

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-110010

(P2017-110010A)

(43) 公開日 平成29年6月22日(2017.6.22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C O 7 K 14/50 (2006.01)	C O 7 K 14/50 Z N A	4 C O 8 4
C O 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00	4 H O 4 5
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 3/04 (2006.01)	A 6 1 P 3/04	

審査請求 有 請求項の数 1 O L 外国語出願 (全 70 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-935 (P2017-935)	(71) 出願人	504389991
(22) 出願日	平成29年1月6日 (2017.1.6)		ノバルティス アーゲー
(62) 分割の表示	特願2013-539257 (P2013-539257) の分割		スイス国 バーゼル リヒトシュトラッセル 35
原出願日	平成23年11月17日 (2011.11.17)	(74) 代理人	100092783
(31) 優先権主張番号	61/415,476		弁理士 小林 浩
(32) 優先日	平成22年11月19日 (2010.11.19)	(74) 代理人	100095360
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 片山 英二
		(74) 代理人	100120134
			弁理士 大森 規雄
		(74) 代理人	100162617
			弁理士 大賀 沙央里
		(74) 代理人	100104282
			弁理士 鈴木 康仁

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 F G F 2 1 関連障害を処置する方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 繊維芽細胞増殖因子 2 1 (F G F 2 1) 関連障害を処置するための方法の提供。

【解決手段】 改善された医薬特性を有する線維芽細胞増殖因子 2 1 (F G F 2 1) の新規ポリペプチド及びタンパク質変異体。 F G F 2 1 関連障害、例えば、肥満、1 型及び 2 型糖尿病、膵炎、脂質異常症、非アルコール性脂肪性肝炎 (N A S H) 、インスリン耐性、高インスリン血症、耐糖能障害、高血糖、メタボリック・シンドロームおよび他の代謝障害を処置するための方法に用いることができる。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

表 1 における配列の群から選択される配列を有するポリペプチド変異体。

【請求項 2】

1 つ以上の以下の修飾：（a）最大 8 個のアミノ酸残基のアミノ末端切断；および（b）最大 12 個のアミノ酸残基のカルボキシル末端切断をさらに含む、請求項 1 に記載の変異体。

【請求項 3】

ポリエチレングリコール（PEG）またはポリシアル酸に共有結合している、請求項 1 に記載の変異体。

【請求項 4】

変異体のシステインに共有結合した分岐状 40 kDa PEG 基をさらに含む、請求項 3 に記載の変異体。

【請求項 5】

以下：IgG 定常ドメインまたはそのフラグメント；ヒト血清アルブミン（HSA）；およびアルブミン結合ポリペプチドの 1 つからなる異種アミノ酸配列に融合している、請求項 1 に記載の変異体。

【請求項 6】

異種アミノ酸配列が変異体のアミノ末端に融合している、請求項 5 に記載の変異体。

【請求項 7】

異種アミノ酸配列が変異体のカルボキシル末端に融合している、請求項 5 に記載の変異体。

【請求項 8】

少なくとも 1 つの請求項 1 に記載の変異体からなる多量体。

【請求項 9】

多量体がホモ二量体である、請求項 8 に記載の多量体。

【請求項 10】

変異体 76（V76）を含む、ポリペプチドまたはタンパク質変異体。

【請求項 11】

位置 154 のシステイン残基でペグ化を有する、請求項 10 に記載の変異体。

【請求項 12】

位置 154 で分岐状 40 kDa PEG 基をさらに含む、請求項 11 に記載の変異体。

【請求項 13】

表 1 における配列からなる群から選択される変異体を含む医薬組成物。

【請求項 14】

位置 154 のシステイン残基でペグ化を有する変異体 76（V76）をさらに含む、請求項 13 に記載の医薬組成物。

【請求項 15】

治療有効量の線維芽細胞増殖因子 21（FGF21）ポリペプチドまたはタンパク質変異体を患者に投与することを含む該患者を処置するための方法であって、該患者は FGF21 関連障害の 1 つ以上を示す、方法。

【請求項 16】

FGF21 関連障害が、1 つ以上の以下：肥満、1 型および 2 型糖尿病、膵炎、脂質異常症、非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）、インスリン耐性、高インスリン血症、耐糖能障害、高血糖、メタボリック・シンドロームおよび他の代謝障害からなる、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

FGF21 関連障害が 1 型糖尿病からなる、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

FGF21 関連障害が 2 型糖尿病からなる、請求項 16 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 19】

治療有効量の線維芽細胞増殖因子 21 (FGF 21) ポリペプチドまたはタンパク質変異体を含む医薬組成物を患者に投与することを含む該患者を処置するための方法であって、該患者は FGF 21 関連障害の 1 つ以上を示す、方法。

【請求項 20】

治療有効量の線維芽細胞増殖因子 21 (FGF 21) ポリペプチドまたはタンパク質変異体を患者に投与することを含む該患者を処置するための方法であって、該患者は FGF 21 関連障害の 1 つ以上を示し、該変異体は位置 154 のシステイン残基でペグ化を有する変異体 76 (V76) をさらに含む、方法。

【請求項 21】

FGF 21 関連障害が、1 つ以上の以下：肥満、1 型および 2 型糖尿病、膵炎、脂質異常症、非アルコール性脂肪性肝炎 (NAFLD)、インスリン耐性、高インスリン血症、耐糖能障害、高血糖、メタボリック・シンドロームおよび他の代謝障害からなる、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

FGF 21 関連障害が 1 型糖尿病からなる、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

FGF 21 関連障害が 2 型糖尿病からなる、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 24】

必要とする患者における高血糖、高インスリン血症、肝臓脂質および体重増加の 1 つ以上を減少させるための方法であって、治療有効量の線維芽細胞増殖因子 21 (FGF 21) ポリペプチドまたはタンパク質変異体を該患者に投与することを含む、方法。

【請求項 25】

変異体が、位置 154 のシステイン残基でペグ化を有する変異体 76 (V76) をさらに含む、請求項 24 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

技術分野

本発明は、改善された医薬特性を有する線維芽細胞増殖因子 21 (FGF 21) の新規ポリペプチドに関する。また、FGF 21 関連障害、例えば、肥満、1 型および 2 型糖尿病、膵炎、脂質異常症、非アルコール性脂肪性肝炎 (NAFLD)、インスリン耐性、高インスリン血症、耐糖能障害、高血糖、メタボリック・シンドロームおよび他の代謝障害を処置するための、および重症患者の死亡率および罹患率を減少させることにおける方法も記載する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

線維芽細胞増殖因子 (FGF) ファミリーは、7 つのサブファミリーにグループ分けされる、22 個の遺伝的に異なる同種リガンドにより特徴付けられる。公開文献によると、FGF ファミリーは、現在、少なくとも 23 メンバー、FGF-1 から FGF-23 からなる (Reussら Cell Tissue Res. 313:139-157 (2003))。

【0003】

FGF-21 は、マウス胚から単離され、FGF-19 および FGF-23 に非常に近い。この FGF サブファミリーは、古典的 FGF に珍しい種々の生理学的プロセス、すなわちエネルギーおよび胆汁酸ホメオスタシス、グルコースおよび脂質代謝およびリン酸塩ならびにビタミン D ホメオスタシスを制御する。さらに、古典的 FGF とは違って、該サブファミリーは、内分泌腺様式において作用する (Moore, D.D. (2007) Science 316, 1436-8)。線維芽細胞増殖因子 21 (FGF 21) は、肝臓において優先的に発現されることを報告されている (Nishimuraら Biochimica et Biophysica Acta, 1492:203-206, (20

10

20

30

40

50

00) ; 特許公報 W O 0 1 / 3 6 6 4 0 ; および特許公報 W O 0 1 / 1 8 1 7 2) 、 虚血性血管疾患、創傷治癒、および、肺、気管支または肺胞細胞機能の喪失と関連する疾患、および、多数の他の障害に対する処置として記載されている。

【 0 0 0 4 】

F G F 2 1 は、強力な代謝レギュレーターとして同定されている。食餌性または遺伝性肥満および糖尿病を有する齧歯動物およびアカゲザルへの F G F 2 1 の全身投与は、強い抗高血糖性およびトリグリセリド低下効果ならびに体重減少を与える。(Coskun,Tら (2008) *Endocrinology* 149:6018-6027; Kharitononkov,Aら (2005) *Journal of Clinical Investigation* 115:1627-1635; Kharitononkov,Aら (2007) *Endocrinology* 148:774-781; Xu, Jら (2009) *Diabetes* 58:250-259)。F G F 2 1 は、28個のアミノ酸リーダー配列を含む209個のアミノ酸ポリペプチドである。ヒト F G F 2 1 は、マウス F G F 2 1 と約79%アミノ酸同一性、およびラット F G F 2 1 と約80%アミノ酸同一性を有する。

10

【 0 0 0 5 】

F G F - 2 1 が F G F 受容体および下流シグナル伝達分子、例えば、F R S 2 a および E R K を活性化するが、F G F R および F G F - 2 1 の直接的相互作用は検出されていない。さらに、種々の非脂肪細胞は、多数の F G F R アイソフォームを発現するけれども、F G F - 2 1 に応答しない。全てのこれらのデータは、補因子が F G F R を介して F G F - 2 1 シグナル伝達を媒介するはずであることを示唆する。最近の試験は、F G F - 2 1 に対する細胞性応答の決定因子として、肝臓、脂肪細胞および膵臓において高度に発現される β -クロトール(klotho)を同定した(Kurosu, Hら (2007) *J Biol Chem* 282, 26687-95)。 β -クロトールは、F G F R 1 c および F G F R 4 に優先的に結合する。F G F R 単独ではない β -クロトール-F G F R 複合体は、インビトロで F G F - 2 1 に結合する(Kharitononkov, Aら (2008) *J Cell Physiol* 215, 1-7)。同様のメカニズムは、F G F - 2 3 -クロトール-F G F R システムにおいて同定されている(Urakawa, Iら (2006) *Nature* 444, 770-4)。

20

【 0 0 0 6 】

F G F - 2 1 の生物活性は、最初に、マウス 3 T 3 - L 1 脂肪細胞グルコース摂取アッセイにおいて同定された(Kharitononkov, Aら (2005) *J Clin Invest* 115, 1627-35)。次に、F G F - 2 1 は、インスリン依存性グルコース摂取および G L U T 1 発現を誘導することを示した。F G F - 2 1 はまた、種々の糖尿病齧歯動物モデルにおいて高血糖を改善することを示した。加えて、F G F - 2 1 を過剰発現するトランスジェニックマウスは、食餌性代謝異常、例えば、体重減少および脂肪塊に対する耐性、ならびにインスリン感受性の増強となることを見出された(Badman, M.Kら (2007) *Cell Metab* 5, 426-37)。糖尿病非ヒト霊長類への F G F - 2 1 の投与は、空腹時血漿グルコース、トリグリセリド、インスリンおよびグルカゴンレベルの減少を引き起こし、リポタンパク質プロファイルにおける有意な改善、例えば、H D L コレステロールの約80%の増加をもたらした(Kharitononkov, Aら (2007) *Endocrinology* 148, 774-81)。重要なことには、低血糖は、N H P 試験中にいずれの時点でも観察されなかった。さらに、最近の試験は、F G F - 2 1 を、空腹時状態への適応をコントロールすることを手助けする重要な内分泌腺ホルモンとして同定した。これは、P P A R α の下流に、以前に失われたリンクを提供しそれにより、肝臓が生物学的エネルギーホメオスタシスの制御において身体の他の部位と連絡する。

30

40

【 0 0 0 7 】

F G F - 2 1 が脂肪(脂肪分解)、肝臓(脂肪酸酸化およびケトン生成)、および脳(けん怠感)を制御するという組合せた観察は、F G F - 2 1 を空腹時の応答の主要な内分泌レギュレーターとして確立する(Kharitononkov, A. & Shanafelt, A.B. (2008) *Bio Drugs* 22, 37-44)。しかしながら、生物学的薬物として直接的に F G F - 2 1 を使用する問題は、その半減期が非常に短いことである。マウスにおいて、ヒト F G F 2 1 の半減期は0.5から1時間であり、カンクイザルにおいて、半減期は2から3時間である。

50

【0008】

1型および2型糖尿病および他の代謝状態の処置における治療剤として使用するためのFGF21タンパク質を開発することにおいて、半減期および安定性における増加が望ましい。増強された半減期および安定性を有するFGF21タンパク質は、該タンパク質を投与される患者のより少ない投与頻度を可能にする。明らかに、治療タンパク質FGF21に対する安定な水性タンパク質製剤を開発する必要性が存在する。

【0009】

FGF21は、多目的の滅菌医薬製剤として利用され得る。しかしながら、防腐剤、すなわち、m-クレゾールが、これらの条件下でその安定性に対する有害な効果を有することが決定されている。本発明は、医薬製剤条件下で野生型FGF21よりも、より安定で、タンパク質分解および酵素分解されにくく、複合体を凝集および形成する可能性が低い、本発明のFGF21の変異体にて、物理的不安定の重大な障害を克服する。

10

【0010】

したがって、本発明のFGF21の変異体は、FGF21関連障害、例えば、肥満、2型糖尿病、1型糖尿病、膵炎、脂質異常症、非アルコール性脂肪性肝炎（NAFLD）、インスリン耐性、高インスリン血症、耐糖能障害、高血糖、メタボリック・シンドローム、高血圧、心臓血管疾患、アテローム性動脈硬化症、末梢動脈疾患、卒中、心不全、冠動脈性心臓疾患、腎臓疾患、糖尿病性合併症、ニューロパシー、胃不全まひおよび他の代謝障害の処置のための、ならびに重症患者の死亡率および罹患率を減少させることにおいて有用な安定な薬理学的タンパク質製剤を提供する。

20

【発明の概要】

【0011】

発明の概要

本発明は、改善された医薬特性を有する、例えば、医薬製剤条件下で野生型FGF21よりも、より安定で、タンパク質分解および酵素分解されにくく、複合体を凝集および形成する可能性が低い、線維芽細胞増殖因子21（FGF21）の新規ポリペプチドおよびタンパク質変異体の同定に関する。また、記載されているものは、FGF21関連障害、例えば、代謝状態を処置するための方法である。

【0012】

本発明のFGF21タンパク質変異体は、単独で、または1型および2型糖尿病患者の血糖コントロール、体重および脂質プロファイルを改善する経口抗糖尿病剤と組み合わせて、週に1回で注射可能用として使用され得る。第1の局面において、本発明は、表1に記載されている配列の1つ以上、およびさらに本明細書に記載されている配列を含むが、これらに限定されない、線維芽細胞増殖因子21（FGF21）のポリペプチドおよびタンパク質変異体を提供する。表1の該FGF21変異体は、種々の部位特異的内部修飾を有する4個のアミノ酸N-末端切断成熟FGF21野生型タンパク質（すなわち、成熟FGF21配列（配列番号：3）の4個の残基N-末端切断バージョン）を含む。表1の変異体は、全長FGF21タンパク質配列（NCBI参照配列番号 NP_061986.1）と比較して番号付けされている；例えば、変異体1（配列番号：5）の位置1におけるアスパラギン酸残基は、配列番号：1の残基数33（および成熟FGF21配列（配列番号：3）の残基数5）に対応する。

30

40

【0013】

表1. 野生型FGF21（配列番号：1）と比較したFGF21変異体、アミノ酸配列およびアミノ酸変化の表

【表 1 - 1】

変異体	配列番号：	配列	先行技術文献記番号：1（全長FGF21タンパク質配列（NCBI参照配列番号NP_061986.1）と比較して作成された部位特異的修飾
1	5	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQTEAHLE IREDGTAGGA ADQSPESLLE LKALKPGVIQ ILGVKTSRFL CQGPDGALYG SLHFDPEACS FRELVLLEDGY NVYQSEAHGL PLHLPGHKSP HRDPAPRGPA RFLPLPGLPP ALPEPPGILA PEPPDVGSSD PLSMVGPSQG RSPSYTS	Q56E, V69A, Q82E, R105G, L127V, N149H, Q184E, A208T
2	6	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQTEAHLE IREDGTAGGA ADQSPESLLN LKALKPGVIQ ILGVKTSRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELVLLEDGY NVYQSEAHGL PLHLPGQKSP HRDPAPRGPA RFLPLPGLPP ALPEPPGILA PNPPDVGSSD PLSMVGPSQG RSPSYTS	Q56N, V69A, Q82N, R105K, L127V, N149Q, Q184N, A208T
5	7	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DDQTEAHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLQ LKALKPGVIQ ILGVKASRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLENGY NVYQSEAHGL PLHLPGNRSP HRDPASQGPA RFLPLPGLPP ALPEPPGILA PQPPDVGSSD PLAMVGPSQA RSPSYAS	A54D, D74H, T98A, R105K, D130N, K150R, P158S, R159Q, S195A, G202A

10

20

【表 1 - 2】

6	8	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DDQQTEAHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLQ LKALKPGVIO ILGVQTSRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLENGY NVYQSETHGL PLHLPGNKSP HRDPASQGPA RFLPLPGLPP ALPEPPGILA PQPPDVGSDD PLAMVGPSQA RSPSYAS	A54D, D74H, K97Q, R105K, D130N, A139T, P158S, R159Q, S195A, G202A
7	9	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQETEAHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLQ LKALKPGVIO ILGVKASRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLENGY NVYQSEAHGL PLHLPGNRSP HRDPASQGPA RFLPLPGLPP ALPEPPGILA PQPPDVGSDD PLAMVGPSQA RSPSYAS	Q56E, D74H, T98A, R105K, D130N, K150R, P158S, R159Q, S195A, G202A
8	10	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQETEAHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLQ LKALKPGVIO ILGVQTSRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLENGY NVYQSETHGL PLHLPGNKSP HRDPASQGPA RFLPLPGLPP ALPEPPGILA PQPPDVGSDD PLAMVGPSQA RSPSYAS	Q56E, D74H, K97Q, R105K, D130N, A139T, P158S, R159Q, S195A, G202A
9	11	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DDQQTEAHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLQ LKALKPGVIO ILGVKASRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLENGY NVYQSETHGL PLHLPGNKSP HRDPASQGPA RFLPLPGLPP ALPEPPGILA PQPPDVGSDD PLAMVGPSQA RSPSYAS	A54D, D74H, T98A, R105K, D130N, A139T, P158S, R159Q, S195A, G202A
10	12	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQETEAHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLQ LKALKPGVIO ILGVKASRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLENGY NVYQSETHGL PLHLPGNKSP HRDPASQGPA RFLPLPGLPP ALPEPPGILA PQPPDVGSDD PLAMVGPSQA RSPSYAS	Q56E, D74H, T98A, R105K, D130N, A139T, P158S, R159Q, S195A, G202A
11	13	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DDQQTEAHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLE LKALKPGVIO ILGVKTSRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLENGY NVYQSEAHGL PLHLPGNRSP HRDPAPQGPA RFLPLPGLPP ALPEPPGILA PQPPDVGSDD PLAMVGPSQG RSPSYAS	A54D, D74H, Q82E, R105K, D130N, K150R, R159Q, S195A
12	14	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DDQQTEAHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLQ LKALKPGVIO ILGVQTSRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLENGY NVYQSEAHGL PLHLPGNRSP HRDPAPQGPA RFLPLPGLPP ALPEPPGILA PQPPDVGSDD PLAMVGPSQG RSPSYAS	A54D, D74H, K97Q, R105K, D130N, K150R, R159Q, S195A
13	15	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DDQQTEAHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLQ LKALKPGVIO ILGVKASRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLENGY NVYQSEAHGL PLHLPGNRSP HRDPAPQGPA RFLPLPGLPP ALPEPPGILA PQPPDVGSDD PLAMVGPSQG RSPSYAS	A54D, D74H, T98A, R105K, D130N, K150R, R159Q, S195A

10

20

30

【 0 0 1 4 】

【表 1 - 3】

14	16	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQETEAHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLE LKALKPGVIQ ILGVKTSRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLENGY NVYQSEAHGL PLHLPGNRSP HRDPAPQGPA RFLPLPGLPP ALPEPPGILA PQPPDVGSDD PLAMVGPSQG RSPSYAS	Q56E, D74H, Q82E, R105K, D130N, K150R, R159Q, S195A
14- R154C, L174P	17	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQETEAHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLE LKALKPGVIQ ILGVKTSRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLENGY NVYQSEAHGL PLHLPGNRSP HCDPAPQGPA RFLPLPGLPP APPEPPGILA PQPPDVGSDD PLAMVGPSQG RSPSYAS	Q56E, D74H, Q82E, R105K, D130N, K150R, R154C, R159Q, L174P, S195A
15	18	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQETEAHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLQ LKALKPGVIQ ILGVQTSRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLENGY NVYQSEAHGL PLHLPGNRSP HRDPAPQGPA RFLPLPGLPP ALPEPPGILA PQPPDVGSDD PLAMVGPSQG RSPSYAS	Q56E, D74H, K97Q, R105K, D130N, K150R, R159Q, S195A
16	19	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQETEAHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLQ LKALKPGVIQ ILGVKASRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLENGY NVYQSEAHGL PLHLPGNRSP HRDPAPQGPA RFLPLPGLPP ALPEPPGILA PQPPDVGSDD PLAMVGPSQG RSPSYAS	Q56E, D74H, T98A, R105K, D130N, K150R, R159Q, S195A
17	20	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQQTESHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLE LKALKPGVIQ ILGVKTSRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLENGY NVYQSEAHGL PLHLPGNRSP HRDPAPQGPA RFLPLPGLPP ALPEPPGILA PQPPDVGSDD PLAMVGPSQG RSPSYAS	A59S, D74H, Q82E, R105K, D130N, K150R, R159Q, S195A
18	21	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQQTESHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLQ LKALKPGVIQ ILGVQTSRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLENGY NVYQSEAHGL PLHLPGNRSP HRDPAPQGPA RFLPLPGLPP ALPEPPGILA PQPPDVGSDD PLAMVGPSQG RSPSYAS	A59S, D74H, K97Q, R105K, D130N, K150R, R159Q, S195A
19	22	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQQTESHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLQ LKALKPGVIQ ILGVKASRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLENGY NVYQSEAHGL PLHLPGNRSP HRDPAPQGPA RFLPLPGLPP ALPEPPGILA PQPPDVGSDD PLAMVGPSQG RSPSYAS	A59S, D74H, T98A, R105K, D130N, K150R, R159Q, S195A
50	23	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DDQQTAEHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLQ LKALKPGVIQ ILGVQTSRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLENGY NVYQSEAHGL PLHLPGNRSP HRDPASQGPA RFLPLPGLPP ALPEPPGILA PQPPDVGSDD PLAMVGPSQA RSPSYAS	A54D, D74H, K97Q, R105K, D130N, K150R, P158S, R159Q, S195A, G202A

10

20

30

【表 1 - 4】

51	24	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQETEAHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLQ LKALKPGVIQ ILGVQTSRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLENGY NVYQSEAHGL PLHLPGNRSP HRDPASQGPA RFLPLPGLPP ALPEPPGILA PQPPDVGSSD PLAMVGPSQA RSPSYAS	Q56E, D74H, K97Q, R105K, D130N, K150R, P158S, R159Q, S195A, G202A
52	25	DSSPLVQFGG QVRQRYLYTD DAQQTEAHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLQ LKALKPGVIQ ILGVKTSRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLENGY NVYQSEAHSL PLHLPGNKSP HRDPASQGPA RFLPLPGLPP ALPEPPGILA PQPPDVGSSD PLSMVGPSQA RSPSYAS	L38V, D74H, R105K, D130N, G141S, P158S, R159Q, G202A
53	26	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQETEAHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLE LKALKPGVIQ ILGVKTSRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLENGY NVYQSEAHGL PLHLPGNRSP HRDPASQGPA RFLPLPGLPP APPEPPGILA PQPPDVGSSD PLAMVGPSQG RSPSYAS	Q56E, D74H, Q82E, R105K, D130N, K150R, P158S, R159Q, L174P, S195A
54	27	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQQTEAHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLE LKALKPGVIQ ILGVKTSRFL CQKPDGTYLG SLHFDPEACS FRELLLENGY NVYQSEAHGL PLHLPGNRSP HRDPASQGPA RFLPLPGLPP APPEPPGILA PQPPDVGSSD PLAMVGPSQG RSPSYAS	D74H, Q82E, R105K, A109T, D130N, K150R, P158S, R159Q, L174P, S195A
55	28	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQQTEAHLE IREDGTAGGA AHQSPESLLE LKALKPGVIQ ILGVKTSRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLENGY NVYQSEAHGL PLHLPGNRSP HRDPASQGPA RFLPLPGLPP APPEPPGILA PQPPDVGSSD PLAMVGPSQG RSPSYAS	V69A, D74H, Q82E, R105K, D130N, K150R, P158S, R159Q, L174P, S195A
56	29	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQQTEAHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLQ LKALKPGVIQ ILGVKASRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLENGY NVYQSETHGL PLHLPGNKSP HRDPASQGPA RFLPLPGLPP APPEPPGILA PQPPDVGSSD PLAMVGPSQA RSPSYAS	D74H, T98A, R105K, D130N, A139T, P158S, R159Q, L174P, S195A, G202A
57	30	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQQTEAHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLQ LKALKPGVIQ ILGVKASRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLENGY NVYQSETHGL PLHLPGNRSP HRDPASQGPA RFLPLPGLPP APPEPPGILA PQPPDVGSSD PLAMVGPSQA RSPSYAS	D74H, T98A, D130N, A139T, K150R, P158S, R159Q, L174P, S195A, G202A
58	31	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQQTEAHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLQ LKALKPGVIQ ILGVKTSRFL CQKPDGTYLG SLHFDPEACS FRELLLENGY NVYQSETHGL PLHLPGNRSP HRDPASQGPA RFLPLPGLPP APPEPPGILA PQPPDVGSSD PLAMVGPSQA RSPSYAS	D74H, A109T, D130N, A139T, K150R, P158S, R159Q, L174P, S195A, G202A

10

20

30

【表 1 - 5】

59	32	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DACQTEAHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLE LKALKPGVIQ ILGVKTSRFL CQRPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLENGY NVYQSEAHGL PLHLPCNRSP HRDPASQGPA RFLPLPGLPP APPEPPGILA PQPPDVGSSD PLAMVGPSQG RSPSYAS	Q55C, D74H, Q82E, D130N, G148C, K150R, P158S, R159Q, L174P, S195A
60	33	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DACQTEAHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLE LKALKPGVIQ ILGVKTSRFL CQRPDGTLYG SLHFDPEACS FRELLLENGY NVYQSEAHGL PLHLPCNRSP HRDPASRGPA RFLPLPGLPP APPEPPGILA PQPPDVGSSD PLAMVGPSQG RSPSYAS	Q55C, D74H, Q82E, A109T, D130N, G148C, K150R, P158S, L174P, S195A
61	34	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DACQTEAHLE IREDGTAGGA AHQSPESLLE LKALKPGVIQ ILGVKTSRFL CQRPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLENGY NVYQSEAHGL PLHLPCNRSP HRDPASRGPA RFLPLPGLPP APPEPPGILA PQPPDVGSSD PLAMVGPSQG RSPSYAS	Q55C, V69A, D74H, Q82E, D130N, G148C, K150R, P158S, L174P, S195A
62	35	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DACQTEAHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLQ LKALKPGVIQ ILGVKTSRFL CQRPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLENGY NVYQSETHGL PLHLPCNKSP HRDPASQGPA RFLPLPGLPP APPEPPGILA PQPPDVGSSD PLAMVGPSQA RSPSYAS	Q55C, D74H, D130N, A139T, G148C, P158S, R159Q, L174P, S195A, G202A
63	36	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DACQTEAHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLQ LKALKPGVIQ ILGVKTSRFL CQRPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLENGY NVYQSETHGL PLHLPCNRSP HRDPASRGPA RFLPLPGLPP APPEPPGILA PQPPDVGSSD PLAMVGPSQA RSPSYAS	Q55C, D74H, D130N, A139T, G148C, K150R, P158S, L174P, S195A, G202A
64	37	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DACQTEAHLE IREDGTVGGA ADQSPESLLQ LKALKPGVIQ ILGVKTSRFL CQRPDGTLYG SLHFDPEACS FRELLLENGY NVYQSETHGL PLHLPCNRSP HRDPASRGPA RFLPLPGLPP APPEPPGILA PQPPDVGSSD PLAMVGPSQA RSPSYAS	Q55C, A109T, D130N, A139T, G148C, K150R, P158S, L174P, S195A, G202A
73	38	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQETEAHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLE LKALKPGVIQ ILGVKTSRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLEEGY NVYQSEAHGL PLHLPGNRSP HRDPAPQGPA RFLPLPGLPP ALPEPPGILA PQPPDVGSSD PLAMVGPSQG RSPSYAS	Q56E, D74H, Q82E, R105K, D130E, K150R, R159Q, S195A
76	39	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQETEAHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLE LKALKPGVIQ ILGVKTSRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLEDGY NVYQSEAHGL PLHLPGNRSP HCDPAPQGPA RFLPLPGLPP ALPEPPGILA PQPPDVGSSD PLAMVGPSQG RSPSYAS	Q56E, D74H, Q82E, R105K, K150R, R154C, R159Q, S195A

10

20

30

【表 1 - 6】

79	40	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQQTEAHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLE LKALKPGVIQ ILGVKTSRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLEDGY NVYQSEAHGL PLHLPGNRSP HCDPAPQGPA RFLPLPGLPP ALPEPPGILA PQPPDVGSSD PLAMVGPSQA RSPSYAS	D74H, Q82E, R105K, K150R, R154C, R159Q, S195A, G202A
80	41	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQQTEAHLE IREDGTVGGA ADQSPESLLE LKALKPGVIQ ILGVKTSRFL CQKPDGTYLG SLHFDPEACS FRELLLEDGY NVYQSEAHGL PLHLPGNRSP HCDPAPQGPA RFLPLPGLPP ALPEPPGILA PQPPDVGSSD PLAMVGPSQA RSPSYAS	Q82E, R105K, A109T, K150R, R154C, R159Q, S195A, G202A
81	42	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQQTEAHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLE LKALKPGVIQ ILGVKTSRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLEDGY NVYQSEAHGL PLHLPGNRSP HCDPASQGPA RFLPLPGLPP ALPEPPGILA PQPPDVGSSD PLAMVGPSQG RSPSYAS	D74H, Q82E, R105K, K150R, R154C, P158S, R159Q, S195A
82	43	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQQTEAHLE IREDGTVGGA ADQSPESLLE LKALKPGVIQ ILGVKTSRFL CQKPDGTYLG SLHFDPEACS FRELLLEDGY NVYQSEAHGL PLHLPGNRSP HCDPASQGPA RFLPLPGLPP ALPEPPGILA PQPPDVGSSD PLAMVGPSQG RSPSYAS	Q82E, R105K, A109T, K150R, R154C, P158S, R159Q, S195A
83	44	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQQTEAHLE IREDGTVGGA ADQSPESLLE LKALKPGVIQ ILGVKTSRFL CQKPDGTYLG SLHFDPEACS FRELLLEDGY NVYQSEAHGL PLHLPGNRSP HCDPASRGPA RFLPLPGLPP ALPEPPGILA PQPPDVGSSD PLAMVGPSQA RSPSYAS	Q82E, R105K, A109T, K150R, R154C, P158S, S195A, G202A
84	45	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQQTEAHLE IREDGTVGGA ADQSPESLLE LKALKPGVIQ ILGVKTSRFL CQRPDGTLYG SLHFDPEACS FRELLLEDGY NVYQSETHGL PLHLPGNRSP HCDPASRGPA RFLPLPGLPP ALPEPPGILA PQPPDVGSSD PLAMVGPSQA RSPSYAS	Q82E, A109T, A139T, K150R, R154C, P158S, S195A, G202A
85	46	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQQTEAHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLE LKALKPGVIQ ILGVKTSRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLEEGY NVYQSEAHGL PLHLPGNRSP HCDPAPQGPA RFLPLPGLPP ALPEPPGILA PQPPDVGSSD PLAMVGPSQG RSPSYAS	D74H, Q82E, R105K, D130E, K150R, R154C, R159Q, S195A
86	48	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQQTEAHLE IREDGTVGGA ADQSPESLLQ LRALRPGVIQ ILGVRTSRFL CQRPDGTLYG SLHFDPEACS FRELLLEDGY NVYQSEAHGL PLHLPGNRSP HKDPAPRGPA RFLPLPGLPP APPEPPGILA PQPPDVGSSD PLAMVGPSQG RSPSYAS	K84R, K87R, K97R, K150R, R154K, L174P, S195A

10

20

30

【表 1 - 7】

87	49	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DACQTEAHLE IREDGTVGGA ADQSPESLLQ LRALRPGVIQ ILGVRTSRFL CQRPDGTLYG SLHFDPEACS FRELLLEDGY NVYQSEAHGL PLHLPCNRSP HKDPAPRGPA RFLPLPGLPP APPEPPGILA PQPPDVGSSD PLAMVGPSQG RSPSYAS	Q55C, K84R, K87R, K97R, G148C, K150R, R154K, L174P, S195A
----	----	---	---

40

【0016】

他の態様は、本発明のポリペプチドおよびタンパク質変異体をコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含むベクターおよび該ベクターを有する宿主細胞を記載している。

【0017】

本明細書において提供されるものは、該ポリペプチドおよびタンパク質変異体を作製す

50

るために使用される方法であって、例えば、野生型 F G F 2 1 タンパク質の切断および野生型 F G F 2 1 タンパク質内の興味ある位置でのアミノ酸の部位特異的取り込みを介して、野生型 F G F 2 1 タンパク質の修飾を含む方法である。該修飾は、野生型 F G F 2 1 タンパク質と比較して本発明の変異体の生物学的特性を増強し、ならびに、いくつかの場合において、固体支持体の表面へ該変異体を付着させる目的のために、例えば、標識およびタンパク質半減期延長剤に対する、付着点として役割を果たす。本発明の関連態様は、該ポリペプチドおよびタンパク質変異体を、ならびに該変異体をコードする D N A を含むベクターを生産することができる細胞を生産する方法である。

【0018】

種々の態様において、本明細書に記載されているポリペプチドおよびタンパク質変異体は、(a) 哺乳動物において血糖を低下させることができる最大 8 個のアミノ酸残基のアミノ末端切断 (b) 哺乳動物において血糖を低下させることができる最大 12 個のアミノ酸残基のカルボキシル末端切断；または (c) 哺乳動物において血糖を低下させることができる最大 8 個のアミノ酸残基のアミノ末端切断および最大 12 個のアミノ酸残基のカルボキシル末端切断を含むことができる。

【0019】

いくつかの態様において、本明細書に記載されているポリペプチドおよびタンパク質変異体は、野生型 F G F 2 1 と比較して作製される部位特異的アミノ酸修飾の位置にて、または一般的に野生型 F G F 2 1 と共有されるアミノ酸の位置にて、1 つ以上のポリマー、例えば、ポリエチレングリコール (P E G) またはポリシアル酸に共有結合させることができる。他の態様において、本発明のポリペプチドは、異種アミノ酸配列に、所望によりリンカーを介して、例えば、G S または G G G S G G G S G G G S (配列番号：4) に融合することができる。異種アミノ酸配列は、I g G 定常ドメインまたはそのフラグメント (例えば、F c 領域)、ヒト血清アルブミン (H S A)、またはアルブミン結合ポリペプチドであり得る。本明細書に記載されているこのような融合ポリペプチドもまた、多量体を形成することができる。

【0020】

いくつかの態様において、融合異種アミノ酸配列 (例えば、H S A、F c など) は、本発明のタンパク質変異体のアミノ末端に融合される。他の態様において、融合異種アミノ酸配列 (例えば、H S A、F c、など) は、本発明のタンパク質変異体のカルボキシル末端に融合される。

【0021】

さらに別の態様は、1 つ以上の F G F 2 1 関連障害、例えば、肥満、2 型糖尿病、1 型糖尿病、膵炎、脂質異常症、非アルコール性脂肪性肝炎 (N A S H)、インスリン耐性、高インスリン血症、耐糖能障害、高血糖、メタボリック・シンドローム、高血圧、心臓血管疾患、アテローム性動脈硬化症、末梢動脈疾患、卒中、心不全、冠動脈性心臓疾患、腎臓疾患、糖尿病性合併症、ニューロパシー、胃不全まひおよび他の代謝障害を示す患者を処置する方法であって、治療有効量の 1 つ以上の本発明のヒト F G F 2 1 ポリペプチドおよびタンパク質変異体またはそれらの医薬組成物を処置の必要な該患者に投与することを含む、方法を記載している。

【0022】

本発明はまた、本明細書に記載されているポリペプチドおよびタンパク質変異体および薬学的に許容される製剤を含む医薬組成物を提供する。このような医薬組成物は、代謝障害を処置するための方法、および本発明の医薬組成物を必要とするヒト患者に投与することを含む方法において使用することができる。処置することができる代謝障害の非限定的な例は、1 型および 2 型糖尿病および肥満を含む。

【0023】

これらのおよび本発明の他の局面は、以下の発明の詳細な説明において解明される。

【図面の簡単な説明】

【0024】

10

20

30

40

50

【図 1】図 1 は、ペグ化野生型 FGF21 および本発明の FGF21 変異体で 12 日間、ob/ob マウスを処置後の、肝臓トリグリセリドレベルにおける低下を示すグラフ表示である。肝臓サンプル (< 50 mg) を、Qiagen tissue lysis (1 つの 5-mm ビーズを有する) を使用して、1000:5 の比率でイソプロパノール:ブチルヒドロキシトルエン (BHT または 2, 6-ジ-tert-ブチル-4-メチルフェノール) 中でホモジェナイズした。均質化後、サンプルを室温で 45 分間穏やかに震盪し、次に、6000 rpm で 4℃ で 10 分間遠沈した。上清を回収し、Wako トリグリセリドアッセイキットを使用してトリグリセリド数に対してアッセイした。

【0025】

【図 2】図 2 は、12 日間処置された ob/ob マウスにおける FGF21-WT-R154C-PEG および FGF21-V76-154C-PEG の血漿暴露を示すグラフ表示である。FGF21-WT-R154C-PEG および FGF21-V76-154C-PEG を、1、4、8 および 11 日目の 0 時の時点で皮下に与えた。

10

【0026】

【図 3】図 3 A および 3 B は、野生型 FGF21 (パネル A) および FGF21-V76-154C-PEG (パネル B) の ob/ob マウス血漿安定性を示す。pERK 活性 (「背景活性」) に対する平均血漿寄与は、野生型 FGF21 サンプルに対して 28% (12-49% の範囲) および FGF21-V76-154C-PEG サンプルに対して 58% (46-75% の範囲) である。

【発明を実施するための形態】

20

【0027】

発明の詳細な説明

タンパク質医薬、例えば、FGF21、例えば、本発明の FGF21 タンパク質変異体の開発における重要な挑戦は、それらの物理化学的不安定性に対処することである。タンパク質の組成変化および特性は、特定の性質、例えば、フォールディング、立体配座安定性およびアンフォールディング/変性を定義する。このような特性は、タンパク質水溶液を利用する医薬製剤条件を開発するとき、タンパク質を安定化する必要がある (Wang, W., Int. J. of Pharmaceutics, 18, (1999))。興味ある治療タンパク質、例えば、本発明の FGF21 タンパク質変異体を安定化する所望の効果は、タンパク質分解および酵素分解に対する耐性を増加させ、それにより、タンパク質安定性を改善し、タンパク質凝集を減少させる。

30

【0028】

具体的には、医薬タンパク質開発において、抗-微生物保存剤、例えば、フェノール、m-クレゾール、メチルパラベン、レゾルシノールおよびベンジルアルコールが、滅菌多目的製剤を意図している非経口医薬製剤において必要である。残念ながら、これらの化合物は、しばしば、タンパク質産物の安定性に悪影響を及ぼし、会合および凝集を引き起こす、特に (Maaら Int. J. of Pharmaceutics 140:155-168 (1996); Lamら Pharm. Res. 14(6):725-729 (1997))。

【0029】

本発明の FGF21 ポリペプチドおよびタンパク質変異体は、当分野で知られている全長野生型 FGF21 ポリペプチドの修飾バージョンを示す。例えば、FGF21 野生型配列とタンパク質変異体との間の比較が必要であるとき、FGF21 野生型配列は、参照配列 (配列番号: 1) となる。FGF21 野生型配列は、NCBI 参照配列番号 NP_061986.1 を有し、例えば、Chiron Corporation による US 6, 716, 626 B1 のような発行済み特許において見い出すことができる。

40

【表 2】

Met	Asp	Ser	Asp	Glu	Thr	Gly	Phe	Glu	His	Ser	Gly	Leu	Trp	Val	Ser	
1				5					10					15		
Val	Leu	Ala	Gly	Leu	Leu	Leu	Gly	Ala	Cys	Gln	Ala	His	Pro	Ile	Pro	
			20					25					30			
Asp	Ser	Ser	Pro	Leu	Leu	Gln	Phe	Gly	Gly	Gln	Val	Arg	Gln	Arg	Tyr	
		35					40					45				
Leu	Tyr	Thr	Asp	Asp	Ala	Gln	Thr	Glu	Ala	His	Leu	Glu	Ile	Arg		
	50					55				60						
Glu	Asp	Gly	Thr	Val	Gly	Gly	Ala	Ala	Asp	Gln	Ser	Pro	Glu	Ser	Leu	
65					70					75					80	
Leu	Gln	Leu	Lys	Ala	Leu	Lys	Pro	Gly	Val	Ile	Gln	Ile	Leu	Gly	Val	
				85					90					95		
Lys	Thr	Ser	Arg	Phe	Leu	Cys	Gln	Arg	Pro	Asp	Gly	Ala	Leu	Tyr	Gly	
			100					105					110			
Ser	Leu	His	Phe	Asp	Pro	Glu	Ala	Cys	Ser	Phe	Arg	Glu	Leu	Leu	Leu	
		115					120					125				
Glu	Asp	Gly	Tyr	Asn	Val	Tyr	Gln	Ser	Glu	Ala	His	Gly	Leu	Pro	Leu	
	130					135					140					
His	Leu	Pro	Gly	Asn	Lys	Ser	Pro	His	Arg	Asp	Pro	Ala	Pro	Arg	Gly	
145					150					155					160	
Pro	Ala	Arg	Phe	Leu	Pro	Leu	Pro	Gly	Leu	Pro	Pro	Ala	Leu	Pro	Glu	
				165					170					175		
Pro	Pro	Gly	Ile	Leu	Ala	Pro	Gln	Pro	Pro	Asp	Val	Gly	Ser	Ser	Asp	
			180				185						190			
Pro	Leu	Ser	Met	Val	Gly	Pro	Ser	Gln	Gly	Arg	Ser	Pro	Ser	Tyr	Ala	
		195					200					205				
Ser																
209																

10

20

【0030】

全長 F G F 2 1 ポリペプチド（NCBI 参照配列番号 NM_019113.2）をコードする対応する cDNA 配列は以下（配列番号：2）に示される。

30

【表 3】

1	atggactcgg	acgagaccgg	gttcgagcac	tcaggactgt	gggtttctgt	gctggctggt	
61	cttctgctgg	gagcctgcca	ggcacacccc	atccctgact	ccagtcctct	cctgcaattc	
121	gggggccaag	tccggcagcg	gtacctctac	acagatgatg	cccagcagac	agaagcccac	
181	ctggagatca	gggaggatgg	gacggtgggg	ggcgctgctg	accagagccc	cgaaagtctc	
241	ctgcagctga	aagccttgaa	gccgggagtt	attcaaatct	tgggagtcaa	gacatccagg	
301	ttcctgtgcc	agcggccaga	tggggccctg	tatggatcgc	tccactttga	ccctgaggcc	
361	tgcagcttcc	gggagctgct	tcttgaggac	ggatacaatg	tttaccagtc	cgaagcccac	
421	ggcctcccgc	tgcacctgcc	agggaacaag	tccccacacc	gggaccctgc	accccaggga	
481	ccagctcgct	tcctgccact	accaggcctg	ccccccgcac	tcccggagcc	acccggaatc	
541	ctggccccc	agccccccga	tgtgggctcc	tccgaccctc	tgagcatggt	gggaccttcc	
601	cagggccgaa	gccccagcta	cgcttctga				

40

【0031】

成熟 F G F 2 1 配列は、リーダー配列を欠いており、また、当業者により理解されるポリペプチドの他の修飾、例えば、アミノ末端（リーダー配列を有する、または該配列を有さない）および／またはカルボキシル末端のタンパク質分解プロセッシング、より大きな前駆体からより小さいポリペプチドの開裂、N-連結および／またはO-連結グリコシル化および他の翻訳後修飾を含み得る。成熟 F G F 2 1 配列の典型的な例は、以下の配列（全長 F G F 2 1 タンパク質配列（NCBI 参照配列番号 NP_061986.1）のアミノ酸位置 29-209 を示す配列番号：3）を有する：

【表 4】

His	Pro	Ile	Pro	Asp	Ser	Ser	Pro	Leu	Leu	Gln	Phe	Gly	Gly	Gln	Val	
				5					10					15		
Arg	Gln	Arg	Tyr	Leu	Tyr	Thr	Asp	Asp	Ala	Gln	Gln	Thr	Glu	Ala	His	
			20					25					30			
Leu	Glu	Ile	Arg	Glu	Asp	Gly	Thr	Val	Gly	Gly	Ala	Ala	Asp	Gln	Ser	
		35					40					45				
Pro	Glu	Ser	Leu	Leu	Gln	Leu	Lys	Ala	Leu	Lys	Pro	Gly	Val	Ile	Gln	
	50					55					60					
Ile	Leu	Gly	Val	Lys	Thr	Ser	Arg	Phe	Leu	Cys	Gln	Arg	Pro	Asp	Gly	
65				70						75				80		
Ala	Leu	Tyr	Gly	Ser	Leu	His	Phe	Asp	Pro	Glu	Ala	Cys	Ser	Phe	Arg	
				85					90					95		
Glu	Leu	Leu	Leu	Glu	Asp	Gly	Tyr	Asn	Val	Tyr	Gln	Ser	Glu	Ala	His	
			100					105					110			
Gly	Leu	Pro	Leu	His	Leu	Pro	Gly	Asn	Lys	Ser	Pro	His	Arg	Asp	Pro	
		115					120					125				
Ala	Pro	Arg	Gly	Pro	Ala	Arg	Phe	Leu	Pro	Leu	Pro	Gly	Leu	Pro	Pro	
	130					135						140				
Ala	Leu	Pro	Glu	Pro	Pro	Gly	Ile	Leu	Ala	Pro	Gln	Pro	Pro	Asp	Val	
145				150						155					160	
Gly	Ser	Ser	Asp	Pro	Leu	Ser	Met	Val	Gly	Pro	Ser	Gln	Gly	Arg	Ser	
				165					170					175		
Pro	Ser	Tyr	Ala	Ser												
			180													

10

20

【0032】

成熟 FGF21 ポリペプチド（配列番号：3）をコードする対応する cDNA 配列は、以下（配列番号：47）に示される：

【表 5】

1	caccccatcc	ctgaactccag	tcctctcctg	caattcgagg	gccaaagtcg	gcagcggtag	
61	ctctacacag	atgatgccca	gcagacagaa	gccacactgg	agatcaggga	ggatgggacg	
121	gtggggggcg	ctgctgacca	gagccccgaa	agtctcctgc	agctgaaagc	cttgaagccg	
181	ggagttatcc	aaatcttggg	agtcaagaca	tccaggttcc	tgtgccagcg	gccagatggg	
240	gccctgtatg	gatogetcca	ctttgacct	gaggcctgca	gcttcgggga	gctgcttctt	
301	gaggacggat	acaatgttta	ccagtcgcaa	gccacgggcc	tccgctgca	cctgccaggg	
360	aacaagtccc	cacaccggga	cctgcaccc	cgaggaccag	ctcgttctct	gccactacca	
421	ggcctgcccc	ccgcaactcc	ggagccaccc	ggaatcctgg	ccccccagcc	ccccgatgtg	
481	ggctcctcgg	accctctgag	catggtggga	ccttcccagg	gccgaagccc	cagctacgct	
541	tcctga						

30

40

【0033】

タンパク質の発現の分野の当業者は、メチオニンまたはメチオニン-アルギニン配列が、大腸菌における発現のために、FGF21 タンパク質変異体のいずれかの N-末端に導入することができることを認識しており、本発明の文脈内に考慮される。

【0034】

「FGF21 タンパク質変異体」。「ヒト FGF21 変異体」、「FGF21 ポリペプチドまたはタンパク質変異体」、「変異体」、「FGF21 突然変異体」などの用語は、天然（すなわち、野生型）FGF21 アミノ酸配列が修飾されている、例えば、野生型タンパク質の少なくとも 1 つのアミノ酸が別のアミノ酸により置換されている、および／ま

50

たは除去されているヒト F G F 2 1 を含むように定義される。さらに、変異体は、野生型 F G F 2 1 タンパク質と比較して N-および/または C-末端切断を含み得る。一般的に言えば、変異体は、野生型タンパク質のいくつかの修飾された特性、構造または機能を有する。例えば、変異体は、濃縮液中の増強または改善された物理的安定性（例えば、低い疎水性媒介凝集）、血漿とインキュベートしたとき増強または改善された血漿安定性、または好ましい生物活性プロフィールを維持して増強または改善された生物活性を有し得る。

【0035】

本発明の F G F 2 1 ポリペプチドおよびタンパク質変異体と野生型 F G F 2 1 との間の違いを構成する許容されるアミノ酸置換および修飾は、1つ以上のアミノ酸置換、例えば、非天然アミノ酸アナログとの置換、および切断を含むが、これらに限定されない。したがって、F G F 2 1 タンパク質変異体は、本明細書に記載されている部位特異的 F G F 2 1 突然変異体、切断 F G F 2 1 ポリペプチド、タンパク質分解耐性 F G F 2 1 突然変異体、凝集減少 F G F 2 1 突然変異体、F G F 2 1 組合せ突然変異および F G F 2 1 融合タンパク質を含むが、これらに限定されない。

【0036】

変異体は、医薬防腐剤（例えば、m-クレゾール、フェノール、ベンジルアルコール）との増加した互換性を有し得、したがって、保存中にタンパク質の生理化学特性および生物学的活性を維持する保存された医薬製剤の調製を可能にする。したがって、野生型 F G F 2 1 と比較して増強された医薬安定性を有する変異体は、生理学および保存された医薬製剤条件下で濃縮液中の改善された物理的安定性を有し、生物学的効力を維持している。非限定的な例のために、本発明の変異体は、それらの野生型対応物よりも、タンパク質分解および酵素分解に対してさらに耐性であり得；改善された安定性を有し得；凝集する可能性が低いかもしれない。本明細書において使用される、これらの用語は、相互排他的または限定的ではなく、全体に、挙げられた変異体が野生型タンパク質の1つ以上の修飾された特性を有することを可能にする。

【0037】

本発明はまた、F G F 2 1 ポリペプチドまたはタンパク質変異体、または、F G F 2 1 タンパク質変異体に対する望ましい特性、例えば、タンパク質分解耐性、増加した半減期または凝集減少特性およびそれらの組合せを与える特定の残基がさらに修飾されていない、配列番号：3のアミノ酸配列と少なくとも約95%（代替的に96%、代替的に97%、代替的に98%、代替的に99%）同一であるアミノ酸配列を含む変異体をコードする核酸分子を含む。言い換えれば、タンパク質分解耐性、凝集減少または他の特性を与えるために修飾されている F G F 2 1 突然変異体配列における残基を除いて、F G F 2 1 突然変異体配列における全ての他のアミノ酸残基の約5%（代替的に4%、代替的に3%、代替的に2%、代替的に1%）を修飾させることができる。このような F G F 2 1 突然変異体は、野生型 F G F 2 1 ポリペプチドの少なくとも1つの活性を有する。

【0038】

本発明はまた、コードされた F G F 2 1 タンパク質変異体のタンパク質分解耐性、凝集減少または他の特性を与えるアミノ酸残基をコードするヌクレオチドがさらに修飾されていない、配列番号：47のヌクレオチド配列と少なくとも約95%（代替的に96%、代替的に97%、代替的に98%、代替的に99%）同一であるヌクレオチド配列を含む核酸分子を含む。言い換えれば、タンパク質分解耐性、凝集減少または他の特性を与えるために修飾されている F G F 2 1 突然変異体配列における残基をコードするヌクレオチドを除いて、F G F 2 1 突然変異体配列における全ての他のヌクレオチドの約5%（代替的に4%、代替的に3%、代替的に2%、代替的に1%）を修飾させることができる。このような F G F 2 1 突然変異体ポリペプチドをコードする核酸分子は、野生型 F G F 2 1 ポリペプチドの少なくとも1つの活性を有する。

【0039】

本明細書において提供されるものは、F G F 2 1 ポリペプチドおよび本発明のタンパク

質変異体を作製するために使用される方法であって、野生型 F G F 2 1 タンパク質、例えば、野生型 F G F 2 1 タンパク質の切断および野生型 F G F 2 1 タンパク質の興味ある位置でのアミノ酸の部位特異的取り込みを介して、野生型 F G F 2 1 タンパク質の部位特異的修飾を含む方法である。該修飾は、野生型 F G F 2 1 タンパク質と比較して本発明の変異体の生物学的特性を増強し、ならびに、いくつかの場合において、固体支持体の表面へ該変異体を付着させる目的のために、例えば、標識およびタンパク質半減期延長剤に対する、付着点として役割を果たす。本発明の関連態様は、該ポリペプチドおよびタンパク質変異体を、ならびに該変異体をコードする D N A を含むベクターを生産することができる細胞を生産する方法である。

【0040】

10

1つの態様において、このような部位特異的修飾は、タンパク質、ポリペプチドおよび／またはペプチドにポリ（エチレングリコール）（P E G）を結合させるために使用される。他の態様において、このような部位特異的修飾は、タンパク質、ポリペプチドおよび／またはペプチドに P E G－コレステロール抱合体（ミセルおよびリポソームを含む）を結合させるために使用される。他の態様において、このような部位特異的修飾は、タンパク質、ポリペプチドおよび／またはペプチドに糖（グリコシル化）を結合させるために使用される。

【0041】

他の態様において、このような部位特異的修飾は、F G F 2 1 野生型および／または変異体多量体、例えば、二量体（ホモ二量体またはヘテロ二量体）または三量体の生産のための結合手段として使用される。これらの多量体 F G F 2 1 分子は、さらに、アミノ末端またはカルボキシ末端のいずれかで、他のタンパク質、例えば、F c、H S A などに結合または融合された基、例えば、P E G、糖、および／または P E G－コレステロール抱合体を有し得る。

20

【0042】

他の態様において、このような部位特異的修飾は、タンパク質、ポリペプチドおよび／またはペプチドを生産するために使用され、部位特異的に組み込まれたピロリジンまたはピロリジン類似体の位置が、制御配向および固体支持体の表面上へのこのようなタンパク質、ポリペプチドおよび／またはペプチドの結合を可能にするか、または結合される基、例えば、P E G、糖および／または P E G－コレステロール抱合体を有することを可能にする。

30

【0043】

他の態様において、このような部位特異的修飾は、タンパク質、ポリペプチドおよび／またはペプチドを部位特異的に架橋するために使用され、それにより、ヘテロ二量体およびヘテロ三量体を含むが、これらに限定されないヘテロオリゴマーを形成する。他の態様において、このような部位特異的修飾は、タンパク質、ポリペプチドおよび／またはペプチドを部位特異的に架橋するために使用され、それにより、タンパク質－タンパク質抱合体、タンパク質－ポリペプチド抱合体、タンパク質－ペプチド抱合体、ポリペプチド－ポリペプチド抱合体、ポリペプチド－ペプチド抱合体またはペプチド－ペプチド抱合体を形成する。

40

【0044】

定義

種々の定義が、本明細書を通して使用される。多数の用語は、当業者がそれらの用語に帰属すると考える意味を有する。下記で、または本明細書の他の場所で具体的に定義された用語は、全体として、本発明の文脈で提供される意味を有し、一般的には、当業者により理解されるものである。

【0045】

本明細書において使用される「F G F 2 1」なる用語は、線維芽細胞増殖因子（F G F）タンパク質ファミリーメンバーを示す。F G F 2 1（G e n B a n k 受入番号 N P _ 0 6 1 9 8 6 . 1）のアミノ酸配列は配列番号：1として記載されており、これと対応する

50

ポリヌクレオチド配列は配列番号：2（NCBI参照配列番号NM_019113.2）として記載されている。

【0046】

本明細書において使用される「FGF21受容体」なる用語は、FGF21に対する受容体を示す（Kharitononkov, Aら（2008）Journal of Cellular Physiology 215:1-7; Kurosui, Hら（2007）JBC 282:26687-26695; Ogawa, Yら（2007）PNAS 104:7432-7437）。

【0047】

「FGF21ポリペプチド」なる用語は、ヒトにおいて発現される天然ポリペプチドを示す。この記載の目的のために、「FGF21ポリペプチド」なる用語は、あらゆる全長FGF21ポリペプチド、例えば、209アミノ酸残基からなり、配列番号：2のヌクレオチド配列によってコードされる配列番号：1；全長FGF21ポリペプチドのアミノ末端で28アミノ酸残基（すなわち、これはシグナルペプチドを構成する）が除去されている181アミノ酸残基からなるあらゆる該ポリペプチドの成熟形態、およびそれらの変異体を互換的に示すために使用することができる。

【0048】

「単離された核酸分子」なる用語は、（1）全核酸が供給源細胞から単離される時、天然に見出される少なくとも約50パーセントのタンパク質、脂質、炭水化物または他の物質から分離されている、（2）「単離された核酸分子」が天然に連結されるポリヌクレオチドのすべてまたは一部に連結されていない、（3）天然に連結されないポリヌクレオチドに作動可能に連結されている、または（4）より大きなポリヌクレオチド配列の一部として天然に起こらない本発明の核酸分子を示す。好ましくは、本発明の単離された核酸分子は、ポリペプチド生産における使用または治療、診断、予防または研究の使用を妨げるであろう、天然環境において見られるあらゆる他の汚染核酸分子または他の汚染を実質的に含まない。

【0049】

「ベクター」なる用語は、コード情報を宿主細胞に伝達するために使用されるあらゆる分子（例えば、核酸、プラスミドまたはウイルス）を示すために使用される。

【0050】

「発現ベクター」なる用語は、宿主細胞の形質転換のために適当であり、挿入された異種核酸配列の発現を指向および／またはコントロールする核酸配列を含むベクターを示す。発現は、プロセッシング、例えば、転写、翻訳およびRNAスプライシング（イントロンが存在するとき）を含むが、これらに限定されない。

【0051】

「作動可能に連結した」なる用語は、フランキング配列が通常機能をを行うように構成されるか、または集合される、フランキング配列の配置を示すために本明細書において使用される。したがって、コード配列に作動可能に連結したフランキング配列は、コード配列の複製、転写および／または翻訳をもたらしことができ得る。例えば、コード配列は、プロモーターがコード配列の転写を指向することができる時、プロモーターに作動可能に連結している。正確に機能する限り、フランキング配列はコード配列と隣接する必要はない。したがって、例えば、介在するまだ翻訳されていない転写配列が、プロモーター配列とコード配列間に存在することができ、プロモーター配列は、コード配列に「作動可能に連結している」と考えることができる。

【0052】

「宿主細胞」なる用語は、形質転換されているか、または核酸配列で形質転換され、次に、選択された興味ある遺伝子を発現することができる細胞を示すために使用される。該用語は、選択された遺伝子が存在する限り、子孫が元の親と構成される形態または遺伝子において同一であるがなかろうと、親細胞の子孫を含む。

【0053】

本明細書において使用される「アミノ酸」なる用語は、それらの構造がこのような立体異性体形態を可能にするときDおよびL立体異性体における全てにおいて、天然アミノ酸

10

20

30

40

50

と同様の様式において機能する、天然アミノ酸、非天然アミノ酸、アミノ酸類似体およびアミノ酸模擬物を示す。アミノ酸は、本明細書において、IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commissionにより推奨される、それらの名前、それらの一般的に知られる 3 文字記号または 1 文字記号のいずれかにより示す。

【0054】

生物学的物質、例えば、核酸分子、ポリペプチド、宿主細胞などに関連して使用されるときの「天然」なる用語は、天然において見出され、ヒトにより操作されていない物質を示す。同様に、本明細書において使用される「非天然」は、天然において見出されないか、またはヒトにより構造的に修飾または合成されている物質を示す。ヌクレオチドに関連して使用されるとき「天然」なる用語は、塩基アデニン (A)、シトシン (C)、グアニン (G)、チミン (T) およびウラシル (U) を示す。アミノ酸に関連して使用されるとき「天然」なる用語は、20 の慣用のアミノ酸 (すなわち、アラニン (A)、システイン (C)、アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E)、フェニルアラニン (F)、グリシン (G)、ヒスチジン (H)、イソロイシン (I)、リジン (K)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、アスパラギン (N)、プロリン (P)、グルタミン (Q)、アルギニン (R)、セリン (S)、スレオニン (T)、バリン (V)、トリプトファン (W) およびチロシン (Y))、ならびにセレノシステイン、ピロリジン (PYL) およびピロリンーカルボキシリジン (PCL) を示す。

【0055】

ピロリジン (PYL) は、*Methanosarcina* ファミリーのメタン生成古細菌のメチルアミンメチルトランスフェラーゼ内に天然に見出されるアミノ酸である。ピロリジンは、それぞれの mRNA においてインフレームの UAG コドンで共翻訳的に組み込まれるリジン類似体であり、22 番目の天然アミノ酸と考えられる。

【0056】

PCT 特許公報 WO 2010/48582 (出願人 IIRM、LLC) において少なくとも記載されているとおり、大腸菌においてピロリジン (PYL) を生物合成する試みは、ピロリンーカルボキシリジンまたは PCL として本明細書において称される「脱メチル化ピロリジン」の形成をもたらした。本明細書において使用される「PCL」は、PCL-A または PCL-B のいずれかを示す。

【0057】

本明細書において使用される「非天然アミノ酸」および「非天然アミノ酸」なる用語は、互換的に、同じか、または異なっている任意生物体からの修飾されていない、または修飾された遺伝子を使用して、任意の生物体において生合成的に産生することができないアミノ酸構造を示すことが意図される。該用語は、天然 (野生型) FGF21 タンパク質配列または本発明の FGF21 変異体の配列に存在しないアミノ酸残基を示す。これらは、限定はしないが、20 天然アミノ酸の 1 つではない修飾されたアミノ酸および/またはアミノ酸類似体、セレノシステイン、ピロリジン (PYL) またはピロリンーカルボキシリジン (PCL) を含むが、これらに限定されない。このような非天然アミノ酸残基は、天然アミノ酸の置換、および/または天然 (野生型) FGF21 タンパク質配列または本発明の FGF21 変異体の配列への非天然アミノ酸の挿入により導入することができる。非天然アミノ酸残基はまた、所望の機能性を FGF21 分子に与えるように組み込むことができる、例えば、機能性部分に連結する能力 (例えば、PEG)。

【0058】

加えて、このような「非天然アミノ酸」は、タンパク質への取り込みのために、修飾された tRNA および修飾された tRNA シンテターゼ (RS) を必要とすることが理解される。これらの「選択された」直交 tRNA/RS ペアは、Schultz らにより開発された選択プロセスまたはランダムもしくは標的化突然変異により作製される。一例として、ピロリンーカルボキシリジンは、ある生物体から宿主細胞に移動させられた遺伝子により生合成的により産生されるため、および天然 tRNA および tRNA シンテターゼ遺伝子を使用することによりタンパク質に組み込まれるため、「天然アミノ酸」であるが

、p-アミノフェニルアラニン (Generation of a bacterium with a 21 amino acid genetic code, Mehl RA, Anderson JC, Santoro SW, Wang L, Martin AB, King DS, Horn DM, Schultz PG. J Am Chem Soc. 2003 Jan 29;125(4):935-9参照) は、生合成的に産生されるが、「選択された」直交 tRNA / tRNA シンテターゼペアによりタンパク質に組み込まれるため、「非天然アミノ酸」である。

【0059】

修飾されたコードアミノ酸は、ヒドロキシプロリン、γ-カルボキシグルタミン酸、O-ホスホセリン、アゼチジンカルボン酸、2-アミノアジピン酸、3-アミノアジピン酸、ベーターアラニン、アミノプロピオン酸、2-アミノ酪酸、4-アミノ酪酸、6-アミノカプロン酸、2-アミノヘプタン酸、2-アミノイソ酪酸、3-アミノイソ酪酸、2-アミノピメリン酸、第三級-ブチルグリシン、2, 4-ジアミノイソ酪酸、デスモシン、2, 2'-ジアミノピメリン酸、2, 3-ジアミノプロピオン酸、N-エチルグリシン、N-メチルグリシン、N-エチルアスパラギン、ホモプロリン、ヒドロキシリジン、アロ-ヒドロキシリジン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン、イソデスモシン、アロ-イソロイシン、N-メチルアラニン、N-メチルグリシン、N-メチルイソロイシン、N-メチルペンチルグリシン、N-メチルバリン、ナフトアラニン(naphthalanine)、ノルバリン、ノルロイシン、オルニチン、ペンチルグリシン、ピペコリン酸およびチオプロリンを含むが、これらに限定されない。「アミノ酸」なる用語はまた、特定の生物体における代謝産物であるが、タンパク質への取り込みのために遺伝子コードによってコードされない天然アミノ酸を含む。このようなアミノ酸は、オルニチン、D-オルニチンおよびD-アルギニンを含むが、これらに限定されない。

【0060】

本明細書において使用される「アミノ酸類似体」なる用語は、天然アミノ酸と同じ基本化学構造、一例のみとして、水素、カルボキシ基、アミノ基およびR基に結合されるα-炭素を有する化合物を示す。アミノ酸類似体は、可逆的にまたは不可逆的に、化学的にブロックされている天然および非天然アミノ酸、または化学的に修飾されているそれらのC-末端カルボキシ基、それらのN-末端アミノ基および/またはそれらの側鎖官能基を含む。このような類似体は、メチオニンスルホキシド、メチオニンスルホン、S-(カルボキシメチル)-システイン、S-(カルボキシメチル)-システインスルホキシド、S-(カルボキシメチル)-システインスルホン、アスパラギン酸-(ベーターメチルエステル)、N-エチルグリシン、アラニンカルボキサミド、ホモセリン、ノルロイシンおよびメチオニンメチルスルホニウムを含むが、これらに限定されない。

【0061】

本明細書において使用される「アミノ酸模擬物」なる用語は、アミノ酸の一般的な化学構造と異なるが天然アミノ酸と同様の様式において機能する構造を有する化合物を示す。

【0062】

「生物学的に活性なFGF21変異体」なる用語は、FGF21ポリペプチド変異体に導入されている修飾の型または数にかかわらず、野生型FGF21ポリペプチドの活性、例えば、血糖、インスリン、トリグリセリドまたはコレステロールを低くする；体重を減少する；および、グルコース耐性、エネルギー消費またはインスリン感受性を改善する能力を有する本明細書に記載されているあらゆるFGF21ポリペプチド変異体を示す。野生型FGF21ポリペプチドと比較して若干減少したレベルのFGF21活性を有するFGF21ポリペプチド変異体は、それでもなお、生物学的に活性なFGF21ポリペプチド変異体と考えることができる。

【0063】

「有効量」および「治療有効量」なる用語はそれぞれ、野生型FGF21ポリペプチドの1つ以上の生物学的活性、例えば、血糖、インスリン、トリグリセリドもしくはコレステロールレベルを低くする；肝臓トリグリセリドもしくは脂質レベルを減少する；体重を減少する；または、グルコース耐性、エネルギー消費もしくはインスリン感受性を改善する能力の観察できるレベルをサポートするために使用されるFGF21タンパク質変異体

の量を示す。例えば、F G F 2 1 関連障害（例えば、1 型もしくは2 型糖尿病、肥満またはメタボリック・シンドローム）を示す、該障害に罹患している、または該障害に罹患しやすい患者に投与される「治療有効量」は、上記障害と関連するか、または該障害で死ぬ病理学的症状、疾患進行、生理学的状態における改善を誘導する、改善する、さもなければ引き起こす量である。本発明の目的のために、「対象」または「患者」は、好ましくはヒトであるが、動物、さらに具体的には、ペット（例えば、イヌ、ネコなど）、家畜（例えば、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウマなど）および実験動物（例えば、ラット、マウス、モルモットなど）でもあり得る。

【0064】

本明細書において使用される「薬学的に許容される担体」または「生理学的に許容される担体」なる用語は、F G F 2 1 タンパク質変異体の送達を成し遂げるか、または増強するために適当な1 つ以上の製剤物質を示す。

【0065】

「抗原」なる用語は、抗体により結合することができ、さらに抗原のエピトープに結合することができる抗体を生産するように動物において使用することができる分子または分子の一部を示す。抗原は、1 つ以上のエピトープを有し得る。

【0066】

「天然 F c」なる用語は、単量体または多量体形態のいずれでも、全抗体の消化から得られる、または他の手段により生産される非抗原結合フラグメントの配列を含み、ヒンジ領域を含むことができる分子または配列を示す。天然 F c の元の免疫グロブリン供給源は、好ましくはヒト起源であり、任意の免疫グロブリンであってよいが、I g G 1 および I g G 2 が好ましい。天然 F c 分子は、共有（すなわち、ジスルフィド結合）および非共有結合により二量体または多量体形態に連結することができる単量体ポリペプチドで構成される。天然 F c 分子の単量体サブユニット間の分子間ジスルフィド結合の数は、クラス（例えば、I g G、I g A および I g E）またはサブクラス（例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g A 1 および I g G A 2）に依存して1 から4 の範囲である。天然 F c の1 つの例は、I g G のパペイン消化から得られるジスルフィド結合二量体である（Ellison ら 1982, Nucleic Acids Res. 10: 4071-9 参照）。本明細書において使用される「天然 F c」なる用語は、単量体、二量体および多量体形態の総称である。「F c 変異体」なる用語は、天然 F c から修飾されるが、サルベージ(salvage)受容体、F c R n（新生児の F c 受容体）に対する結合部位をまだ含む分子または配列を示す。国際公開 W O 9 7 / 3 4 6 3 1 および W O 9 6 / 3 2 4 7 8 は、典型的な F c 変異体、ならびにサルベージ受容体との相互作用を記載しており、出典明示により包含させる。したがって、「F c 変異体」なる用語は、非ヒト天然 F c からヒト化された分子または配列を含むことができる。さらに、天然 F c は、本発明の F G F 2 1 突然変異体の融合分子に対して必要ではない構造的特徴または生物学的活性を提供するため、除去することができる領域を含む。したがって、「F c 変異体」なる用語は、（1）ジスルフィド結合形成、（2）選択された宿主細胞との不適合性、（3）選択された宿主細胞における発現時の N-末端不均一性、（4）グリコシル化、（5）補体との相互作用、（6）サルベージ受容体以外の F c 受容体への結合、または（7）抗体依存性細胞毒性（A D C C）に影響するか、またはこれらと関与する、1 つ以上の天然 F c 部位または残基を欠いているか、または、1 つ以上の F c 部位または残基が修飾されている、分子または配列を含む。F c 変異体は、以下にさらに詳細に記載されている。

【0067】

「F c ドメイン」なる用語は、上記定義のとおり天然 F c および F c 変異体および配列を含む。F c 変異体および天然 F c 分子と同様に、「F c ドメイン」なる用語は、全抗体から消化されるか、または他の手段により生産される単量体または多量体形態における分子を含む。本発明のいくつかの態様において、F c ドメインは、例えば、F c ドメインと F G F 2 1 配列間の共有結合を介して、F G F 2 1 または F G F 2 1 突然変異体（F G F 2 1 または F G F 2 1 突然変異体の切断形態を含む）に融合することができる。このよ

うな融合タンパク質は、Fcドメインの結合を介して多量体を形成することができ、これらの融合タンパク質およびこれらの多量体の両方が本発明の局面である。

【0068】

「ポリエチレングリコール」または「PEG」なる用語は、カップリングまたは活性化部分に対してカップリング剤または誘導体化の有無にかかわらず、ポリアルキレングリコール化合物またはその誘導体を示す。

【0069】

「FGF21関連障害」なる用語および本明細書において同様に使用される用語は、肥満、1型および2型糖尿病、膵炎、脂質異常症、非アルコール性脂肪性肝炎（NAFLD）、インスリン耐性、高インスリン血症、耐糖能障害、高血糖、メタボリック・シンドローム、高血圧、心臓血管疾患、アテローム性動脈硬化症、末梢動脈疾患、卒中、心不全、冠動脈性心臓疾患、腎臓疾患、糖尿病性合併症、ニューロパシー、胃不全まひおよび他の代謝障害を含むが、これらに限定されない。

【0070】

「2型糖尿病」は、インスリンの利用可能性にかかわらず過剰なグルコース生産により特徴付けられる状態であり、循環グルコースレベルが、不十分なグルコースクリアランスの結果として、過剰に高く維持される。

【0071】

「1型糖尿病」は、インスリンの完全な欠乏により引き起こされる高い血糖レベルにより特徴付けられる状態である。これは、身体の免疫系が膵臓におけるインスリンを生産するベータ細胞を攻撃し、それらを破壊するときに起こる。その結果、膵臓は、ほとんどあるいは全くインスリンを生産しない。

【0072】

「膵炎」は膵臓の炎症である。

【0073】

「脂質異常症」は、リポタンパク質過剰生産または欠乏を含むリポタンパク質代謝の障害である。脂質異常症は、血液中の、総コレステロール、低比重リポタンパク質（LDL）コレステロールおよびトリグリセリド濃度の上昇、ならびに高比重リポタンパク質（HDL）コレステロール濃度の減少により明らかにされ得る。

【0074】

「非アルコール性脂肪性肝炎（NAFLD）」は、アルコール消費と関連せず、小葉内炎症および線維症を伴う肝細胞の脂肪変化により特徴付けられる肝臓疾患である。

【0075】

「耐糖能障害」または耐糖能異常（IGT）は、心臓血管病理学の危険性の増加と関連する血糖異常症の前糖尿病状態である。前糖尿病状態は、対象の、グルコースの細胞への効率的な移動およびそれを効率的な燃料源としての利用を防ぎ、血液中のグルコースレベルの上昇およびある程度のインスリン耐性を引き起こす。

【0076】

「高血糖」は、血中の糖（グルコース）の過剰として定義される。

【0077】

低い血糖とも称される「低血糖」は、血糖レベルが、身体の活性のために十分なエネルギーを提供するためにはあまりにも低く低下したときに起こる。

【0078】

「高インスリン血症」は、正常レベルよりも高い血液中のインスリンとして定義される。

【0079】

「インスリン耐性」は、正常量のインスリンが、正常以下の生物学的応答を生じる状態として定義される。

【0080】

「肥満」は、ヒト対象に関して、体重が20パーセント、所定の集団に対する標準体重

10

20

30

40

50

を超えるとして定義され得る (R. H. Williams, Textbook of Endocrinology, 1974, p. 904-916)。

【0081】

「メタボリック・シンドローム」は、少なくとも3つの以下の兆候のクラスターとして定義することができる：腹部脂肪—ほとんどの男性において、40インチ以上のウエスト；空腹後、高い血糖—少なくとも110ミリグラム／デシリットル (mg/dl)；血流中の高いトリグリセリド—少なくとも150mg/dL；低いHDL—40mg/dl未満；および、130/85mmHgまたはそれ以上の血圧。

【0082】

「高血圧」または「高い血圧」、すなわち、心臓血管損傷または他の悪影響を誘導する可能性のあるレベルへの全身動脈血圧の一時的または持続的上昇。高血圧は、140mmHgを超える収縮期血圧または90mmHgを超える拡張期血圧として独断的に定義されている。

10

【0083】

「心臓血管疾患」は、心臓または血管に関連する疾患である。

【0084】

「末梢動脈疾患」は、プラークが頭、臓器および手足へ血液を運ぶ動脈においてを構築するときに起こる。時間とともに、プラークは、動脈を硬化し狭め、臓器および身体の一部への酸素を豊富に含む血液の流量を制限し得る

【0085】

20

「アテローム性動脈硬化症」は、大および中動脈の内膜における不規則に分散された脂質沈着により特徴付けられる血管疾患であり、動脈内腔の狭窄を引き起こし、結局は線維症および石灰化が始まる。病変は、通常病巣であり、ゆっくり、断続的に進行する。血流の制限は、病変の分布および重症度によって異なる多くの臨床症状の原因となる。

【0086】

「卒中」は、24時間以上続く脳循環の損傷に関連するあらゆる急性臨床事象である。卒中は、循環が危険にさらされている脳組織の位置および程度に依存して、不可逆性脳損傷、症状の型および重症度に関連する。

【0087】

鬱血性心不全とも称される「心不全」は、心臓がもはや身体の一部へ血液を十分に供給することができない状態である。

30

【0088】

冠動脈疾患とも称される「冠動脈性心臓疾患」は、心臓へ血液および酸素を供給する少量の血管の狭窄である。

【0089】

「腎臓疾患」またはネフロパシーは、腎臓のあらゆる疾患である。糖尿病性腎症は、1型または2型糖尿病を有する人々における罹患率および死亡率の主な原因である。

【0090】

「糖尿病性合併症」は、高い血糖レベルにより引き起こされる他の身体機能での問題、例えば、腎臓、神経（ニューロパシー）、足（足部潰瘍および循環不良）および眼（例えば網膜症）である。糖尿病はまた、心臓疾患および骨関節障害に対する危険性を増加させる。糖尿病の他の長期合併症は、皮膚問題、消化問題、性機能障害および歯と歯茎との問題を含む。

40

【0091】

「ニューロパシー」は、脳神経または末梢もしくは自律神経系に関連するあらゆる疾患である。

【0092】

「胃不全まひ」は、腸の排出遅延をもたらす胃蠕動の低下である。

【0093】

本発明によって包含される重症患者は、一般的に、不安定な代謝亢進状態を経験する。

50

該不安定な代謝状態は、いくつかの栄養素における相対的な欠乏を引き起こし得る基質代謝における変化による。一般的に、脂肪および筋肉の両方の酸化の増加が存在する。

【0094】

さらに、重症患者は、好ましくは、全身性炎症反応症候群または呼吸困難を経験する患者である。罹患率における減少は、重症患者がさらなる病気、状態または症状を発症する可能性を減少すること、または、さらなる病気、状態または症状の重症度を減少することを意味する。例えば、罹患率を減少することは、菌血症もしくは敗血症または多臓器不全と関連する合併症の発症の減少に対応し得る。

【0095】

本明細書において使用される単数形「a」、「an」および「the」は、文脈上明白に他の意味を示さない限り、複数の表示を含む。したがって、例えば、「抗体」に対する表示は、2つ以上のこのような抗体の混合物を含む。

10

【0096】

本明細書において使用される「約」なる用語は、値の $+/-20\%$ 、 $+/-10\%$ または $+/-5\%$ を示す。

【0097】

「ポリペプチド」および「タンパク質」なる用語は、互換的に使用され、コードおよび非コードアミノ酸、化学的もしくは生化学的に修飾もしくは誘導体化されたアミノ酸、および修飾されたペプチド骨格を有するポリペプチドを含むことができるあらゆる長さのアミノ酸のポリマー形態を示す。該用語は、融合タンパク質を含み、N-末端メチオニン残基を有していろとなかろうと、異種アミノ酸配列との融合タンパク質、異種および同種リーダー配列との融合；免疫学的タグ化タンパク質などを含むが、これらに限定されない。

20

【0098】

「個体」、「対象」、「宿主」および「患者」なる用語は、互換的に使用され、診断、処置または治療が望まれるあらゆる対象、特にヒトを示す。他の対象は、ウシ、イヌ、ネコ、モルモット、ウサギ、ラット、マウス、ウマなどを含み得る。いくつかの好ましい態様において、対象はヒトである。

【0099】

本明細書において使用される「サンプル」なる用語は、患者由来の生物学的材料を示す。本発明によりアッセイされるサンプルは、何ら特定の型に限定されない。サンプルは、限定的な例として、単一の細胞、複数の細胞、組織、腫瘍、生物学的液体、生物学的分子もしくは上清または前記のいずれかの抽出物を含む。例えば、生検のために取り出される組織、切除中に取り出される組織、血液、尿、リンパ組織、リンパ液、脳脊髄液、粘液および糞便サンプルを含む。使用されるサンプルは、アッセイフォーマット、検出方法ならびにアッセイされる腫瘍、組織、細胞または抽出物の性質に基づいて変化する。サンプルを調製するための方法は、当分野でよく知られており、容易に適合させ、利用される方法に適合するサンプルを得ることができる。

30

【0100】

本明細書において使用される「生物学的分子」なる用語は、ポリペプチド、核酸および糖類を含むが、これらに限定されない。

40

【0101】

本明細書において使用される「調節」なる用語は、遺伝子、タンパク質または細胞の内部、外部または表面に存在するあらゆる分子の質または量における変化を示す。該変化は、該分子の発現またはレベルにおける増加または減少であり得る。「調節する」なる用語はまた、限定はしないが、血糖、インスリン、トリグリセリドもしくはコレステロールレベルを低下する；肝臓脂質もしくは肝臓トリグリセリドレベルを減少する；体重を減少する；および、グルコース耐性、エネルギー消費もしくはインスリン感受性を改善する能力を含む生物学的機能／活性の質または量の変化を含む。

【0102】

50

本明細書において使用される「モジュレーター」なる用語は、F G F 2 1 関連障害、例えば、1 型もしくは2 型糖尿病または代謝状態様肥満と関連する1 つ以上の生理学的または生化学的事象を調節する組成物を示す。該事象は、血糖、インスリン、トリグリセリドもしくはコレステロールレベルを低下する；肝臓脂質もしくは肝臓トリグリセリドレベルを減少する；体重を減少する；および、グルコース耐性、エネルギー消費もしくはインスリン感受性を改善する能力を含むが、これらに限定されない。

【0 1 0 3】

「遺伝子産物」は、遺伝子により発現または生産されるバイオポリマー産物である。遺伝子産物は、例えば、つなぎ合わされていないR N A、m R N A、スプライス変異体m R N A、ポリペプチド、翻訳後修飾されたポリペプチド、スプライス変異体ポリペプチドなどであり得る。また、該用語により含まれるものは、鋳型（すなわちR N Aのc D N A）としてR N A遺伝子産物を使用して作製されるバイオポリマー産物である。遺伝子産物は、酵素的に、組換え的に、化学的に、または遺伝子が生来の細胞内で作製され得る。いくつかの態様において、遺伝子産物がタンパク性であるとき、それは生物学的活性を示す。いくつかの態様において、遺伝子産物が核酸であるとき、それは生物学的活性を示すタンパク性遺伝子産物に翻訳され得る。

【0 1 0 4】

本明細書において使用される「F G F 2 1 活性の調節」は、例えば、F G F 2 1 ポリヌクレオチドまたはポリペプチドとの薬剤の相互作用、F G F 2 1 転写および／または翻訳の阻害（例えば、F G F 2 1 遺伝子またはF G F 2 1 転写産物とのアンチセンスまたはs i R N A相互作用を介して、F G F 2 1 発現を促進する転写因子の調節を介して）などの結果であり得るF G F 2 1 活性における増加または減少を示す。例えば、生物学的活性の調節は、生物学的活性における増加または減少を示す。F G F 2 1 活性は、限定はしないが、対象において血糖、インスリン、トリグリセリドまたはコレステロールレベルをアッセイすること、F G F 2 1 ポリペプチドレベルを評価すること、F G F 2 1 転写レベルを評価することを含む方法により評価することができる。F G F 2 1 活性の比較はまた、例えば、F G F 2 1 下流バイオマーカーのレベルを測定すること、およびF G F 2 1 シグナル伝達における増加を評価することにより成し遂げることができる。F G F 2 1 活性はまた、細胞シグナル伝達；キナーゼ活性；脂肪細胞へのグルコース摂取；血液インスリン、トリグリセリドまたはコレステロールレベル変動；肝臓脂質または肝臓トリグリセリドレベル変化；F G F 2 1 とF G F 2 1 受容体間の相互作用；またはF G F 2 1 受容体のリン酸化を測定することにより評価することができる。いくつかの態様において、F G F 2 1 受容体のリン酸化はチロシンリン酸化であり得る。いくつかの態様において、F G F 2 1 活性の調節は、F G F 2 1 ー関連表現型の調節を引き起こすことができる。

【0 1 0 5】

本明細書において使用される「F G F 2 1 下流バイオマーカー」は、遺伝子もしくは遺伝子産物または遺伝子もしくは遺伝子産物の測定可能な徴候である。いくつかの態様において、F G F 2 1 の下流マーカーである遺伝子または活性は、血管組織において発現の改変されたレベルを示す。いくつかの態様において、下流マーカーの活性は、F G F 2 1 モジュレーターの存在下で改変される。いくつかの態様において、下流マーカーは、F G F 2 1 が本発明のF G F 2 1 モジュレーターでかき乱されるとき、発現の改変されたレベルを示す。F G F 2 1 下流マーカーは、グルコースまたは2 -デオキシグルコース摂取、p E R Kおよび他のリン酸化またはアセチル化タンパク質またはN A Dレベルを含むが、これらに限定されない。

【0 1 0 6】

本明細書において使用される「上方調節する」なる用語は、活性または量の増加、活性化または刺激を示す。例えば、本発明の文脈において、F G F 2 1 モジュレーターは、F G F 2 1 受容体の活性を増加させ得る。1 つの態様において、F G F R - 1 cまたはF G F R - 4 の1 つまたは両方が、F G F 2 1 モジュレーターに応答して上方調節され得る。上方調節はまた、F G F 2 1 ー関連活性、例えば、例えば、血糖、インスリン、トリグリ

セリドもしくはコレステロールレベルを低下する；肝臓脂質もしくはトリグリセリドレベルを減少する；体重を減少する；グルコース耐性、エネルギー消費もしくはインスリン感受性を改善する；またはF G F 2 1受容体のリン酸化を引き起こす；またはF G F 2 1下流マーカーを増加する能力を示すことができる。F G F R 2 1受容体は、F G F R-1cまたはF G F R-4の1つまたは両方であり得る。上方制御は、コントロールと比較して、少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも75%、少なくとも100%、少なくとも150%、少なくとも200%、少なくとも250%、少なくとも400%または少なくとも500%であり得る。

【0107】

本明細書において使用される「N-末端」なる用語は、タンパク質の少なくとも最初の10個のアミノ酸を示す。

10

【0108】

本明細書において使用される「N-末端ドメイン」および「N-末端領域」なる用語は、互換的に使用され、タンパク質の第1のアミノ酸で始まり、タンパク質のN-末端半分における任意のアミノ酸で終わるタンパク質のフラグメントを示す。例えば、F G F 2 1のN-末端ドメインは、配列番号：1のアミノ酸1から配列番号：1のほぼアミノ酸10から105の間の任意のアミノ酸までである。

【0109】

本明細書において使用される「C-末端」なる用語は、タンパク質の少なくとも最後の10個のアミノ酸を示す。

20

【0110】

本明細書において使用される「C-末端ドメイン」および「C-末端領域」なる用語は、互換的に使用され、タンパク質のC末端半分における任意のアミノ酸で始まり、タンパク質の最後のアミノ酸で終わるタンパク質のフラグメントを示す。例えば、F G F 2 1のC末端ドメインは、配列番号：1のアミノ酸105から約アミノ酸200の間から任意のアミノ酸で始まり、配列番号：1のアミノ酸209で終わる。

【0111】

本明細書において使用される「ドメイン」なる用語は、生体分子の知られているまたは疑われる機能に寄与する該生体分子の構造部を示す。ドメインは、領域またはその一部と同一であってよく、領域の全てまたは一部に加えて、特定の領域と異なる生体分子の一部を組み込まれていてもよい。

30

【0112】

本明細書において使用される「シグナルドメイン」（「シグナル配列」または「シグナルペプチド」とも称される）なる用語は、前駆体タンパク質（しばしば、膜結合または分泌タンパク質）のN-末端領域で一続きのアミノ酸配列にて存在するペプチドドメインを示し、翻訳後タンパク質輸送に関与する。多くの場合、シグナルドメインは、選別プロセスが完了した後、特異的シグナルペプチダーゼにより全長タンパク質から除去される。それぞれのシグナルドメインは、細胞中の前駆体タンパク質の特定の目標を指定する。F G F 2 1のシグナルドメインは、配列番号：1のアミノ酸1-28である。

【0113】

本明細書において使用される「受容体結合ドメイン」なる用語は、膜結合受容体タンパク質と接触し、細胞性応答、例えば、シグナル伝達事象を引き起こすタンパク質の任意の位置または領域を示す。

40

【0114】

本明細書において使用される「リガンド結合ドメイン」なる用語は、F G F 2 1の対応する天然配列の少なくとも1つの定性結合活性を保持するタンパク質の任意の位置または領域を示す。

【0115】

「領域」なる用語は、生体分子の一次構造の物理的に隣接する部分を示す。タンパク質の場合、領域は、タンパク質のアミノ酸配列の隣接する部分により定義される。いくつか

50

の態様において、「領域」は、生体分子の機能と関連する。

【0116】

本明細書において使用される「フラグメント」なる用語は、生体分子の一次構造の物理的に隣接する部分を示す。タンパク質の場合、部分は、タンパク質のアミノ酸配列隣接する部分により定義され、少なくとも3-5アミノ酸、少なくとも8-10アミノ酸、少なくとも11-15アミノ酸、少なくとも17-24アミノ酸、少なくとも25-30アミノ酸および少なくとも30-45アミノ酸を示す。オリゴヌクレオチドの場合、部分は、オリゴヌクレオチドの核酸配列の隣接する部分により定義され、少なくとも9-15ヌクレオチド、少なくとも18-30ヌクレオチド、少なくとも33-45ヌクレオチド、少なくとも48-72ヌクレオチド、少なくとも75-90ヌクレオチドおよび少なくとも90-130ヌクレオチドを示す。いくつかの態様において、生体分子の部分は、生物学的活性を有する。本発明の文脈において、FGF21ポリペプチドフラグメントは、配列番号：1に記載されている全FGF21ポリペプチド配列を含まない。

10

【0117】

「天然配列」ポリペプチドは、天然由来のポリペプチドと同じアミノ酸配列を有するものである。このような天然配列ポリペプチドは、天然から単離することができるか、または組換えもしくは合成手段により生産することができる。したがって、天然配列ポリペプチドは、天然ヒトポリペプチド、マウスポリペプチドまたは任意の他の哺乳動物種由来のポリペプチドのアミノ酸配列を有し得る。

【0118】

20

本明細書において使用される「同種ヌクレオチド配列」もしくは「同種アミノ酸配列」またはそれらの変異する句は、少なくとも特定のパーセントのヌクレオチドレベルまたはアミノ酸レベルでの相同性により特徴付けられる配列を示し、「配列同一性」と互換的に使用される。同種ヌクレオチド配列は、タンパク質のアイソフォームをコードする配列を含む。このようなアイソフォームは、例えば、RNAの代替スプライシングの結果として、同じ生物体の異なる組織において発現させることができる。あるいは、アイソフォームは、異なる遺伝子によってコードされ得る。同種ヌクレオチド配列は、限定はしないが哺乳動物を含む、ヒト以外の種のタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。同種ヌクレオチド配列はまた、限定はしないが、本明細書に記載されているヌクレオチド配列天然対立遺伝子変異および突然変異を含む。同種アミノ酸配列は、保存的アミノ酸置換を含み、ポリペプチドが同じ結合および／または活性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、ヌクレオチドまたはアミノ酸配列は、少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一性を有するとき、同種である。いくつかの態様において、ヌクレオチドまたはアミノ酸配列は、1-10、10-20、20-30、30-40、40-50または50-60個のヌクレオチド／アミノ酸置換、付加または欠失を有するとき、同種である。いくつかの態様において、同種アミノ酸配列は、最大5または最大3個の保存アミノ酸置換を有する。

30

【0119】

相同性または同一性パーセントは、例えば、SmithおよびWatermanのアルゴリズム (Adv. Appl. Math., 1981, 2, 482-489) を使用する、デフォルト設定を使用してGapプログラム (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for UNIX, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison WI) により決定することができる。いくつかの態様において、プローブと標的間の相同性は、約75%から約85%である。いくつかの態様において、核酸は、配列番号：2またはその部分と少なくとも約95%、約97%、約98%、約99%および約100%同種であるヌクレオチドを有する。

40

【0120】

相同性はまた、ポリペプチドレベルであり得る。いくつかの態様において、ポリペプチドは、配列番号：1またはその部分と約95%、約97%、約98%、約99%および約100%同種である。本発明のFGF21変異体（「本発明配列」、例えば、変異体1ま

50

たは配列番号：5）および異なるアミノ酸配列（「外来配列」、例えば、P 1 7 4へ変化したL 1 7 4を有する配列番号：1）の同一性程度またはパーセントは、「本発明配列」または「外来配列」のどちらか小さい方の長さで割った2つの配列のアラインメントにおける正確な一致の数として計算する。結果は、同一性パーセントとして示される。例えば、変異体1（配列番号：5）は、P 1 7 4へ変化したL 1 7 4（L 1 7 4を有する配列番号：1がP 1 7 4に変化した）を有する野生型F G F 2 1と94.9%同一性を有する。これらの2つの配列に関して、168個の同一のアミノ酸が存在し、全長は177個のアミノ酸である。したがって、同一性パーセントは、 $(168 / 177) \times 100 = 94.9\%$ である。

【0121】

本明細書において使用される「混合」なる用語は、同じ領域中で1つ以上の化合物、細胞、分子などを互いに合わせるプロセスを示す。これは、例えば、試験チューブ、ペトリ皿または1つ以上の化合物、細胞または分子を混合することが可能であるあらゆる容器で行われ得る。

【0122】

本明細書において使用される「実質的に精製される」なる用語は、天然環境から取り出されており、天然に関連する他の成分を少なくとも60%、少なくとも75%、および少なくとも90%含まない化合物（例えば、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドまたは抗体のいずれか）を示す。

【0123】

「薬学的に許容される担体」なる用語は、治療剤、例えば、抗体またはポリペプチド、遺伝子および他の治療剤の投与のための担体を示す。該用語は、組成物を受ける個体に有害な抗体の生産をそれ自体誘導せず、過度の毒性なく投与することができるあらゆる医薬担体を示す。適当な担体は、大型のゆっくり代謝される高分子、例えば、タンパク質、多糖類、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリマーアミノ酸、アミノ酸コポリマー、脂質凝集物および不活性ウイルス粒子であり得る。このような担体は、当業者によく知られている。治療組成物における薬学的に許容される担体は、液体、例えば、水、塩水、グリセロールおよびエタノールを含むことができる。補助物質、例えば、湿潤剤または乳化剤、pH緩衝物質などもまた、このようなビヒクル中に存在することができる。

【0124】

システイン残基により提供される天然ジスルフィド結合は、一般的に、タンパク質の熱力学的安定性を増加させる。融解温度の増加において測定されるとき、熱力学的安定性の増加の成功例は、酵素T 4リゾチーム（Matsumuraら PNAS 86:6562-6566 (1989)）およびバルナーゼ（Johnsonら J. Mol. Biol. 268:198-208 (1997)）の多数のジスルフィド結合された突然変異体である。本発明の局面は、野生型F G F 2 1の柔軟性を抑制し、それにより、タンパク質の疎水性コアへの保存剤のアクセスを制限する、変異体内のジスルフィド結合の存在によりなし遂げられた、保存剤の存在下でのF G F 2 1の物理的安定性の増強である。

【0125】

したがって、本発明の第2の局面は、例えば、システイン残基を野生型F G F 2 1タンパク質または本発明のポリペプチドおよびタンパク質変異体に組み込む、または置換することを介する、さらなるジスルフィド結合の取り込みにより生じる増強された医薬安定性を有するヒトF G F 2 1の変異体またはその生物学的に活性なペプチドを提供する。当業者は、本明細書において記載されている提案された態様に加えて、天然システイン、システイン103およびシステイン121を、改善された特性を与え得る新規ジスルフィド結合を導入するために遺伝子座として利用することができることを認識している。

【0126】

これらは、2つ以上のいかのもの：グルタミン46、アルギニン47、チロシン48、ロイシン49、チロシン50、スレオニン51、アスパラギン酸52、アスパラギン酸53、アラニン54、グルタミン55、グルタミン56、スレオニン57、グルタミン酸5

10

20

30

40

50

8、アラニン59、ヒスチジン60、ロイシン61、グルタミン酸62、イソロイシン63、バリン69、グリシン70、グリシン71、アラニン72、アラニン73、ロイシン144、ヒスチジン145、ロイシン146、プロリン147、グリシン148、アスパラギン149、リジン150、セリン151、プロリン152、ヒスチジン153、アルギニン154、アスパラギン酸155、プロリン156、アラニン157、プロリン158、アルギニン159、グリシン160、プロリン161、アラニン162、アルギニン163、フェニルアラニン164（ここで、アミノ酸の番号は、全長209アミノ酸hF G F 2 1配列の配列番号：1に基づく）に対してシステインでの置換を有するF G F - 2 1を含む。

【0127】

10

さらに、ヒトF G F 2 1の変異体またはその生物学的に活性なペプチドは、C y s 1 0 3 - C y s 1 2 1の天然の1つに加えて、操作されたジスルフィド結合を提供され、以下のとおりである：G l n 4 6 C y s - A l a 5 9 C y s、G l n 4 6 C y s - H i s 6 0 C y s、G l n 4 6 C y s - L e u 6 1 C y s、G l n 4 6 C y s - G l u 6 2 C y s、G l n 4 6 C y s - I l e 6 3 C y s、A r g 4 7 C y s - A l a 5 9 C y s、A r g 4 7 C y s - H i s 6 0 C y s、A r g 4 7 C y s - L e u 6 1 C y s、A r g 4 7 C y s - G l u 6 2 C y s、A r g 4 7 C y s - I l e 6 3 C y s、T y r 4 8 C y s - A l a 5 9 C y s、T y r 4 8 C y s - H i s 6 0 C y s、T y r 4 8 C y s - L e u 6 1 C y s、T y r 4 8 C y s - G l u 6 2 C y s、T y r 4 8 C y s - I l e 6 3 C y s、L e u 4 9 C y s - A l a 5 9 C y s、L e u 4 9 C y s - H i s 6 0 C y s、L e u 4 9 C y s - L e u 6 1 C y s、L e u 4 9 C y s - G l u 6 2 C y s、L e u 4 9 C y s - I l e 6 3 C y s、T y r 5 0 C y s - A l a 5 9 C y s、T y r 5 0 C y s - H i s 6 0 C y s、T y r 5 0 C y s - L e u 6 1 C y s、T y r 5 0 C y s - G l u 6 2 C y s、T y r 5 0 C y s - I l e 6 3 C y s、L e u 1 4 4 C y s - G l y 1 6 0 C y s、L e u 1 4 4 C y s - P r o 1 6 1 C y s、L e u 1 4 4 C y s - A l a 1 6 2 C y s、L e u 1 4 4 C y s - A r g 1 6 3 C y s、L e u 1 4 4 C y s - P h e 1 6 4 C y s、H i s 1 4 5 C y s - G l y 1 6 0 C y s、H i s 1 4 5 C y s - P r o 1 6 1 C y s、H i s 1 4 5 C y s - A l a 1 6 2 C y s、H i s 1 4 5 C y s - A r g 1 6 3 C y s、H i s 1 4 5 C y s - P h e 1 6 4 C y s、L e u 1 4 6 C y s - G l y 1 6 0 C y s、L e u 1 4 6 C y s - P r o 1 6 1 C y s、L e u 1 4 6 C y s - A l a 1 6 2 C y s、L e u 1 4 6 C y s - A r g 1 6 3 C y s、L e u 1 4 6 C y s - P h e 1 6 4 C y s、P r o 1 4 7 C y s - G l y 1 6 0 C y s、P r o 1 4 7 C y s - P r o 1 6 1 C y s、P r o 1 4 7 C y s - A l a 1 6 2 C y s、P r o 1 4 7 C y s - A r g 1 6 3 C y s、P r o 1 4 7 C y s - P h e 1 6 4 C y s、G l y 1 4 8 C y s - G l y 1 6 0 C y s、G l y 1 4 8 C y s - P r o 1 6 1 C y s、G l y 1 4 8 C y s - A l a 1 6 2 C y s、G l y 1 4 8 C y s - A r g 1 6 3 C y s、G l y 1 4 8 C y s - P h e 1 6 4 C y s、T h r 5 7 C y s - V a l 6 9 C y s、T h r 5 7 C y s - G l y 7 0 C y s、T h r 5 7 C y s - G l y 7 1 C y s、T h r 5 7 C y s - A l a 7 2 C y s、T h r 5 7 C y s - A l a 7 3 C y s、G l u 5 8 C y s - V a l 6 9 C y s、G l u 5 8 C y s - G l u 7 0 C y s、G l u 5 8 C y s - G 7 1 C y s、G l u 5 8 C y s - A l a 7 2 C y s、G l u 5 8 C y s - A l a 7 3 C y s、A l a 5 9 C y s - V a l 6 9 C y s、A l a 5 9 C y s - G l y 7 0 C y s、A l a 5 9 C y s - G l y 7 1 C y s、A l a 5 9 C y s - A l a 7 2 C y s、A l a 5 9 C y s - A l a 7 3 C y s、H i s 6 0 C y s - V a l 6 9 C y s、H i s 6 0 C y s - G l y 7 0 C y s、H i s 6 0 C y s - G l y 7 1 C y s、H i s 6 0 C y s - A l a 7 2 C y s、H i s 6 0 C y s - A l a 7 3 C y s、L e u 6 1 C y s - V a l 6 9 C y s、L e u 6 1 C y s - G l y 7 0 C y s、L e u 6 1 C y s - G l y 7 1 C y s、L e u 6 1 C y s - A l a 7 2 C y s、L e u 6 1 C y s - A l a 7 3 C y s、A r g 4 7 C y s - G l y 1 4 8 C y s、T y r 4 8 C y s - G l y 1 4 8 C y s、L e u 4 9 C y s - G l y 1 4 8 C y s、T y r 5 0 C y s - G l y 1 4 8 C y s、T h r 5 1 C y s - G l y 1 4 8 C y s、A s p 5 2 C y s - G l y 1 4 8 C y s、

20

30

40

50

Asp53Cys-Gly148Cys, Ala54Cys-Gly148Cys, Gln55Cys-Gly148Cys, Gln56Cys-Gly148Cys, Thr57Cys-Gly148Cys, Glu58Cys-Gly148Cys, Arg47Cys-Asn149Cys, Tyr48Cys-Asn149Cys, Leu49Cys-Asn149Cys, Tyr50Cys-Asn149Cys, Thr51Cys-Asn149Cys, Asp52Cys-Asn149Cys, Asp53Cys-Asn149Cys, Ala54Cys-Asn149Cys, Gln55Cys-Asn149Cys, Gln56Cys-Asn149Cys, Thr57Cys-Asn149Cys, Glu58Cys-Asn149Cys, Arg47Cys-Lys150Cys, Tyr48Cys-Lys150Cys, Leu49Cys-Lys150Cys, Tyr50Cys-Lys150Cys, Thr51Cys-Lys150Cys, Asp52Cys-Lys150Cys, Asp53Cys-Lys150Cys, Ala54Cys-Lys150Cys, Gln55Cys-Lys150Cys, Gln56Cys-Lys150Cys, Thr57Cys-Lys150Cys, Glu58Cys-Lys150Cys, Arg47Cys-Ser151Cys, Tyr48Cys-Ser151Cys, Leu49Cys-Ser151Cys, Tyr50Cys-Ser151Cys, Thr51Cys-Ser151Cys, Asp52Cys-Ser151Cys, Asp53Cys-Ser151Cys, Ala54Cys-Ser151Cys, Gln55Cys-Ser151Cys, Gln56Cys-Ser151Cys, Thr57Cys-Ser151Cys, Glu58Cys-Ser151Cys, Arg47Cys-Pro152Cys, Tyr48Cys-Pro152Cys, Leu49Cys-Pro152Cys, Tyr50Cys-Pro152Cys, Thr51Cys-Pro152Cys, Asp52Cys-Pro152Cys, Asp53Cys-Pro152Cys, Ala54Cys-Pro152Cys, Gln55Cys-Pro152Cys, Gln56Cys-Pro152Cys, Thr57Cys-Pro152Cys, Glu58Cys-Pro152Cys, Arg47Cys-His153Cys, Tyr48Cys-His153Cys, Leu49Cys-His153Cys, Tyr50Cys-His153Cys, Thr51Cys-His153Cys, Asp52Cys-His153Cys, Asp53Cys-His153Cys, Ala54Cys-His153Cys, Gln55Cys-His153Cys, Gln56Cys-His153Cys, Thr57Cys-His153Cys, Glu58Cys-His153Cys, Arg47Cys-Arg154Cys, Tyr48Cys-Arg154Cys, Leu49Cys-Arg154Cys, Tyr50Cys-Arg154Cys, Thr51Cys-Arg154Cys, Asp52Cys-Arg154Cys, Asp53Cys-Arg154Cys, Ala54Cys-Arg154Cys, Gln55Cys-Arg154Cys, Gln56Cys-Arg154Cys, Thr57Cys-Arg154Cys, Glu58Cys-Arg154Cys, Arg47Cys-Asp155Cys, Tyr48Cys-Asp155Cys, Leu49Cys-Asp155Cys, Tyr50Cys-Asp155Cys, Thr51Cys-Asp155Cys, Asp52Cys-Asp155Cys, Asp53Cys-Asp155Cys, Ala54Cys-Asp155Cys, Gln55Cys-Asp155Cys, Gln56Cys-Asp155Cys, Thr57Cys-Asp155Cys, Glu58Cys-Asp155Cys, Arg47Cys-Pro156Cys, Tyr48Cys-Pro156Cys, Leu49Cys-Pro156Cys, Tyr50Cys-Pro156Cys, Thr51Cys-Pro156Cys, Asp52Cys-Pro156Cys, Asp53Cys-Pro156Cys, Ala54Cys-Pro156Cys, Gln55Cys-Pro156Cys, Gln56Cys-Pro156Cys, Thr57Cys-Pro156Cys, Glu58Cys-Pro156Cys, Arg47Cys-Ala157Cys, Tyr48Cys-Ala157Cys, Leu49Cys-Ala157Cys, Tyr50

Cys-Ala157Cys、Thr51Cys-Ala157Cys、Asp52Cys
 s-Ala157Cys、Asp53Cys-Ala157Cys、Ala54Cys-
 Ala157Cys、Gln55Cys-Ala157Cys、Gln56Cys-Ala
 157Cys、Thr57Cys-Ala157Cys、Glu58Cys-Ala1
 57Cys、Arg47Cys-Pro158Cys、Tyr48Cys-Pro158
 Cys、Leu49Cys-Pro158Cys、Tyr50Cys-Pro158Cys
 s、Thr51Cys-Pro158Cys、Asp52Cys-Pro158Cys、
 Asp53Cys-Pro158Cys、Ala54Cys-Pro158Cys、Gln
 55Cys-Pro158Cys、Gln56Cys-Pro158Cys、Thr5
 7Cys-Pro158Cys、Glu58Cys-Pro158Cys、Arg47C
 ys-Arg159Cys、Tyr48Cys-Arg159Cys、Leu49Cys
 -Arg159Cys、Tyr50Cys-Arg159Cys、Thr51Cys-A
 rg159Cys、Asp52Cys-Arg159Cys、Asp53Cys-Arg
 159Cys、Ala54Cys-Arg159Cys、Gln55Cys-Arg15
 9Cys、Gln56Cys-Arg159Cys、Thr57Cys-Arg159C
 ys、Glu58Cys-Arg159Cys、Arg47Cys-G160Cys、T
 yr48Cys-G160Cys、Leu49Cys-G160Cys、Tyr50Cy
 s-Gly160Cys、Thr51Cys-Gly160Cys、Asp52Cys-
 Gly160Cys、Asp53Cys-Gly160Cys、Ala54Cys-Gly
 160Cys、Gln55Cys-Gly160Cys、Gln56Cys-Gly1
 60Cys、Thr57Cys-Gly160Cys、Glu58Cys-Gly160
 Cys、Arg47Cys-Pro161Cys、Tyr48Cys-Pro161Cy
 s、Leu49Cys-Pro161Cys、Tyr50Cys-Pro161Cys、
 Thr51Cys-Pro161Cys、Asp52Cys-Pro161Cys、As
 p53Cys-Pro161Cys、Ala54Cys-Pro161Cys、Gln5
 5Cys-Pro161Cys、Gln56Cys-Pro161Cys、Thr57C
 ys-Pro161Cys、Glu58Cys-Pro161Cys、Arg47Cys
 -Ala162Cys、Tyr48Cys-Ala162Cys、Leu49Cys-A
 la162Cys、Tyr50Cys-Ala162Cys、Thr51Cys-Ala
 162Cys、Asp52Cys-Ala162Cys、Asp53Cys-Ala16
 2Cys、Ala54Cys-Ala162Cys、Gln55Cys-Ala162C
 ys、Gln56Cys-Ala162Cys、Thr57Cys-Ala162Cys
 、Glu58Cys-Ala162Cys、Arg47Cys-Arg163Cys、T
 yr48Cys-Arg163Cys、Leu49Cys-Arg163Cys、Tyr
 50Cys-Arg163Cys、Thr51Cys-Arg163Cys、Asp52
 Cys-Arg163Cys、Asp53Cys-Arg163Cys、Ala54Cy
 s-Arg163Cys、Gln55Cys-Arg163Cys、Gln56Cys-
 Arg163Cys、Thr57Cys-Arg163Cys、Glu58Cys-Ar
 g
 163Cys。

【0128】

本発明の第3の局面は、本発明の第2の態様において示される2つ以上のアミノ酸位置
 でのシステインの置換と共に、本発明の第1の態様において示される任意のアミノ酸位置
 で任意の荷電アミノ酸および／または極性であるが非荷電アミノ酸の置換を含むヒトFF
 F21の変異体またはその生物学的に活性なペプチドを提供する。

【0129】

タンパク質医薬の開発における重要な挑戦が、タンパク質の物理化学的不安定性に取り
 組むことであることは、当分野でよく知られている。このことは、タンパク質医薬製剤が
 多数の使用を意図されるとき、さらになおさら明らかであり、注射製剤は、安定な濃縮さ
 れた保存溶液を必要とすると同時に、好ましい生物活性プロフィールを維持する。野生型

F G F 2 1 の詳細な生物物理学特性化は、濃縮タンパク質溶液 ($> 5 \text{ mg/ml}$) は、ストレス条件、例えば、高い温度または低い pH に暴露されたとき、加速された会合および凝集 (すなわち、乏しい物理的安定性および生物医薬特性) を引き起こすことを確立した。医薬防腐剤 (例えば、m-クレゾール) への F G F 2 1 の濃縮タンパク質溶液の暴露はまた、物理的安定性に対するネガティブな影響を有した。

【0130】

したがって、本発明の態様は、生理学および保存製剤の両方の条件下で、化学安定性および生物学的効力を維持するが、濃縮溶液の物理的安定性を増強することである。所定のタンパク質濃度で、温度およびイオン強度が物理的安定性に対して大きな影響を有するため、会合および凝集が疎水性相互作用によって生じ得ることが考えられる。ほとんど、非保存的と推測される表面暴露アミノ酸残基を標的とした。これらの残基の局所環境を分析し、構造的に重要であると思われるものを突然変異誘発のために選択した。特定の変化を開始する1つの方法は、グルタミン酸残基を導入することにより、タンパク質の pI をさらに減少させることである (「グルタミン酸スキャン」)。電荷置換の導入が電荷-電荷反発を介して疎水性媒介凝集を阻害し、保存剤相溶性を改善する可能性があるという仮説を立てられる。加えて、当業者はまた、十分な程度の突然変異誘発で、負電荷の同時減少有りまたは無しでの正電荷の導入により、pI を塩基性(basic) pH 範囲にシフトさせ、したがって電荷-電荷反発を起こすことができることを認識している。

【0131】

本発明の態様は、生理学および保存医薬製剤の両方の条件下で物理化学的安定性に関与するが、野生型 F G F 2 1 と比較して変異体の生物学的効力の維持が、同様に考慮される重要な因子である。したがって、本発明の変異体の生物学的効力は、インビトロで 3 T 3-L 1 脂肪細胞 2-D O G 摂取細胞アッセイにおいて測定されるとき、グルコース摂取 (実施例 3) および/または、インビボで o b / o b マウスアッセイにおいて測定されるとき、血漿グルコースレベルならびに血漿トリグリセリドの低下 (実施例 5) に影響する変異体の能力により定義される。

【0132】

本発明にしたがって投与される F G F 2 1 の変異体は、当分野で知られている任意の手段により作製および/または単離され得る。変異体を生産するための最も好ましい方法は、組換え DNA 方法論を介することであり、当業者によく知られている。このような方法は、M o l e c u l a r B i o l o g y (John Wiley & Sons, Inc.) の C u r r e n t P r o t o c o l s に記載されており、これを出典明示により本明細書に包含させる。

【0133】

さらに、好ましい態様は、本明細書に記載されている変異体に由来する生物学的に活性なペプチドを含む。このようなペプチドは、記載されている少なくとも1つの置換を含み、該変異体は、生物学的活性を有する。ペプチドは、当業者に知られているあらゆる、および全ての手段により生産され得、この例は、酵素消化、化学合成または組換え DNA 方法論を含むが、これらに限定されない。

【0134】

特定の線維芽細胞増殖因子のペプチドのフラグメントが生物学的に活性であることが当分野で確立されている。例えば、Baird ら Proc. Natl. Acad. Sci (USA) 85:2324-2328 (1988) および J. Cell. Phys. Suppl. 5:101-106 (1987) 参照。したがって、変異体のフラグメントまたはペプチドの選択は、当分野で知られている基準に基づく。例えば、ジペプチジルペプチダーゼ I V (D P P - I V) が、神経ペプチド、内分泌腺ペプチドおよびサイトカインの不活性化に関与するセリン型プロテアーゼであることが知られている (Damm e ら Chem. Immunol. 72: 42-56, (1999))。F G F 2 1 の N-末端 (H i s P r o I l e P r o) は、D P P - I V に対する基質となる可能性がある2つのジペプチドを含み、4個のアミノ酸によって N-末端で切断された F G F 2 1 のフラグメントをもたらす得る。予想外に、野生型 F G F 2 1 の該フラグメントは、生物学的活性保持することが証明され

ており（表2）、したがって、最大4個のアミノ酸によってN-末端で切断された本発明の変異体は、本発明の態様である。

【0135】

本発明はまた、RNAの形態またはDNAの形態であってよい上記変異体をコードするポリヌクレオチドを含み、該DNAはcDNA、ゲノムDNAおよび合成DNAを含む。DNAは二本鎖または一本鎖であってよい。本発明の変異体をコードするコード配列は、遺伝子コードの重複または縮重の結果として変化し得る。

【0136】

本発明の変異体をコードするポリヌクレオチドは、以下のものを含み得る：変異体に対するコード配列のみ、変異体に対するコード配列およびさらなるコード配列、例えば、機能性ポリペプチド、またはリーダーもしくはは分泌配列または前駆タンパク質配列；変異体に対するコード配列および非コード配列、例えば、イントロンまたは変異体に対するコード配列の5'および/または3'の非コード配列。したがって、「変異体をコードするポリヌクレオチド」なる用語は、さらなるコードおよび/または非コード配列を含む、変異体に対するコード配列だけでなく、ポリヌクレオチドもまた含み得るポリヌクレオチドを含む。

【0137】

本発明はさらに、示される置換を含む、ポリペプチドのフラグメント、アナログおよび誘導体をコードする記載されているポリヌクレオチドの変異体に関する。ポリヌクレオチドの変異体は、ヒトFGF21配列の天然対立遺伝子変異体、非天然変異体、または上記切断変異体であり得る。したがって、本発明はまた、上記変異体をコードするポリヌクレオチド、ならびに記載されている変異体のフラグメント、誘導体またはアナログをコードするこのようなポリヌクレオチドの変異体を含む。このようなヌクレオチド変異体は、第1または第2の態様の少なくとも1つの示されたアミノ酸置換が存在するかぎり、欠失変異体、置換変異体、切断変異体、および付加または挿入変異体を含む。

【0138】

本発明のポリヌクレオチドは、配列が発現コントロール配列に作動可能に連結した（すなわち、発現コントロール配列の機能を保証するように位置する）後、宿主において発現する。これらの発現ベクターは一般的に、エピソームまたは宿主染色体DNAの不可欠な部分として、宿主生物中で複製可能である。一般的に、発現ベクターは、所望のDNA配列で形質転換された細胞の検出を可能にするために、選択マーカー、例えば、テトラサイクリン、ネオマイシンおよびジヒドロ葉酸レダクターゼを含み得る。FGF21変異体は、適当なプロモーターのコントロール下で、哺乳動物細胞、昆虫、酵母、細菌または他の細胞において発現させることができる。無細胞翻訳系もまた、本発明のDNA構築物由来のRNAを使用して、このようなタンパク質を生産するために使用することができる。

【0139】

大腸菌は、本発明のポリヌクレオチドをクローニングするために特に有用な原核生物宿主である。使用のために適当な他の微生物宿主は、枯草菌(*Bacillus subtilis*)、ネズミチフス菌(*Salmonella typhimurium*)ならびにセラチア、シュードモナス、連鎖球菌およびブドウ球菌の様々な種を含むが、他のものも当然選択肢として使用され得る。これらの原核生物宿主において、1つはまた、一般的に宿主細胞と適合性のある発現コントロール配列（例えば、複製起点）を含む発現ベクターを作ることができる。加えて、多くのよく知られているプロモーター、例えば、ラクトースプロモーター系、トリプトファン（trp）プロモーター系、ペーターラクタマーゼプロモーター系またはファージラムダもしくははT7由来のプロモーター系が存在し得る。プロモーターは、一般的に、所望によりオペレーター配列にて、発現をコントロールし、転写および翻訳を開始および完了するために、リボソーム結合部位配列などを有する。

【0140】

タンパク質の発現の当業者は、メチオニンまたはメチオニン-アルギニン配列が大腸菌における発現のために成熟配列（配列番号：3）のN-末端に導入され得ることを認識し

10

20

30

40

50

、本発明の文脈において考慮される。したがって、特記されない限り、大腸菌において発現される本発明の変異体は、N-末端に導入されたメチオニン配列を有する。

【0141】

他の微生物、例えば、酵母または真菌もまた、発現のために使用され得る。メタノール資化酵母、出芽酵母、分裂酵母およびピチア・アングスタ(*Pichia angusta*)は、所望の、発現コントロール配列、例えば、プロモーター、例えば、3-ホスホグリセリン酸キナーゼまたは他の糖分解酵素、および複製起点、終始配列などを有する適当なベクターと共に、好ましい酵母宿主の例である。アスペルギルス・ニガー(*Aspergillus niger*)、トリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)；およびスエヒロタケ(*Schizophyllum commune*)は、真菌宿主の例であるが、他のものも当然選択肢として使用され得る。

10

【0142】

哺乳動物組織細胞培養物もまた、本発明のポリペプチドを発現および生産するために使用され得る。無傷な変異体を分泌することができる多くの適当な宿主細胞系が、当分野で開発されているため、真核細胞が実際に好ましく、CHO細胞系、種々のCOS細胞系、NSO細胞、Syrian Hamster 卵巣細胞系、HeLa細胞またはヒト胚腎臓細胞系（すなわちHEK293、HEK293EBNA）を含む。

【0143】

これらの細胞のための発現ベクターは、発現コントロール配列、例えば、複製起点、プロモーター、エンハンサー、および必要なプロセッシング情報部位、例えば、リボソーム結合部位、RNAスプライス部位、ポリアデニル化部位、および転写ターミネーター配列を含むことができる。好ましい発現コントロール配列は、SV40、アデノウイルス、ウシパピローマウイルス、サイトメガロウイルス、Raus肉腫ウイルスなどに由来するプロモーターである。好ましいポリアデニル化部位は、SV40およびウシ成長ホルモンに由来する配列を含む。

20

【0144】

興味あるポリヌクレオチド配列（例えば、FGF21の変異体および発現コントロール配列）を含むベクターは、よく知られている方法により宿主細胞に移動させることができ、これは細胞性宿主の型に依存して変化する。例えば、塩化カルシウムトランスフェクションは、原核細胞のために一般的に利用され、リン酸カルシウム処理またはエレクトロポレーションは、他の細胞性宿主のために使用され得る。

30

【0145】

タンパク質精製の種々の方法が使用され得、このような方法は、例えば、Deutscher, Methods in Enzymology 182: 83-9 (1990)およびScopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, NY (1982)において、当分野で知られており、記載されている。選択される精製工程は、例えば、FGF21の変異体のために使用される生産プロセスの性質に依存する。

【0146】

FGF21変異体含有組成物は、患者の臨床状態、FGF21変異体組成物の送達部位、投与方法、投与スケジュールおよび専門家に知られている他の因子を考慮して、良い医療行為と一致する様式において処方および投与されるべきである。したがって、本明細書における目的のためにFGF21変異体の「治療有効量」は、このような考えにより決定される。

40

【0147】

FGF21変異体の医薬組成物および本発明の医薬組成物は、一般的に意図される目的をなし遂げる任意の手段により、1型および2型糖尿病、肥満、メタボリック・シンドロームまたは重症患者を処置するために投与され得る。本明細書において使用される「非経口」なる用語は、静脈内、筋肉内、腹腔内、胸骨内、皮下および関節内注射および注入を含む投与様式を示す。投与される用量は、年齢、健康状態およびレシピエントの体重、もしあれば同時処置の種類、処置の頻度、および所望の効果の性質に依存する。本発明の範囲内の組成物は、FGF21変異体が、1型または2型糖尿病、肥満またはメタボリック

50

・シンドロームの処置のために所望の医療効果をなし遂げるために有効である量において存在する全ての組成物を含む。個々の必要性はある患者から別の患者で変化し得るが、全ての成分の有効量の最適範囲の決定は、通常の臨床医の能力の範囲内である。

【0148】

本発明の F G F 2 1 の変異体は、薬学的に有用な組成物を調製するために、既知の方法にしたがって製剤化することができる。所望の製剤は、任意の薬学的に許容される担体、防腐剤、賦形剤または安定剤を有する高い純度の適当な希釈剤または水溶液で再構成された安定な凍結乾燥された産物である [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition (1980)]。本発明の変異体は、薬学的に許容されるバッファーと組み合わせられて、pHを、許容される安定性および投与のために許容される pHを提供するために調整され得る。

10

【0149】

非経口投与において、1つの態様において、F G F 2 1 変異体は、一般的に、単位用量の注射可能形態（溶液、懸濁液またはエマルジョン）における所望の純度の程度の1つ以上の該変異体を、薬学的に許容される担体、すなわち、使用される用量および濃度でレシピエントに対して非毒性であり、製剤の他の成分と適合性であるものと混合することにより製剤化される。好ましくは、1つ以上の薬学的に許容される抗微生物剤を加えてもよい。フェノール、m-クレゾールおよびベンジルアルコールは、好ましい薬学的に許容される抗微生物剤である。

20

【0150】

所望により、1つ以上の薬学的に許容される塩は、イオン強度または緊張力(tonicity)を調整するために加えられ得る。1つ以上の賦形剤は、製剤の等張性をさらに調整するために加えられ得る。グリセリン、塩化ナトリウムおよびマンニトールは、等張性を調整する賦形剤の例である。

【0151】

当業者は、良い医療行為および個々の患者の臨床状態により決定されるとき、F G F 2 1 変異体を含む治療組成物に対する薬学的に有効な用量および投与レジメンを容易に最適化することができる。本発明の F G F 2 1 変異体に対する典型的な用量範囲は、成体に対して約 0.01 mg/日から約 1000 mg/日（または週に1回の投与にて約 0.05 mg/週から約 5000 mg/週）の範囲である。好ましくは、用量は、約 0.1 mg/日から約 100 mg/日（または週に1回の投与にて約 0.5 mg/週から約 500 mg/週）、さらに好ましくは約 1.0 mg/日から約 10 mg/日（または週に1回の投与にて約 5 mg/週から約 50 mg/週）の範囲である。より好ましくは、用量は、約 1-5 mg/日（または週に1回の投与にて約 5 mg/週から約 25 mg/週）である。投与される F G F 2 1 変異体の適当な用量は、より速く、より効率的なグルコース利用により血糖レベルの低下およびエネルギー消費の増加をもたらし、したがって、1型および2型糖尿病、肥満およびメタボリック・シンドロームの処置のために有用である。

30

【0152】

加えて、高血糖およびインスリン耐性が栄養補給を与えられた重症患者において一般的であるため、いくつかの ICUは、食事を与えられた重症患者において過剰高血糖を処置するためにインスリンを投与する。実際に、最近の試験は、糖尿病の病歴を有するか否かにかかわらず、デシリットルあたり 110 mg よりも高くないレベルで血糖を維持するための外因性インスリンの使用が、外科的集中治療単位における重症患者中の罹患率および死亡率を減少させることを立証している (Van den Bergheら N Engl J Med., 345(19):1359, (2001))。したがって、本発明の F G F 2 1 の変異体は、ユニークに、代謝的に不安定な重症患者において代謝安定性を回復させるための手助けに適している。F G F 2 1 の変異体は、グルコース摂取を刺激し、インスリン感受性を増強するが、低血糖を誘導しないという点でユニークである。

40

【0153】

本発明の別の局面において、1型および2型糖尿病、肥満、メタボリック・シンドロー

50

ムまたは重症患者の処置のための医薬として使用するための F G F 2 1 の変異体が考慮される。

【0154】

本発明は詳細に今回記載されており、これは、以下の実施例を参照することによりさらに明白に理解されるが、実施例は、説明のみの目的のためにここに含まれ、本発明を限定されることを意図しない。

【0155】

本発明の実施は、他に記載のない限り、当分野の技術内の化学、生化学、分子生物学、免疫学および薬理学の慣用の方法を使用する。このような技術は、文献で十分に説明されている。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Methods In Enzymology (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.); および Handbook of Experimental Immunology, Vols. I IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds., 1986, Blackwell Scientific Publications); および Sambrookら Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Edition, 1989) 参照。

10

【0156】

部位特異的 F G F 2 1 突然変異体

「部位特異的 F G F 2 1 突然変異体」または「置換 F G F 2 1 突然変異体」なる用語は、天然 F G F 2 1 ポリペプチド配列のアミノ酸配列、例えば、配列番号：1 と異なるアミノ酸配列を有する F G F 2 1 突然変異体ポリペプチドおよびその変異体を示す。部位特異的 F G F 2 1 突然変異体は、F G F 2 1 ポリペプチドの特定の位置にて、保存または非保存のいずれかでのアミノ酸置換を導入し、天然または非天然アミノ酸を使用することにより作製することができる。

20

【0157】

「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基の極性または電荷に対してほとんどあるいは全く効果がない位置で、天然アミノ酸残基（すなわち、野生型 F G F 2 1 ポリペプチド配列の所定の位置に見出される残基）の非天然残基（すなわち、野生型 F G F 2 1 ポリペプチド配列の所定の位置に見出されない残基）での置換を含むことができる。保存的アミノ酸置換はまた、一般的に生物学的システムにおける合成よりもむしろ化学的ペプチド合成により組み込まれる非天然アミノ酸残基を含む。これらは、ペプチド模擬物およびアミノ酸部分の他の逆(reversed)または反転(inverted)形態を含む。

30

【0158】

天然残基は、一般的な側鎖特性に基づくクラスに分類することができる：

(1) 疎水性：N o r l o y s i n、M e t、A l a、V a l、L e u、I l e；

(2) 中性親水性：C y s、S e r、T h r；

(3) 酸性：A s p、G l u；

(4) 塩基性：A s n、G l n、H i s、L y s、A r g；

(5) 鎖方向に影響する残基：G l y、P r o；

(6) 芳香族性：T r p、T y r、P h e；ならびに

(7) セレノシステイン、ピロリジン(P Y L) およびピロリナーカルボキシーリジン(P C L)。

40

【0159】

保存的置換は、これらのクラスの1つのメンバーと同じクラスの別のメンバーとの交換を含むことができる。非保存的置換は、これらのクラスの1つのメンバーと別のクラスのメンバーとの交換を含むことができる。

【0160】

所望のアミノ酸置換（保存または非保存のいずれか）は、このような置換が望ましいとき、当業者により決定することができる。

【0161】

切断 F G F 2 1 ポリペプチド

50

本発明の１つの態様は、成熟 F G F 2 1 ポリペプチド（配列番号：３）の切断形態である。本発明のこの態様は、優れた場合によっては、成熟 F G F 2 1 ポリペプチドの非切断形態と同様の活性を提供することができる切断 F G F 2 1 ポリペプチドを同定する努力から生じた。

【０１６２】

本明細書において使用される「切断 F G F 2 1 ポリペプチド」なる用語は、アミノ酸残基が F G F 2 1 ポリペプチドのアミノ末端（または N-末端）から除去されているか、アミノ酸残基が F G F 2 1 ポリペプチドのカルボキシル末端（または C-末端）から除去されているか、または、アミノ酸残基が F G F 2 1 ポリペプチドのアミノ末端およびカルボキシル末端の両方から除去されている F G F 2 1 ポリペプチドを示す。本明細書に記載されている種々の切断は、本明細書に記載されているとおりに調製された。

10

【０１６３】

N-末端切断 F G F 2 1 ポリペプチドおよび C-末端切断 F G F 2 1 ポリペプチドの活性は、インビトロ ホスホー E R K アッセイを使用してアッセイすることができる。切断 F G F 2 1 ポリペプチドの活性を試験するために使用することができるインビトロアッセイの特定の詳細は、実施例において見いだすことができる。

【０１６４】

本発明の切断 F G F 2 1 ポリペプチドの活性はまた、インビボアッセイ、例えば、o b / o b マウスにおいて評価することができる。一般的に、切断 F G F 2 1 ポリペプチドのインビボ活性を評価するために、切断 F G F 2 1 ポリペプチドを試験動物の腹腔内に投与することができる。所望のインキュベーション期間（例えば、１時間またはそれ以上）後、血液サンプルを取り、血糖レベルを測定することができる。

20

【０１６５】

a. N-末端切断

本発明のいくつかの態様において、N-末端切断は、成熟 F G F 2 1 ポリペプチドの N-末端からの 1、2、3、4、5、6、7 または 8 個のアミノ酸残基を含む。9 個未満のアミノ酸残基の N-末端切断を有する切断 F G F 2 1 ポリペプチドは、個体において血糖を低下させる成熟 F G F 2 1 ポリペプチドの能力を保持する。したがって、特定の態様において、本発明は、1、2、3、4、5、6、7 または 8 個のアミノ酸残基の N-末端切断を有する成熟 F G F 2 1 ポリペプチドの切断形態または F G F 2 1 タンパク質変異体を含む。

30

【０１６６】

b. C-末端切断

本発明のいくつかの態様において、C-末端切断は、成熟 F G F 2 1 ポリペプチドの C-末端からの 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 または 12 個のアミノ酸残基を含む。13 個未満のアミノ酸残基の C-末端切断を有する切断 F G F 2 1 ポリペプチドは、インビトロ E L K-ールシフェラーゼアッセイ（Yie Jら FEBS Letts 583:19-24 (2009)）において野生型 F G F 2 1 の有効性の少なくとも 50% の有効性を示し、これらの F G F 2 1 突然変異体が個体において血糖を低下させる成熟 F G F 2 1 ポリペプチドの能力を保持することを示した。したがって、特定の態様において、本発明は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 または 12 個のアミノ酸残基の C-末端切断を有する成熟 F G F 2 1 ポリペプチドの切断形態または F G F 2 1 タンパク質変異体を含む。

40

【０１６７】

c. N-末端および C-末端切断

本発明のいくつかの態様において、切断 F G F 2 1 ポリペプチドは、N-末端および C-末端切断の組合せを有することができる。N-末端および C-末端切断の組合せを有する切断 F G F 2 1 ポリペプチドは、N-末端または C-末端切断単独のいずれかを含む対応する切断 F G F 2 1 ポリペプチドの活性を共有する。言い換えれば、9 個未満のアミノ酸残基の N-末端切断および 13 個未満のアミノ酸残基の C-末端切断の両方を有する切

50

断 F G F 2 1 ポリペプチドは、9 個未満のアミノ酸残基の N-末端切断を有する切断 F G F 2 1 ポリペプチドまたは 13 個未満のアミノ酸残基の C-末端切断を有する切断 F G F 2 1 ポリペプチドと同様またはそれ以上の血糖降下活性を有する。したがって、特定の態様において、本発明は、1、2、3、4、5、6、7 または 8 個のアミノ酸残基の N-末端切断および 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 または 12 個のアミノ酸残基の C-末端切断の両方を有する成熟 F G F 2 1 ポリペプチドの切断形態または F G F 2 1 タンパク質変異体を含む。

【0168】

本発明の全ての F G F 2 1 変異体と同様に、切断 F G F 2 1 ポリペプチドは、所望により、特異的突然変異により、または細菌発現プロセスの結果として導入され得るアミノ末端メチオニン残基を含むことができる。

【0169】

本発明の切断 F G F 2 1 ポリペプチドは、本明細書に記載されている実施例に記載されているとおりに調製することができる。標準分子生物学技術をよく知っている当業者は、本明細書の記載と組み合わせて、本発明の切断 F G F 2 1 ポリペプチドを作製および使用する知識を使用することができる。標準技術は、組換え DNA、オリゴヌクレオチド合成、組織培養および形質転換（例えば、エレクトロポレーション、リポフェクション）に関して使用することができる。例えば、あらゆる目的のために出典明示により本明細書に含ませる、上記、Sambrookら Molecular Cloning: A Laboratory Manual、参照。酵素反応および精製技術は、一般的に当分野で成し遂げられている、または本明細書に記載されているとおりに、製造業者の記載にしたがって行うことができる。特定の定義が提供されている場合を除いて、本明細書に記載されている分析化学、合成有機化学および薬学および医薬化学の実験室的処理および技術と関連して利用される命名法が、よく知られており、当分野で一般的に使用されるものである。標準技術は、化学合成；化学分析；医薬品、製剤および送達；および患者の処置のために使用することができる。

【0170】

本発明の切断 F G F 2 1 ポリペプチドはまた、切断 F G F 2 1 ポリペプチドにさらなる特性を与えることができる別のエンティティ(entity)に融合することができる。本発明の 1 つの態様において、切断 F G F 2 1 ポリペプチドは、I g G 定常ドメインまたはそれらのフラグメント（例えば、Fc 領域）、ヒト血清アルブミン（HSA）またはアルブミン結合ポリペプチドに融合することができる。このような融合は、本明細書において提供される既知の分子生物学的方法および／または案内を使用して成し遂げることができる。このような融合ポリペプチドの利益ならびにこのような融合ポリペプチドを作製する方法は、本明細書においてより詳細に記載されている。

【0171】

F G F 2 1 融合タンパク質

本明細書において使用される「F G F 2 1 融合ポリペプチド」または「F G F 2 1 融合タンパク質」なる用語は、本明細書に記載されているいずれかの F G F 2 1 タンパク質変異体の N-末端または C-末端にて 1 つ以上のアミノ酸残基（例えば、異種タンパク質またはペプチド）の融合を示す。

【0172】

異種ペプチドおよびポリペプチドは、F G F 2 1 タンパク質変異体；膜貫通受容体タンパク質またはその部分、例えば、細胞外ドメインまたは膜貫通および細胞内ドメイン；膜貫通受容体タンパク質に結合するリガンドまたはその部分；触媒的に活性である酵素またはその部分；オリゴマー形成を促進するポリペプチドまたはペプチド、例えば、ロイシンジッパードメイン；安定性を増加させるポリペプチドまたはペプチド、例えば、免疫グロブリン定常領域；機能性もしくは非機能性抗体またはそれらの重鎖もしくは軽鎖；ならびに、本発明の F G F 2 1 タンパク質変異体と異なる活性、例えば、治療活性を有するポリペプチドの検出および／または単離を可能にするエピトープを含むが、これらに限定されない。ヒト血清アルブミン（HSA）に融合された F G F 2 1 突然変異体もまた、本発明

10

20

30

40

50

により包含される。

【0173】

F G F 2 1 融合タンパク質は、F G F 2 1 タンパク質変異体のN-末端またはC-末端のいずれかにて異種配列を融合することにより作製することができる。本明細書に記載されているとおり、異種配列は、アミノ酸配列または非アミノ酸含有ポリマーであり得る。異種配列は、F G F 2 1 タンパク質変異体に直接、またはリンカーもしくはアダプター分子を介して融合することができる。リンカーまたはアダプター分子は、1つ以上のアミノ酸残基（またはmer）、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8または9個の残基（またはmer）、好ましくは10から50個のアミノ酸残基（またはmer）、例えば、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45または50個の残基（またはmer）、およびさらに好ましくは15から35個のアミノ酸残基（またはmer）であり得る。リンカーまたはアダプター分子はまた、融合分子の分離を可能にするように、DNA制限エンドヌクレアーゼまたはプロテアーゼに対する切断部位にて設計することができる。

10

【0174】

a. Fc融合

本発明の1つの態様において、F G F 2 1 タンパク質変異体は、ヒトIgGのFc領域の1つ以上のドメインに融合される。抗体は、2つの機能的依存性部分、抗原に結合する「Fab」として知られる可変ドメインおよびエフェクター機能、例えば、補体活性化に関与し、食細胞により攻撃する「Fc」として知られる定常ドメインを含む。Fcは長期血清半減期を有するが、Fabは寿命が短い（Caponら 1989, Nature 337: 525-31）。治療タンパク質と連結されるとき、Fcドメインは、より長い半減期を提供するか、または、Fc受容体結合、プロテインA結合、補体結合および胎盤通過さえも含むような機能を組み込むことができる（Caponら 1989）。

20

【0175】

インビボ薬物動態学分析は、ヒトF G F 2 1 が、迅速なクリアランスおよびインビボ分解によってマウスにおける約、5から1時間の短い半減期を有することを示した。したがって、F G F 2 1 の半減期を延長するために、Fc配列がF G F 2 1 ポリペプチドのN-もしくはC-末端に融合された。野生型F G F 2 1 へのFc領域の融合、特に、野生型F G F 2 1 のN-末端に融合されたFcは、予期されたとおり半減期が延長されなかったが、しかしながら、インビボでのF G F 2 1 のタンパク質分解性分解およびかかる分解に耐性があったF G F 2 1 突然変異体の同定の研究につながった。

30

【0176】

本明細書中、Fc-F G F 2 1 は、Fc配列がF G F 2 1 のN-末端に融合されている融合タンパク質を示す。同様に、本明細書中、F G F 2 1 -Fcは、Fc配列がF G F 2 1 のC-末端に融合されている融合タンパク質を示す。

【0177】

得られるF G F 2 1 融合タンパク質は、例えば、プロテインAアフィニティーカラムの使用により精製することができる。Fc領域に融合されるペプチドおよびタンパク質は、非融合対応物よりも実質的に良いインビボ半減期を示すことを見出した。また、Fc領域への融合は、融合ポリペプチドの二量化／多重合を可能する。Fc領域は天然Fc領域であってよく、また、特定の質、例えば、治療的質、循環時間または凝集の減少を改善するように改変することができる。

40

【0178】

抗体の「Fc」ドメインとの融合によるタンパク質治療剤の有用な修飾は、国際公開WO 00/024782において詳細に記載されており、これを出典明示によりその全体を本明細書に包含させる。この文献は、「ビヒクル」、例えば、ポリエチレングリコール（PEG）、デキストランまたはFc領域への連結を記載されている。

【0179】

b. 融合タンパク質リンカー

50

本発明の融合タンパク質を形成するとき、リンカーは必要ではないが、使用することができる。存在するとき、スペーサーとして主に働くため、リンカーの化学構造は重要ではないかもしれない。リンカーは、ペプチド結合により互いに連結されたアミノ酸からなり得る。本発明のいくつかの態様において、リンカーは、ペプチド結合により連結される1から20個のアミノ酸からなり、該アミノ酸は20個の天然アミノ酸から選択される。種々の態様において、1から20個のアミノ酸は、アミノ酸グリシン、セリン、アラニン、プロリン、アスパラギン、グルタミンおよびリジンから選択される。いくつかの態様において、リンカーは、立体的障害のない大多数のアミノ酸、例えば、グリシンおよびアラニンからなる。いくつかの態様において、リンカーは、ポリグリシン、ポリアラニン、グリシンおよびアラニンの組合せ（例えば、ポリ（G l y - A l a））またはグリシンおよびセリンの組合せ（例えば、ポリ（G l y - S e r））である。15個のアミノ酸残基のリンカーがF G F 2 1融合タンパク質に対して特に良く働くことが見出されたが、本発明は、任意の長さまたは組成物のリンカーを考慮する。 10

【0180】

本明細書に記載されているリンカーは典型的であり、より長く他の残基を含むリンカーが、本発明により考慮される。非ペプチドリinkerもまた、本発明により考慮される。例えば、アルキルリンカーを使用することができる。これらのアルキルリンカーは、限定はしないが、低級アルキル（例えば、C 1 - C 6）、低級アシル、ハロゲン（例えば、C 1、B r）、C N、N H 2またはフェニルを含む任意の非立体的障害基によりさらに置換され得る。典型的な非ペプチドリinkerは、ポリエチレングリコールリンカーであり、該リンカーは、100から5000 k D、例えば、100から500 k Dの分子量を有する。 20

【0181】

化学的に修飾されたF G F 2 1突然変異体

本明細書に記載されているF G F 2 1の切断形態を含む本明細書に記載されているF G F 2 1タンパク質変異体の化学的に修飾された形態は、本明細書に記載されている記載を考慮して、当業者により調製することができる。このような化学的に修飾されたF G F 2 1突然変異体は、化学的に修飾されたF G F 2 1突然変異体が、修飾されていないF G F 2 1突然変異体と、F G F 2 1突然変異体に結合された分子の型または位置のいずれかにいて異なるように改変される。化学的に修飾されたF G F 2 1突然変異体は、1つ以上の天然に結合された化学基の欠失により形成される分子を含むことができる。 30

【0182】

1つの態様において、本発明のF G F 2 1タンパク質変異体は、1つ以上のポリマーの共有結合により修飾することができる。例えば、選択されるポリマーは、一般的に、結合するタンパク質が水性環境、例えば、生理学的環境下で沈殿しないように、水溶性である。適当なポリマーの範囲内に含まれるものは、ポリマーの混合物である。好ましくは、最終産物調製物の治療的使用のために、ポリマーは薬学的に許容される。本発明のF G F 2 1タンパク質変異体に結合した非水溶性ポリマーもまた、本発明の局面を形成する。

【0183】

典型的なポリマーはそれぞれ、あらゆる分子量であってよく、分岐状または非分岐状であってよい。ポリマーはそれぞれ、一般的に、約2 k D aから約100 k D aの平均分子量を有する（「約」なる用語は、水溶性ポリマーの調製において、いくつかの分子が規定された分子量以上および未満の重さであることを示す）。それぞれのポリマーの平均分子量は、好ましくは、約5 k D aから約50 k D a、さらに好ましくは約12 k D aから約40 k D a、より好ましくは約20 k D aから約35 k D aである。 40

【0184】

適当な水溶性ポリマーまたはその混合物は、N-連結もしくはO-連結炭水化物、糖、リン酸、ポリエチレングリコール（P E G）（モノ-（C 1 - C 10）、アルコキシ、もしくはアリーロキシポリエチレングリコールを含む、タンパク質を誘導体化するために使用されているP E Gの形態を含む）、モノメトキシポリエチレングリコール、デキストラン（例えば、約6 k Dの、例えば低分子量デキストラン）、セルロースまたは他 50

の炭水化物ベースのポリマー、ポリー（N-ビニルピロリドン）ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド／エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール（例えば、グリセロール）およびポリビニルアルコールを含むが、これらに限定されない。共有的に結合されたF G F 2 1タンパク質変異体多量体を調製するために使用することができる二機能性架橋分子もまた、本発明により包含される。ポリシアル酸に共有結合されるF G F 2 1突然変異体もまた、本発明により包含される。

【0185】

本発明のいくつかの態様において、F G F 2 1突然変異体は、限定はしないが、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリオキシエチレングリコールまたはポリプロピレングリコールを含む1つ以上の水溶性ポリマーを含むように共有的または化学的に修飾される。例えば、米国特許第4, 640, 835；4, 496, 689；4, 301, 144；4, 670, 417；4, 791, 192；および4, 179, 337号、参照。本発明のいくつかの態様において、F G F 2 1突然変異体は、限定はしないが、モノメトキシーポリエチレングリコール、デキストラン、セルロース、別の炭水化物ベースのポリマー、ポリー（N-ビニルピロリドン）-ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド／エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール（例えば、グリセロール）、ポリビニルアルコールまたはこのようなポリマーの混合物を含む1つ以上のポリマーを含む。

【0186】

本発明のいくつかの態様において、F G F 2 1突然変異体は、PEGサブユニットで共有的に修飾される。いくつかの態様において、1つ以上の水溶性ポリマーは、F G F 2 1突然変異体の1つ以上の特定の位置（例えば、N-末端）で結合される。いくつかの態様において、1つ以上の水溶性ポリマーは、F G F 2 1突然変異体の1つ以上の側鎖にランダム的に結合される。いくつかの態様において、PEGは、F G F 2 1突然変異体の治療的能力を改善するために使用される。特定のこのような方法は、例えば、in 米国特許第6, 133, 426号に記載されており、これを、あらゆる目的のために本明細書に引用により包含させる。

【0187】

ポリマーがPEGである本発明の態様において、PEG基はあらゆる適当な分子量であってよく、直線状または分岐状であってよい。PEG基の平均分子量は、好ましくは、約2 kDaから約100 kDa、さらに好ましくは約5 kDaから約50 kDa、例えば、10、20、30、40または50 kDaの範囲である。PEG基は、一般的に、PEG部分上の反応基（例えば、アルデヒド、アミノ、チオールまたはエステル基）からF G F 2 1突然変異体上の反応基（例えば、アルデヒド、アミノまたはエステル基）へ、アシル化または還元的アルキル化を介して、F G F 2 1突然変異体に結合される。

【0188】

「Y-形」PEG誘導体としても知られている分岐状PEG誘導体は、中核に結合される2つの直線状メトキシPEG鎖を含む。これらの「Y形」PEG誘導体の立体的バルキー(bulky)構造は、修飾分子の一点結合を容易にする。一例として、3つの種類の「Y形」PEG誘導体は、Y-NHS-40K（アミンペグ化のために有用）；Y-MAL-40K（チオールペグ化のために有用）；およびY-ALD-40K（例えば、Y-AALD-40KおよびY-PALD-40K）（N-末端ペグ化のために有用）である。アミンペグ化のために、「Y形」NHSエステルは、生物学的活性分子におけるリジンまたはN-末端アミンのアミノ基と反応し、安定なアミド結合を生産する。該NHSエステルは、pH 7-8で標的分子と結合する。チオールペグ化のために、「Y形」マレイミドは、生物学的活性分子におけるチオール基と反応し、安定な3-チオスクシンイミジルエーテル結合を生産する。該マレイミドは、他の官能基の存在下でpH 5.0-6.5で標的分子と結合する。N-末端ペグ化のために、「Y形」アルデヒドは、好ましくは、生物学的活性分子におけるN-末端アミンと反応し、還元試薬、例えば、シアノ水素化ホウ素ナト

リウムが存在下で安定なアミン結合を生産する。該アルデヒドは、pH 5-8で標的分子のN-末端アミンと結合する。分岐状ペグ化を再形成するための試薬は、例えば、JenKem Technologyを介して利用できる。

【0189】

本発明のFGF21突然変異体を含むポリペプチドのペグ化は、当分野で知られているペグ化反応のいずれかを使用して特異的に行うことができる。このような反応は、例えば、以下の文献：Francisら 1992, Focus on Growth Factors 3: 4-10；欧州特許第0 1 5 4 3 1 6および0 4 0 1 3 8 4号；および米国特許第4, 1 7 9, 3 3 7号において記載されている。例えば、ペグ化は、本明細書に記載されている反応性ポリエチレングリコール分子（または類似反応性水溶性ポリマー）とのアシル化反応またはアルキル化反応を介して行うことができる。アシル化反応のために、選択されるポリマーは、単一の反応性エステル基を有するべきである。還元的アルキル化のために、選択されるポリマーは、単一の反応性アルデヒド基を有するべきである。反応性アルデヒドは、例えば、水安定でありポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドまたはモノC1-C10アルコキシまたはそのアリールオキシ誘導体（例えば、米国特許第5, 2 5 2, 7 1 4号参照）である。

【0190】

本発明のいくつかの態様において、ポリペプチドへのPEG基の結合のために有用な戦略は、溶液中の抱合体結合の形成を介して、それぞれが他方に対して相互に反応性の特別な機能性を有する、ペプチドおよびPEG部分を結合することを含む。ペプチドは、慣用の固相合成で容易に調製することができる。ペプチドは、特定の部位で適当な官能基で「前活性化」される。前駆体は、PEG部分での反応の前に、精製および完全に特性化される。PEGとペプチドのライゲーションは、通常、水相で行い、逆相分析HPLCにより容易にモニタリングすることができる。PEG化ペプチドは、分取HPLCにより容易に精製し、分析HPLC、アミノ酸分析およびレーザー脱離質量分析により特徴付けることができる。

【0191】

多糖類ポリマーは、タンパク質修飾のために使用することができる別の型の水溶性ポリマーである。したがって、多糖類ポリマーに融合された本発明のFGF21突然変異体は、本発明の態様を形成する。デキストランは、アルファ1-6結合により主に連結されるグルコースの個々のサブユニットからなる多糖類ポリマーである。デキストランそれ自体は、広い分子量範囲において利用でき、約1 kDから約70 kDの分子量において容易に利用できる。デキストランは、ビヒクルそれ自体または別のビヒクル（例えば、Fc）と組み合わせての使用のための適当な水溶性ポリマーである。例えば、国際公開WO 9 6 / 1 1 9 5 3参照。治療または診断免疫グロブリンへ結合されるデキストランの使用が報告されている。例えば、欧州特許公報第0 3 1 5 4 5 6号参照、これを出典明示により本明細書に包含させる。本発明はまた、約1 kDから約20 kDのデキストランの使用を含む。

【0192】

一般的に、化学修飾は、タンパク質を活性化ポリマー分子と反応させるために使用される任意の適当な条件下で行うことができる。化学的に修飾されたポリペプチドを調製するための方法は、一般的に、（a）条件下でポリペプチドを活性化ポリマー分子（例えば、ポリマー分子の反応性エステルまたはアルデヒド誘導体）と反応させ、それによって、FGF21タンパク質変異体が1つ以上のポリマー分子と結合するようになること、および（b）反応産物を得ることの工程を含む。最適な反応条件は、既知のパラメーターおよび所望の結果に基づいて決定される。例えば、タンパク質に対するポリマー分子の比率が高くなれば、結合されるポリマー分子のパーセントが高くなる。本発明の1つの態様において、化学的に修飾されたFGF21突然変異体は、アミノ末端に単一のポリマー分子部分を有し得る（例えば、米国特許第5, 2 3 4, 7 8 4号参照）。

【0193】

本発明の別の態様において、F G F 2 1 タンパク質変異体は、ビオチンと化学的に結合させることができる。次に、ビオチン／F G F 2 1 タンパク質変異体はアビジンに結合し、四価アビジン／ビオチン／F G F 2 1 タンパク質変異体をもたらすことができる。F G F 2 1 タンパク質変異体はまた、ジニトロフェノール（D N P）またはトリニトロフェノール（T N P）と共有的に結合させ、得られる抱合体を抗-D N Pまたは抗-T N P-I g Mで沈殿させ、1 0 の価数で十量体抱合体を形成させることができる。

【0 1 9 4】

一般的に、本発明の化学的に修飾されたF G F 2 1 突然変異体の投与により緩和または調節することができる条件は、F G F 2 1 タンパク質変異体に対して本明細書に記載されているものを含む。しかしながら、本明細書に記載されている化学的に修飾されたF G F 2 1 突然変異体は、非修飾F G F 2 1 突然変異体と比較して、さらなる活性、生物学的活性の増強または減少、または他の特性、例えば、半減期の延長または短縮を有し得る。

【0 1 9 5】

F G F 2 1 突然変異体の治療組成物およびその投与

F G F 2 1 突然変異体を含む治療組成物は、本発明の範囲内であり、具体的には、増強された特性を示すいくつかの突然変異体F G F 2 1 配列の同定を踏まえて考慮される。このようなF G F 2 1 突然変異体医薬組成物は、投与経路との適合性に対して選択される薬学的または生理学的に許容される製剤との混合物中に治療有効量のF G F 2 1 タンパク質変異体を含むことができる。

【0 1 9 6】

許容される製剤は、好ましくは、使用される用量および濃度でレシピエントに対して非毒性である。

【0 1 9 7】

医薬組成物は、例えば、組成物のp H、浸透性、粘性、明瞭さ、色、等張性、臭気、滅菌性、安定性、分解もしくは放出速度、吸着性または浸透を修飾、維持または保存するための製剤物質を含むことができる。適当な製剤物質は、限定はしないが、アミノ酸（例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンまたはリジン）、抗菌剤、抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸、硫酸ナトリウムまたは亜硫酸水素ナトリウム）、バッファ（例えば、ホウ酸、重炭酸、T r i s-H C l、クエン酸、リン酸または他の有機酸）、増量剤（例えば、マンニトールまたはグリシン）、キレート化剤（例えば、エチレンジアミン四酢酸（E D T A））、錯化剤（例えば、カフェイン、ポリビニルピロリドン、ベータシクロデキストリンまたはヒドロキシプロピルベータシクロデキストリン）、増量剤、単糖類、二糖類および他の炭水化物（例えば、グルコース、マンノースまたはデキストリン）、タンパク質（例えば、血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリン）、着色剤、香味剤および賦形剤、乳化剤、親水性ポリマー（例えば、ポリビニルピロリドン）、低分子量ポリペプチド、塩形成対イオン（例えば、ナトリウム）、防腐剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、安息香酸、サリチル酸、チメロサル、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロルヘキシジン、ソルビン酸または過酸化水素）、溶媒（例えば、グリセリン、プロピレングリコールまたはポリエチレングリコール）、糖アルコール（例えば、マンニトールまたはソルビトール）、懸濁剤、界面活性剤または湿潤剤（例えば、プルロニック；P E G；ソルビタンエステル；ポリソルベート、例えば、ポリソルベート2 0またはポリソルベート8 0；トリトン；トロメタミン；レシチン；コレステロールまたはチロキサパール（チロキサパール（tyloxapal）））、安定性増強剤（例えば、スクロースまたはソルビトール）、緊張力増強剤（例えば、アルキル金属ハロゲン化物；好ましくは塩化ナトリウムまたはカリウム；またはマンニトールソルビトール）、送達ビヒクル、希釈剤、賦形剤および／または医薬アジュバント（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences (18th Ed., A. R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company 1990)、およびこの後版、参照、あらゆる目的のために出典明示により本明細書に包含させる）を含む。

【0 1 9 8】

最適な医薬組成物は、例えば、意図される投与経路、送達形式および所望の用量に依存して、当業者により決定される（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences、上記、参照）。このような組成物は、F G F 2 1 タンパク質変異体の物理的状态、安定性、インビボ放出速度、およびインビボクリアランス速度に影響し得る。

【0199】

医薬組成物における主なビヒクルまたは担体は、実際、水性または非水性のいずれかであり得る。例えば、注射のために適当なビヒクルまたは担体は、恐らく非経口投与のための組成物によく見られる他の物質を補った、水、生理食塩水溶液または人工脳脊髄液であり得る。中性緩衝食塩水または血清アルブミンと混合した塩水は、さらなる典型的なビヒクルである。他の典型的な医薬組成物は、ソルビトールまたは適当な代替物をさらに含むことができる、約pH 7.0-8.5のTrisバッファーまたは約pH 4.0-5.5の酢酸バッファーを含む。本発明の1つの態様において、F G F 2 1 タンパク質変異体組成物は、凍結乾燥されたケーキまたは水溶液の形態にて、所望の純度の程度を有する選択される組成物を任意の製剤と混合することにより（Remington's Pharmaceutical Sciences、上記）、保存用に調製することができる。さらに、F G F 2 1 タンパク質変異体産物は、適当な賦形剤、例えば、スクロースを使用して凍結乾燥物として製剤化することができる。

【0200】

F G F 2 1 タンパク質変異体医薬組成物は、非経口投与のために選択することができる。あるいは、組成物は、消化管を介する、例えば、経口的な、吸入または送達のために選択することができる。このような薬学的に許容される組成物の調製は、当分野の技術の範囲内である。

【0201】

製剤成分は、投与部位に許容される濃度で存在する。例えば、バッファーは、生理学的pHまたはわずかにより低いpHで、一般的に約5から約8のpH範囲内で、組成物を維持するために使用される。

【0202】

非経口投与が考慮されるとき、本発明における使用のための治療組成物は、薬学的に許容されるビヒクル中に所望のF G F 2 1 タンパク質変異体を含むピロゲン無し非経腸的に許容される水溶液の形態においてであり得る。非経口注射のために特に適当なビヒクルは、F G F 2 1 タンパク質変異体が適当に保存される滅菌等張液として製剤化される滅菌蒸留水である。さらに別の調製物は、デポー注射を介して送達される産物の制御または持続放出を提供する、薬剤を有する所望の分子の製剤、例えば、注射可能なミクロスフェア、生体内分解性粒子、ポリマー化合物（例えば、ポリ乳酸またはポリグリコール酸）、ビーズまたはリポソームを含むことができる。ヒアルロン酸もまた使用することができ、これは、循環の持続期間を増進する効果を有することができる。所望の分子の導入のための他の適当な手段は、移植可能な薬物送達デバイスを含む。

【0203】

1つの態様において、医薬組成物は、吸入のために製剤化することができる。例えば、F G F 2 1 タンパク質変異体は、吸入のための乾燥粉末として製剤化することができる。F G F 2 1 タンパク質変異体吸入溶液もまた、エアロゾル送達のために高圧ガスで製剤化することができる。さらに別の態様において、溶液は噴霧状にすることができる。肺投与は、化学的に修飾されたタンパク質の肺送達を記載している国際公開WO 94/20069にさらに記載されている。

【0204】

特定の製剤は経口的に投与することができることも考慮される。本発明の1つの態様において、この様式において投与されるF G F 2 1 タンパク質変異体は、固体投与形態、例えば、錠剤およびカプセルの合成において習慣的に使用される担体の有無にかかわらず製剤化することができる。例えば、カプセルは、バイオアベイラビリティを最大化し、前全身性分解を最小限にすると、胃腸管部位に製剤の活性部分を放出するように設計するこ

とができる。さらなる薬剤を、F G F 2 1 タンパク質変異体の吸収を容易にするために含むことができる。希釈剤、香味剤、低融点ワックス、植物油、滑剤、懸濁剤、錠剤崩壊剤および結合剤もまた、使用することができる。

【0205】

別の医薬組成物は、錠剤の製造のために適当である非毒性賦形剤との混合物中に有効な量の F G F 2 1 タンパク質変異体を含むことができる。錠剤を滅菌水または別の適当なビヒクルに溶解することにより、溶液は単位用量形態において調製することができる。適当な賦形剤は、不活性希釈剤、例えば、炭酸カルシウム、炭酸もしくは重炭酸ナトリウム、ラクトースまたはリン酸カルシウム；または結合剤、例えば、デンプン、ゼラチンまたはアカシア；または滑剤、例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸またはタルクを含むが、これらに限定されない。

10

【0206】

持続もしくは制御送達製剤において F G F 2 1 タンパク質変異体を含む製剤を含む、さらなる F G F 2 1 タンパク質変異体医薬組成物が、当業者に明らかである。種々の他の持続もしくは制御送達手段、例えば、リポソーム担体、生体内分解性微粒子または多孔質ビーズおよびデポー注射を製剤化するための技術もまた、当業者に知られている（例えば、医薬組成物の送達のための多孔質ポリマー性微粒子の制御放出を記載している国際公開 W O 9 3 / 1 5 7 2 2、およびミクロスフェア／微粒子調製および使用を記載している Wisc hke & Schwendeman, 2008, Int. J Pharm. 364: 298-327、および Freiberg & Zhu, 2004, Int. J Pharm. 282: 1-18、参照）。

20

【0207】

持続放出調製物のさらなる例は、造形品の形態における半透性ポリマーマトリックス、例えば、フィルムまたはマイクロカプセルを含む。持続放出マトリックスは、ポリエステル、ヒドロゲル、ポリラクチド（米国特許第 3, 7 7 3, 9 1 9 号および欧州特許第 0 0 5 8 4 8 1 号）、L-グルタミン酸およびガンマエチル-L-グルタミン酸のコポリマー（Sidman ら 1983, Biopolymers 22: 547-56）、ポリ（2-メタクリル酸ヒドロキシエチル）（Langer ら 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15: 167-277 および Langer, 1982, Chem. Tech. 12: 98-105）、エチレン酢酸ビニル（Langer ら、上記）またはポリ-D-3-ヒドロキシ酪酸（欧州特許第 0 1 3 3 9 8 8 号）を含むことができる。持続放出組成物はまた、当分野で知られているいくつかの方法のいずれかにより調製することができるリポソームを含むことができる。例えば、Epstein ら 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82: 3688-92；および欧州特許第 0 0 3 6 6 7 6、0 0 8 8 0 4 6 および 0 1 4 3 9 4 9 号、参照。

30

【0208】

インビボ投与のために使用される F G F 2 1 タンパク質変異体医薬組成物は、一般的に、滅菌であるべきである。これは、滅菌濾過膜を介する濾過により成し遂げることができる。組成物が凍結乾燥されるとき、この方法を使用する滅菌は、凍結乾燥および再構成の前、または後のいずれかに行うことができる。非経口投与のための組成物は、凍結乾燥形態または溶液において保管することができる。加えて、非経口組成物は、一般的に、皮下注射針により貫通できるストッパーを有する滅菌点検口を有する容器、例えば、静脈内溶液バッグまたはバイアルに分類される。

40

【0209】

医薬組成物が製剤化されると、溶液、懸濁液、ゲル、エマルジョン、固体、または無水もしくは凍結乾燥粉末として滅菌バイアル中で保管することができる。このような製剤は、すぐに使える形態、または、投与前に再構成する必要な形態（例えば、凍結乾燥された形態）のいずれかで保管することができる。

【0210】

特定の態様において、本発明は、単回投与単位を生産するためのキットである。キットは、それぞれ、乾燥タンパク質を有する第 1 の容器および水性製剤を有する第 2 の容器の両方を含む。単一および多チャンバー型の充填済みシリンジ（例えば、液体シリンジおよ

50

び凍結乾燥シリンジ(lyosyringe))を含むキットも本発明の範囲内に含まれる。

【0211】

治療に使用されるF G F 2 1タンパク質変異体医薬組成物の有効量は、例えば、治療状況および目的に依存する。当業者は、したがって、処置に対して適当な用量レベルが、一部分において、送達される分子、F G F 2 1タンパク質変異体を使用される適応症、投与経路、ならびに患者のサイズ(体重、体表面または臓器サイズ)および状態(年齢および全般的な健康状態)に依存することを理解している。したがって、臨床医は、最適な治療効果を得るために用量を滴定し、投与経路を修飾することができる。典型的な用量は、上記因子に依存して、約 $0.1\mu\text{g}/\text{kg}$ から約 $100\text{mg}/\text{kg}$ またはそれ以上の範囲であり得る。他の態様において、用量は、 $0.1\mu\text{g}/\text{kg}$ から約 $100\text{mg}/\text{kg}$ ；または $1\mu\text{g}/\text{kg}$ から約 $100\text{mg}/\text{kg}$ ；または $5\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $10\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $15\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $20\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $25\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $30\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $35\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $40\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $45\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $50\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $55\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $60\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $65\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $70\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $75\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $100\text{mg}/\text{kg}$ の範囲であり得る。さらなる他の態様において、用量は、 $50\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $100\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $150\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $200\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $250\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $300\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $350\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $400\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $450\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $500\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $550\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $600\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $650\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $700\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $750\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $800\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $850\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $900\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $950\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $1000\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $2000\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $3000\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $4000\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $5000\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $6000\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $7000\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $8000\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $9000\mu\text{g}/\text{kg}$ or $10\text{mg}/\text{kg}$ であり得る。

【0212】

投与の頻度は、使用される製剤におけるF G F 2 1タンパク質変異体の薬物動態パラメーターに依存する。一般的に、臨床医は、用量が所望の効果をなし遂げるように達するまで、組成物を投与する。したがって、組成物は、単回投与として、時間とともに2またはそれ以上の投与として(同じ量の所望の分子を含んでも、含まなくてもよい)として、または、移植デバイスまたはカテーテルを介する連続的な注入として、投与することができる。適当な用量のさらなる改善は、当業者により日常的に行われており、当業者により日常的に行われる活動の範囲内である。適当な用量は、適当な用量-応答データの使用を介して確認することができる。

【0213】

医薬組成物の投与経路は、既知の方法にしたがって、例えば、経口的；静脈内、腹腔内、脳内(実質内)、脳室内、筋肉内、眼内、動脈内、門脈内または病巣内経路による注射を介して；持続放出系(注射もされ得る)により；または、移植デバイスによりである。所望により、組成物は、ボーラス注射により、または連続的に注入により、または移植デバイスにより投与することができる。

【0214】

あるいは、またはさらに、組成物は、所望の分子が吸収または封入されている膜、スポンジまたは他の適当な物質の移植を介して局所的に投与することができる。移植デバイスを使用するとき、デバイスは、任意の適当な組織または臓器に埋め込むことができ、所望の分子の送達は、拡散、定時放出ボーラスまたは連続的投与を介する送達であり得る。

【0215】

F G F 2 1ポリペプチド突然変異体の治療的使用

F G F 2 1タンパク質変異体は、限定はしないが代謝障害を含む、多くの疾患、障害または状態を処置、診断、改善または予防するために使用することができる。1つの態様において、処置される代謝障害は、糖尿病、例えば、2型糖尿病である。別の態様において、代謝障害は肥満である。他の態様は、代謝状態または障害、例えば、1型糖尿病、膵炎

、脂質異常症、非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）、インスリン耐性、高インスリン血症、耐糖能障害、高血糖、メタボリック・シンドローム、高血圧、心臓血管疾患、アテローム性動脈硬化症、末梢動脈疾患、卒中、心不全、冠動脈性心臓疾患、腎臓疾患、糖尿病性合併症、ニューロパシー、胃不全まひおよび他の代謝障害を含む。

【0216】

適用において、障害または状態、例えば、1型または2型糖尿病または肥満は、治療有効用量において本明細書に記載されているFGF21タンパク質変異体を必要とする患者に投与することにより処置することができる。投与は、本明細書に記載されているとおり、例えば、IV注射、腹腔内注射、筋肉内注射または錠剤または液体製剤の形態における経口的に行うことができる。多くの場合、所望の用量は、本明細書に記載されているとおり、臨床医により決定することができ、FGF21突然変異体ポリペプチドの治療有効用量を示すことができる。治療有効用量のFGF21突然変異体ポリペプチドが、とりわけ、投与スケジュール、投与される抗原の投与単位、核酸分子またはポリペプチドが他の治療剤と組み合わせて投与されるか否か、レシビエントの免疫状態および健康状態に依存することは当業者に明白である。本明細書において使用される「治療有効用量」なる用語は、処置される疾患または障害の症状の緩和を含む、研究者、医師または他の臨床医により探求される組織系、動物またはヒトにおける生物学的または医学応答を引き起こすFGF21突然変異体ポリペプチドの量を意味する。

【0217】

医薬組成物

本発明はまた、本明細書に記載されているFGF21変異体または突然変異体の1つ以上および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物を提供する。いくつかの態様において、医薬組成物は、液体溶液または懸濁液としてのいずれかで注射用として製造され；注射前に、液体ビヒクルでの溶液または懸濁液に対して適当な固体形態もまた製造することができる。リポソームは、薬学的に許容される担体の定義に含まれる。薬学的に許容される塩、例えば、鈣酸塩、例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩、硫酸塩など；および有機酸の塩、例えば、酢酸塩、プロピオン酸塩、マロン酸塩、安息香酸エステル塩などもまた、医薬組成物に存在することができる。薬学的に許容される賦形剤の徹底的な議論は、Remington: The Science and Practice of Pharmacy (1995) Alfonso Gennaro, Lippincott, Williams, & Wilkinsで利用できる。

【0218】

融合タンパク質およびFGF21由来ペプチド化合物

別の態様において、本発明のFGF21変異体は、FGF21変異体アミノ酸配列に由来する融合タンパク質またはペプチド化合物に作り替えることができる。このような融合タンパク質およびペプチド化合物は、当分野で知られている標準技術を使用して作製することができる。例えば、ペプチド化合物は、標準ペプチド合成技術を使用する化学合成により作製し、次に、ペプチドを細胞（例えば、リポソームなど）に導入するための当分野で知られている種々の手段により細胞に導入することができる。

【0219】

本発明の融合タンパク質またはペプチド化合物のインビボ半減期は、ペプチド修飾、例えば、FGF21変異体へN-連結グリコシル化部位を付加させること、または例えば、リジン-モノベグ化またはシステイン-モノベグ化を介する、ポリ（エチレングリコール）（PEG；ベグ化）にFGF21変異体を結合することにより改善することができる。このような技術は、治療タンパク質薬物の半減期を延長することにおいて有益であることが証明されている。本発明のFGF21変異体のベグ化が同様の医薬的利点をもたらし得ることが予期される。

【0220】

加えて、ベグ化は、本発明のポリペプチドの任意の部分における非天然アミノ酸の導入によりなし遂げることができる。特定の非天然アミノ酸は、Deitersら J Am Chem Soc 125:11782-11783, 2003; Wang and Schultz, Science 301:964-967, 2003; Wangら Science

292:498-500, 2001; Zhangら Science 303:371-373, 2004または米国特許第7, 083, 970号に記載されている技術により導入することができる。簡潔には、これらの発現系いくつかは、ナンセンス・コドン、例えば、アンバーTAGを本発明のポリペプチドをコードするオープンリーディングフレームに導入するための部位特異的突然変異誘発を含む。次に、このような発現ベクターは、導入されるナンセンス・コドンに特異的なtRNAを利用することができる宿主に導入され、選択された非天然アミノ酸が負荷される(charged with)。本発明のポリペプチドへ部分を結合する目的のために有益である特定の非天然アミノ酸は、アセチレンおよびアジド側鎖を有するものを含む。次に、これらの新規アミノ酸を含むFGF21変異体は、タンパク質中のこれらの選択される部位でペグ化することができる。

10

【0221】

実施例

実施例1：FGF21変異体タンパク質の調製およびペグ化

FGF21変異体に対する発現構築物：FGF21変異体を、Achmullerら(2007)(Nature Methods 4:1037-1043)に記載されている修飾された大腸菌発現ベクターpET30aにクローニングし、FGF21のN-末端(aa33-209)にヘキサ-ヒスチジンタグ、次に、N^{Pro}-EDDIEタグのインフレーム融合物を産生した。

【0222】

FGF21変異体の発現および精製：pET30a-His-N^{Pro}-EDDIE-FGF21発現プラスミドを、大腸菌BL21 Star(DE3)コンピテント細胞(Invitrogen)に形質転換した。新たに形質転換された細胞の単一コロニーの一晩培養を、37℃で50μg/mLのカナマイシンを含む50mLのTerrific Broth(TB)で行った。前培養物をカナマイシンを有する1LのTB培地に移し、250rpmで浸透しながら37℃でバッフル付フラスコ中で培養した。6時間培養後、1mMの最終濃度でのIPTGの添加によりFGF21の発現を誘導し、培養物を37℃で一晩培養した。次に、細胞を回収し、50mLの氷冷溶解バッファー；50mMのTris-HCl、pH8、150mMのNaCl、1mMのEDTAに再懸濁し、次に、microfluidizerTMを使用して溶解した。

20

【0223】

封入体(IB)を、4℃で1時間30,000×gで遠心分離により沈殿させた。IBを50mMのTris-HCl、pH8、150mMのNaClで洗浄し、次に、30mLの溶解バッファー；10mMのTris-HCl、pH8、100mMのNaH₂PO₄、6MのGnHClに溶解させた。溶解されたIBは、25℃で1時間30,000×gで遠心分離により浄化した。IB溶液を、溶解バッファーで平衡化されたNi-NTA高性能樹脂(GE Healthcare)の5mLのカラム上に負荷した。樹脂に結合したタンパク質を、pH4.5に低下させることにより溶離した。溶出液を、pHを調整し、ジチオスレイトール(DTT)を20mMの濃度で添加することに調整した。調整された溶出液を、1Lのリフォールディングバッファー；50mMのTris-HCl、pH8、0.5Mのアルギニン、20mMのDTTにゆっくり希釈し、次に、4℃で2日間インキュベーションした。希釈されたサンプルを濃縮し、限外ろ過方法を使用して20mMのTris-HCl、pH9にバッファー交換した。濃縮したサンプルを、20mMのTris-HCl(pH9)で平衡化されたQセファローズ高速流樹脂(GE Healthcare)の10mLカラムに負荷した。

30

40

【0224】

平衡バッファーで樹脂を洗浄後、樹脂に結合したタンパク質を、20mMのTris-HCl、pH9、500mMのNaClで溶離した。リフォールディングされたFGF21タンパク質から開裂されたHis-N^{Pro}融合フラグメントおよびあらゆる開裂されていない融合タンパク質を除去するために、溶出液を20mMのTris、pH8.0、50mMのイミダゾールで平衡化されたNi-NTA高性能樹脂の5mLカラムに負荷し、FGF21を含むフロースルー画分を回収した。エンドトキシンレベルを減少させるた

50

めに、FGF21画分を、10mMのTris、pH8、50mMのイミダゾール、500mMのNaCl、1mMのCaCl₂で平衡化されたEndoTrap HD樹脂(Hyglos)で処理した。低エンドトキシンサンプルをPBSに対して透析し、次に、0.22μmフィルターで滅菌した。精製されたFGF21タンパク質を液体窒素でスナップ凍結させ、-80℃で貯蔵した。タンパク質濃度を、FGF21に対するモル吸光係数として9362 M⁻¹ cm⁻¹を使用して280nmでの吸光度により決定した。タンパク質純度および完全性を、HPLC、SDS-PAGEおよび液体クロマトグラフィー質量分析により決定した。

【0225】

FGF21変異体のシステインペグ化：hsFGF21(R154C)変異体は、操作されたシステインを介して二量体化する傾向を有する；したがって、ペグ化前に、タンパク質溶液(一般的に、Trisバッファー中5mg/ml)を、氷上で30分間、5mMのメルカプトエチルアミンで穏やかに還元し、20mMのTris、pH7で即座に脱塩した。次に、新たに還元されたタンパク質(一般的に3mg/ml)を、氷上で3時間、1.5当量の40kDaの分岐状マレイミド-PEG試薬(SunbrightシリーズのNOFカタログ#GL2-400MA)で即座にペグ化した。最後に、ペグ化タンパク質を、約25%の全収率で陰イオン交換クロマトグラフィー(MonoQ)により精製した。

【0226】

FGF21変異体のN-末端ペグ化：FGF21変異体および40kDaの分岐状PEG試薬(SunbrightシリーズのNOFカタログ#GL2-400AL3；FGF21に対して3:1モル比)の最終濃度はそれぞれ、3-4mg/mLおよび9-12mg/mLであった。バッファーは、50mMの酢酸ナトリウム、pH6.0、25mMの塩化ナトリウムおよび40mMのシアノ水素化ホウ素ナトリウムであった。反応混合物を4℃で44時間、穏やかにタンブル(tumbled)し、反応変換物をいくつかの時点にわたってモニタリングした。20時間でおおよそ変換は50%であり、44時間で70%であった。

【0227】

実施例2：ヒトFGF21ジスルフィド変異体の作製

クローニングライブラリー：ベクターpGAPZアルファA(Invitrogen, Carlsbad, CA)を、ベクターのユニークなBamHI部位においてβ-ラクタマーゼ発現カセットを付加することにより修飾した。β-ラクタマーゼ発現カセットは、Hribarら(2008) BioTechniques 44:477-84により記載されているとおりに作製した。アルファ接合因子分泌シグナル配列、6個のヒスチジンアフィニティー精製tag、およびタバコエッチ病ウイルス(TEV)プロテアーゼ認識配列を含むN-末端配列を有するインフレーションにおけるグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAP)プロモーターの後に、アミノ酸33から209をコードするヒトFGF21 cDNAを、修飾pGAPZアルファAベクターにクローンした。hFGF21構築物のライブラリーを、野生型配列においてCys103およびCys121ならびにシステインに突然変異された2つの野生型アミノ酸を有するそれぞれの構築物で作製した。ライブラリーは、野生型アミノ酸の代わりにシステインをコードするプライマーでhFGF21アミノ酸33-209コード領域のPCRフラグメントを作製することにより作った。PCRフラグメントを、互いに同一の配列の16個の塩基対を共有することができるよう、または、直線状修飾pGAPZアルファAベクターを、In-Fusion酵素(Takara Bio Co USA)を使用して結合することができるよう設計した。それぞれの構築物を配列確認し、酵母株作製のために使用した。

【0228】

酵母株の作製：メタノール資化酵母酵母株SMD1168H(Invitrogen)を、Yaoら(2009) J Biotechnol. Jan 15;139(2):131-6により記載されているYPS1遺伝子を破壊することにより修飾した。修飾株(SMD1168HデルタYPS1)は、300μg/

10

20

30

40

50

m Lのプラスミドサイジンに対する耐性を有した。約5-10 μ gの配列確認されたプラスミドDNAをA v r I Iで消化し、p G A P Z α -Aに対するI n v i t r o g e nのマニュアルにしたがって調製されたS M D 1 1 6 8 HデルタY P S 1細胞と混合した。細胞を、0.2 cmキューベット (Bio-Rad, Hercules, CA) において直線状プラスミドと混合した。細胞および直線状プラスミドを有するキューベットを、氷上で5分間インキュベートした。キューベットに、1.5 kVに合わせたボルト数、25 μ Fに合わせたコンデンサー、および400 Ohmに合わせたパルスコントローラーを備えたG e n e P u l s e r - I I (Bio-Rad) を使用して、パルスを発した。

【0229】

パルス後即座に、1 mLの氷冷1 Mのソルビトールをキューベットに加え、その内容物を滅菌15 mLチューブに移した。チューブを、2時間震盪することなく、30°Cでインキュベートした。電気穿孔された細胞を、100 μ g/mLのゼオシン(zeocin) (zeo) を含むY P D S (1%の酵母抽出物、2%のペプトン、2%のデキストロース、1 Mのソルビトールおよび2%の寒天) プレート上に広げた。プレートを30°Cで3-10日間インキュベートし、コロニー形成した。それぞれの構築物の24コロニーを取り出し、96-ウェル ディープ-ウェルプレートにおいて100 μ g/mLのゼオシンを含む1 mLのY P D増殖培地に植菌するために使用した。プレートを、900 RPMで震盪器 (Sheldon Manufacturing, Cornelius, OR) で30°Cで一晩インキュベートした。それぞれの培養物の10 μ Lのアリコートを取り出し、96-ウェル ディープ-ウェルプレートにおいて990 μ LのP B S (p H 7. 4) に希釈した。

【0230】

β -ラクタマーゼ活性の比色定量のために、50 μ Lの1:100希釈培養物を96-ウェル マイクロタイタープレートに移した。ニトロセフィン (1 mg; EMD Chemicals, Gibbstown, NJ) を100 μ LのD M S Oに溶解させ、1.9 mLのP B Sに希釈し、1 mMの希釈標準溶液を得た。ニトロセフィン希釈標準溶液 (50 uL) を、500 uMの最終濃度のためにそれぞれのウェルに加えた。ニトロセフィンの添加後、プレートを暗闇下で室温 (R T) で5分間インキュベートした。492 nmの吸光度をS p e c t r a m a x P l u s マイクロタイタープレートリーダー (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) にて測定し、 β -ラクタマーゼ活性を決定した。それぞれの構築物に対して最も高い β -ラクタマーゼ活性を有する2つの株のグリセロール貯蔵物を作り、-80°Cで貯蔵した。

【0231】

h F G F 2 1ジスルフィド変異体の小規模発現および精製：それぞれの構築物に対して最も高い β -ラクタマーゼ比活性を有する2つの株からのh F G F 2 1ジスルフィド変異体グリセロール貯蔵物を、96-ウェル ディープ-ウェルプレートにおいて1 mLのB u f f e r e d C o m p l e x G l u c o s e M e d i u m (1%の酵母抽出物、2%のペプトン、100 mMのリン酸カリウム、p H 6. 0、1.34%のY N B、4 $\times$ 10-5%のビオチン、2%のグルコースおよび2%のカザミノ酸) に植菌するために使用した。細胞増殖が飽和に達するまで、培養物を約48時間、900 RPM (Sheldon Manufacturing, Cornelius, OR) で震盪しながら30°Cで培養した。飽和培養物のアリコート (25 uL) を、24-ウェル ディープ-ウェルプレートにおいて5 mLのB u f f e r e d C o m p l e x G l u c o s e M e d i u mに植菌するために使用した。プレートを、350 RPMで震盪器 (Sheldon Manufacturing, Cornelius, OR) で30°Cで一晩インキュベートした。約24時間後、プレートを15分間2500 $\times$ gで遠心した。培地をベレット化細胞から吸引し、10 kDカットオフ膜を備えたA m i c o n u l t r a - 1 5 遠心フィルターユニット (Millipore, Billerica, MA) に加えた。10 mMのイミダゾールおよび1 X H a l t E D T A無しプロテアーゼインヒビターカクテルを含む10 mLのP B S、p H 7. 4 (Thermo, Rockford, IL) を濃縮器において培地に加え、全容量を15 mLにした。

【0232】

フィルターユニットを、30分間、Sorvall Legend RT プラス 遠心機 (Thermo) において4000RMPで遠心した。濃縮器フロースルー(flow through)を捨て、約13mLのPBS、pH7.4を遠心された培地に加えた。フィルターユニットを、再び4000RMPで30分間遠心した。濃縮バッファー交換されたサンプルを、ニッケル-ニトリロ三酢酸 (Ni-NTA) スピнкаラム (Qiagen, Valencia, CA) 上に負荷した。カラムを、5分間、Sorvall Legend Micro 21R 遠心機 (Thermo) において270×g (1600rpm) で遠心し、次に10mMのイミダゾールを含む600uLのPBS、pH7.4で2回洗浄した。6HISタグ化hFGF21変異体を、300mMのイミダゾールを含む200uLのPBS、pH7.4で溶離した。

10

【0233】

hFGF21ジスルフィド変異体の中規模発現および精製：2点pERK細胞性アッセイ (10および100nM) において試験したとき、最も高い活性でhFGF21ジスルフィド変異体を発現した株からのhFGF21ジスルフィド変異体グリセロール貯蔵物を、50mLの滅菌チューブにおいて100μg/mLのゼオシンを含む5mLのBuffered Complex Glucose Medium (1%の酵母抽出物、2%のペプトン、100mMのリン酸カリウム、pH6.0、1.34%のYNB、4×10⁻⁵%のビオチン、2%のグルコースおよび2%のカザミノ酸) に植菌するために使用した。細胞増殖が飽和に達するまで、培養物を約48時間、250RPMで震盪しながら30℃で培養した。飽和培養物のアリコート (50uL) を、250mLのUltra Yield フラスコ (Thomson Instrument Co, Oceanside, CA) において100mLのBuffered Complex Glucose Mediumに植菌するために使用した。フラスコを300RPMで震盪器で30℃で一晩インキュベートした。約24時間後、細胞を15分間2500×gで遠心した。培地 (80mL) をペレット化細胞から吸引し、10kDカットオフ膜を備えたCentricon-70 遠心フィルターユニット (Millipore, Billerica, MA) に加えた。フィルターユニットを、30分間、Sorvall Legend RT プラス 遠心機 (Thermo) において4000RMPで遠心した。残っている浄化された培地 (約20mL) をCentricon-70 遠心フィルターに加え、フィルターにおける全容量は、10mMのイミダゾールおよび1X EDTA無し Halt プロテアーゼインヒビターカクテルを含むPBS、pH7.4を加えることにより80mLに増加した。フィルターユニットを、再び、4000rpmで30分間遠心した。フィルターユニットにおける濃縮培地の容量は、10mMを含むPBS、pH7.4を加えることにより80mLに増加した。フィルターユニットを、再び、4000rpmで30分間遠心した。

20

30

【0234】

濃縮バッファー交換されたサンプルを、10mMのイミダゾールを含むPBS、pH7.4で前平衡化された1mLのHis-Gravitrappカラム (GE Lifesciences, Piscataway, NJ) 上に負荷した。カラムを20mMのイミダゾールを含む10mLのPBS、pH7.4で洗浄した。6HISタグ化hFGF21変異体を、300mMのイミダゾールを含む2.5mLのPBS、pH7.4で溶離した。2.5mLの溶離バッファーを、10mMのイミダゾールを含む25mLのPBS、pH7.4で前平衡化された10mLのPD-10脱塩カラムに適用した。6HISタグ化ジスルフィド変異体を、10mMのイミダゾールを含む3.5mLのPBS、pH7.4で脱塩カラムから溶離した。

40

【0235】

6HISタグを、ProTEVプロテアーゼ (250ユニット; Promega, Madison, WI) を加え、サンプルを室温で2時間および4℃で一晩インキュベートすることにより、脱塩アフィニティー精製hFGF21ジスルフィド変異体から除去舌。タグ開裂hFGF21ジスルフィド変異体を、10mMのイミダゾールを含むPBS、pH7.4で前平衡化された1mLのHis-Gravitrappカラム上に負荷した。タグ開裂hFGF21ジスルフィド変異体を含むフロースルーを回収した。His-Gravitrappカラ

50

ムを、10 mMのイミダゾールを含むPBS、pH 7.4、5 mLで洗浄した。カラムフロースルーを回収し、タグ開裂反応からのフロースルーに加えた。混合フロースルーサンプル（約8.5 mL）を、10 kDaカットオフ膜を備えたAmicon ultra-15 遠心フィルターで約1 mLに濃縮した。pERK細胞性アッセイにおいてアッセイされるまで、濃縮されたhFGF21ジスルフィド変異体を-80℃で凍結した。

【0236】

実施例3：2-デオキシグルコース（2-DOG）摂取測定

最近、FGF21は、インスリンの存在および非存在下でマウス3T3-L1脂肪細胞においてグルコース摂取を刺激する、およびob/obおよびdb/dbマウスならびに8週齢ZDFラットにおいて用量依存的に食餌および空腹時血糖、トリグリセリドおよびグルカゴンレベルを減少させることを示し、したがって、糖尿病および肥満を処置するための治療としてのFGF21の使用の基礎を提供する（例えば、特許公報WO 03/011213、およびKharitonovら（2005）*Jour. of Clinical Invest.* 115:1627-1635参照）。また、FGF21は、3T3-L1脂肪細胞におけるFGFR-1およびFGFR-2のチロシンリン酸化を刺激することを観察した。

【0237】

3T3-L1繊維芽細胞は、ATCC（カタログ # CCL173）から購入した。該細胞を150 cmペトリ皿においてコンフルエンスにまで増殖させ、10%ウシ胎児血清および1%ペニシリン-ストレプトマイシンを補った高グルコース（Invitrogen # 11995065）を有するDMEMにおいて、さらに4日間維持した。次に、細胞を3日後、4 μg/mLのインスリン（Sigma カatalog # I-5500）、115 μg/mLのIBMX（Sigma カatalog # I5879）および0.0975 μg/mLのデキサメタゾン（Sigma カatalog # D1756）を補った上記培地で分化し、その後、分化培地を完全DMEMと置き換えた。1つのプレートの分化された3T3-L1脂肪細胞を、培地置換えの次の日に、4つの96-ウェルプレート上に播種した。

【0238】

次に、脂肪細胞を完全培地において、一晚FGF21-WTおよびFGF21変異体で処理した（変異体のリストに関して表2参照；30 pMから100 nMが使用される典型的な濃度範囲である）。FGF21サンプルで処理される脂肪細胞は、ウェルあたり50 μLのKRHバッファー（0.75%のNaCl；0.038%のKCl；0.0196%のCaCl₂；0.032%のMgSO₄；0.025 MのHepes、pH 7.5；0.5%のBSA；2 mMのピルビン酸ナトリウム）において2時間血清飢餓である。ブランクのためのウェルに、15分間1 μL（最終濃度5 μg/mL）サイトカラシンBを加えた。[3H]-2-DOG（20.6 mCi/mmol、1 mCi/mL）を、5.1 mMの冷2-DOGにおいて1:20希釈し、ウェルあたり1 μLの希釈2-DOGを細胞に加え、5分間インキュベートした。細胞を100 μL/ウェルのKRHバッファーで3回洗浄した。40 μL/ウェルの1%SDSを細胞に加え、細胞を少なくとも10分間震盪した。200 μL/ウェルのシンチレーション液体を加え、プレートを一晚震盪し、ベーターマイクロプレートリーダーで読んだ。サイトカラシンBで処理された全カラム/列から得られた値を平均し、全ての他の値から引いた。データをGraphPad Prism ソフトウェアにより分析し、該結果は表2に要約される

【0239】

表2. 3T3-L1脂肪細胞 2-デオキシグルコース（2-DOG）摂取アッセイにおけるFGF21 WTおよびFGF21変異体のEC50値および相対的効力（Fold-WT）の要約

【表 6 - 1】

変異体 ID	標準名	EC50 (nM)	Fold- WT (1)	N
V5	hFGF21(33-209)-V5	3.3	1.5	1
V7	hFGF21(33-209)-V7	3.9	1.8	1
V8	hFGF21(33-209)-V8	1.8	0.8	1
V9	hFGF21(33-209)-V9	3.1	1.0	1
V10	hFGF21(33-209)-V10	2.8	1.3	1
V11	hFGF21(33-209)-V11	3.4	1.6	1
V12	hFGF21(33-209)-V12	3.2	1.5	1
V13	hFGF21(33-209)-V13	2.9	1.3	1
V14	hFGF21(33-209)-V14-pool1	0.56	1.0	7
V14-N130D	hFGF21(33-209)-V14-pool2	0.60	1.5	4
V14-N-PEG	hFGF21(33-209)-V14pool1-N-40kDa bPEG-AL	5.7	8.8	3
V14-R154C, L174P	hFGF21(33-209)-V14-R154C, L174P	0.58	1.1	6
V14-L174P,R154C-PEG	hFGF21(33-209)-V14-L174P,R154C-40kDa bPEG-MA	4.3	8.9	6
V15	hFGF21(33-209)-V15	3.2	1.5	1
V16	hFGF21(33-209)-V16	3.1	1.4	1
V18	hFGF21(33-209)-V18	2.6	0.8	1
V53	hFGF21(33-209)-V53	0.78	1.4	3
V54	hFGF21(33-209)-V54	2.5	1.1	1
V55	hFGF21(33-209)-V55	3.7	1.7	1
V56	hFGF21(33-209)-V56	3.0	1.3	1
V57	hFGF21(33-209)-V57	0.60	0.69	4
V58	hFGF21(33-209)-V58	0.31	1.1	1
V59	hFGF21(33-209)-V59	0.67	0.69	3
V60	hFGF21(33-209)-V60	1.0	0.5	1
V61	hFGF21(33-209)-V61	1.9	0.9	1
V62	hFGF21(33-209)-V62	1.5	0.7	1
V63	hFGF21(33-209)-V63	1.9	0.9	1

10

20

30

【表 6 - 2】

V64	hFGF21(33-209)-V64	0.56	0.3	1
V73	hFGF21(33-209)-V73	1.1	2.8	2
V73-N-PEG	hFGF21(33-209)-V73-N-40kDa bPEG-AL	0.89	1.8	2
V76	hFGF21(33-209)-V76	0.77	1.0	1
V76-154C-PEG	hFGF21(33-209)-V76-154C-40kDa bPEG-MA	1.8	4.5	2
V79	hFGF21(33-209)-V79	2.3	2.3	1
V80	hFGF21(33-209)-V80	0.66	0.7	1
V81	hFGF21(33-209)-V81	0.83	0.8	1
V82	hFGF21(33-209)-V82	10	2.0	1
V83	hFGF21(33-209)-V83	7.4	1.5	1
V84	hFGF21(33-209)-V84	1.6	2.8	3
V85	hFGF21(33-209)-V85	1.1	1.5	1
WT	hFGF21(33-209)-WT-CH	0.99	1.0	20
WT-L174P	hFGF21(33-209)-WT-AM	2.2	1.5	3
WT-N-PEG	hFGF21(33-209)-WT-N-40kDa bPEG-AL	1.1	3.1	2
WT-R154C	hFGF21(33-209)-WT-R154C	0.42	1.2	2
WT-R154C-PEG	hFGF21(33-209)-WT-R154C-40kDa bPEG-MA	1.4	3.3	2

10

20

(1) 「Fold-WT」は、同じ実験において「直接的」で行われた FGF21-WT に対する FGF21 変異体の EC50 値の比率である。

【0240】

実施例 4：細胞ウェスタン (ICW) アッセイにおける pERK。ヒト β -クロトーで安定にトランスフェクトされた HEK293 細胞を、DMEM 高グルコース、10% の FBS、1% の PS および 600 ng/ml の G418 において培養し、ウェルあたり 30,000 個の細胞で一晩でポリ-D-リジン被覆 96-ウェルプレート (BD bioscience, 356640) に播種した。細胞は、4 時間、DMEM 高グルコース、0.5% の BSA および 10 mM の HEPES において血清飢餓した。WT FGF21 および FGF21 変異体 (変異体のリストに関して表 3 参照) を、飢餓培地において、種々の濃度に希釈した (100 pM から 300 nM が使用される典型的な濃度範囲である)。細胞を 10 分間、FGF21 で刺激した。FGF21 刺激後、培地をウェルから吸引し、細胞を 100 μ l の冷 PBS で 1 回洗浄し、次に、RT で 15 分間 100 μ L の 4% ホルムアルデヒドで固定し、次に、100 μ l の氷冷メタノールでさらに 10 分間インキュベーションした。

30

【0241】

固定後、細胞を PBS 中の 0.3% のトリトン X-100 で 4 回、それぞれ 5 分洗浄した。150 μ l の Odyssey Blocking バッファーを、室温で 1.5 時間、透過処理した細胞に加えた。ホスホ-ERK (pERK) 抗体を 0.17 μ g/ml の濃度 (1:200 希釈、または示された希釈) に希釈し、全-ERK (tERK) 抗体を Odyssey Blocking バッファーにおいて 2.2 μ g/ml の濃度 (1:200 希釈、または示された希釈) に希釈した。50 μ l を、バックグラウンドのために標準化する二次抗体で処理されたのみである 1 つのカラムを含めない全てのウェルに加えた。プレートを湿紙タワー (tower) で被覆し、蒸発を防止するために蓋をし、次に 4 $^{\circ}$ C で一晩インキュベートした。

40

【0242】

その後、一次抗体を吸引し、細胞を、PBS 中の 0.3% の Tween 20 でそれぞれ 5 分間 4 回洗浄した。洗浄中、二次抗体反応混合物は、1:10000-希釈 (または示された希釈) ヤギ抗-マウス Alexa 680 および 1:10000-希釈 (または示さ

50

れた希釈) I R D y e 8 0 0 ヤギ抗-ウサギ抗体を含む O d y s s e y B l o c k i n g バッファーにおいて調製した。洗浄が完了したら、40 μ L の反応混合物をそれぞれのウェルに加えた。プレートに黒色の蓋を被せ、光から二次抗体を保護し、プレートを震盪器上で R T で 1 時間インキュベートした。最後に、細胞を再び、P B S 中の 0.3 % の T w e e n 2 0 でそれぞれ 5 分間 4 回洗浄し、次に 700 nm (赤) および 800 nm (緑) チャンネルにおいて L I - C O R B i o s c i e n c e O d y s s e y I n f r a r e d I m a g i n g S y s t e m (Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE) にてスキャンした。A l e x a 6 8 0 は近赤外蛍光 (発光波長 668 nm) で t E R K を染色したが、I R D y e 8 0 0 は緑色蛍光 (発光波長 800 nm) で p E R K を染色した。蛍光バックグラウンドを除去するために、二次抗体のみで処理された全体の段/列から得られた値を平均し、プレートから得られた全ての他の値から引いた。それぞれのサンプルに存在する p E R K の量の標準化のために、それぞれのウェルにおける p E R K に対する値を、t E R K の値で割った。データは G r a p h P a d プリズム ソフトウェアにより分析し、該結果は表 3 に要約される。

10

【0243】

表 3. ヒト β -クロトーで安定にトランスフェクトされた H E K 2 9 3 細胞を使用する p E R K 細胞性アッセイにおける F G F 2 1 W T および F G F 2 1 変異体の E C 5 0 値および相対的効力 (F o l d - W T) の要約

【表 7-1】

変異体 ID	標準名	EC50 (nM)	Fold-WT (1)	N
V5	hFGF21(33-209)-V5	26	9.3	1
V7	hFGF21(33-209)-V7	19	6.8	1
V8	hFGF21(33-209)-V8	14	5.0	1
V9	hFGF21(33-209)-V9	13	2.4	1
V10	hFGF21(33-209)-V10	18	3.3	1

20

【表 7 - 2】

V11	hFGF21(33-209)-V11	28	18	1
V12	hFGF21(33-209)-V12	14	5.0	1
V13	hFGF21(33-209)-V13	11	4.0	1
V14	hFGF21(33-209)-V14-pool1	6.7	1.4	6
V14-N130D	hFGF21(33-209)-V14-pool2	5.3	1.4	3
V14-N-PEG	hFGF21(33-209)-V14pool 1-N-40kDa bPEG-AL	107	22	5
V14-R154C, L174P	hFGF21(33-209)-V14-R154C, L174P	6.7	1.0	3
V14-L174P, R154C-PEG	hFGF21(33-209)-V14-L174P, R154C-40kDa bPEG- MA	21	3.3	3
V15	hFGF21(33-209)-V15	3.3	1.2	1
V16	hFGF21(33-209)-V16	11	6.5	1
V18	hFGF21(33-209)-V18	15	2.7	1
V52	hFGF21(33-209)-V52	66	94	1
V53	hFGF21(33-209)-V53	4.2	1.3	3
V54	hFGF21(33-209)-V54	25	9.2	1
V55	hFGF21(33-209)-V55	34	13	1
V56	hFGF21(33-209)-V56	37	14	1
V57	hFGF21(33-209)-V57	22	5.4	3
V58	hFGF21(33-209)-V58	3.6	2.6	1
V59	hFGF21(33-209)-V59	6.5	1.6	3
V60	hFGF21(33-209)-V60	7.6	2.2	1
V61	hFGF21(33-209)-V61	22	6.3	1
V62	hFGF21(33-209)-V62	24	6.8	1
V63	hFGF21(33-209)-V63	13	3.7	1
V64	hFGF21(33-209)-V64	2.9	0.80	1
V73	hFGF21(33-209)-V73	5.8	1.7	3
V73-N-PEG	hFGF21(33-209)-V73-N-40kDa bPEG-AL	191	66	2
V76	hFGF21(33-209)-V76	3.4	0.47	3
V76-154C-PEG	hFGF21(33-209)-V76-154C-40kDa-bPEG-MA	8.3	2.4	4
V79	hFGF21(33-209)-V79	2.2	0.40	1
V80	hFGF21(33-209)-V80	2.2	0.40	1
V81	hFGF21(33-209)-V81	11	2.1	1
V82	hFGF21(33-209)-V82	1.5	2.7	1
V83	hFGF21(33-209)-V83	0.21	0.38	1
V84	hFGF21(33-209)-V84	4.5	1.1	3
V85	hFGF21(33-209)-V85	2.0	0.30	1

10

20

30

40

【表 7 - 3】

V86	hFGF21(33-209)-V86	8.5	4.5	1
V87	hFGF21(33-209)-V87	1.9	1.6	1
WT	hFGF21(33-209)-WT-CH	7.4	1.0	33
WT-R154C	hFGF21(33-209)-WT-R154C	4.2	1.3	3
WT-R154C-PEG	hFGF21(33-209)-WT-R154C-40kDa bPEG-MA	9.0	2.9	3
WT-N-PEG	hFGF21(33-209)-WT-N-40kDa bPEG-AL	20	6.3	3
WT-L174P	hFGF21(33-209)-WT-AM	5.7	1.5	3

10

(1) 「Fold-WT」は、同じ実験において「直接的」で行われた FGF21-WT の EC50 値に対する FGF21 変異体の EC50 値の比率である。

【0244】

実施例 5：FGF21 および FGF21 変異体のインビボ試験－薬物動力学および血漿暴露。ob/ob マウスは、2 型糖尿病のマウスモデルである。該マウスは、機能性レプチンを欠いており、高血糖、インスリン耐性、過食症、肝臓脂肪症および肥満により特徴付けられる。オス ob/ob マウス（10－13 週齢）を使用し、以下：(1) 野生型 FGF21、(2) FGF21 変異体、(3) ペグ化野生型 FGF21、および (4) ペグ化 FGF21 変異体の血糖に対する効果を評価した。

【0245】

野生型 FGF21、変異体 FGF21 または PBS ビヒクルを、1 mg/kg および 4 ml/kg で 1 日に 1 回 5 日間 s.c. 投与した。試験の最初の日、尾の血糖および体重を測定し、マウスを、グループ間で平均グルコースおよび体重を合わせて、異なるグループ（グループあたり n = 8）に配分した。1、3 および 5 日の投与前、ならびに投与後 2 および 4 時間で、glucose meter (OneTouch) を使用して血糖を測定した。これらの試験の結果は、表 4 に要約される。

20

【0246】

表 4。ob/ob マウスにおける 5 日間スクリーニング試験中の、FGF21 変異体による全グルコース AUC の減少パーセント。

【表 8 - 1】

30

変異体 ID	用量 (mg/kg)	グルコース AUC 減少 対 ビヒクル	WT に対する 倍数変化	変異体 ID	用量 (mg/kg)	グルコース AUC 減少 対 ビヒクル	WT に対する 倍数変化 (1)
V1	1 mg/kg	-30%	0.86	V57	1 mg/kg	-18%	0.90
V5	1 mg/kg	-25%	1.19	V58	1 mg/kg	-20%	0.65
V7	1 mg/kg	-25%	1.19	V59	1 mg/kg	-22%	0.69
V8	1 mg/kg	-16%	0.76	V60	1 mg/kg	-21%	1.05
V9	1 mg/kg	-20%	0.95	V61	1 mg/kg	-5%	0.25

40

【表 8 - 2】

V10	1 mg/kg	-31%	1.48	V62	1 mg/kg	-2%	0.10
V11	1 mg/kg	-29%	0.83	V63	1 mg/kg	-13%	0.65
V12	1 mg/kg	-31%	0.89	V73	1 mg/kg	-26%	0.74
V13	1 mg/kg	-27%	0.87	V76 exp1	1 mg/kg	-30%	0.86
V14 exp1	1 mg/kg	-33%	0.94	V76 exp2	1 mg/kg	-16%	1.45
V14 exp2	1 mg/kg	-37%	1.06	V79	1 mg/kg	-30%	1.15
V14 exp3	1 mg/kg	-36%	1.16	V80	1 mg/kg	-23%	0.88
V14- R154C, L174P	1 mg/kg	-30%	0.97	V81	1 mg/kg	-24%	0.92
V15	1 mg/kg	-26%	0.74	V82	1 mg/kg	-31%	1.19
V16	1 mg/kg	-24%	0.69	V83 exp1	1 mg/kg	-32%	1.23
V18	1 mg/kg	-20%	0.95	V83 exp2	1 mg/kg	-30%	2.73
V53	1 mg/kg	-32%	1.03	V84	1 mg/kg	-23%	0.88
V54	1 mg/kg	-25%	0.78	V85	1 mg/kg	-16%	1.45
V55	1 mg/kg	-22%	0.69	WT- L174P	1 mg/kg	-28%	0.92
V56	1 mg/kg	-20%	0.63	WT	1 mg/kg	-27% (n = 9)	1.0

10

20

(1) 「WTに対する倍異数変化」は、同じ実験において「直接的」で行われた FGF2 1-WT の「グルコース AUC 減少」に対する FGF2 1 変異体の「グルコース AUC 減少」の比率である。

【0247】

マウスに、ペグ化 FGF2 1 野生型を 1 mg/kg で、ペグ化 FGF2 1 変異体を 0.3、1 または 3 mg/kg で、または PBS ビヒクルを 4 ml/kg で、週に 2 回を 2 週間 s.c. 投与した。試験の最初の日、尾の血糖および体重を測定し、マウスを、グループ間で平均グルコースおよび体重を合わせて、異なるグループ（グループあたり n = 8）に配分した。1、4、8 および 11 日目の投与前に、ならびに投与後 4 時間で、glucose meter を使用して血糖を測定した。さらなる血糖測定を、それぞれの投与後 24 時間で、2、5、9 および 12 日目に行った。1 日目の投与前および最後の投与後 24 時間で 12 日目に血漿インスリンを測定した。1 日目の投与前および第 2 の投与後 24 時間で 5 日目に血漿トリグリセリドを測定した。これらの試験の結果は、表 5 に要約される。

30

【0248】

表 5。ob/ob マウスにおける 12 日間試験中の、ペグ化 FGF2 1 野生型 (WT) および変異体による血漿グルコース、インスリン、トリグリセリド (TG)、体重 (BW) 増加、肝臓 TG/脂質のビヒクルに対する % 変化。

【表 9】

変異体 ID	用量 (mg/kg)	全 グルコース AUC	血漿 インスリン	BW 増加	肝臓 TG (または脂質)	血漿 TG (5 日目)
WT-N-PEG, exp 1	1.0	-8%	-24%	-4%	-19% (lipid)	-48%
WT-N-PEG, exp 2	1.0	-24%	-45%	-1%	-3%	-35%
WT-R154C- PEG, exp 1	1.0	-30%	-40%	-5%	-18% (lipid)	-59%
V14-N-PEG	0.3	+2%	-17%	+1%	+7%	-29%
V14-N-PEG	1.0	+1%	-39%	-1%	+6%	-40%
V14-N-PEG	3.0	-11%	-39%	0%	+7%	-24%
V14-L174P, R154C-PEG	0.3	-8%	-6%	0%	-19%	-24%
V14-L174P, R154C-PEG	1.0	-4%	-49%	-2%	-4%	-43%
V14-L174P, R154C-PEG	3.0	-17%	-48%	-3%	-33%	-44%
WT-N-PEG, exp 3	1.0	-8%	+21%	+1%	-5%	-17%
WT-R154C- PEG, exp 3	1.0	-28%	-14%	-1%	-7%	-53%
V73-N-PEG	0.3	-1%	+29%	+2%	+1%	+24%
V73-N-PEG	1.0	0%	+24%	+2%	-1%	+7%
V73-N-PEG	3.0	-16%	+8%	+3%	+8%	-22%
V76-154C- PEG	0.3	-20%	+22%	0%	-3%	-24%
V76-154C- PEG	1.0	-20%	-21%	-1%	-25%	-45%
V76-154C- PEG	3.0	-31%	-38%	-5%	-40%	-51%

【0249】

V76-154C-PEG 変異体は、表 5 に示されるとおり、優れたインビボ代謝プロフィールを示す。V76-154C-PEG もまた、FGF21-WT-R154C-PEG（-7% 肝臓トリグリセリド変化、ビヒクルコントロールグループと有意に異なる；図 1）と比較して、優れた肝臓トリグリセリド低下特性（-25% 肝臓トリグリセリド変化、ビヒクルコントロールグループと有意に異なる；図 1）を示す。両方が 1 mg/kg で同じ試験において投与されたとき（WT-R154C-PEG、exp 3）、両方の化合物に対する血漿暴露（図 2）は当量であり、他の有効性終点（全グルコース AUC、血漿インスリン、体重増加および血漿トリグリセリド）は有意に異ならなかった。

【0250】

実施例 6：野生型 FGF21 およびペグ化 FGF21 変異体での血漿安定性アッセイ

ペグ化 FGF21 変異体と比較して野生型 FGF21（FGF21-WT）の血漿安定性を測定するために、血漿安定性アッセイを実行した。+（10）μL の FGF21-WT（4.84 mg/mL）および 35.5 μL の FGF21-V76-154C-PEG（2.12 mg/mL）を 90 μL および 264.5 μL の ob/ob マウス血漿（90% および 88% 血漿）に加えた。それぞれのサンプルから 5 つのアリコートを作り、1 時間、4 時間、24 時間、48 時間および 72 時間インキュベートした。全ての時点からの

サンプルを回収するまで、血漿処理サンプルを4℃で貯蔵した。九(9)μLの血漿処理FGF21-WTおよび27μLの血漿処理FGF21-V76-154C-PEGを、750μLの培地(1.2%血漿で300nMのFGF21-WTおよび3.6%血漿で450nMのFGF21-V76-154C-PEG)に加え、培地で1:3に8回連続希釈された。ヒトβ-クロトーで安定にトランスフェクトされたHEK293細胞を、10分間タンパク質で処理、次にpERK ICWの標準プロトコールをした。未処理FGF21-WT、FGF21-V76-154C-PEGならびに1.2%および3.6%マウス血漿もまた、コントロールとして含まれる。これらの実験の結果は、図3Aおよび3Bにより描写されるグラフである。

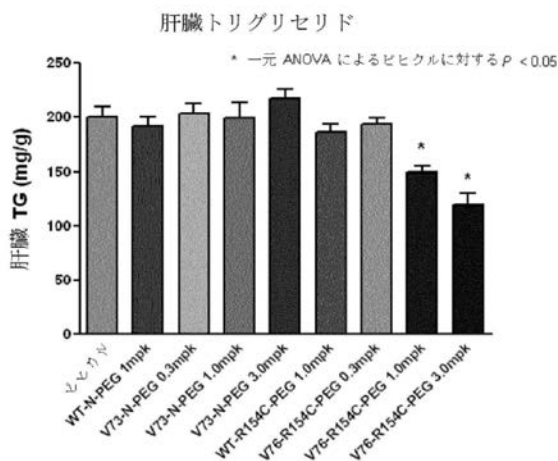
【0251】

FGF21-WTは、37℃でマウス血漿とインキュベートしたとき、短い期限(1-4時間)で活性を失ったが、V76-154C-PEGは、対照的に、37℃でマウス血漿とインキュベートしたとき、少なくとも72時間その完全活性を保持した。

【0252】

本発明は、それらの特定の態様を基準にして記載されているが、本発明の真の精神および範囲から逸脱することなく、種々の変化が作られ得、均等が置き換えられ得ることを当業者により理解されるべきである。加えて、多数の修飾が、本発明の対象、精神および範囲に対して、特定の状況、材料、物質の組成、プロセス、プロセス工程を採用され得る。全てのこのような修飾は、本発明の範囲内であると意図される。

【図1】



【図3】

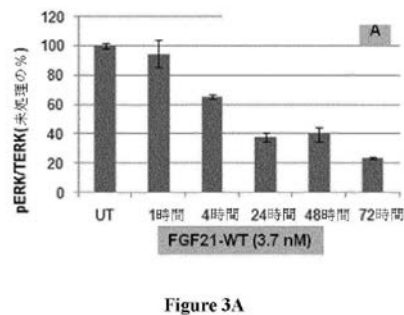


Figure 3A

【図2】

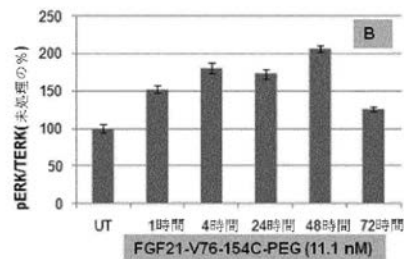
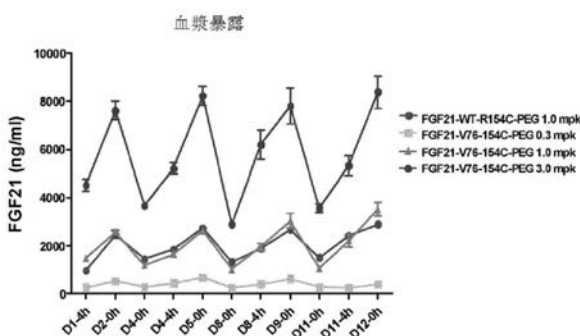


Figure 3B

【配列表】

2017110010000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成29年2月3日(2017.2.3)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

表1における配列の群から選択される配列を有するポリペプチド変異体。

【表1-1】

変異体	配列番号:	配列	先行技術配列番号: 1 (全長 FGF21 タンパク質配列 (NCBI 参照配列番号 NP_061986.1)) と比較して 作成された部位特異的修飾
1	5	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQTEAHLE IREDGTAGGA ADQSPESLLE LKALKPGVIQ ILGVKTSRFL CQGPDGALYG SLHFDPEACS FRELVLLEDGY NVYQSEAHGL PLHLPGHKSP HRDPAPRGPA RFLPLPGLPP ALPEPPGILA PEPPDVGSSD PLSMVGPSQG RSPSYTS	Q56E, V69A, Q82E, R105G, L127V, N149H, Q184E, A208T
2	6	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQNTAHLE IREDGTAGGA ADQSPESLLN LKALKPGVIQ ILGVKTSRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELVLLEDGY NVYQSEAHGL PLHLPGQKSP HRDPAPRGPA RFLPLPGLPP ALPEPPGILA PNPPDVGSSD PLSMVGPSQG RSPSYTS	Q56N, V69A, Q82N, R105K, L127V, N149Q, Q184N, A208T
5	7	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DDQTEAHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLQ LKALKPGVIQ ILGVKASRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLENGY NVYQSEAHGL PLHLPGNRSP HRDPASQGPA RFLPLPGLPP ALPEPPGILA PQPPDVGSSD PLAMVGPSQA RSPSYAS	A54D, D74H, T98A, R105K, D130N, K150R, P158S, R159Q, S195A, G202A

【表 1 - 2】

6	8	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DDQQTEAHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLQ LKALKPGVIO ILGVQTSRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLENGY NVYQSETHGL PLHLPGNKSP HRDPASQGPA RFLPLPGLPP ALPEPPGILA PQPPDVGSSD PLAMVGPSQA RSPSYAS	A54D, D74H, K97Q, R105K, D130N, A139T, P158S, R159Q, S195A, G202A
7	9	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQETEAHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLQ LKALKPGVIO ILGVKASRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLENGY NVYQSEAHGL PLHLPGNRSP HRDPASQGPA RFLPLPGLPP ALPEPPGILA PQPPDVGSSD PLAMVGPSQA RSPSYAS	Q56E, D74H, T98A, R105K, D130N, K150R, P158S, R159Q, S195A, G202A
8	10	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQETEAHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLQ LKALKPGVIO ILGVQTSRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLENGY NVYQSETHGL PLHLPGNKSP HRDPASQGPA RFLPLPGLPP ALPEPPGILA PQPPDVGSSD PLAMVGPSQA RSPSYAS	Q56E, D74H, K97Q, R105K, D130N, A139T, P158S, R159Q, S195A, G202A
9	11	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DDQQTEAHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLQ LKALKPGVIO ILGVKASRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLENGY NVYQSETHGL PLHLPGNKSP HRDPASQGPA RFLPLPGLPP ALPEPPGILA PQPPDVGSSD PLAMVGPSQA RSPSYAS	A54D, D74H, T98A, R105K, D130N, A139T, P158S, R159Q, S195A, G202A
10	12	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQETEAHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLQ LKALKPGVIO ILGVKASRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLENGY NVYQSETHGL PLHLPGNKSP HRDPASQGPA RFLPLPGLPP ALPEPPGILA PQPPDVGSSD PLAMVGPSQA RSPSYAS	Q56E, D74H, T98A, R105K, D130N, A139T, P158S, R159Q, S195A, G202A
11	13	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DDQQTEAHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLE LKALKPGVIO ILGVKTSRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLENGY NVYQSEAHGL PLHLPGNRSP HRDPAPQGPA RFLPLPGLPP ALPEPPGILA PQPPDVGSSD PLAMVGPSQG RSPSYAS	A54D, D74H, Q82E, R105K, D130N, K150R, R159Q, S195A
12	14	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DDQQTEAHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLQ LKALKPGVIO ILGVQTSRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLENGY NVYQSEAHGL PLHLPGNRSP HRDPAPQGPA RFLPLPGLPP ALPEPPGILA PQPPDVGSSD PLAMVGPSQG RSPSYAS	A54D, D74H, K97Q, R105K, D130N, K150R, R159Q, S195A
13	15	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DDQQTEAHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLQ LKALKPGVIO ILGVKASRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLENGY NVYQSEAHGL PLHLPGNRSP HRDPAPQGPA RFLPLPGLPP ALPEPPGILA PQPPDVGSSD PLAMVGPSQG RSPSYAS	A54D, D74H, T98A, R105K, D130N, K150R, R159Q, S195A

【表 1 - 3】

14	16	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQETEAHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLE LKALKPGVIO ILGVKTSRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLENGY NVYQSEAHGL PLHLPGNRSP HRDPAPQGPA RFLPLPGLPP ALPEPPGILA EQPPDVGSDD PLAMVGPSQG RSPSYAS	Q56E, D74H, Q82E, R105K, D130N, K150R, R159Q, S195A
14- R154C, L174P	17	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQETEAHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLE LKALKPGVIO ILGVKTSRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLENGY NVYQSEAHGL PLHLPGNRSP HCDPAPQGPA RFLPLPGLPP APPEPPGILA EQPPDVGSDD PLAMVGPSQG RSPSYAS	Q56E, D74H, Q82E, R105K, D130N, K150R, R154C, R159Q, L174P, S195A
15	18	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQETEAHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLQ LKALKPGVIO ILGVQTSRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLENGY NVYQSEAHGL PLHLPGNRSP HRDPAPQGPA RFLPLPGLPP ALPEPPGILA EQPPDVGSDD PLAMVGPSQG RSPSYAS	Q56E, D74H, K97Q, R105K, D130N, K150R, R159Q, S195A
16	19	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQETEAHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLQ LKALKPGVIO ILGVKASRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLENGY NVYQSEAHGL PLHLPGNRSP HRDPAPQGPA RFLPLPGLPP ALPEPPGILA EQPPDVGSDD PLAMVGPSQG RSPSYAS	Q56E, D74H, T98A, R105K, D130N, K150R, R159Q, S195A
17	20	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQQTESHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLQ LKALKPGVIO ILGVKTSRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLENGY NVYQSEAHGL PLHLPGNRSP HRDPAPQGPA RFLPLPGLPP ALPEPPGILA EQPPDVGSDD PLAMVGPSQG RSPSYAS	A59S, D74H, Q82E, R105K, D130N, K150R, R159Q, S195A
18	21	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQQTESHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLQ LKALKPGVIO ILGVQTSRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLENGY NVYQSEAHGL PLHLPGNRSP HRDPAPQGPA RFLPLPGLPP ALPEPPGILA EQPPDVGSDD PLAMVGPSQG RSPSYAS	A59S, D74H, K97Q, R105K, D130N, K150R, R159Q, S195A
19	22	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQQTESHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLQ LKALKPGVIO ILGVKASRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLENGY NVYQSEAHGL PLHLPGNRSP HRDPAPQGPA RFLPLPGLPP ALPEPPGILA EQPPDVGSDD PLAMVGPSQG RSPSYAS	A59S, D74H, T98A, R105K, D130N, K150R, R159Q, S195A
50	23	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DDQQTESHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLQ LKALKPGVIO ILGVQTSRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLENGY NVYQSEAHGL PLHLPGNRSP HRDPASQGPA RFLPLPGLPP ALPEPPGILA EQPPDVGSDD PLAMVGPSQA RSPSYAS	A54D, D74H, K97Q, R105K, D130N, K150R, P158S, R159Q, S195A, G202A

【表 1 - 4】

51	24	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQTEAHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLQ LKALKPGVIO ILGVKTSRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLENGY NvyQSEAHGL PLHLPGNRSP HRDPASQGPA RFLPLPGLPP ALPEPPGILA PQPPDVGSDD PLAMVGPSQA RSPSYAS	Q56E, D74H, K97Q, R105K, D130N, K150R, P158S, R159Q, S195A, G202A
52	25	DSSPLVQFGG QVRQRYLYTD DAQQTEAHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLQ LKALKPGVIO ILGVKTSRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLENGY NvyQSEAHSL PLHLPGNKSP HRDPASQGPA RFLPLPGLPP ALPEPPGILA PQPPDVGSDD PLSMVGPSQA RSPSYAS	L38V, D74H, R105K, D130N, G141S, P158S, R159Q, G202A
53	26	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQTEAHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLE LKALKPGVIO ILGVKTSRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLENGY NvyQSEAHGL PLHLPGNRSP HRDPASQGPA RFLPLPGLPP APPEPPGILA PQPPDVGSDD PLAMVGPSQG RSPSYAS	Q56E, D74H, Q82E, R105K, D130N, K150R, P158S, R159Q, L174P, S195A
54	27	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQQTEAHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLE LKALKPGVIO ILGVKTSRFL CQKPDGTYG SLHFDPEACS FRELLLENGY NvyQSEAHGL PLHLPGNRSP HRDPASQGPA RFLPLPGLPP APPEPPGILA PQPPDVGSDD PLAMVGPSQG RSPSYAS	D74H, Q82E, R105K, A109T, D130N, K150R, P158S, R159Q, L174P, S195A
55	28	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQQTEAHLE IREDGTAGGA AHQSPESLLE LKALKPGVIO ILGVKTSRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLENGY NvyQSEAHGL PLHLPGNRSP HRDPASQGPA RFLPLPGLPP APPEPPGILA PQPPDVGSDD PLAMVGPSQG RSPSYAS	V69A, D74H, Q82E, R105K, D130N, K150R, P158S, R159Q, L174P, S195A
56	29	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQQTEAHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLQ LKALKPGVIO ILGVKASRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLENGY NvyQSETHGL PLHLPGNKSP HRDPASQGPA RFLPLPGLPP APPEPPGILA PQPPDVGSDD PLAMVGPSQA RSPSYAS	D74H, T98A, R105K, D130N, A139T, P158S, R159Q, L174P, S195A, G202A
57	30	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQQTEAHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLQ LKALKPGVIO ILGVKASRFL CQRPDGLYG SLHFDPEACS FRELLLENGY NvyQSETHGL PLHLPGNRSP HRDPASQGPA RFLPLPGLPP APPEPPGILA PQPPDVGSDD PLAMVGPSQA RSPSYAS	D74H, T98A, D130N, A139T, K150R, P158S, R159Q, L174P, S195A, G202A
58	31	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQQTEAHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLQ LKALKPGVIO ILGVKTSRFL CQRPDGTLYG SLHFDPEACS FRELLLENGY NvyQSETHGL PLHLPGNRSP HRDPASQGPA RFLPLPGLPP APPEPPGILA PQPPDVGSDD PLAMVGPSQA RSPSYAS	D74H, A109T, D130N, A139T, K150R, P158S, R159Q, L174P, S195A, G202A

【表 1 - 5】

59	32	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DACQTEAHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLE LKALKPGVIO ILGVKTSRFL CQRPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLENGY NvyQSEAHGL PLHLPCNRSP HRDPASQGPA RFLPLPGLPP APPEPPGILA PQPPDVGSDD PLAMVGPSQG RSPSYAS	Q55C, D74H, Q82E, D130N, G148C, K150R, P158S, R159Q, L174P, S195A
60	33	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DACQTEAHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLE LKALKPGVIO ILGVKTSRFL CQRPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLENGY NvyQSEAHGL PLHLPCNRSP HRDPASRGPA RFLPLPGLPP APPEPPGILA PQPPDVGSDD PLAMVGPSQG RSPSYAS	Q55C, D74H, Q82E, A109T, D130N, G148C, K150R, P158S, L174P, S195A
61	34	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DACQTEAHLE IREDGTAGGA AHQSPESLLE LKALKPGVIO ILGVKTSRFL CQRPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLENGY NvyQSEAHGL PLHLPCNRSP HRDPASRGPA RFLPLPGLPP APPEPPGILA PQPPDVGSDD PLAMVGPSQG RSPSYAS	Q55C, V69A, D74H, Q82E, D130N, G148C, K150R, P158S, L174P, S195A
62	35	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DACQTEAHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLE LKALKPGVIO ILGVKTSRFL CQRPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLENGY NvyQSETHGL PLHLPCNRSP HRDPASQGPA RFLPLPGLPP APPEPPGILA PQPPDVGSDD PLAMVGPSQA RSPSYAS	Q55C, D74H, D130N, A139T, G148C, P158S, R159Q, L174P, S195A, G202A
63	36	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DACQTEAHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLE LKALKPGVIO ILGVKTSRFL CQRPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLENGY NvyQSETHGL PLHLPCNRSP HRDPASRGPA RFLPLPGLPP APPEPPGILA PQPPDVGSDD PLAMVGPSQA RSPSYAS	Q55C, D74H, D130N, A139T, G148C, K150R, P158S, L174P, S195A, G202A
64	37	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DACQTEAHLE IREDGTVGGA ADQSPESLLE LKALKPGVIO ILGVKTSRFL CQRPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLENGY NvyQSETHGL PLHLPCNRSP HRDPASRGPA RFLPLPGLPP APPEPPGILA PQPPDVGSDD PLAMVGPSQG RSPSYAS	Q55C, A109T, D130N, A139T, G148C, K150R, P158S, L174P, S195A, G202A
73	38	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQTEAHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLE LKALKPGVIO ILGVKTSRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLENGY NvyQSEAHGL PLHLPGNRSP HRDPAPQGPA RFLPLPGLPP ALPEPPGILA PQPPDVGSDD PLAMVGPSQG RSPSYAS	Q56E, D74H, Q82E, R105K, D130E, K150R, R159Q, S195A
76	39	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQTEAHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLE LKALKPGVIO ILGVKTSRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLEDGY NvyQSEAHGL PLHLPGNRSP HCDPAPQGPA RFLPLPGLPP ALPEPPGILA PQPPDVGSDD PLAMVGPSQG RSPSYAS	Q56E, D74H, Q82E, R105K, K150R, R154C, R159Q, S195A

【表 1 - 6】

79	40	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQQTEAHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLE LKALKPGVIO ILGVKTSRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLEDGY NvyQSEAHGL PLHLPGNRSP HCDPAPQGPA RFLPLPGLPP ALPEPPGILA PQPPDVGSDD PLAMVGPSQA RSPSYAS	D74H, Q82E, R105K, K150R, R154C, R159Q, S195A, G202A
80	41	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQQTEAHLE IREDGTVGGA ADQSPESLLE LKALKPGVIO ILGVKTSRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLEDGY NvyQSEAHGL PLHLPGNRSP HCDPAPQGPA RFLPLPGLPP ALPEPPGILA PQPPDVGSDD PLAMVGPSQA RSPSYAS	Q82E, R105K, A109T, K150R, R154C, R159Q, S195A, G202A
81	42	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQQTEAHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLE LKALKPGVIO ILGVKTSRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLEDGY NvyQSEAHGL PLHLPGNRSP HCDPASQGPA RFLPLPGLPP ALPEPPGILA PQPPDVGSDD PLAMVGPSQG RSPSYAS	D74H, Q82E, R105K, K150R, R154C, P158S, R159Q, S195A
82	43	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQQTEAHLE IREDGTVGGA ADQSPESLLE LKALKPGVIO ILGVKTSRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLEDGY NvyQSEAHGL PLHLPGNRSP HCDPASQGPA RFLPLPGLPP ALPEPPGILA PQPPDVGSDD PLAMVGPSQG RSPSYAS	Q82E, R105K, A109T, K150R, R154C, P158S, R159Q, S195A
83	44	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQQTEAHLE IREDGTVGGA ADQSPESLLE LKALKPGVIO ILGVKTSRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLEDGY NvyQSEAHGL PLHLPGNRSP HCDPASRGPA RFLPLPGLPP ALPEPPGILA PQPPDVGSDD PLAMVGPSQA RSPSYAS	Q82E, R105K, A109T, K150R, R154C, P158S, S195A, G202A
84	45	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQQTEAHLE IREDGTVGGA ADQSPESLLE LKALKPGVIO ILGVKTSRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLEDGY NvyQSEAHGL PLHLPGNRSP HCDPASRGPA RFLPLPGLPP ALPEPPGILA PQPPDVGSDD PLAMVGPSQA RSPSYAS	Q82E, A109T, A139T, K150R, R154C, P158S, S195A, G202A
85	46	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQQTEAHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLE LKALKPGVIO ILGVKTSRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLEEGY NvyQSEAHGL PLHLPGNRSP HCDPAPQGPA RFLPLPGLPP ALPEPPGILA PQPPDVGSDD PLAMVGPSQG RSPSYAS	D74H, Q82E, R105K, D130E, K150R, R154C, R159Q, S195A
86	48	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQQTEAHLE IREDGTVGGA ADQSPESLLE LKALKPGVIO ILGVKTSRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLEDGY NvyQSEAHGL PLHLPGNRSP HKDPAPRGPA RFLPLPGLPP APPEPPGILA PQPPDVGSDD PLAMVGPSQG RSPSYAS	K84R, K87R, K97R, K150R, R154K, L174P, S195A

【表 1 - 7】

87	49	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DACQTEAHLE IREDGTVGGA ADQSPESLLQ LRALRPGVIO ILGVKTSRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLEDGY NvyQSEAHGL PLHLPGNRSP HKDPAPRGPA RFLPLPGLPP APPEPPGILA PQPPDVGSDD PLAMVGPSQG RSPSYAS	Q55C, K84R, K87R, K97R, G148C, K150R, R154K, L174P, S195A
----	----	--	---

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 2 5 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 2 5 2】

本発明は、それらの特定の態様を基準にして記載されているが、本発明の真の精神およ

び範囲から逸脱することなく、種々の変化が作られ得、均等が置き換えられ得ることを当業者により理解されるべきである。加えて、多数の修飾が、本発明の対象、精神および範囲に対して、特定の状況、材料、物質の組成、プロセス、プロセス工程を採用され得る。全てのこのような修飾は、本発明の範囲内であると意図される。

以下に、本願の当初の特許請求の範囲に記載された発明を付記する。

[1] 表 1 における配列の群から選択される配列を有するポリペプチド変異体。

[2] 1 つ以上の以下の修飾： (a) 最大 8 個のアミノ酸残基のアミノ末端切断；および (b) 最大 1 2 個のアミノ酸残基のカルボキシル末端切断をさらに含む、 [1] に記載の変異体。

[3] ポリエチレングリコール (P E G) またはポリシアル酸に共有結合している、 [1] に記載の変異体。

[4] 変異体のシステインに共有結合した分岐状 4 0 k D a P E G 基をさらに含む、 [3] に記載の変異体。

[5] 以下： I g G 定常ドメインまたはそのフラグメント；ヒト血清アルブミン (H S A) ；およびアルブミン結合ポリペプチドの 1 つからなる異種アミノ酸配列に融合している、 [1] に記載の変異体。

[6] 異種アミノ酸配列が変異体のアミノ末端に融合している、 [5] に記載の変異体。

[7] 異種アミノ酸配列が変異体のカルボキシ末端に融合している、 [5] に記載の変異体。

[8] 少なくとも 1 つの [1] に記載の変異体からなる多量体。

[9] 多量体がホモ二量体である、 [8] に記載の多量体。

[1 0] 変異体 7 6 (V 7 6) を含む、ポリペプチドまたはタンパク質変異体。

[1 1] 位置 1 5 4 のシステイン残基でペグ化を有する、 [1 0] に記載の変異体。

[1 2] 位置 1 5 4 で分岐状 4 0 k D a P E G 基をさらに含む、 [1 1] に記載の変異体。

[1 3] 表 1 における配列からなる群から選択される変異体を含む医薬組成物。

[1 4] 位置 1 5 4 のシステイン残基でペグ化を有する変異体 7 6 (V 7 6) をさらに含む、 [1 3] に記載の医薬組成物。

[1 5] 治療有効量の線維芽細胞増殖因子 2 1 (F G F 2 1) ポリペプチドまたはタンパク質変異体を患者に投与することを含む該患者を処置するための方法であって、該患者は F G F 2 1 関連障害の 1 つ以上を示す、方法。

[1 6] F G F 2 1 関連障害が、 1 つ以上の以下：肥満、 1 型および 2 型糖尿病、膵炎、脂質異常症、非アルコール性脂肪性肝炎 (N A S H) 、インスリン耐性、高インスリン血症、耐糖能障害、高血糖、メタボリック・シンドロームおよび他の代謝障害からなる、 [1 5] に記載の方法。

[1 7] F G F 2 1 関連障害が 1 型糖尿病からなる、 [1 6] に記載の方法。

[1 8] F G F 2 1 関連障害が 2 型糖尿病からなる、 [1 6] に記載の方法。

[1 9] 治療有効量の線維芽細胞増殖因子 2 1 (F G F 2 1) ポリペプチドまたはタンパク質変異体を含む医薬組成物を患者に投与することを含む該患者を処置するための方法であって、該患者は F G F 2 1 関連障害の 1 つ以上を示す、方法。

[2 0] 治療有効量の線維芽細胞増殖因子 2 1 (F G F 2 1) ポリペプチドまたはタンパク質変異体を患者に投与することを含む該患者を処置するための方法であって、該患者は F G F 2 1 関連障害の 1 つ以上を示し、該変異体は位置 1 5 4 のシステイン残基でペグ化を有する変異体 7 6 (V 7 6) をさらに含む、方法。

[2 1] F G F 2 1 関連障害が、 1 つ以上の以下：肥満、 1 型および 2 型糖尿病、膵炎、脂質異常症、非アルコール性脂肪性肝炎 (N A S H) 、インスリン耐性、高インスリン血症、耐糖能障害、高血糖、メタボリック・シンドロームおよび他の代謝障害からなる、 [2 0] に記載の方法。

〔 2 2 〕 F G F 2 1 関連障害が 1 型糖尿病からなる、〔 2 1 〕に記載の方法。

〔 2 3 〕 F G F 2 1 関連障害が 2 型糖尿病からなる、〔 2 1 〕に記載の方法。

〔 2 4 〕 必要とする患者における高血糖、高インスリン血症、肝臓脂質および体重増加の 1 つ以上を減少させるための方法であって、治療有効量の線維芽細胞増殖因子 2 1 (F G F 2 1) ポリペプチドまたはタンパク質変異体を該患者に投与することを含む、方法。

〔 2 5 〕 変異体が、位置 1 5 4 のシステイン残基でペグ化を有する変異体 7 6 (V 7 6) をさらに含む、〔 2 4 〕に記載の方法。

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 P 3/06 (2006.01)	A 6 1 P 3/06	
A 6 1 P 1/18 (2006.01)	A 6 1 P 1/18	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 5/50 (2006.01)	A 6 1 P 5/50	
A 6 1 P 3/00 (2006.01)	A 6 1 P 3/00	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 38/22 (2006.01)	A 6 1 K 37/24	
(72)発明者	ブライアン・アール・ボーチャー	
	アメリカ合衆国02139マサチューセッツ州ケンブリッジ、テクノロジー・スクエア100番、ノバルティス・インスティテューツ・フォー・バイオメディカル・リサーチ・インコーポレイテッド	
(72)発明者	シャリ・エル・キャプラン	
	アメリカ合衆国02139マサチューセッツ州ケンブリッジ、テクノロジー・スクエア100番、ノバルティス・インスティテューツ・フォー・バイオメディカル・リサーチ・インコーポレイテッド	
(72)発明者	ダグラス・エス・ダニエルズ	
	アメリカ合衆国02139マサチューセッツ州ケンブリッジ、テクノロジー・スクエア100番、ノバルティス・インスティテューツ・フォー・バイオメディカル・リサーチ・インコーポレイテッド	
(72)発明者	ベルンハルト・ハー・ガイアーシュタンガー	
	アメリカ合衆国92121カリフォルニア州サンディエゴ、ジョン・ジェイ・ホプキンス・ドライブ10675番、ノバルティス・インスティテュート・フォー・ファンクショナル・ジェノミックス・インコーポレイテッド	
(72)発明者	浜松 典郎	
	アメリカ合衆国02139マサチューセッツ州ケンブリッジ、テクノロジー・スクエア100番、ノバルティス・インスティテューツ・フォー・バイオメディカル・リサーチ・インコーポレイテッド	
(72)発明者	スチュアート・リクト	
	アメリカ合衆国02142マサチューセッツ州ケンブリッジ、メモリアル・ドライブ100番、アパートメント2-9ビー	
(72)発明者	アンドレアス・レーヴ	
	アメリカ合衆国02139マサチューセッツ州ケンブリッジ、マサチューセッツ・アベニュー250番、ノバルティス・インスティテューツ・フォー・バイオメディカル・リサーチ・インコーポレイテッド	
(72)発明者	スティープン・クレイグ・ウェルドン	
	アメリカ合衆国02139マサチューセッツ州ケンブリッジ、テクノロジー・スクエア100番、ノバルティス・インスティテューツ・フォー・バイオメディカル・リサーチ・インコーポレイテッド	
Fターム(参考)	4C084 AA02 AA03 AA07 BA01 BA08 BA22 BA23 CA18 CA59 DB54 MA17 MA22 MA23 MA55 MA66 NA14 ZA661 ZA662 ZA701 ZA702 ZA751 ZA752 ZC211 ZC212 ZC331 ZC332 ZC351 ZC352 4H045 AA10 AA30 BA10 BA41 BA53 BA57 CA40 DA31 EA27 EA28 FA74	

【外国語明細書】
20171100100000001.pdf