポリマー形態を指す。特定の実施形態では、本用語は、異種アミノ酸配列に融合された遺伝子的にコード化されたアミノ酸を含む任意の長さのアミノ酸のポリマー形態を指す。特定の実施形態では、本用語は、任意で異種配列に融合された長さが112アミノ酸のアミノ酸を指す。特定の実施形態では、適宜、本明細書に開示され、記載されたタンパク質および分子を指す場合、「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」という用語は、本明細書に定義したとおりのポリペプチドを指す。

【0066】

本開示全体を通じて1文字コードまたは3文字コードに従ってアミノ酸についての参照がなされると理解される。読者の利便性のために、以下に1および3文字アミノ酸コードを提供する。

G	グリシン	Gly		P	プロリン	Pro
A	アラニン	Ala		V	バリン	Val
L	ロイシン	Leu		I	イソロイシン	Ile
M	メチオニン	Met		C	システイン	Cys
F	フェニルアラニン	Phe		Y	チロシン	Tyr
W	トリプトファン	Trp		H	ヒスチジン	His
K	リジン	Lys		R	アルギニン	Arg
Q	グルタミン	Gln		N	アスパラギン	Asn
E	グルタミン酸	Glu		D	アスパラギン酸	Asp
S	セリン	Ser		T	トレオニン	Thr

【0067】

本明細書に用いる場合、「変異体」という用語は、天然変異体（例えば、相同体および対立遺伝子変異体）および非天然変異体（例えば、組換え修飾）を包含する。天然変異体は、相同体、すなわち、種ごとにヌクレオチドまたはアミノ酸配列がそれぞれ異なる核酸

およびポリペプチドを含む。天然変異体は、対立遺伝子変異体、すなわち、種内の個体ごとにヌクレオチドまたはアミノ酸配列がそれぞれ異なる核酸およびポリペプチドを含む。非天然変異体は、ヌクレオチドまたはアミノ酸配列それぞれに変化を含む核酸およびポリペプチドを含み、配列中の変化は、人工的に導入され、例えば、変化は、ヒトの介入（「人間の手」）によって実験室または他の施設で生成される。

【0068】

「未変性」または「野生型」という用語は、G D F 1 5 に関して、生物学的に活性がある天然 G D F 1 5 変異体を含む生物学的に活性がある天然 G D F 1 5 を指す。本用語は、1 1 2 アミノ酸ヒト G D F 1 5 成熟配列（S E Q I D N O : 1）を含む。

【0069】

「突然変異タンパク質」という用語は、本明細書に用いる場合、広く、組換えタンパク質、すなわち、アミノ酸配列中の人工的に導入された変化、例えば、ヒトの介入（「人間の手」）によって実験室または他の施設で生成されたアミノ酸配列中の変化を含むポリペプチドを指す。これらのポリペプチドは、通常、単一または複数のアミノ酸置換または欠失を保持し、部位特異的変異誘発またはランダム変異誘発されたクローン化遺伝子、または完全合成遺伝子由来であることが多い。したがって、本開示の「G D F 1 5 突然変異タンパク質」は、例えば、参照ポリペプチドに対して、例えば、成熟ヒト G D F 1 5（S E Q I D N O : 1）に対して、アミノ酸置換および／またはアミノ酸欠失（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、または14個以上のアミノ酸のN末端側切断）を包含する。

【0070】

本明細書に用いる場合、未変性ヒト G D F 1 5 または G D F 1 5 突然変異タンパク質に関して、「修飾された」、「修飾」などの用語は、ヒト G D F 1 5、天然 G D F 1 5 変異体、または G D F 1 5 突然変異タンパク質の特性を修飾する1つ以上の変化を指し、当該変化は、G D F 1 5 の一次アミノ酸配列を変化させない。かかる特性としては、例えば、溶解度、循環半減期、安定度、クリアランス、免疫原性またはアレルギー原性、および製造性（例えば、コストおよび効率）が挙げられる。「修飾」は、G D F 1 5 ポリペプチド（未変性または突然変異タンパク質）自体の一次アミノ酸配列を変化させない共有結合的化学修飾を含む。実施してよいヒト G D F 1 5、天然 G D F 1 5 変異体、または G D F 1 5 突然変異タンパク質への変化としては、これらに限定されないが、ペグ化（ポリエチレングリコール（P E G）、またはこれらの誘導体の1個以上の分子の共有結合）；グリコシル化（例えば、N-グリコシル化）、ポリシアル化およびH E S 化；マルトース結合タンパク質融合；アルブミン融合（例えば、H S A 融合）；例えば、コンジュゲート脂肪酸鎖（アシル化）によるアルブミン結合；F c 融合；およびP E G ミメティックとの融合が挙げられる。いくつかの特定の実施形態では、ポリエチレングリコールに関係する修飾を必然的に伴い、他の特定の実施形態では、アルブミンに関係する修飾を必然的に伴い、更に他の特定の修飾では、グリコシル化に関係する修飾またはこれらの組み合わせを必然的に伴う。

【0071】

「DNA」、「核酸」、「核酸分子」、「ポリヌクレオチド」などの用語は、本明細書に交換可能で用いられ、任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態、デオキシリボヌクレオチドもしくはリボヌクレオチドのどちらか、またはこれらの類似体を指す。ポリヌクレオチドの非限定例としては、直鎖状および環状核酸、メッセンジャーRNA（mRNA）、相補的DNA（cDNA）、組換えポリヌクレオチド、ベクター、プローブ、プライマーなどが挙げられる。

【0072】

「プローブ」という用語は、目的の遺伝子または配列に対応するDNAまたはRNAのフラグメントを指し、フラグメントは、放射標識されている（例えば、³²Pまたは³⁵Sを組み入れることによって）、またはいくつかの他の検出可能な分子、例えば、ビオチン、ジゴキシゲニンまたはフルオレセインで標識されている。相補的配列とのDNAまた

10

20

30

40

50

はRNAの一続きが、ハイブリダイズする場合、プローブを用いて、例えば、目的の遺伝子を含むゲル上で、ウイルスブランク、細菌コロニーまたはバンドに標識を付けることができる。プローブは、クローン化DNAとすることができる、または合成DNAストランドとすることができる；後者を用いて、例えば、タンパク質の一部をマイクロシーケンシングし、タンパク質をコードする核酸配列を演繹し、その配列を保持するオリゴヌクレチドを合成し、その配列を放射標識して、cDNAライブラリーまたはゲノムライブラリーをスクリーニングするためにプローブとしてそれを用いて、単離タンパク質からcDNAまたはゲノムクローンを得ることができる。

【0073】

「異種」という用語は、異なる供給源に由来する構造によって定義される2つの成分を指す。例えば、ポリペプチドの文脈では、「異種」ポリペプチドが、異なるポリペプチド（例えば、組換えポリペプチドを含む第1の成分および未変性GDF15ポリペプチド由来の第2の成分）由来の機能的に連結されるアミノ酸配列を含んでよい。同様に、キメラポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの文脈では、「異種」ポリヌクレオチドが、異なる遺伝子（例えば、本明細書に開示された実施形態に従ったポリペプチドをコードする核酸からの第1の成分およびキャリアポリペプチドをコードする核酸からの第2の成分）由来であることができる機能的に連結される核酸配列を含んでよい。他の例示的な「異種」核酸は、コード配列を含む核酸が、コード配列の遺伝的起源と異なる遺伝的起源からの制御エレメント（例えば、プロモーター）に機能的に連結されている（例えば、プロモーター、コード配列または両者と異なる遺伝的起源であり得る目的の宿主細胞中に発現させるため）発現コンストラクトを含む。例えば、GDF15ポリペプチドまたはこれらのドメインをコードするポリヌクレオチドに機能的に連結されるT7プロモーターが、異種核酸であると言われる。組換え細胞の文脈では、「異種」は、核酸が存在している宿主細胞と異なる遺伝的起源の核酸（または遺伝子産物、例えば、ポリペプチド）の存在を指すことができる。

【0074】

「機能的に連結される」という用語は、所望の機能をもたらす分子間の連結を指す。例えば、「機能的に連結される」は、核酸の文脈では核酸配列間の機能的連結を指す。例えば、核酸発現制御配列（プロモーター、シグナル配列、または一連の転写因子結合部位など）を第2のポリヌクレオチドに機能的に連結してよく、発現制御配列は、第2のポリヌクレオチドの転写および／または翻訳に影響を及ぼす。ポリペプチドの文脈では、「機能的に連結される」は、ポリペプチドの記載された活性をもたらすアミノ酸配列（例えば、異なるドメイン）間の機能的連結を指す。

【0075】

本明細書に用いる場合、ポリペプチドの構造の文脈では、「N末端」（または「アミノ末端」）および「C末端」（または「カルボキシル末端」）は、それぞれポリペプチドのアミノおよびカルボキシル最末端を指し、一方、「N末端側」および「C末端側」という用語は、それぞれN末端およびC末端に向かってのポリペプチドのアミノ酸配列中の相対的な位置を指し、それぞれN末端およびC末端に残基を含むことができる。「隣接N末端側」または「隣接C末端側」は、第2のアミノ酸残基に対する第1のアミノ酸残基の位置を指し、第1のアミノ酸残基および第2のアミノ酸残基は、共有結合して連続アミノ酸配列をもたらす。

【0076】

「由来の」は、アミノ酸配列またはポリヌクレオチド配列（例えば、GDF15ポリペプチド「由来の」アミノ酸配列）の文脈では、ポリペプチドまたは核酸が、参照ポリペプチドまたは核酸（例えば、天然GDF15ポリペプチドまたはGDF15をコードする核酸）の配列に基づいている配列を有することを示すのを意味し、供給源またはタンパク質または核酸が生成される方法について制限することを意味しない。例えば、「由来の」という用語は、参照アミノ酸またはDNA配列の相同体または変異体を含む。

【0077】

ポリペプチドの文脈では、「単離された」という用語は、天然ポリペプチドであれば、天然に生じる可能性がある環境と異なる環境にある目的のポリペプチドを指す。「単離された」とは、目的のポリペプチドが実質的に濃縮されている、および／または、目的のポリペプチドが部分的にまたは実質的に精製されている試料内に存在するポリペプチドを含むことを意味する。ポリペプチドが天然ポリペプチドでない場合、「単離された」は、ポリペプチドが合成または組換え手段のいずれかによって作製された環境から分離されていることを示す。

【0078】

「濃縮された」は、試料が非天然に操作され（例えば、実験室で、例えば、科学者または臨床医によって）、その結果、目的のポリペプチドが、a) 生体試料などの開始試料（例えば、ポリペプチドが天然に生じる試料、またはポリペプチドが投与後に存在している試料）中のポリペプチドの濃度より濃度が増加（例えば、少なくとも3倍増加、少なくとも4倍増加、少なくとも8倍増加、少なくとも64倍増加、またはそれ以上）して、またはb) ポリペプチドが生成された環境以上の濃度（例えば、細菌性細胞中）で存在していることを意味する。

【0079】

「実質的に純粋」は、成分（例えば、ポリペプチド）が、組成物の総含有量の約50%超を構成しており、典型的には総ポリペプチド含有量の約60%超を構成していることを示す。更に典型的には、「実質的に純粋」は、総組成物の少なくとも75%、少なくとも85%、少なくとも90%以上が目的の成分である組成物を指す。いくつかの場合では、ポリペプチドが、組成物の総含有量の約90%超、または約95%超を構成している。

【0080】

「抗体」（Ab）および「免疫グロブリン」（Ig）という用語は、同じ構造的特性を有する糖タンパク質を指す。抗体は、特定の抗原への結合特異性を示し、一方、免疫グロブリンは、抗原特異性を欠いている抗体および他の抗体様分子の両者を含む。以下に詳細に抗体を記載している。

【0081】

「単クローン性抗体」という用語は、実質的に均質な抗体の集団から得られた抗体を指し、すなわち、集団を含む個々の抗体は、少量で存在する可能性がある天然に生じる可能性がある変異型を除いて、同じものである。単クローン性抗体はきわめて特異的であり、単一抗原部位に向けられる。異なる決定因子（エピトープ）に向けられた異なる抗体を含むことができる多クローン性抗体調製物とは対照的に、それぞれの単クローン性抗体は、抗原上の単一決定因子に向けられる。

【0082】

抗体の文脈では「単離された」という用語は、その自然環境の汚染成分から単離されたおよび／または回収された抗体を指す；かかる汚染成分は、抗体の診断用利用または治療用利用を妨げる可能性がある物質を含み、酵素、ホルモン、および他のタンパク質溶質または非タンパク質溶質を含んでよい。

【0083】

「保存的アミノ酸置換」という語句は、以下の群：1) L、I、M、V、F；2) R、K；3) F、Y、H、W、R；4) G、A、T、S；5) Q、N；および6) D、E内でのアミノ酸残基の置換を指す。保存的アミノ酸置換は、酸性度、塩基度、電荷、極性、または側鎖の大きさがほぼ同じ側鎖を有するアミノ酸でタンパク質中のアミノ酸（複数可）を置換することによって、タンパク質の活性を保存する可能性がある。置換、挿入、または欠失のガイダンスは、異なる種からの異なる変異体タンパク質またはタンパク質のアミノ酸配列のアラインメントに基づいてよい。

【0084】

増殖分化因子15（GDF15）

GDF15は、また、MIC-1（マクロファージ抑制サイトカイン-1）、PDF（前立腺分化因子）、PLAB（胎盤骨形態形成タンパク質）、NAG-1（非ステロイド

10

20

30

40

50

系抗炎症薬剤（NSAID）活性化遺伝子）、TGF- β 、およびPTGFBとして知られ、形質転換成長因子 β （TGF- β ）スーパーファミリーのメンバーである。GDF15は、のちにフューリン様プロテアーゼによって切断される62kDa細胞内前駆体タンパク質として合成され、25kDaジスルフィド結合タンパク質として分泌される。[例えば、Fairlie et al., J. Leukoc. Biol 65: 2-5 (1999)を参照]。GDF15 mRNAは、肝臓、腎臓、すい臓、結腸および胎盤を含むいくつかの組織中にみられ、臓器、例えば、肝臓、腎臓、心臓および肺の損傷中に、肝臓中のGDF15発現を有意に上向き調節することができる。

【0085】

GDF15前駆体は、29アミノ酸シグナルペプチド、167アミノ酸プロドメイン、およびフューリン様プロテアーゼによってプロドメインから切除される112アミノ酸の成熟ドメインを含有する308アミノ酸ポリペプチド（NCBI参照配列NP_004855.2）である。308アミノ酸GDF15ポリペプチドは、「完全長」GDF15ポリペプチドと称される；112アミノ酸GDF15ポリペプチド（「完全長」GDF15のアミノ酸197～308）は、「成熟」GDF15ポリペプチド（SEQ ID NO: 1）である。別途特に指示がない限り、「GDF15」という用語は、112アミノ酸成熟ヒト配列を指す。また、特定のGDF15残基の数値的参照は、112アミノ酸成熟配列（すなわち、残基1が、Ala（A）であり、残基112が、Ile（I）である；SEQ ID NO: 1を参照）を指す。重要なことに、GDF15前駆体アミノ酸配列は、3つの除去部位を予測し、「成熟」ヒトGDF15の3つの推定形態（すなわち、110、112および115アミノ酸）が得られ、112アミノ酸成熟配列は、正しいと受け入れられる。

【0086】

本開示の範囲は、マウス（NP_035949）、チンパンジー（XP_524157）、オランウータン（XP_002828972）、アカゲザル（EHH29815）、ジャイアントパンダ（XP_002912774）、テナガザル（XP_003275874）、モルモット（XP_003465238）、フェレット（AER98997）、ウシ（NP_001193227）、ブタ（NP_001167527）、イヌ（XP_541938）およびカモノハシ（Ornithorhynchus anatinus；AFV61279）を含む他の哺乳動物種からのGDF15オーソログ、およびこれらの修飾形態、ならびにこれらの使用を含む。ヒトGDF15の成熟形態は、マウスオーソログと約67%アミノ酸同一性を有する。

【0087】

利便性のために、以降に記載される修飾ヒトGDF15分子、GDF15変異体（例えば、突然変異タンパク質）、および修飾GDF15突然変異タンパク質は、ひとまとめにして以下で「ポリペプチド（複数可）」と称する。本開示のポリペプチドおよび核酸分子に関係して「ヒト」への任意の参照は、ポリペプチドまたは核酸を得る方法または供給源に関して制限することを意味せず、配列が天然ヒトポリペプチドまたは核酸分子の配列に対応する可能性があるために配列への参照だけであるということに留意しなければならない。特定の実施形態では、修飾ヒトGDF15分子は、N-グリコシル化二量体である。特定の実施形態では、修飾ヒトGDF15分子は、N-グリコシル化ホモ二量体である。これらをコードするヒトポリペプチドおよび核酸分子に加えて、本開示は、他の種からのGDF15関連ポリペプチドおよび対応する核酸分子を企図する。

【0088】

A. 所望の物理的特性を有するポリペプチド

本開示は、部分的に、SEQ ID NO: 1のアミノ酸配列（成熟112アミノ酸長ヒトGDF15）と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一である連続アミノ酸配列を含むポリペプチドを企図する。当該ポリペプチドは、SEQ ID NO: 1のアミノ酸配列に対して1つ以上のアミノ酸置換および／または欠失を含んでよい。ある特定の実施形態では、アミノ酸置換に加

えて、本開示のポリペプチドは、また、SEQ ID NO: 1のアミノ酸配列に対してアミノ酸欠失を含んでよい。いくつかの実施形態では、本開示のポリペプチドが、SEQ ID NO: 1のアミノ酸配列に対してアミノ酸欠失を含んでよい。

【0089】

利便性および明確さのため、SEQ ID NO: 1のアミノ酸配列が、本明細書に示したポリペプチドの参照配列として用いられる。このため、本明細書では、アミノ酸残基位置は、SEQ ID NO: 1を基準としてナンバリングされる。SEQ ID NO: 1の配列は、以下に示される。

ARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQ

FRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLAKDC

HCI

【0090】

いくつかの実施形態では、本開示のポリペプチドは、1個以上のN結合グリコシル化コンセンサス部位（複数可）を、かかる部位がSEQ ID NO: 1中に存在していない位置に導入する1、2、3つ以上のアミノ酸置換、付加、または欠失を含んでよい。N結合グリコシル化コンセンサス部位は、配列NXS/Tを含み、Nは、Asnであり；Xは、プロリン以外のアミノ酸であり；後にSer（S）またはThr（T）が続く。

【0091】

本開示のポリペプチドの例としては、1、2、3、4つ、またはそれ以上のグリコシル化コンセンサス部位（例えば、N結合グリコシル化コンセンサス部位）を、かかる部位がSEQ ID NO: 1のアミノ酸配列に存在していないアミノ酸位置に有するポリペプチドが挙げられる。

【0092】

ある特定の実施形態では、ポリペプチドは、置換の位置（例えば、SEQ ID NO: 1中の配列NGDを、1つの置換によってNGT/Sに変化させてよい；置換の位置には下線を引いた）に1つのN結合グリコシル化コンセンサス部位をもたらす1つのアミノ酸置換を、SEQ ID NO: 1に対して含んでよい。他の場合では、ポリペプチドは、置換の位置（例えば、SEQ ID NO: 1中の配列KTDを、2つの置換によってNTT/Sに変化させてよい；置換の位置には下線を引いた）に1つのN結合グリコシル化コンセンサス部位をもたらす2つのアミノ酸置換をSEQ ID NO: 1に対して含んでよい。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、置換の位置（例えば、SEQ ID NO: 1中の配列GPGを、3つの置換によってNTT/Sに変化させてよい；置換の位置には下線を引いた）に1つのN結合グリコシル化コンセンサス部位をもたらす3つのアミノ酸置換をSEQ ID NO: 1に対して含んでよい。

【0093】

ある特定の実施形態では、ポリペプチドは、欠失の位置にN結合グリコシル化コンセンサス部位をもたらす1つ以上のアミノ酸欠失を、SEQ ID NO: 1に対して含んでよい。例えば、SEQ ID NO: 1中の

NGDHCPLGPGRCCRLHT

配列を、アミノ酸D~H（下線を引いた）の欠失によって変化させてよく、これにより、N結合グリコシル化コンセンサス部位：NGTをもたらす。

【0094】

ある特定の実施形態では、ポリペプチドは、付加（複数可）の位置（複数可）にN結合グリコシル化コンセンサス部位をもたらす1つ以上のアミノ酸付加をSEQ ID NO: 1に対して含んでよい。1つのアミノ酸の付加によるN結合グリコシル化コンセンサス部位の導入の例としては、NをSEQ ID NO: 1中の配列LHTに付加し、これにより、配列LNHTを生成することが挙げられ、NHTは、N結合グリコシル化コンセンサス部位である。

【0095】

10

20

30

40

50

上述のとおり、ポリペプチドは、SEQ ID NO: 1に対して1つ以上の置換を含んでよく、置換は、SEQ ID NO: 1中の対応するアミノ酸の位置としてナンバリングしてよい。

【0096】

ある特定の実施形態では、ポリペプチドが、SEQ ID NO: 1のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一である連続アミノ酸配列を含んでよく、連続アミノ酸配列は、SEQ ID NO: 1中の対応するアミノ酸に対して以下の対の少なくとも1つの置換を有する。

- i) D 5 TおよびR 2 1 NまたはD 5 SおよびR 2 1 N;
- ii) R 1 6 NおよびH 1 8 TまたはR 1 6 NおよびH 1 8 S;
- iii) S 2 3 NおよびE 2 5 TまたはS 2 3 NおよびE 2 5 S;
- iv) L 2 4 NおよびD 2 6 TまたはL 2 4 NおよびD 2 6 S;
- v) S 5 0 NおよびF 5 2 T; S 5 0 NおよびF 5 2 S; F 5 2 NおよびA 5 4 T; またはF 5 2 NおよびA 5 4 S;
- vi) Q 5 1 NおよびR 5 3 T; Q 5 1 NおよびR 5 3 S; R 5 3 NおよびA 5 5 T; またはR 5 3 NおよびA 5 5 S;
- vii) S 6 4 NおよびH 6 6 TまたはS 6 4 NおよびH 6 6 S;
- viii) L 6 5 NおよびR 6 7 TまたはL 6 5 NおよびR 6 7 S;
- ix) S 8 2 NおよびN 8 4 TまたはS 8 2 NおよびN 8 4 S;
- x) K 9 1 NおよびD 9 3 T; K 9 1 NおよびD 9 3 S; D 9 3 NおよびG 9 5 T; またはD 9 3 NおよびG 9 5 S;
- xi) T 9 4 NおよびV 9 6 T; T 9 4 NおよびV 9 6 S; V 9 6 NおよびL 9 8 T; またはV 9 6 NおよびL 9 8 S;
- xii) S 9 7 NおよびQ 9 9 TまたはS 9 7 NおよびQ 9 9 S; および
- xiii) A 1 0 6 NおよびD 1 0 8 TまたはA 1 0 6 NおよびD 1 0 8 S。

【0097】

例えば、上述のi)の置換は、ポリペプチドが、SEQ ID NO: 1中のアミノ酸位置5に対応するアミノ酸位置にトレオニン(T)またはセリン(S)を有し、SEQ ID NO: 1中にアスパレート(D)が、アミノ酸位置5に存在していることを示す。

位置5でのTまたはSによるDの置換は、D 5 T/Sによって示すことができる。SEQ ID NO: 1に対してポリペプチド中の対応するアミノ酸の位置は、アミノ酸配列を整理させることによって決定してよい。

【0098】

ある特定の実施形態では、ポリペプチドが、N-グリコシル化コンセンサス配列が、SEQ ID NO: 1中に存在していない位置に、単一N-グリコシル化コンセンサス配列をもたらす2つのアミノ酸置換(1対の置換)を含んでよい。かかる置換の例としては、R 1 6 NおよびH 1 8 T/S; K 9 1 NおよびD 9 3 T/S; T 9 4 NおよびV 9 6 T/S; および上記の他のものが挙げられる。R 1 6 NおよびH 1 8 T/Sは、ポリペプチドが、SEQ ID NO: 1の位置16に対応する位置にNを有し、SEQ ID NO: 1中に、Rが、存在しており、ポリペプチドが、Hが存在しているSEQ ID NO: 1中の位置18に対応する位置にTまたはSのいずれかを有することを示す。SEQ ID NO: 1中の配列RXH(位置16~18に)が、N結合グリコシル化コンセンサス配列の残基を含まないため、対の置換により、N結合グリコシル化コンセンサス配列が導入される。

【0099】

別の実施形態では、N結合グリコシル化コンセンサス配列をもたらすのに単一アミノ酸置換で、十分である可能性があり、例えば、配列NGD(位置3~5に)が、SEQ ID NO: 1中に存在しているため、TまたはSによるDの単一置換により、それぞれ配列NGTまたはNGSが生成され、ともにN-グリコシル化コンセンサス配列である。

【0100】

10

20

30

40

50

ある特定の場合では、野生型 G D F 1 5 に 1 つ以上の N-グリコシル化コンセンサス配列を導入してよい。例えば、1、2、3、4 つ以上の N-グリコシル化コンセンサス配列をもたらすように、置換および／または欠失によって野生型 G D F 1 5 アミノ酸配列を修飾してよい。ある特定の実施形態では、ポリペプチドが、SEQ ID NO: 1 の 1 1 2 アミノ酸配列と少なくとも 90 % の配列同一性を有する 1 1 2 個の連続するアミノ酸を含んでよく、この 1 1 2 連続アミノ酸は、1、2、3、4 つ以上の N-グリコシル化コンセンサス配列、例えば、1 ~ 1 2、1 ~ 1 0、1 ~ 8、1 ~ 6、1 ~ 4、1 ~ 3、または 1 ~ 2 の N-グリコシル化コンセンサス配列を含む。

【0101】

2 つの N-グリコシル化コンセンサス配列を有するポリペプチドの例としては、位置 5 (SEQ ID NO: 1 に対して) に T / S および位置 2 1 (SEQ ID NO: 1 に対して) に N を有する G D F 1 5 突然変異タンパク質が挙げられる。

【0102】

本開示の例示的なポリペプチドとしては、2 つの以上の N 結合グリコシル化コンセンサス配列を有するポリペプチドが挙げられる。例えば、ポリペプチドは、以下の対の置換の 2 つの以上の組み合わせを含んでよい。

- i) D 5 T および R 2 1 N または D 5 S および R 2 1 N ;
- i i) R 1 6 N および H 1 8 T または R 1 6 N および H 1 8 S ;
- i i i) S 2 3 N および E 2 5 T または S 2 3 N および E 2 5 S ;
- i v) L 2 4 N および D 2 6 T または L 2 4 N および D 2 6 S ;
- v) S 5 0 N および F 5 2 T ; S 5 0 N および F 5 2 S ; F 5 2 N および A 5 4 T ; または F 5 2 N および A 5 4 S ;
- v i) Q 5 1 N および R 5 3 T ; Q 5 1 N および R 5 3 S ; R 5 3 N および A 5 5 T ; または R 5 3 N および A 5 5 S ;
- v i) S 6 4 N および H 6 6 T ; または S 6 4 N および H 6 6 S ;
- v i i) L 6 5 N および R 6 7 T ; または L 6 5 N および R 6 7 S ;
- v i i i) S 8 2 N および N 8 4 T または S 8 2 N および N 8 4 S ;
- i x) K 9 1 N および D 9 3 T ; K 9 1 N および D 9 3 S ; D 9 3 N および G 9 5 T ; または D 9 3 N および G 9 5 S ;
- x) T 9 4 N および V 9 6 T ; T 9 4 N および V 9 6 S ; V 9 6 N および L 9 8 T ; または V 9 6 N および L 9 8 S ;
- x i) S 9 7 N および Q 9 9 T ; または S 9 7 N および Q 9 9 S ; および
- x i i) A 1 0 6 N および D 1 0 8 T または A 1 0 6 N および D 1 0 8 S 。

【0103】

ある特定の実施形態では、ポリペプチドは、SEQ ID NO: 1 のアミノ酸配列と少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または 100 % 同一である連続アミノ酸配列を含んでよく、連続アミノ酸配列は、SEQ ID NO: 1 中の対応するアミノ酸に対して以下の対の少なくとも 1 つの置換を有する。

- i) D 5 T および R 2 1 N または D 5 S および R 2 1 N ;
- i i) R 1 6 N および H 1 8 T または R 1 6 N および H 1 8 S ;
- i i i) S 2 3 N および E 2 5 T または S 2 3 N および E 2 5 S ;
- i v) S 5 0 N および F 5 2 T ; S 5 0 N および F 5 2 S ; F 5 2 N および A 5 4 T ; または F 5 2 N および A 5 4 S ;
- v) Q 5 1 N および R 5 3 T ; Q 5 1 N および R 5 3 S ; R 5 3 N および A 5 5 T ; または R 5 3 N および A 5 5 S ;
- v i) S 6 4 N および H 6 6 T ; または S 6 4 N および H 6 6 S ;
- v i i) K 9 1 N および D 9 3 T ; K 9 1 N および D 9 3 S ; D 9 3 N および G 9 5 T ; または D 9 3 N および G 9 5 S ;
- v i i i) T 9 4 N および V 9 6 T ; T 9 4 N および V 9 6 S ; V 9 6 N および L 9 8 T ; または V 9 6 N および L 9 8 S ;

i x) S 9 7 N および Q 9 9 T ; または S 9 7 N および Q 9 9 S ; および
x) A 1 0 6 N および D 1 0 8 T または A 1 0 6 N および D 1 0 8 S ;

【0104】

置換により、配列 N X S / T を有する 1 つ以上の N 結合グリコシル化コンセンサス部位が生成され、N は、A s n であり；X は、プロリン以外のアミノ酸であり；後に S e r (S) または T h r (T) のいずれかが続き、更に 1 つ以上の N 結合グリコシル化コンセンサス部位は、N-グリカンに結合される。更なる実施形態では、ポリペプチドは、二量体を形成する。更なる実施形態では、ポリペプチドは、S E Q I D N O : 1 に対して N 末端側切断および／または C 末端側切断を有する。切断は、参照ポリペプチド、例えば、S E Q I D N O : 1 に対して 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 以上のアミノ酸としてよい。特定の実施形態では、ポリペプチドは、G D F 1 5 中の最初の 3 つの N 末端側残基の切断 (Δ A R N または Δ N 3) を有する。更なる実施形態では、ポリペプチドは、緩衝溶液中で、少なくとも 0.5 mg / ml、例えば、少なくとも 1 mg / ml、少なくとも 2 mg / ml、少なくとも 3 mg / ml、少なくとも 4 mg / ml、少なくとも 5 mg / ml、少なくとも 8 mg / ml、少なくとも 10 mg / ml、少なくとも 15 mg / ml、少なくとも 20 mg / ml、または少なくとも 25 mg / ml の溶解度、例えば、0.5 mg / ml ~ 25 mg / ml、0.5 mg / ml ~ 20 mg / ml、1 mg / ml ~ 25 mg / ml、1 mg / ml ~ 20 mg / ml、3 mg / ml ~ 25 mg / ml、3 mg / ml ~ 20 mg / ml、5 mg / ml ~ 25 mg / ml、5 mg / ml ~ 20 mg / ml、または 5 mg / ml ~ 18 mg / ml の範囲の溶解度を有する。ある特定の場合では、ポリペプチドは、緩衝溶液中で、少なくとも 0.5 mg / ml、例えば、少なくとも 1 mg / ml、少なくとも 2 mg / ml、少なくとも 3 mg / ml、少なくとも 4 mg / ml、少なくとも 5 mg / ml、少なくとも 8 mg / ml、少なくとも 10 mg / ml、少なくとも 15 mg / ml、少なくとも 20 mg / ml、または少なくとも 25 mg / ml の溶解度、例えば、0.5 mg / ml ~ 25 mg / ml、0.5 mg / ml ~ 20 mg / ml、1 mg / ml ~ 25 mg / ml、1 mg / ml ~ 20 mg / ml、3 mg / ml ~ 25 mg / ml、3 mg / ml ~ 20 mg / ml、5 mg / ml ~ 25 mg / ml、5 mg / ml ~ 20 mg / ml、または 5 mg / ml ~ 18 mg / ml の範囲の溶解度を有する。緩衝剤は、リン酸緩衝剤、トリス緩衝剤、H E P E S 緩衝剤、M O P S 緩衝剤、P I P E S 緩衝剤など、またはこれらの組み合わせとしてよい。ある特定の場合では、緩衝剤は、リン酸緩衝生理食塩水を含んでよい。ある特定の場合では、緩衝剤は、トリス、リン酸カリウムおよび塩化ナトリウムを含んでよい。いくつかの場合では、緩衝剤は、トリス、リン酸カリウム、塩化ナトリウム、およびギ酸を含んでよい。例えば、緩衝剤は、10 mM ~ 100 mM トリス pH 7、1 mM ~ 50 mM リン酸カリウム、100 mM ~ 200 mM 塩化ナトリウム、および 10 mM / cm ~ 30 mM / cm ギ酸を含んでよい。更なる実施形態では、ポリペプチドは、ポリペプチドの投与前と比較して少なくとも 10%、20%、30%、50%、60%、70%、80%、または 90% 血中グルコースレベル、体重、および／または食物摂取を減少させる。

【0105】

ある特定の実施形態では、ポリペプチドは、S E Q I D N O : 1 のアミノ酸配列と少なくとも 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または 100% 同一である連続アミノ酸配列を含んでよく、連続アミノ酸配列は、S E Q I D N O : 1 中の対応するアミノ酸に対して以下の対の少なくとも 1 つの置換を有する。

- i) D 5 T および R 2 1 N ;
- i i) S 2 3 N および E 2 5 T ;
- i i i) F 5 2 N および A 5 4 T ;
- i v) R 5 3 N および A 5 5 T ;
- v) S 6 4 N および H 6 6 T ;
- v i) K 9 1 N および D 9 3 T ;
- v i i) D 9 3 N および G 9 5 T ;

v i i i) S 9 7 N および Q 9 9 T ; および
i x) A 1 0 6 N および D 1 0 8 T ;

【0106】

置換により、配列 N X S / T を有する 1 つ以上の N 結合グリコシル化コンセンサス部位が生成され、N は、A s n であり；X は、プロリン以外のアミノ酸であり；後に S e r (S) または T h r (T) のいずれかが続き、更に、1 つ以上の N 結合グリコシル化コンセンサス部位は、N-グリカンに結合される。更なる実施形態では、ポリペプチドが、二量体を形成する。更なる実施形態では、ポリペプチドは、S E Q I D N O : 1 に対して N 末端側切断および / または C 末端側切断を有する。切断は、参照ポリペプチド、例えば、S E Q I D N O : 1 に対して 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 以上のアミノ酸としてよい。特定の実施形態では、ポリペプチドは、G D F 1 5 中の最初の 3 つの N 末端側残基の切断 (Δ A R N または Δ N 3) を有する。更なる実施形態では、ポリペプチドは、緩衝溶液中で、少なくとも 0. 5 m g / m l、例えば、少なくとも 1 m g / m l、少なくとも 2 m g / m l、少なくとも 3 m g / m l、少なくとも 4 m g / m l、少なくとも 5 m g / m l、少なくとも 8 m g / m l、少なくとも 10 m g / m l、少なくとも 15 m g / m l、少なくとも 20 m g / m l、または少なくとも 25 m g / m l の溶解度、例えば、0. 5 m g / m l ~ 25 m g / m l、0. 5 m g / m l ~ 20 m g / m l、1 m g / m l ~ 25 m g / m l、1 m g / m l ~ 20 m g / m l、3 m g / m l ~ 25 m g / m l、3 m g / m l ~ 20 m g / m l、5 m g / m l ~ 25 m g / m l、5 m g / m l ~ 20 m g / m l、または 5 m g / m l ~ 18 m g / m l の範囲の溶解度を有する。ある特定の場合では、ポリペプチドは、緩衝溶液中で、少なくとも 0. 5 m g / m l、例えば、少なくとも 1 m g / m l、少なくとも 2 m g / m l、少なくとも 3 m g / m l、少なくとも 4 m g / m l、少なくとも 5 m g / m l、少なくとも 8 m g / m l、少なくとも 10 m g / m l、少なくとも 15 m g / m l、少なくとも 20 m g / m l、または少なくとも 25 m g / m l の溶解度、例えば、0. 5 m g / m l ~ 25 m g / m l、0. 5 m g / m l ~ 20 m g / m l、1 m g / m l ~ 25 m g / m l、1 m g / m l ~ 20 m g / m l、3 m g / m l ~ 25 m g / m l、3 m g / m l ~ 20 m g / m l、5 m g / m l ~ 25 m g / m l、5 m g / m l ~ 20 m g / m l、または 5 m g / m l ~ 18 m g / m l の範囲の溶解度を有する。緩衝剤は、リン酸緩衝剤、トリス緩衝剤、H E P E S 緩衝剤、M O P S 緩衝剤、P I P E S 緩衝剤など、またはこれらの組み合わせとしてよい。ある特定の場合では、緩衝剤は、リン酸緩衝生理食塩水を含んでよい。ある特定の場合では、緩衝剤は、トリス、リン酸カリウムおよび塩化ナトリウムを含んでよい。いくつかの場合では、緩衝剤は、トリス、リン酸カリウム、塩化ナトリウム、およびギ酸を含んでよい。例えば、緩衝剤は、10 m M ~ 100 m M トリス p H 7、1 m M ~ 50 m M リン酸カリウム、100 m M ~ 200 m M 塩化ナトリウム、および 10 m S / c m ~ 30 m S / c m ギ酸を含んでよい。更なる実施形態では、ポリペプチドは、ポリペプチドの投与前と比較して少なくとも 10 %、20 %、30 %、50 %、60 %、70 %、80 %、または 90 % 血中グルコースレベル、体重、および / または食物摂取を減少させる。特定の実施形態では、ポリペプチドは、S E Q I D N O : 2、S E Q I D N O : 4、S E Q I D N O : 8、S E Q I D N O : 9、S E Q I D N O : 10、S E Q I D N O : 13、S E Q I D N O : 14、S E Q I D N O : 17、S E Q I D N O : 18 または S E Q I D N O : 30 を含む、または本質的にこれらからなる。特定の実施形態では、ポリペプチドは、S E Q I D N O : 81、S E Q I D N O : 83、S E Q I D N O : 87、S E Q I D N O : 88、S E Q I D N O : 89、S E Q I D N O : 92、S E Q I D N O : 93、S E Q I D N O : 96、S E Q I D N O : 97 または S E Q I D N O : 100 を含む、または本質的にこれらからなる。ある特定の実施形態では、ポリペプチドは、S E Q I D N O : 1 のアミノ酸配列と少なくとも 95 % 同一である連続アミノ酸配列を含んでよく、連続アミノ酸配列は、S E Q I D N O : 1 中の対応するアミノ酸に対して以下の対の少なくとも 1 つの置換を有する。

10

20

30

40

50

- i) D 5 T および R 2 1 N ;
- i i) S 6 4 N および H 6 6 T ;
- i i i) K 9 1 N および D 9 3 T ;
- i v) D 9 3 N および G 9 5 T ; および

v) S 9 7 N および Q 9 9 T ; 置換により、配列 N X S / T を有する 1 つ以上の N 結合グリコシル化コンセンサス部位が生成され、N は、A s n であり；X は、プロリン以外のアミノ酸であり；後に S e r (S) または T h r (T) のいずれかが続き、1 つ以上の N 結合グリコシル化コンセンサス部位は、N-グリカンに結合される；更に、ポリペプチドは、二量体を形成し；更に、ポリペプチドは、ポリペプチド中に緩衝溶液中で少なくとも 1 m g / m l の溶解度を有する。

10

【0107】

更なる実施形態では、ポリペプチドは、緩衝溶液中で少なくとも 5 m g / m l の溶解度を有する。緩衝剤は、リン酸緩衝剤、トリス緩衝剤、H E P E S 緩衝剤、M O P S 緩衝剤、P I P E S 緩衝剤など、またはこれらの組み合わせとしてよい。ある特定の場合では、緩衝剤は、リン酸緩衝生理食塩水を含んでよい。ある特定の場合では、緩衝剤は、トリス、リン酸カリウムおよび塩化ナトリウムを含んでよい。いくつかの場合では、緩衝剤は、トリス、リン酸カリウム、塩化ナトリウム、およびギ酸を含んでよい。例えば、緩衝剤は、10 mM ~ 100 mM トリス pH 7、1 mM ~ 50 mM リン酸カリウム、100 mM ~ 200 mM 塩化ナトリウム、および 10 mM / cm ~ 30 mM / cm ギ酸を含んでよい。更なる実施形態では、ポリペプチドは、ポリペプチドの投与前と比較して少なくとも 10 %、20 %、30 %、50 %、60 %、70 %、80 %、または 90 % 血中グルコースレベル、体重、および / または食物摂取を減少させる。更なる実施形態では、ポリペプチドは、S E Q I D N O : 1 に対して N 末端側切断および / または C 末端側切断を有する。切断は、参照ポリペプチド、例えば、S E Q I D N O : 1 に対して 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 以上のアミノ酸としてよい。特定の実施形態では、ポリペプチドは、G D F 1 5 中の最初の 3 つの N 末端側残基の切断 (Δ A R N または Δ N 3) を有する。特定の実施形態では、ポリペプチドが、S E Q I D N O : 2、S E Q I D N O : 10、S E Q I D N O : 13、S E Q I D N O : 14、S E Q I D N O : 17 または S E Q I D N O : 30 を含む、または本質的にこれらからなる。特定の実施形態では、ポリペプチドが、S E Q I D N O : 81、S E Q I D N O : 89、S E Q I D N O : 92、S E Q I D N O : 93、S E Q I D N O : 96 または S E Q I D N O : 100 を含む、または本質的にこれらからなる。

20

30

【0108】

ある特定の実施形態では、ポリペプチドは、S E Q I D N O : 1 の 112 アミノ酸配列と少なくとも 90 % の配列同一性を有する 112 個の連続するアミノ酸を含んでよく、この 112 連続アミノ酸は、上に記載の 1、2、3、4 つ以上の対の置換を含む。

【0109】

図 1 は、野生型成熟ヒト G D F 1 5 (W T h G D F 1 5 ; S E Q I D N O : 1) のアミノ酸配列と整列させた本開示で企図される例示的なポリペプチド (1 ~ 17 とナンバリングした) のアミノ酸配列を示す。図 1 に、2 つの N 結合グリコシル化コンセンサス部位 (1 とナンバリングした突然変異体 ; S E Q I D N O : 2) を含むポリペプチドならびに 1 つの N 結合グリコシル化コンセンサス部位 (2 ~ 17 とナンバリングした突然変異体 ; それぞれ、S E Q I D N O : 3 ~ 18) を含むポリペプチドが示されている。

40

【0110】

ある特定の実施形態では、本開示は、修飾 G D F 1 5 N-グリコシル化二量体を企図し、前記二量体は、互いに共有結合した本明細書に開示された 2 つのポリペプチドを含む。特定の実施形態では、2 つのポリペプチドそれぞれが、S E Q I D N O : 2、S E Q I D N O : 4、S E Q I D N O : 8、S E Q I D N O : 9、S E Q I D

50

NO:10、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18またはSEQ ID NO:30または5個までのアミノ酸が異なるアミノ酸から選択されるアミノ酸配列を含み；前記ポリペプチドは、N-グリコシル化されている少なくとも1つのN-グリコシル化部位を含有する。特定の実施形態では、2つのポリペプチドそれぞれが、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18またはSEQ ID NO:30または2個までのアミノ酸が異なるアミノ酸から選択されるアミノ酸配列を含み；前記ポリペプチドは、N-グリコシル化されている少なくとも1つのN-グリコシル化部位を含有する。特定の実施形態では、2つのポリペプチドそれぞれが、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:96、SEQ ID NO:97またはSEQ ID NO:100または5個までのアミノ酸が異なるアミノ酸から選択されるアミノ酸配列からなり；前記ポリペプチドは、N-グリコシル化されている少なくとも1つのN-グリコシル化部位を含有する。特定の実施形態では、2つのポリペプチドそれぞれが、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:96、SEQ ID NO:97またはSEQ ID NO:100または2個までのアミノ酸が異なるアミノ酸から選択されるアミノ酸配列からなり；前記ポリペプチドは、N-グリコシル化されている少なくとも1つのN-グリコシル化部位を含有する。更なる実施形態では、修飾GDF15N-グリコシル化二量体が、鎖間ジスルフィド結合によって結合されたホモ二量体である。更なる実施形態では、修飾GDF15N-グリコシル化二量体が、それぞれ同じアミノ酸配列を含む開示された本明細書に開示されたとおりの2つのポリペプチドを有するホモ二量体であり、前記ポリペプチドは、N-グリコシル化されている少なくとも1つのN-グリコシル化部位を含有する。

【0111】

本開示は、また、上記ポリペプチドの活性フラグメント（例えば、サブ配列）であるポリペプチドを企図する。活性フラグメントまたはサブ配列の長さは、40アミノ酸～111アミノ酸、例えば、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、98、106、109、または111アミノ酸までとしてよい。

【0112】

ポリペプチドは、連続アミノ酸の定義された長さ（例えば、「比較ウィンドウ」）について参照配列と比較して定義された配列同一性を有する。比較のための配列のアラインメントの方法が、当技術分野によく知られている。例えば、Smith&Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981)の局地的相同性アルゴリズムによって、Needleman&Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970)の相同性アラインメントアルゴリズムによって、Pearson&Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988)の類似性の調査法によって、これらのアルゴリズム (Wisconsin Genetics Software Package, Madison, Wis. のGAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTA)のコンピュータによる実行によって、または手動アラインメントおよび目視検査によって（例えば、Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds. 1995 supplement)を参照）、比較のための配列の最適なアラインメントを実施することができる。

【0113】

1つの例として、好適なポリペプチドは、SEQ ID NO:1中の40、45、50、55、60、65、70、75、80、85または112個のアミノ酸までの連続す

る範囲と少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%、アミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むことができる。

【0114】

本明細書に開示されたポリペプチドの例示的なフラグメントが、SEQ ID NO: 1に対してアミノ酸の欠失を有するポリペプチドを含む。例えば、ポリペプチドが、SEQ ID NO: 1に対してN末端側切断および／またはC末端側切断を有してよい。切断は、参照ポリペプチド、例えば、SEQ ID NO: 1に対して1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14以上のアミノ酸としてよい。ある特定の実施形態では、目的のポリペプチドが、N結合グリコシル化コンセンサス配列、例えば、本明細書に開示されたもの、およびSEQ ID NO: 1に対してN末端側切断および／またはC末端側切断を導入する1つ以上の置換を含んでよい。

10

【0115】

ある特定の実施形態では、ポリペプチドが、少なくとも98アミノ酸長としてよく、SEQ ID NO: 1中の98アミノ酸の対応する一続きと少なくとも90%のアミノ酸配列同一性を有してよい。このポリペプチドは、SEQ ID NO: 1のC末端に存在しているアミノ酸は保持しながら、SEQ ID NO: 1のN末端に存在している最初の3個から最初の14個のアミノ酸（例えば、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、または14アミノ酸）を欠いていてよい。換言すれば、欠失したアミノ酸（複数可）は、SEQ ID NO: 1のN末端アミノ酸に対応する。

20

【0116】

ある特定の実施形態では、GDF15突然変異タンパク質が、少なくとも106アミノ酸長としてよく、SEQ ID NO: 1中の106アミノ酸の対応する一続きと少なくとも90%のアミノ酸配列同一性を有してよい。GDF15突然変異タンパク質は、SEQ ID NO: 1のN末端に存在している最初の6個のアミノ酸を欠いていてよい。

【0117】

ある特定の実施形態では、ポリペプチドが、少なくとも109アミノ酸長としてよく、SEQ ID NO: 1中の109アミノ酸の対応する一続きと少なくとも90%のアミノ酸配列同一性を有してよい。GDF15突然変異タンパク質は、SEQ ID NO: 1のN末端に存在している最初の3個のアミノ酸を欠いていてよい。

30

【0118】

本開示の例示的なポリペプチドが、図2に示されている。図1に示された例示的なポリペプチド（1～17とナンバリングした）は、WT hGDF15と同じ長さである。図2に示された例示的なポリペプチド（18～34とナンバリングした；SEQ ID NO: 19～35）は、WT hGDF15に対して3つのN末端側アミノ酸の欠失（ΔN3）を含むため長さ109のアミノ酸である。しかし、アミノ酸置換の位置を指す場合、示された残基番号は、WT成熟hGDF15（WT；SEQ ID NO: 1）の位置に対応するものである。したがって、ポリペプチドのN末端のアミノ酸Gは、ポリペプチドアミノ酸配列中の第1のアミノ酸であるが、残基4と称される。

【0119】

上述のとおり、これらのポリペプチドフラグメントは、SEQ ID NO: 1の配列に対してN-グリコシル化コンセンサス配列、例えば、1つ、2つ、またはそれ以上の本明細書に開示されたアミノ酸置換を導入する1つ以上のアミノ酸置換を含んでよい。

40

【0120】

上に示したとおり、および以下に更に詳細に記載したとおり、本開示のポリペプチドは、例えば、ペグ化（ポリエチレングリコール（PEG）、またはこれらの誘導体の1つ以上の分子の共有結合）；グリコシル化（例えば、N-グリコシル化）；ポリシアル化；血清アルブミン（例えば、ヒト血清アルブミン（HSA）、カニクイザル血清アルブミン、またはウシ血清アルブミン（BSA））を含むアルブミン融合分子；例えば、コンジュゲート脂肪酸鎖（アシル化）によるアルブミン結合；Fc融合；およびPEGミメティック

50

との融合によって修飾してよい。ある特定の実施形態では、修飾は、部位特異的な方法で導入される。他の実施形態では、修飾は、リンカーを含む。リンカーは、修飾部分をポリペプチドにコンジュゲートしてよい。

【0121】

特定の実施形態では、本開示は、アルブミンとのコンジュゲートによる成熟ヒト G D F 1 5 および G D F 1 5 突然変異タンパク質（例えば、上記ポリペプチド）の修飾を企図する。他の実施形態では、本開示は、N-グリコシル化またはO-グリコシル化によるポリペプチドの修飾を企図する。アルブミンおよびこれらのポリペプチドコンジュゲート（例えば、融合タンパク質）、およびグリコシル化ポリペプチドの特性が、更に以下に記載されている。

10

【0122】

G D F 1 5 機能を修飾するおよび／または模倣するための特定の修飾

ポリペプチドは、治療法のために製剤化されたタンパク質に好適な特性（例えば、血清半減期）を向上させる修飾、検出アッセイに用いられる抗体（例えば、エピトープタグ）の生成を可能にする修飾、タンパク質精製を容易にする修飾等の1つ以上の修飾を含むことができる。かかる修飾としては、ペグ化（ポリエチレングリコール（P E G）、またはこれらの誘導体の1つ以上の分子の共有結合）；グリコシル化（N-およびO-結合）；ポリシアル化；アルブミン融合；コンジュゲート脂肪酸鎖（アシル化）によるアルブミン結合；F c 融合タンパク質；およびP E G ミメティックとの融合が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0123】

本明細書に記載したとおり、本開示は、成熟 G D F 1 5 ポリペプチド（例えば、成熟ヒト G D F 1 5）または G D F 1 5 突然変異タンパク質ポリペプチド（例えば、成熟ヒト G D F 1 5 の突然変異タンパク質）を含む融合分子を企図し、成熟 G D F 1 5 ポリペプチドまたは G D F 1 5 突然変異タンパク質ポリペプチドは、そのアミノ酸配列を変化させない少なくとも1つの修飾を含み、当該修飾は、ポリペプチドまたは突然変異タンパク質ポリペプチドの少なくとも1つの物理的特性を改善する。1つの実施形態では、G D F 1 5 ポリペプチドまたは G D F 1 5 突然変異タンパク質ポリペプチド修飾は、血清アルブミン（例えば、ヒト血清アルブミン（H S A）、カニクイザル血清アルブミン、またはウシ血清アルブミン（B S A））とのコンジュゲートを含む。いくつかの実施形態では、物理的特性は、溶解度である。

30

【0124】

融合分子が修飾 G D F 1 5 ポリペプチドまたは G D F 1 5 突然変異タンパク質（例えば、上に開示したポリペプチド）を含む実施形態では、いずれかがアルブミンにコンジュゲートされ、融合分子の溶解度が、一般に非コンジュゲート組換えヒト G D F 1 5 と比較して改善される。ある特定の実施形態では、融合分子は、p H 7 . 0 のリン酸緩衝生理食塩水（P B S）中で少なくとも1 m g / m L の溶解度を有する。他の実施形態では、融合分子は、少なくとも2 m g / m L、少なくとも3 m g / m L、少なくとも4 m g / m L、または少なくとも5 m g / m L の溶解度を有する。他の実施形態では、融合分子は、p H 7 . 0 のリン酸緩衝生理食塩水（P B S）中で、少なくとも6 m g / m L、少なくとも7 m g / m L、少なくとも8 m g / m L、少なくとも9 m g / m L、または少なくとも10 m g / m L の溶解度を有する。特定の実施形態では、融合分子は、10 m g / m L 超の溶解度を有する。

40

【0125】

ペグ化：タンパク質治療薬の臨床的効果が、短い血漿半減期およびプロテアーゼ分解への感受性によって制限されることが多い。さまざまな治療用タンパク質（例えば、フィルグラスチム）の試験では、かかる困難が、ポリペプチド配列をさまざまな非タンパク質ポリマーのいずれか、例えば、ポリエチレングリコール（P E G）、ポリプロピレングリコール、またはポリオキシアルキレンにコンジュゲートまたは結合させること（例えば、典型的には、タンパク質および非タンパク質ポリマー、例えば、P E G の両方に共有結合し

50

た結合部分を介することを参照)を含むさまざまな修飾によって克服される可能性があることを示した。かかるPEGコンジュゲート生体分子が、物理的および熱安定度の良さ、酵素的分解への感受性に対する保護、溶解度の増大、*in vivo*循環半減期の延長およびクリアランスの低下、免疫原性および抗原性の減少、および毒性の低下を含む臨床的に有用な特性を保持することを示している。

【0126】

ポリペプチド配列へのコンジュゲートに好適なPEGは、一般に室温で水中で溶解し、一般式 $R(O-CH_2-CH_2)_nO-R$ を有し、Rは、水素または保護基、例えば、アルキルまたはアルカノール基であり、nは、1~1000の整数である。Rが保護基である場合、一般に1~8個の炭素を有する。ポリペプチド配列にコンジュゲートされたPEGは、直鎖または分枝鎖とすることができる。分枝鎖PEG誘導体、「star-PEG」およびマルチアーム型PEGが、本開示によって企図される。本開示で用いられるPEGの分子量は、特定の範囲に制限されるものではないが、ある特定の実施形態では、分子量が500~20,000であり、他の実施形態では、分子量は、4,000~10,000である。

【0127】

本開示は、また、PEGが、異なるn値を有し、このため、さまざまな異なるPEGが、特定の割合で存在しているコンジュゲート組成物を企図する。例えば、いくつかの組成物が、n=1、2、3および4のコンジュゲート混合物を含む。いくつかの組成物では、n=1の場合、コンジュゲートのパーセンテージは18~25%であり、n=2の場合、コンジュゲートのパーセンテージは50~66%であり、n=3の場合、コンジュゲートのパーセンテージは12~16%であり、n=4の場合、コンジュゲートのパーセンテージは5%までである。当技術分野で知られる反応条件および精製方法によってかかる組成物を生成することができる。例えば、コンジュゲートを分離するのに陽イオン交換クロマトグラフィーを用いてよく、そうすると、フラクションが、例えば、所望の数の結合されるPEGを有する、精製されて非修飾タンパク質配列および他の数の結合されるPEGを有するコンジュゲートのないコンジュゲートを含有することが確認される。

【0128】

末端反応基を介して、PEGを本開示のポリペプチドに結合させてよい。末端反応基が、1つ以上のポリペプチド配列およびポリエチレングリコールの遊離アミノまたはカルボキシル基間の結合を媒介してよい。末端反応基を別個の長さのポリエチレングリコールスパーサーに結合させてよい。これらのPEGスパーサーは、非PEGスパーサーと比較して試薬およびコンジュゲート溶解度を増大させ、毒性作用および免疫学的作用を最小化し、PEGおよびポリペプチド間の特定の距離を適応させるためのいくつかのオプションをもたらす。反応基との例示的なPEGスパーサーとしては、アミン-反応ペグ化架橋剤(例えば、ビス(スクシンイミジル)ペンタ(エチレングリコール)(BS(PEG)₅))；スルフヒドリル-反応ペグ化架橋剤(1,11-ビスマレイミドトリエチレングリコール(BM(PEG)₃))；二官能性ペグ化架橋剤(NHS-PEGn-マレイミドスクシンイミジル-[N-マレイミドプロピオンアミド]-エチレングリコール)エステル(SM(PEG)n)；n=2~24)が挙げられる。PEGスパーサーを遊離アミノ基に結合させてよい。PEGスパーサーは、N-ヒドロキシスクシニルイミドでポリエチレングリコールのコハク酸エステルを活性化することによって調製してよいN-ヒドロキシスクシニルイミドポリエチレングリコールを含む。遊離アミノ基に結合させてよいもう1つの活性化ポリエチレングリコールが、塩化シアヌルとポリエチレングリコールモノメチルエーテルを反応させることによって調製してよい2,4-ビス(O-メトキシポリエチレングリコール)-6-クロロ-s-トリアジンである。遊離カルボキシル基に結合される活性化ポリエチレングリコールが、ポリオキシエチレンジアミンを含む。

【0129】

さまざまな従来の方法によって、1つ以上の本開示のポリペプチド配列のスパーサーを有するPEGへのコンジュゲートを実施してよい。例えば、pH5~10の溶液中で、4

℃～室温の温度で、30分間～20時間、試薬とタンパク質とのモル比4：1～30：1を用いてコンジュゲート反応を実施することができる。主として所望の程度の置換を生じるように反応を向けるために反応条件を選択してよい。一般に、低温度、低pH（例えば、pH＝5）、および短い反応時間では、結合されるPEGの数を減少させる傾向があるが、高温、中性～高pH（例えば、pH≥7）、および長い反応時間では、結合されるPEGの数を増大させる傾向がある。反応を終了させるために当技術分野で知られるさまざまな手段を用いてよい。いくつかの実施形態では、反応混合物を酸性化し、例えば、－20℃で凍結することによって反応を終了させる。

【0130】

本開示は、また、PEGミメティックの使用を企図する。いくつかの追加の有利な特性を与えながら、PEGの特質（例えば、血清半減期の向上）を保持する組換えPEGミメティックが開発された。例えば、目的のペプチドまたはタンパク質薬剤にあらかじめ融合されたPEGとほぼ同じ伸長配座を形成することができる単純ポリペプチド鎖（例えば、Ala、Glu、Gly、Pro、SerおよびThrを含む）を組換えで生成することができる（例えば、AmunixのXTEN技術；Mountain View, CA）。これは、製造工程中の追加のコンジュゲートステップを不要にする。更に、分子生物学技術の確立により、ポリペプチド鎖の側鎖組成の制御が可能になり、免疫原性および製造特性が最適化される。

【0131】

グリコシル化：本開示の目的のため、「グリコシル化」は、グリカンタンパク質、脂質または他の有機分子に結合させる酵素的プロセスを広く指すことを意味する。本開示と関連して「グリコシル化」という用語の使用は、一般に1つ以上の糖質部分を（基礎をなすグリコシル化部位を除去することによって、または化学的および／または酵素的手段によりグリコシル化をなくすことによって）付加または欠失すること、および／または未変性配列に存在してよい、または存在しなくてよい1つ以上のグリコシル化部位を付加することを意味することを意図する。また、当該語句は、存在しているさまざまな糖質部分の性質および割合の変化に関係する未変性タンパク質のグリコシル化の質的变化を含む。

【0132】

グリコシル化は、劇的にタンパク質の物理的特性に影響を及ぼすことができ、また、タンパク質安定度、分泌、および細胞下局在化に重要である可能性がある。確かに、本明細書に記載されたGDF15突然変異タンパク質ポリペプチドのグリコシル化は、その物理的特性に有益な改善をもたらす。例えば、これらに限定されないが、グリコシル化によってGDF15突然変異タンパク質の溶解度を改善させることができ、かかる改善が、重要である可能性がある（実施例を参照）。本明細書に記載されたグリコシル化GDF15突然変異タンパク質ポリペプチドは、グリコシル化されていない野生型GDF15と比較して高い溶解度を有する。ある特定の実施形態では、本明細書に開示されたグリコシル化GDF15突然変異タンパク質は、緩衝溶液中で、少なくとも0.5mg/ml、例えば、少なくとも1mg/ml、少なくとも2mg/ml、少なくとも3mg/ml、少なくとも4mg/ml、少なくとも5mg/ml、少なくとも8mg/ml、少なくとも10mg/ml、少なくとも15mg/ml、少なくとも20mg/ml、または少なくとも25mg/mlの溶解度、例えば、0.5mg/ml～25mg/ml、0.5mg/ml～20mg/ml、1mg/ml～25mg/ml、1mg/ml～20mg/ml、3mg/ml～25mg/ml、3mg/ml～20mg/ml、5mg/ml～25mg/ml、5mg/ml～20mg/ml、または5mg/ml～18mg/mlの範囲の溶解度を有する。ある特定の場合では、本明細書に開示されたグリコシル化GDF15突然変異タンパク質は、緩衝溶液中で、少なくとも0.5mg/ml、例えば、少なくとも1mg/ml、少なくとも2mg/ml、少なくとも3mg/ml、少なくとも4mg/ml、少なくとも5mg/ml、少なくとも8mg/ml、少なくとも10mg/ml、少なくとも15mg/ml、少なくとも20mg/ml、または少なくとも25mg/mlの溶解度、例えば、0.5mg/ml～25mg/ml、0.5mg/ml～20mg/ml

／m l、1 m g／m l～2 5 m g／m l、1 m g／m l～2 0 m g／m l、3 m g／m l
～2 5 m g／m l、3 m g／m l～2 0 m g／m l、5 m g／m l～2 5 m g／m l、5
m g／m l～2 0 m g／m l、または5 m g／m l～1 8 m g／m lの範囲の溶解度を有
してよい。緩衝剤は、リン酸緩衝剤、トリス緩衝剤、H E P E S緩衝剤、M O P S緩衝剤
、P I P E S緩衝剤など、またはこれらの組み合わせとしてよい。ある特定の場合では、
緩衝剤は、リン酸緩衝生理食塩水を含んでよい。ある特定の場合では、緩衝剤は、トリス
、リン酸カリウムおよび塩化ナトリウムを含んでよい。いくつかの場合では、緩衝剤は、
トリス、リン酸カリウム、塩化ナトリウム、およびギ酸を含んでよい。例えば、緩衝剤は
、1 0 m M－1 0 0 m Mトリスp H 7、1 m M－5 0 m Mリン酸カリウム、1 0 0 m M－
2 0 0 m M塩化ナトリウム、および1 0 m S／c m－3 0 m S／c mギ酸を含んでよい。

10

【0133】

本明細書に開示されたグリコシル化G D F 1 5突然変異タンパク質ポリペプチドは、野
生型成熟G D F 1 5ポリペプチドより優れている。これらのグリコシル化G D F 1 5突然
変異タンパク質ポリペプチドは、野生型成熟G D F 1 5ポリペプチドと比較して、これら
に限定されないが以下の1つ以上を含む改善した特性を有する：細胞培養中の収率が大き
い、二量体形成の改善、溶解度が大きい、および免疫原性の低下。かかる修飾G D F 1 5
突然変異タンパク質によって示される溶解度の改善により、例えば、非グリコシル化G D
F 1 5／G D F 1 5突然変異タンパク質より医薬投与に好適な製剤を生成することができ
る。グリコシル化G D F 1 5／G D F 1 5突然変異タンパク質ポリペプチドは、また、安
定度の向上を示す可能性がある。更に、ポリペプチドは、1つ以上の薬物動態学的特性、
例えば、半減期を改善する可能性がある。

20

【0134】

上記のとおり、アミノ酸配列を変化させることによって、グリコシル化部位の付加を実
施することができる。例えば、1つ以上のセリンもしくはトレオニン残基（O－結合グリ
コシル化部位の）またはアスパラギン残基（N結合グリコシル化部位の）による付加また
は置換によってポリペプチドを変化させてよい。N結合およびO－結合オリゴ糖ならびに
糖残基のそれぞれの型にみられる構造は、異なる可能性がある。通常、両者に通常みられ
る糖の1つの型が、N－アセチルノイラミン酸（以下、シアル酸と称する）である。シアル
酸は、通常、N結合およびO－結合オリゴ糖の両者の末端側残基であり、その陰電荷によ
って、糖タンパク質に酸性特性が与えられる可能性がある。本開示の特定の実施形態で
は、上記のとおり、N－グリコシル化変異体の生成および使用を含む。

30

【0135】

ポリペプチドの糖質部分の数を増大するもう1つの手段が、グリコシドのポリペプチド
への化学的または酵素的カップリングである。

【0136】

ジヒドロ葉酸レダクターゼ（D H F R）欠損チャイニーズハムスター卵巣（C H O）細
胞が、組換え糖タンパク質の生成のために一般に用いられる宿主細胞である。これらの細
胞は、酵素β－ガラクトシドα－2，6－シアルルトランスフェラーゼを発現せず、この
ため、これらの細胞中に生成される糖タンパク質のN結合オリゴ糖へのα－2，6結合中
のシアル酸を添加しない。

40

【0137】

ポリシアル化：本開示は、また、ペプチドおよびタンパク質の安定度およびi n v i
v o薬物動態を改善するために、ポリシアル化の使用、天然生分解性α－（2→8）結合
ポリシアル酸（「P S A」）へのペプチドおよびタンパク質のコンジュゲートを企図する
。P S Aは、親水性が高い生分解性の非毒性天然ポリマーであり、その血清半減期を増大
させる血中の高い見かけの分子量を与える。また、さまざまなペプチドおよびタンパク質
治療薬のポリシアル化により、明らかに、プロテオリシスの低下、i n v i v o活性の
保持、ならびに免疫原性および抗原性の減少となっている（例えば、G . G r e g o r i
a d i s e t a l . , I n t . J . P h a r m a c e u t i c s 3 0 0 （1－2）
：1 2 5－3 0を参照）。他のコンジュゲート（例えば、P E G）による修飾と同様に、

50

部位特異的なポリシアル化のさまざまな技術が利用可能である（例えば、T L i n d h o u t e t a l . , P N A S 1 0 8 (1 8) 7 3 9 7 - 7 4 0 2 (2 0 1 1) を参照）。

【0138】

融合タンパク質。本開示は、野生型成熟G D F 1 5（例えば、ヒトG D F 1 5）の融合タンパク質、ならびに本開示のポリペプチドの融合タンパク質（例えば、修飾ヒトG D F 1 5分子、ヒトG D F 1 5の突然変異タンパク質、修飾G D F 1 5突然変異タンパク質など）を企図する。かかる融合タンパク質は、一般に非G D F 1 5ポリペプチド（例えば、アルブミン（例えば、H S A）またはこれらのフラグメント：アルブミン結合ドメイン（A B D）；F cポリペプチド；マルトース結合ドメイン（M B D））からなり、本開示の野生型G D F 1 5ポリペプチドまたはポリペプチドにそのN末端またはC末端でコンジュゲートされる「融合パートナー」と本明細書で称してよい。任意で、融合パートナーは、リンカーポリペプチドを介して野生型G D F 1 5またはポリペプチドにコンジュゲートしてよい。リンカーポリペプチドは、任意で開裂可能リンカー、例えば、酵素的開裂可能リンカーとしてよい。融合パートナーの例が、以下に記載されている。

10

【0139】

アルブミン融合：コンジュゲートの好適な融合パートナーとしては、アルブミン、例えば、ヒト血清アルブミン（H S A）、カニクイザル血清アルブミン、およびウシ血清アルブミン（B S A）が挙げられる。

【0140】

成熟H S A、585アミノ酸ポリペプチド（約67kDa）は、血清半減期が約20日であり、主にコロイド浸透血圧、血中pHの維持ならびに多くの内因性および外因性リガンドの輸送および分配を担う。タンパク質は、3つの構造的に相同なドメイン（ドメインI、IIおよびIII）を有し、ほとんど全体が、 α -ヘリックス配座にあり、17ジスルフィド架橋によって極めて安定化されている。アルブミンの3つの一次薬剤結合領域が、サブドメインIB、IIAおよびIIIA内の3つのドメインそれぞれの上に位置している。

20

【0141】

アルブミン合成は、肝臓中で行われ、短命の一次生成物プレプロアルブミンを生成する。したがって、完全長H S Aは、18アミノ酸に6アミノ酸のプロドメインが続くシグナルペプチドを有する；この24アミノ酸残基ペプチドは、プレプロドメインと称してよい。H S Aを、その内因性シグナルペプチドをプレプロドメインとして用いて発現および分泌することができる。代わりに、成熟H S Aに融合されたIgKシグナルペプチドを用いて、H S Aを発現および分泌することができる。プレプロアルブミンは、そのアミノ末端の小胞体内腔中で、急速に翻訳と共役して切断され、安定した609アミノ酸前駆体ポリペプチド、プロアルブミンを生成する。プロアルブミンは、その後、ゴルジ体に進み、フーリン依存性アミノ末端側開裂によって585アミノ酸成熟アルブミンに変換される。別途特に指示がない限り、「アルブミン」または「成熟アルブミン」は、H S Aを指す。

30

【0142】

アルブミンの一次アミノ酸配列、構造、および機能は、アルブミン合成および分泌のプロセスと同様に、種を越えて高度に保存される。H S Aと同等のアルブミン血清タンパク質が、例えば、カニクイザル、ウシ、イヌ、ウサギおよびラットにみられる。非ヒト種、ウシ血清アルブミン（B S A）のものが、H S Aと最も構造的にほぼ同じである。[例えば、K o s a e t a l . , J P h a r m S c i . 9 6 (1 1) : 3 1 1 7 - 2 4 (N o v 2 0 0 7) を参照]。本開示は、例えば、G D F 1 5ポリペプチドへの融合で、限定されないが、上に記載のものを含む非ヒト種からのアルブミンの使用を企図する。ある特定の実施形態では、非ヒト種はウシである。他の実施形態では、非ヒト種はカニクイザルである。

40

【0143】

本開示に従って、カルボキシル末端、アミノ末端、カルボキシルおよびアミノ末端の両

50

者に、または内部に、アルブミンを薬剤分子（例えば、本明細書に記載されたポリペプチド）にコンジュゲートしてよい（例えば、米国特許第5,876,969号および米国特許第7,056,701号を参照）。更に、本開示は、複数の同種（例えば、複数のGDF15突然変異タンパク質分子）または異種（例えば、GDF15突然変異タンパク質分子および別々の抗糖尿病の薬剤）薬剤分子を含むアルブミン融合タンパク質を企図する。

【0144】

本開示によって企図されるHSA-ポリペプチドコンジュゲートでは、さまざまな形態のアルブミン、例えば、HSA変異体、例えば、フラグメントを用いてよい。かかる形態は、一般に1つ以上の所望のアルブミン活性を保持する。追加の実施形態では、本開示が、アルブミン、アルブミンフラグメント、およびアルブミン変異体などに直接または間接に融合されるポリペプチド薬剤分子を含む融合タンパク質を含み、融合タンパク質が、非融合薬剤分子より高い血漿安定度を有する、および／または融合タンパク質が、非融合薬剤分子の治療用活性を保持する。いくつかの実施形態では、間接融合が、リンカー、例えば、ペプチドリリンカーまたはこれらの修飾型によって行われる。

【0145】

融合タンパク質を生成するためにリンカーを介して本明細書に記載されたポリペプチドにHSAをコンジュゲートしてよい。好適なリンカーの例が、本明細書に記載されている。いくつかの実施形態では、例えば、4〜30個のアミノ酸のペプチドリリンカーを企図する。

【0146】

融合タンパク質がリンカーを含む実施形態では、リンカーは、非開裂可能リンカーとしてよい。例えば、1つの実施形態では、本開示が、HSA前駆体アミノ酸配列または成熟HSAが、非開裂可能 $(G_4S)_3$ リンカーを介して成熟ヒトGDF15またはGDF15突然変異タンパク質アミノ酸配列のN末端に融合されている融合分子を記載している。

【0147】

融合タンパク質がリンカーを含む他の実施形態では、リンカーは、開裂可能リンカーとしてよい。例えば、本開示は、HSA前駆体アミノ酸配列または成熟HSAアミノ酸配列が、プロテアーゼ感受性 $(G_4S)_2$ 因子Xa-開裂可能リンカーを介して、本明細書に提供されるとおりの成熟ヒトGDF15またはGDF15突然変異タンパク質アミノ酸配列のN末端に融合されている融合分子を企図する。

【0148】

例えば、GDF15/GDF15突然変異タンパク質の溶解度および*in vivo*有効性の測定の評価を容易にするために、HSA-開裂可能リンカー-成熟組換えGDF15/GDF15突然変異タンパク質分子の構成、ならびに成熟組換えGDF15/GDF15突然変異タンパク質-開裂可能リンカー-HSA融合分子の構成を用いてよい。かかる実施形態では、細胞内開裂または*in vitro*酵素的開裂によって、HSAシャペロンからGDF15/GDF15突然変異タンパク質を切除してよい。いくつかの実施形態では、任意の生プロテアーゼを用いて、開裂可能リンカーのタンパク質消化によって、除去が行われる。他の実施形態では、また、本明細書に提供されるポリペプチドに融合されたシグナルペプチドの構成によって、非HSA融合物としてGDF15突然変異タンパク質を生成することができる。

【0149】

酵素的に、例えば、フューリンまたはカスパーゼによって細胞内開裂を実施してよい。融合タンパク質を発現する宿主細胞が、細胞内で融合分子の一部を切断することができる低レベルのこれらの内因性酵素を発現する可能性がある；したがって、いくつかのポリペプチドが、HSAにコンジュゲートされることなく細胞から分泌される一方、いくつかのポリペプチドが、HSAを含む融合分子の形態で、分泌される。本開示の実施形態では、さまざまなフューリン融合コンストラクトの使用を企図する。例えば、配列

RGRR (SEQ ID NO: 36),

RKRKKR (SEQ ID NO: 37), RKKR (SEQ ID NO: 38), または RRRKKR (SEQ ID NO: 39)

を含むコンストラクトを設計してよい。かかるコンストラクトは、以下の一般構造： I g k - H S A - (G ₄ S)₂ - フューリン配列 - h G D F 1 5 を有することができる。

【0150】

本開示は、また、細胞外開裂（すなわち、e x - v i v o 開裂）を企図し、これにより、融合分子が、細胞から分泌され、精製に供され、その後、（例えば、因子 X a タンパク質分解感受性リンカーまたはエンテロキナーゼを用いて）切断される。除去により、ポリペプチド（例えば、成熟 G D F 1 5 または G D F 1 5 突然変異タンパク質）から H S A - リンカー複合体全体を分離する可能性がある、または H S A - リンカー複合体全体未満を分離する可能性があると理解される。

10

【0151】

上記のとおり、例えば、遺伝子操作によって、アルブミンの1つ以上の本開示のポリペプチドへの融合を実現することができる、この結果、H S A、またはこれらのフラグメントをコードする D N A が、1つ以上のポリペプチド配列をコードする D N A に結合される。その後、融合ポリペプチドを発現するように、例えば、好適なプラスミドの形態で、融合されたヌクレオチド配列により、好適な宿主を形質転換またはトランスフェクトすることができる。i n v i t r o で、例えば、原核細胞または真核細胞から、または i n v i v o で、例えば、トランスジェニック生物から発現させてよい。本開示のいくつかの実施形態では、融合タンパク質の発現が、哺乳動物細胞株、例えば、C H O 細胞株中で実施される。形質転換は、その環境から細胞膜（複数可）を介して吸収される外因性遺伝的物質（外因性 D N A）の直接取込み、組込みおよび発現から生じる細胞の遺伝的変化を指すように本明細書に広く用いられる。形質転換は、細菌のいくつかの種で自然に生じるが、また、他の細胞中の人工的手段によって影響を受ける可能性がある。

20

【0152】

更に、アルブミンそれ自体を、その循環半減期を延長するように修飾してよい。上記遺伝的操作／組換え技術によって、または化学的コンジュゲートによって修飾アルブミンを本開示の1つ以上のポリペプチドに融合させることができる；得られた融合分子は、非修飾アルブミンによる融合より半減期が延長する。（例えば、W O 2 0 1 1 / 0 5 1 4 8 9 を参照）。

30

【0153】

確立した技術プラットフォームが、ポリペプチド（例えば、本明細書に記載されたポリペプチド）および組換えアルブミンの遺伝的融合および化学的コンジュゲートのために存在している。例えば、1つ以上の組換えアルブミン分子を1つ以上のポリペプチドに遺伝的に融合させるために、A L B U F U S E（登録商標）フレックスプラットフォーム（N o v o z y m e s B i o p h a r m a A / S ; D e n m a r k）を用いることができる、これにより、単一の均質なタンパク質を生成するポリペプチド（複数可）およびアルブミン（複数可）をコードする連続 c D N A が生成される。例えば、酵母および哺乳動物宿主発現系によりプラットフォームを用いることができる。更なる例では、更にアルブミンを誘導体化することなく、本開示のポリペプチドを組換えアルブミンに化学的コンジュゲートさせるように、R E C O M B U M I N（登録商標）フレックスプラットフォーム（N o v o z y m e s B i o p h a r m a A / S ; D e n m a r k）を用いることができる。いくつかのアミノ酸残基（例えば、リジンおよびチロシン）でコンジュゲートを実施してよいが、C y s 3 4 の遊離チオールが、より均質の最終生成物を生成する部位特異性による通常の戦略である。

40

【0154】

別のアルブミン結合戦略：コンジュゲート脂肪酸鎖（アシル化）を介したアルブミン結合を含む直接融合の代替案として、いくつかのアルブミン結合戦略が開発された。血清アルブミンが、脂肪酸の輸送タンパク質であるため、低分子タンパク質治療薬の半減期延長

50

のために、アルブミン結合活性を有するこれらの天然リガンドが、用いられている。例えば、糖尿病用に承認された製品であるインスリンデテミル（LEVEMIR）は、遺伝子修飾インスリンにコンジュゲートされたミリスチル鎖を含み、長時間作用インスリン類似体が得られる。

【0155】

本開示は、また、アルブミン結合ドメイン（ABD）ポリペプチド配列および1つ以上の本明細書に記載されたポリペプチドの配列を含む融合タンパク質を企図する。本明細書または文献に記載されたいずれのABDポリペプチド配列も、融合タンパク質の成分とすることができる。融合タンパク質の成分は、任意でリンカー、例えば、本明細書に記載されたリンカーを介して共有結合させることができる。本開示のいくつかの実施形態では、融合タンパク質は、N末端側部分としてABDポリペプチド配列およびC末端側部分として本明細書に記載されたポリペプチドを含む。

10

【0156】

本開示は、また、アルブミン結合ポリペプチドのフラグメントであって、実質的にアルブミン結合を保持するフラグメント；またはアルブミン結合ポリペプチドまたはこれらのフラグメントのマルチマーであって、モノマー単位として少なくとも2つのアルブミン結合ポリペプチドまたはこれらのフラグメントを含むマルチマーを含む、融合タンパク質を企図する。

【0157】

理論に束縛されるものでないが、本明細書に記載されたポリペプチドが、ABDポリペプチド配列に結合し、これにより、対象中のポリペプチドを封鎖し、対象中の作用の持続時間が増加すると考えられる。

20

【0158】

ABDおよび関連技術の一般的考察には、WO2012/050923、WO2012/050930、WO2012/004384およびWO2009/016043を参照。

【0159】

マルトース結合タンパク質またはこれらのフラグメントを有する融合タンパク質：本開示は、また、マルトース結合タンパク質（MBP）、またはこれらのフラグメント、および1つ以上の本明細書に記載されたポリペプチドのアミノ酸配列を含む融合タンパク質を企図する。いくつかの実施形態では、MBPフラグメントが、マルトース結合ドメイン（MBD）を含む。いずれのMBP、もしくはこれらのフラグメント、または本明細書に記載されたMBDポリペプチド配列または当技術分野で知られるMBDポリペプチド配列も、本開示の融合タンパク質の成分とすることができる。融合タンパク質の成分は、任意でリンカー、例えば、本明細書に記載されたリンカーを介して共有結合させることができる。本開示のいくつかの実施形態では、融合タンパク質は、MBP、もしくはこれらのフラグメント、またはN末端側部分としてMBDポリペプチド配列およびC末端側部分として本明細書に記載されたポリペプチドを含む。

30

【0160】

本開示は、また、MBPまたはMBDポリペプチドのフラグメントであって、実質的にマルトース結合活性を保持するフラグメント；マルトース結合ポリペプチド、またはこれらのフラグメントのマルチマー（例えば、MBDのマルチマー）であって、モノマー単位として少なくとも2つのマルトース結合ポリペプチド、またはこれらのフラグメント（例えば、2つ以上のMBDポリペプチド）を含むマルチマーを含む、融合タンパク質を企図する。

40

【0161】

MBPおよびMBDならびに関連技術の一般的考察には、例えば、Kapust et al. (1999) Protein Sci 8 (8) : 1668-74を参照。

【0162】

Fc融合タンパク質：本開示は、また、Fcポリペプチドまたはこれらのフラグメント

50

、および1つ以上の本明細書に記載されたポリペプチド（例えば、ヒトG D F 1 5分子、修飾ヒトG D F 1 5分子、G D F 1 5突然変異タンパク質、および修飾G D F 1 5突然変異タンパク質）のアミノ酸配列を含む融合タンパク質を企図する。本明細書に記載されたいずれのF cポリペプチド配列または当技術分野で知られるF cポリペプチド配列も、本開示の融合タンパク質成分とすることができる。融合タンパク質の成分は、任意でリンカー、例えば、本明細書に記載されたリンカーを介して共有結合させることができる。本開示のいくつかの実施形態では、融合タンパク質は、N末端側部分としてF cポリペプチド配列およびC末端側部分として本明細書に記載されたポリペプチドを含む。

【0163】

本開示は、また、F cポリペプチド融合パートナーが、荷電F c対の1つのパートナーであるように修飾されることを含むF cポリペプチド融合パートナー、および融合タンパク質を企図する。「荷電F c対のパートナー」は、(i) 荷電対突然変異を含む「陰性荷電」F c配列（任意でヒンジ領域を欠いている）または(ii) 荷電対突然変異を含む「陽性荷電」F c配列（任意でヒンジ領域を欠いている）を指す。「陽性荷電」および「陰性荷電」は、F c配列中の荷電対突然変異の性質を記載して参照を容易にし、全配列またはコンストラクトが、必ず陽性または陰性荷電を有するというを示さないように本明細書に用いられる。本開示のポリペプチドコンストラクト（例えば、G D F 1 5突然変異タンパク質、修飾G D F 1 5突然変異タンパク質）の使用に好適な荷電F cアミノ酸配列が、例えば、W O 2 0 1 3 / 1 1 3 0 0 8に記載されている。

【0164】

陽性荷電F c（「F c（+）」）の例としては、ヒンジ領域を欠いているF c配列のアスパラギン酸からリジンへの突然変異（E 3 5 6 K）およびグルタミン酸からリジンへの突然変異（D 3 9 9 K）を含むF cが挙げられる。陰性荷電F c（「F c（-）」）の例としては、ヒンジ領域を欠いているF c配列中の2つのリジンからアスパルテートへの突然変異（K 3 9 2 D、K 4 0 9 D）を含むF cが挙げられる。また、任意でC末端側リジン（K 4 7 7）を欠失させてよい。F c（+）ポリペプチド融合タンパク質（例えば、F c（+）G D F 1 5突然変異タンパク質融合タンパク質）およびF c（-）ポリペプチド融合タンパク質（例えば、F c（-）G D F 1 5突然変異タンパク質融合タンパク質）をともにインキュベートする場合、アスパルテート残基が静電力によりリジン残基と結合し、G D F 1 5ポリペプチド融合タンパク質のF c（+）およびF c（-）配列間のF cヘテロ二重体の形成を容易にする。

【0165】

本開示は、また、第1のF c配列のN末端を第2のF c配列のC末端に結合させるリンカーによって、並んで結合された2つのF c配列を含む「h e m i」または「h e m i F c」コンストラクトと称されるコンストラクトを企図する。いくつかの実施形態では、モノマーが、G D F 1 5配列のN末端を第1のF c配列のC末端に結合する第1のリンカーによって、第1のF c配列に結合されたポリペプチド（例えば、成熟修飾G D F 1 5または突然変異タンパク質G D F 1 5）配列を含み、第1のF c配列が、第1のF c配列のN末端を第2のF c配列のC末端に結合する第2のリンカーによって、第2のF c配列に結合される。第1のF c配列および第2のF c配列は、また、F cヒンジ領域によって結合される。2つのかかるモノマーは、モノマーが2つのポリペプチド配列間の鎖間ジスルフィド結合を介して結合される二量体を形成するように結合する。本開示のG D F 1 5突然変異タンパク質との使用に好適なh e m i F cポリペプチドの例には、W O 2 0 1 3 / 1 1 3 0 0 8を参照。

【0166】

本開示は、また、荷電F c対のパートナーを含むF cポリペプチド、またはこれらのフラグメントのマルチマー（例えば、F cのマルチマー）を有する融合タンパク質を企図する。

【0167】

他の分子とのコンジュゲート：コンジュゲートのための追加の好適な成分および分子と

しては、例えば、チログロブリン；破傷風トキソイド；ジフテリアトキソイド；ポリアミノ酸、例えば、ポリ（D-リジン：D-グルタミン酸）；ロタウイルスのVP6ポリペプチド；インフルエンザウイルスヘマグルチニン、インフルエンザウイルス核タンパク質；キーホールリンペットヘモシニアン（KLH）；およびB型肝炎ウイルスコアタンパク質および表面抗原；または前述のものの任意の組み合わせが挙げられる。

【0168】

したがって、本開示は、ポリペプチド配列のN末端および／またはC末端の1つ以上の追加の成分または分子、例えば、もう1つのタンパク質（例えば、対象タンパク質と異なるアミノ酸配列を有するタンパク質）、または担体分子のコンジュゲートを企図する。したがって、もう1つの成分または分子とのコンジュゲートとして例示的なポリペプチド配列を提供することができる。

10

【0169】

コンジュゲート修飾の結果、追加もしくは相補的機能を有する活性、または第2の分子の活性を保持するポリペプチド配列となる可能性がある。例えば、溶解度、貯蔵、*in vivo*または貯蔵半減期または安定度、免疫原性の減少、*in vivo*での遅延または制御放出などを容易にするように、例えば、ポリペプチド配列を分子にコンジュゲートしてよい。他の機能または作用が、非コンジュゲートポリペプチド配列と比較して毒性を低下させるコンジュゲート、非コンジュゲートポリペプチド配列よりもより効率的にある種の細胞または臓器を標的にするコンジュゲート、すなわち、更に本明細書に記載したとおりの障害または疾患（例えば、糖尿病）と関係している原因または作用に更に対抗する薬剤を含む。

20

【0170】

また、大きくゆっくりと代謝される高分子、例えば、タンパク質；多糖、例えば、セファロース、アガロース、セルロース、セルロースビーズ；ポリマーアミノ酸、例えば、ポリグルタミン酸、ポリリジン；アミノ酸コポリマー；非活性化ウイルス粒子；非活性化細菌毒素、例えば、ジフテリアからのトキソイド、破傷風、コレラ、白血球毒分子；非活性化細菌；および樹状細胞に、ポリペプチドをコンジュゲートしてよい。所望であれば、本開示のポリペプチドに対する抗体を生成するように、かかるコンジュゲート形態を用いることができる。

【0171】

コンジュゲートのための追加の候補成分および分子が、単離または精製に好適なものを含む。特定の非限定例としては、結合分子、例えば、プラスチックもしくはポリスチレンビーズ、プレートまたはビーズ、磁気ビーズ、試験ストリップ、および膜を含む固体支持体を含む、例えば、ビオチン（ビオチン-アビジン特異的結合対）、抗体、受容体、リガンド、レクチン、または分子が挙げられる。

30

【0172】

効率的にコンジュゲートをそれらのさまざまな分子量に分離する荷電差によってコンジュゲートを分離するために、精製方法、例えば、陽イオン交換クロマトグラフィーを用いてよい。例えば、陽イオン交換カラムに負荷し、その後、pH約4の約20mM酢酸ナトリウムで洗浄し、その後、pH約3～5.5、例えば、pH約4.5で、勾配緩衝した線状（0M～0.5M）NaClで溶離することができる。従来の方法、例えば、質量分析法、SDS-PAGE、または分子量によって分子実体を分離するための他の知られる方法を用いて、分子量によって陽イオン交換クロマトグラフィーによって得られたフラクションの含有量を同定してよい。

40

【0173】

他の修飾：本開示は、1つ以上の特性を改善するポリペプチドの現在知られている、または、将来開発される他の修飾の使用を企図する。本開示のポリペプチドの循環半減期を延長し、安定度を増大し、クリアランスを減少し、または、免疫原性またはアレルギー原性を変化させるための1つのかかる方法が、分子の特性を修飾するために他の分子に結合されたヒドロキシエチルスターチ誘導体を利用するHES化によるポリペプチド配列の修

50

飾を含む。H E S 化のさまざまな実施形態が、例えば、米国特許出願第 2 0 0 7 / 0 1 3 4 1 9 7 号および 2 0 0 6 / 0 2 5 8 6 0 7 号に記載されている。

【0174】

本開示は、また、融合タグとして S U M O (L i f e S e n s o r s , I n c ; M a l v e r n , P A) を含む融合分子を企図する。本明細書に記載されたポリペプチドの S U M O への融合が、ポリペプチドに、発現の向上、溶解度の改善、および／または精製方法の開発の助成を含むいくつかの有益な作用をもたらす可能性がある。S U M O プロテアーゼが、S U M O の三次構造を認識し、S U M O の C 末端で融合タンパク質を切断し、このため、所望の N 末端側アミノ酸を有する本明細書に記載されたポリペプチドを放出する。

【0175】

リンカー：本開示のポリペプチド配列を修飾するのに用いられる前述の成分および分子のいずれも任意でリンカーを介してコンジュゲートしてよい。好適なリンカーが、修飾ポリペプチド配列および結合成分および分子間のいくつかの移動を可能にする一般に十分な長さがある「可動性リンカー」を含む。リンカー分子は、約 6 ~ 5 0 原子長とすることができる。リンカー分子は、また、例えば、アリアルアセチレン、2 ~ 1 0 モノマー単位を含有するエチレングリコールオリゴマー、ジアミン、二塩基酸、アミノ酸、またはこれらの組み合わせとしてよい。好適なリンカーは、容易に選択することができ、好適な長さ、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、10 ~ 20、20 ~ 30、30 ~ 50 アミノ酸のリンカーとすることができる。

【0176】

例示的な可動性リンカーとしては、グリシンポリマー (G)_n、グリシン-アラニンポリマー、アラニン-セリンポリマー、グリシン-セリンポリマー (例えば、(G_m S_o)_n、(G S G G S)_n、(G_m S_o G_m)_n、(G_m S_o G_m S_o G_m)_n、(G S G G S_m)_n、(G S G S_m G)_n および (G G G S_m)_n、およびこれらの組み合わせ (m、n、および o が、それぞれ独立して少なくとも 1 ~ 20 (例えば、1 ~ 18、2 ~ 16、3 ~ 14、4 ~ 12、5 ~ 10、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10) の整数から選択される)、および他の可動性リンカーが挙げられる。グリシンおよびグリシン-セリンポリマーが、比較的非構造化され、このため成分間のニュートラルなテザーとして役割を果たす可能性がある。例示的な可動性リンカーとしては、G G S G、G G S G G、G S G S G、G S G G G、G G G S G、および G S S S G が挙げられるが、これら

【0177】

追加の可動性リンカーとしては、グリシンポリマー (G)_n またはグリシン-セリンポリマー (例えば、(G S)_n、(G S G G S)_n、(G G G S)_n および (G G G G S)_n (n = 1 ~ 50、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、10 ~ 20、20 ~ 30、30 ~ 50)) が挙げられる。例示的な可動性リンカーとしては、GGGS (SEQ ID NO: 40)、GGGGS (SEQ ID NO: 41)、GGSG (SEQ ID NO: 42)、GSGSG (SEQ ID NO: 43)、GSGSG (SEQ ID NO: 44)、GSGGG (SEQ ID NO: 45)、GGGSG (SEQ ID NO: 46)、

および GSSSG (SEQ ID NO: 47)

が挙げられるが、これらに限定されない。異種アミノ酸配列を本明細書に開示されたポリペプチドにコンジュゲートするために用いてよい可動性リンカーをもたらすために、これらのリンカー配列のマルチマー (例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、10 ~ 20、20 ~ 30、または 30 ~ 50) を、ともに結合させてよい。本明細書に記載したとおり、異種アミノ酸配列は、シグナル配列および／または融合パートナー、例えば、アルブミン、Fc 配列などとしてよい。

【0178】

リンカーの例としては、例えば、(G G G G S)_n (n が、1 ~ 約 10 (例えば、n = 1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10) の整数である) ;

10

20

30

40

GGGSGGGSIEGR (SEQ ID NO: 48); GGGGG (SEQ ID NO: 49); EGGGS (SEQ ID NO: 50)

が挙げられる。

【0179】

いくつかの場合では、リンカーは、開裂可能リンカー、例えば、酵素的に開裂可能リンカーとしてよい。他の場合では、リンカーは、非開裂可能リンカー、例えば、*in vivo*で、正常な生理学的条件下で、酵素的に切断されないリンカーとしてよい。

【0180】

例えば、タンパク質分解開裂可能リンカーが、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) 開裂部位、例えば、コラーゲナーゼ 1、-2、および-3 (MMP-1、-8、および-13)、ゼラチナーゼ A および B (MMP-2 および-9)、ストロメライシン 1、2、および 3 (MMP-3、-10、および-11)、マトリライシン (MMP-7)、および膜メタロプロテアーゼ (MT1-MMP および MT2-MMP) から選択される MMP のための開裂部位を含むことができる。MMP-9 の開裂配列は、Pro-X-X-Hy (X は任意の残基を示す; Hy、疎水性残基) (SEQ ID NO: 51)、例えば、Pro-X-X-Hy-(Ser/Thr) (SEQ ID NO: 52)、例えば、Pro-Leu/Gln-Gly-Met-Thr-Ser (SEQ ID NO: 53) または Pro-Leu/Gln-Gly-Met-Thr (SEQ ID NO: 54) である。プロテアーゼ開裂部位のもう 1 つの例は、プラスミノゲンアクチベーター開裂部位、例えば、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター (uPA) または組織プラスミノゲンアクチベーター (tPA) 開裂部位である。uPA および tPA の開裂配列の特定の例としては、Val-Gly-Arg を含む配列が挙げられる。もう 1 つの例が、トロンビン開裂部位、例えば、CGLVPAGSGP (SEQ ID NO: 55) である。プロテアーゼ開裂部位を含む追加の好適なリンカーとしては、以下のアミノ酸配列の 1 つ以上を含むリンカーが挙げられる: 1) カテプシン B によって切断される SLLKSRMVPNFN (SEQ ID NO: 56) または SLLIARRMPNFN (SEQ ID NO: 57)

; エプスタインバーウイルスプロテアーゼによって切断される

SKLVQASASGVN (SEQ ID NO: 58) または SSYLKASDAPDN (SEQ ID NO: 59)

; MMP-3 (ストロメライシン) によって切断される

RPKPQQFFGLMN (SEQ ID NO: 60)

; MMP-7 (マトリライシン) によって切断される

SLRPLALWRSFN (SEQ ID NO: 61)

; MMP-9 によって切断される

SPQGIAGQRNFN (SEQ ID NO: 62)

; サーモリシン様 MMP によって切断される

DVDERDVRGFASFL (SEQ ID NO: 63)

; マトリックスメタロプロテアーゼ 2 (MMP-2) によって切断される

SLPLGLWAPNFN (SEQ ID NO: 64)

; カテプシン L によって切断される

SLLIFRSWANFN (SEQ ID NO: 65)

; カテプシン D によって切断される

SGVVIATVIVIT (SEQ ID NO: 66)

; マトリックスメタロプロテアーゼ 1 (MMP-1) によって切断される

SLGPQGIWGQFN (SEQ ID NO: 67)

; ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーターによって切断される

KKSPGRVVGGSV (SEQ ID NO: 68)

; 膜型 1 マトリックスメタロプロテアーゼ (MT-MMP) によって切断される

PQGLLGAPGILG (SEQ ID NO: 69)

; ストロメライシン 3 (または MMP-11)、サーモリシン、線維芽球コラーゲナーゼ および ストロメライシン-1 によって切断される

HGPEGLRVGFYESDVMGRGHARLVHVEEPHT (SEQ ID NO: 70)

；マトリックスメタロプロテアーゼ 13（コラーゲナーゼー 3）によって切断される

GPQGLAGQRGIV (SEQ ID NO: 71)

；組織型プラスミノゲンアクチベーター（tPA）によって切断される

GGSGQRGRKALE (SEQ ID NO: 72)

；ヒト前立腺特異的抗原によって切断される

SLSALLSSDIFN (SEQ ID NO: 73)

；カリクレイン（hK3）によって切断される

SLPRFKIIGGFN (SEQ ID NO: 74)

；好中球エラスターゼによって切断される

SLLGIAVPGNFN (SEQ ID NO: 75)

；およびカルパイン（カルシウム活性化中性プロテアーゼ）によって切断される

FFKNIVTPRTPP (SEQ ID NO: 76)

。

【0181】

図3は、本明細書に企図される2つの融合タンパク質M1（SEQ ID NO: 77）およびM2（SEQ ID NO: 78）のアミノ酸配列を示す。融合タンパク質M1では、N末端からC末端に連続的に、IgKシグナル配列（小文字）がHSAアミノ酸配列に融合されており、それが（Gly-Gly-Gly-Gly-Ser）₃リンカー（下線）と共に成熟ヒトGDF15（太字）のN末端に融合されている。融合タンパク質M2では、N末端からC末端に連続的に、IgKシグナル配列（小文字）がHSAアミノ酸配列に融合されており、それが（Gly-Gly-Gly-Gly-Ser）₃リンカー（下線）と共に、3アミノ酸欠失（ΔARN）を含有する成熟ヒトGDF15（太字）のN末端に融合されている。

【0182】

図5は、本明細書に企図される2つの融合タンパク質M3（SEQ ID NO: 79）およびM4（SEQ ID NO: 80）のアミノ酸配列を示す。融合タンパク質M3では、N末端からC末端に連続的に、IgKシグナル配列（小文字）がHSAアミノ酸配列に融合されており、それが（Gly-Gly-Gly-Gly-Ser）₅リンカー（下線）と共に、3アミノ酸欠失（ΔARNまたはΔN3で示した）を含有する成熟ヒトGDF15（太字）アミノ酸配列のN末端に融合されている。融合タンパク質M4では、N末端からC末端に連続的に、IgKシグナル配列（小文字）がHSAアミノ酸配列に融合されており、それが（Gly-Gly-Gly-Gly-Ser）₅リンカー（下線）と共に、成熟hGDF15のN末端に対して6アミノ酸切断（ΔARNGDH）を含有する成熟ヒトGDF15（太字）アミノ酸配列のN末端に融合されている。

【0183】

本発明は、また、本明細書に記載された配列、ポリペプチドおよび二量体をコードする組換え核酸配列を企図する。ある特定の実施形態では、組換え核酸は、SEQ ID NO: 1のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一である連続アミノ酸配列を有するポリペプチドをコードし、連続アミノ酸配列は、SEQ ID NO: 1中の対応するアミノ酸に対して以下の対の少なくとも1つの置換を有する。

i) D5TおよびR21NまたはD5SおよびR21N；

ii) R16NおよびH18TまたはR16NおよびH18S；

iii) S23NおよびE25TまたはS23NおよびE25S；

iv) S50NおよびF52T；S50NおよびF52S；F52NおよびA54T；またはF52NおよびA54S；

v) Q51NおよびR53T；Q51NおよびR53S；R53NおよびA55T；またはR53NおよびA55S；

vi) S64NおよびH66T；またはS64NおよびH66S；

10

20

30

40

50

v i i) K 9 1 N および D 9 3 T ; K 9 1 N および D 9 3 S ; D 9 3 N および G 9 5 T ; または D 9 3 N および G 9 5 S ;

v i i i) T 9 4 N および V 9 6 T ; T 9 4 N および V 9 6 S ; V 9 6 N および L 9 8 T ; または V 9 6 N および L 9 8 S ;

i x) S 9 7 N および Q 9 9 T ; または S 9 7 N および Q 9 9 S ; および

x) A 1 0 6 N および D 1 0 8 T または A 1 0 6 N および D 1 0 8 S ;

【0184】

置換により、配列 N X S / T を有する 1 つ以上の N 結合グリコシル化コンセンサス部位が生成され、N は、A s n であり；X は、プロリン以外のアミノ酸であり；後に S e r (S) または T h r (T) のいずれかが続き、更に、発現した場合、1 つ以上の N 結合グリコシル化コンセンサス部位は、N-グリカンに結合される。更なる実施形態では、組換え核酸は、発現した場合二量体を形成するポリペプチドをコードする。更なる実施形態では、組換え核酸は、SEQ ID NO: 1 に対して N 末端側切断および／または C 末端側切断を有するポリペプチドをコードする。切断は、参照ポリペプチド、例えば、SEQ ID NO: 1 に対して 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 以上のアミノ酸としてよい。特定の実施形態では、組換え核酸は、G D F 1 5 中の最初の 3 つの N 末端側残基の切断 (Δ A R N または Δ N 3) を有するポリペプチドをコードする。特定の実施形態では、本開示は、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18 または SEQ ID NO: 30 または 5 個までのアミノ酸が異なるアミノ酸から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする組換え核酸分子を企図し；前記ポリペプチドは、発現した場合、N-グリコシル化されている少なくとも 1 つの N-グリコシル化部位を含有する。特定の実施形態では、本開示は、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18 または SEQ ID NO: 30 または 2 個までのアミノ酸が異なるアミノ酸から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする組換え核酸分子を企図し；前記ポリペプチドは、発現した場合、N-グリコシル化されている少なくとも 1 つの N-グリコシル化部位を含有する。特定の実施形態では、組換え核酸は、SEQ ID NO: 81、SEQ ID NO: 83、SEQ ID NO: 87、SEQ ID NO: 88、SEQ ID NO: 89、SEQ ID NO: 92、SEQ ID NO: 93、SEQ ID NO: 96、SEQ ID NO: 97 または SEQ ID NO: 100 または 5 個までのアミノ酸が異なるアミノ酸から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードし；前記ポリペプチドは、発現した場合、N-グリコシル化されている少なくとも 1 つの N-グリコシル化部位を含有する。特定の実施形態では、組換え核酸は、SEQ ID NO: 81、SEQ ID NO: 83、SEQ ID NO: 87、SEQ ID NO: 88、SEQ ID NO: 89、SEQ ID NO: 92、SEQ ID NO: 93、SEQ ID NO: 96、SEQ ID NO: 97 または SEQ ID NO: 100 または 2 個までのアミノ酸が異なるアミノ酸から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードし；前記ポリペプチドは、発現した場合、N-グリコシル化されている少なくとも 1 つの N-グリコシル化部位を含有する。本開示は、また、哺乳動物細胞、例えば、CHO 細胞中の前述の組換え核酸を発現させるステップを含む修飾 G D F 1 5 N-グリコシル化ホモ二量体を生成する方法を企図する。本開示は、また、前述の方法によって生成される修飾 G D F 1 5 N-グリコシル化ホモ二量体を包含する。

【0185】

本明細書に提供される特定のアミノ酸配列および核酸配列に加えて、本開示は、また、アミノ酸および核酸と配列が少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、または少なくとも 95% 同一である配列を有するポリペプチドおよび核酸を企図する。「

同一」またはパーセント「同一性」という用語は、2つ以上のポリヌクレオチド配列、または2つ以上のアミノ酸配列の文脈では、比較し、特定領域にわたって対応が最大となるように整列させた場合、同じである2つ以上の配列またはサブ配列、または同じ（例えば、特定の領域にわたって少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%同一である）である特定のパーセンテージのアミノ酸残基またはヌクレオチドを有する2つ以上の配列またはサブ配列を指す。本開示は、特に、配列が、SEQ ID NO: 2~35または77~97のアミノ酸配列と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドを企図する。

10

【0186】

ポリペプチドの生成方法

組換えおよび非組換え方法（例えば、化学的合成）を含む任意の好適な方法によって、本開示のポリペプチドを生成することができる。

【0187】

A. 化学的合成

ポリペプチドが、化学的に合成される場合、液相または固相を介して合成を進めてよい。固相ペプチド合成（SPPS）により、非天然アミノ酸および／またはペプチド／タンパク質主鎖修飾が組込まれることが可能になる。SPPSのさまざまな形態、例えば、FmocおよびBocが、本開示のポリペプチドを合成するのに利用可能である。化学的合成の詳細が、当技術分野で知られている（例えば、Ganesan A. 2006 Mini Rev. Med. Chem. 6: 3-10; および Camarero J. A. et al., 2005 Protein Pept Lett. 12: 723-8）。

20

【0188】

以下に記載したとおり、固相ペプチド合成を実施してよい。酸不安定性または塩基不安定性基で、 α 官能基（Na）および任意の反応側鎖を保護する。保護基は、アミド結合を連結するための条件下で、安定しているが、形成されたペプチド鎖を損なうことなく、容易に切断することができる。 α -アミノ官能基のための好適な保護基としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：*t*-ブチルオキシカルボニル（Boc）、ベンジルオキシカルボニル（Z）、*o*-クロロベンジルオキシカルボニル、*b*i-フェニルイソプロピルオキシカルボニル、*tert*-アミルオキシカルボニル（Amoc）、 α , α -ジメチル-3, 5-ジメトキシベンジルオキシカルボニル、*o*-ニトロスルフェニル、2-シアノー-*t*-ブトキシカルボニル、9-フルオレニルメトキシカルボニル（Fmoc）、1-(4, 4-ジメチル-2, 6-ジオキソシクロヘキサ（dioxocyclohex）-1-イリデン）エチル（Dde）など。

30

【0189】

好適な側鎖保護基としては、アセチル、アリル（Allyl）、アリルオキシカルボニル（Allyloc）、ベンジル（Benzyl）、ベンジルオキシカルボニル（Z）、*t*-ブチルオキシカルボニル（Boc）、ベンジルオキシメチル（Bom）、*o*-ブromoベンジルオキシカルボニル、*t*-ブチル（*t*Bu）、*t*-ブチルジメチルシリル、2-クロロベンジル、2-クロロベンジルオキシカルボニル（2-ClZ）、2, 6-ジクロロベンジル、シクロヘキシル、シクロペンチル、1-(4, 4-ジメチル-2, 6-ジオキソシクロヘキサ-1-イリデン）エチル（Dde）、イソプロピル、4-メトキシ-2, 3-6-トリメチルベンジルスルホニル（Mtr）、2, 3, 5, 7, 8-ペンタメチルクロマン-6-スルホニル（Pmc）、ピバリル、テトラヒドロピラン-2-イル、トシル（Tos）、2, 4, 6-トリメトキシベンジル、トリメチルシリルおよびトリチル（Trit）が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0190】

固相合成では、C末端側アミノ酸を好適な支持材料に結合させる。好適な支持材料は、試薬、および合成プロセスの段階的縮合および開裂反応のための反応条件に対して不活性

50

であり、用いられる反応媒質中で溶解しないものである。市販されている支持材料の例としては、反応基および／またはポリエチレングリコールで修飾されたスチレン／ジビニルベンゼンコポリマー；クロロメチル化スチレン／ジビニルベンゼンコポリマー；ヒドロキシメチル化またはアミノメチル化スチレン／ジビニルベンゼンコポリマーなどが挙げられる。ペプチド酸を調製するのを意図する場合、4-ベンジルオキシベンジルーアルコール（Wang-アンカー）または2-クロロトリチルクロリドで誘導体化されたポリスチレン（1%）-ジビニルベンゼンまたはTentaGel（登録商標）を用いることができる。ペプチドアミドの場合では、5-（4'-アミノメチル）-3', 5'-ジメトキシフェノキシ）バレリアン酸（PAL-アンカー）またはp-（2, 4-ジメトキシフェニルーアミノメチル）-フェノキシ基（Rinkアミドアンカー）で誘導体化されたポリスチレン（1%）ジビニルベンゼンまたはTentaGel（登録商標）を用いることができる。

10

【0191】

室温で、または温度を上昇させて（例えば、40℃～60℃）、例えば、2～72時間の反応時間で、支持材料とC末端側Fmoc保護アミノ酸を反応させることによってエタノール、アセトニトリル、N、N-ジメチルホルムアミド（DMF）、ジクロロメタン、テトラヒドロフラン、N-メチルピロリドンまたはほぼ同じ溶媒中で、活性化試薬の添加により、ポリマー支持体への連結を実現することができる。

【0192】

例えば、カップリング試薬、例えば、N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）、N, N'-ジイソプロピルカルボジイミド（DIC）または他のカルボジイミド、2-（1H-ベンゾトリアゾール-1-イル）-1, 1, 3, 3-тетраметилулоиумтетрафлуороборат（TBTU）または他のウロニウム塩、o-アシル尿素、ベンゾトリアゾール-1-イル-トリス-ピロリジノ-ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート（PyBOP）または他のホスホニウム塩、N-ヒドロキシスクシンイミド、他のN-ヒドロキシイミドまたはオキシムを用いて、1-ヒドロキシベンゾトリアゾールまたは1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾールが存在して、または、これが存在しないでも、例えば、TBTUを用いて、ヒドロキシベンゾトリアゾール（HOBt）を添加して、塩基、例えば、ジイソプロピルエチルアミン（DIEA）、トリエチルアミンまたはN-メチルモルホリン、例えば、ジイソプロピルエチルアミンを添加して、または添加しないで、2～72時間の反応時間（例えば、3時間、1.5～3倍超過のアミノ酸およびカップリング試薬中で、例えば、2倍超過させて、約10℃～50℃の温度、例えば、25℃で、溶媒、例えば、ジメチルホルムアミド、N-メチルピロリドンまたはジクロロメタン、例えば、ジメチルホルムアミド中で）で、Nα保護アミノ酸（例えば、Fmocアミノ酸）のPAL、WangまたはRinkアンカーへのカップリングを実施することができる。

20

30

【0193】

カップリング試薬の代わりに、また、上記条件下で、活性エステル（例えば、ペンタフルオロフェニル、p-ニトロフェニルなど）、Nα-Fmoc-アミノ酸の対称無水物、その酸塩化物または酸フッ化物を使用することができる。

40

【0194】

DIEAの添加により10～120分の反応時間で、例えば、20分で、ジクロロメタン中の2-クロロトリチルレジンにNα-保護アミノ酸（例えば、Fmocアミノ酸）をカップリングさせることができるが、この溶媒およびこの塩基の使用に限定されない。

【0195】

ペプチド合成の従来の方法に従って、典型的には自動ペプチド合成装置で、保護アミノ酸の連続的カップリングを実施することができる。処理、例えば、5～20分間、ジメチルホルムアミド中のピペリジン（10%～50%）による処理（例えば、DMF中の50%ピペリジンによる2x2分、およびDMF中の20%ピペリジンによる1x15分）によって、固相上でカップリングしたアミノ酸のNα-Fmoc保護基の開裂後、不活性、

50

非水性、極性溶媒中で、例えば、ジクロロメタン、DMFまたはその2つの混合物中で、約10℃～50℃の温度で、例えば、25℃で、3～10倍超過、例えば、10倍超過の次の保護アミノ酸を、前のアミノ酸にカップリングさせる。第1のN α -Fmocアミノ酸をPAL、WangまたはRinkアンカーにカップリングさせるための先に述べた試薬が、カップリング試薬として好適である。また、別の試薬として、保護アミノ酸の活性エステル、または塩化物もしくはフッ化物またはこれらの対称無水物を用いることができる。

【0196】

固相合成の終わりに、ペプチドが、支持材料から切断され、同時に側鎖保護基を切断する。0.5～3時間内で、例えば、2時間で、5%～20% V/Vのスカベンジャー、例えば、ジメチルスルフィド、エチルメチルスルフィド、チオアニソール、チオクレゾール、m-クレゾール、アニソールエタンジチオール、フェノールまたは水の添加、例えば、15% v/vジメチルスルフィド/エタンジチオール/m-クレゾール1:1:1の添加により、トリフルオロ酢酸または他の強酸性媒質で、開裂を実施することができる。水酢酸/トリフルオロエタノール/ジクロロメタン2:2:6で、2-クロロトリチルアンカーを切断することによって、完全保護側鎖を有するペプチドが得られる。シリカゲル上のクロマトグラフィーによって保護ペプチドを精製することができる。ペプチドが、Wangアンカーを介して固相に結合されている場合、および、C末端側アルキルアミド化によりペプチドを得ることを意図する場合、アルキルアミンまたはフルオロアルキルアミンによるアミノリシスによって開裂を実施することができる。アミノリシスは、約-10℃～50℃（例えば、約25℃）の温度で、約12～24時間（例えば、約18時間）の反応時間で、実施される。また、例えば、メタノールによる再エステル化によって、支持からペプチドを切断することができる。

【0197】

ペプチドを沈殿させ、その結果、スカベンジャーおよびエーテル中に残っている切断された保護基を分離するために、3～20倍の量の冷エーテルまたはn-ヘキサン、例えば、10倍超過のジエチルエーテルで、得られた酸性溶液を混合してよい。何度か水酢酸からペプチドを再沈殿させることによって更なる精製を実施することができる。水もしくはtert-ブタノールまたはその2つの溶媒の混合物、例えば、tert-ブタノール/水の1:1混合物中に得られた沈殿物を溶かし、凍結乾燥することができる。

【0198】

アセテート形態中の弱塩基性レジン上でのイオン交換；非誘導体化ポリスチレン/ジビニルベンゼンコポリマー（例えば、Amberlite（登録商標）XAD）上での疎水性吸収クロマトグラフィー；シリカゲル上での吸収クロマトグラフィー；例えば、カルボキシメチルセルロース上でのイオン交換クロマトグラフィー；例えば、Sephadex（登録商標）G-25上での分配クロマトグラフィー；向流分配クロマトグラフィー；または高压液体クロマトグラフィー（HPLC）例えば、オクチルまたはオクタデシルシリルシリカ（ODS）相上での逆相HPLCを含むさまざまなクロマトグラフィー法によって、得られたペプチドを精製することができる。

【0199】

B. 組換え生成

組換え技術を用いてポリペプチドを生成する場合、任意の好適なコンストラクト、および、原核細胞または真核細胞、例えば、それぞれ、細菌（例えば、E. coli）または酵母宿主細胞とすることができる任意の好適な宿主細胞を用いて、細胞内タンパク質または分泌されるタンパク質として、ポリペプチドを生成してよい。宿主細胞として用いてよい真核細胞の他の例としては、昆虫細胞、哺乳動物細胞、および/または植物細胞が挙げられる。哺乳動物宿主細胞が用いられる場合、ヒト細胞（例えば、HeLa、293、H9およびJurkat細胞）；マウス細胞（例えば、NIH3T3、L細胞、およびC127細胞）；霊長類細胞（例えば、Cos1、Cos7およびCV1）およびハムスター細胞（例えば、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞）を含んでよい。特定の実施

形態では、ポリペプチドは、CHO細胞中で生成される。他の実施形態では、ポリペプチドは、酵母細胞で生成され、特定の実施形態では、哺乳動物様N-グリカンで糖タンパク質を生成するために遺伝子操作された酵母細胞としてよい。

【0200】

当技術分野で知られる標準手順に従って、ポリペプチドの発現に好適なさまざまな宿主ベクター系を用いてよい。例えば、Sambrook et al., 1989 Current Protocols in Molecular Biology Cold Spring Harbor Press, New York; および Ausubel et al., 1995 Current Protocols in Molecular Biology, Eds. Wiley and Sonsを参照。遺伝的物質の宿主細胞への導入方法としては、例えば、形質転換、電気穿孔法、コンジュゲーション、リン酸カルシウム法などが挙げられる。導入されるポリペプチドコード核酸の安定した発現をもたらすように、転換方法を選択することができる。ポリペプチドをコードする核酸は、遺伝性エピソード要素（例えば、プラスミド）として、提供することができる、またはゲノムに統合することができる。目的のポリペプチドの生成に使用するのに好適なさまざまなベクターが、市販されている。

10

【0201】

ベクターは、宿主細胞中の染色体外維持をもたらすことができる、または宿主細胞ゲノムへの統合をもたらすことができる。発現ベクターは、転写および翻訳制御配列をもたらす、コード領域が、転写開始領域ならびに転写および翻訳停止領域の転写調節下で、機能的に連結される、誘導的発現または構成的発現をもたらすことができる。一般に、転写および翻訳制御配列は、プロモーター配列、リボソーム結合部位、転写開始および停止配列、翻訳開始および停止配列、およびエンハンサーまたはアクチベーター配列を含んでよいが、これらに限定されない。プロモーターは、構成的または誘導的とすることができ、強い構成的プロモーター（例えば、T7）とすることができ。

20

【0202】

発現コンストラクトは、一般に目的のタンパク質をコードする核酸配列の挿入をもたらすためにプロモーター配列の近くに位置する簡便な制限部位を有する。ベクターを含有する細胞の選択を容易にするために、発現宿主中で作用する選択可能マーカが、存在してよい。更に、発現コンストラクトが、追加の要素を含んでよい。例えば、発現ベクターは、1つのまたは2つの複製系を有してよく、このため、生物において、例えば、発現のために哺乳動物または昆虫細胞において、およびクローン化および増幅のために原核宿主においてそれを維持することが可能である。また、発現コンストラクトが、形質転換宿主細胞の選択が可能となるように選択可能マーカ遺伝子を含んでよい。選択可能遺伝子が、当技術分野でよく知られており、用いられる宿主細胞により異なる。

30

【0203】

当技術分野で知られる方法に従って、タンパク質の単離および精製を実現することができる。例えば、構成的におよび／または誘導時にタンパク質を発現する遺伝子組換えされた細胞の可溶化液から、または、合成反応混合物から、試料を抗タンパク質抗体と接触させ、非特異的結合物質を除去するために洗浄し、および特異的結合タンパク質を溶離することを一般に含む免疫アフィニティ精製によってタンパク質を単離することができる。透析およびタンパク質精製方法に通常用いられる他の方法によって単離タンパク質を更に精製することができる。1つの実施形態では、金属キレートクロマトグラフィー法を用いてタンパク質を単離してよい。タンパク質は、単離を容易にする修飾を含有してよい。

40

【0204】

実質的に純粋または単離形態（例えば、他のポリペプチドを含まない）で、ポリペプチドを調製してよい。存在する可能性がある他の成分（例えば、他のポリペプチドまたは他の宿主細胞成分）と比較してポリペプチドが濃縮されている組成物中にポリペプチドが存在させることができる。例えば、ポリペプチドが、他の発現したタンパク質を実質的に含まない、例えば、組成物の90%未満、60%未満、50%未満、40%未満、30%未

50

満、20%未満、10%未満、5%未満、または1%未満が、他の発現したタンパク質から構成される組成物中に存在するように精製されたポリペプチドを提供してよい。

【0205】

抗体

本開示は、本開示のポリペプチドまたは融合タンパク質と特異的に結合する単離抗体を含む抗体を提供する。「抗体」という用語は、本開示のポリペプチドまたは融合タンパク質と特異的に結合するという条件で、インタクト単クローン性抗体、多クローン性抗体、少なくとも2つのインタクト抗体から形成される多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、およびFabおよびF(ab')₂を含む抗体結合フラグメントを包含する。基本的全抗体構造単位が、テトラマーを含み、各テトラマーは、2つの同一対のポリペプチド鎖からなり、それぞれの対が、1つの「軽」鎖（約25kDa）および1つの「重」鎖（約50～70kDa）を有する。各鎖のアミノ末端側部分は、主に抗原認識を担う約100～110以上のアミノ酸の可変領域を含む。それとは対照的に、各鎖のカルボキシ末端側部分は、主にエフェクター機能を担う定常領域を定義する。ヒト軽鎖は、カッパおよびラムダに分類され、ヒト重鎖は、ミュー、デルタ、ガンマ、アルファ、またはイプシロンに分類され、それぞれ抗体のイソ型をIgM、IgD、IgG、IgA、およびIgEと定義する。結合フラグメントは、組換えDNA技術によって、またはインタクト抗体の酵素的もしくは化学的開裂によって生成される。結合フラグメントとしては、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、および単鎖抗体が挙げられる。

【0206】

各重鎖は、1つの末端に可変ドメイン（VH）を有し、それに複数の定常ドメインが続く。各軽鎖は、1つの末端に可変ドメイン（VL）およびそのもう1つの末端に定常ドメインを有し；軽鎖の定常ドメインが、重鎖の第1の定常ドメインと整列され、軽鎖可変ドメインが、重鎖の可変ドメインと整列される。軽鎖および重鎖内では、可変および定常領域が、約12以上のアミノ酸の「J」領域によって結合され、重鎖は、また、約10以上のアミノ酸の「D」領域を含む。全抗体鎖は、「相補性決定領域」または「CDR」とも称される、3つの超可変領域によって結合される比較的保存されたフレームワーク領域（FR）の同じ一般構造を示す。各対の2本の鎖からのCDRは、フレームワーク領域によって整列され、特定のエピトープに結合することができる。N末端側からC末端側まで、軽鎖および重鎖ともドメインFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3およびFR4を含む。

【0207】

インタクト抗体は、2つの結合部位を有し、二官能性または二重特異性抗体中を除いて、2つの結合部位は同じである。二重特異性または二官能性抗体は、2つの異なる重鎖／軽鎖対および2つの異なる結合部位を有する人工ハイブリッド抗体である。ハイブリドーマの融合またはFab'フラグメントの結合を含むさまざまな方法によって、二重特異性抗体を生成することができる。

【0208】

上に記載のとおり、インタクト抗体の酵素的または化学的開裂によって結合フラグメントを生成してよい。酵素パバインによる抗体の消化の結果、「Fab」フラグメント、および抗原結合活性を有しない「Fc」フラグメントとしても知られる2つの同一抗原結合フラグメントとなる。酵素ペプシンによる抗体の消化の結果、抗体分子の2つのアームが結合されたままであり、2つの抗原結合部位を含むF(ab')₂フラグメントとなる。F(ab')₂フラグメントは、抗原を架橋する能力を有する。

【0209】

本明細書に用いる場合、「Fab」という用語は、VHおよびVL領域ならびに軽鎖の定常ドメインおよび重鎖のCH1ドメインを含む抗体のフラグメントを指す。

【0210】

本明細書に用いる場合、「Fv」という用語は、抗原認識部位および抗原結合部位の両者を保持する抗体の最小フラグメントを指す。2本鎖Fv種では、この領域は、非共有結

合の1本の重鎖および1本の軽鎖可変ドメインの二量体を含む。単一鎖Fv種では、軽鎖および重鎖が、2本鎖Fv種のものに類似した「二量体」構造で結合することができる可動性ペプチドリンカーによって、1本の重鎖および1本の軽鎖可変ドメインを共有結合させることができる。各可変ドメインの3つのCDRが、相互作用し、VH-VL二量体の表面に抗原結合部位を定義するのが、この立体配置である。6つのCDRが、まとめて、抗体に抗原結合特異性を与える、一方、単一可変ドメイン（または抗原に特異的な3つのCDRだけを含むFvの半分）でも抗原を認識し、それと結合する能力を有する。

【0211】

本明細書に用いる場合、「相補性決定領域」または「CDR」という用語は、特定のリガンドと接触し、その特異性を決定する免疫学的受容体の一部を指す。

10

【0212】

「超可変領域」という用語は、抗原結合を担う抗体のアミノ酸残基を指す。超可変領域は、一般にCDRからのアミノ酸残基および／または「超可変ループ」からのその残基を含む。

【0213】

本明細書に用いる場合、「エピトープ」という用語は、タンパク質抗原上の抗体の結合部位を指す。エピトープ決定基は、通常、分子の化学的に活性がある表面基、例えば、アミノ酸または糖側鎖、ならびに特定の3次元構造特性および荷電特性を含む。解離定数が、 $\leq 1 \mu\text{M}$ 、 $\leq 100 \text{ nM}$ 、または $\leq 10 \text{ nM}$ である場合、抗体は、抗原と結合すると言われている。平衡定数（「 K_D 」）の増大は、エピトープおよび抗体間の親和性が減少していることを意味し、一方、平衡定数の減少は、エピトープおよび抗体間の親和性が増大していることを意味する。ある特定の量「を超えない」 K_D を有する抗体は、抗体が、一定の K_D で、またはそれより強力にエピトープに結合することを意味する。 K_D は、エピトープおよび抗体の結合特性を示し、一方、「力価」は、抗体の機能についての抗体それ自体の効果を示す。必ずしも平衡定数および力価間の相関はない；したがって、例えば、比較的低い K_D が、必然的に高い力価を意味するものではない。

20

【0214】

抗体に関する「選択的に結合する」という用語は、抗体が単一物質に結合することだけを意味せず、抗体の第1の物質に対する K_D が、抗体の第2の物質に対する K_D 未満であることを意味する。もっぱらエピトープだけに結合する抗体は、単一エピトープに結合する。

30

【0215】

ヒトに投与される場合、げっ歯類動物（すなわち、マウスまたはラット）可変および／または定常領域を含有する抗体は、時には、例えば、身体からの急速なクリアランス、または抗体に対する身体による免疫応答の発生と関係している。げっ歯類動物から誘導された抗体の利用を回避するために、ヒト抗体機能のげっ歯類動物への導入により完全ヒト抗体を生成することができ、その結果、げっ歯類動物が、完全ヒト抗体を生成する。別途特に本明細書に特定しない限り、「ヒト」および「完全ヒト」抗体は、交換可能で用いることができる。「完全ヒト」という用語は、部分的だけヒトである抗体と、全くまたは完全にヒトである抗体を識別する場合、有用とすることができる。当業者は、完全ヒト抗体を生成するさまざまな方法を知っている。

40

【0216】

可能性のあるヒト抗マウス抗体応答に対処するために、キメラ抗体またはそうでなければヒト化抗体を用いることができる。キメラ抗体は、ヒト定常領域およびマウス可変領域を有し、したがって、ヒト抗キメラ抗体応答が、患者の一部で観察される可能性がある。このため、可能性のあるヒト抗マウス抗体またはヒト抗キメラ抗体応答を回避するために、多量体酵素に対する完全ヒト抗体をもたらしのが有利である。

【0217】

例えば、当業者に知られる技術によるハイブリドーマ細胞株の生成によって、完全ヒト単クローン性抗体を調製することができる。他の調製方法は、好適な哺乳動物宿主細胞、

50

例えば、C H O細胞の形質転換のための特定の抗体をコードする配列の使用を含む。形質転換は、ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための任意の公知の方法によるものとすることができ、この方法は、例えば、ウイルス（またはウイルスベクター中に）中にポリヌクレオチドをパッケージすること、およびウイルス（またはベクター）で、または当技術分野で知られるトランスフェクション方法によって宿主細胞を形質導入することを含む。哺乳動物細胞に異種ポリヌクレオチドを導入する方法が、当技術分野でよく知られており、デキストラン媒介トランスフェクション、リン酸カルシウム沈殿、ポリブレン媒介トランスフェクション、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、ポリヌクレオチド（複数可）のリポソーム中への封入、およびDNAの核中への直接マイクロインジェクションを含む。発現のための宿主として利用可能な哺乳動物細胞株が、当技術分野でよく知られており、C H O細胞、H e L a細胞、およびヒト肝細胞癌細胞が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0218】

本開示のポリペプチドを検出するために抗体を用いることができる。例えば、対象中の本開示の1つ以上のポリペプチドのレベルを検出すること、および標準対照レベルまたは以前（例えば、病気の前）に測定した対象中のベースラインレベルのいずれかと検出レベルを比較することによって診断薬として抗体を用いることができる。

【0219】

本開示のもう1つの実施形態では、1つ以上のヒトドメイン抗体（d A b）の使用を含む。d A bは、ヒト抗体（I g G）の最小の機能的結合単位であり、好ましい安定度および溶解度特性を有する。当該技術は、H S Aにコンジュゲートされたd A b（複数可）（これにより、「A l b u d A b」を形成する；例えば、E P 1 5 1 7 9 2 1 B、W O 2 0 0 5 / 1 1 8 6 4 2 および W O 2 0 0 6 / 0 5 1 2 8 8 を参照）および目的の分子（例えば、本開示のポリペプチド配列）を含む。A l b u d A bは、小さいことが多く、ポリペプチドの血清半減期を延長するために用いられる現在実施されている技術より、微生物発現系、例えば、細菌または酵母中で製造するのに容易である。H S Aは、約3週間の半減期を有するため、得られたコンジュゲート分子は、目的の分子の半減期を改善する。d A b技術の使用が、また、目的の分子有効性を向上させる可能性がある。

20

【0220】

治療的用法および予防的用法

30

本開示は、本明細書に記載したとおり、ポリペプチド、またはこれらの組成物の投与によって、代謝疾患および代謝関連疾患、例えば、肥満および他の体重障害、高血糖、高インスリン血症、グルコース不耐性、およびグルコース代謝障害を治療または予防する方法を提供する。かかる方法は、また、例えば、症状の重症度または頻度を低下させることによって、疾患、障害または状態と関係している1つ以上の症状への有利な作用を有し得る。特定の実施形態では、本開示は、ポリペプチド、N-グリコシル化二量体またはこれらの組成物の投与によってグルコース代謝または体重障害を治療する方法を提供する。特定の実施形態では、本開示は、ポリペプチド、N-グリコシル化二量体またはこれらの組成物の投与によって、食物摂取を減少させる、または体重を減少させる方法。本開示は、更に、代謝疾患および代謝関連疾患、例えば、肥満および他の体重障害、高血糖、高インスリン血症、グルコース不耐性、およびグルコース代謝障害から選択される状態を治療するのに使用するための医薬品の製造への前述の配列、ポリペプチド、N-グリコシル化二量体またはこれらの組成物の使用を提供する。本開示は、更に、グルコース代謝または体重障害を治療するのに使用するための医薬品の製造への前述の配列、ポリペプチド、N-グリコシル化二量体またはこれらの組成物の使用を提供する。本開示は、更に、食物摂取または体重を減少させるのに使用するための医薬品の製造への前述の配列、ポリペプチド、N-グリコシル化二量体またはこれらの組成物の使用を提供する。

40

【0221】

対象が、本明細書に提供される方法によって、体重障害（例えば、肥満）の治療または予防の候補としてよいかどうかを決定するために、パラメーター、例えば、限定されない

50

が、発病因子および対象の状態の程度（例えば、参照する健康な個体と比較して対象の太り過ぎの程度）を評価しなければならない。例えば、BMIが、約25～約29.9 kg/m²である成人は、太り過ぎ（前肥満）と考えてよく、一方、BMIが、約30 kg/m²以上である成人は、肥満と考えてよい。本明細書に記載したとおり、本発明のポリペプチドは、食欲を抑制し、例えば、食欲の低下により体重を減少させることができる。

【0222】

対象が、高血糖、高インスリン血症、グルコース不耐性、および／またはグルコース障害の本明細書に提供される方法による治療または予防の候補としてよいかどうかを決定するために、当技術分野で知られるさまざまな診断方法を利用してよい。かかる方法は、本明細書の他の箇所に記載したもの（例えば、空腹時血漿グルコース（FPG）評価および経口グルコース負荷試験（OGTT））を含む。

10

【0223】

本明細書に提供されるポリペプチドおよび融合タンパク質は、代謝疾患および代謝関連疾患、例えば、肥満および他の体重障害、高血糖、高インスリン血症、グルコース不耐性、グルコース代謝障害を治療または予防するために対象に投与した場合、血中グルコースレベルの減少、体重の減少、および／または食物摂取の減少をもたらす可能性がある。

【0224】

ある特定の実施形態では、本明細書に企図されるポリペプチドおよび融合タンパク質が、ポリペプチドまたは融合タンパク質を投与しない場合と比較して、少なくとも5%血中グルコースレベル、体重、および／または食物摂取を減少させる可能性がある。例えば、本明細書に企図されるポリペプチドおよび融合タンパク質は、治療または予防の開始前と比較して、少なくとも10%、20%、30%、50%、60%、70%、80%、または90%血中グルコースレベル、体重、および／または食物摂取を減少させる可能性がある。

20

【0225】

医薬組成物

本開示のポリペプチドは、対象への投与に好適な組成物の形態としてよい。一般に、かかる組成物は、1つ以上のポリペプチドおよび1つ以上の製剤的に許容可能、または生理的に許容可能な希釈剤、担体または賦形剤を含む「医薬組成物」である。ある特定の実施形態では、ポリペプチドが、治療有効量で存在している。本開示の方法に当該医薬組成物を用いてよく；したがって、例えば、本明細書に記載された治療方法および予防方法ならびに用法を実施するために、対象に*ex vivo*または*in vivo*で、当該医薬組成物を投与することができる。

30

【0226】

意図される投与方法または投与経路と適合するように、本開示の医薬組成物を製剤化することができる；例示的な投与経路が、本明細書に記載されている。更に、本開示によって企図されるとおり、疾患、障害および状態を治療または予防するために、本明細書に記載したとおり、他の治療的に活性がある薬剤または化合物（例えば、グルコース低下薬剤）と併用して、当該医薬組成物を用いてよい。

【0227】

当該医薬組成物は、通常、治療有効量の少なくとも1つの本開示によって企図されるポリペプチド、および1つ以上の製剤的におよび生理的に許容可能な製剤を含む。好適な製剤的に許容可能または生理的に許容可能な希釈剤、担体または賦形剤としては、抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸および重硫酸ナトリウム）、防腐剤（例えば、ベンジルアルコール、メチルパラベン、エチルまたは*n*-プロピル、*p*-ヒドロキシベンゾエート）、乳化剤、懸濁化剤、分散剤、溶媒、充填剤、増量剤、界面活性剤、緩衝剤、ビヒクル、希釈剤、および／または補助剤が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、好適なビヒクルは、生理的食塩水またはクエン酸緩衝生理食塩水としてよく、非経口的投与のための医薬組成物でよくみられる他の材料を補うことができる。中性緩衝生理食塩水または血清アルブミンと混合した生理食塩水が、更なる例示的なビヒクルである。当業者であれば、

40

50

医薬組成物および剤形に用いることができるさまざまな緩衝剤を容易に理解する。通常の緩衝剤としては、製剤的に許容可能な弱酸、弱塩基、またはこれらの混合物が挙げられるが、これらに限定されない。1つの例として、緩衝剤成分は、水溶性物質、例えば、リン酸、酒石酸、乳酸、コハク酸、クエン酸、酢酸、アスコルビン酸、アスパラギン酸、グルタミン酸、およびこれらの塩とすることができる。許容可能な緩衝剤としては、例えば、トリス緩衝剤、N-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-N'-(2-エタンスルホン酸)(HEPES)、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸(MES)、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸ナトリウム塩(MES)、3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸(MOPS)、およびN-トリス[ヒドロキシメチル]メチル-3-アミノプロパンスルホン酸(TAPS)が挙げられる。

10

【0228】

医薬組成物を製剤化した後、溶液、懸濁液、ゲル、エマルジョン、固体、または無水粉末もしくは凍結乾燥粉末として滅菌バイアル中に保管してよい。かかる製剤は、使用準備済の形態、使用前に再構成が必要な凍結乾燥形態、使用前に希釈が必要な液体形態、または他の許容可能な形態のいずれかで保管してよい。いくつかの実施形態では、医薬組成物が、単回使用容器(例えば、単回使用バイアル、アンプル、シリンジ、または自己注射器(例えば、EpiPen(登録商標))に類似したもの)中に提供され、一方、他の実施形態では、多回使用容器(例えば、多回使用バイアル)が、提供される。ポリペプチドを送達するために、任意の薬剤送達装置を用いてよく、この装置は、移植物(例えば、埋込ポンプ)およびカテーテル系を含み、両者とも当業者によく知られている。また、規定された期間にわたって本明細書に開示されたポリペプチドを放出するために、一般に皮下にまたは筋肉内に投与されるデポ注射を用いてよい。デポ注射は、通常、固体ベースまたはオイルベースのいずれかであり、一般に少なくとも1つの本明細書に記載された製剤成分を含む。当業者は、デポ注射の可能性のある製剤および使用をよく知っている。

20

【0229】

当該医薬組成物は、滅菌注射可能水性または油性懸濁液の形態としてよい。この懸濁液は、本明細書に記載の好適な分散剤または湿潤剤および懸濁化剤を用いて、公知の技術分野に従って、製剤化してよい。滅菌注射可能調製物は、また、非毒性の非経口で許容可能な希釈剤または溶媒中(例えば、1, 3-ブタンジオール中の溶液として)の滅菌注射可能溶液または懸濁液としてよい。水、リンゲル液、等張性塩化ナトリウム溶液、Cremophor EL(商標)(BASF、Parshippany、NJ)またはリン酸緩衝生理食塩水(PBS)、エタノール、ポリオール(例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコール)、およびこれらの好適な混合物を含む許容可能な希釈剤、溶媒および分散媒質を用いてよい。また、滅菌固定油が、従来から溶媒または懸濁媒質として用いられる。この目的では、合成モノグリセリドまたはジグリセリドを含む任意の無刺激性固定油を用いてよい。更に、脂肪酸、例えば、オレイン酸は、注射可能物の調製に使用される。吸収を遅らせる薬剤(例えば、モノステアリン酸アルミニウムまたはゼラチン)を含むことによって、特定の注射可能製剤の吸収の持続を実現することができる。

30

【0230】

活性成分(例えば、本開示のポリペプチド)を含有する医薬組成物は、経口使用に好適な形態としてよく、例えば、錠剤、カプセル、トローチ剤、ロゼンジ剤、水性または油性懸濁液、分散性粉末または顆粒、エマルジョン、硬カプセルまたは軟カプセル、またはシロップ、溶液、マイクロビーズまたはエリキシル剤としてよい。医薬組成物の製造のために当技術分野に知られる任意の方法に従って、経口使用を意図した医薬組成物を調製してよく、製剤的に上品さを与え、味のいい調製物を提供するために、かかる組成物が、1つ以上の薬剤、例えば、例えば、甘味剤、風味剤、着色剤および防腐剤を含有してよい。錠剤、カプセルなどは、錠剤の製造に好適である非毒性の製剤的に許容可能な賦形剤と混合して活性成分を含有する。これらの賦形剤は、例えば、希釈剤(炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、ラクトース、リン酸カルシウムまたはリン酸ナトリウムなど)；造粒剤および崩

40

50

壊剤（コーンスターチ、またはアルギン酸など）；結合剤（デンプン、ゼラチンまたはアカシアなど）、および潤滑剤（ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸またはタルクなど）としてよい。

【0231】

消化管中での崩壊および吸収を遅らせ、これにより、作用の持続がもたらされるように、公知の技術によって経口投与に好適な錠剤、カプセルなどを被覆しないでよい、または被覆してよい。例えば、徐放化材料、例えば、モノステアリン酸グリセリルまたはジステアリン酸グリセリルを用いてよい。また、制御放出のための浸透性治療用錠剤を形成するために、当技術分野で知られる技術によって、これらを被覆してよい。追加の薬剤としては、投与された組成物の送達を制御するための生分解性もしくは生体適合性粒子またはポリマー物質、例えば、ポリエステル、ポリアミン酸、ヒドロゲル、ポリビニルピロリドン、ポリ酸無水物、ポリグリコール酸、エチレン酢酸ビニル、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、硫酸プロタミン、またはラクチド／グリコリドコポリマー、ポリラクチド／グリコリドコポリマー、またはエチレン酢酸ビニルコポリマーが挙げられる。例えば、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチンマイクロカプセルまたはポリ（メタクリル酸メチル）マイクロカプセルの使用によって、それぞれ、コアセルヴェーション技術によってまたは界面重合によって調製されるマイクロカプセル、またはコロイド薬剤送達系に経口薬剤を封入することができる。コロイド状分散系としては、高分子複合体、ナノカプセル、ミクロスフェア、マイクロビーズ、および脂質ベース系を含み、それには水中油型エマルション、ミセル、混合ミセル、およびリポソームが挙げられる。リポソームの調製方法が、例えば、米国特許第4,235,871号、4,501,728号、および4,837,028号に記載されている。上記の製剤の調製方法は、当業者に明らかである。

【0232】

また、活性成分が、不活性固体希釈剤、例えば、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、カオリンまたは微結晶セルロースと混合されている硬ゼラチンカプセルとして、または活性成分が、水または油性媒質、例えば、ピーナッツ油、流動パラフィン、またはオリーブ油と混合されている軟ゼラチンカプセルとして、経口使用のための製剤を示してよい。

【0233】

水性懸濁液は、その製造に好適な賦形剤と混合して活性材料を含有する。かかる賦形剤は、懸濁化剤、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリドン、トラガcantガムおよびアカシアガム；分散剤または湿潤剤、例えば、天然ホスファチド（例えば、レシチン）、または脂肪酸とアルキレンオキシドの縮合物（例えば、ステアリン酸ポリオキシエチレン）、または長鎖脂肪族アルコールとエチレンオキシドの縮合物（例えば、ヘプタデカエチレンオキシセタノール）、または脂肪酸およびヘキシトール由来の部分エステルとエチレンオキシドの縮合物（例えば、ポリオキシエチレンソルビトールモノオレート）、または脂肪酸およびヘキシトール無水物由来の部分エステルとエチレンオキシドの縮合物（例えば、ポリエチレンソルビタンモノオレート）とすることができる。水性懸濁液は、また、1つ以上の防腐剤を含有してよい。

【0234】

植物油、例えば、落花生油、オリーブ油、ゴマ油またはヤシ油、または鉱油、例えば、流動パラフィン中に活性成分を懸濁させることによって、油性懸濁液を製剤化してよい。油性懸濁液は、増粘剤、例えば、ビーズワックス、固形パラフィンまたはセチルアルコールを含有してよい。味のいい経口調製物を提供するために、甘味剤、例えば、上に記載のもの、および香味剤を添加してよい。

【0235】

水の添加による水性懸濁液の調製に好適な分酸性粉末および顆粒では、分散剤または湿潤剤、懸濁化剤および1つ以上の防腐剤と混合して活性成分を提供する。好適な分散剤または湿潤剤および懸濁化剤は、本明細書に例示されている。

【0236】

本開示の医薬組成物は、また、水中油型エマルションの形態としてよい。油相は、植物油、例えば、オリーブ油または落花生油、または鉱油、例えば、流動パラフィン、またはこれらの混合物としてよい。好適な乳化剤は、天然ガム、例えば、アカシアガムまたはトラガcantガム；天然ホスファチド、例えば、大豆、レシチン、および脂肪酸由来のエステルまたは部分エステル；ヘキシトール無水物、例えば、ソルビタンモノオレート；およびエチレンオキシドと部分エステルの縮合物、例えば、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレートとしてよい。

【0237】

製剤は、また、急速な分解または身体からの排出に対して組成物を保護するために、担体、例えば、インプラント、リポソーム、ヒドロゲル、プロドラッグおよびマイクロカプセル化送達系を含む制御放出製剤を含むことができる。単独で、またはワックスと組み合わせて、例えば、徐放化材料、例えば、モノステアリン酸グリセリルまたはステアリン酸グリセリルを用いてよい。

【0238】

本開示は、薬剤の直腸投与のために坐剤の形態でのポリペプチドの投与を企図する。通常の温度で固体であるが直腸の温度で液体であり、このため薬剤を放出する直腸中で融解する好適な非刺激性賦形剤と薬剤を混合することによって、坐剤を調製することができる。かかる材料としては、カカオバターおよびポリエチレングリコールが挙げられるが、これらに限定されない。

【0239】

本開示によって企図されるポリペプチドは、現在知られている、または将来開発される任意の他の好適な医薬組成物の形態（例えば、鼻または吸入使用のためのスプレー）としてよい。

【0240】

製剤中のポリペプチドまたはこれらのフラグメントの濃度は、広く変えることができ（例えば、約0.1重量%未満から、通常、約2重量%または少なくとも約2重量%から20重量%～50重量%以上ほどまで）、通常、主に、例えば、選択された特定の投与方法に従って、液体量、粘度、および対象に基づく要因に基づいて選択される。

【0241】

Nano Precision Medicalのデポ送達技術（Nano Precision Medical；Emeryville, CA）の使用が、本明細書に企図される。当該技術は、高分子、例えば、タンパク質およびペプチド治療薬のゼロ次放出速度をもたらすチタニアナノチューブ膜を利用する。生体適合性膜は、小さな皮下インプラント中に入れられ、治療用高分子の長期（例えば、1年まで）で定速度の送達をもたらす。当該技術は現在2型糖尿病の治療のためのGLP-1アゴニストの送達に評価されている。ある特定の実施形態では、本明細書に開示されたポリペプチド（複数可）は、膜を有する製剤としてよい。例えば、ポリペプチドは、膜に含浸させてよい、または膜によって囲まれてよい。膜は、ディスク、管または球体の形状としてよい。ある特定の実施形態では、管は、ナノチューブとしてよい、または球体は、ナノスフェアとしてよい。

【0242】

いくつかの実施形態では、患者に貼ることができる、患者に所定の用量のポリペプチドを送達することができるオンボディ送達系を用いることによって本明細書に記載されたポリペプチドを対象に投与してよい。例示的なオンボディ送達系としては、パッチまたはポンプが挙げられる。ある特定の場では、本明細書に開示されたポリペプチドを投与するために、オンボディ送達系、例えば、Neulasta（登録商標）を送達するのに用いられるオンボディインジェクターを用いてよい。他の実施形態では、患者に本明細書に記載されたポリペプチドを送達するために、浸透ポンプ、例えば、埋込型浸透ポンプ（例えば、Duros（登録商標）ポンプまたはALZET（登録商標）浸透ポンプ）を用いてよい。

10

20

30

40

50

【0243】

投与経路

本開示は、任意の好適な方法での、開示されたポリペプチド、およびこれらの組成物の投与を企図する。好適な投与経路としては、非経口（例えば、筋肉内、静脈内、皮下（例えば、注入またはインプラント）、腹腔内、脳槽内、関節内、腹腔内、脳内（実質内）および脳室内）、経口、経鼻、経腔、舌下、眼内、直腸内、局所（例えば、経皮）、舌下および吸入が挙げられる。

【0244】

また、規定された期間にわたって本明細書に開示されたポリペプチドを放出するために、一般に皮下にまたは筋肉内に投与されるデポ注射を用いてよい。デポ注射は、通常、固体ベースまたはオイルベースのいずれかであり、一般に少なくとも1つの本明細書に記載された製剤成分を含む。当業者は、デポ注射の可能性のある製剤および使用をよく知っている。

10

【0245】

抗体に関して、1つの例示的な実施形態では、本開示の抗体または抗体フラグメントが、注入のために4℃で滅菌等張性水性生理食塩溶液中に10mg/mlで保存され、対象への投与前に、注入のために100mlまたは200mlの0.9%塩化ナトリウム中に希釈される。1時間の間に0.2~10mg/kgの用量で、静脈内注入によって抗体が投与される。他の実施形態では、15分~2時間の間に静脈内注入によって抗体が投与される。更に他の実施形態では、投与方法が、皮下ボーラス注入によるものである。

20

【0246】

本開示は、本開示のポリペプチドまたは抗体もしくは抗体フラグメントが、少なくとも1日に2回、少なくとも1日に1回、少なくとも48時間ごとに1回、少なくとも72時間ごとに1回、少なくとも1週間に1回、少なくとも2週間ごとに1回、少なくとも1ヶ月に1回、少なくとも2ヶ月ごとに1回、または少なくとも3ヶ月ごとに1回、またはこれより少ない頻度で対象に投与される方法を企図する。

【0247】

併用療法

本開示は、1つ以上の活性がある治療用薬剤または他の予防的もしくは治療的モダリティと組み合わせたポリペプチドの使用を企図する。かかる併用療法では、さまざまな活性がある薬剤が、作用の異なる機序を有することが多い。かかる併用療法は、1つ以上の薬剤の用量を減少させ、これにより、1つ以上の薬剤と関係している副作用を減少させる、または除去することによって特に有利となる可能性があり；更に、かかる併用療法は、基にある疾患、障害、または状態への治療的または予防的相乗作用を有する可能性がある。

30

【0248】

本明細書に用いる場合、「併用」は、別々に投与することができる治療法、例えば、別々の投与のために別々に製剤化することができる（例えば、キット中に提供してよい）治療法、および単一製剤で投与することができる（すなわち、「同時処方」）治療法を含むことを意味する。

【0249】

ある特定の実施形態では、ポリペプチドが、順次投与される、または塗布される、例えば、1つの薬剤が、1つ以上の他の薬剤の前に投与される。他の実施形態では、ポリペプチドが、同時に投与される、例えば、2つの以上の薬剤が、同じ時間に、またはほぼ同じ時間に投与される；2つの以上の薬剤が、2つの以上の別々の製剤中に、または単一製剤に混合して（すなわち、同時処方）、存在してよい。2つの以上の薬剤が順次または同時に投与されるかどうかに関わらず、これらは、本開示の目的のために併用して投与されると考えられる。

40

【0250】

本開示のポリペプチドは、本明細書に記載された疾患、障害または状態の治療、予防、抑制または改善に有用な他の薬剤と併用することができ、通常、肥満、摂食障害、高血糖

50

、高インスリン血症、グルコース不耐性、および他のグルコース代謝障害を患っている対象に投与されるものを含む。

【0251】

本開示は、多くの薬剤（およびこれらのクラス）による併用療法を企図し、以下を含む。1）スルホニル尿素（例えば、クロルプロバミド、トラザミド、アセトヘキサミド、トルブタミド、グリブリド、グリメピリド、グリピジド）およびメグリチニド（例えば、ミチグリニド、レバグリニド（PRANDIN）およびナテグリニド（STARLIX））を含むインスリン、インスリンミメティックおよびインスリン分泌の刺激を必然的に伴う薬剤；2）ビッグアニド（例えば、メトホルミン（GLUCOPHAGE）、およびその製剤的に許容可能な塩、特に、メトホルミンヒドロクロリド、およびこれらの放出持続製剤、例えば、Glumetza（商標）、Fortamet（商標）、およびGlucophage XR（商標））ならびにグルコース利用を促進すること、肝臓グルコース産生を減少させることおよび／または腸グルコース排出を減らすことによって作用する他の薬剤；3） α -グルコシダーゼ阻害剤（例えば、アカルボース、ボグリボースおよびミグリトール）および糖質消化を遅らせ、その結果、腸からの吸収を遅らせ、および食後高血糖を低減する他の薬剤；4）チアゾリジンジオン（例えば、ロシグリタゾン（AVANDIA）、トログリタゾン（REZULIN）、ピオグリタゾン（ACTOS）、グリピジド、バラグリタゾン、リボグリタゾン、ネトグリタゾン、AMG131、MBX2044、ミトグリタゾン、ロベグリタゾン、IDR-105、トログリタゾン、エングリタゾン、シグリタゾン、アダグリタゾン、ダルグリタゾン（これらは、インスリン、およびインスリンミメティック（例えば、インスリンデグルデク、インスリングルルギン、インスリンリスプロ、インスリンデテミル、インスリングルリシンおよびそれぞれの吸入可能製剤）を含むインスリン作用を向上させ（例えば、インスリン増感作用によって）、その結果、末梢組織中のグルコース利用を促進する）；5）DPP-IV阻害剤（例えば、アログリプチン、オマリグリプチン、リナグリプチン、ビルダグリプチン（GALVUS）およびシタグリプチンリン（JANUVIA））を含むグルカゴン様ペプチドならびにグルカゴン様ペプチド-1（GLP-1）およびGLP-1アゴニストおよび類似体（例えば、エキセナチド（BYETTAおよびITCA650（12ヶ月間にわたってエキセナチド類似体を送達する皮下に挿入される浸透ポンプ；Intarcia、Boston、MA））ならびにGLP-1受容体アゴニスト（例えば、デュラグルチド、セマグルチド、アルビグルチド、エキセナチド、リラグルチド、リキシセナチド、タスポグルチド、CJC-1131、およびBIM-51077、これらの鼻腔内、経皮、および1週間に1回の製剤を含む）；6）およびDPP-IV耐性類似体（インクレチンミメティック）、PPAR γ アゴニスト、PPAR α アゴニスト例えば、フェノフィブリン酸誘導体（例えば、ゲムフィブロジル、クロフィブレート、シプロフィブレート、フェノフィブレート、ベザフィブレート）、二重作用PPARアゴニスト（例えば、ZYL2、ZYL1、GFT505、チグリタザル、ムラグリタザル、アレグリタザル、ソデルグリタザル、およびナベグリタザル）、汎作用PPARアゴニスト、PTP1B阻害剤（例えば、ISIS-113715およびTTP814）、SGLT阻害剤（例えば、ASP1941、SGLT-3、エンバグリフロジン、ダバグリフロジン、カナグリフロジン、BI-10773、PF-04971729、レモグリフロジン、TS-071、トホグリフロジン、イブラグリフロジン、およびLX-4211）、インスリン分泌促進剤、アンジオテンシン変換酵素阻害剤（例えば、アラセプリル、ベナゼプリル、カプトプリル、セロナプリル、シラザプリル、デラプリル、エナラプリル、エナラプリラト、フォシノプリル、イミダプリル、リシノプリル、モベルチプリル、ペリンドプリル、キナプリル、ラミプリル、スピラプリル、テモカプリル、またはトランドラプリル）、アンジオテンシンII受容体アンタゴニスト（例えば、ロサルタンすなわち、COZAAR（登録商標）、バルサルタン、カンデサルタン、オルメサルタン、テルメサルタンおよび以下と併用されるこれらの薬剤の任意のもの、ヒドロクロロチアジド、例えば、HYZAAR（登録商標））または他の抗高血圧薬剤、例えば、LCZ696、RXRアゴニスト、グリコーゲンシンターゼキナーゼ-3

10

20

30

40

50

阻害剤、免疫モジュレーター、交感神経抑制薬、 β -アドレナリン遮断薬（例えば、プロプラノロール、アテノロール、ビソプロロール、カルベジロール、メトプロロール、または酒石酸メトプロロール）、 α -アドレナリン遮断薬（例えば、ドキサゾシン、プラゾシンまたは α -メチルドーパ）中枢性 α -アドレナリンアゴニスト、末梢血管拡張薬（例えば、ヒドララジン）； β -3アドレナリン受容体アゴニスト、11 β -HSD1阻害剤、中性エンドペプチダーゼ阻害剤（例えば、チオルファンおよびホスホラミドン）、アルドステロンアンタゴニスト、アルドステロンシンターゼ阻害剤、レニン阻害剤（例えば、ジおよびトリペプチドの尿素誘導体（米国特許第5, 116, 835号を参照）、アミノ酸および誘導体（米国特許第5, 095, 119号および5, 104, 869号）、非ペプチド結合により連結されたアミノ酸鎖（米国特許第5, 114, 937号）、ジおよびトリペプチド誘導体（米国特許第5, 106, 835号）、ペプチジルアミノジオール（米国特許第5, 063, 208号および4, 845, 079号）およびペプチジル β -アミノアシルアミノジオールカルバメート（米国特許第5, 089, 471号）；また、以下の米国特許第5, 071, 837号；5, 064, 965号；5, 063, 207号；5, 036, 054号；5, 036, 053号；5, 034, 512号および4, 894, 437号に開示されたとおりのさまざまな他のペプチド類似体、および小分子レニン阻害剤（ジオールスルホンアミドおよびスルフィニル（米国特許第5, 098, 924号）、N-モルホリノ誘導体（米国特許第5, 055, 466号）、N-複素環式アルコール（米国特許第4, 885, 292号）およびピロールイミダゾロン（米国特許第5, 075, 451号）；また、ペプスタチン誘導体（米国特許第4, 980, 283号）およびスタトン含有ペプチドのフルオローおよびクロロー誘導体（米国特許第5, 066, 643号）、エナルクレイン、RO42-5892、A65317、CP80794、ES1005、ES8891、SQ34017、アリスキレン（2（S）、4（S）、5（S）、7（S）-N-（2-カルバモイル-2-メチルプロピル）-5-アミノ-4-ヒドロキシ-2, 7-ジイソプロピル-8-[4-メトキシ-3-（3-メトキシプロポキシ）-フェニル]-オクタンアミドヘミフマレート）SPP600、SPP630およびSPP635を含む）、エンドセリン受容体アンタゴニスト、ホスホジエステラーゼ5阻害剤（例えば、シルデナフィル、タダフィルおよびバルデナフィル）、血管拡張薬、カルシウムチャンネル遮断薬（例えば、アムロジピン、ニフェジピン、ベラパミル、ジルチアゼム、ガロパミル、ニルジピン、ニモジピン、ニカルジピン）、カリウムチャンネル活性剤（例えば、ニコランジル、ピナシジル、クロマカリム、ミノキシジル、アプリルカリム、ロブラゾラム）、脂質低下薬、例えば、HMG-CoAレダクターゼ阻害剤、（ラクトンプロドラッグ形態および機能でZOCOR（登録商標）およびMEVACOR（登録商標）として市販され、投与後に阻害剤として機能するシンバスタチンおよびロバスタチンなど）、およびジヒドロキシオープンリング酸HMG-CoAレダクターゼ阻害剤の製剤的に許容可能な塩、例えば、アトルバスタチン（特に、LIPITOR（登録商標）で売られているカルシウム塩）、ロスバスタチン（特にCRESTOR（登録商標）で売られているカルシウム塩）、プラバスタチン（特にPRAVACHOL（登録商標）で売られているナトリウム塩）、セリバスタチン、およびフルバスタチン（特にLESCOL（登録商標）で売られているナトリウム塩）；コレステロール吸収阻害剤、例えば、エゼチミブ（ZETIA（登録商標））および他のいずれかの脂質低下薬と併用されるエゼチミブ、例えば、上述のHMG-CoAレダクターゼ阻害剤および特にシンバスタチン（VYTORIN（登録商標））またはアトルバスタチンカルシウムと併用されるもの；HDL増加薬、（例えば、ナイアシンおよびニコチン酸受容体アゴニスト、およびこれらの放出持続または放出制御型、および／またはHMG-CoAレダクターゼ阻害剤と併用されるもの；ナイアシン受容体アゴニスト、例えば、アシピモックスおよびアシフラン、ならびにナイアシン受容体部分アゴニスト；グルカゴン受容体アンタゴニスト（例えば、MK-3577、MK-0893、LY-2409021およびKT6-971）；胆汁酸封鎖剤（例えば、コレステラン、コレステミド、コレセバラムヒドロクロリド、コレステポール、コレステラミン、および架橋デキストランのジアルキルアミノアルキル誘導体）、アシルCoA：

コレステロールアシルトランスフェラーゼ阻害剤、（例えば、アバシミブ）；炎症状態での使用を意図した薬剤、例えば、アスピリン、非ステロイド系抗炎症薬すなわちNSAID、グルココルチコイド、および選択的シクロオキシゲナーゼ-2またはCOX-2阻害剤；グルコキナーゼアクチベーター（GKA）（例えば、AZD6370）；11β-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ1型の阻害剤（例えば、米国特許第6,730,690号、およびLY-2523199に開示されたもの）；CETP阻害剤（例えば、アナセトラピブ、エバセトラピブ、およびトルセトラピブ）；フルクトース1,6-ビスホスファターゼの阻害剤、（例えば、米国特許第6,054,587号；6,110,903号；6,284,748号；6,399,782号；および6,489,476号に開示されたもの）；アセチルCoAカルボキシラーゼ-1または2（ACC1またはACC2）の阻害剤；PCSK9阻害剤；GPR-40部分アゴニスト；SCDモジュレーター；脂肪酸シンターゼの阻害剤；アミリンおよびアミリン類似体（例えば、プラムリンチド）；化学的に可能な場合上述の活性薬剤の製剤的に許容可能な塩形態を含む。

【0252】

更に、本開示は、体重減少を促進するための薬剤および方法、例えば、代謝を刺激する、または食欲を減少させる薬剤、ならびに体重減少を促進するための食事および／または運動修正計画との併用療法を企図する。

【0253】

本開示のポリペプチドは、環境下で好適な方法で、1つ以上の他の薬剤と併用して、用いてよい。1つの実施形態では、少なくとも1つの活性薬剤および少なくとも1つの本開示のポリペプチドによる治療が、一定の時間の間に維持される。もう1つの実施形態では、少なくとも1つの活性薬剤による治療が、減らされ、または中止され（例えば、対象が安定している場合）、一方、本開示のポリペプチド（複数可）による治療が、一定の投与計画で維持される。更なる実施形態では、少なくとも1つの活性薬剤による治療が、減らされ、または中止され（例えば、対象が安定している場合）、一方、本開示のポリペプチド（複数可）による治療が、減らされる（例えば、用量を減らし、投与の頻度を減らす、または治療計画を短くする）。更に別の実施形態では、少なくとも1つの活性薬剤による治療が、減らされ、または中止され（例えば、対象が安定している場合）、本開示のポリペプチド（複数可）による治療が、増やされる（例えば、用量を増やし、投与の頻度を増やす、または治療計画を長くする）。更に別の実施形態では、少なくとも1つの活性薬剤による治療が、維持され、本開示のポリペプチド（複数可）による治療が、減らされ、または中止される（例えば、用量を減らし、投与の頻度を減らす、または治療計画を短くする）。更に別の実施形態では、少なくとも1つの活性薬剤による治療および本開示のポリペプチド（複数可）による治療が、減らされ、または中止される（例えば、用量を減らし、投与の頻度を減らす、または治療計画を短くする）。

【0254】

投薬

本開示のポリペプチドは、例えば、投与の目標（例えば、所望の消散の程度）；治療される対象の年齢、体重、性別、および健康および身体的状態；投与されるポリペプチドおよび／または製剤の性質；投与経路；およびこれらの疾患、障害、状態または症状の性質（例えば、グルコース／インスリンの調節異常の重症度および障害のステージ）に依存した量で、対象に投与してよい。投与計画では、また、投与される薬剤（複数可）と関係している副作用の存在、性質、および程度を考慮してよい。例えば、安全性および用量漸増試験、in vivo試験（例えば、動物モデル）、および当業者に知られる他の方法によって、効果的用量および用量計画を容易に決定することができる。

【0255】

一般に、投与パラメーターにより、用量が、対象に不可逆的に毒性がある可能性がある量（すなわち、最大耐性服用量、「MTD」）未満となり、対象への計測可能な作用が生じるために必要な量未満にならないように要求される。投与経路および他の因子を考慮に入れ、例えば、吸収、分配、代謝、および排出（「ADME」）と関係している薬物動態

学的小および薬力学的パラメーターによって、かかる量が決定される。

【0256】

有効量（ED）は、薬剤を服用する対象のある一定の割合において、治療反応または所望の作用を生じる薬剤の用量または量である。薬剤の「半有効量」またはED50は、投与される集団の50%で治療反応または所望の作用を生じる薬剤の用量または量である。ED50は、一般に薬剤の作用の妥当な期待の測定値として用いられるが、必ずしも、臨床医がすべての関連要因を考慮に入れた、好適と考える用量であるとは限らない。したがって、いくつかの状況では、有効量は、ED50の計算値以上であり、他の状況では、有効量は、ED50の計算値未満であり、更に他の状況では、有効量は、ED50計算値と同じである。

10

【0257】

また、本開示のポリペプチド（複数可）の有効量は、対象に1つ以上の用量で投与される場合、健康な対象と比較して所望の結果を生じる量としてよい。例えば、有効量は、血漿グルコースおよび／または血漿インスリンが上昇している対象に投与される場合、健康な対象と比較して少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、または80%超、所望の減少が実現する用量としてよい。

【0258】

好適な用量レベルは、一般に、単一または複数の用量で投与することができる1日当たり患者体重の約0.001~100mg/kgとなる。いくつかの実施形態では、用量レベルが、1日当たり約0.01~約25mg/kgとなり、他の実施形態では、1日当たり約0.05~約10mg/kgとなる。好適な用量レベルは、1日当たり約0.01~25mg/kg、1日当たり約0.05~10mg/kg、または1日当たり約0.1~5mg/kgとしてよい。この範囲内では、用量は、1日当たり0.005~0.05、0.05~0.5または0.5~5.0mg/kgとしてよい。

20

【0259】

経口薬剤の投与では、組成物は、1.0~1000ミリグラムの有効成分、特に1.0、3.0、5.0、10.0、15.0、20.0、25.0、50.0、75.0、100.0、150.0、200.0、250.0、300.0、400.0、500.0、600.0、750.0、800.0、900.0、および1000.0ミリグラムの有効成分を含有する錠剤、カプセルなどの形態で提供することができる。ポリペプチド（複数可）は、例えば、1日当たり1~4時間の計画で投与してよく、1日当たり1回または2回で投与されることが多い。

30

【0260】

本開示のポリペプチド（複数可）の用量は、好適な頻度で繰り返してよく、頻度は、ポリペプチド（複数可）の薬物動態（例えば半減期）および薬力学的反応（例えばポリペプチド（複数可）の治療用作用の持続時間）に応じて、1日当たり1回~3ヶ月ごとに1回の範囲としてよい。いくつかの実施形態では、投与が、1週間当たり1回~3ヶ月ごとに1回の頻度で繰り返される。他の実施形態では、ポリペプチド（複数可）が、1ヶ月当たり約1回で投与される。

40

【0261】

ある特定の実施形態では、開示されたポリペプチド（複数可）の用量が、「単位剤形」に含有されている。「単位剤形」という語句は、物理的に別個の単位を指し、各単位が、単独で、または1つ以上の追加の薬剤と併用して、所望の作用を生じさせるのに十分な本開示のポリペプチド（複数可）の所定量を含有する。単位剤形のパラメーターは、特定の薬剤および実現される作用に依存すると理解される。

【0262】

キット

本開示は、また、開示されたポリペプチド（複数可）、およびこれらの医薬組成物を含

50

むキットを企図する。キットは、一般に以下に記載したとおり、さまざまな構成部品を収納する物理的構造の形態であり、例えば、上記方法（例えば、体重減少が必要な対象へのポリペプチド（複数可）の投与）を実施するのに使用してよい。

【0263】

キットは、1つ以上の本明細書に開示されたポリペプチド（複数可）（例えば、滅菌容器中に提供される）を含むことができ、これは、対象への投与に好適な医薬組成物の形態としてよい。ポリペプチド（複数可）は、使用準備済の形態で、または、例えば、投与前に再構成または希釈が必要な形態で提供することができる。ポリペプチド（複数可）が、使用者によって再構成が必要な形態である場合、キットは、また、ポリペプチド（複数可）とともにパッケージされ、またはポリペプチド（複数可）から分離されてパッケージされる、緩衝剤、製剤的に許容可能な賦形剤などを含んでよい。併用療法が企図される場合、キットは、別々にいくつかの薬剤を含有してよい、またはあらかじめキット中に組み合わせてよい。個々の容器内にキットの各構成部品を内包することができる、さまざまな容器のすべてを単一パッケージ内とすることができる。本開示のキットは、その中に収納された構成部品を適切に維持するのに必要な条件（例えば、冷凍または凍結）のために設計することができる。

10

【0264】

キットは、その中の構成部品の情報を確認することおよびそれらの使用の説明書（例えば、作用の機序、薬物動態および薬力学、副作用、禁忌などを含む有効成分（複数可）の投与パラメーター、臨床的薬理）を含むラベルまたは添付文書を含有してよい。ラベルまたは添付文書は、製造者情報、例えば、ロット番号および使用期限を含むことができる。ラベルまたは添付文書は、例えば、物理的構造内に別々に含有され、またはキットの構成部品（例えば、アンプル、管またはバイアル）に取り付けられ、構成部品を収納する物理的構造中に統合してよい。例示的な説明書としては、開示されたモジュレーター、およびこれらの医薬組成物ともに、血中グルコースの減少または低下、高血糖の治療、糖尿病の治療などが挙げられる。

20

【0265】

ラベルまたは添付文書は、追加で、コンピュータ読取可能媒体、例えば、ディスク（例えば、ハードディスク、カード、メモリーディスク）、光ディスク、例えば、CD—もしくはDVD—ROM／RAM、DVD、MP3、磁気テープ、または電気ストレージメディア、例えば、RAMおよびROMもしくはこれらのハイブリッド、例えば、磁気／光ストレージメディア、フラッシュメディアもしくはメモリー型カードを含むことができる、またはこれらに組み入れることができる。いくつかの実施形態では、実際の説明書が、キット中に存在していないが、遠隔源から、例えば、インターネットを介して説明書を得るための手段が、提供される。

30

【実施例】

【0266】

実験

以下の実施例は、本発明の実施方法および使用方法の包括的な開示および説明を当業者に提供するために記載され、発明者が自身の発明と考えるものの範囲を制限することを意図せず、以下の実験が、実施した全実験または唯一の実験であることを示すことも意図しない。用いられる数（例えば、量、温度など）に関して正確さを確保するために努力がなされてきたが、いくつかの実験誤差および偏差を考慮しなければならない。

40

【0267】

別途特に指示がないかぎり、部は重量部であり、分子量は重量平均分子量であり、温度は摂氏温度（℃）であり、圧力は大気圧または近大気圧である。以下を含む標準略語が用いられ得る：b p＝塩基対（複数可）；K b＝キロベース（複数可）；p l＝ピコリットル（複数可）；sまたはs e c＝秒（複数可）；m i n＝分（複数可）；hまたはh r＝時間（複数可）；a a＝アミノ酸（複数可）；k b＝キロベース（複数可）；n t＝ヌクレオチド（複数可）；n g＝ナノグラム；μ g＝マイクロ

50

グラム；mg＝ミリグラム；g＝グラム；kg＝キログラム；dlまたはdL＝デシリットル；μlまたはμL＝マイクロリットル；mlまたはmL＝ミリメートル；lまたはL＝リットル；μM＝マイクロモル；mM＝ミリモル；M＝モル；kDa＝キロダルトン；im＝筋肉内の（筋肉内で）；ip＝腹腔内の（腹腔内で）；sc＝皮下の（皮下で）；bid＝1日に2回；HPLC＝高速液体クロマトグラフィー；BW＝体重；U＝単位；ns＝統計的に有意でない；PG＝空腹時血漿グルコース；FPI＝空腹時血漿インスリン；ITT＝インスリン耐性試験；PTT＝ビルビン酸耐性試験；oGTT＝経口グルコース負荷試験；GSI＝グルコース刺激インスリン分泌；PBS＝ホスフェート緩衝生理食塩水；PCR＝ポリメラーゼ鎖反応；NHS＝N-ヒドロキシスクシンイミド；DME＝ダルベッコ修飾イーグル培地；GC＝ゲノムコピー；EDTA＝エチレンジアミンテトラ酢酸。

10

【0268】

材料および方法

以下の実施例では、以下の方法および材料が用いられる。

【0269】

動物 12～20週間、60kcal%脂肪、20kcal%タンパク質および20kcal%糖質を含有する高脂肪食餌（D12492、Research Diets, Inc.、New Brunswick、NJ）で、食餌性肥満（DIO）オスC57BL/6Jマウス（The Jackson Laboratory、Bar Harbor、ME）を維持した。全動物試験が、動物実験委員会によって承認された。DIO C57BL/6Jマウスが、肥満のヒト様モデルを提供し、肥満は、カロリーの過剰摂取に基づいている。C57BL/6Jマウスは、肥満傾向があり、明らかな体重増、ならびに高インスリン血症が観察され、時には高血糖が観察されている。この株が、食餌性肥満をモデル化するために最も一般に用いられるマウス株である。（Nilsson C. et al., Acta Pharmacologica Sinica (2012) 33:173-181）。

20

【0270】

核酸およびアミノ酸配列 GenBank受託番号BC000529. 2が、ヒトGDF15変異体をコードするORFのcDNAを示し、GenBank受託番号NP_004855. 2が、当該cDNAによってコードされたアミノ酸配列を示す。ホモサピエンス血清アルブミンcDNAをOrigene（SC319937）から購入した（GenBank受託番号NM_000477. 3、NP_000468）。

30

【0271】

PmeIおよびEcoRI部位の間のpTT5ベクター（National Research Council Canada）に、コザックエレメントおよびヒトIgK-シグナルペプチド配列

(5'-CACCATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTACTCTGGCTC
CGAGGTGCCAGATGT3') (SEQ ID NO: 98)

を挿入した。両制限部位を除去し、更にインフレームクローニングのためにAgeI部位を形成した。hIgK-GDF15コンストラクトを形成するために、フォワードプライマー：

40

5'-CTCCGAGGTGCCAGATGTGCGCGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGG 3' (SEQ ID NO: 102)

およびリバースプライマー：

5'-CCTCGAGCGGCCGCTAGCTCATATGCAGTGGCAGTCTTTGGCTAACAA 3' (SEQ ID NO: 99)

およびSapphire PCR ミックス（Clontech）を用いて、PCRによ

50

ってGDF15 DNAを増幅した。PCR生成物をゲル精製 (Qiagen Gel Extractionキット) し、In-Fusion (Clontech) を用いてpT T5-hlgK (AgeI/HindIIIで線状化) 中にクローン化した。hlgK-HSA-リンカー-GDF15コンストラクトを形成するために、個々に好適なプライマーを用いてPCRによってHSA-リンカーおよびGDF15を増幅した。ゲル精製後、Gibson Assembly Master Mixを用いて、2つのPCRフラグメントおよび線状化pT T5ベクターを構成した。星状またはNEB5α-細胞それぞれをIn-Fusionおよびギブソン反応で形質転換し、カルベニシリンを含有するLB-寒天プレート上にプレートし、37℃で一晩、インキュベートした。単一コロニーを選択し、シーケンシングによって分析した。陽性コロニーからのDNAを精製し (DNA-Maxi-prep、Qiagen)、完全配列を確認し、これを用いて、組換えタンパク質発現のために哺乳動物細胞をトランスフェクトした。

10

【0272】

特定の突然変異タンパク質を形成するために、QuikChange Lightningキット (Agilent) および好適なプライマーで部位特異的突然変異生成を実施した。

【0273】

一時的発現 Expi 293F細胞 (Invitrogen Corporation、Carlsbad、CA) 中で全GDF15突然変異タンパク質を一時的にトランスフェクトした。Expi発現培地 (Invitrogen) 中で、通常通りに細胞を二次培養し、さまざまなサイズの振とうフラスコ中に懸濁培養として維持した。典型的には、細胞を二次培養前に、3日間、成長させ、5e5生存可能細胞/mlの細胞密度で二次培養した。37℃および5%CO₂レベルで維持された加湿CO₂インキュベーター中にフラスコを維持した。120RPMの攪拌速度で、New Brunswickシェーカープラットフォーム (New Brunswick Scientific Company、Edison、NJ) 上に、細胞を維持した。

20

【0274】

培養物の細胞密度が、95%以上の生存能力で2.5e6生存可能細胞/mlに達した場合、トランスフェクションを実施した。典型的には、50mlトランスフェクションでは、250ml振とうフラスコ中で、42.5ml培養容量で、2.5e6細胞/ml X 50ml細胞に接種した。2.5mlOPTI-MEM血清低減培地 (Invitrogen) 中で、目的の遺伝子を含有する発現ベクターからなる50μgプラスミドDNAを最初に希釈した。同時に、また、2.5mlOPTI-MEM血清低減培地中で、Expifectamineトランスフェクション試薬 (Invitrogen) を、2.67倍の容量 (プラスミドDNA量の) に希釈した。室温で5分のインキュベーション後に、トランスフェクションコンピテント複合体を形成するために、ゆっくりと希釈したプラスミドDNAに希釈したトランスフェクション試薬を添加した。室温で20分間のインキュベーション後に、42.5ml細胞培養に5mlのトランスフェクション複合体を添加した。その後、120RPMに維持したオービタルシェーカー上の加湿CO₂インキュベーター中にトランスフェクトされた細胞を入れた。トランスフェクションの24時間後、トランスフェクトされた培養に250μlエンハンサー1溶液 (Invitrogen) および2.5mlエンハンサー2溶液 (Invitrogen) を供給した。その後、再び、オービタルシェーカー上の加湿CO₂インキュベーター中に培養を入れた。トランスフェクションの6~7日後、0.2μmフィルター (Nalgene) を介して濾過する前に、30分間、3000RPMで遠心分離することによって培養を採集した。その後、発現のためのクマシー染色ゲル上で試料を分析した。

30

40

【0275】

安定したCHO細胞発現 CHOK1SV細胞のためのロンザの確立した発現システムに基づいているCHOK1SV GS-KO宿主細胞株によるGS Xceed (商標) システムから安定してGDF15突然変異タンパク質を発現させた。GS Xceedシ

50

テムにより、高発現細胞株が可能になり、c G M P 製造に好適なものが生成される。当該システムは、c G M P バンク化 C H O K 1 S V G S - K O 宿主細胞、G S 発現ベクター、細胞培養の全プロトコール、トランスフェクション、細胞株の選択およびスクリーニング、および V 8 生成プロセス（培地および餌料）を含む。G D F 1 5 突然変異タンパク質のための細胞株を発現するため、製造者の提案した推奨は、最初に非クローン化細胞株を確立するため、以下のとおりである。その後、高発現単一細胞クローンを単離するために、非クローン化細胞株に限界希釈クローニングを行う。

【0276】

G D F 1 5 組換えタンパク質の精製 ブルーセファロースアフィニティーキャプチャーまたはイオン交換キャプチャーを用いて、培養培地から H S A - G D F 1 5 融合を精製した。いずれの場合でも、宿主細胞タンパク質不純物からの最適な溶離および分離の助けとなる好適な塩／pH 条件の勾配を用いて、H S A - G D F 1 5 融合を溶離させた。その後、更に G E H e a l t h c a r e S u p e r d e x 2 0 0 (2 6 / 6 0) カラムを用いて、泳動緩衝液として 1 X P B S を用いて、全 H S A - G D F 1 5 融合を精製した。更に、L C / M S (A g i l e n t 6 5 0 0 - シリーズ Q - T O F) で、精製した融合物を特徴づけ、配列を確認し、ゲルろ過 - H P L C (A g i l e n t 1 2 0 0 - H P L C) ならびにクマシーおよび／またはシルバー染色付き S D S - P A G E ゲル（非還元および還元）によって、単分散性を確認した。i n v i v o 実験では、エンドトキシンが、皮下注入のため 5 E U / m g 未満であることを確認した。

【0277】

イオン交換キャプチャーを用いて、培養培地から G D F 1 5 グリコシル化突然変異タンパク質を精製した。すべての場合で、宿主細胞タンパク質不純物からの溶離および分離の助けとなる好適な塩／pH の勾配を用いて、G D F 1 5 突然変異タンパク質を溶離させた。その後、更に、p H 8 . 0 で、G E H i T r a p P h e n y l H P を用いて、硫酸アンモニウムの直線減少勾配を用いて、全 G D F 1 5 突然変異タンパク質を精製した。非還元 S D S - P A G E ゲル上のゲルシフトによる純度およびグリコシル化特性に基づいて、フラクションを評価し、プールした。その後、更に、L C / M S (A g i l e n t 6 5 0 0 - シリーズ Q - T O F) により、各 G D F 1 5 突然変異タンパク質の最終プールを特徴づけ、配列／グリカンを確認し（+ / - P N G a s e F、NEB カタログ番号 P 0 7 0 4 S）、ゲルろ過 - H P L C (A g i l e n t 1 2 0 0 - H P L C) ならびにクマシーおよび／またはシルバー染色付き S D S - P A G E ゲル（非還元および還元）によって、単分散性を確認した。p H 4 . 0 で、1 0 m M 酢酸ナトリウム中で、全 G D F 1 5 突然変異タンパク質を製剤化した。

【0278】

ヒト G D F 1 5 突然変異タンパク質の溶解度評価 再生ニトロセルロース 1 0、0 0 0 N M W L (U F C 9 0 1 0 9 6) （いくつかの場合では、1 0 m g / m L 超）からなる A m i c o n U l t r a C e n t r i f u g a l F i l t e r s を用いて、0 . 0 1 % (v / v) ギ酸（p H 2 . 0）中に突然変異タンパク質を透析により分離し、濃縮した。2 8 0 n m 波長の吸光度およびベールの法則（吸光係数 = 1 4 4 0 0、分子量 = 1 2、2 8 7 D a）を用いて、各突然変異タンパク質の開始濃度を測定した。その後、0 . 0 1 % ギ酸中に 2 倍に各突然変異タンパク質を連続希釈し、9 6 ウェルプレートに 9 0 μ L の各希釈液を添加した。各ウェルに 1 0 μ L の 1 0 X P B S (0 . 5 M トリス p H 7 . 0 を含有する) を添加し、p H が 7 であることを確認した。続いて一晩、振とうしながら、室温でインキュベーションし、3 7 0 n m で、濁度を測定した。混濁が生じ始める変曲点を各突然変異タンパク質の最大溶解度として受け入れる。それらの溶解度のレベルに応じて、突然変異タンパク質を 5 つの群の 1 つに分類した：< 0 . 2 m g / m L = + ; ≥ 0 . 2 m g / m L = + + ; ≥ 0 . 5 m g / m L = + + + ; ≥ 1 . 0 m g / m L = + + + + ; ≥ 5 . 0 m g / m L = + + + + + 。

【実施例 1】

【0279】

安定化H S A－G D F 1 5融合分子のエンジニアリング

コンストラクトM1の発現が、C H O K 1 S V G S K O安定細胞株中の生成物チャレンジを示した（図4）。細胞培養媒質中で、H S A－G D F 1 5二量体融合分子の有意なクリッピングが観察された。更に特性付けのために濃縮された種の供給源を生成するために、イオン交換および／または疎水性相互作用クロマトグラフィーおよび／またはゲルろ過を用いてクリップ種を単離した。続いて、A g i l e n t 6 5 0 0－シリーズQ－T O F上でL C／M S分析を行い、クリッピングの部位が、H S A融合のC末端、リンカー、およびG D F 1 5のN末端中で、明らかであった。コンストラクトM1からの主な種が、以下のとおり（リンカー＝下線、G D F 1 5＝太字）、確認された。

【0280】

10

種1（SEQ ID NO：103）：

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKT
CVADESAENCCKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP
NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECC
QAADKAACLLPKLDELRLDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKA
EFAEVSKLVTDLTKEVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLE
KSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSV
VLLLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYK
FQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQL
CVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKE
RQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCF AE EGKKLVA
【0281】

20

種2（SEQ ID NO：104）：

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKT
CVADESAENCCKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP
NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECC
QAADKAACLLPKLDELRLDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKA
EFAEVSKLVTDLTKEVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLE
KSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSV
VLLLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYK
FQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQL
CVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKE
RQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCF AE EGKKLVA
ASQAALG

30

40

【0282】

種3（SEQ ID NO：105）：

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKT
CVADESAENCCKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP
NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECC
QAADKAACLLPKLDELRLDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKA
EFAEVSKLVTDLTQVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLE
KSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSV
VLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYK
FQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQL
CVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKE
RQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCFAEEGKKLVA
ASQAALGLG

10

【0283】

種3が、成熟ヒト血清アルブミンアミノ酸配列およびリンカー配列の1つの（第1の）アミノ酸を含むことを明記する。種1および2は、成熟ヒト血清アルブミンアミノ酸配列のC末端で、最後の8つのアミノ酸および最後の1つのアミノ酸を欠損している。

20

【0284】

種4（SEQ ID NO：106）：

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKT
CVADESAENCCKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP
NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECC
QAADKAACLLPKLDELRLDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKA
EFAEVSKLVTDLTQVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLE
KSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSV
VLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYK
FQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQL
CVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKE
RQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCFAEEGKKLVA
ASQAALGLGGGSGGGSGGGGSAR

30

【0285】

種5（SEQ ID NO：107）：

40

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKT
CVADESAENCCKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP
NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECC
QAADKAAACLLPKLDELRLDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKA
EFAEVSKLVTDLTQVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLE
KSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVLGMFLYEYARRHPDYSV
VLLLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYK
FQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQL
CVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKE
RQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVA
ASQAALGLGGGGSGGGGSGGGGSARN

10

【0286】

融合分子のリンカー領域の近くで観察されたクリッピングの問題を最小化し、正すために、コンストラクトM1と同等であるが、GDF15中の最初の3つのN末端側残基が切断された(ΔARNまたはΔN3)コンストラクトM2を設計した(図3)。得られた安定化M2コンストラクトは、CHOK1SV GSKO安定細胞株中で発現した場合、各発現したコンストラクトの条件付き増殖と比較した場合、M1で観察されたものと同じように最小のクリッピングの問題を示した。図4は、M1で観察された重大なクリッピングおよびコンストラクトM2の安定度を示している。

20

【0287】

コンストラクトM2で観察された安定度向上に基づいて、更に最適なリンカー長さおよびクリッピング可能性のためにエンジニアリングを実施した。[(G₄S)]₅の最適化したリンカー長さを実現し、3つの残基(M3-ΔARNまたはΔN3)または6つの残基(M4-ΔARNGDHまたはΔN6)のいずれかのGDF15N末端側欠失とつなげた(図5を参照)。

30

【実施例2】

【0288】

DIOマウスモデルでの安定度向上HSA-GDF15融合分子の体重および食物摂取への作用

7日間にわたり、組換えヒトGDF15に融合された組換えHSAを有する皮下に投与された融合分子の体重および食物摂取への作用を評価した。簡潔にいうと、体重約38g~40gのDIOマウスに、4nmol/kg、12nmol/kgおよび40nmol/kgの用量で、単一皮下ボラス注入(10mL/kg)として、融合タンパク質M1(図3)、M3およびM4(図5)を投与した。ビヒクル対照または融合タンパク質の投与に続いて、有効性をモニターするために、投与後24時間および7日間、体重および食物摂取をモニターした。40nmol/kgの用量で投与されたDIOマウスで得られた結果を図6および7に示している。

40

【0289】

図6に示したとおり、40nmol/kg(4nmol/kgおよび12nmol/kgは、示していない)の用量で融合タンパク質を投与した結果、食物摂取減少に有意な改善がみられた。マウスの各群(n=8)で、対応のないスチューデントのt検定によって、それぞれの特定の時点で、さまざまな濃度での食物摂取をビヒクル対照群と比較して、p値(*、p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001、ns=有意でない)を測定した。

【0290】

50

図6を参照すると、融合タンパク質対ビヒクル対照の投与後24時間(第1日)に、以下の食物摂取減少の結果となった(ビヒクル=2.8g+/-0.13g):4nmol/kg用量群(M1=1.9g+/-0.25g、** ; M3=1.8g+/-0.18g、*** ; M4=1.8g+/-0.10g、***)、12nmol/kg用量群(M1=1.5g+/-0.19g、*** ; M3=1.9g+/-0.16g、*** ; M4=1.7g+/-0.12g、***)、および40nmol/kg用量群(M1=1.3g+/-0.11g、*** ; M3=1.8g+/-0.06g、*** ; M4=1.5g+/-0.15g、***)。融合分子対ビヒクル対照の投与後7日に、以下の食物摂取減少の結果となった(ビヒクル=2.7g+/-0.09g):4nmol/kg用量群(M1=2.0+/-0.18g、** ; M3=2.5g+/-0.08g、ns ; M4=2.5g+/-0.09g、ns)、12nmol/kg用量群(M1=2.0g+/-0.20g、** ; M3=2.2g+/-0.17g、* ; M4=2.4g+/-0.28g、ns)および40nmol/kg用量群(M1=1.7g+/-0.14g、*** ; M3=2.4g+/-0.25g、ns ; M4=2.2g+/-0.24g、ns)。

【0291】

図7に示したとおり、40nmol/kg(4nmol/kgおよび12nmol/kgは、示していない)の用量で融合分子を投与した結果、体重で有意な減少がみられた。マウスの各群(n=8)で、対応のないスチューデントのt検定によって、それぞれの特定の時点で、さまざまな濃度での食物摂取をビヒクル対照群と比較して、p値(*、p<0.05 ; **、p<0.01 ; ***、p<0.001、ns=有意でない)を測定した。

【0292】

図7を参照すると、融合分子対ビヒクル対照の投与前の投与時(第0日)に、以下の体重が記録された(ビヒクル=39.0g+/-0.92g):4nmol/kg用量群(M1=39.2g+/-0.66g ; M3=39.4g+/-0.91g ; M4=39.3g+/-0.77g)、12nmol/kg用量群(M1=39.4g+/-0.78g ; M3=39.3g+/-1.09g ; M4=39.3g+/-0.81g)、および40nmol/kg用量群(M1=39.2g+/-0.64g ; M3=39.2g+/-0.68g ; M4=38.9g+/-0.60g)。融合分子対ビヒクル対照の投与後24時間(第1日)に、以下の体重が記録された(%減少=デルタ差対投与前の用量群の体重)。ビヒクル=+0.3g+/-0.11g、+0.6%)、4nmol/kg用量群(M1=-0.6g+/-0.21g、-1.5%、*** ; M3=-0.6g+/-0.17g、-1.6%、*** ; M4=-0.9g+/-0.13g、-2.4%、***)、12nmol/kg用量群(M1=-0.9g+/-0.11g、-2.3%、*** ; M3=-0.7g+/-0.18g、-1.6%、*** ; M4=-0.6g+/-0.16g、-1.7%、***)、および40nmol/kg用量群(M1=-1.0g+/-0.14g、-2.5%、*** ; M3=-0.6g+/-0.09g、-1.5%、*** ; M4=-0.8g+/-0.22g、-2.1%、***)。融合分子対ビヒクル対照の投与後7日に、以下の体重が記録された(%減少=デルタ差対投与前の用量群の体重)。ビヒクル=+1.2g+/-0.25g、+3.1%)、4nmol/kg用量群(M1=-1.3g+/-0.30g、-3.3%、*** ; M3=-1.1g+/-0.32g、-2.8%、*** ; M4=-2.0g+/-0.29g、-5.0%、***)、12nmol/kg用量群(M1=-1.8g+/-0.34g、-4.7%、*** ; M3=-1.4g+/-0.43g、-3.6%、*** ; M4=-1.5g+/-0.32g、-3.7%、***)、および40nmol/kg用量群(M1=-2.6g+/-0.28g、-6.7%、*** ; M3=-2.1g+/-0.28g、-5.4%、*** ; M4=-2.6g+/-0.31g、-6.7%、***)。

【0293】

10

20

30

40

50

図6および7のデータは、リンカー最適化およびGDF15のN末端側切断を有するHSA融合が、活性があること、およびかかる融合分子が、GDF15分子の特定の有益な特性を向上させるための実行可能なアプローチであることを示す。

【実施例3】

【0294】

改善した物理的特性を有するヒトGDF15突然変異タンパク質

実施例3に記載されたデータは、成熟ヒトGDF15に固有の表面疎水性および親水性と関係している溶解度限界を扱う。また、成熟ヒトGDF15の配列にN結合グリコシル化コンセンサス部位（複数可）を導入することの溶解度への作用を評価した。成熟組換えヒトGDF15突然変異タンパク質の発現特性；グリコシル化特性および溶解度の評価を容易にするために、図8Aに示したとおり、IgKシグナルペプチド配列と融合された成熟突然変異タンパク質として、すべてを構成した。17のGDF15突然変異タンパク質（それぞれM5～M21；SEQ ID NO：81～97と示した）を生成した。M16では、N末端側欠損型：ΔN3-M16突然変異タンパク質を生成し、その溶解度を測定した。M5突然変異タンパク質は、wt GDF15（SEQ ID NO：1）中の位置5のDをTと置換することによって、およびwt GDF15（SEQ ID NO：1）中の位置21のRをNと置換することによって導入された2つのN結合グリコシル化コンセンサス部位を含有する。突然変異タンパク質M6～M21では、1つのN結合グリコシル化コンセンサス部位を導入した（図8Aを参照）。突然変異タンパク質は、置換の位置を表す目的でN末端にIgKシグナル配列を含むが、SEQ ID NO：1中の対応する残基の位置として残基をナンバリングすることを明記する。したがって、例えば、Tは、M5突然変異タンパク質中の位置27に存在しているが、SEQ ID NO：1中の対応するD残基に位置は、5であるため、位置5として表される。

【0295】

10X PBS + 0.5M トリス pH 7.0 中で、成熟ヒトGDF15と比較して突然変異タンパク質の溶解度の改善を評価することができるストリンジェント緩衝剤のスパイクによって、突然変異タンパク質（0.01%ギ酸中）に対する溶解度評価を実施した。

【0296】

吸光係数（成熟ヒトGDF15 = 14,400 / モノマー）および分子量（成熟ヒトGDF15 = 12,278 Da / モノマー）を用いて計算し、ベールの法則を用いて、280 nmの吸光度に基づいて、溶解度の評価を決定した。

【0297】

溶解度を評価する前に、折りたたまれたGDF15ホモ二量体としての哺乳動物組織培養媒質への分泌およびN-グリカン部位占有について、図8Aに記載された遺伝子操作されたN-グリカン突然変異タンパク質およびΔN3-M16突然変異タンパク質のそれぞれを評価した。図9に記載したとおり、18のグリコシル化突然変異タンパク質のうち14が、折りたたまれたGDF15ホモ二量体として分泌され、一方、M8、M10、M14およびM15の結果では、二量体が形成されず、凝集物として発現された。その後、条件付き培地から精製後のコンセンサス部位上のN-グリカン基の占有を測定するために、LC/MSおよびSDS-PAGEゲルシフトによって、ホモ二量体として分泌された14の発現したグリコシル化突然変異タンパク質のすべてを評価した。14のすべての場合で、発現した突然変異タンパク質が、高程度の占有を含有し、物理的特性、例えば、溶解度の改善について、サブセットを分析した。

【0298】

溶解度の改善について、成熟ヒトGDF15と比較して、ホモ二量体として分泌され、コンセンサス部位内に高グリカン占有を保持した、操作されたN-グリカンGDF15突然変異タンパク質をモニターした。混濁が生じ始める変曲点を各突然変異タンパク質の最大溶解度として受け入れる。それらの溶解度のレベルに応じて、突然変異タンパク質を5つの群の1つに分類した：< 0.2 mg/mL = +；≥ 0.2 mg/mL = ++；≥ 0.5 mg/mL = +++；≥ 1.0 mg/mL = ++++；≥ 5.0 mg/mL = +++++

＋。評価したN－グリカンGDF15突然変異タンパク質のそれぞれが、成熟ヒトGDF15と比較して溶解度の改善を示した：M5：++++、M7：+++、M11：++++、M12：+++、M13：++++、M16：+++++、ΔN3－M16：+++++、M17：+++++、M20：++++、M21：+++。

【実施例4】

【0299】

DIOマウスモデルでのM16、ΔN3－M16およびM17突然変異タンパク質の食物摂取への作用

皮下に投与された糖突然変異タンパク質（glycomut ein）の食物摂取への作用を評価した。糖突然変異タンパク質M16（SEQ ID NO：92）およびM17（SEQ ID NO：93）は上述の実施例3に記載されている。ΔN3－M16として示される糖突然変異タンパク質も評価した。ΔN3－M16糖突然変異タンパク質の配列を以下に提供する。

mdmrvpaqlglglwlrgrarcGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREV

QVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQNNTTGVSL

QTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO: 100)

【0300】

マウスに投与されたポリペプチドは、IgKシグナル配列が、細胞（293細胞）により発現したシグナルペプチダーゼによって、分泌されたポリペプチドから切断されているため、IgKシグナル配列（mdmrvpaqlglglwlrgrarc、SEQ ID NO：101）を含まないことを明記する。

【0301】

図10を参照すると、17週齢オスDIOマウス（n＝9）に、単一1.0mg/kg（40nmol/kg）用量のPBSビヒクル、成熟ヒトGDF15またはN－グリカン突然変異タンパク質を皮下投与した。皮下投与後の24時間にわたって、食物摂取（グラム/動物）をモニターした。対応のないスチューデントのt検定によって、ビヒクル（PBS）対照群と比較して、P値を測定した。

【0302】

図10に示したとおり、糖突然変異タンパク質の投与の結果、食物摂取が減少した。マウスの各群で、対応のないスチューデントのt検定によって、食物摂取をビヒクル対照群と比較して、p値（*、p<0.05；**、p<0.01；***、p<0.001）を測定した。野生型GDF15でも、食物摂取が減少した。

【実施例5】

【0303】

DIOマウスモデルでのM16、ΔN3－M16およびM17突然変異タンパク質の体重への作用

皮下に投与された糖突然変異タンパク質の体重への作用を評価した。17週齢オスDIOマウス（n＝9）に、単一1.0mg/kg（40nmol/kg）用量のPBSビヒクル、成熟ヒトGDF15またはN－グリカン突然変異タンパク質（M16、M17、およびΔN3－M16）を皮下投与した。皮下投与後の24時間にわたって、体重をモニターした。対応のないスチューデントのt検定によって、ビヒクル（PBS）対照群と比較して、P値を測定した。

【0304】

糖突然変異タンパク質の投与の結果、体重が減少した（図11）。マウスの各群で、対応のないスチューデントのt検定によって、食物摂取をビヒクル対照群と比較して、p値（*、p<0.05；**、p<0.01；***、p<0.001）を測定した。野生型GDF15でも、体重が減少した。

【0305】

本発明の特定の実施形態は、本発明を実施するために発明者らに知られた最も好ましい

10

20

30

40

50

方法を含み、本明細書に記載される。前述の説明を読む場合、開示された実施形態の変更は、当技術分野に従事する者には明らかである可能性があり、当業者が、適宜、かかる変更を用いてよいと推測される。したがって、本発明が、特に本明細書に記載されたものと別の方法で実施されること、および本発明が、適用法令によって許可される通り、本明細書に添付された請求項に記載の対象事項のすべての修正および同等物を含むことを意図する。更に、本明細書に別段に指示しない限り、または、文脈により明確に否定しない限り、上記の要素の可能な変更すべてにおいて、上記の要素のあらゆる組み合わせが、本発明に含まれる。

【0306】

本明細書に示した文献、特許出願、登録番号、および他の参照のすべてが、あたかも個々の文献または特許出願それぞれが、特定の、個々に参照によって組み込まれるように示されたように、参照によって本明細書に組み込まれる。

10

【図1】

野生型GDF15 (SEQ ID NO: 1) と共に整列させたグリコシル化突然変異体 (1~17とナンバリング; SEQ ID NO: 2~18)

	1	10	20	30	40	50
WT	ARNGDHCP	LGPRCCRLH	TVRASLED	LGWADV	LSPREVQ	VMTCIGAC
1	ARNGTHCP	LGPRCCRLH	TVRASLED	LGWADV	LSPREVQ	VMTCIGAC
2	ARNGDHCP	LGPRCCRLH	TVRASLED	LGWADV	LSPREVQ	VMTCIGAC
3	ARNGDHCP	LGPRCCRLH	TVRASLED	LGWADV	LSPREVQ	VMTCIGAC
4	ARNGDHCP	LGPRCCRLH	TVRASLED	LGWADV	LSPREVQ	VMTCIGAC
5	ARNGDHCP	LGPRCCRLH	TVRASLED	LGWADV	LSPREVQ	VMTCIGAC
6	ARNGDHCP	LGPRCCRLH	TVRASLED	LGWADV	LSPREVQ	VMTCIGAC
7	ARNGDHCP	LGPRCCRLH	TVRASLED	LGWADV	LSPREVQ	VMTCIGAC
8	ARNGDHCP	LGPRCCRLH	TVRASLED	LGWADV	LSPREVQ	VMTCIGAC
9	ARNGDHCP	LGPRCCRLH	TVRASLED	LGWADV	LSPREVQ	VMTCIGAC
10	ARNGDHCP	LGPRCCRLH	TVRASLED	LGWADV	LSPREVQ	VMTCIGAC
11	ARNGDHCP	LGPRCCRLH	TVRASLED	LGWADV	LSPREVQ	VMTCIGAC
12	ARNGDHCP	LGPRCCRLH	TVRASLED	LGWADV	LSPREVQ	VMTCIGAC
13	ARNGDHCP	LGPRCCRLH	TVRASLED	LGWADV	LSPREVQ	VMTCIGAC
14	ARNGDHCP	LGPRCCRLH	TVRASLED	LGWADV	LSPREVQ	VMTCIGAC
15	ARNGDHCP	LGPRCCRLH	TVRASLED	LGWADV	LSPREVQ	VMTCIGAC
16	ARNGDHCP	LGPRCCRLH	TVRASLED	LGWADV	LSPREVQ	VMTCIGAC
17	ARNGDHCP	LGPRCCRLH	TVRASLED	LGWADV	LSPREVQ	VMTCIGAC

	61	70	80	90	100	110
WT	IKTSLHRLK	PDTVPAPCC	VPA	SYNPMV	LQIKTD	TVGSLQTYD
1	IKTSLHRLK	PDTVPAPCC	VPA	SYNPMV	LQIKTD	TVGSLQTYD
2	IKTSLHRLK	PDTVPAPCC	VPA	SYNPMV	LQIKTD	TVGSLQTYD
3	IKTSLHRLK	PDTVPAPCC	VPA	SYNPMV	LQIKTD	TVGSLQTYD
4	IKTSLHRLK	PDTVPAPCC	VPA	SYNPMV	LQIKTD	TVGSLQTYD
5	IKTSLHRLK	PDTVPAPCC	VPA	SYNPMV	LQIKTD	TVGSLQTYD
6	IKTSLHRLK	PDTVPAPCC	VPA	SYNPMV	LQIKTD	TVGSLQTYD
7	IKTSLHRLK	PDTVPAPCC	VPA	SYNPMV	LQIKTD	TVGSLQTYD
8	IKTSLHRLK	PDTVPAPCC	VPA	SYNPMV	LQIKTD	TVGSLQTYD
9	IKTSLHRLK	PDTVPAPCC	VPA	SYNPMV	LQIKTD	TVGSLQTYD
10	IKTSLHRLK	PDTVPAPCC	VPA	SYNPMV	LQIKTD	TVGSLQTYD
11	IKTSLHRLK	PDTVPAPCC	VPA	SYNPMV	LQIKTD	TVGSLQTYD
12	IKTSLHRLK	PDTVPAPCC	VPA	SYNPMV	LQIKTD	TVGSLQTYD
13	IKTSLHRLK	PDTVPAPCC	VPA	SYNPMV	LQIKTD	TVGSLQTYD
14	IKTSLHRLK	PDTVPAPCC	VPA	SYNPMV	LQIKTD	TVGSLQTYD
15	IKTSLHRLK	PDTVPAPCC	VPA	SYNPMV	LQIKTD	TVGSLQTYD
16	IKTSLHRLK	PDTVPAPCC	VPA	SYNPMV	LQIKTD	TVGSLQTYD
17	IKTSLHRLK	PDTVPAPCC	VPA	SYNPMV	LQIKTD	TVGSLQTYD

【図2】

野生型GDF15 (SEQ ID NO: 1) と共に整列させたグリコシル化ΔN3突然変異体 (18~34とナンバリング; SEQ ID NO: 19~35)

	1	10	20	30	40	50
WT	ARNGDHCP	LGPRCCRLH	TVRASLED	LGWADV	LSPREVQ	VMTCIGAC
18	GTNCP	LGPRCCRLH	TVRASLED	LGWADV	LSPREVQ	VMTCIGAC
19	GDHCP	LGPRCCRLH	TVRASLED	LGWADV	LSPREVQ	VMTCIGAC
20	GDHCP	LGPRCCRLH	TVRASLED	LGWADV	LSPREVQ	VMTCIGAC
21	GDHCP	LGPRCCRLH	TVRASLED	LGWADV	LSPREVQ	VMTCIGAC
22	GDHCP	LGPRCCRLH	TVRASLED	LGWADV	LSPREVQ	VMTCIGAC
23	GDHCP	LGPRCCRLH	TVRASLED	LGWADV	LSPREVQ	VMTCIGAC
24	GDHCP	LGPRCCRLH	TVRASLED	LGWADV	LSPREVQ	VMTCIGAC
25	GDHCP	LGPRCCRLH	TVRASLED	LGWADV	LSPREVQ	VMTCIGAC
26	GDHCP	LGPRCCRLH	TVRASLED	LGWADV	LSPREVQ	VMTCIGAC
27	GDHCP	LGPRCCRLH	TVRASLED	LGWADV	LSPREVQ	VMTCIGAC
28	GDHCP	LGPRCCRLH	TVRASLED	LGWADV	LSPREVQ	VMTCIGAC
29	GDHCP	LGPRCCRLH	TVRASLED	LGWADV	LSPREVQ	VMTCIGAC
30	GDHCP	LGPRCCRLH	TVRASLED	LGWADV	LSPREVQ	VMTCIGAC
31	GDHCP	LGPRCCRLH	TVRASLED	LGWADV	LSPREVQ	VMTCIGAC
32	GDHCP	LGPRCCRLH	TVRASLED	LGWADV	LSPREVQ	VMTCIGAC
33	GDHCP	LGPRCCRLH	TVRASLED	LGWADV	LSPREVQ	VMTCIGAC
34	GDHCP	LGPRCCRLH	TVRASLED	LGWADV	LSPREVQ	VMTCIGAC

	61	70	80	90	100	110
WT	IKTSLHRLK	PDTVPAPCC	VPA	SYNPMV	LQIKTD	TVGSLQTYD
18	IKTSLHRLK	PDTVPAPCC	VPA	SYNPMV	LQIKTD	TVGSLQTYD
19	IKTSLHRLK	PDTVPAPCC	VPA	SYNPMV	LQIKTD	TVGSLQTYD
20	IKTSLHRLK	PDTVPAPCC	VPA	SYNPMV	LQIKTD	TVGSLQTYD
21	IKTSLHRLK	PDTVPAPCC	VPA	SYNPMV	LQIKTD	TVGSLQTYD
22	IKTSLHRLK	PDTVPAPCC	VPA	SYNPMV	LQIKTD	TVGSLQTYD
23	IKTSLHRLK	PDTVPAPCC	VPA	SYNPMV	LQIKTD	TVGSLQTYD
24	IKTSLHRLK	PDTVPAPCC	VPA	SYNPMV	LQIKTD	TVGSLQTYD
25	IKTSLHRLK	PDTVPAPCC	VPA	SYNPMV	LQIKTD	TVGSLQTYD
26	IKTSLHRLK	PDTVPAPCC	VPA	SYNPMV	LQIKTD	TVGSLQTYD
27	IKTSLHRLK	PDTVPAPCC	VPA	SYNPMV	LQIKTD	TVGSLQTYD
28	IKTSLHRLK	PDTVPAPCC	VPA	SYNPMV	LQIKTD	TVGSLQTYD
29	IKTSLHRLK	PDTVPAPCC	VPA	SYNPMV	LQIKTD	TVGSLQTYD
30	IKTSLHRLK	PDTVPAPCC	VPA	SYNPMV	LQIKTD	TVGSLQTYD
31	IKTSLHRLK	PDTVPAPCC	VPA	SYNPMV	LQIKTD	TVGSLQTYD
32	IKTSLHRLK	PDTVPAPCC	VPA	SYNPMV	LQIKTD	TVGSLQTYD
33	IKTSLHRLK	PDTVPAPCC	VPA	SYNPMV	LQIKTD	TVGSLQTYD
34	IKTSLHRLK	PDTVPAPCC	VPA	SYNPMV	LQIKTD	TVGSLQTYD

【図 3】

M1融合タンパク質：1 g Kシグナル配列（小文字）がHSAアミノ酸配列に融合されており、それが〔Gly-Ser〕₃リンカー（下線）と共に成熟ヒトGDF15（太字）のN末端に融合されている（SEQ ID NO：77）

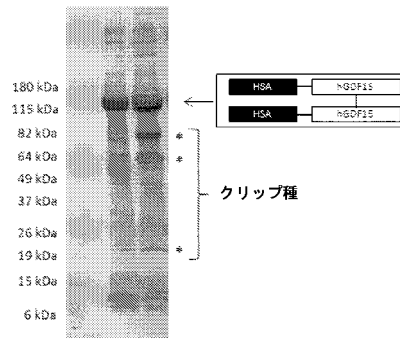
mdmrpqaqlgl111lwlrgarcDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQCCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVA
DESAENCOKSLHTLFGDKLCIVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECF LQHKDDNPNLRLVRPEVDVMCTAFHDNEE
TFLKKYLVEIARRHPFYFAPELLFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLDELDRDEGKASSAKQRLKASLQKFGER
AFKAWAVARLSQRFFKAEFAEVSKLVDTLTKVHTCCGDLLECCADRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEK
SHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCKNYAEAKDVLGMFLYEYARRHPDYSVLLRLAKTYETTLKCCAA
ADPHECYAKVDEFKPLV EEPQNLKQNCLEFQELGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGRVGSCKCKH
PEAKRMPCAEEDYLSV LNLQCLV LHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDITYPKFENASTFTFHADICTLS
EKERQIKKQIALVELV LKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFEKCKCKADDDKECTFAEEGKKLV AASQAALGLGGGSGGGG
SGGGSGARNGDHCP LGGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPD
TVPAPCCVPASYNPMVL IQKTD TGVS LQTYDDLLAKDCHCI

M2融合タンパク質：1 g Kシグナル配列（小文字）がHSAアミノ酸配列に融合されており、それが〔Gly-Ser〕₃リンカー（下線）と共に、3つのアミノ酸欠失（ΔARN）を含有する成熟ヒトGDF15（太字）のN末端に融合されている（SEQ ID NO：78）

mdmrpqaqlgl111lwlrgarcDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQCCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVA
DESAENCOKSLHTLFGDKLCIVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECF LQHKDDNPNLRLVRPEVDVMCTAFHDNEE
TFLKKYLVEIARRHPFYFAPELLFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLDELDRDEGKASSAKQRLKASLQKFGER
AFKAWAVARLSQRFFKAEFAEVSKLVDTLTKVHTCCGDLLECCADRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEK
SHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCKNYAEAKDVLGMFLYEYARRHPDYSVLLRLAKTYETTLKCCAA
ADPHECYAKVDEFKPLV EEPQNLKQNCLEFQELGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGRVGSCKCKH
PEAKRMPCAEEDYLSV LNLQCLV LHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDITYPKFENASTFTFHADICTLS
EKERQIKKQIALVELV LKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFEKCKCKADDDKECTFAEEGKKLV AASQAALGLGGGSGGGG
SGGGSGGDHCP LGGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPD
TVPAPCCVPASYNPMVL IQKTD TGVS LQTYDDLLAKDCHCI

【図 4】

コンストラクト：M2 M1



【図 5】

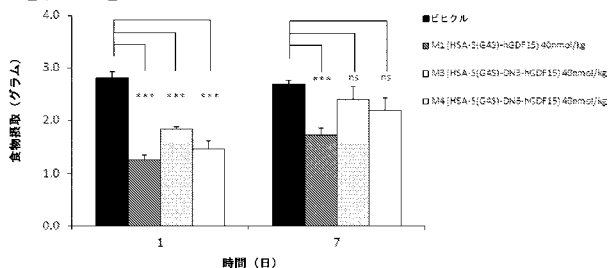
M3融合タンパク質：1 g Kシグナル配列（小文字）がHSAアミノ酸配列に融合されており、それが〔Gly-Ser〕₃リンカー（下線）と共に、3つのアミノ酸欠失（ΔARNまたはΔN3と示した）を含有する成熟ヒトGDF15（太字）アミノ酸配列のN末端に融合されている（SEQ ID NO：79）

mdmrpqaqlgl111lwlrgarcDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQCCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVA
DESAENCOKSLHTLFGDKLCIVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECF LQHKDDNPNLRLVRPEVDVMCTAFHDNEE
TFLKKYLVEIARRHPFYFAPELLFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLDELDRDEGKASSAKQRLKASLQKFGER
AFKAWAVARLSQRFFKAEFAEVSKLVDTLTKVHTCCGDLLECCADRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEK
SHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCKNYAEAKDVLGMFLYEYARRHPDYSVLLRLAKTYETTLKCCAA
ADPHECYAKVDEFKPLV EEPQNLKQNCLEFQELGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGRVGSCKCKH
PEAKRMPCAEEDYLSV LNLQCLV LHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDITYPKFENASTFTFHADICTLS
EKERQIKKQIALVELV LKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFEKCKCKADDDKECTFAEEGKKLV AASQAALGLGGGSGGGG
SGGGSGGDHCP LGGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPD
TVPAPCCVPASYNPMVL IQKTD TGVS LQTYDDLLAKDCHCI

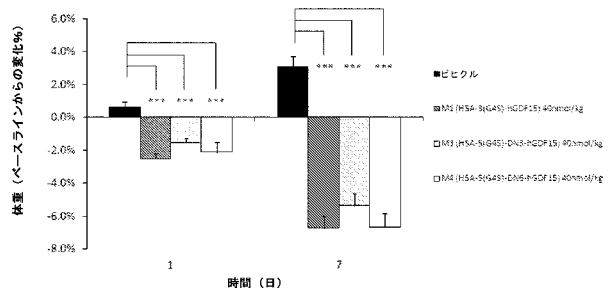
M4融合タンパク質：1 g Kシグナル配列（小文字）がHSAアミノ酸配列に融合されており、それが〔Gly-Ser〕₃リンカー（下線）と共に、6つのアミノ酸欠失（ΔARNGDHまたはΔN6と示した）を含有する成熟ヒトGDF15（太字）アミノ酸配列のN末端に融合されている（SEQ ID NO：80）

mdmrpqaqlgl111lwlrgarcDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQCCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVA
DESAENCOKSLHTLFGDKLCIVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECF LQHKDDNPNLRLVRPEVDVMCTAFHDNEE
TFLKKYLVEIARRHPFYFAPELLFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLDELDRDEGKASSAKQRLKASLQKFGER
AFKAWAVARLSQRFFKAEFAEVSKLVDTLTKVHTCCGDLLECCADRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEK
SHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCKNYAEAKDVLGMFLYEYARRHPDYSVLLRLAKTYETTLKCCAA
ADPHECYAKVDEFKPLV EEPQNLKQNCLEFQELGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGRVGSCKCKH
PEAKRMPCAEEDYLSV LNLQCLV LHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDITYPKFENASTFTFHADICTLS
EKERQIKKQIALVELV LKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFEKCKCKADDDKECTFAEEGKKLV AASQAALGLGGGSGGGG
SGGGSGGDLGCP LGGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPD
TVPAPCCVPASYNPMVL IQKTD TGVS LQTYDDLLAKDCHCI

【図 6】



【図 7】



【図 8 A－1】

成熟ヒト G D F 1 5（太字）アミノ酸配列の N 末端に融合された 1 ｇ K シグナル配列（小文字）を含む ｈ G D F 1 5 グリコシル化突然変異タンパク質

M5 - (SEQ ID NO: 81)
mdmrvpagllgllllwlr garc**ARNGDHCPLGPGRC**CLHTV**NASLED**LGWADWVLS**PREVQV**TM**CIGAC**
PSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLI**QKTD**TGVSLQTYDDLLAKDCHCI

M6 - (SEQ ID NO: 82)
mdmrvpagllgllllwlr garc**ARNGDHCPLGPGRC**CLNTTV**RASLED**LGWADWVLS**PREVQV**TM**CIGAC**
PSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLI**QKTD**TGVSLQTYDDLLAKDCHCI

M7 - (SEQ ID NO: 83)
mdmrvpagllgllllwlr garc**ARNGDHCPLGPGRC**CLHTV**RANL**TDLGWADWVLS**PREVQV**TM**CIGAC**
PSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLI**QKTD**TGVSLQTYDDLLAKDCHCI

M8 - (SEQ ID NO: 84)
mdmrvpagllgllllwlr garc**ARNGDHCPLGPGRC**CLHTV**RASNET**LGWADWVLS**PREVQV**TM**CIGAC**
PSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLI**QKTD**TGVSLQTYDDLLAKDCHCI

M9 - (SEQ ID NO: 85)
mdmrvpagllgllllwlr garc**ARNGDHCPLGPGRC**CLHTV**RASLED**LGWADWVLS**PREVQV**TM**CIGAC**
PNQTRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLI**QKTD**TGVSLQTYDDLLAKDCHCI

M10 - (SEQ ID NO: 86)
mdmrvpagllgllllwlr garc**ARNGDHCPLGPGRC**CLHTV**RASLED**LGWADWVLS**PREVQV**TM**CIGAC**
PSNFTAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLI**QKTD**TGVSLQTYDDLLAKDCHCI

M11 - (SEQ ID NO: 87)
mdmrvpagllgllllwlr garc**ARNGDHCPLGPGRC**CLHTV**RASLED**LGWADWVLS**PREVQV**TM**CIGAC**
PSQNRTANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLI**QKTD**TGVSLQTYDDLLAKDCHCI

M12 - (SEQ ID NO: 88)
mdmrvpagllgllllwlr garc**ARNGDHCPLGPGRC**CLHTV**RASLED**LGWADWVLS**PREVQV**TM**CIGAC**
PSQFNATNMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLI**QKTD**TGVSLQTYDDLLAKDCHCI

M13 - (SEQ ID NO: 89)
mdmrvpagllgllllwlr garc**ARNGDHCPLGPGRC**CLHTV**RASLED**LGWADWVLS**PREVQV**TM**CIGAC**
PSQFRAANMHAQIKTNLTRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLI**QKTD**TGVSLQTYDDLLAKDCHCI

M14 - (SEQ ID NO: 90)
mdmrvpagllgllllwlr garc**ARNGDHCPLGPGRC**CLHTV**RASLED**LGWADWVLS**PREVQV**TM**CIGAC**
PSQFRAANMHAQIKTSNHTLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLI**QKTD**TGVSLQTYDDLLAKDCHCI

【図 8 B－1】

成熟ヒト G D F 1 5 アミノ酸配列の N 末端に融合された 1 ｇ K シグナル配列を含む ｈ G D F 1 5 グリコシル化突然変異タンパク質（図 8 A に示したとおり）をコードする核酸配列

M5 をコードする核酸配列

atggacatgaggggtccccgcctcagctcctggggctcctgctactctgggtccgaggtgccagat
gtGCGCGCAACGGGACTCAGTGCCTCGGGCCCCGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTGCAA
CGCGTCGCTGGAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTCGCCACGGGAGGTGCAAGTGACC
ATGTGCATCGGCGCTGCCGAGCCAGTTCCGGCGGGCAAAATGCACGCGCAGATCAAGACGA
GCCTGCACCGCCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCCGCCAGCTACAATCC
CATGGTGCTCATTCAAAGACCGACACCGGGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCC
AAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID NO: 108)

M6 をコードする核酸配列

atggacatgaggggtccccgcctcagctcctggggctcctgctactctgggtccgaggtgccagat
gtGCGCGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCCGGCGTTGCTGCAATCTGACACCGTGCCG
CGCGTCGCTGGAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTCGCCACGGGAGGTGCAAGTGACC
ATGTGCATCGGCGCTGCCGAGCCAGTTCCGGCGGGCAAAATGCACGCGCAGATCAAGACGA
GCCTGCACCGCCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCCGCCAGCTACAATCC
CATGGTGCTCATTCAAAGACCGACACCGGGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCC
AAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID NO: 109)

M7 をコードする核酸配列

atggacatgaggggtccccgcctcagctcctggggctcctgctactctgggtccgaggtgccagat
gtGCGCGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCCGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTGCCG
CGCGAACCTGACGGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTCGCCACGGGAGGTGCAAGTGACC
ATGTGCATCGGCGCTGCCGAGCCAGTTCCGGCGGGCAAAATGCACGCGCAGATCAAGACGA
GCCTGCACCGCCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCCGCCAGCTACAATCC
CATGGTGCTCATTCAAAGACCGACACCGGGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCC
AAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID NO: 110)

【図 8 A－2】

M15 - (SEQ ID NO: 91)
mdmrvpagllgllllwlr garc**ARNGDHCPLGPGRC**CLHTV**RASLED**LGWADWVLS**PREVQV**TM**CIGAC**
PSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPANYTPMVLI**QKTD**TGVSLQTYDDLLAKDCHCI

M16 - (SEQ ID NO: 92)
mdmrvpagllgllllwlr garc**ARNGDHCPLGPGRC**CLHTV**RASLED**LGWADWVLS**PREVQV**TM**CIGAC**
PSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLI**QNTTT**TGVSLQTYDDLLAKDCHCI

M17 - (SEQ ID NO: 93)
mdmrvpagllgllllwlr garc**ARNGDHCPLGPGRC**CLHTV**RASLED**LGWADWVLS**PREVQV**TM**CIGAC**
PSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLI**QKNTTT**TGVSLQTYDDLLAKDCHCI

M18 - (SEQ ID NO: 94)
mdmrvpagllgllllwlr garc**ARNGDHCPLGPGRC**CLHTV**RASLED**LGWADWVLS**PREVQV**TM**CIGAC**
PSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLI**QKTDNGT**SLQTYDDLLAKDCHCI

M19 - (SEQ ID NO: 95)
mdmrvpagllgllllwlr garc**ARNGDHCPLGPGRC**CLHTV**RASLED**LGWADWVLS**PREVQV**TM**CIGAC**
PSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLI**QKTD**TGNSTQTYDDLLAKDCHCI

M20 - (SEQ ID NO: 96)
mdmrvpagllgllllwlr garc**ARNGDHCPLGPGRC**CLHTV**RASLED**LGWADWVLS**PREVQV**TM**CIGAC**
PSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLI**QKTD**TGVNLTQTYDDLLAKDCHCI

M21 - (SEQ ID NO: 97)
mdmrvpagllgllllwlr garc**ARNGDHCPLGPGRC**CLHTV**RASLED**LGWADWVLS**PREVQV**TM**CIGAC**
PSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLI**QKTD**TGVSLQTYDDLLNK**TCHCI**

【図 8 B－2】

M8 をコードする核酸配列

atggacatgaggggtccccgcctcagctcctggggctcctgctactctgggtccgaggtgccagat
gtGCGCGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCCGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTGCCG
CGCGTCGATGAACCCCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTCGCCACGGGAGGTGCAAGTGACC
ATGTGCATCGGCGCGTGCCCGAGCCAGTTCCGGCGGGCAAAATGCACGCGCAGATCAAGACGA
GCCTGCACCGCCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCCGCCAGCTACAATCC
CATGGTGCTCATTCAAAGACCGACACCGGGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCC
AAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID NO: 111)

M9 をコードする核酸配列

atggacatgaggggtccccgcctcagctcctggggctcctgctactctgggtccgaggtgccagat
gtGCGCGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCCGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTGCCG
CGCGTCGCTGGAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTCGCCACGGGAGGTGCAAGTGACC
ATGTGCATCGGCGCGTGCCCGAACAGACCCCGGGCGGCAAAATGCACGCGCAGATCAAGACGA
GCCTGCACCGCCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCCGCCAGCTACAATCC
CATGGTGCTCATTCAAAGACCGACACCGGGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCC
AAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID NO: 112)

M10 をコードする核酸配列

atggacatgaggggtccccgcctcagctcctggggctcctgctactctgggtccgaggtgccagat
gtGCGCGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCCGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTGCCG
CGCGTCGCTGGAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTCGCCACGGGAGGTGCAAGTGACC
ATGTGCATCGGCGCGTGCCCGAGCAACTTCACGGCGGCAAAATGCACGCGCAGATCAAGACGA
GCCTGCACCGCCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCCGCCAGCTACAATCC
CATGGTGCTCATTCAAAGACCGACACCGGGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCC
AAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID NO: 113)

M11 をコードする核酸配列

atggacatgaggggtccccgcctcagctcctggggctcctgctactctgggtccgaggtgccagat
gtGCGCGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCCGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTGCCG
CGCGTCGCTGGAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTCGCCACGGGAGGTGCAAGTGACC
ATGTGCATCGGCGCGTGCCCGAGCAGAACCGGACGGCAAAATGCACGCGCAGATCAAGACGA
GCCTGCACCGCCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCCGCCAGCTACAATCC
CATGGTGCTCATTCAAAGACCGACACCGGGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCC
AAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID NO: 114)

【図 8 B－3】

M12をコードする核酸配列

atggacatgaggggtccccgctcagctcctggggctcctgctactctgggtccgaggtgccagat
gtGCGCGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCG
CGCGTCGCTGGAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTGCCACGGGAGGTGCAAGTGACC
ATGTGCATCGGCGCGTGCCTGAGCCAGTTCAACGCGACGAACATGCACGCGCAGATCAAGACGA
GCCTGCACCGCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCTGCCGACGATACAATCC
CATGGTGCTCATTTCAAAGACCGACACCGGGGTGTGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCC
AAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID NO: 115)

M13をコードする核酸配列

atggacatgaggggtccccgctcagctcctggggctcctgctactctgggtccgaggtgccagat
gtGCGCGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCG
CGCGTCGCTGGAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTGCCACGGGAGGTGCAAGTGACC
ATGTGCATCGGCGCGTGCCTGAGCCAGTTCCGGCGGCAAAACATGCACGCGCAGATCAAGACGA
ACCTGACCGCCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCTGCCGACGATACAATCC
CATGGTGCTCATTTCAAAGACCGACACCGGGGTGTGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCC
AAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID NO: 116)

M14をコードする核酸配列

atggacatgaggggtccccgctcagctcctggggctcctgctactctgggtccgaggtgccagat
gtGCGCGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCG
CGCGTCGCTGGAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTGCCACGGGAGGTGCAAGTGACC
ATGTGCATCGGCGCGTGCCTGAGCCAGTTCCGGCGGCAAAACATGCACGCGCAGATCAAGACGA
GCAACACACCCCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCTGCCGACGATACAATCC
CATGGTGCTCATTTCAAAGACCGACACCGGGGTGTGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCC
AAAGACTGCCACTGCATA (SEQ ID NO: 117)

M15をコードする核酸配列

atggacatgaggggtccccgctcagctcctggggctcctgctactctgggtccgaggtgccagat
gtGCGCGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCG
CGCGTCGCTGGAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTGCCACGGGAGGTGCAAGTGACC
ATGTGCATCGGCGCGTGCCTGAGCCAGTTCCGGCGGCAAAACATGCACGCGCAGATCAAGACGA
GCCTGCACCGCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCTGCCGCAACTACATCC
CATGGTGCTCATTTCAAAGACCGACACCGGGGTGTGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCC
AAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID NO: 118)

【図 8 B－5】

M20をコードする核酸配列

atggacatgaggggtccccgctcagctcctggggctcctgctactctgggtccgaggtgccagat
gtGCGCGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCG
CGCGTCGCTGGAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTGCCACGGGAGGTGCAAGTGACC
ATGTGCATCGGCGCGTGCCTGAGCCAGTTCCGGCGGCAAAACATGCACGCGCAGATCAAGACGA
GCCTGCACCGCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCTGCCGCACTACAATCC
CATGGTGCTCATTTCAAAGACCGACACCGGGGTGAACCTCACGACCTATGATGACTTGTTAGCC
AAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID NO: 123)

M21をコードする核酸配列

atggacatgaggggtccccgctcagctcctggggctcctgctactctgggtccgaggtgccagat
gtGCGCGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCGCGCT
GCTGGAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTGCCACGGGAGGTGCAAGTGACCATGTGCATCGC
GCTGCCGAGCCAGTTCCGGCGGCAAAACATGCACGCGCAGATCAAGACGAGCCTGCACCGCTGAAGC
CCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCTGCCGCACTACAATCCATGGTGCTCATTTCAAAGACCG
CAACCGGGGTGTGCTCCAGACCTATGATGACTTGTAAACAAACCTGCCACTGCATATGA (SEQ ID
NO: 124)

【図 8 C】

ΔN3－M16アミノ酸配列 (1 g Kシグナル配列 (小文字) が成熟ヒトGDF15 (太字) のN末端に融合されている)

mdmrvpagllgllllwlrgrcGDHCP LGPGRCCRLHTVRASLED LGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQ
FRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQNTDGTGVS LQTYD DLLAKDCHCI (SEQ ID
NO: 100)

ΔN3－M16をコードする核酸配列

atggacatgaggggtccccgctcagctcctggggctcctgctactctgggtccgaggtgccagat
gtGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCGCGCGCTCGCT
GGAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTGCCACGGGAGGTGCAAGTGACCATGTGCATC
GGCGCGTGCCCGAGCCAGTTCCGGCGGCAAAACATGCACGCGCAGATCAAGACGAGCCTGCACC
GCCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCTGCCGCACTACAATCCCATGGTGCT
CATTTCAAACACCAACCGGGGTGTGCTCCAGACCTATGATGACTTGTAGCCAAAGACTGC
CACTGCATATGA (SEQ ID NO: 125)

【図 8 B－4】

M16をコードする核酸配列

atggacatgaggggtccccgctcagctcctggggctcctgctactctgggtccgaggtgccagat
gtGCGCGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCG
CGCGTCGCTGGAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTGCCACGGGAGGTGCAAGTGACC
ATGTGCATCGGCGCGTGCCTGAGCCAGTTCCGGCGGCAAAACATGCACGCGCAGATCAAGACGA
GCCTGCACCGCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCTGCCGCACTACAATCC
CATGGTGCTCATTTCAAACACCAACCGGGGTGTGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCC
AAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID NO: 119)

M17をコードする核酸配列

atggacatgaggggtccccgctcagctcctggggctcctgctactctgggtccgaggtgccagat
gtGCGCGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCG
CGCGTCGCTGGAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTGCCACGGGAGGTGCAAGTGACC
ATGTGCATCGGCGCGTGCCTGAGCCAGTTCCGGCGGCAAAACATGCACGCGCAGATCAAGACGA
GCCTGCACCGCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCTGCCGCACTACAATCC
CATGGTGCTCATTTCAAAGACCAACACCGGTGTGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCC
AAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID NO: 120)

M18をコードする核酸配列

atggacatgaggggtccccgctcagctcctggggctcctgctactctgggtccgaggtgccagat
gtGCGCGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCG
CGCGTCGCTGGAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTGCCACGGGAGGTGCAAGTGACC
ATGTGCATCGGCGCGTGCCTGAGCCAGTTCCGGCGGCAAAACATGCACGCGCAGATCAAGACGA
GCCTGCACCGCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCTGCCGCACTACAATCC
CATGGTGCTCATTTCAAAGACCGACACCGGACCTGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCC
AAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID NO: 121)

M19をコードする核酸配列

atggacatgaggggtccccgctcagctcctggggctcctgctactctgggtccgaggtgccagat
gtGCGCGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCG
CGCGTCGCTGGAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTGCCACGGGAGGTGCAAGTGACC
ATGTGCATCGGCGCGTGCCTGAGCCAGTTCCGGCGGCAAAACATGCACGCGCAGATCAAGACGA
GCCTGCACCGCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCTGCCGCACTACAATCC
CATGGTGCTCATTTCAAAGACCGACACCGGAACTCGACCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCC
AAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID NO: 122)

【図 8 D】

N末端で1 g Kシグナル配列に融合された野生型成熟ヒトGDF15のアミノ酸配列
(1 g K－WT－GDF15)

mdmrvpagllgllllwlrgrcARNGDHCP LGPGRCCRLHTVRASLED LGWADWVLSPREVQVTMCIGAC
PSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQNTDGTGVS LQTYD DLLAKDCHCI (SEQ
ID NO: 126)

1 g K－WT－GDF15をコードする核酸

atggacatgaggggtccccgctcagctcctggggctcctgctactctgggtccgaggtgccagat
gtGCGCGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCG
CGCGTCGCTGGAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTGCCACGGGAGGTGCAAGTGACC
ATGTGCATCGGCGCGTGCCTGAGCCAGTTCCGGCGGCAAAACATGCACGCGCAGATCAAGACGA
GCCTGCACCGCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCTGCCGCACTACAATCC
CATGGTGCTCATTTCAAAGACCGACACCGGGGTGTGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCC
AAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID NO: 127)

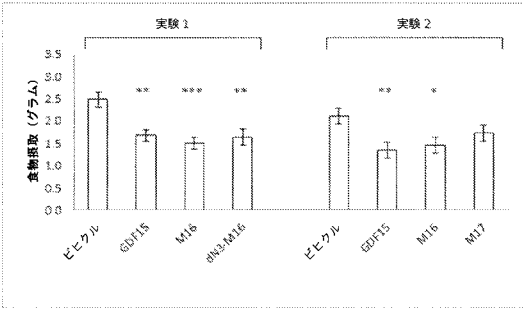
【図 9】

ヒトGDF15突然変異タンパク質二量体形成、N－グリカン部位占有、および溶解度評価

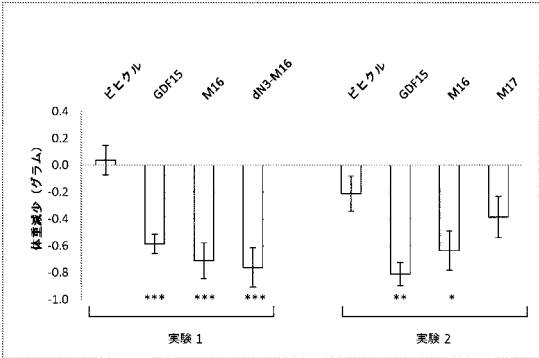
突然変異タンパク質ID	二量体	N－グリカン	溶解度変曲点
hGDF15	あり	-	++
M5	あり	あり	++++
M6	あり	あり	実施せず
M7	あり	あり	+++
M8	なし	なし	実施せず
M9	あり	あり	実施せず
M10	なし	なし	実施せず
M11	あり	あり	+++
M12	あり	あり	+++
M13	あり	あり	++++
M14	なし	なし	実施せず
M15	なし	なし	実施せず
M16	あり	あり	++++
ΔN3-M16	あり	あり	++++
M17	あり	あり	++++
M18	あり	あり	実施せず
M19	あり	あり	実施せず
M20	あり	あり	++++
M21	あり	あり	+++

【図 1 0】

D10マウスモデル



【図 1 1】



【配列表】

2017529059000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 15/42510
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C07K 14/495, 14/00; A61K 38/18 (2015.01) CPC - C07K 14/495, 14/00; A61K 38/1841 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - C07K 14/495, 14/00; A61K 38/18 (2015.01) CPC - C07K 14/495, 14/00; A61K 38/1841 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC: C07K 14/495, 14/00; A61K 38/1841 (text search) USPC: 514/4.8, 8.9; 530/399, 300, 350 (text search) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase: PatBase; Google Patents; Google Scholar; GenCore sequence search (AA) Search terms: Growth Differentiation Factor 15 (GDF15, MIC1), point mutations, D5T, D5S, R21N, N-glycosylated dimer, metabolic disorder, glucose disorder, body weight order, SEQ ID NOs: 1, 2, 81, 83		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2013/113008 A1 (AMGEN, Inc.) 01 August 2013 (01.08.2013). Especially pg 20 ln 31 continued to pg 21 ln 10.	1-3, 5/(1-3), 25-28
A	LIU et al. Enhancing the secretion of recombinant proteins by engineering N-glycosylation sites. Biotechnol Prog Sept-Oct 2009 Vol 25 No 5 Pages 1468-1475. Especially pg 1471 col 1 para 2.	1-3, 5/(1-3), 25-28
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 24 November 2015 (24.11.2015)		Date of mailing of the international search report 04 JAN 2016
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 15/42510

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

- a. ☒ forming part of the international application as filed:
☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

GenCore ver 6.4.1 SEQ ID NOs: 1, 2, 4, 81, 83

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 15/42510

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 6-19, 29-55
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
—Go to Extra Sheet for continuation—

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-3, 5(in part), 25-28, limited to D5T, R21N, SEQ ID NOS: 2, 81

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 15/42510

---continuation of Box III (Lack of Unity of Invention)---

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I+: Claims 1-5, 25-28, drawn to a polypeptide comprising a contiguous amino acid sequence that is at least 90% identical to the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 [i.e. mature wild-type human GDF15] wherein the polypeptide comprises at least one pair of amino acid substitutions, wherein the polypeptide forms N-glycosylated dimer.

The polypeptide and its N-glycosylated dimer will be searched to the extent that the amino acid substitutions encompasses the first named mutant pair, D5T and R21N (claim 1(i)). It is believed that claims 1-3, 5 (in part), 25, 26 (SEQ ID NO: 2), 27 (SEQ ID NO: 81), 28 read on this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass the mutant pair D5T and R21N (SEQ ID NOs: 2, 81) [see Figs. 2 and 8A of instant Specification for SEQ ID NOs: 2, 81, respectively]. Additional pair(s) of amino acid substitutions and/or mutant polypeptide(s) will be searched upon payment of additional fees. Applicant must specify the claims that encompass any additional elected mutant polypeptide(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which read on the first named invention if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be: mutant polypeptide pair S23N and E25T (claim 1 (iii) and SEQ ID NOs: 4, 83) (claims 1, 2, 5 (in part), 25, 26 (SEQ ID NO: 4), 27 (SEQ ID NO: 83), 28).

Group II: Claims 20-24, drawn to a fusion protein comprising a heterologous polypeptide and GDF15.

The inventions listed as Groups I+ and II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features:

Group I+ has the special technical feature of a polypeptide with at least 90% sequence identity to SEQ ID NO: 1 (mature human GDF15) with at least 2 amino acid substitutions, not required by Group II.

Group II has the special technical feature of a fusion protein comprising a heterologous peptide, (G4S)5 linker, and GDF15 or a deletion mutant thereof, not required by Group I+.

Among the inventions listed as Groups I+ are the specific mutants recited therein. Each invention requires a mutant not required by any of the other inventions. In addition, SEQ ID NO: 1 is taught by Xiong (see below).

Common Technical Features:

The common technical feature shared by Groups I+ and II is GDF15.

The inventions of Group I+ further share the common technical feature of claims 1 and 25.

However, said common technical feature does not represent a contribution over the prior art, and is obvious over WO 2013/113008 A1 to XIONG et al. (hereinafter "Xiong"), in view of the publication titled "Enhancing the secretion of recombinant proteins by engineering N-glycosylation sites" by LIU et al. (hereinafter "Liu"). Xiong teaches (claim 1) a polypeptide comprising a contiguous amino acid sequence that is at least 90% identical to the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 (pg 20 in 31 continued to pg 21 in 10: The terms "GDF15 polypeptide" and "GDF15 protein" are used interchangeably and mean a naturally-occurring wild-type polypeptide expressed in a mammal, such as a human or a mouse [.....] e.g., SEQ ID NO: 12, which consists of 112 amino acid residues" [note: Xiong SEQ ID NO: 12 has 100% sequence identity with SEQ ID NO: 1 of instant claim]) wherein the polypeptide comprises at least one pair of substitutions of the corresponding amino acids in SEQ ID NO: 1: (pg 21 in 14-17: "The term "GDF15 mutant polypeptide" encompasses a GDF15 polypeptide in which a naturally occurring GDF15 polypeptide sequence (e.g., SEQ ID NOs: 4, 8 or 12) has been modified. Such modifications include, but are not limited to, one or more amino acid substitutions"; pg 21 in 32-34: "In other embodiments, a GDF15 polypeptide comprises an amino acid sequence that is at least about 90 percent, or about 95, 96, 97, 98, or 99 percent identical to a naturally-occurring GDF15 polypeptide amino acid sequence").

As to claim 25, a modified GDF15 N-glycosylated dimer, wherein said dimer comprises two polypeptides of claim 1 covalently joined to each other, where said dimer is N-glycosylated, Liu teaches (pg 1471 col 1 para 2: Another recombinant protein which has been subjected to test the method is the mature form of human macrophage inhibitory cytokine 1 (MIC1), also known as growth differentiation factor 15 (GDF15). The pro-form of this protein is a homodimer of a 308 amino acid polypeptide, whereas the mature form is a dimer of the last 112 amino acids. The mature form of MIC1 contains no potential N-glycosylation sites but has been shown to be expressed and secreted in CHO cells by fusion with a secretion signal peptide. When an NXS/T sequon was introduced at the N-terminal of the protein (D201S, 198RNGSH, two amino acid behind an N-terminal six histidine tag), the secretion of the mature MIC1 mutant dimer increased more than about five-fold in HEK293-6E cells. The attached glycan chain on the D201S mutant is also susceptible to PNGase-F under native condition (Figure 1B)).

As the common technical feature was known in the art at the time of the invention, this cannot be considered a common special technical feature that would otherwise unify the groups. The inventions lack unity with one another.

Therefore, Groups I+ and II lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

Note concerning item 4: Claims 6-19, 29-55 are multiple dependent claims and are not drafted according to the second and third sentences of PCT Rule 6.4(a).

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 0 7 K 16/44 (2006.01)	C 0 7 K 16/44	
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	
C 0 7 K 14/765 (2006.01)	C 0 7 K 14/765	
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	C
A 6 1 K 38/17 (2006.01)	A 6 1 K 38/17	1 0 0
A 6 1 K 38/38 (2006.01)	A 6 1 K 38/38	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 3/04 (2006.01)	A 6 1 P 3/04	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 K 38/16 (2006.01)	A 6 1 K 38/16	
A 6 1 K 38/19 (2006.01)	A 6 1 K 38/19	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
C 0 7 K 14/52 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
	A 6 1 P 43/00	1 2 1
	C 0 7 K 14/52	

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

(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 リンドウト ダリン アンソニー
アメリカ合衆国 9 4 0 4 0 カリフォルニア州 マウンテン ビュー ミラモンテ アベニュー
1 5 3 3

(72)発明者 ハルダンカー ラジ

アメリカ合衆国 9 4 0 6 5 カリフォルニア州 レッドウッド シティ ツリーダスト ストリート 3 1 2

(72)発明者 ティエン ホイ

アメリカ合衆国 9 4 4 0 4 カリフォルニア州 フォスター シティ サーフバード アイル 2 6 6

(72)発明者 スウ イェルーユアン

アメリカ合衆国 9 4 0 6 6 カリフォルニア州 サンプルノ アカシア アベニュー 3 0 3

F ターム(参考) 4B064 AG01 AG24 AG27 CA10 CA19 CC24 CE11 DA01

4B065 AA91X AA93Y AA99Y AB01 AC14 BA02 BD14 CA24 CA25 CA26
CA44

4C084 AA01 AA02 AA19 BA01 BA02 BA08 BA19 BA21 BA23 BA34
BA41 CA18 CA19 CA20 DA01 DA37 DA39 DC50 MA13 MA16
MA17 MA22 MA23 MA28 MA34 MA35 MA37 MA41 MA43 MA44
MA52 MA55 MA56 MA57 MA58 MA59 MA60 MA63 MA66 NA14
ZA701 ZA702 ZB071 ZB072 ZC351 ZC352 ZC411 ZC412 ZC751

4C085 AA13 AA14 BB11 BB33 BB34 BB35 BB36 BB37 BB41 BB42
BB43 CC01 CC02 CC03 CC05 DD22 DD23 DD62 EE01 EE03
GG02 GG03 GG04 GG06 GG08 GG10

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 BA53 CA40 DA01 DA70
DA76 EA20 EA27 FA74