

(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2019-535267

(P2019-535267A)

(43) 公表日 令和1年12月12日(2019.12.12)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62 Z	4 B 0 6 4
C O 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00 Z N A	4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z	4 C O 7 6
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 C O 8 4
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C	4 C O 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 36 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2019-525814 (P2019-525814)	(71) 出願人	519165308
(86) (22) 出願日	平成29年11月9日 (2017.11.9)		ケロス セラピューティクス インコーポ レイテッド
(85) 翻訳文提出日	令和1年6月27日 (2019.6.27)		KEROS THERAPEUTICS, I N C.
(86) 国際出願番号	PCT/US2017/060953		アメリカ合衆国 O 2 4 2 1 マサチュー セッツ州 レキシントン ヘイデン アベ ニュー 99 スイート 120 (ビルデ ィング イー)
(87) 国際公開番号	W02018/089702	(74) 代理人	100105957
(87) 国際公開日	平成30年5月17日 (2018.5.17)		弁理士 恩田 誠
(31) 優先権主張番号	62/420,480	(74) 代理人	100068755
(32) 優先日	平成28年11月10日 (2016.11.10)		弁理士 恩田 博宣
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	100142907
			弁理士 本田 淳
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 G D N F 融合ポリペプチド及びその使用方法

(57) 【要約】

本発明は、G D N F 融合ポリペプチドの組成物及び方法に関し、ここで G D N F 融合ポリペプチドは、G D N F 改変体に直接又はリンカーを解して結合した F c ドメイン、アルブミン結合ペプチド、フィブロネクチンドメイン、又はヒト血清アルブミンを含む。G D N F 融合ポリペプチドは、肥満ならびに 1 型及び 2 型糖尿病などの代謝性疾患、ならびに筋萎縮性側索硬化症 (A L S) 及びパーキンソン病などの神経性疾患を治療するために使用され得る。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

式 A - L - B を有するグリア由来神経栄養因子 (G D N F) 融合ポリペプチドであって、式中、

A は F c ドメインを含み、

L はリンカーであり、かつ

B は、配列番号 1 のアミノ酸 1 1 8 ~ 2 1 1 を含む参照 G D N F 配列に対して少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する G D N F 改変体を含む、G D N F 融合ポリペプチド。

【請求項 2】

前記 F c ドメインの N 末端に結合したアルブミン結合ペプチドをさらに含む、請求項 1 に記載の G D N F 融合ポリペプチド。

【請求項 3】

前記 F c ドメインの N 末端に結合したフィブロネクチンドメインをさらに含む、請求項 1 に記載の G D N F 融合ポリペプチド。

【請求項 4】

前記 F c ドメインの N 末端に結合したヒト血清アルブミンをさらに含む、請求項 1 に記載の G D N F 融合ポリペプチド。

【請求項 5】

式 A - L - B を有する G D N F 融合ポリペプチドであって、式中、

A はアルブミン結合ペプチドを含み、

L はリンカーであり、かつ

B は、配列番号 1 のアミノ酸 1 1 8 ~ 2 1 1 を含む参照 G D N F 配列に対して少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する G D N F 改変体を含む、G D N F 融合ポリペプチド。

【請求項 6】

式 A - L - B を有する G D N F 融合ポリペプチドであって、式中、

A はフィブロネクチンドメインを含み、

L はリンカーであり、かつ

B は、配列番号 1 のアミノ酸 1 1 8 ~ 2 1 1 を含む参照 G D N F 配列に対して少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する G D N F 改変体を含む、G D N F 融合ポリペプチド。

【請求項 7】

式 A - L - B を有する G D N F 融合ポリペプチドであって、式中、

A はヒト血清アルブミンを含み、

L はリンカーであり、かつ

B は、配列番号 1 のアミノ酸 1 1 8 ~ 2 1 1 を含む参照 G D N F 配列に対して少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する G D N F 改変体を含む、G D N F 融合ポリペプチド。

【請求項 8】

G D N F 改変体は、配列番号 1 のアミノ酸 9 2 ~ 2 1 1 又はその断片からなる、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の G D N F 融合ポリペプチド。

【請求項 9】

前記参照 G D N F 配列は、配列番号 1 のアミノ酸 1 1 7 ~ 2 1 1 を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の G D N F 融合ポリペプチド。

【請求項 10】

前記参照 G D N F 配列は、配列番号 1 のアミノ酸 1 1 0 ~ 2 1 1 を含む、請求項 9 に記載の G D N F 融合ポリペプチド。

【請求項 11】

前記参照 G D N F 配列は、配列番号 1 のアミノ酸 9 2 ~ 2 1 1 を含む、請求項 10 に記載

10

20

30

40

50

の G D N F 融合ポリペプチド。

【請求項 1 2】

前記参照 G D N F 配列は、配列番号 1 のアミノ酸 7 8 ~ 2 1 1 を含む、請求項 1 1 に記載の G D N F 融合ポリペプチド。

【請求項 1 3】

G D N F 変体は、野生型ヒト G D N F に対し、配列番号 1 のアミノ酸残基 8 5 と 1 2 0 との間のタンパク質分解を減少させるアミノ酸置換を含む、請求項 1 0 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の G D N F 融合ポリペプチド。

【請求項 1 4】

G D N F 変体は、野生型ヒト G D N F に対する以下の残基：非塩基性アミノ酸については、配列番号 1 の配列に対し、R 8 8、R 8 9、R 9 1、R 9 3、R 1 0 4、K 1 0 6、R 1 0 8、R 1 0 9、R 1 1 2、K 1 1 4、及び R 1 1 6 のうちの 1 つ以上のアミノ酸置換を含む、請求項 1 3 に記載の G D N F 融合ポリペプチド。

10

【請求項 1 5】

アルブミン結合ペプチドは配列番号 2 の配列を含む、請求項 2 又は 5 に記載の G D N F 融合ポリペプチド。

【請求項 1 6】

前記 F c ドメインは二量体を形成しない、請求項 1 ~ 3 及び 9 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の G D N F 融合ポリペプチド。

【請求項 1 7】

前記 F c ドメインはヒンジドメインを含まない、請求項 1 ~ 3 及び 9 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の G D N F 融合ポリペプチド。

20

【請求項 1 8】

前記 F c ドメインは、以下のアミノ酸置換：ヒト I g G 1 の配列に対して、T 3 6 6 W、T 3 6 6 Y、T 3 9 4 W、F 4 0 5 W、Y 3 4 9 T、Y 3 4 9 E、Y 3 4 9 V、L 3 5 1 T、L 3 5 1 H、L 3 5 1 N、L 3 5 2 K、P 3 5 3 S、S 3 5 4 D、D 3 5 6 K、D 3 5 6 R、D 3 5 6 S、E 3 5 7 K、E 3 5 7 R、E 3 5 7 Q、S 3 6 4 A、T 3 6 6 E、L 3 6 8 T、L 3 6 8 Y、L 3 6 8 E、K 3 7 0 E、K 3 7 0 D、K 3 7 0 Q、K 3 9 2 E、K 3 9 2 D、T 3 9 4 N、P 3 9 5 N、P 3 9 6 T、V 3 9 7 T、V 3 9 7 Q、L 3 9 8 T、D 3 9 9 K、D 3 9 9 R、D 3 9 9 N、F 4 0 5 T、F 4 0 5 H、F 4 0 5 R、Y 4 0 7 T、Y 4 0 7 H、Y 4 0 7 I、K 4 0 9 E、K 4 0 9 D、K 4 0 9 T、及び K 4 0 9 I のうちの 1 つ以上を含む、請求項 1 6 に記載の G D N F 融合ポリペプチド。

30

【請求項 1 9】

G D N F 融合ポリペプチド中のリンカーは結合である、請求項 1 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の G D N F 融合ポリペプチド。

【請求項 2 0】

G D N F 融合ポリペプチド中のリンカーはスペーサーである、請求項 1 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の G D N F 融合ポリペプチド。

【請求項 2 1】

スペーサーは配列番号 4 ~ 2 9 のいずれか 1 つの配列を含む、請求項 2 0 に記載の G D N F 融合ポリペプチド。

40

【請求項 2 2】

前記配列は配列番号 4 又は 2 9 からなる、請求項 2 1 に記載の G D N F 融合ポリペプチド。

【請求項 2 3】

G D N F 融合ポリペプチドは、3 ~ 6 0 日の血清半減期を有する、請求項 1 ~ 2 2 のいずれか一項に記載の G D N F 融合ポリペプチド。

【請求項 2 4】

2 0 ~ 2 0 , 0 0 0 p M の K_D でヒト G D N F ファミリー受容体アルファ - 1 (G F R 1) に結合する、請求項 1 ~ 2 3 のいずれか一項に記載の G D N F 融合ポリペプチド。

50

【請求項 25】

単一のオープンリーディングフレームによってコードされている、請求項 1～24 のいずれか一項に記載の G D N F 融合ポリペプチド。

【請求項 26】

前記 G D N F 変体は参照 G D N F 配列に対して 85% の配列同一性を有する、請求項 1～7 及び 9～12 のいずれか一項に記載の G D N F 融合ポリペプチド。

【請求項 27】

前記 G D N F 変体は参照 G D N F 配列に対して 90% の配列同一性を有する、請求項 26 に記載の G D N F 融合ポリペプチド。

【請求項 28】

前記 G D N F 変体は参照 G D N F 配列に対して 95% の配列同一性を有する、請求項 27 に記載の G D N F 融合ポリペプチド。

【請求項 29】

前記 G D N F 変体は参照 G D N F 配列に対して 97% の配列同一性を有する、請求項 28 に記載の G D N F 融合ポリペプチド。

【請求項 30】

G D N F 変体は、配列番号 1 のアミノ酸 118～211、117～211、110～211、92～211、又は 78～211 からなる、請求項 1～29 のいずれか一項に記載の G D N F 融合ポリペプチド。

【請求項 31】

請求項 1～30 のいずれか一項に記載の G D N F 融合ポリペプチドをコードする核酸分子。

【請求項 32】

請求項 31 に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 33】

請求項 1～30 のいずれか一項に記載の G D N F 融合ポリペプチド、請求項 31 に記載の核酸分子、又は請求項 32 に記載のベクターを発現する宿主細胞。

【請求項 34】

チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞である、請求項 33 に記載の宿主細胞。

【請求項 35】

請求項 1～30 のいずれか一項に記載の G D N F 融合ポリペプチドを調製する方法であって、

a) 請求項 31 に記載の核酸分子又は請求項 32 に記載のベクターを含む宿主細胞を提供する工程、及び

b) G D N F 融合ポリペプチドの産生を可能にする条件下で、宿主細胞において核酸分子又はベクターを発現させる工程を含む方法。

【請求項 36】

前記宿主細胞は CHO 細胞である、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

請求項 1～30 のいずれか一項に記載の G D N F 融合ポリペプチド、請求項 31 に記載の核酸分子、又は請求項 32 に記載のベクターと、1 つ以上の薬学的に許容される担体又は賦形剤とを含む医薬組成物。

【請求項 38】

G D N F 融合ポリペプチドが治療上有効な量である、請求項 37 に記載の医薬組成物。

【請求項 39】

対象における代謝性疾患を治療及び / 又は予防する方法であって、請求項 1～30 のいずれか一項に記載の G D N F 融合ポリペプチド、請求項 31 に記載の核酸分子、請求項 32 に記載のベクター、又は請求項 37 又は 38 に記載の医薬組成物を対象に投与する工程を含む方法。

10

20

30

40

50

【請求項 40】

代謝性疾患は、肥満、1型糖尿病、及び2型糖尿病からなる群から選択される、請求項39に記載の方法。

【請求項 41】

代謝性疾患は肥満である、請求項40に記載の方法。

【請求項 42】

代謝性疾患は1型糖尿病である、請求項40に記載の方法。

【請求項 43】

代謝性疾患は2型糖尿病である、請求項40に記載の方法。

【請求項 44】

対象の体重及び/又は体重増加の割合を減少させる、請求項39～43のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 45】

対象の食物摂取に対する食欲に影響を及ぼさない、請求項39～44のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 46】

対象の脂肪症を軽減する、請求項39～45のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 47】

対象の精巣上体及び腎周囲の脂肪体の重量を減少させる、請求項39～46のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 48】

対象の空腹時のインスリンレベルを低下させる、請求項39～47のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 49】

対象のグルコースクリアランス速度を増加させる、請求項39～48のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 50】

対象の血清脂質プロファイルを改善する、請求項39～49のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 51】

対象における神経学的疾患を治療及び/又は予防する方法であって、請求項1～30のいずれか一項に記載のGDNF融合ポリペプチド、請求項31に記載の核酸分子、請求項32に記載のベクター、又は請求項37又は38に記載の医薬組成物を対象に投与する工程を含む方法。

【請求項 52】

神経学的疾患は、統合失調症、てんかん、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、パーキンソン病、アルツハイマー病、ハンチントン病、不安、卒中、脳腫瘍、及び脳転移からなる群から選択される、請求項51に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、GDNF融合ポリペプチド及びその使用方法に関する。

【背景技術】**【0002】**

肥満は米国で増加している問題であり、人口の約25%の有病率である。内臓脂肪や皮下脂肪の増加は様々な臓器の機能不全を引き起こす。過剰体重は、肥満、糖尿病(例えば、1型及び2型糖尿病)、心血管疾患、及びいくつかの形態の癌を含む、あらゆる一連の合併症の危険因子である。

【0003】

インスリン抵抗性は、末梢組織が高量のインスリンを必要とし、かつ肥満と関連してい

10

20

30

40

50

る場合に生じる。膵臓細胞がその要求を満たすのに十分なインスリンを産生できなくなると、高血糖が起こり、2型糖尿病を発症する。肥満で増加する脂肪細胞は、この過程に関与すると考えられている。代謝性疾患（特に1型及び2型糖尿病）及びインスリン抵抗性を含む肥満ならびにそれに関連する疾患及び状態を治療するための努力は、外科手術から医薬品に至るまで様々なアプローチを取ってきた。

【0004】

肥満及び糖尿病（例えば、1型及び2型糖尿病）などの代謝性疾患の有病率にもかかわらず、利用可能な治療選択肢はほとんどない。これらの代謝性疾患に対する新規な治療法が必要とされている。

【発明の概要】

【0005】

本発明は、グリア由来神経栄養因子（GDNF）改変体のN末端に直接又はリンカーを介して結合されたFcドメイン、アルブミン結合ペプチド、フィブロネクチンドメイン、又はヒト血清アルブミンを含むGDNF融合ポリペプチドを特徴とする。本発明のGDNF融合ポリペプチドは、ヒトGDNFファミリー受容体アルファ-1（GFR-1）に結合し、望ましくは長い血清半減期を有する。本発明はまた、肥満ならびに1型及び2型糖尿病などの代謝疾患、ならびに統合失調症、てんかん、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、パーキンソン病、アルツハイマー病、ハンチントン病、不安、脳卒中、脳腫瘍、脳転移などの神経疾患を治療及び/又は予防するためのこれらのGDNF融合ポリペプチドの医薬組成物及び使用方法を特徴とする。

【0006】

一態様では、本発明は、式A-L-Bを有するGDNF融合ポリペプチドを特徴とし、式中、AはFcドメインを含み、Lはリンカーであり、Bは、配列番号1のアミノ酸118～211を含む参照GDNF配列に対して少なくとも80%の配列同一性（例えば、少なくとも85%、90%、95%、97%、又は100%の配列同一性）を有するGDNF改変体を含む。

【0007】

いくつかの実施形態では、GDNF融合ポリペプチドは、FcドメインのN末端に結合したアルブミン結合ペプチドをさらに含む。

他の実施形態では、GDNF融合ポリペプチドは、FcドメインのN末端に結合したフィブロネクチンドメインをさらに含む。

【0008】

さらに他の実施形態では、GDNF融合ポリペプチドはさらに、FcドメインのN末端に結合したヒト血清アルブミンを含む。

別の態様では、本発明は、式A-L-Bを有するGDNF融合ポリペプチドを特徴とし、式中、Aはアルブミン結合ペプチドを含み、Lはリンカーであり、Bは、配列番号1のアミノ酸118～211を含む参照GDNF配列に対して少なくとも80%の配列同一性（例えば、少なくとも85%、90%、95%、97%、又は100%の配列同一性）を有するGDNF改変体を含む。

【0009】

別の態様では、本発明は、式A-L-Bを有するGDNF融合ポリペプチドを特徴とし、式中、Aはフィブロネクチンドメインを含み、Lはリンカーであり、Bは、配列番号1のアミノ酸118～211を含む参照GDNF配列に対して少なくとも80%の配列同一性（例えば、少なくとも85%、90%、95%、97%、又は100%の配列同一性）を有するGDNF改変体を含む。

【0010】

さらに別の態様では、本発明は、式A-L-Bを有するGDNF融合ポリペプチドを特徴とし、式中、Aはヒト血清アルブミンを含み、Lはリンカーであり、Bは、配列番号1のアミノ酸118～211を含む参照GDNF配列に対して少なくとも80%の配列同一性（例えば、少なくとも85%、90%、95%、97%、又は100%の配列同一性）

10

20

30

40

50

を有する G D N F 改変体を含む。

【 0 0 1 1 】

上記の態様のいずれかの特定の実施形態では、G D N F 改変体は、配列番号 1 のアミノ酸 9 2 ~ 2 1 1 又はその断片からなる。

上記の態様のいずれかのいくつかの実施形態では、参照 G D N F 配列は、配列番号 1 のアミノ酸 1 1 7 ~ 2 1 1、アミノ酸 1 1 0 ~ 2 1 1、アミノ酸 9 2 ~ 2 1 1、又はアミノ酸 7 8 ~ 2 1 1 を含む。

【 0 0 1 2 】

いくつかの実施形態では、G D N F 改変体は、野生型ヒト G D N F に対し、配列番号 1 のアミノ酸残基 8 5 と 1 2 0 との間のタンパク質分解を減少させるアミノ酸置換を含む。特定の実施形態では、G D N F 改変体は、野生型ヒト G D N F に対する以下の残基のうちの 1 つ以上のアミノ酸置換を含む：非塩基性アミノ酸については、配列番号 1 の配列に対し、R 8 8、R 8 9、R 9 1、R 9 3、R 1 0 4、K 1 0 6、R 1 0 8、R 1 0 9、R 1 1 2、K 1 1 4、及び R 1 1 6。

10

【 0 0 1 3 】

いくつかの実施形態では、アルブミン結合ペプチドは配列番号 2 の配列を含む。

他の実施形態では、F c ドメインは二量体を形成しない。さらに他の実施形態では、F c ドメインはヒンジドメインを含まない。

【 0 0 1 4 】

いくつかの実施形態では、F c ドメインは以下のアミノ酸置換のうちの 1 つ以上を含む：ヒト I g G 1 の配列に対して、T 3 6 6 W、T 3 6 6 Y、T 3 9 4 W、F 4 0 5 W、Y 3 4 9 T、Y 3 4 9 E、Y 3 4 9 V、L 3 5 1 T、L 3 5 1 H、L 3 5 1 N、L 3 5 2 K、P 3 5 3 S、S 3 5 4 D、D 3 5 6 K、D 3 5 6 R、D 3 5 6 S、E 3 5 7 K、E 3 5 7 R、E 3 5 7 Q、S 3 6 4 A、T 3 6 6 E、L 3 6 8 T、L 3 6 8 Y、L 3 6 8 E、K 3 7 0 E、K 3 7 0 D、K 3 7 0 Q、K 3 9 2 E、K 3 9 2 D、T 3 9 4 N、P 3 9 5 N、P 3 9 6 T、V 3 9 7 T、V 3 9 7 Q、L 3 9 8 T、D 3 9 9 K、D 3 9 9 R、D 3 9 9 N、F 4 0 5 T、F 4 0 5 H、F 4 0 5 R、Y 4 0 7 T、Y 4 0 7 H、Y 4 0 7 I、K 4 0 9 E、K 4 0 9 D、K 4 0 9 T、及び K 4 0 9 I。野生型 F c ドメインの配列は、配列番号 3 に示されている。

20

【 0 0 1 5 】

いくつかの実施形態では、G D N F 融合ポリペプチド中のリンカーは結合である。他の実施形態では、G D N F 融合ポリペプチド中のリンカーはスペーサーである。特定の実施形態では、スペーサーは配列番号 4 ~ 2 9 のいずれか 1 つの配列を含む。

30

【 0 0 1 6 】

いくつかの実施形態では、G D N F 融合ポリペプチド中のフィブロネクチンドメインは、UniProt ID NO : P 0 2 7 5 1 の配列のアミノ酸 6 1 0 ~ 7 0 2 を有するフィブロネクチン I I I 型ドメイン（配列番号 3 0）である。他の実施形態では、フィブロネクチンドメインはアドネクチンタンパク質である。

【 0 0 1 7 】

いくつかの実施形態では、G D N F 融合ポリペプチド中のヒト血清アルブミンは、UniProt ID NO : P 0 2 7 6 8（配列番号 3 1）の配列を有する。

40

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の本発明の G D N F 融合ポリペプチドは、3 ~ 6 0 日の血清半減期を有する。

【 0 0 1 8 】

他の実施形態では、G D N F 融合ポリペプチドは、2 0 ~ 2 0 , 0 0 0 p M の K_D でヒト G D N F ファミリー受容体アルファ - 1（G F R 1）に結合する。

いくつかの実施形態では、G D N F 融合ポリペプチドは単一のオープンリーディングフレームによってコードされている。

【 0 0 1 9 】

他の態様では、本発明は、本明細書に記載の G D N F 融合ポリペプチドをコードする核

50

酸分子を特徴とする。

さらに別の態様では、本発明は、本明細書に記載の G D N F 融合ポリペプチドをコードする核酸分子を含むベクターを特徴とする。

【 0 0 2 0 】

さらに別の態様では、本発明は、本明細書に記載の G D N F 融合ポリペプチド、本明細書に記載の G D N F 融合ポリペプチドをコードする核酸分子、又はそのような核酸分子を含むベクターを発現する宿主細胞を特徴とする。

【 0 0 2 1 】

特定の実施形態では、宿主細胞は哺乳動物細胞（例えば、チャイニーズハムスター卵巣（C H O）細胞）である。他の実施形態では、宿主細胞はヒト胎児腎臓（H E K）（例えば、H E K 2 9 3、H E K 2 9 3 F）、H e L a、C O S、P C 3、V e r o、M C 3 T 3、N S 0、S p 2 / 0、V E R Y、B H K、M D C K、W 1 3 8、B T 4 8 3、H s 5 7 8 T、H T B 2、B T 2 0、T 4 7 D、N S 0（内因的に免疫グロブリン鎖を産生しないネズミ骨髄腫細胞株）、C R L 7 O 3 O、又は H s S 7 8 B s t 細胞である。

10

【 0 0 2 2 】

さらに他の実施形態では、宿主細胞は細菌細胞（例えば大腸菌細胞）である。大腸菌株の例としては、大腸菌 2 9 4（A T C C（登録商標）3 1，4 4 6）、大腸菌 1 7 7 6（A T C C（登録商標）3 1，5 3 7、大腸菌 B L 2 1（D E 3）（A T C C（登録商標）B A A - 1 0 2 5）、及び大腸菌 R V 3 0 8（A T C C（登録商標）3 1，6 0 8）が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【 0 0 2 3 】

別の態様では、本発明は、本発明の G D N F 融合ポリペプチドを調製する方法を特徴とする。この方法は、a）本明細書に記載の G D N F 融合ポリペプチドをコードする核酸分子又はそのような核酸分子を含むベクターを含む宿主細胞を提供する工程、及び b）G D N F 融合ポリペプチドの産生を可能にする条件下で、宿主細胞において核酸分子又はベクターを発現させる工程を含む。

【 0 0 2 4 】

いくつかの実施形態では、本発明の任意の G D N F 融合ポリペプチドを調製する方法において使用される宿主細胞は C H O 細胞である。他の実施形態では、この方法で使用される宿主細胞は、ヒト胎児腎臓（H E K）（例えば、H E K 2 9 3、H E K 2 9 3 F）、H e L a、C O S、P C 3、V e r o、M C 3 T 3、N S 0、S p 2 / 0、V E R Y、B H K、M D C K、W 1 3 8、B T 4 8 3、H s 5 7 8 T、H T B 2、B T 2 0、T 4 7 D、N S 0（内因的に免疫グロブリン鎖を産生しないネズミ骨髄腫細胞株）、C R L 7 O 3 O、又は H s S 7 8 B s t 細胞である。

30

【 0 0 2 5 】

さらに他の実施形態では、この方法で使用される宿主細胞は細菌細胞（例えば大腸菌細胞）である。大腸菌株の例としては、大腸菌 2 9 4（A T C C（登録商標）3 1，4 4 6）、大腸菌 1 7 7 6（A T C C（登録商標）3 1，5 3 7、大腸菌 B L 2 1（D E 3）（A T C C（登録商標）B A A - 1 0 2 5）、及び大腸菌 R V 3 0 8（A T C C（登録商標）3 1，6 0 8）が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【 0 0 2 6 】

別の態様では、本発明は、本発明の G D N F 融合ポリペプチド、本発明の G D N F 融合ポリペプチドをコードする核酸分子、又は本発明の G D N F 融合ポリペプチドをコードする核酸分子を含むベクターと、1つ以上の薬学的に許容される担体又は賦形剤とを含む医薬組成物であって、G D N F 融合ポリペプチドが治療上有効な量である医薬組成物を特徴とする。

【 0 0 2 7 】

さらに別の態様では、本発明は、対象における代謝性疾患を治療及び／又は予防する方法を特徴とする。この方法は、本明細書に記載の G D N F 融合ポリペプチド、核酸分子、ベクター、又は医薬組成物を対象に投与する工程を含む。

50

【 0 0 2 8 】

いくつかの実施形態では、代謝性疾患は、肥満、1型糖尿病、及び2型糖尿病からなる群から選択される。

いくつかの実施形態では、代謝性疾患は肥満である。他の実施形態では、代謝性疾患は1型糖尿病である。さらに他の実施形態では、代謝性疾患は2型糖尿病である。

【 0 0 2 9 】

他の実施形態において、対象における代謝性疾患を治療及び／又は予防する方法は、対象の体重及び／又は体重増加の割合を減少させる。

いくつかの実施形態では、この方法は対象の食物摂取に対する食欲に影響を及ぼさない。他の実施形態では、この方法は対象の脂肪症を軽減する。他の実施形態では、この方法は、除脂肪量に影響を与えることなく対象の脂肪症を軽減する。さらに他の実施形態では、この方法は対象の精巣上体及び腎周囲の脂肪体の重量を減少させる。さらに他の実施形態では、この方法は、対象の空腹時のインスリンレベルを低下させ、対象のグルコースクリアランス速度を増加させ、かつ／又は対象の血清脂質プロファイルを改善する。

【 0 0 3 0 】

なお別の態様では、本発明は、対象における神経学的疾患を治療及び／又は予防する方法を特徴とする。この方法は、本明細書に記載のGDNF融合ポリペプチド、核酸分子、ベクター、又は医薬組成物を対象に投与する工程を含む。

【 0 0 3 1 】

いくつかの実施形態では、神経学的疾患は、統合失調症、てんかん、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、パーキンソン病、アルツハイマー病、ハンチントン病、不安、卒中、脳腫瘍、及び脳転移からなる群から選択される。

【 0 0 3 2 】

定義

本明細書で使用されるとき、用語「GDNF改変体」は、野生型ヒトGDNFよりも長い血清半減期を有する野生型ヒトGDNF(本明細書でさらに定義される)の改変体又は断片を含むポリペプチドを指す。いくつかの実施形態では、GDNF改変体は、配列番号1のアミノ酸118~211、117~211、110~211、92~211、又は78~211を有する参照GDNF配列(本明細書でさらに定義される)に対して少なくとも80%の配列同一性(例えば、80%、85%、90%、95%、97%、又は100%の配列同一性)を有する。いくつかの実施形態では、GDNF改変体は、野生型ヒトGDNFに対し、配列番号1のアミノ酸残基85と120との間のタンパク質分解を減少させるアミノ酸置換を含む。そのようなアミノ酸置換は、本明細書においてさらに詳細に記載される。

【 0 0 3 3 】

本明細書で使用されるとき、用語「野生型ヒトGDNF」とは、配列番号1の配列を有する天然型のヒトグリア由来神経栄養因子(GDNF)をいう。

本明細書で使用されるとき、用語「Fcドメイン」とは、少なくともC_H2ドメイン及びC_H3ドメインを含むヒトFcドメインに対して少なくとも80%の配列同一性(例えば、少なくとも85%、90%、95%、97%、又は100%の配列同一性)を有するタンパク質をいう。任意選択で、Fcドメインは、Fcドメイン二量体化を低下させ又は阻害する1つ又は複数のアミノ酸置換を含む。任意選択で、Fcドメインはヒンジドメインを含む。Fcドメインは、免疫グロブリン抗体アイソタイプIgG、IgE、IgM、IgA、又はIgDのものであり得る。さらに、Fcドメインは、IgGサブタイプ(例えば、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、又はIgG4)であり得る。Fcドメインはまた、天然に存在しないFcドメイン、例えば組換えFcドメインであり得る。

【 0 0 3 4 】

本明細書で使用されるとき、用語「アルブミン結合ペプチド」とは、血清アルブミンに対して親和性を有し、それに結合するように機能する、12~16アミノ酸のアミノ酸配

10

20

30

40

50

列をいう。アルブミン結合ペプチドは、異なる起源、例えば、ヒト、マウス、又はラットのものであり得る。いくつかの実施形態では、アルブミン結合ペプチドは配列 D I C L P R W G C L W (配列番号 2) を有する。

【0035】

本明細書で使用されるとき、用語「フィブロネクチンドメイン」とは、例えばインテグリンなどの膜貫通受容体タンパク質ならびにコラーゲンやフィブリンなどの細胞外マトリックス成分に結合する、細胞外マトリックスの高分子量糖タンパク質又はその断片をいう。いくつかの実施形態では、フィブロネクチンドメインは、UniProt ID NO: P02751 の配列のアミノ酸 610 ~ 702 を有するフィブロネクチン III 型ドメイン (配列番号 30) である。他の実施形態では、フィブロネクチンドメインはアドネクチンタンパク質である。

10

【0036】

本明細書で使用されるとき、用語「ヒト血清アルブミン」は、ヒト血漿中に存在するアルブミンタンパク質をいう。ヒト血清アルブミンは、血中で最も豊富なタンパク質である。これは血清タンパク質の約半分を構成する。いくつかの実施形態では、ヒト血清アルブミンは、UniProt ID NO: P02768 (SEQ ID NO: 31) の配列を有する。

【0037】

本明細書で使用されるとき、用語「リンカー」とは、2つの要素間、例えばタンパク質ドメイン間の結合をいう。リンカーは、共有結合又はスパーサーであり得る。「結合」という用語は、化学結合、例えばアミド結合又はジスルフィド結合、もしくは化学反応、例えば化学的共役から生じる任意の種類の結合を指す。用語「スパーサー」は、2つのポリペプチド又はポリペプチドドメインの間に存在してその2つのポリペプチド又はポリペプチドドメインの間に空間及び/又は柔軟性を提供する部分 (例えば、ポリエチレングリコール (PEG) ポリマー) 又はアミノ酸配列 (例えば、3 ~ 200 アミノ酸配列) を指す。アミノ酸スパーサーは、ポリペプチドの一次配列の一部であり得る (例えば、間隔のあったポリペプチド又はポリペプチドドメインに、ポリペプチド主鎖を介して連結される)。

20

【0038】

本明細書で使用されるとき、用語「結合された」は、化学的共役、組換え手段、及び化学結合、例えばジスルフィド結合及びアミド結合を含む手段による、2つ以上の要素、成分、又はタンパク質ドメイン、例えばポリペプチドの組み合わせ又は付着を記載するために使用される。例えば、化学的共役、化学結合、ペプチドリinker、又は任意の他の共有結合手段を介して、2つの単一ポリペプチドを結合して1つの一繋ぎりのタンパク質構造を形成することができる。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、ペプチドリinkerによってGDNF 変体体に結合され、ここで、ペプチドリinkerのN末端は、化学結合、例えばペプチド結合を介してFcドメインのC末端に結合され、ペプチドリinkerのC末端は化学結合、例えばペプチド結合を介してGDNF 変体体のN末端に結合している。他の実施形態では、アルブミン結合ペプチドのC末端は、上記と同じ様式でリンカーを介してGDNF 変体体のN末端に連結されている。

30

40

【0039】

本明細書で使用されるとき、用語「ヒトGDNFファミリー受容体 - 1 (GFR 1)」とは、少なくとも4つのメンバー: GFR 1、GFR 2、GFR 3、及びGFR 4 からなるGDNFファミリー受容体 サブタイプに属する細胞表面タンパク質に連結されたグリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) を指す。

【0040】

本明細書で使用されるとき、用語「結合親和性」とは、2つの分子間の結合相互作用の強度を指す。一般に、結合親和性とは、分子とその結合パートナー、例えば本発明のGDNF 融合ポリペプチドとその標的受容体 (例えば、ヒトGDNFファミリー受容体 - 1 (GFR 1)) との間の非共有相互作用の合計の強度を指す。特に明記しない限り、結

50

合親和性は、結合対のメンバー間の 1 : 1 の相互作用を反映する固有の結合親和性を指す。2 つの分子間の結合親和性は一般的に解離定数 (K_D) 又は親和定数 (K_A) によって表される。互いに低い結合親和性を有する 2 つの分子は、一般的にゆっくりと結合し、容易に解離する傾向があり、大きい K_D を示す。互いに高い親和性を有する 2 つの分子は、一般的に容易に結合し、より長く結合したままである傾向があり、小さい K_D を示す。2 つの相互作用分子の K_D は、当技術分野において周知の方法及び技術、例えば表面プラズモン共鳴を使用して決定することができる。 K_D は、 k_{off} / k_{on} の比として計算される。具体的な例示の実施形態が本明細書にさらに記載されている (例えば実施例 2 参照)。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の GDNF 融合ポリペプチドは、例えば 20 ~ 20,000 pM の K_D でヒト GDNF ファミリー受容体アルファ - 1 (GFR 1) に結合する。

10

【0041】

本明細書で使用されるとき、用語「血清半減期」は、対象への治療用タンパク質の投与に関して、そのタンパク質の対象における血漿濃度が半減するのに必要とされる時間を指す。タンパク質は血流から再分配されるか、除去されるか、又は分解、すなわちタンパク質分解され得る。例えば、GDNF 改変体を含む本発明の GDNF 融合ポリペプチドは、タンパク質分解性切断部位 (すなわち、配列番号 1 のアミノ酸 85 ~ 120) を除去されているか、又はタンパク質分解性切断部位内にアミノ酸置換を含み、野生型ヒト GDNF よりも長い血清半減期を有する。タンパク質の血清半減期は、当技術分野において周知の技術、例えば、酵素結合免疫吸着検定法 (ELISA) (例えば、実施例 4 及び図 2 参照)、ウエスタンブロット、顕微鏡観察、及び質量分析法を用いて測定することができる。いくつかの実施形態において、本明細書に記載の GDNF 融合ポリペプチドは、例えば 3 ~ 60 日の血清半減期を有する。

20

【0042】

本明細書で使用されるとき、用語「タンパク質分解」とは、ペプチド骨格の加水分解によるタンパク質のより小さなポリペプチド又はアミノ酸への分解のプロセスをいう。野生型ヒト GDNF は、配列番号 1 のアミノ酸残基 85 と 120 との間に潜在的なタンパク質分解性切断部位を含み、したがって短い血清半減期を有する。本発明の GDNF 融合ポリペプチドは、GDNF 融合ポリペプチドが野生型ヒト GDNF と比較して減少したタンパク質分解及び増加した血清半減期を有するように、タンパク質分解性切断部位を欠失させるか又はタンパク質分解性切断部位内のアミノ酸置換を有する GDNF 改変体を含む。いくつかの実施形態では、GDNF 融合ポリペプチド中の GDNF 改変体は、タンパク質分解性切断部位内でタンパク質分解性切断部位 (すなわち、配列番号 1 のアミノ酸残基 85 及び 120) が欠失又は改変されている。

30

【0043】

本明細書で使用されるとき、用語「非塩基性アミノ酸」とは、その側鎖が、例えば生理学的 pH、例えば pH 7.4 において正電荷を有しないアミノ酸を指す。非塩基性アミノ酸は、グリシン、アラニン、バリン、イソロイシン、ロイシン、フェニルアラニン、トリプトファン、メチオニン、システイン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、プロリン、アスパラギン酸、及びグルタミン酸である。

40

【0044】

本明細書で使用されるとき、用語「単一のオープンリーディングフレーム」とは、宿主細胞の分子機構によって翻訳され単一のポリペプチドに発現され得る単一鎖中の核酸 (すなわち DNA) 残基の配置を指す。単一のオープンリーディングフレーム内の核酸残基は、連続して直列に配置されている 1 つ又は複数の遺伝子をコードすることができる。

【0045】

本明細書で使用されるとき、用語「核酸分子」とは、任意の長さのヌクレオチドのポリマーを指し、DNA 及び RNA を含む。ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾ヌクレオチド又は塩基、及び / 又はそれらのアナログであるか、もしくは DNA 又は RNA ポリメラーゼによって、あるいは合成反応によってポリマーに組

50

み込むことができる任意の基質であり得る。核酸分子は、メチル化ヌクレオチド及びそれらのアナログなどの修飾ヌクレオチドを含み得る。存在する場合、ヌクレオチド構造に対する修飾は、ポリマーアセンブリの完成前又は完成後に付与されてもよい。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド成分によって中断されていてもよい。核酸分子は、標識との結合などによって合成後にさらに修飾されてもよい。他の種類の修飾としては、例えば、天然に存在するヌクレオチドの1つ以上をアナログで置換すること、例えば非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホアミデート、カルバメートなど）及び荷電結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）でのヌクレオチド間修飾、ペンダント部分を含むもの、例えばタンパク質（例えばヌクレアーゼ、毒素、抗体、シグナルペプチド、poly-L-リジンなど）、インターカレーターを含むもの（例えばアクリジン、ソラレンなど）、キレート剤を含むもの（例えば金属、放射性金属、ホウ素、酸化性金属など）、アルキル化剤を含むもの、結合が修飾されたもの（例、アルファアノマー核酸など）、ならびに未修飾核酸分子の形態が挙げられる。さらに、糖に通常存在するヒドロキシル基のいずれかは、例えば、ホスホネート基、ホスフェート基により置換されるか、標準的な保護基により保護されるか、又はさらなるヌクレオチドへのさらなる結合を調製するために活性化されるか、固体支持体又は半固体支持体に結合され得る。5'及び3'末端OHはリン酸化されてもよく、又はアミンもしくは1~20個の炭素原子の有機カップリング基部分で置換されていてもよい。他のヒドロキシルも標準的な保護基に誘導体化することができる。核酸分子はまた、当技術分野において一般的に知られているリボース又はデオキシリボース糖のアナログ形態、例えば、2'-O-メチル-、2'-O-アシル-、2'-フルオロ-、又は2'-アジド-リボース、炭素環式糖アナログ、-アノマー糖、アラビノース、キシロース又はリキソースなどのエピマー糖、ピラノース糖、フラノース糖、セドヘプツロース、非環式アナログ及びメチルリボシドなどの塩基性ヌクレオシドアナログを含み得る。1つ以上のホスホジエステル結合は、代替の結合基によって置き換えられてもよい。これらの代替の連結基は、ホスフェートがP(O)S(「チオエート」)、P(S)S(「ジチオエート」)、(O)NR₂(「アミデート」)、P(O)R、P(O)OR'、CO、又はCH₂(「ホルムアセタール」)で置換されており、ここで、各R又はR'は独立してHもしくは任意選択でエーテル(-O-)結合、アリール、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、又はアラリジル(aryl)を含む置換又は非置換のアルキル(1~20C)である実施形態を含むが、これらに限定されない。核酸分子中の全ての結合が同一である必要はない。上記の説明は、DNA及びRNAを含む、本明細書で言及される全ての核酸分子に適用される。

【0046】

本明細書で使用されるとき、用語「ポリペプチド」とは、モノマーがアミド結合を介して互いに結合しているアミノ酸残基である単一のポリマーを指す。ポリペプチドは、天然のもの、組換えのもの、及び合成的に製造されたもののいずれのアミノ酸配列も包含することを意図している。

【0047】

本明細書で使用されるとき、用語「治療及び/又は予防」は、本発明の方法及び組成物を使用した、疾患、例えば代謝性疾患（例えば肥満、1型及び2型糖尿病）又は神経疾患（例えばALS及びパーキンソン病）の治療及び/又は予防を指す。一般に、代謝性疾患又は神経性疾患の治療は、対象が代謝性疾患又は神経性疾患を発症した後、及び/又は代謝性疾患又は神経性疾患と既に診断された後に行われる。代謝性疾患又は神経性疾患を予防することは、対象が代謝性疾患又は神経性疾患を発症する危険性があるときにとられるステップ又は手順を指す。対象は、代謝性疾患又は神経学的疾患を発症する徴候又は危険因子であることが医師によって判断される兆候又は軽度の症状を示し得るが、まだ疾患を発症していない。

【0048】

本明細書で使用されるとき、用語「代謝性疾患」は、食物中の炭水化物、タンパク質、

及び脂肪を分解してエネルギーを放出し、化学物質を他の物質に変換し、エネルギー利用及び／又は貯蔵のために細胞内にそれらを輸送するといった対象の代謝に関連する疾患、障害、又は症候群を指す。代謝性疾患のいくつかの症状には、高い血清トリグリセリド、高い低密度コレステロール（LDL）、低い高密度コレステロール（HDL）、及び／又は空腹時インスリン値の上昇、空腹時血漿グルコースの上昇、腹部（中部）肥満、ならびに血圧の上昇が挙げられる。代謝性疾患は、心血管疾患などの他の疾患を発症するリスクを高める。本発明において、代謝性疾患としては、肥満、1型糖尿病、及び2型糖尿病が挙げられるが、これらに限定されない。

【0049】

本明細書で使用されるとき、用語「体重増加率」は、以前の時点における対象の以前の体重と比較した、増加した体重の割合を指す。体重増加率は次のように計算できる。

$$100 \times [(\text{後の時点の体重} - \text{前の時点の体重}) / (\text{前の時点の体重})]$$

本発明において、GDNF融合ポリペプチド、GDNF融合ポリペプチドをコードする核酸分子、又はそのような核酸分子を含むベクターの対象への投与は、対象の体重増加率を減少させる（例えば、実施例5及び図3を参照のこと）。

【0050】

本明細書で使用されるとき、用語「食物摂取に対する食欲」は、対象の食物に対する自然な欲求又は必要性を指す。対象の食物摂取に対する食欲は、GDNF融合ポリペプチドが投与された後に消費される食物の量を測定することによってモニタリングされ得る（例えば、実施例6及び図4を参照のこと）。本発明において、GDNF融合ポリペプチド、GDNF融合ポリペプチドをコードする核酸分子、又はそのような核酸分子を含むベクターの対象への投与は、対象の食物摂取に対する食欲に影響を及ぼさない。

【0051】

本明細書で使用されるとき、用語「脂肪症」は、対象の脂肪組織に貯蔵されている脂肪を指す。本発明において、GDNF融合ポリペプチド、GDNF融合ポリペプチドをコードする核酸分子、又はそのような核酸分子を含むベクターを対象に投与することは、除脂肪量に影響を及ぼすことなく対象の脂肪症を軽減する。

【0052】

本明細書で使用されるとき、用語「除脂肪量」は、例えば除脂肪分、体脂肪、及び体液を含む体組成のうちの成分を指す。通常、除脂肪量は、総体重から体脂肪及び体液の重量を引くことによって計算される（例えば、実施例7及び図5参照）。典型的には、対象の除脂肪量は全体重の60%～90%である。本発明では、GDNF融合ポリペプチド、GDNF融合ポリペプチドをコードする核酸分子、又はそのような核酸分子を含むベクターを対象に投与することで、除脂肪量に影響を与えることなく対象の脂肪症（すなわち脂肪）が減少する。

【0053】

本明細書で使用されるとき、用語「精巣上体及び腎周囲の脂肪体」とは、精巣上体及び腎臓周辺の密集した脂肪細胞を指す。本発明では、GDNF融合ポリペプチド、GDNF融合ポリペプチドをコードする核酸分子、又はそのような核酸分子を含むベクターを対象に投与することで、対象の精巣上体及び腎周囲の脂肪体の重量が減少する。

【0054】

本明細書で使用されるとき、用語「空腹時インスリン」とは、対象がある期間（すなわち、12～24時間）にわたって食物摂取を全くしていない間の対象のインスリンレベルをいう。空腹時インスリン値は代謝性疾患の診断に使用される。空腹時インスリンレベルは、対象が代謝性疾患を発症する危険性があるかどうかの指標としても使用される。通常、1型糖尿病に罹患している対象において、対象の空腹時インスリンレベルは健康な対象のそれと比較して低い。インスリン抵抗性（すなわち、2型糖尿病）に罹患している対象において、対象の空腹時インスリンレベルは健康な対象のそれと比較して高い。本発明において、GDNF融合ポリペプチド、GDNF融合ポリペプチドをコードする核酸分子、又はそのような核酸分子を含むベクターを対象に投与することで、対象の空腹時インスリ

10

20

30

40

50

ンレベルが低下する。

【0055】

本明細書で使用されるとき、用語「グルコースクリアランス速度」は、グルコースが血液から除去される速度を指す。グルコースクリアランス速度は、グルコース負荷試験（GTT）で測定することができる（例えば、実施例8及び図6を参照のこと）。GTTでは、対象に一定量のグルコースを投与し、その後血液試料を採取して、それが血液からどれだけ早く除去されるかを決定する。グルコースクリアランス速度は、肥満、糖尿病、及びインスリン抵抗性などの代謝性疾患を発症するリスクを診断及び/又は決定する際のパラメータとして使用することができる。

【0056】

本明細書で使用されるとき、用語「血清脂質プロファイル」とは、対象の血清中の様々な種類の脂質及びリポタンパク質の分布の測定をいう。そのような測定は、一揃いの血液検査によって達成され得る。対象の血清中の脂質及びリポタンパク質の種類としては、コレステロール（例えば、高密度リポタンパク質（HDL）及び低密度リポタンパク質（LDL））、トリグリセリド、及び遊離脂肪酸（FFA）が挙げられるが、これらに限定されない。様々な種類の脂質及びリポタンパク質の分布は、肥満、糖尿病、及びインスリン抵抗性などの代謝性疾患を発症する危険性を診断及び/又は決定する際のパラメータとして使用することができる。高レベルのコレステロール、特に低密度リポタンパク質は、一般的に特定の代謝性疾患を、又はいくつかの重度の医学的症例では心血管疾患を発症する兆候又は危険因子と見なされている。本発明では、GDNF融合ポリペプチド、GDNF融合ポリペプチドをコードする核酸分子、又はそのような核酸分子を含むベクターを対象に投与することで、コレステロールレベル（特に低密度リポタンパク質）及びトリグリセリドが低下するように対象の血清脂質プロファイルが改善される。

【0057】

本明細書で使用されるとき、用語「流体力学的注入」とは、目的のタンパク質（例えば、本発明のGDNF融合ポリペプチド）をコードする核酸分子を含有する操作プラスミド（例えば、ウイルスプラスミド）を大量の液体によって迅速に対象に静脈内注射するインビボ遺伝子送達方法を指す。流体力学的注入は、静脈内の制御された流体力学的圧力を使用して細胞透過性を高め、その結果、大量の流体を迅速に注入することに由来する高圧が、静脈からの流体及びプラスミドの血管外遊出をもたらす。一般に、核酸分子は、操作されたプラスミド中の強力なプロモーターの制御下に置かれる。核酸分子の発現は主に肝臓によって促進される。マウスでは、流体力学的注入はしばしば尾静脈へのプラスミドの注射によって行われる。

【0058】

本明細書で使用されるとき、用語「配列同一性パーセント（％）」とは、最大の配列同一性パーセントを達成するように配列を整列させ、必要に応じてギャップを導入した後の（すなわち、ギャップは最適なアラインメントのために候補配列及び参照配列の一方又は両方に導入することができ、非相同配列は、比較目的のために無視することができる）、参照配列（例えば野生型ヒトGDNF）のアミノ酸（又は核酸）と同一である候補配列（例えばGDNF変体の配列）のアミノ酸（又は核酸）残基の百分率を指す。同一性パーセントを決定する目的のための整列は、例えばBLAST、ALIGN、又はMegalign（DNASTAR）ソフトウェアなどの公的に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用して、当技術分野の範囲内である様々な方法で達成することができる。当業者は、比較される配列の全長にわたって最大のアラインメントを達成するために必要とされる任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。いくつかの実施形態では、所与の参照配列に対する所与の候補配列（あるいは、所与の参照配列に対し、あるアミノ酸（又は核酸）同一性パーセントを有する又は含む所与の候補配列と言い換えることができる）のアミノ酸（又は核酸）配列同一性パーセントは、以下のように計算される。

【0059】

$100 \times (\text{分数 } A / B)$

ここで、Aは候補配列と参照配列とのアラインメントにおいて同一と評価されたアミノ酸（又は核酸）残基の数であり、Bは参照配列のアミノ酸（又は核酸）残基の総数である。候補配列の長さが参照配列の長さと同じでないいくつかの実施形態では、参照配列に対する候補配列のアミノ酸（又は核酸）配列同一性パーセントは、候補配列に対する参照配列のアミノ酸（又は核酸）配列同一性パーセントと等しくないであろう。

【0060】

特定の実施形態では、候補配列との比較のために整列された参照配列は、候補配列の全長又は連続するアミノ酸（又は核酸）残基の選択された部分にわたって候補配列が50%～100%の同一性を示すことを示し得る。比較目的のために整列される候補配列の長さは、参照配列の長さの少なくとも30%、例えば少なくとも40%、例えば少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、又は100%である。候補配列中の位置が参照配列中の対応する位置と同じアミノ酸（又は核酸）残基によって占められている場合、それらの分子はその位置では同一である。

10

【0061】

本明細書で使用されるとき、用語「参照GDNF配列」とは、他の配列、すなわちGDNF変体の配列と比較して、例えばGDNF変体の配列の参照GDNF配列に対する配列同一性パーセントを計算することができる塩基配列を指す。参照GDNF配列のアミノ酸（又は核酸）残基の総数は、典型的にはそのような比較において使用される。上記の式において、 $100 \times (\text{分数 } A / B)$ は、参照配列、例えば参照GDNF配列に対する候補配列、例えばGDNF変体の配列の配列同一性パーセントを算出し、AはGDNF変体の配列中の、参照GDNF配列中の対応する位置にある残基と同一のアミノ酸（又は核酸）残基の数であり、Bは参照GDNF配列のアミノ酸（又は核酸）残基の総数である。

20

【0062】

本明細書で使用されるとき、用語「宿主細胞」とは、タンパク質をそれらの対応する核酸から発現するのに必要とされる必須の細胞成分、例えば、細胞小器官を含む媒体を指す。核酸は、典型的には、当該分野で公知の従来技術（例えば、形質転換、トランスフェクション、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、直接マイクロインジェクションなど）によって宿主細胞に導入することが可能な核酸ベクターに含まれる。宿主細胞は原核細胞、例えば細菌細胞、又は真核細胞、例えば哺乳動物細胞（例えばCHO細胞）であり得る。本明細書に記載されるように、宿主細胞は、本発明のGDNF融合ポリペプチドをコードする核酸分子を発現するために使用される。

30

【0063】

本明細書で使用されるとき、用語「ベクター」とは、それに結合している別の核酸分子を輸送することができる核酸分子を指す。ベクターの1種は「プラスミド」であり、これは追加のDNAセグメントを連結することができる環状二本鎖DNAループを指す。別の種類のベクターはファージベクターである。別の種類のベクターはウイルスベクターであり、追加のDNAセグメントをウイルスゲノムに連結することができる。ある種のベクターは、それらが導入された宿主細胞中で自律複製することができる（例えば、細菌の複製起点を有する細菌性ベクター及びエピソーム性哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソーム性哺乳動物ベクター）は、宿主細胞への導入時に宿主細胞のゲノムに組み込まれることができ、それによって宿主ゲノムと共に複製される。さらに、ある種のベクターは、それらが機能的に連結されている遺伝子の発現をもたらすことができる。そのようなベクターは、本明細書において「組換え発現ベクター」（又は単に「組換えベクター」）と呼ばれる。一般に、組換えDNA技術において有用な発現ベクターはプラスミドの形態であることが多い。いくつかの実施形態において、ベクターは、複数のGDNF融合ポリペプチドの発現を可能にする内部リボソーム進入部位（IRES）を含み得る。本発明のいくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、本発明のGDNF融合ポリペプチドをコードする核酸分子の*in vivo*遺伝子送達及び発現に使用される。遺伝子送達

40

50

のためのウイルスベクターとしては、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ポックスウイルスベクター（例えば、改変ワクシニアアンカラ（MVA）などのワクシニアウイルスベクター）、アデノ随伴ウイルスベクター、及びアルファウイルスベクターが挙げられるが、これらに限定されない。

【0064】

本明細書で使用されるとき、用語「対象」は哺乳動物、例えば好ましくはヒトを指す。哺乳動物には、ヒト、ならびにサル（例えば、カニクイザル）、マウス、イヌ、ネコ、ウマ、及びウシなどの家庭動物及び家畜などが含まれるが、これらに限定されない。

【0065】

本明細書で使用されるとき、用語「医薬組成物」は、活性成分ならびにその活性成分を投与方法に適したものにするための賦形剤及び希釈剤を含有する医薬又は医薬製剤を指す。本発明の医薬組成物は、GDNF融合ポリペプチド、GDNF融合ポリペプチドをコードする核酸分子、又はそのような核酸分子を含むベクターと適合性のある薬学的に許容される成分を含む。医薬組成物は、静脈内又は皮下投与用には水性の形態であり得、経口投与用には錠剤又はカプセルの形態であり得る。

10

【0066】

本明細書で使用されるとき、用語「薬学的に許容される担体」とは、医薬組成物中の賦形剤又は希釈剤を指す。薬学的に許容される担体は、製剤の他の成分と親和性でなければならず、レシipientに有害であってはならない。本発明において、薬学的に許容される担体は、GDNF融合ポリペプチド、GDNF融合ポリペプチドをコードする核酸分子、又はそのような核酸分子を含むベクターに適切な薬学的安定性を提供しなければならない。担体の性質は投与方法によって異なる。例えば、静脈内投与のためには、水溶液担体が一般的に使用される。経口投与のためには、固体担体が好まれる。

20

【0067】

本明細書で使用されるとき、用語「治療有効量」とは、対象又は患者において所望の生物学的効果を誘導するのに、又は患者が本明細書に記載の症状又は疾患を有するのを治療及び/又は予防するのに有効な量、例えば医薬用量を指す。また、本明細書において、「治療有効量」は、単独で又は他の治療薬と組み合わせて摂取され、1用量もしくは任意の用量又は経路で摂取されて、所望の治療効果を与える量として解釈され得ることもまた理解されるべきである。

30

【図面の簡単な説明】

【0068】

【図1A】本発明の様々なGDNF融合ポリペプチド（融合ポリペプチド1～5、実施例1参照）の発現を示すウエスタンブロットである。

【図1B】3つのドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）ゲルの説明図であり、それぞれ融合ポリペプチド2、3、及び4の還元条件下又は非還元条件下における発現を示す。

【図2】マウスにおけるGDNF融合ポリペプチドの血清濃度を示す4つのグラフを示す図である。

【図3】GDNF融合ポリペプチド6の体重に対する効果を示す2つのグラフを示す図である。

40

【図4】GDNF融合ポリペプチド6の食物摂取に対する効果を示す棒グラフである。

【図5】GDNF融合ポリペプチド6の体組成に対する効果を示す2つのグラフを含む。

【図6】GDNF融合ポリペプチド6のグルコースクリアランス速度に対する効果を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0069】

本発明は、治療用タンパク質としてグリア由来神経栄養因子（GDNF）融合ポリペプチドを調製する組成物及び方法の特徴とする。本発明のGDNF融合ポリペプチドは、ヒトGDNFファミリー受容体アルファ-1（GFR α 1）に結合し、長い血清半減期を有

50

する。本発明はまた、肥満ならびに1型及び2型糖尿病などの代謝疾患、ならびに統合失調症、てんかん、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、パーキンソン病、アルツハイマー病、ハンチントン病、不安、脳卒中、脳腫瘍、脳転移などの神経疾患を治療及び/又は予防するためのこれらのGDNF融合ポリペプチドの医薬組成物及び使用方法を特徴とする。

【0070】

I. GDNF融合ポリペプチド

一般に、本発明は式A-L-Bを有するGDNF融合ポリペプチドを特徴とし、ここで、Aは、GDNF改変体のN末端に直接又はリンカーによって結合されたFcドメイン、アルブミン結合ペプチド、フィブロネクチンドメイン、又はヒト血清アルブミンを含む。好ましい実施形態では、GDNF融合ポリペプチドは単一のオープンリーディングフレームによってコードされる。いくつかの実施形態では、AがFcドメインを含む場合、本発明のGDNF融合ポリペプチドは、FcドメインのN末端に直接又はリンカーによって結合されたアルブミン結合ペプチド、フィブロネクチンドメイン、又はヒト血清アルブミンをさらに含む。

10

【0071】

特定の実施形態では、本発明のGDNF融合ポリペプチドは、3～60日の血清半減期を有する。他の実施形態では、GDNF融合ポリペプチドは、20～20,000pMのK_DでヒトGDNFファミリー受容体アルファ-1（GFR-1）に結合する。

【0072】

II. GDNF改変体

GDNF改変体は、野生型ヒトGDNF（配列番号1）の改変体又は断片を含有するポリペプチドである。いくつかの実施形態では、GDNF改変体は、配列番号1のアミノ酸118～211、117～211、110～211、92～211、又は78～211を含む参照GDNF配列に対して少なくとも80%の配列同一性（例えば、少なくとも85%、90%、95%、97%、又は100%の配列同一性）を有する。野生型ヒトGDNFのアミノ酸配列を以下に示す。

20

【0073】

【化1】

配列番号1：野生型ヒトGDNF

```
1 MKLWDVVAVC LVLLHTASAF PLPAGKRPPE APAEDRSLGR RRAPFALSSD SNMPEDYPDQ
61 FDDVMDIFIQA TIKRLKRSPD QMAVLPRRE RNRQAAAANP ENSRGKGRRG QRGKNRGCVL
121 TAIHLNVTDL GLGYETKEEL IFRYCSGSCD AAETTYDKIL KNLSRNRRLV SDKVQACCR
181 PIAFDDDLSE LDDNLVYHIL RKHSAKRCGC I
```

30

【0074】

ヒトGDNFのアミノ酸78～211は、GDNF機能ドメインを形成する。特定の実施形態では、GDNF改変体は、配列番号1のアミノ酸92～211又はその断片からなる。いくつかの実施形態では、GDNF改変体は、配列番号1のアミノ酸118～211、アミノ酸117～211、アミノ酸110～211、アミノ酸92～211、又はアミノ酸78～211からなる。

40

【0075】

野生型ヒトGDNFは、配列番号1のアミノ酸85と120の間の辺りにある潜在的なタンパク質分解性切断部位を含む。GDNFのこの部位は、タンパク質分解及びさらなる分解をしやすい。したがって、野生型ヒトGDNFは、例えば10分未満の短い血清半減期を示すことが多い（例えば、Boadoら、Drug Metab Dispos. 37:2299-304, 2009のFig. 4を参照）。

【0076】

タンパク質の血清半減期を改善するために、GDNF改変体のタンパク質分解性切断部位を欠失させることができる。他の実施形態では、GDNF改変体は、野生型ヒトGDNF

50

F に対して、潜在的なタンパク質分解部位内（すなわち、配列番号 1 のアミノ酸残基 85 と 120 の間）でのタンパク質分解を減少させるアミノ酸置換を含む。そのようなアミノ酸置換は、タンパク質分解性切断部位における荷電アミノ酸、例えばアルギニン及びリジンを非塩基性アミノ酸に置換することを含む。非塩基性アミノ酸に置換することができるアミノ酸 85 と 120 の間の荷電アミノ酸、例えばアルギニン及びリジンは、R88、R89、R91、R93、R104、K106、R108、R109、R112、K114、及び R116 を含む。これらのアミノ酸残基は、グリシン、アラニン、バリン、イソロイシン、ロイシン、フェニルアラニン、トリプトファン、メチオニン、システイン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、プロリン、アスパラギン酸、及びグルタミン酸などの非塩基性アミノ酸に置換することができる。

10

【0077】

上記の GDNF 改変体を含む GDNF 融合ポリペプチドは、例えば 3 ~ 60 日という長い血清半減期を示し、GFR 1 に対する所望の結合親和性、例えば 20 ~ 20,000 pM の K_D を維持する。

【0078】

III. Fc ドメイン

本発明において、「Fc ドメイン」は、少なくとも C_H2 ドメイン及び C_H3 ドメインを含むヒト Fc ドメインに対して少なくとも 80% の配列同一性（例えば、少なくとも 85%、90%、95%、97%、又は 100% の配列同一性）を有するタンパク質を指す。任意選択で、Fc ドメインは、Fc ドメイン二量体化を低減又は阻害する 1 つ又は複数のアミノ酸置換を含む。任意選択で、Fc ドメインはヒンジドメインを含む。Fc ドメインは、免疫グロブリン抗体アイソタイプ IgG、IgE、IgM、IgA、又は IgD のものであり得る。さらに、Fc ドメインは、IgG サブタイプ（例えば、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、又は IgG4）であり得る。Fc ドメインはまた、天然に存在しない Fc ドメイン、例えば組換え Fc ドメインであり得る。

20

【0079】

二量体化が減少した Fc ドメインを操作する方法は当技術分野において公知である。いくつかの実施形態において、大きい側鎖を有する 1 つ以上のアミノ酸（例えば、チロシン又はトリプトファン）を $C_H3 - C_H3$ 二量体界面に導入して、立体的衝突による二量体形成を妨げることができる。他の実施形態では、小さい側鎖を有する 1 つ以上のアミノ酸（例えば、アラニン、バリン、又はスレオニン）を $C_H3 - C_H3$ 二量体界面に導入して、好ましい相互作用を除去することができる。大きい側鎖又は小さい側鎖を有するアミノ酸を C_H3 ドメインに導入する方法は、例えば、Yingら（J Biol Chem. 287:19399-19408, 2012）、米国特許公開第 2006/0074225 号、米国特許第 8,216,805 号及び第 5,731,168 号、Ridgwayら（Protein Eng. 9:617-612, 1996）、Atwellら（J Mol Biol. 270:26-35, 1997）、及び Merchantら（Nat Biotechnol. 16:677-681, 1998）に記載されており、これらは全て参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

30

【0080】

さらに他の実施形態では、2 つの Fc ドメイン間の $C_H3 - C_H3$ 界面を構成する C_H3 ドメイン中の 1 つ以上のアミノ酸残基が、正に荷電したアミノ酸残基（例えば、リジン、アルギニン、又はヒスチジン）又は負に荷電したアミノ酸（例えば、アスパラギン酸又はグルタミン酸）で置換され、導入された特定の荷電アミノ酸に応じて、相互作用が静電的に不都合になる。二量体形成を不利にするか又は防止するために C_H3 ドメインに荷電アミノ酸を導入する方法は、例えば、Yingら（J Biol Chem. 287:19399-19408, 2012）、米国特許出願公開第 2006/0074225 号、同第 2012/0244578 号、及び同第 2014/0024111 号に記載されており、これらは全て参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

40

【0081】

50

本発明のいくつかの実施形態では、Fcドメインは、以下のアミノ酸置換のうちの1つ以上を含む：ヒトIgG1の配列に対して、T366W、T366Y、T394W、F405W、Y349T、Y349E、Y349V、L351T、L351H、L351N、L352K、P353S、S354D、D356K、D356R、D356S、E357K、E357R、E357Q、S364A、T366E、L368T、L368Y、L368E、K370E、K370D、K370Q、K392E、K392D、T394N、P395N、P396T、V397T、V397Q、L398T、D399K、D399R、D399N、F405T、F405H、F405R、Y407T、Y407H、Y407I、K409E、K409D、K409T、及びK409I。特定の一実施形態では、Fcドメインは、ヒトIgG1の配列に対して、アミノ酸置換T366Wを含む。野生型Fcドメインの配列は、配列番号3に示されている。

10

【0082】

IV. アルブミン結合ペプチド

血清タンパク質ペプチドへの結合は、タンパク質医薬品の薬物動態を改善することができ、特に本明細書に記載のGDNF融合ポリペプチドは、血清タンパク質結合ペプチドと結合され得る。

【0083】

一例として、本明細書に記載の方法及び組成物に使用することができるアルブミン結合ペプチドは、当技術分野において一般的に知られている。一実施形態では、アルブミン結合ペプチドは配列DICLP RWGCLW（配列番号2）を含む。

20

【0084】

本発明において、アルブミン結合ペプチドは、本発明のGDNF融合ポリペプチド中のFcドメインのN末端に連結されて、GDNF融合ポリペプチドの血清半減期を延長し得る。アルブミン結合ペプチドは、直接又はリンカーを介して、FcドメインのN末端に結合させることができる。他の実施形態では、アルブミン結合ペプチドは、直接又はリンカーを介して、GDNF改変体のN末端に結合される。

【0085】

アルブミン結合ペプチドは、GDNF融合ポリペプチドに遺伝的に融合させることができるか、又は化学的手段により、例えば化学的共役によりGDNF融合ポリペプチドに結合させることができる。必要に応じて、スペーサーをGDNF融合ポリペプチドとアルブミン結合ペプチドとの間に挿入することができる。理論に縛られるものではないが、本発明のGDNF融合ポリペプチドにアルブミン結合ペプチドを含めることで、治療用タンパク質の血清アルブミンへの結合を介して治療用タンパク質の長期保持をもたらすことができる。

30

【0086】

V. フィブロネクチンドメイン

フィブロネクチンドメインへの結合は、タンパク質医薬品の薬物動態を改善することができ、特に本明細書に記載のGDNF融合ポリペプチドは、フィブロネクチンドメインと結合され得る。

【0087】

フィブロネクチンドメインは、細胞外マトリックスの高分子量糖タンパク質、又はその断片であり、例えば、インテグリンなどの膜貫通型受容体タンパク質、ならびにコラーゲン及びフィブリンなどの細胞外マトリックス成分に結合する。本発明のいくつかの実施形態において、フィブロネクチンドメインは、本発明のGDNF融合ポリペプチド中のFcドメインのN末端に連結されて、GDNF融合ポリペプチドの血清半減期を延長させる。フィブロネクチンドメインは、直接又はリンカーを介して、FcドメインのN末端に結合させることができる。他の実施形態では、フィブロネクチンドメインは、直接又はリンカーを介して、GDNF改変体のN末端に結合される。

40

【0088】

一例として、本明細書に記載の方法及び組成物に使用することができるフィブロネクチ

50

ンドメインは、当技術分野において一般的に知られている。一実施形態では、フィブロネクチンドメインは、UniProt ID NO: P02751の配列のアミノ酸610～702を有するフィブロネクチンIII型ドメイン（配列番号30）である。別の実施形態では、フィブロネクチンドメインはアドネクチンタンパク質である。

【0089】

フィブロネクチンドメインは、GDNF融合ポリペプチドに遺伝的に融合させることができるか、又は化学的手段により、例えば化学的共役によりGDNF融合ポリペプチドに結合させることができる。必要に応じて、スペーサーをGDNF融合ポリペプチドとフィブロネクチンドメインとの間に挿入することができる。理論に縛られるものではないが、本発明のGDNF融合ポリペプチドにフィブロネクチンドメインを含めることで、インテグリンならびに細胞外マトリックス成分、例えばコラーゲン及びフィブリンへの治療用タンパク質の結合を介して治療用タンパク質の長期保持をもたらす得ることが予想される。

10

【0090】

VI. 血清アルブミン

血清アルブミンへの結合は、タンパク質医薬品の薬物動態を改善することができ、特に本明細書に記載のGDNF融合ポリペプチドは、血清アルブミンと結合され得る。

【0091】

血清アルブミンは、哺乳動物において最も豊富な血液タンパク質である球状タンパク質である。血清アルブミンは肝臓で生成され、血清タンパク質の約半分を占める。それは単量体であり、血液に対し溶解性である。血清アルブミンの最も重要な機能のいくつかとして、体内でホルモン、脂肪酸、及び他のタンパク質を輸送すること、pHを緩衝すること、及び血管と体組織との間に体液を適切に分配するのに必要な浸透圧を維持することが挙げられる。好ましい態様において、血清アルブミンはヒト血清アルブミンである。本発明のいくつかの実施形態において、ヒト血清アルブミンは、本発明のGDNF融合ポリペプチド中のFcドメインのN末端に結合して、GDNF融合ポリペプチドの血清半減期を延長する。ヒト血清アルブミンは、直接又はリンカーを介して、FcドメインのN末端に結合させることができる。他の実施形態では、ヒト血清アルブミンは、直接又はリンカーを介して、GDNF改変体のN末端に結合される。

20

【0092】

一例として、本明細書に記載の方法及び組成物に使用することができる血清アルブミンは、当技術分野において一般的に知られている。一実施形態では、血清アルブミンは、UniProt ID NO: P02768（配列番号：31）の配列を含む。

30

【0093】

血清アルブミンは、GDNF融合ポリペプチドに遺伝的に融合させることができ、又は化学的手段、例えば化学的共役によりGDNF融合ポリペプチドに結合させることができる。必要に応じて、GDNF融合ポリペプチドとヒト血清アルブミンとの間にスペーサーを挿入することができる。理論に縛られるものではないが、本発明のGDNF融合ポリペプチドにヒト血清アルブミンを含めることで、治療用タンパク質の長期保持をもたらす得ることが予想される。

【0094】

40

VII. リンカー

本発明において、リンカーは、ポリペプチド又はタンパク質ドメイン及び/又は関連する非タンパク質部分の間の連結又は結合を記載するために使用される。いくつかの実施形態では、リンカーは、Fcドメイン、アルブミン結合ペプチド、フィブロネクチンドメイン、又はヒト血清アルブミンとGDNF改変体との間の連結又は結合であり、そのためにリンカーはFcドメイン、アルブミン結合ペプチド、フィブロネクチンドメイン、又はヒト血清アルブミンのC末端をGDNF改変体のN末端に繋いで、2つのポリペプチドを互いに直列に連結する。

【0095】

リンカーは、単純な共有結合、例えばペプチド結合、合成ポリマー、例えばポリエチレ

50

10

10

10

10

20

20

20

30

40

50

ペーサーの長さ及び使用されるアミノ酸は、関与する２つのタンパク質ドメイン及び最終的なタンパク質融合ポリペプチドに望まれる柔軟性の程度に応じて調整することができる。スペーサーの長さは、適切なタンパク質フォールディングを確実にし、凝集体形成を回避するように調節することができる。例えば、小さいG D N F 改変体（例えば、配列番号１のアミノ酸１１７～２１１又は１１８～２１１を有するG D N F 改変体）を、短いスペーサー（例えば、G G G（配列番号４））ではなく、より長いスペーサー（例えば、配列G G G G A G G G G（配列番号２２）のスペーサー）に結合させてもよい。

【００９９】

V I I I . ベクター、宿主細胞、及びタンパク質生産

本発明のG D N F 融合ポリペプチドは、宿主細胞から産生され得る。宿主細胞とは、本明細書に記載のポリペプチド及び融合ポリペプチドをそれらの対応する核酸から発現させるのに必要な必須の細胞成分、例えばオルガネラを含む媒体を指す。核酸は、宿主細胞に導入することができる核酸ベクターに、当技術分野において公知の従来技術（例えば、形質転換、トランスフェクション、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、直接マイクロインジェクション、感染など）によって含ませてもよい。核酸ベクターの選択は部分的には使用される宿主細胞に依存する。一般に、好ましい宿主細胞は原核生物（例えば細菌）又は真核生物（例えば哺乳動物）起源のものである。

10

【０１００】

核酸ベクターの構築及び宿主細胞

本発明のG D N F 融合ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸配列は、当該分野において公知の種々の方法によって調製され得る。これらの方法としては、オリゴヌクレオチド媒介（又は部位特異的）突然変異誘発及びP C R 突然変異誘発が挙げられるが、これらに限定されない。本発明のG D N F 融合ポリペプチドをコードする核酸分子は、標準的な技術、例えば遺伝子合成を使用して得ることができる。あるいは、野生型ヒトG D N F をコードする核酸分子を、当技術分野における標準的な技術、例えばQ u i k C h a n g e（商標）突然変異誘発を用いて、切断し及び／又は突然変異させて特定のアミノ酸置換を含むようにすることができる。核酸分子は、ヌクレオチド合成機又はP C R 技術を用いて合成することができる。

20

【０１０１】

本発明のG D N F 融合ポリペプチドをコードする核酸配列は、原核生物又は真核生物宿主細胞において核酸分子を複製及び発現することができるベクターに挿入することができる。多くのベクターが当該分野で利用可能であり、本発明の目的のために使用され得る。各ベクターは、特定の宿主細胞との適合性について調整及び最適化され得る様々な構成要素を含み得る。例えば、ベクター成分は、複製起点、選択マーカー遺伝子、プロモーター、リボソーム結合部位、シグナル配列、目的のタンパク質をコードする核酸配列、及び転写終結配列を含み得るが、これらに限定されない。

30

【０１０２】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞が本発明のための宿主細胞として使用される。哺乳動物細胞種の例としては、ヒト胎児腎臓（H E K）（例えば、H E K 2 9 3、H E K 2 9 3 F）、チャイニーズハムスター卵巢（C H O）、H e L a、C O S、P C 3、V e r o、M C 3 T 3、N S 0、S p 2 / 0、V E R Y、B H K、M D C K、W 1 3 8、B T 4 8 3、H s 5 7 8 T、H T B 2、B T 2 0、T 4 7 D、N S 0（内因的に免疫グロブリン鎖を産生しないネズミ骨髓腫細胞株）、C R L 7 O 3 O、及びH s S 7 8 B s t細胞が挙げられるが、これらに限定されない。他の実施形態では、大腸菌細胞が本発明の宿主細胞として使用される。大腸菌株の例としては、大腸菌 2 9 4（A T C C（登録商標）3 1，4 4 6）、大腸菌 1 7 7 6（A T C C（登録商標）3 1，5 3 7）、大腸菌 B L 2 1（D E 3）（A T C C（登録商標）B A A - 1 0 2 5）、及び大腸菌 R V 3 0 8（A T C C（登録商標）3 1，6 0 8）が挙げられるが、これらに限定されない。異なる宿主細胞は、翻訳後プロセッシング及びタンパク質産物の修飾のための特徴的かつ特異的なメカニズムを有する。発現されたG D N F 融合ポリペプチドの正しい修飾及びプロセッシングを確実に

40

50

するために適切な細胞株又は宿主系を選択することができる。上記の発現ベクターは、当技術分野における従来技術、例えば、形質転換、トランスフェクション、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、及び直接マイクロインジェクションを用いて適切な宿主細胞に導入することができる。ベクターをタンパク質産生のための宿主細胞に導入したら、宿主細胞を、プロモーターの誘導、形質転換体の選択、又は所望の配列をコードする遺伝子の増幅のために適切に改変された従来の栄養培地中で培養する。治療用タンパク質の発現方法は当技術分野において公知である。例えば、Paulina Balbas、Argelia Lorence (編) Recombinant Gene Expression: Reviews and Protocols (Methods in Molecular Biology)、Humana Press; 第2版、2004 及び Vladimir Voynov と Justin A. Caravella (編) Therapeutic Proteins: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology) Humana Press; 第2版、2012を参照。

10

20

30

40

50

【0103】

タンパク質の産生、回収、及び精製

本発明のGDNF融合ポリペプチドを産生するために使用される宿主細胞は、当該分野で公知の、選択された宿主細胞の培養に適した培地中で増殖され得る。哺乳動物宿主細胞に適した培地の例には、最小必須培地(MEM)、ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)、Exp i 293 (商標) 発現培地、ウシ胎仔血清(FBS)を添加したDMEM、及びRPMI-1640が挙げられる。細菌宿主細胞に適した培地の例には、ルリアブロス(LB)+必要な補助剤、例えば選択剤、例えばアンピシリンが含まれる。宿主細胞は、約20 ~ 約39、例えば25 ~ 約37、好ましくは37などの適切な温度、及び5 ~ 10% (好ましくは8%) などのCO₂レベルで培養される。培地のpHは、主に宿主生物に応じて、通常約6.8 ~ 7.4、例えば7.0である。誘導性プロモーターが本発明の発現ベクターにおいて使用される場合、タンパク質発現はプロモーターの活性化に適した条件下で誘導される。

【0104】

タンパク質回収は、典型的には、浸透圧ショック、超音波処理、又は溶解などの手段によって、宿主細胞を破壊することを含む。細胞が破壊されたら、細胞片を遠心分離又は濾過によって除去することができる。タンパク質はさらに精製され得る。GDNF融合ポリペプチドは、タンパク質精製の分野で公知の任意の方法によって、例えばクロマトグラフィー(例えば、イオン交換、アフィニティー、及びサイズ排除カラムクロマトグラフィー)、遠心分離、示差溶解度によって、又はタンパク質の精製のための任意の他の標準的な技術によって精製され得る。例えば、プロテインAカラム(例えば、POROSプロテインAクロマトグラフィー)及びクロマトグラフィーカラム(例えば、POROS HS-50陽イオン交換クロマトグラフィー)などのアフィニティークラム、濾過、限外濾過、塩析及び透析手順を適切に選択し、組み合わせることによって、タンパク質を単離及び精製することができる。いくつかの例において、GDNF融合ポリペプチドは、精製を容易にするためにペプチドなどのマーカー配列に結合させることができる。マーカーアミノ酸配列の例は、ヘキサヒスチジンペプチド(Hisタグ)であり、これは、マイクロモル濃度の親和性でニッケル官能化アガロースアフィニティークラムに結合する。精製に有用な他のペプチドタグとしては、インフルエンザヘマグルチニンタンパク質に由来するエピートープに対応するヘマグルチニン「HA」タグが挙げられるが、これらに限定されない(Wilsonら、Cell 37:767、1984)。

【0105】

あるいは、GDNF融合ポリペプチドは、例えば、遺伝子治療の状況において、本発明のGDNF融合ポリペプチドをコードする核酸分子を含有するベクター(例えば、ウイルスベクター(例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ボックスウイルスベクター(例えば、修飾ワクシニアアンカラ(MVA)などのワクシニアウイルスベ

クター、アデノ随伴ウイルスベクター、及びアルファウイルスベクター))) を投与することによって、対象（例えば、ヒト）の細胞によって産生され得る。ベクターは、（例えば、形質転換、トランスフェクション、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、直接マイクロインジェクション、感染などによって）対象の細胞内に入ると、G D N F 融合ポリペプチドの発現を促進し、それはその後細胞から分泌される。疾患又は障害の治療が望ましい結果である場合、それ以上の処置は必要ないかもしれない。タンパク質の回収が所望される場合、対象から血液が採取されてもよく、タンパク質が当該分野で公知の方法によってその血液から精製され得る。

【0106】

I X . 医薬組成物及び製剤

本発明は、本明細書に記載の1つ以上のG D N F 融合ポリペプチドを含む医薬組成物を特徴とする。いくつかの実施形態において、本発明の医薬組成物は、治療用タンパク質として本発明の1つ以上のG D N F 融合ポリペプチドを含む。他の実施形態では、1つ以上のG D N F 融合ポリペプチドを含有する本発明の医薬組成物は、治療において他の薬剤（例えば、治療用生物製剤及び/又は小分子）又は組成物と組み合わせて使用され得る。G D N F 融合ポリペプチドの治療有効量に加えて、医薬組成物は、1つ以上の薬学的に許容される担体又は賦形剤を含有してもよく、それらは当業者に公知の方法によって製剤化することができる。他の実施形態では、本発明の医薬組成物は、本発明の1つ以上のG D N F 融合ポリペプチドをコードする核酸分子（DNA 又はRNA、例えばmRNA）、又はそのような核酸分子を含むベクターを含む。

【0107】

医薬組成物において許容される担体及び賦形剤は、使用される投与量及び濃度でレシピエントに対して無毒性である。許容される担体及び賦形剤には、リン酸塩、クエン酸塩、H E P E S、及びT A E などの緩衝剤、アスコルビン酸及びメチオニンなどの抗酸化剤、塩化ヘキサメトニウム、塩化オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム、レゾルシノール、及び塩化ベンザルコニウムなどの保存剤、ヒト血清アルブミン、ゼラチン、デキストラン、及び免疫グロブリンなどのタンパク質、ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー、グリシン、グルタミン、ヒスチジン、及びリジンなどのアミノ酸、ならびにグルコース、マンノース、スクロース、及びソルビトールなどの炭水化物が含まれる。本発明の医薬組成物は注射用製剤の形態で非経口的に投与することができる。注射用医薬組成物は、無菌溶液又は任意の薬学的に許容される液体を媒体として用いて製剤化することができる。薬学的に許容される媒体としては、滅菌水、生理食塩水、及び細胞培養培地（例えば、ダルベッコ改変イーグル培地（D M E M）、 - 改変イーグル培地（ - M E M）、F - 1 2 培地）が挙げられるが、これらに限定されない。製剤方法は当技術分野において公知であり、例えばB a n g a（編）T h e r a p e u t i c P e p t i d e s a n d P r o t e i n s : F o r m u l a t i o n , P r o c e s s i n g a n d D e l i v e r y S y s t e m（第2版）T a y l o r & F r a n c i s G r o u p、C R C P r e s s（2006）を参照のこと。

【0108】

本発明の医薬組成物は、ヒドロキシルメチルセルロース又はゼラチン - マイクロカプセル及びポリ - （メチルメタクリレート）マイクロカプセルなどのマイクロカプセル中に調製することができる。本発明の医薬組成物はまた、リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、及びナノカプセルなどの他の薬物送達システム中に調製することもできる。そのような技術は、R e m i n g t o n : T h e S c i e n c e a n d P r a c t i c e o f P h a r m a c y 第22版（2012）に記載されている。i n v i v o 投与に使用される医薬組成物は無菌でなければならない。これは滅菌濾過膜を通して濾過することにより容易に達成される。

【0109】

本発明の医薬組成物は徐放性製剤として調製することもできる。徐放性製剤の適切な例には、本発明のG D N F 融合ポリペプチドを含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリ

10

20

30

40

50

ックスが含まれる。徐放性マトリックスの例としては、ポリエステル、ヒドロゲル、ポリアクチド（米国特許第3,773,919号）、L-グルタミン酸とエチル-L-グルタメートのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、LUPRONDEPOT（商標）などの分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、及びポリ-D-（-）-3-ヒドロキシ酪酸が挙げられる。いくつかの徐放性製剤は、数ヶ月、例えば1～6ヶ月にわたる分子の放出を可能にし、一方、他の製剤は、より短い期間、例えば、数日から数週間、本発明の医薬組成物を放出する。

【0110】

医薬組成物は、必要に応じて単位用量の剤形に形成することができる。医薬製剤中に含まれる活性成分、例えば本発明の1つ以上のGDNF融合ポリペプチドの量は、指定された範囲内の適切な用量が提供されるようなものである（例えば、0.01～30mg/kg体重の範囲内の用量）。

10

【0111】

遺伝子治療のための医薬組成物は、許容される希釈剤中にあり得るか、又は遺伝子送達用媒体が埋め込まれている徐放性マトリックスを含み得る。流体力学的注入が送達方法として使用される場合、GDNF融合ポリペプチドをコードする核酸分子又はその核酸分子を含むベクター（例えば、ウイルスベクター）を含む医薬組成物は、大量の流体容量で静脈内に迅速に送達される。in vivo遺伝子送達用媒体として使用され得るベクターとしては、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ボックスウイルスベクター（例えば、修飾ワクシニアアンカラなどのワクシニアウイルスベクター）、アデノ随伴ウイルスベクター、及びアルファウイルスベクターが挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0112】

X. 経路、用量、及び投与

治療用タンパク質として本発明の1つ以上のGDNF融合ポリペプチドを含む医薬組成物は、静脈内投与、非経口投与、皮下投与、筋肉内投与、動脈内投与、髄腔内投与、又は腹腔内投与用に製剤化することができる。医薬組成物はまた、経口投与、経鼻投与、スプレー投与、エアロゾル投与、直腸投与、もしくは腔投与用に製剤化され得るか、又はそれらを介して投与され得る。注射用製剤について、様々な有効な医薬担体が当分野において知られている。例えば、Pharmaceuticals and Pharmacy Practice、J. B. Lippincott Company、ペンシルバニア州フィラデルフィア、Banker and Chalmers編、238～250頁（1982年）、及びASHP Handbook on Injectable Drugs、Toissel、第4版、622～630頁（1986）を参照のこと。

30

【0113】

いくつかの実施形態では、本発明の1つ以上のGDNF融合ポリペプチドをコードする核酸分子又はそのような核酸分子を含むベクターを含む医薬組成物は、遺伝子送達によって投与され得る。遺伝子送達の方法は当業者に周知である。in vivo遺伝子送達及び発現のために使用され得るベクターとしては、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ボックスウイルスベクター（例えば、修飾ワクシニアアンカラ（MVA）などのワクシニアウイルスベクター）、アデノ随伴ウイルスベクター、及びアルファウイルスベクターが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、ベクターは、複数のGDNF融合ポリペプチドの発現を可能にする内部リボソーム進入部位（IRES）を含み得る。特定の実施形態において、1つ以上のGDNF融合ポリペプチドをコードするmRNA分子は、対象に直接投与され得る。

40

【0114】

本発明のいくつかの実施形態において、1つ以上のGDNF融合ポリペプチドをコードする核酸分子又はそのような核酸分子を含むベクターは、流体力学的注入プラットフォームを用いて投与され得る。流体力学的注入法では、GDNF融合ポリペプチドをコードする核酸分子は、遺伝子操作されたプラスミド（例えば、ウイルスプラスミド）中の強力な

50

プロモーターの制御下に置かれる。プラスミドは静脈内に大量の液量で迅速に送達されることが多い。流体力学的注入は、静脈内の制御された流体力学的圧力を用いて細胞透過性を高め、その結果、大量の流体を急速に注入することによる高圧が、静脈からの流体及びプラスミドの血管外遊出をもたらす。核酸分子の発現は主に肝臓によって促進される。マウスでは、流体力学的注射はしばしば尾静脈へのプラスミドの注射によって行われる。特定の実施形態において、1つ以上のGDNF融合ポリペプチドをコードするmRNA分子は、流体力学的注入を用いて投与され得る。

【0115】

本発明の医薬組成物の用量は、投与経路、治療される疾患、及び対象の身体的特徴、例えば年齢、体重、全身の健康状態などの要因に依存する。典型的には、単回用量に含まれる本発明のGDNF融合ポリペプチドの量は、有意な毒性を誘発することなく疾患を効果的に予防、遅延、又は治療する量であり得る。本発明の医薬組成物は、0.01~500mg/kg（例えば、0.01、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、100、150、200、250、300、350、400、450、又は500mg/kg）、より具体的な実施形態では約0.1~約30mg/kgであり、より具体的な実施形態では、約1~約30mg/kgである範囲の用量の本発明のGDNF融合ポリペプチドを含み得る。用量は、疾患の程度および対象の様々なパラメータなどの従来の要因に従って医師により適合され得る。

10

【0116】

医薬組成物は、剤形に適合する方法で、そして症状の向上又は改善をもたらすのに治療上有効であるような量で投与される。医薬組成物は、様々な剤形、例えば静脈内剤形、皮下剤形、及び経口剤形（例えば、摂取可能な溶液、薬物放出カプセル）で投与される。一般に、治療用タンパク質は0.1~100mg/kg、例えば1~50mg/kgで投与される。本発明のGDNF融合ポリペプチドを含有する医薬組成物は、それを必要とする対象に、例えば、毎日、毎週、毎月、隔年、毎年、又は医学的な必要に応じて1回以上（例えば1~10回又はそれ以上）投与され得る。用量は、単回投与計画又は複数回投与計画のいずれかで提供され得る。投与間隔は、病状が改善するにつれて減少し、又は患者の健康が低下するにつれて増加する。

20

【0117】

XI. 兆候

本発明の医薬組成物及び方法は、代謝性疾患、例えば肥満及び糖尿病（1型及び2型糖尿病）、ならびに神経疾患などの病状を治療及び/又は予防するのに有用である。

30

【0118】

いくつかの実施形態において、本発明のGDNF融合ポリペプチドを含有する医薬組成物は、肥満の発症を予防するために、及び/又は既に肥満と診断された患者を治療するために使用され得る。例えば、対象への本発明のGDNF融合ポリペプチドの投与は、除脂肪量を維持しながら脂肪の量を減少させることにより対象の体重を減少させるのに役立ち得る（例えば、実施例5及び7参照）。

【0119】

いくつかの実施形態において、本発明のGDNF融合ポリペプチドを含有する医薬組成物は、糖尿病（例えば、1型及び2型糖尿病）の発症を予防するために及び/又は既に糖尿病と診断された患者を治療するために使用され得る。糖尿病を発症する可能性がある患者、例えば遺伝的素因、糖尿病の家族歴、他の自己免疫疾患との関連、又は他の代謝性疾患を有する個体には、本発明のGDNF融合ポリペプチドによって細胞の正常な機能と健康を維持し、細胞に対する自己免疫性炎症性損傷を予防又は遅延させるために、本発明のGDNF融合ポリペプチドを予防的に投与してもよい。他の実施形態では、本発明のGDNF融合ポリペプチドを含有する医薬組成物は、糖尿病（例えば、1型及び2型糖尿病）と診断される前又は糖尿病の臨床症状、例えば高血糖レベル、高空腹時インスリンレベル、インスリン抵抗性、多尿症、多飲、及び多食症を発症する前に個体に投与され得る

40

50

。いくつかの実施形態において、G D N F 融合ポリペプチドは、患者がインスリンを必要とする前に患者に投与され得る。さらに他の実施形態において、G D N F 融合ポリペプチドの投与は、糖尿病患者におけるインスリン治療の必要性を遅らせるか又は延期することができる。例えば、対象への本発明のG D N F 融合ポリペプチドの投与は、血液からのグルコースクリアランス速度を上げるのを助け得る（例えば、実施例 8 参照）。

【 0 1 2 0 】

本発明の医薬組成物及び方法はまた、精神分裂病、てんかん、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、パーキンソン病、アルツハイマー病、ハンチントン病、不安、卒中、脳腫瘍、及び脳転移を含むがこれらに限定されない神経疾患を治療するのに有用である。

【 0 1 2 1 】

実施例

実施例 1 - G D N F 融合ポリペプチドの発現

G D N F 融合ポリペプチドの発現のために、G D N F 融合ポリペプチドをコードする核酸分子を含むベクターを、エレクトロポレーションによってチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞にトランスフェクションした。タンパク質発現後、発現された融合ポリペプチドを、プロテイン A ベースのアフィニティーカラムクロマトグラフィーにより細胞培養上清から精製した。精製 G D N F 融合ポリペプチドを、抗 G D N F 抗体を用いてウエスタンブロットにより分析した。図 1 A は、5 つの G D N F 融合ポリペプチドの発現を示す。

【 0 1 2 2 】

融合ポリペプチド 1 : F c - h G D N F ₇₈₋₂₁₁ (配列番号 3 2)

融合ポリペプチド 2 : F c - G G G - h G D N F ₉₂₋₂₁₁ (配列番号 3 3)

融合ポリペプチド 3 : F c - G G G - h G D N F ₁₁₀₋₂₁₁ (配列番号 3 4)

融合ポリペプチド 4 : F c - G G G - h G D N F ₁₁₇₋₂₁₁ (配列番号 3 5)

融合ポリペプチド 5 : F c - G G G G A G G G G - h G D N F ₁₁₇₋₂₁₁ (配列番号 3 6)

上記の各融合ポリペプチドは、単一のオープンリーディングフレームによってコードされている。5 つの融合ポリペプチドのそれぞれを 2 日目及び 6 日目に分析した。図 1 A に示すように、潜在的なタンパク質分解性切断部位（すなわち、配列番号 1 のアミノ酸 8 5 ~ 1 2 0 ）を含む融合ポリペプチド 1 は、6 日目までに分解産物を生成するように見えた。

【 0 1 2 3 】

融合ポリペプチド 2、3 及び 4 のそれぞれもまた、還元条件下又は非還元条件下のいずれかで分析した（図 1 B ）。

実施例 2 - 結合親和性

表面プラズモン共鳴（SPR）を用いて、G D N F 融合ポリペプチドの G F R ₁ に対する結合親和性を決定した。この例における G D N F 融合ポリペプチドは、実施例 1 に記載の融合ポリペプチド 2 ~ 4、ならびに、配列番号 1 のアミノ酸 1 1 7 ~ 2 1 1 を有する G D N F 変体の N 末端に G G G リンカーを介して結合した（ヒト Ig G 1 の配列に対して）アミノ酸置換 T 3 6 6 W を有する F c ドメインを有する F c (T 3 6 6 W) - G G G - h G D N F ₁₁₇₋₂₁₁ (配列番号 3 7) (融合ポリペプチド 6) を含む。SPR アッセイは、His タグ捕捉キット（GE）を用いて CM 5 チップ表面上にヒト G F R ₁、G F R ₂、及び G F R ₃ F c キメラ（R & D Systems）を動態学的分析のための適切なレベルまで捕捉するように構成された。G D N F 融合ポリペプチドを固定化 G F R 上に流して、G D N F 融合ポリペプチドのカイネティクスならびに G F R 会合及び解離を測定した。様々な濃度の G D N F 融合ポリペプチドの結合を HBS - EP 緩衝液（GE Health care）中で 3 0 μ L / 分の流速で測定した。見かけの結合親和性及び速度定数を得るために、Scrubber 2 ソフトウェアを用いて結合曲線をフィッティングした。

【 0 1 2 4 】

表 1 は、C 末端が Fc ドメインに結合したヒト GDNF ファミリー受容体アルファ - 1 (GFR 1) への結合について、本発明の GDNF 融合ポリペプチドの平衡解離定数 K_D が 870 pM (融合ポリペプチド 2) ~ 3.8 nM (融合ポリペプチド 4) の範囲であることを示す。

【0125】

【表 1】

表 1. GDNF 融合ポリペプチドの GFR α 1 への結合親和性

	GFR α 1-hFc $K_{D, app}$
R&D hGDNF	約 900 pM
融合ポリペプチド 2 (Fc-GGG-hGDNF ₉₂₋₂₁₁)	160 pM
融合ポリペプチド 3 (Fc-GGG-hGDNF ₁₁₀₋₂₁₁)	870 pM
融合ポリペプチド 4 (Fc-GGG-hGDNF ₁₁₇₋₂₁₁)	3.8 nM
融合ポリペプチド 6 (Fc (T366W)-GGG-hGDNF ₁₁₇₋₂₁₁)	4.9 nM

10

【0126】

実施例 3 - GFR 1 レポーターアッセイ

HEK293T 細胞を、10% FBS 及び抗生物質を含有する DMEM 中、20,000 細胞 / ウェルの密度で 96 ウェルコラーゲンコートプレートに播種した。6 時間後、製造者の指示に従って Eugene 6 を用いて pFR-Luc (62.5 ng)、pFA-ELK1 (7.5 ng)、hRet (10.5 ng) 及び GFR 1 (4.5 ng) プラスミドを細胞にトランスフェクションした。翌日、細胞を PBS で 1 回洗浄し、1% FBS を含有する新鮮な DMEM 中に 6 ~ 8 時間置いた。次いで、細胞を表示濃度の GDNF 融合ポリペプチドで 16 時間処理した。基質としてルシフェリン (Bright-Glo、Promega) を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。

20

【0127】

実施例 4 - in vivo 血清濃度

本発明の GDNF 融合ポリペプチド 2 ~ 4 (実施例 1 に記載) 及び 6 (実施例 2 に記載) の in vivo 血清濃度を測定するために、トランスジェニックマウス系統 C57BL/6NTa のマウスに、GDNF 融合ポリペプチドをコードする 10 μ g の核酸分子を流体力学的注入により注入した。GDNF 融合ポリペプチドの血清濃度は、注入後の異なる時点で、マウスから採取した血液試料を用いて、酵素結合免疫吸着検定法 (ELISA) を用いて測定した。図 2 に示す結果は、半減期がマウスにおいて 48 時間を超えることを示す。

30

【0128】

実施例 5 - 体重に対する融合ポリペプチド 6 の効果

体重に対する融合ポリペプチド 6 (実施例 2 に記載) の効果を測定するために、トランスジェニックマウス系統 C57BL/6NTa の 3 匹のマウスに、0.3、3.0 又は 10.0 mg/kg の融合ポリペプチド 6 又はリン酸緩衝食塩水 (PBS) を 0 日目に腹腔内注射した。2 ~ 3 日ごとに 3 匹のマウスの平均体重を記録した。体重変化率も計算して記録した。図 3 は、融合ポリペプチド 6 による処理が用量依存的に体重を減少させたことを示す。

40

【0129】

実施例 6 - 食物摂取に対する融合ポリペプチド 6 の効果

実施例 5 に記載したのと同じプロトコルを用いて、異なる投与量の融合ポリペプチド 6 又は PBS を注入したマウスを食物摂取量 (すなわち高脂肪食 (HFD)) についてモニタリングした。1 日の平均摂食量を 0 日目から 2 ~ 3 日ごとに測定し記録した。図 4 は、融合ポリペプチド 6 による処理が食物摂取に対するマウスの食欲に有意な影響を及ぼさなかったことを示す。

【0130】

50

実施例 7 - 体組成に対する融合ポリペプチド 6 の効果

実施例 5 に記載したものと同一プロトコルを用いて、異なる投与量の融合ポリペプチド 6 又は P B S を注入したマウスの脂肪、除脂肪分、及び体液量の変化を注入後 1 8 日目に測定した。

【 0 1 3 1 】

ベースラインからの変化 = (脂肪、除脂肪分、又は体液の最終重量) - (脂肪、除脂肪分、又は体液の初期重量)

ベースラインからの変化率 = $100 \times [(\text{最終重量} - \text{初期重量}) / (\text{初期重量})]$

図 5 に示すように、融合ポリペプチド 6 による処理は、体内の除脂肪量に影響を与えることなく脂肪の量を有意に減少させ、これはマウスの体重減少が脂肪症の軽減に完全に起因することを示している。

10

【 0 1 3 2 】

実施例 8 - グルコースクリアランス速度に対する融合ポリペプチド 6 の効果

実施例 5 に記載したものと同一プロトコルを用いて、異なる投与量の融合ポリペプチド 6 又は P B S を注入したマウスをグルコース負荷試験 (G T T) に供した。5 時間絶食後、マウスの空腹時血糖値を測定し記録した。マウスに D - グルコースを 2 g / k g 体重の用量で腹腔内注射した。血糖測定は、グルコース注射の 1 5 、 3 0 、 6 0 、 9 0 及び 1 2 0 分後に行った。全てのサンプルは尾静脈からの採血で採取し、グルコメーターで測定した。

20

【 0 1 3 3 】

図 6 に示すように、融合ポリペプチド 6 による処理はグルコースクリアランス速度を有意に改善した。1 0 m g / k g の融合ポリペプチド 6 を注射したマウスにおける血清グルコースのレベルは、2 時間後に G T T 前の血清グルコースの初期レベルに戻った。

【 0 1 3 4 】

他の実施形態

本発明をその特定の実施形態に関連して説明してきたが、それはさらなる変更が可能であること、また、本出願は以下の本発明の、概して発明の原理の任意の変形、使用又は適応を包含することを意図するものであることが理解されよう。本発明及び本開示からのそのような逸脱を含む本発明は、本発明が属する技術分野内の既知の又は慣習的な慣例の範囲内であり、上記の本質的な特徴に適用することができる。

30

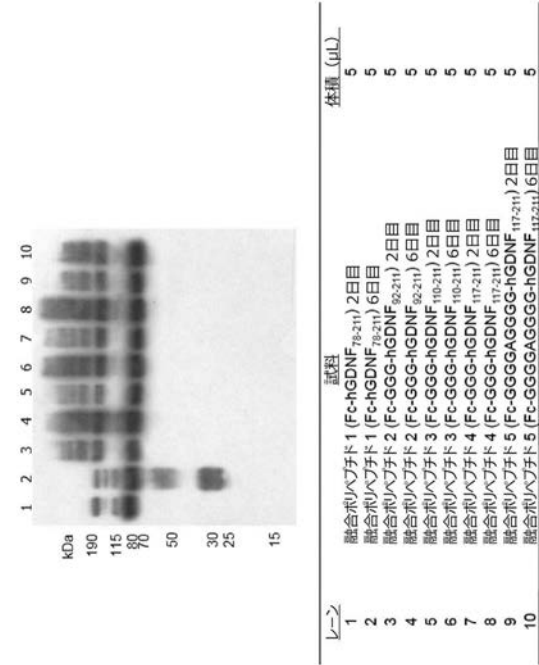
【 0 1 3 5 】

全ての刊行物、特許、及び特許出願は、それら個々の刊行物、特許又は特許出願が全体として参照により本明細書に組み込まれることが具体的かつ個別に示されているのと同程度に、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

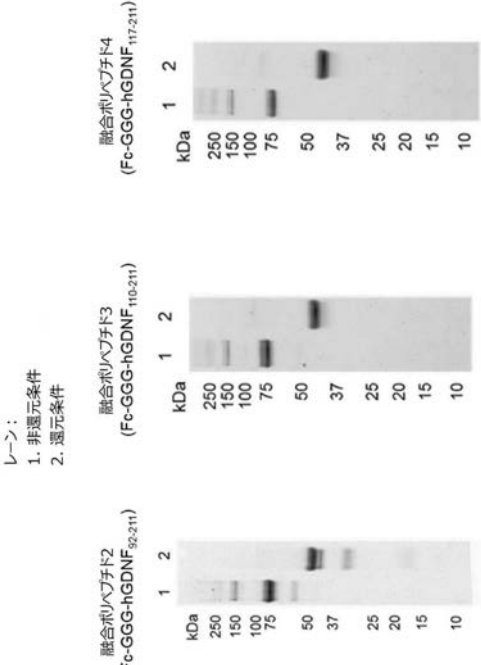
【 0 1 3 6 】

他の実施形態は添付の特許請求の範囲内にある。

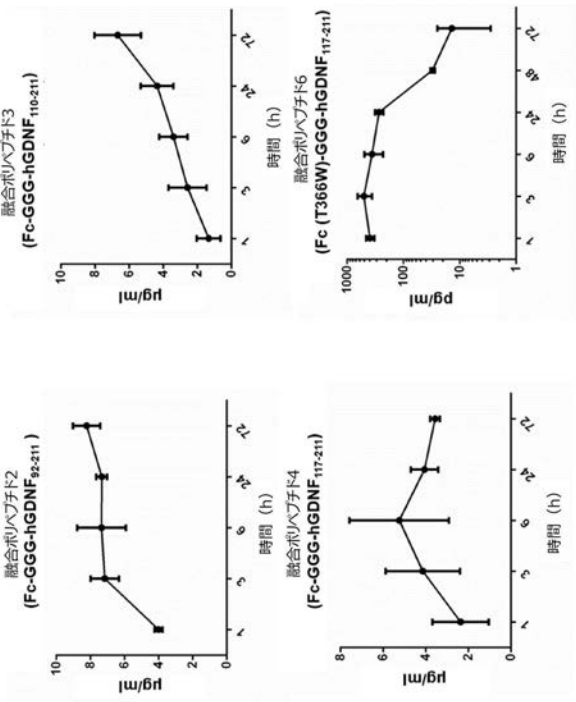
【 図 1 A 】



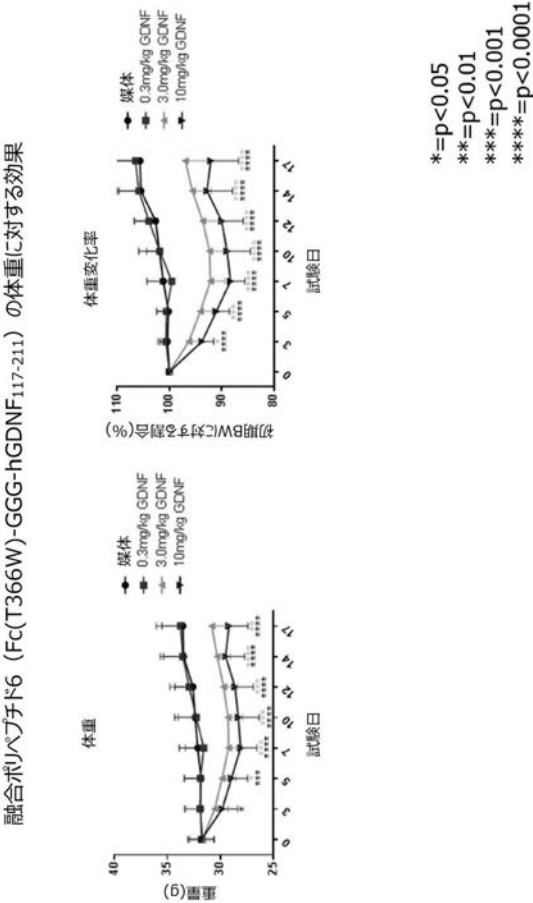
【 図 1 B 】



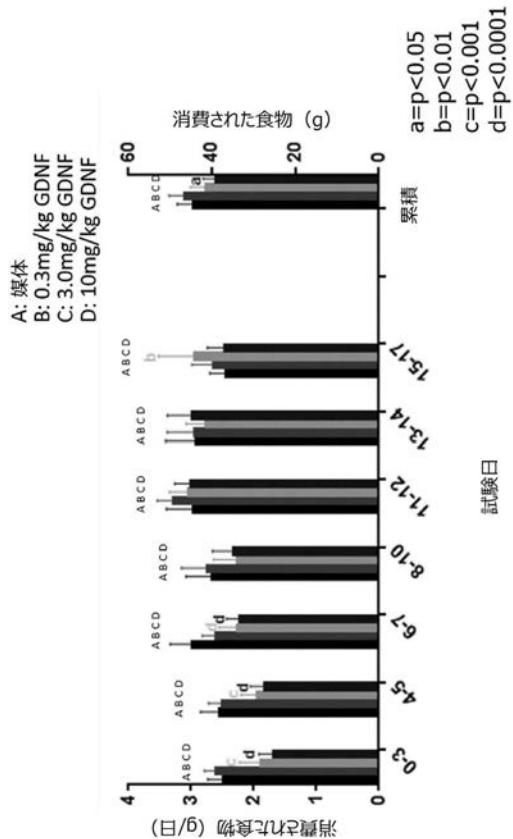
【 図 2 】



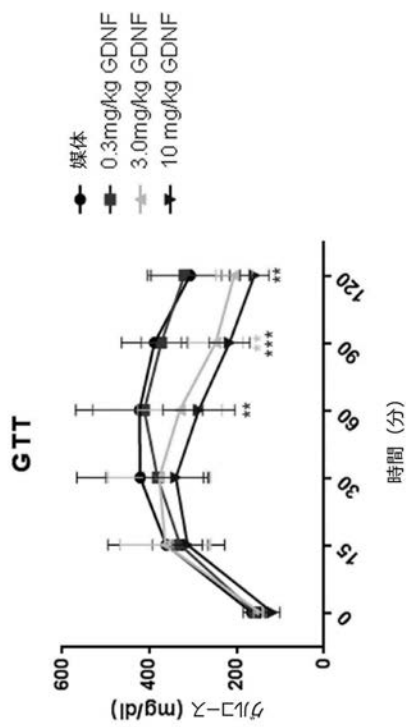
【 図 3 】



【図 4】

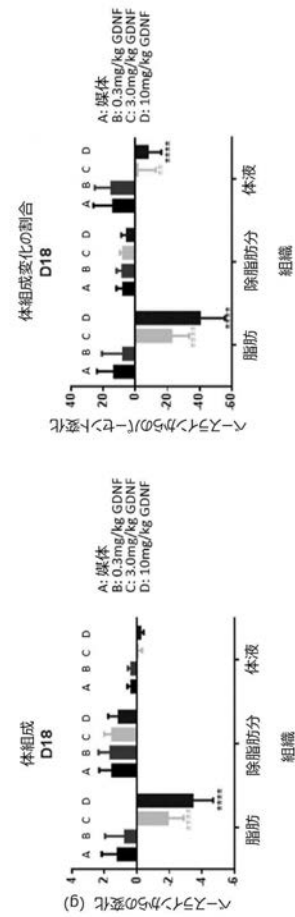
融合ポリペプチド6 (Fc(T366W)-GGG-hGDNF₁₁₇₋₂₁₁) の食物摂取に対する効果

【図 6】

融合ポリペプチド6 (Fc(T366W)-GGG-hGDNF₁₁₇₋₂₁₁) のグルコースクリアランス速度に対する効果

**=p<0.01
 ***=p<0.001

【図 5】

融合ポリペプチド6 (Fc(T366W)-GGG-hGDNF₁₁₇₋₂₁₁) の体組成に対する効果

**=p<0.01
 ****=p<0.0001

【配列表】

2019535267000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 17/60953

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - C07K 19/00, A61P 25/00, C12N 15/62 (2018.01)

CPC - A61K 47/643, A61K 47/64

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)

See Search History Document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

See Search History Document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

See Search History Document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2012/0196803 A1 (DEMEULE et al.) 2 August 2012 (02.08.2012) para [0005], [0006], [0016], Fig. 1	1, 2, 5, 15
Y	US 2014/0113370 A1 (CAMPHAUSEN et al.) 24 April 2014 (24.04.2014) para [0004], [0052], [0059]	1, 2, 15/2
Y	US 2004/0253247 A1 (DENNIS et al.) 16 December 2004 (16.12.2004) abstract, para [0089], [0091], SEQ ID NO: 120	2, 5, 15

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 March 2018

Date of mailing of the international search report

29 MAR 2018

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 17/60953

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.: 13-14, 16-52
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:

----- see extra sheet -----

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, 2, 5, 15 limited to an albumin-binding peptide SEQ ID NO: 2 and GDNF (aa 118-211)

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 17/60953

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 1-12 and 15, directed to a glial-derived neurotrophic factor (GDNF) fusion polypeptide comprising the formula A-L-B, wherein A comprises a Fc domain, L is a linker; and B comprises a fragment of GDNF SEQ ID NO: 1. The GDNF fusion polypeptide will be searched to the extent that the A comprises an albumin-binding peptide, SEQ ID NO: 2, joined to the Fc domain; and B comprises the GDNF fragment amino acids 118-211 of SEQ ID NO: 1. It is believed that claims 1, 2, 5, 15, encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that the GDNF fusion polypeptide comprises an albumin-binding peptide SEQ ID NO: 2 and GDNF (aa 118-211). Additional GDNF fusion polypeptide(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected GDNF fusion polypeptide(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass 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. An exemplary election would be a GDNF fusion polypeptide wherein A comprises an Fc domain joined with an fibronectin domain, and B comprises a GDNF (aa 118-211) (claims 1, 3, 6). Another exemplary election would be a GDNF fusion polypeptide wherein A comprises an Fc domain joined with a human serum albumin, and B comprises a GDNF (aa 117-211) (claims 1, 4, 7, 9(in part)).

The inventions listed as Groups I+ 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:

No technical features are shared among the amino acid sequences of GDNF peptide fragments of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

The inventions of Groups I+ each include the special technical feature of a GDNF fusion polypeptide, recited therein, not required by any other inventions of Groups I+.

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features of claim 1, these shared technical features are previously disclosed by US 2012/0196803 A1 to Demeule et al. (hereinafter 'Demeule') in view of US 2014/0113370 A1 to Camphausen et al. (hereinafter 'Camphausen'). Demeule teaches GDNF fusion polypeptides comprising the formula A-L-B, wherein A comprises a polypeptide, L is a linker; and B comprises a GDNF peptide fragment (para [0005]-[0006] "the invention features a compound including the formula: A-X-B where A is peptide vector; B is a polypeptide substantially identical to (i) GDNF, a fragment thereof having at least one GDNF activity, or a GDNF analog (e.g., any described herein);... and X is a linker (e.g., any described herein) that joins A to B. ... The peptide vector may be present at the N- ... terminal of the GDNF", para [0018] By "peptide vector" is meant a ... molecule such as a polypeptide or a peptidomimetic that can be transported into a particular cell type (e.g., liver, lungs, kidney, spleen, or muscle)", see Fig. 2, white box ia "A", a polypeptide"). Demeule does not expressly teach that A is an Fc domain, however, Camphausen teaches Fc fusions that increase the serum half life of the fusion protein (para [0004] "This application provides novel Fc fusion proteins that increase the serum half-life of various therapeutics, polypeptides having increased serum half-life", para [0052] "novel Fc fusion proteins having the arrangement from N-terminus to C-terminus: Fc-L1-X, where Fc is an Fc domain ... L1 is linker a sequence ... and X is a heterologous polypeptide.", para [0059] "The Fc-L1-X fusion proteins described herein contain an X portion that may be any protein of interest"). Based on Camphausen's teaching, it would have been obvious to an artisan of ordinary skill to experiment with using a Fc domain as the N-terminal portion of Demeule's A-L-B fusion molecule, because said Fc would increase the serum half-life of the GDNF portion of the polypeptide, thus improving it's therapeutic properties.

Another common technical feature of Groups I+, GDNF SEQ ID NO: 1 is previously disclosed by US US 2003/0161814A1 to Wang et al. (hereinafter 'Wang'). Wang teaches a GDNF polypeptide of SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 2, 211 amino acid residues, 100% match).

In addition, the common technical feature of Groups I+, an albumin binding peptide is previously disclosed by US 2004/0253247 A1 to Dennis et al. (hereinafter 'Dennis'). Dennis teaches an albumin binding peptide SEQ ID NO: 2 (SEQ ID NO: 120, 11 amino acid residues, 100% match).

As the technical feature was known in the art at the time of the invention, this cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the inventions.

Groups I+ therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share the same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
A 6 1 K 38/17 (2006.01)		A 6 1 K 38/17		4 C 0 8 7
A 6 1 K 48/00 (2006.01)		A 6 1 K 48/00		4 H 0 4 5
A 6 1 P 3/04 (2006.01)		A 6 1 P 3/04		
A 6 1 P 3/06 (2006.01)		A 6 1 P 3/06		
A 6 1 P 3/10 (2006.01)		A 6 1 P 3/10		
A 6 1 P 9/10 (2006.01)		A 6 1 P 9/10		
A 6 1 P 25/00 (2006.01)		A 6 1 P 25/00		
A 6 1 P 25/08 (2006.01)		A 6 1 P 25/08		
A 6 1 P 25/14 (2006.01)		A 6 1 P 25/14		
A 6 1 P 25/16 (2006.01)		A 6 1 P 25/16		
A 6 1 P 25/22 (2006.01)		A 6 1 P 25/22		
A 6 1 P 25/28 (2006.01)		A 6 1 P 25/28		
A 6 1 P 35/00 (2006.01)		A 6 1 P 35/00		
A 6 1 P 35/04 (2006.01)		A 6 1 P 35/04		
A 6 1 K 47/68 (2017.01)		A 6 1 K 47/68		
A 6 1 K 39/395 (2006.01)		A 6 1 K 39/395	Y	
A 6 1 K 35/76 (2015.01)		A 6 1 K 35/76		
C 0 7 K 14/765 (2006.01)		C 0 7 K 14/765		
C 0 7 K 14/78 (2006.01)		C 0 7 K 14/78		
C 1 2 N 15/14 (2006.01)		C 1 2 N 15/14		

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

(74)代理人 100152489

弁理士 中村 美樹

(72)発明者 シーラ、ジャスパー エス .

アメリカ合衆国 0 2 4 2 1 マサチューセッツ州 レキシントン リンカーン テラス 3

(72)発明者 ラシェイ、ジェニファー

アメリカ合衆国 0 1 7 7 3 マサチューセッツ州 リンカーン タワー ロード 9 9

F ターム(参考) 4B064 AG01 AG24 CA10 CA19 CC24 CE12 DA01

4B065 AA91X AA93Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44

4C076 AA95 CC01 CC21 CC27 CC41 EE59 EE59Q FF63 FF70

4C084 AA02 AA07 AA13 BA01 BA08 BA22 BA23 BA41 BA44 CA28

NA03 NA13 ZA011 ZA012 ZA021 ZA022 ZA061 ZA062 ZA161 ZA162

ZA181 ZA182 ZA361 ZA362 ZA701 ZA702 ZB261 ZB262 ZC331 ZC332

ZC351 ZC352

4C085 AA33 BB42 DD11 EE01 GG02

4C087 AA01 AA02 BC83 NA03 NA13 ZA01 ZA02 ZA06 ZA16 ZA18

ZA36 ZB26 ZC33 ZC35

4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA41 BA57 CA45 EA21 EA27 FA74

GA26 HA02 HA03 HA04 HA05 HA31