(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2018-532693
(P2018-532693A)
(43)公表日　平成30年11月8日(2018.11.8)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C07K 16/28	***(2006.01)***	C07K	16/28	ZNA	4B064
A61K 39/395	***(2006.01)***	A61K	39/395	N	4C085
A61P 3/08	***(2006.01)***	A61P	3/08		4H045
A61P 1/18	***(2006.01)***	A61P	1/18		
A61P 9/00	***(2006.01)***	A61P	9/00		

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 102 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2018-506110 (P2018-506110)
(86)(22)出願日　平成28年8月5日(2016.8.5)
(85)翻訳文提出日　平成30年3月27日(2018.3.27)
(86)国際出願番号　PCT/US2016/045917
(87)国際公開番号　WO2017/024285
(87)国際公開日　平成29年2月9日(2017.2.9)
(31)優先権主張番号　62/280,675
(32)優先日　平成28年1月19日(2016.1.19)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　62/202,143
(32)優先日　平成27年8月6日(2015.8.6)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　514027908
ゾーマ　（ユーエス）　リミテッド　ライアビリティ　カンパニー
アメリカ合衆国　カリフォルニア州　バークレー　セブンス　ストリート　２９１０
(74)代理人　100102978
弁理士　清水　初志
(74)代理人　100102118
弁理士　春名　雅夫
(74)代理人　100160923
弁理士　山口　裕孝
(74)代理人　100119507
弁理士　刑部　俊
(74)代理人　100142929
弁理士　井上　隆一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】インスリン受容体に対する抗体断片及び低血糖を治療するためのその使用

(57)【要約】
本開示は概して、インスリン受容体に結合してインスリン受容体でのインスリンの作用を調節する、負の調節因子である抗体断片を使用して、低血糖を治療または予防する方法に関する。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列番号５～７、８～１０、及び５０～１１２に記載されるアミノ酸配列を有する３つの重鎖ＣＤＲと、配列番号１４～１６または配列番号２０～２８に記載されるアミノ酸配列を有する３つの軽鎖ＣＤＲと、を含む、抗体またはその断片であって、（ｉ）インスリン受容体もしくは（ｉｉ）インスリン及びインスリン受容体を含む複合体、または（ｉ）及び（ｉｉ）の両方に結合する、前記抗体またはその断片。
【請求項２】
重鎖可変領域アミノ酸配列が、配列番号１、２、または２９～４９に記載され、軽鎖可変領域アミノ酸配列が、配列番号４または１７～１９に記載される、請求項１に記載の抗体またはその断片。
【請求項３】
配列番号８～１０に記載されるアミノ酸配列を有する３つの重鎖ＣＤＲと、配列番号１４～１６に記載されるアミノ酸配列を有する３つの軽鎖ＣＤＲと、を含む、抗体またはその断片であって、（ｉ）インスリン受容体もしくは（ｉｉ）インスリン及びインスリン受容体を含む複合体、または（ｉ）及び（ｉｉ）の両方に結合する、前記抗体またはその断片。
【請求項４】
重鎖可変領域アミノ酸配列が、配列番号２に記載され、軽鎖可変領域アミノ酸配列が、配列番号４に記載される、請求項３に記載の抗体またはその断片。
【請求項５】
配列番号５～７または８～１０に記載されるアミノ酸配列を有する３つの重鎖ＣＤＲと、配列番号１１～１３または１４～１６に記載されるアミノ酸配列を有する３つの軽鎖ＣＤＲと、を含む、抗体断片であって、（ｉ）インスリン受容体もしくは（ｉｉ）インスリン及びインスリン受容体を含む複合体、または（ｉ）及び（ｉｉ）の両方に結合する、前記抗体断片。
【請求項６】
重鎖可変領域アミノ酸配列が、配列番号１または２に記載され、軽鎖可変領域アミノ酸配列が、配列番号３または４に記載される、請求項３に記載の抗体断片。
【請求項７】
前記３つの重鎖ＣＤＲが、配列番号８～１０に記載されるアミノ酸配列を有し、３つの軽鎖ＣＤＲが、配列番号１４～１６に記載されるアミノ酸配列を有する、請求項５または６に記載の抗体断片。
【請求項８】
重鎖可変領域アミノ酸配列が、配列番号２に記載され、軽鎖可変領域アミノ酸配列が、配列番号４に記載される、請求項５に記載の抗体断片。
【請求項９】
Ｆａｂ断片である、前記請求項のいずれか１項に記載の抗体断片。
【請求項１０】
前記抗体または抗体断片が、インスリンとインスリン受容体との間の結合親和性を少なくとも約１．５倍、任意選択で最大１０００倍弱めることができる10^{-5}Ｍ以下の平衡解離定数K_Dで、（ｉ）インスリン受容体もしくは（ｉｉ）インスリン及びインスリン受容体を含む複合体、または（ｉ）及び（ｉｉ）の両方に結合する、前記請求項のいずれか１項に記載の抗体断片。
【請求項１１】
前記結合親和性が、K_A、K_D、オフ速度に対するオン速度の比率、またはオン速度に対するオフ速度の比率のうちのいずれか１つである、請求項１０に記載の抗体または抗体断片。
【請求項１２】
前記抗体が、任意選択でｐＡＫＴアッセイにおいて、インスリンシグナル伝達活性のＥ

Ｃ５０を約２倍～１０００倍増加させる、前記請求項のいずれか１項に記載の抗体または抗体断片。

【請求項１３】

前記抗体が、モノクローナル抗体である、前記請求項のいずれか１項に記載の抗体または抗体断片。

【請求項１４】

前記抗体が、ヒト抗体である、前記請求項のいずれか１項に記載の抗体または抗体断片。

【請求項１５】

前記抗体が、疎水部分にコンジュゲートされれいる、前記請求項のいずれか１項に記載の抗体または抗体断片。

【請求項１６】

滅菌医薬組成物を調製する方法であって、滅菌された医薬上許容される希釈剤を、請求項１～１５のいずれか１項に記載の抗体に添加することを含む、前記方法。

【請求項１７】

請求項１～１５のいずれか１項に記載の抗体と、滅菌された医薬上許容される希釈剤と、を含む、滅菌組成物。

【請求項１８】

低血糖を治療する方法であって、それを必要とする対象に、低血糖を改善するのに有効な量で、インスリン受容体へのインスリン結合及び／またはインスリン受容体でのインスリン作用の負の調節因子である抗体断片を投与することを含む、前記方法。

【請求項１９】

前記低血糖が、スルホニル尿素誘発性低血糖、インスリン誘発性低血糖、夜間低血糖、肥満手術後の低血糖、及び遺伝性の代謝及びインスリン感受性障害を有する対象における低血糖からなる群から選択される、請求項１８に記載の方法。

【請求項２０】

夜間低血糖を治療または予防する方法であって、それを必要とする対象に、夜間低血糖を改善するのに有効な量で、インスリン受容体へのインスリン結合及び／またはインスリン受容体でのインスリン作用の負の調節因子である抗体断片を投与することを含む、前記方法。

【請求項２１】

前記抗体断片が、インスリンとインスリン受容体との間の結合親和性を少なくとも約１．５倍、任意選択で最大１０００倍弱めることができる10^{-5}M以下の平衡解離定数K_Dで、（ｉ）インスリン受容体もしくは（ｉｉ）インスリン及びインスリン受容体を含む複合体、または（ｉ）及び（ｉｉ）の両方に結合する、請求項１８～２０のいずれか１項に記載の方法。

【請求項２２】

前記抗体断片が、任意選択でｐＡＫＴアッセイにおいて、インスリンシグナル伝達活性のEC_{50}を約２倍～１０００倍増加させる、請求項２１に記載の方法。

【請求項２３】

前記抗体断片が、配列番号５～７、８～１０、または５０～１１２に記載される３つの重鎖ＣＤＲと、配列番号１１～１３、１４～１６、または２０～２８に記載される３つの軽鎖ＣＤＲと、を含む、請求項１８～２２のいずれか１項の記載の方法。

【請求項２４】

前記抗体断片が、配列番号５～７または８～１０に記載される３つの重鎖ＣＤＲと、配列番号１１～１３または１４～１６に記載される３つの軽鎖ＣＤＲと、を含む、請求項１８～２２のいずれか１項に記載の方法。

【請求項２５】

前記抗体断片が、配列番号１または２からなる群から選択される重鎖可変領域と、配列番号３または４からなる群から選択される軽鎖可変領域と、を含む、請求項１８～２４の

いずれか１項に記載の方法。
【請求項２６】
前記抗体断片が、配列番号８～１０に記載される３つの重鎖ＣＤＲと、配列番号１４～１６に記載される３つの軽鎖ＣＤＲと、を含む、請求項１８～２４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２７】
前記抗体断片が、配列番号２に記載される可変重鎖アミノ酸配列と、配列番号４に記載される可変軽鎖アミノ酸配列と、を含む、請求項１８～２６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２８】
前記抗体断片が、モノクローナル抗体に由来する、請求項１８～２７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２９】
前記抗体断片が、ヒト抗体に由来する、請求項１８～２８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３０】
前記抗体断片が、Ｆａｂ断片である、請求項１８～２９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３１】
前記抗体断片が、疎水部分にコンジュゲートされている、請求項１８～３０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３２】
前記抗体断片が、医薬組成物に含有される、請求項１８～３１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３３】
前記抗体断片が、前記対象における高インスリン血または過剰なインスリンシグナル伝達を低減する、請求項１８～３２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３４】
前記対象が、投与前に７０ｍｇ／ｄＬ未満の血中グルコースレベルを有する、請求項１８～３３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３５】
前記抗体断片が、０．１～２５ｍｇ／ｋｇの用量で投与される、請求項１８～３４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３６】
前記抗体断片が、約０．０５～１０ｍｇ／ｋｇ、約０．３～６．０ｍｇ／ｋｇ、または約０．１～３ｍｇ／ｋｇの用量で投与される、請求項１８～３５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３７】
前記抗体断片が、低血糖が解消されるまで、１２時間に１回、または１日１回、単一ボーラスで投与される、請求項１８～３６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３８】
前記抗体が、静脈内、動脈内、腹腔内、筋肉内、皮内、皮下、または経口投与される、請求項１８～３７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３９】
投与が、前記対象における血中グルコースを１．５～１０倍または１０～４０％増加させる、請求項１８～３８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４０】
投与が、前記対象における血中グルコースを少なくとも１０ｍｇ／ｄＬ増加させる、請求項１８～３９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４１】
前記対象が、食事制限レジメン中でもある、請求項１８～４０のいずれか１項に記載の

方法。
【請求項４２】
第２の薬剤を投与することをさらに含み、任意選択で、前記第２の薬剤が、グルカゴン及び／またはインスリンである、請求項１８～４１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４３】
前記投与が、膵性膵島細胞症、島細胞拡大、島細胞過形成、β細胞出芽、頻拍、発汗、潮紅、及び認知機能低下からなる群から選択される低血糖の１つ以上の症状を予防または改善する、請求項１８～４２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４４】
前記投与が、２０分以内、任意選択で１５分以内に低血糖を低減または解消する、請求項１８～４３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４５】
前記抗体断片が、約４時間の作用持続時間を有する、請求項１８～４４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４６】
前記対象が、デキストロースまたはグルカゴン療法に非応答性である、請求項１８～４５のいずれか１項に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本出願は、２０１５年８月６日に出願された米国仮特許出願第６２／２０２，１４３号、及び２０１６年１月１９日に出願された米国仮特許出願第６２／２８０，６７５号の優先利益を主張し、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。
【０００２】
発明の分野
本開示は、概して、例えば、内因性または外因性高インスリン血、インスリン過量、薬物誘発性低血糖、インスリン誘発性低血糖、肥満もしくは胃のバイパス手術を受けた患者において食後に生じる低血糖、及び異常なグルコースレベルを特徴とする疾患低血糖状態、ならびに高インスリン血に関連する合併症及び状態に起因する低血糖の治療及び予防において、インスリン受容体へのインスリンの結合を調節するインスリン受容体に特異的な負の調節因子抗体断片の使用に関する。
【背景技術】
【０００３】
発明の背景
本開示は、低血糖疾患状態、及びインスリン、インスリン類似体、もしくはインスリン模倣物の異常な産生及び／または利用を特徴とする状態の治療または予防におけるインスリン－インスリン受容体シグナル伝達複合体の新規調節因子に関する。
【０００４】
インスリンは、血中グルコースレベルを低下させるための主要なホルモンである。インスリン作用における最初のステップは、膜内在性糖タンパク質であり、ＣＤ２２０またはＨＨＦ５とも表記される、インスリン受容体（ＩＮＳＲ）へのホルモンの結合である。インスリンがＩＮＳＲに結合すると、受容体はチロシン自己リン酸化により活性化され、ＩＮＳＲチロシンキナーゼは、インスリン受容体基質－１（ＩＲＳ－１）を含む種々のエフェクター分子をリン酸化し、ホルモン作用をもたらす（Ｕｌｌｒｉｃｈ ｅｔ ａｌ，Ｎａｔｕｒｅ ３１３：７５６－７６１，１９８５、Ｇｏｌｄｆｉｎｅ ｅｔ ａｌ，Ｅｎｄｏｃｒｉｎｅ Ｒｅｖｉｅｗｓ ８：２３５－２５５，１９８７（非特許文献１）、Ｗｈｉｔｅ ａｎｄ Ｋａｈｎ，Ｊｏｕｒｎａｌ Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６９：１－４，１９９４（非特許文献２））。ＩＲＳ－１結合及びリン酸化は、最終的には、筋細胞及び脂肪組織を含むインスリン応答性組織の外膜上の高親和性グルコース輸送（Ｇｌｕｔ４）分子の増加、ならびにしたがって、血液からこれらの組織内へのグルコースの取り込みの

増加をもたらす。Ｇｌｕｔ４は、細胞の小胞から細胞表面に輸送され、ここで、細胞内へのグルコースの輸送及び血中グルコースレベルの減少を後に媒介することができる。

【０００５】

インスリン分泌の異常な増加は、てんかん及び脳損傷を含む顕著な病的状態を生じ得る状態である、重度の低血糖または低血糖（ｂｌｏｏｄ　ｓｕｇａｒ）をもたらす場合がある。薬物誘発性低血糖は、スルホニル尿素薬物の投与またはインスリンの過量に起因し得る。いくつかの稀な病状は、非薬物誘発性内因性高インスリン性低血糖、すなわち、身体の過剰なインスリンの産生により生じる低血中グルコースを特色とする。これらの状態には、先天性高インスリン、インスリノーマ、及び胃のバイパス手術後の高インスリン性低血糖が含まれる。

【０００６】

医原性低血糖は、過剰なインスリンもしくはその類似体の投与、または内因性インスリン分泌を刺激する薬物適用により生じる低血中グルコースの状態及び作用を説明する。根本的だがもっぱらインスリン分泌促進薬またはインスリンによる治療の結果である医原性低血糖は、糖尿病の血糖管理における主要な制限要因である。医原性低血糖は、Ｔ１ＤＭを有する大半の個人及び進行Ｔ２ＤＭを有する多くの個人において反復性病的状態を引き起こし、時には致命的である。低血糖の反復性エピソードは、後の血漿中グルコース濃度の低下に対する身体防御を損ない、種々のサイクルの反復性低血糖を引き起こす。

【０００７】

低血糖は、共調運動の欠如、錯乱、意識消失、発作、及びさらには死を含む、様々な症状をもたらす。

【０００８】

軽度の低血糖の大半のエピソードは、グルコース錠剤または他の炭水化物含有飲料もしくはスナックの摂食により、効果的に自分で治療される。より重度の症状の低血糖も経口炭水化物摂食により治療され得る。しかしながら、錯乱、意識消失、または他の理由により、低血糖患者が経口グルコースサプリメントを摂取できないとき、非経口療法が必要である。病院以外での救済手順として、高血糖ホルモンであるグルカゴンの注射が患者自身もしくは重度の低血糖を認識し、治療するための訓練を受けた患者の関係者によって皮下または筋肉内のいずれかで用いられることがある。医療現場において、静脈内グルコースが標準的な非経口療法である。

【０００９】

先天性高インスリン（ＣＨＩ）には、膵β細胞によるインスリンの未制御分泌に起因する高インスリン性低血糖の反復性エピソードを特徴とする一群の遺伝性障害が含まれる（Ａｒｎｏｕｘ　Ｊ．，ｅｔ　ａｌ．Ｏｒｐｈａｎｅｔ　Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｒａｒｅ　Ｄｉｓｅａｓｅｓ　６：６３（２０１１）（非特許文献３）、Ｙｏｒｉｆｕｊｉ　Ｔ．，Ａｎｎ　Ｐｅｄｉａｔｒ　Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ　Ｍｅｔａｂ　１９：５７－６８（２０１４）（非特許文献４）。ＣＨＩは、新生児、乳児、及び小児期の高インスリン性低血糖の最も一般的な原因であり、通常、生後２年以内に診断される。病理組織学的に、ＣＨＩは、びまん型または局限型のいずれかで存在し得る。びまん型では、全ての膵β細胞が影響を受ける一方で、局限型では、異常なβ細胞の病変は（通常）膵臓の小さい範囲に制限される。最も一般的に知られているＣＨＩの原因は、ＳＵＲ１、及び膵β細胞におけるインスリンの分泌に関与するＡＴＰ感受性カルシウムチャネル（ＫＡＴＰチャネル）のサブユニットであるＫｉｒ６．２をコードする遺伝子における機能喪失型突然変異である。

【００１０】

食後低血糖（ＰＰＨ）が、Ｒｏｕｘ－ｅｎ－Ｙ胃バイパス（ＲＹＧＢ）の一般的な手順後を含む胃のバイパス手術の副作用または合併症として最近観察されている（Ｓｉｎｇｈ　ｅｔ　ａｌ．，Ｄｉａｂｅｔｅｓ　Ｓｐｅｃｔｒｕｍ　２５：２１７－２２１，２０１２（非特許文献５）、Ｐａｔｔｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｄｉａｂｅｔｏｌｏｇｉａ　４８：２２３６－２２４０，２００５（非特許文献６）、Ｓｅｒｖｉｃｅ　ｅｔ　ａｌ．Ｎ　Ｅｎｇｌ　Ｊ　Ｍｅｄ　３５３：２４９－２５４，２００５（非特許文献７））。胃のバイパ

ス手術の一般的に観察される副作用は「ダンピング」であり、これは、単糖の摂食、及び食物の小腸への迅速な排出の結果である。これは、血管運動症状（例えば、潮紅、頻拍）、腹痛、及び下痢を特徴とすることが多い（Ｓｉｎｇｈ ｅｔ ａｌ．，Ｄｉａｂｅｔｅｓ Ｓｐｅｃｔｒｕｍ ２５：２１７－２２１，２０１２（非特許文献８）、Ｍａｔｈｅｗｓ ｅｔ ａｌ．，Ｓｕｒｇｅｒｙ ４８：１８５－１９４，１９６０（非特許文献９））。後期ダンピングは、食後最大数時間で生じ得、近位小腸からの単糖の迅速な吸収に起因する高血糖に応答するインスリンに起因する。術後直ぐに認められ、経時的に改善するダンピングとは対照的に、高インスリン性低血糖は、胃のバイパス手術後、数ヶ月から数年間（通常、約１年、最大３年）見られる。この症候群は、典型的にはダンピングが見られない重度の食後神経低糖症の発症、ならびに膵性膵島細胞症（島細胞拡大、管上皮からのβ細胞出芽、及び管に並置する島）により、ダンピングとは異なる。ダンピングとは異なり、栄養改善は食後低血糖（ＰＰＨ）の症状を軽減しない。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【００１１】

【非特許文献１】Ｕｌｌｒｉｃｈ ｅｔ ａｌ，Ｎａｔｕｒｅ ３１３：７５６－７６１，１９８５、Ｇｏｌｄｆｉｎｅ ｅｔ ａｌ，Ｅｎｄｏｃｒｉｎｅ Ｒｅｖｉｅｗｓ ８：２３５－２５５，１９８７

【非特許文献２】Ｗｈｉｔｅ ａｎｄ Ｋａｈｎ，Ｊｏｕｒｎａｌ Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６９：１－４，１９９４

【非特許文献３】Ａｒｎｏｕｘ Ｊ．，ｅｔ ａｌ．Ｏｒｐｈａｎｅｔ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｒａｒｅ Ｄｉｓｅａｓｅｓ ６：６３（２０１１）

【非特許文献４】Ｙｏｒｉｆｕｊｉ Ｔ．，Ａｎｎ Ｐｅｄｉａｔｒ Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ Ｍｅｔａｂ １９：５７－６８（２０１４）

【非特許文献５】Ｓｉｎｇｈ ｅｔ ａｌ．，Ｄｉａｂｅｔｅｓ Ｓｐｅｃｔｒｕｍ ２５：２１７－２２１，２０１２

【非特許文献６】Ｐａｔｔｉ ｅｔ ａｌ．，Ｄｉａｂｅｔｏｌｏｇｉａ ４８：２２３６－２２４０，２００５

【非特許文献７】Ｓｅｒｖｉｃｅ ｅｔ ａｌ．Ｎ Ｅｎｇｌ Ｊ Ｍｅｄ ３５３：２４９－２５４，２００５

【非特許文献８】Ｓｉｎｇｈ ｅｔ ａｌ．，Ｄｉａｂｅｔｅｓ Ｓｐｅｃｔｒｕｍ ２５：２１７－２２１，２０１２

【非特許文献９】Ｍａｔｈｅｗｓ ｅｔ ａｌ．，Ｓｕｒｇｅｒｙ ４８：１８５－１９４，１９６０

【発明の概要】

【００１２】

本開示は、低血糖を有する患者を治療するためのインスリン受容体に対する負の調節因子抗体断片の使用に関する。かかる調節因子は、例えば、例えばインスリン過量に起因する内因性もしくは外因性高インスリン血、及び異常なグルコースレベルを特徴とする疾患低血糖状態に起因する低血糖症に罹患している哺乳類対象を治療するために使用され得る。かかる調節因子は、肥満手術を受けた、もしくは遺伝性の代謝及びインスリン感受性障害を有する、１型（例えば、脆性）を有する患者、または２型糖尿病患者など、リスクのある対象における低血糖の再発を予防するためにも使用され得る。

【００１３】

種々の実施形態では、本発明は、配列番号５～７、８～１０、及び５０～１１２に記載されるアミノ酸配列を有する３つの重鎖ＣＤＲと、配列番号１４～１６または配列番号２０～２８に記載されるアミノ酸配列を有する３つの軽鎖ＣＤＲと、を含む、抗体またはその断片を提供し、この抗体またはその断片は、（ｉ）インスリン受容体もしくは（ｉｉ）インスリン及びインスリン受容体を含む複合体、または（ｉ）及び（ｉｉ）の両方に結合する。例えば、一実施形態では、本発明は、重鎖可変領域アミノ酸配列が、配列番号１、

２、または２９～４９に記載され、軽鎖可変領域アミノ酸配列が、配列番号４または１７～１９に記載される、抗体またはその断片を提供する。

【００１４】

種々の実施形態では、本発明は、配列番号５～７、８～１０、５０～５２、５３～５５、５６～５８、５９～６１、６２～６４、６５～６７、６８～７０、７１～７３、７４～７６、７７～７９、８０～８２、８３～８５、８６～８８、８９～９１、９２～９４、９５～９７、９８～１００、１０１～１０３、１０４～１０６、１０７～１０９、または１１０～１１２に記載されるアミノ酸配列を有する３つの重鎖ＣＤＲと、配列番号１１～１３、１４～１６、または配列番号２０～２８に記載されるアミノ酸配列を有する３つの軽鎖ＣＤＲと、を含む、抗体またはその断片を提供し、この抗体またはその断片は、（ｉ）インスリン受容体もしくは（ｉｉ）インスリン及びインスリン受容体を含む複合体、または（ｉ）及び（ｉｉ）の両方に結合する。例えば、いくつかの実施形態では、本発明は、重鎖可変領域アミノ酸配列が、配列番号１、２、または２９～４９に記載され、軽鎖可変領域アミノ酸配列が、配列番号３、４、または１７～１９に記載される、抗体またはその断片を提供する。

【００１５】

種々の実施形態では、本開示は、配列番号８～１０に記載されるアミノ酸配列を有する３つの重鎖ＣＤＲと、配列番号１４～１６に記載されるアミノ酸配列を有する３つの軽鎖ＣＤＲと、を含む、抗体またはその断片を提供し、この抗体またはその断片は、（ｉ）インスリン受容体もしくは（ｉｉ）インスリン及びインスリン受容体を含む複合体、または（ｉ）及び（ｉｉ）の両方に結合する。種々の実施形態では、重鎖可変領域アミノ酸配列は、配列番号２に記載され、軽鎖可変領域アミノ酸配列は、配列番号４に記載される。

【００１６】

配列番号５～７または８～１０に記載されるアミノ酸配列を有する３つの重鎖ＣＤＲと、配列番号１１～１３または１４～１６に記載されるアミノ酸配列を有する３つの軽鎖ＣＤＲと、を含む、抗体断片も提供され、この抗体断片は、ｉ）インスリン受容体もしくは（ｉｉ）インスリン及びインスリン受容体を含む複合体、または（ｉ）及び（ｉｉ）の両方に結合する。種々の実施形態では、重鎖可変領域アミノ酸配列は、配列番号１または２に記載され、軽鎖可変領域アミノ酸配列は、配列番号３または４に記載される。

【００１７】

種々の実施形態では、抗体またはその断片は、Ｆａｂ断片である。

【００１８】

種々の実施形態では、抗体または断片は、ＦａｂまたはＦａｂ変異型を含む他の抗体または断片よりも小さい程度でヘパリンに結合する。

【００１９】

種々の実施形態では、抗体またはその断片は、インスリンとインスリン受容体との間の結合親和性を少なくとも約１．５倍、任意選択で最大１０００倍弱めることができる10^{-5}Ｍ以下の平衡解離定数K_Dで、（ｉ）インスリン受容体もしくは（ｉｉ）インスリン及びインスリン受容体を含む複合体、または（ｉ）及び（ｉｉ）の両方に結合する。ある特定の実施形態では、抗体は、該インスリンとインスリン受容体との間の結合親和性を約２倍～５００倍弱めることができる。種々の実施形態では、抗体は、任意選択でｐＡＫＴアッセイにおいて、インスリンシグナル伝達活性のEC_{50}を約２倍～１０００倍増加させる。任意選択で、結合親和性は、K_A、K_D、オフ速度に対するオン速度の比率、またはオン速度に対するオフ速度の比率のうちのいずれか１つである。

【００２０】

種々の実施形態では、抗体またはその断片は、モノクローナル抗体である。種々の実施形態では、抗体またはその断片は、ヒト抗体である。

【００２１】

種々の実施形態では、抗体またはその断片は、疎水部分にコンジュゲートされている。

【００２２】

種々の実施形態では、抗体またはその断片は、医薬組成物に含有される。

【００２３】

種々の実施形態では、本開示は、滅菌医薬組成物の調製方法を企図し、滅菌された医薬上許容される希釈剤を、本明細書に企図される抗体またはその断片に添加することを含む。任意選択で、殺菌剤または静菌剤などの少量の保存剤も本組成物に含まれる。本明細書に記載される抗体またはその断片及び滅菌された医薬上許容される希釈剤を含む滅菌組成物も企図される。

【００２４】

種々の実施形態では、本発明は、低血糖を治療または予防する方法を提供し、これには、それを必要とする対象に、低血糖を改善または予防するのに有効な量で、インスリン受容体へのインスリン結合及び／またはインスリン受容体でのインスリン作用の負の調節因子である抗体またはその断片を投与することが含まれる。任意選択で、低血糖は、スルホニル尿素誘発性低血糖、インスリン誘発性低血糖、夜間低血糖、及び肥満手術後の低血糖からなる群から選択される。

【００２５】

種々の実施形態では、本発明は、夜間低血糖を治療または予防する方法を提供し、これには、それを必要とする対象に、夜間低血糖を改善または予防するのに有効な量で、インスリン受容体へのインスリン結合及び／またはインスリン受容体でのインスリン作用の負の調節因子である抗体またはその断片を投与することが含まれる。

【００２６】

種々の実施形態では、本発明は、インスリンとインスリン受容体との間の結合親和性を少なくとも約１．５倍、任意選択で最大１０００倍弱めることができる10^{-5}Ｍ以下の平衡解離定数K_Dで、（ｉ）インスリン受容体もしくは（ｉｉ）インスリン及びインスリン受容体を含む複合体、または（ｉ）及び（ｉｉ）の両方に結合する抗体断片を投与することを含む方法を提供する。任意選択で、抗体断片は、任意選択でｐＡＫＴアッセイにおいて、インスリンシグナル伝達活性のEC_{50}を約２倍～１０００倍増加させる

【００２７】

種々の実施形態では、本発明は、配列番号５～７、８～１０、５０～５２、５３～５５、５６～５８、５９～６１、６２～６４、６５～６７、６８～７０、７１～７３、７４～７６、７７～７９、８０～８２、８３～８５、８６～８８、８９～９１、９２～９４、９５～９７、９８～１００、１０１～１０３、１０４～１０６、１０７～１０９、または１１０～１１２に記載されるアミノ酸配列を有する３つの重鎖ＣＤＲと、配列番号１１～１３、１４～１６、または配列番号２０～２８に記載されるアミノ酸配列を有する３つの軽鎖ＣＤＲと、を含み、または重鎖可変領域アミノ酸配列が、配列番号１、２、または２９～４９に記載され、軽鎖可変領域アミノ酸配列が、配列番号３、４、または１７～１９に記載される、抗体断片を投与することを含む方法を提供する。例えば、いくつかの実施形態では、本発明は、配列番号５～７または８～１０に記載されるアミノ酸配列を有する３つの重鎖ＣＤＲと、配列番号１４～１６もしくは配列番号２０～２８に記載されるアミノ酸配列を有する３つの軽鎖ＣＤＲと、を含む、抗体断片、または配列番号２に記載されるアミノ酸配列を有する可変重鎖と、配列番号４もしくは１７～１９に記載されるアミノ酸配列を有する可変軽鎖と、を含む抗体断片を投与することを提供する。一実施形態では、３つの重鎖ＣＤＲは、配列番号８～１０に記載されるアミノ酸配列を有し、３つの軽鎖ＣＤＲは、配列番号１４～１６に記載されるアミノ酸配列を有する。一実施形態では、重鎖可変領域アミノ酸配列は、配列番号２に記載され、軽鎖可変領域アミノ酸配列は、配列番号４に記載される。

【００２８】

種々の実施形態では、本発明は、モノクローナル抗体、例えば、ヒト抗体からの抗体断片を投与することを含む方法を提供する。

【００２９】

種々の実施形態では、本発明は、Ｆａｂ断片である抗体断片を投与することを含む方法

を提供する。
【００３０】
種々の実施形態では、本発明は、疎水部分にコンジュゲートされた抗体断片を投与することを含む方法を提供する。
【００３１】
種々の実施形態では、本発明は、医薬組成物に含有される抗体断片を投与することを含む方法を提供する。
【００３２】
種々の実施形態では、抗体断片の投与は、対象における高インスリン血または過剰なインスリンシグナル伝達に関連する合併症を低減する。
【００３３】
種々の実施形態では、対象は、本明細書に記載される抗体の投与前に、７０ｍｇ／ｄＬ未満の血中グルコースレベルを有する。任意選択で、対象は、投与前に、５５ｍｇ／ｄＬ未満の血中グルコースレベルを有する。
【００３４】
種々の実施形態では、抗体またはその断片は、０．１～２５ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。種々の実施形態では、抗体またはその断片は、０．３～９ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。企図されるさらなる用量は、約０．３～１５ｍｇ／ｋｇ、約０．０５～１０ｍｇ／ｋｇ、約０．３～６．０ｍｇ／ｋｇ、約０．１～３ｍｇ／ｋｇ、または約１～６ｍｇ／ｋｇを含む。例示的な用量としては、０．１ｍｇ／ｋｇ、０．３ｍｇ／ｋｇ、０．５ｍｇ／ｋｇ、０．７５ｍｇ／ｋｇ、１．０ｍｇ／ｋｇ、１．５ｍｇ／ｋｇ、２ｍｇ／ｋｇ、３ｍｇ／ｋｇ、４ｍｇ／ｋｇ、５ｍｇ／ｋｇ、６ｍｇ／ｋｇ、７ｍｇ／ｋｇ、８ｍｇ／ｋｇ、９ｍｇ／ｋｇ、１０ｍｇ／ｋｇ、１１ｍｇ／ｋｇ、１２ｍｇ／ｋｇ、１３ｍｇ／ｋｇ、１４ｍｇ／ｋｇ、１５ｍｇ／ｋｇ、１６ｍｇ／ｋｇ、１７ｍｇ／ｋｇ、１８ｍｇ／ｋｇ、１９ｍｇ／ｋｇ、２０ｍｇ／ｋｇ、２１ｍｇ／ｋｇ、２２ｍｇ／ｋｇ、２３ｍｇ／ｋｇ、２４ｍｇ／ｋｇ、または２５ｍｇ／ｋｇが挙げられる。他の用量としては、１ｍｇ／日、２．５ｍｇ／日、５ｍｇ／日、１０ｍｇ／日、２０ｍｇ／日、２５ｍｇ／日、５０ｍｇ／日、７５ｍｇ／日、１００ｍｇ／日、１５０ｍｇ／日、２００ｍｇ／日、２５０ｍｇ／日、５００ｍｇ／日、または１０００ｍｇ／日が挙げられる。
【００３５】
種々の実施形態では、抗体またはその断片は、例えば、２～１２時間毎に、単一ボーラスで投与される。１日１回、ならびに連続注入、任意選択で低用量連続注入の投与も企図される。投与に関するさらなる用量及び方法は、発明を実施するための形態においてより詳細に論じられる。
【００３６】
種々の実施形態では、抗体またはその断片は、静脈内、動脈内、腹腔内、鼻孔内、筋肉内、皮内、皮下、経口、または連続注入により投与される。種々の実施形態では、抗体またはその断片は、連続注入ポンプまたはデポ剤を介して投与される。
【００３７】
種々の実施形態では、抗体またはその断片の投与は、対象における血中グルコースを１．５～１０倍または１０～４０％増加させる。種々の実施形態では、投与は、対象における血中グルコースを１．５～１０倍以上または１０～４０％以上増加させる。種々の実施形態では、絶食時の血中グルコースは、未治療の対象と比較して、約１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％以上増加する。種々の実施形態では、投与は、対象における血中グルコースを約１０ｍｇ／ｄＬ以上増加させる。種々の実施形態では、投与は、血中グルコースを増加させ、正常な範囲に戻す。
【００３８】
種々の実施形態では、対象は食事制限レジメン中である。
【００３９】
種々の実施形態では、本発明による方法は、第２の薬剤を投与することをさらに含む。

種々の実施形態では、第２の薬剤は、インスリン、グルカゴン、アカルボース、オクトレオチド、ベラパミル、またはジアゾキシドである。

【００４０】

本明細書に記載される前述の抗体またはその断片のいずれかが補助療法として当該技術分野において既知のまたは本明細書に記載されるいずれの抗糖尿病薬と同時に投与され得ることがさらに企図される。他の抗糖尿病薬と共に抗体またはその断片を含む組成物も企図される。

【００４１】

いくつかの抗糖尿病薬が既知であり、これには、１）スルホニル尿素（例えば、グリメピリド、グリセンチド、スルホニル尿素、ＡＹ３１６３７）、２）ビグアニド（例えば、メトホルミン）、３）アルファ－グルコシダーゼ阻害剤（例えば、アカルボース、ミグリトール）、４）チアゾール－イジンジオン（例えば、トログリタゾン、ピオグリタゾン、ロシグリタゾン、グリピジド、バラグリタゾン、リボグリタゾン、ネトグリタゾン、トログリタゾン、エングリタゾン、ＡＤ　５０７５、Ｔ　１７４、ＹＭ　２６８、Ｒ　１０２３８０、ＮＣ　２１００、ＮＩＰ　２２３、ＮＩＰ　２２１、ＭＫ　０７６７、シグリタゾン、アダグリタゾン、ＣＬＸ　０９２１、ダルグリタゾン、ＣＰ　９２７６８、ＢＭ　１５２０５４）、５）グルカゴン様ペプチド（ＧＬＰ）及びＧＬＰ類似体、またはＧＬＰ－１受容体のアゴニスト（例えば、キセンディン）もしくはその安定剤（例えば、ＤＰＰ４阻害剤、シタグリプチンなど）、ならびに６）インスリンまたはその類似体もしくは模倣物（例えば、ＬＡＮＴＵＳ（登録商標）が含まれるが、これらに限定されない。

【００４２】

種々の実施形態では、抗体またはその断片の投与は、膵性膵島細胞症、島細胞拡大、島細胞過形成、β細胞出芽、頻拍、発汗、潮紅、及び認知機能低下からなる群から選択される低血糖の１つ以上の症状を予防または改善する。

【００４３】

種々の実施形態では、抗体またはその断片の投与は、２０分以内、任意選択で１５分以内に低血糖を低減または解消する。

【００４４】

種々の実施形態では、抗体またはその断片は、約４～６時間の作用持続時間を有する。

【００４５】

種々の実施形態では、対象は、デキストロースまたはグルカゴン療法に非応答性である。

【００４６】

種々の実施形態では、本発明は、インスリンとインスリン受容体（ＩＮＳＲ）との間の結合親和性または結合速度パラメータを少なくとも約１．５倍～５倍低減することができる、10^{-5}Ｍ以下の平衡解離定数K_Dでインスリン受容体ならびに／またはインスリン及びインスリン受容体を含む複合体に結合する抗体またはその断片を提供する。種々の実施形態では、K_Dは、少なくとも10^{-6}、10^{-7}、10^{-8}、10^{-9}、10^{-10}、10^{-11}、または10^{-12}Ｍである。種々の実施形態では、抗体断片のK_Dは、四量体抗体のK_Dよりも強い。

【００４７】

種々の実施形態では、インスリンとＩＮＳＲとの間の結合親和性を弱める抗体またはその断片は、負の調節因子である。いくつかの実施形態では、インスリンとＩＮＳＲとの間の結合親和性を弱める抗体またはその断片は、アンタゴニストである。

【００４８】

関連態様では、インスリン結合を１．５倍～５倍減少させる本明細書に記載される抗体またはその断片は、インスリン媒介シグナル伝達の強力な調節因子でもある。

【００４９】

ある特定の実施形態では、本発明は、少なくとも10^{-5}、10^{-6}、10^{-7}、10^{-8}、10^{-9}、10^{-10}、10^{-11}、または10^{-12}Ｍの親和性でインスリン受

容体に結合し、（任意でｐＡＫＴアッセイにおいて）約５倍～１０００倍でインスリン媒介シグナル伝達の阻害を呈する負のアロステリック調節因子抗体を提供する。

【００５０】

種々の実施形態では、負のアロステリック調節因子は、協同作用因子アルファにおいて２倍未満（α≦２）の変化、及び協同作用因子ベータにおいて５～５００倍の変化（５≦β≦５００）を呈する。

【００５１】

本開示は、本開示の抗体またはその断片がＩＮＳＲとインスリン、インスリン類似体、またはインスリン模倣物との間の結合を調節することをさらに企図する。種々の実施形態では、本開示の抗体またはその断片は、動物モデルにおけるインビトロもしくはインビボでのグルコース取り込み、好ましくは外因性インスリンにより誘発されたグルコース取り込み、またはスルホニル尿素及び他の薬物など、他の薬理学的治療により誘発されたインスリン産生を減少させることを含むが、これらに限定されない望ましい生物学的特性も呈する。一部の実施形態では、抗体またはその断片は、グルコース取り込みの速度もしくは総量、またはそれらの両方を減少させることができる。

【００５２】

別の態様では、本発明は、過剰なインスリンシグナル伝達として現れるインスリンの異常な産生及び／または感受性である高インスリン血に関連する状態または障害を治療する方法を提供し、これには、インスリン過剰産生及び／または感受性を治療するのに有効な量で、本開示の負の調節因子抗体もしくはアンタゴニスト抗体、またはそれらの断片を必要とする対象にそれを投与することが含まれる。

【００５３】

一実施形態では、インスリン感受性に関連する障害は、癌、カポジ肉腫、インスリノーマ、糖尿病性腎疾患、低血糖、膵島細胞症（ＫＡＴＰ－Ｈｌびまん性疾患、ＫＡＴＰ－Ｈｌ局限性疾患、または「ＰＨＨＩ」）、ＧＤＨ－Ｈｌ（高インスリン症／高アンモニア血症症候群（ＨＩ／ＨＡ）、ロイシン感受性低血糖、またはジアゾキシド感受性低血糖）、島細胞調節不全症候群、乳児期の特発性低血糖、乳児期の持続性高インスリン性低血糖（ＰＨＨＩ）、及び先天性高インスリン症、インスリン過量、腎不全に起因する低血糖（急性または慢性）、Ｎｉｓｓｅｎ噴門形成術、膵島細胞の肝臓への自家移植に起因する低血糖、及び慢性腎疾患、例えば、ＩＩＩ型、ＩＶ型、もしくはＶ型からなる群から選択される。

【００５４】

種々の実施形態では、リスクのある対象は、ある特定の食事が低血糖を引き起こすことが知られる対象であり、例えば、食事が与えられ、混合食試験（ＭＭＴ）が行われ、リスクのある対象は低血糖を引き起こすことが多い。

【００５５】

種々の実施形態では、リスクのある対象は、低血糖症のエピソードが以前にあった対象、任意選択でスルホニル尿素の薬物適用またはインスリンにより治療を受けた対象、高齢の対象、または糖尿病もしくは先天性高インスリン症を有する対象である。

【００５６】

リスクのある対象への症状の開始前または開始時における投与は、代替えのまたは現在の標準管理治療の必要性を低減する、膵切除の必要性を低減する、及び治療された対象の医師の訪問回数を低減することができる。

【００５７】

一実施形態では、抗体は、抗体もしくはその断片、または抗体の抗原結合ドメインを含むポリペプチドを指す。例示的な抗体または抗体断片としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、多特異性抗体、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆｖ、ドメイン抗体（ｄＡｂ）、相補性決定領域（ＣＤＲ）断片、ＣＤＲ移植抗体、１本鎖抗体（ｓｃＦｖ）、１本鎖抗体断片、キメラ抗体、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ミニボディ、直鎖状抗体、キレート化組換え抗体、トリ

ボディもしくはバイボディ（ｂｉｂｏｄｙ）、イントラボディ、ナノボディ、小モジュラー免疫薬（ＳＭＩＰ）、抗原結合ドメイン免疫グロブリン融合タンパク質、ラクダ化抗体、ＶＨＨ含有抗体、またはその変異型もしくは誘導体、及び１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つのＣＤＲ配列など、ポリペプチドに特異的抗原結合を付与するのに十分である免疫グロブリンの少なくとも一部を含有するポリペプチドが挙げられる。一実施形態では、抗体は、モノクローナル抗体である。関連する実施形態では、抗体は、ヒト抗体である。

【００５８】

例示的な実施形態では、本明細書の方法は、以下の使用を企図する：

それぞれ、配列番号５～１０及び配列番号５０～１１２及び配列番号１１～１６及び配列番号２０～２８のうちのいずれか１つのＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、もしくはＬＣＤＲ３のうちのいずれか１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つを保持し、任意選択で、かかるＣＤＲ（複数可）に１つまたは２つの突然変異、例えば、保存的または非保存的置換を含む、モノクローナル抗体またはその断片、

それぞれ、配列番号５～１０、５０～１１２、または配列番号１、２、もしくは２９～４９のうちのいずれか１つのＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３の全て、または重鎖可変領域を保持し、任意選択で、かかるＣＤＲ（複数可）のいずれかに１つまたは２つの突然変異を含み、任意選択で、任意の好適な重鎖定常領域、例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＭ、ＩｇＡ１、ＩｇＡ２、もしくはＩｇＥ、またはそれらのハイブリッドをさらに含む、モノクローナル抗体またはその断片、

いずれか１つの配列番号１１～１６、または配列番号３もしくは４、または配列番号２０～２８、または配列番号１７～１９のＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、ＬＣＤＲ３の全て、あるいは軽鎖可変領域を保持し、任意選択で、かかるＣＤＲ（複数可）のいずれかに１つまたは２つの突然変異を含み、任意選択で、任意の好適な軽鎖定常領域、例えば、カッパもしくはラムダ軽鎖定常領域をさらに含む、モノクローナル抗体またはその断片、

配列番号１、２、２９～４９、及び４または１７～１９に記載される重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含むモノクローナル抗体の精製調製物、

配列番号２及び４、または１７～１９に記載される重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含むモノクローナル抗体の精製調製物、

例えば、Ｘ線結晶学、または重水素交換質量分析、アラニン走査、及びペプチド断片ＥＬＩＳＡなどの他の生物学的もしくは生化学的技法により決定されるとき、配列番号１～４、１７～１９、または２９～４９のうちのいずれか１つに記載される可変領域を含む抗体として、ＩＮＳＲの同じ直鎖状または３次元エピトープに結合するモノクローナル抗体、

配列番号１～４、１７～１９、または２９～４９のうちのいずれか１つに記載される可変領域を含み、任意選択で、約７５％超、約８０％超、または約８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、または９５％超でヒトＩＮＳＲに結合するために、表１にあるように対合された抗体と競合するモノクローナル抗体。

【００５９】

いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号１～４、１７～１９、または２９～４９に記載される可変領域を含む抗体の３つ全ての軽鎖ＣＤＲ、３つ全ての重鎖ＣＤＲ、または６つ全てのＣＤＲを含む。いくつかの例示的な実施形態では、抗体からの２つの軽鎖ＣＤＲは、異なる抗体からの第３の軽鎖ＣＤＲと組み合わせられ得る。代替えとして、１つの抗体からのＬＣＤＲ１は、特にＣＤＲが高度に相同である場合、異なる抗体からのＬＣＤＲ２及びまた別の抗体からのＬＣＤＲ３と組み合わせられ得る。同様に、ある抗体からの２つの重鎖ＣＤＲが、異なる抗体からの第３の重鎖ＣＤＲと組み合わせられ得るか、または１つの抗体からのＨＣＤＲ１が、特にＣＤＲが高度に相同である場合、異なる抗体からのＨＣＤＲ２及びまた別の抗体からのＨＣＤＲ３と組み合わせられ得る。

【００６０】

コンセンサスＣＤＲも使用され得る。本明細書において得られるコンセンサスＣＤＲのうちのいずれか１つは、本明細書に記載される抗体のいずれかの同じ鎖（例えば、重または軽）からの２つの他のＣＤＲと組み合わされて、例えば、好適な重鎖または軽鎖可変領域を形成することができる。例示的なコンセンサス配列は、表１及び図１９に記載される配列を決定された形態であり得る。例示的なコンセンサス配列は、重鎖及び／または軽鎖可変領域配列、ならびにＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、及び／またはＬＣＤＲ３アミノ酸配列について決定され得る。

【００６１】

別の態様では、本開示は、本明細書に記載される抗体の変異型または誘導体の使用を提供する。例えば、一実施形態では、抗体は、本明細書に記載される検出可能な部分で標識される。さらなる実施形態では、抗体は、本明細書に記載される疎水部分にコンジュゲートされている。

【００６２】

抗体の変異型は、アミノ酸挿入、欠失、または置換、例えば、保存的もしくは非保存的置換を含む、本明細書に提供されるアミノ酸配列に突然変異または改変を有する抗体を含む。

【００６３】

いくつかの実施形態では、配列番号１、２、または２９～４９に記載される重鎖可変領域と少なくとも約６５％、７０％、７５％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％以上同一であるアミノ酸配列及び／または配列番号３もしくは４、または１７～１９に記載される軽鎖可変領域と少なくとも約６５％、７０％、７５％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％以上同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む抗体が提供され、本抗体は、ＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２、ＣＤＲＨ３、ＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２、またはＣＤＲＬ３のうちの少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または全てをさらに含む。いくつかの実施形態では、軽鎖可変領域と同一パーセントを有するアミノ酸配列は、軽鎖ＣＤＲのうちの１つ、２つ、または３つを含み得る。他の実施形態では、重鎖可変領域と同一パーセントを有するアミノ酸配列は、重鎖ＣＤＲのうちの１つ、２つ、または３つを含み得る。

【００６４】

本明細書に使用される抗体は、抗体のＣＤＲ領域に１つまたは２つ以上のアミノ酸置換、例えば、保存的置換を有し得る。

【００６５】

種々の実施形態では、本方法に使用される抗体は、配列番号１、２、または２９～４９からなる群から選択される重鎖可変領域と、配列番号３もしくは４、または１７～１９からなる群から選択される軽鎖可変領域と、を含む。種々の実施形態では、可変重鎖は、配列番号２に記載され、可変軽鎖は、配列番号４もしくは１７～１９に記載される。

【００６６】

種々の実施形態では、抗体は、配列番号５～７、８～１０、または５０～１１２に記載される３つの重鎖ＣＤＲと、配列番号１１～１３、１４～１６、２０～２２、２３～２５、及び２６～２８に記載される３つの軽鎖ＣＤＲと、を含む。

【００６７】

一実施形態では、可変重鎖は、配列番号２に記載され、可変軽鎖は、配列番号４に記載される。別の実施形態では、抗体は、配列番号８～１０に記載される３つの重鎖ＣＤＲと、配列番号１４～１６または２０～２２、２３～２５及び２６～２８に記載される３つの軽鎖ＣＤＲと、を含む。

【００６８】

種々の実施形態では、投与は絶食レジメン中に行われる。

【００６９】
種々の実施形態では、投与はインスリン抵抗性を誘発する。種々の実施形態では、インスリン抵抗性は、食事負荷試験、インスリン負荷試験絶食ＨＯＭＡ－ＩＲアッセイ、及び／または経口グルコース負荷試験により測定される。
【００７０】
本明細書に記載される障害のいずれかの治療のための薬剤の調製におけるインスリン－ＩＮＳＲシグナル伝達相互作用を調節する、本明細書に記載される前述の抗体またはポリペプチドのいずれかの使用も企図される。任意選択で好適な使用説明書と共に、前述の抗体またはポリペプチドのいずれかを含む、注射器、例えば、単一使用または事前充填注射器、減菌密閉容器、例えば、バイアル、瓶、管、及び／またはキットもしくはパッケージも企図される。
【００７１】
本明細書に記載される各特徴もしくは実施形態、または組み合わせは、本開示の態様のいずれかの非限定的な例示的な例であり、そのため、本明細書に記載される任意の他の特徴もしくは実施形態、または組み合わせと組み合わせ可能であることを意味することを理解する。例えば、特徴が、「一実施形態」、「いくつかの実施形態」、「さらなる実施形態」、「特定の例示的な実施形態」、及び／または「別の実施形態」などの用語で説明される場合、これらの種類の実施形態のそれぞれは、全ての可能な組み合わせを列記する必要なく、本明細書に記載される任意の他の特徴、または特徴の組み合わせと組み合わされることが意図される特徴の非限定的な例である。かかる特徴または特徴の組み合わせは、本開示の態様のいずれかに適用される。同様に、方法がある特定の特徴を特徴とする抗体などのポリペプチド結合剤の使用または特定を説明する場合、それらの特徴を特徴とするポリペプチド結合剤も本開示により企図される。範囲内に入る値の例が開示される場合、これらの例のいずれも範囲の可能なエンドポイントとして企図され、かかるエンドポイントの間の任意の及び全ての数値が企図され、上限及び下限のエンドポイントの任意の及び全ての組み合わせが想定される。
【図面の簡単な説明】
【００７２】
【図１】フローサイトメトリーを用いた、ヒトＩＮＳＲを発現するＣＨＯ細胞におけるＸＰＡ．１５．２４７親抗体（ＩｇＧ　２４７）及びその変異型ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８（ＩｇＧ　２４７．２．０１８）の結合を比較する代表的な結果を示す。
【図２】フローサイトメトリーを用いた、ヒトＩＮＳＲを発現するＣＨＯ細胞におけるＸＰＡ．１５．２４７親Ｆａｂ（Ｆａｂ２４７）及びその変異型ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂ（Ｆａｂ　２４７．２．０１８）の結合を比較する代表的な結果を示す。
【図３】図３Ａは、ＸＰＡ．１５．２４７親抗体及びその変異型ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８を調節する抗ヒトＩＮＳＲによりもたらされるインスリン用量応答の感受性（ＥＣ５０）の変化を示すｐＡＫＴアッセイ結果を示す。ＸＰＡ．１５．２４７及びＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８抗体の単量体Ｆａｂ断片からの結果も示される。図３Ｂは、ＥＣ８０濃度のインスリンで評価されたＣＨＯ－ｈｕＩＮＳＲ細胞におけるｐＡｋｔ活性を調節したときのＸＰＡ．１５．２４７親抗体及びその変異型ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８抗体、ならびにＦａｂ断片の効力を示す。
【図４Ａ】ウィスターラットにおけるスルホニル尿素誘発性低血糖に対するＸＰＡ．１５．２４７親抗体の作用を示す。
【図４Ｂ】ウィスターラットにおけるスルホニル尿素誘発性低血糖に対する変異型ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　ＩｇＧの作用を示す。
【図４Ｃ】ウィスターラットにおけるスルホニル尿素誘発性低血糖に対する変異型ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂの作用を示す。
【図４Ｄ】試験の全時間過程の間のグルコース読み取りを示す。
【図５】図５Ａは、スプラーグドーリーラットにおけるインスリン誘発性低血糖に対する

ＸＰＡ．１５．２４７親抗体の作用を示す。図５Ｂは、スプラーグドーリーラットにおけるインスリン誘発性低血糖に対する変異型ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂの作用を示す。

【図６－１】本開示による抗体及びその断片のアミノ酸配列を示す。

【図６－２】本開示による抗体及びその断片のアミノ酸配列を示す。

【図７】ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８はヘパリンを結合しないが、２つの他のＦａｂ変異型はヘパリンを非特異的に結合することを示す。

【図８】インスリン誘発性の重度の低血糖の反転に対するＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂの作用を示す。

【図９】図９Ａ～９Ｂは、静脈内投与によるラットにおけるＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂの薬物動態を示す。図９Ａは、最大８時間の初期の時間点を示す。図９Ｂは、最大４８時間の全時間過程を示す。

【図１０Ａ】図１０Ａ～１０Ｃは、静脈内、筋肉内、または皮下投与後のゲッティンゲンミニブタにおけるＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂの薬物動態及び薬物動力を示す。図１０Ａは、最大８時間の初期の時間点を示す。

【図１０Ｂ】図１０Ａ～１０Ｃは、静脈内、筋肉内、または皮下投与後のゲッティンゲンミニブタにおけるＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂの薬物動態及び薬物動力を示す。図１０Ｂは、全時間過程を示す。

【図１０Ｃ】図１０Ａ～１０Ｃは、静脈内、筋肉内、または皮下投与後のゲッティンゲンミニブタにおけるＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂの薬物動態及び薬物動力を示す。図１０Ｃは、ゲッティンゲンミニブタにおけるＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂの血中グルコース変化を示す。

【図１１Ａ】図１１Ａ～１１Ｃは、ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂの単一の静脈内、筋肉内、または皮下投与による、正常なゲッティンゲンミニブタにおけるベツリン（Ｖｅｔｓｕｌｉｎ）誘発性低血糖の反転を示す。図１１Ａは、１０ｍｇ／ｋｇ及び２ｍｇ／ｋｇの両方でのＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂの静脈内投与を示す。

【図１１Ｂ】図１１Ａ～１１Ｃは、ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂの単一の静脈内、筋肉内、または皮下投与による、正常なゲッティンゲンミニブタにおけるベツリン（Ｖｅｔｓｕｌｉｎ）誘発性低血糖の反転を示す。図１１Ｂは、５ｍｇ／ｋｇでのＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂの筋肉内投与を示す。

【図１１Ｃ】図１１Ａ～１１Ｃは、ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂの単一の静脈内、筋肉内、または皮下投与による、正常なゲッティンゲンミニブタにおけるベツリン（Ｖｅｔｓｕｌｉｎ）誘発性低血糖の反転を示す。図１１Ｃは、９ｍｇ／ｋｇでのＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂの皮下投与を示す。

【図１２】９ｍｇ／ｋｇでのＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂの単一皮下投与による、正常なゲッティンゲンミニブタにおけるベツリン誘発性低血糖の予防を示す。

【図１３Ａ】図１３Ａ～１３Ｂは、１週間に１回のＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　ＩｇＧの静脈内投与後のスプラーグドーリーラットにおける絶食時及び摂食時の血中グルコースレベルを示す。図１３Ａは、絶食８時間後の血中グルコースレベルを示す。

【図１３Ｂ】図１３Ａ～１３Ｂは、１週間に１回のＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　ＩｇＧの静脈内投与後のスプラーグドーリーラットにおける絶食時及び摂食時の血中グルコースレベルを示す。図１３Ｂは、絶食なしの血中グルコースレベルを示す。

【図１４Ａ】図１４Ａ～１４Ｄは、１週間に１回のＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　ＩｇＧの静脈内投与後のスプラーグドーリーラットにおける絶食及び摂食条件下のＣ－ペプチド及びインスリンのレベルを示す。図１４Ａは、絶食８時間後のＣ－ペプチドレベルを示す。

【図１４Ｂ】図１４Ａ～１４Ｄは、１週間に１回のＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　ＩｇＧの静脈内投与後のスプラーグドーリーラットにおける絶食及び摂食条件下のＣ－ペプチド及びインスリンのレベルを示す。図１４Ｂは、絶食なしのＣ－ペプチドレベルを示す。

【図１４Ｃ】図１４Ａ～１４Ｄは、１週間に１回のＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　ＩｇＧの静脈内投与後のスプラーグドーリーラットにおける絶食及び摂食条件下のＣ－ペプチド及びインスリンのレベルを示す。図１４Ｃは、絶食８時間後のインスリンレベルを示す。

【図１４Ｄ】図１４Ａ～１４Ｄは、１週間に１回のＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　ＩｇＧの静脈内投与後のスプラーグドーリーラットにおける絶食及び摂食条件下のＣ－ペプチド及びインスリンのレベルを示す。図１４Ｄは、絶食なしのインスリンレベルを示す。

【図１５Ａ】図１５Ａ～１５Ｃは、１週間に１回、３週間にわたるＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　ＩｇＧの反復静脈内投与後の体重の変化、ならびに肝臓及び腎臓における重量変化を示す。図１５Ａは、試験中の体重の変化を示す。

【図１５Ｂ】図１５Ａ～１５Ｃは、１週間に１回、３週間にわたるＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　ＩｇＧの反復静脈内投与後の体重の変化、ならびに肝臓及び腎臓における重量変化を示す。図１５Ｂは、試験の終了時の肝臓における重量変化を示す。

【図１５Ｃ】図１５Ａ～１５Ｃは、１週間に１回、３週間にわたるＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　ＩｇＧの反復静脈内投与後の体重の変化、ならびに肝臓及び腎臓における重量変化を示す。図１５Ｃは、試験の終了時の腎臓における重量変化を示す。

【図１６】図１６Ａ～１６Ｂは、１日に１回のＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂの静脈内投与後のスプラーグドーリーラットにおける絶食時及び摂食時の血中グルコースレベルを示す。図１６Ａは、１日目の血中グルコースレベルを示す。ｔ０での血中グルコースは絶食８時間後に収集される。図１６Ｂは、３日目の血中グルコースレベルを示す。ｔ０での血中グルコースは絶食８時間後に収集される。

【図１７Ａ】図１７Ａ～１７Ｄは、１日に１回、３日間にわたるＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂの静脈内投与後のスプラーグドーリーラットにおけるＣ－ペプチド及びインスリンのレベルを示す。図１７Ａ～１７Ｂは、それぞれ、１日目及び３日目のＣ－ペプチドレベルを示す。ｔ０でのＣ－ペプチドレベルは、絶食８時間後に収集された。

【図１７Ｂ】図１７Ａ～１７Ｄは、１日に１回、３日間にわたるＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂの静脈内投与後のスプラーグドーリーラットにおけるＣ－ペプチド及びインスリンのレベルを示す。図１７Ａ～１７Ｂは、それぞれ、１日目及び３日目のＣ－ペプチドレベルを示す。ｔ０でのＣ－ペプチドレベルは、絶食８時間後に収集された。

【図１７Ｃ】図１７Ａ～１７Ｄは、１日に１回、３日間にわたるＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂの静脈内投与後のスプラーグドーリーラットにおけるＣ－ペプチド及びインスリンのレベルを示す。図１７Ｃ～１７Ｄは、それぞれ、１日目及び３日目のインスリンレベルを示す。ｔ０でのインスリンレベルは、絶食８時間後に収集された。

【図１７Ｄ】図１７Ａ～１７Ｄは、１日に１回、３日間にわたるＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂの静脈内投与後のスプラーグドーリーラットにおけるＣ－ペプチド及びインスリンのレベルを示す。図１７Ｃ～１７Ｄは、それぞれ、１日目及び３日目のインスリンレベルを示す。ｔ０でのインスリンレベルは、絶食８時間後に収集された。

【図１８Ａ】図１８Ａ～１８Ｃは、１日に１回、３日間にわたるＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８Ｆａｂの反復静脈内投与後の体重の変化、ならびに肝臓及び腎臓における重量変化を示す。図１８Ａは、試験中の体重の変化を示す。

【図１８Ｂ】図１８Ａ～１８Ｃは、１日に１回、３日間にわたるＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８Ｆａｂの反復静脈内投与後の体重の変化、ならびに肝臓及び腎臓における重量変化を示す。図１８Ｂは、試験の終了時の肝臓における重量変化を示す。

【図１８Ｃ】図１８Ａ～１８Ｃは、１日に１回、３日間にわたるＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８Ｆａｂの反復静脈内投与後の体重の変化、ならびに肝臓及び腎臓における重量変化を示す。図１８Ｃは、試験の終了時の腎臓における重量変化を示す。

【図１９－１】ＸＰＡ．２４７．２．０１８親和性成熟重鎖可変領域配列のＣＤＲ配列、ならびに親和性、効力、及び異なる種の異なるクローンへの結合を記載する。

【図１９－２】ＸＰＡ．２４７．２．０１８親和性成熟重鎖可変領域配列のＣＤＲ配列、

ならびに親和性、効力、及び異なる種の異なるクローンへの結合を記載する。
【発明を実施するための形態】
【００７３】
詳細な説明
本開示は、異常なグルコースレベルに関連する障害、例えば、内因性または外因性高インスリン血、インスリン過量（インスリン誘発性低血糖）、及び異常なグルコースレベルを特徴とする疾患性低血糖状態に起因する低血糖を含む低血糖、スルホニル尿素誘発性低血糖、ならびに食後低血糖の治療における、インスリン受容体（ＩＮＳＲ）またはインスリン受容体－インスリン複合体に特異的な抗体及びその使用を提供する。かかる調節因子は、１型または２型糖尿病患者など、リスクのある対象における低血糖の再発を予防するためにも使用され得る。
【００７４】
理論に拘束されるものではないが、本明細書に開示される抗体または抗体断片によるシグナル伝達複合体の調節は、シグナル入力に対する感受性の減少及び同時にシグナル伝達の減少をもたらし得ることが企図される。負の調節因子抗体の投与により、細胞経路の感受性及び／または細胞応答の絶対レベルが減少する。
【００７５】
定義
「化合物」という用語は、有機もしくは無機、内因性もしくは外因性の任意の化学化合物を指し、これには、ポリペプチド、タンパク質、ペプチド、小分子、核酸（例えば、ＤＮＡ及びＲＮＡ）、炭水化物、脂質、脂肪酸、ステロイド、プリン、ピリミジン、ペプチド模倣物、ポリケチド、及びそれらの誘導体、構造類似体、または組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。「内因性」とは、哺乳動物において天然に生じることを意味するが、「外因性」とは、哺乳動物において天然に生じない、例えば、天然に生じるか、または人工化合物かに関わらず、投与された外来化合物を意味する。
【００７６】
「ポリペプチド結合剤」という用語は、抗原、例えば標的もしくはそのシグナル伝達パートナーを特異的に結合することができるか、または測定可能な結合親和性で抗原を結合することができるポリペプチドを指す。ポリペプチド結合剤の例としては、任意選択で、他のペプチド部分または非ペプチド性部分にコンジュゲートされる、抗体、ペプチボディ、ポリペプチド、及びペプチドが挙げられる。ポリペプチド結合剤が結合し得る抗原には、抗体応答を誘発することができるか、または非特異的結合よりも大きい検出可能な結合親和性でポリペプチド結合剤に結合することができる、任意のタンパク質性もしくは非タンパク質性分子が含まれる。調節ポリペプチド結合剤が結合する抗原には、標的、標的のシグナル伝達パートナー、ならびに／または標的及びシグナル伝達パートナーを含む複合体が含まれてもよい。
【００７７】
「抗体」という用語は、広い意味で使用され、完全に組み立てられた抗体、四量体抗体、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、抗原を結合することができる抗体断片（例えば、Ｆａｂ’、Ｆ’（ａｂ）２、Ｆｖ、１本鎖抗体、ダイアボディ）、及びそれらが所望の生物学的活性を呈する限り、前述を含む組換えペプチドを含む。「免疫グロブリン」または「四量体抗体」とは、２本の重鎖及び２本の軽鎖からなり、それぞれが可変領域及び定常領域を含む、四量体糖タンパク質である。抗原結合部分は、組換えＤＮＡ技法により、または無傷抗体の酵素もしくは化学的切断により産生され得る。抗体断片または抗原結合部分には、特に、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆｖ、ドメイン抗体（ｄＡｂ）、相補性決定領域（ＣＤＲ）断片、ＣＤＲ移植抗体、１本鎖抗体（ｓｃＦｖ）、１本鎖抗体断片、キメラ抗体、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ミニボディ、直鎖状抗体、キレート化組換え抗体、トリボディもしくはバイボディ、イントラボディ、ナノボディ、小モジュラー免疫薬（ＳＭＩＰ）、抗原結合ドメイン免疫グロブリン融合タンパク質、ラクダ化抗体、ＶＨＨ含有抗体、また

はその変異型もしくは誘導体、及び抗体が所望の生物学的活性を保持する限り、１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つのＣＤＲ配列など、ポリペプチドに特異的抗原結合を付与するのに十分である免疫グロブリンの少なくとも一部を含有するポリペプチドが含まれる。

【００７８】

「モノクローナル抗体」は、実質的に均質な抗体の集団から得られた抗体、すなわち、その集団を含む個々の抗体が少量で存在し得る可能な天然に生じ得る突然変異を除き同一である抗体を指す。

【００７９】

本明細書で使用されるとき、「抗体変異型」は、天然の抗体可変領域ドメインの可変領域において、少なくとも１つのアミノ酸置換、欠失、または挿入を含有する抗体ポリペプチド配列を指す。変異型は、実質的に均質であるか、または未修飾の抗体と実質的に同一であり得る。

【００８０】

本明細書で使用されるとき、「キメラ抗体」は、典型的には異なる種を起源とする２つの異なる抗体に由来する配列を含有する抗体（例えば、米国特許第４，８１６，５６７号を参照されたい）を指す。最も典型的には、キメラ抗体は、ヒト及びゲッ歯類抗体断片、一般的にはヒト定常領域及びマウス可変領域を含む。

【００８１】

「中和抗体」は、抗体分子であり、これは、それが結合する抗原の生物学的機能を排除または大幅に低減することができる。しがたって、「中和」抗体は、酵素活性、リガンド結合、または細胞内シグナル伝達などの生物学的機能を排除または大幅に低減することができる。

【００８２】

「単離された」抗体は、特定され、その天然環境の構成成分から分離及び回収された抗体である。その天然環境の汚染物質構成成分は、抗体の診断または治療使用に干渉するであろう材料であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質性または非タンパク質性溶質を含み得る。好ましい実施形態では、抗体は、（１）ローリー法により決定される抗体の９５重量％を超える、最も好ましくは９９重量％を超えるまで、（２）スピニングカップ配列決定装置の使用により、Ｎ末端または内部アミノ酸配列の少なくとも１５残基を得るのに十分な程度まで、または（３）クマシーブルーもしくは好ましくは銀染色を使用した還元または非還元条件下でＳＤＳ－ＰＡＧＥによる均質性を示すまで精製される。抗体の天然の環境の少なくとも１つの構成成分が存在しないため、単離された抗体は組換え細胞内の原位置で抗体を含む。しかしながら、通常は、単離された抗体は少なくとも１つの精製ステップによって調製される。

【００８３】

本明細書で使用されるとき、「重鎖可変領域」は、抗体重鎖可変ドメインの少なくとも１つの相補性決定領域（ＣＤＲ）を含む該抗体分子の領域を指す。重鎖可変領域は、該抗体重鎖の１つ、２つ、または３つのＣＤＲ（複数可）を含有し得る。

【００８４】

本明細書で使用されるとき、「軽鎖可変領域」は、抗体軽鎖可変ドメインの少なくとも１つの相補性決定領域（ＣＤＲ）を含む該抗体分子の領域を指す。軽鎖可変領域は、該抗体軽鎖の１つ、２つ、または３つのＣＤＲ（複数可）を含有し、これは、抗体によりカッパまたはラムダ軽鎖のいずれかであり得る。

【００８５】

本明細書で使用されるとき、「特異的に結合する」が、「抗原特異的」である、抗原標的に「特異的」である、または抗原と「免疫反応性」である抗体は、類似する配列の他の抗原よりも大きい親和性で抗原を結合する、本明細書に使用される抗体またはポリペプチド結合剤を指す。一態様では、ポリペプチド結合剤、またはその断片、変異型、もしくは誘導体は、他、すなわち、非ヒトの種の類似する抗原に対するその結合親和性と比較して

、ヒト抗原に対して大きい親和性で結合するが、標的のオルソログを認識し、結合するポリペプチド結合剤は本方法の範囲内である。

【００８６】

例えば、その同族抗原に「特異的」な抗体またはその断片であるポリペプチド結合剤は、抗体の可変領域が検出可能な優先度で所望の抗原を認識し、結合することを示す（例えば、所望の抗原がポリペプチドである場合、抗体の可変領域は、ファミリーメンバー間の可能な局在性配列同一性、相同性、または類似性の存在に関わらず、結合親和性における測定可能な相違により、抗原ポリペプチドを同じファミリーの他の既知のポリペプチドと区別することができる）。特定の抗体が抗体の可変領域の外側の、及び特に分子の定常領域の配列との相互作用を通して他のタンパク質（例えば、ＥＬＩＳＡ技法におけるＳ．ａｕｒｅｕｓタンパク質Ａまたは他の抗体）とも相互作用し得ることも理解する。本明細書の方法において使用するための、ポリペプチド結合剤、例えば抗体の結合特異性を決定するためのスクリーニングアッセイは、当業者に周知であり、慣例的に実施される。かかるアッセイの包括的な考察に関しては、Ｈａｒｌｏｗ ｅｔ ａｌ．（Ｅｄｓ），Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ；Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ；Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹ（１９８８），Ｃｈａｐｔｅｒ ６を参照されたい。本方法において使用するための抗体は、当該技術分野において既知の任意の方法を使用して産生することができる。

【００８７】

「エピトープ」という用語は、抗原結合領域のうちの１つ以上で、選択的結合剤によって認識され、結合されることができる任意の分子のその部分を指す。エピトープは、通常、アミノ酸または糖側鎖などの分子の化学的に活性な表面群からなり、また特異的な３次元構造特徴ならびに特異的な電荷特徴を有する。本明細書で使用されるエピトープは、連続または非連続であり得る。

【００８８】

本明細書のポリペプチド結合剤及びポリペプチドに関連して使用されるとき、「誘導体」という用語は、ヒトタンパク質において通常生じない、ユビキチン化、治療剤もしくは診断剤へのコンジュゲーション、標識（例えば、放射性核種または種々の酵素）、ペグ化などの共有結合ポリマー接着（ポリエチレングリコールによる誘導体化）、及びオルニチンなどのアミノ酸の化学合成による挿入または置換などの技法により化学修飾されたポリペプチドを指す。誘導体は、出発材料の未誘導体化分子の結合特性を保持する。

【００８９】

「検出可能な部分」または「標識」は、分光、光化学、生化学、免疫化学、または化学手段により検出可能な組成物を指す。例えば、有用な標識としては、^{32}Ｐ、^{35}Ｓ、蛍光染料、電子密度の高い試薬、酵素（例えば、ＥＬＩＳＡにおいて一般的に使用される）、ビオチン－ストレプトアビジン、ジオキシゲニン、抗血清もしくはモノクローナル抗体が利用可能なハプテン及びタンパク質、または別の標識された核酸分子に相補的な配列を有する核酸分子が挙げられる。検出可能な部分は、試料中の結合した検出可能な部分の量を定量化するために使用され得る放射活性、発色性、または蛍光シグナルなどの測定可能なシグナルを生成することが多い。

【００９０】

「ペプチド」または「オリゴペプチド」とは、典型的には長さが３～１００個のアミノ酸残基である、短いアミノ酸配列であり、ペプチドに特定の立体構造特異性または特定の生物学的活性、例えば、タンパク質分解に対する耐性を与えるために、天然に生じるアミノ酸残基、及び単独で、または天然に生じるアミノ酸残基と組み合わせて使用され得る残基の天然に生じない類似体を包含する。ペプチドは、ペプチド配列の反復を含み、ヘッド－テイルまたはヘッド－ヘッドに配置されたアミノ酸配列の２、３、４、５、６、７、８、９、１０以上のコピーを含み得る。ペプチドは、非ペプチド性部分にコンジュゲートされ得る。ペプチドは、例えば、ＰＥＧなどの他のポリマーまたは非ポリマー部分へのコンジュゲーションを通して形成された二量体、三量体、またはより高次元の多量体を含む。

【００９１】
「ポリペプチド」とは、典型的には長さが１００個以上のアミノ酸残基である、より長いアミノ酸配列であり、ポリペプチドに特定の立体構造特異性または特定の生物学的活性、例えば、タンパク質分解に対する耐性を与えるために、天然に生じるアミノ酸残基、及び単独で、または天然に生じるアミノ酸残基と組み合わせて使用され得る残基の天然に生じない類似体を包含する。
【００９２】
本明細書で使用されるとき、「ペプチボディ」とは、免疫グロブリン（Ｉｇ）定常領域の全てまたは一部に融合された１つ以上のペプチドを含む融合ポリペプチドである。例えば、米国特許第６，６６０，８４３号を参照されたい。ペプチドは、抗原に結合する、任意の天然に生じる、または組換えにより調製された、もしくは化学合成されたペプチドであり得る。ペプチドは、反復されてもよく、ヘッドーテイルまたはヘッドーヘッドに配置されたアミノ酸配列の２、３、４、５、６、７、８、９、１０以上のコピーを含み得る。Ｉｇ定常領域の部分は、少なくとも１つの定常領域ドメイン（例えば、ＣＨ１、ＣＨ２、ＣＨ３、及び／またはＣＨ４）、多重ドメイン（例えば、ＣＨ３を伴うＣＨ２）、ドメインの多重コピー（例えば、ＣＨ２－ＣＨ２）、所望の活性を保持する定常ドメインの任意の断片、例えば、循環における免疫グロブリンの長期半減期に関与するサルベージ受容体エピトープ、またはそれらの任意の組み合わせを含み得る。
【００９３】
「小」分子または「小」有機分子は、本明細書において、約１０００ダルトン以下の分子量を有する非ポリマー有機化学化合物として定義される。
【００９４】
本明細書で使用されるとき、「シグナル伝達複合体」とは、細胞シグナルの伝達を媒介するタンパク質及び／または内因性もしくは外因性の化合物の集合体である。シグナル伝達複合体の例としては、膜結合受容体に結合したリガンド、基質に結合した酵素、またはシグナルカスケードに関与する生化学反応を伝播するように会合する任意の細胞分子が挙げられるが、これらに限定されない。シグナル伝達複合体は、共受容体、補助因子、足場タンパク質、アロステリック調節因子、ならびに細胞シグナル伝達に関与する多くの他の種類のタンパク質及び分子も含み得る。シグナル伝達複合体は、一過的に形成され得るか、または長寿命であり得る。シグナル伝達複合体の分子構成要素または構成成分は、経時的に変化してもよく、各構成成分の活性化状態及び細胞環境に依存し得る。シグナル伝達複合体は、伝達活性、完全な不活性化、及び恒常的活性化における微妙な変化、または正もしくは負の調節を含む複合体に対する作用のスペクトルを誘発し得る化学修飾及び制御を経ることができる。
【００９５】
「治療有効量」という用語は、本明細書において、シグナル伝達複合体の異常な（例えば、異常に高いまたは異常に低い）シグナル伝達に関連する疾患の症状もしくは徴候を改善または和らげるのに有効である標的特異的組成物の量を示すために使用される。
【００９６】
本明細書で使用されるとき、「結合」とは、水素結合、ファンデルワールス、イオンー双極子、及び疎水性相互作用を含む弱い力、ならびに強い力のイオン結合のうちの１つ以上からなる非共有結合相互作用の特定のネットワークに起因する２つ以上の別個の分子実体間の物理的会合である。結合のレベルまたは程度は、親和性に関して測定され得る。親和性は、平衡結合定数または動態結合速度パラメータにより定義され得る２つ以上の別個の分子実体間の結合相互作用の強度の尺度である。好適な定数またはパラメータ及びそれらの測定単位の例は、当該技術分野において周知であり、平衡会合定数（K_A）、例えば、約$10^5 M^{-1}$以上、約$10^6 M^{-1}$以上、約$10^7 M^{-1}$以上、約$10^8 M^{-1}$以上、約$10^9 M^{-1}$以上、約$10^{10} M^{-1}$以上、約$10^{11} M^{-1}$以上、または約$10^{12} M^{-1}$以上、平衡解離定数（K_D）、例えば、約10^{-5}M以下、または約10^{-6}M以下、または約10^{-7}M以下、または約10^{-8}M以下、または約10^{-9}M以下、ま

たは約10^{-10}M以下、または約10^{-11}M以下、または約10^{-12}M以下、オン速度（例えば、sec^{-1}、mol^{-1}）、及びオフ速度（例えば、sec^{-1}））を含むが、これらに限定されない。K_Aの場合、より高い値は「より強い」または「強化された」結合親和性を意味するが、K_Dの場合、より低い値は「より強い」または「強化された」結合親和性を意味する。本明細書で使用されるとき、「強化された」結合速度パラメータは、滞留時間の増加、より強い会合、またはより弱い解離を意味する。本明細書で使用されるとき、「脆弱化された」結合速度パラメータは、滞留時間の減少、より弱い会合、またはより強い解離を意味する。オン速度の場合、より高い値は、より早いまたはより頻繁な会合を意味し、よって一般的に強化された結合親和性をもたらす。オフ速度の場合、より低い値は、一般的に、より遅い解離を意味し、よって一般的により強い結合親和性をもたらす。しかしながら、後にさらに詳細に説明されるが、結合親和性を示すのは、オン速度とオフ速度の比率である。

【００９７】

２つの化合物間、例えば、抗体と抗原との間、またはシグナル伝達複合体の第１と第２の構成成分との間の親和性は、直接的または間接的に測定され得る。親和性の間接的測定は、親和性を示す、及び／またはそれに比例する代替特性を使用して行われ得る。かかる代替特性には、シグナル伝達複合体の第１の構成成分の、第２の構成成分への結合の量もしくはレベル、または第２の構成成分に対する第１の構成成分の見かけ結合親和性を予測する、またはそれに相関する第１の構成成分もしくは第２の構成成分の生物物理学的特徴が含まれる。特定の例としては、第１または第２の構成成分のいずれかの亜飽和濃度（ｓｕｂｓａｔｕｒａｔｉｎｇ　ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｉｏｎ）で、第１の構成成分の、第２の構成成分への結合の量またはレベルを測定することを含む。測定することができる他の生物物理学的特徴は、正味分子電荷、回転活性、拡散速度、融解温度、静電操縦（ｅｌｅｃｔｒｏｓｔａｔｉｃ　ｓｔｅｅｒｉｎｇ）、または第１及び第２の構成成分のうちの１つもしくはそれらの両方の立体構造を含むが、これらに限定されない。測定することができるまた他の生物物理学的特徴は、様々な温度、ｐＨ、またはイオン強度の影響に対する結合相互作用の安定性を決定することを含む。

【００９８】

測定された親和性は、多くの他の要因の中でも、結合構成成分の濃度、アッセイの設定、結合構成成分の原子価、緩衝組成物、ｐＨ、イオン強度、及び温度、ならびにアロステリック調節因子及び制御因子などの結合反応に添加される追加の構成成分を含む、測定を行うために使用される正確な条件に依存する。定量的及び定性的方法は、結合相互作用の絶対及び相対的強度の両方を測定するために使用され得る。

【００９９】

見かけ親和性は、親和性が、アロステリック調節因子、阻害剤、結合構成成分原子価などの結合反応における条件または構成成分によって変更される条件下での、２つ以上の別個の分子実体間の結合相互作用の強度の尺度である。

【０１００】

本明細書で使用されるとき、「亜飽和濃度」は、結合親和性K_Dを大幅に下回る結合反応における１つ以上の構成成分の濃度、及び／または他の構成成分（複数可）の結合部位の全てを占めるために必要とされるよりも少ない結合反応における１構成成分の濃度である。亜飽和条件下で、結合反応における結合構成成分のうちの１つの相当なパーセントが利用可能な結合部位を有する。

【０１０１】

受容体「アンタゴニスト」は、受容体への結合時に生物学的応答自体は引き起こさないが、アゴニスト媒介応答を阻害もしくは弱める受容体リガンドまたは薬物の種類である。アンタゴニストは、親和性を有し得るが、それらの同族受容体に有効性がなく、結合は相互作用を破壊し、受容体でアゴニストまたは逆アゴニストの機能を阻害する。アンタゴニストは、受容体上の活性部位またはアロステリック部位に結合することによってそれらの作用を媒介するか、またはそれらは、受容体の活性の生物学的制御に通常関与しない特有

の結合部位で相互作用し得る。アンタゴニスト活性は、同様にアンタゴニスト受容体結合の性質に依存する、アンタゴニスト－受容体複合体の寿命により、可逆性または不可逆性であり得る。アンタゴニストの大部分は、受容体上の構造的に定義された結合部位で、内因性リガンドまたは基質と競合することによって、それらの効力を達成する。

【０１０２】

アンタゴニストは、それらが結合する受容体を活性化するのに有効性を示さない。しかしながら、結合すると、アンタゴニストは、アゴニスト、逆アゴニスト、及び部分アゴニストの機能を阻害し得る。機能アンタゴニストアッセイにおいて、用量応答曲線は、アンタゴニストの濃度範囲がアゴニストの活性を反転する能力の作用を測定する。アンタゴニストの効力は通常、そのＩＣ$_{50}$値により定義される。これは、アゴニストの最大生物学的応答の半分の阻害を誘発するのに必要なアンタゴニストの濃度を決定することにより、所与のアンタゴニストに関して計算することができる。ＩＣ$_{50}$が低いほど、アンタゴニストの効力が大きい。

【０１０３】

競合またはオルソステリックなアンタゴニストは、受容体を活性化することなく、リガンドまたはアゴニストと同じ結合部位（活性部位）で受容体に可逆的に結合し、それによって、受容体上の同じ結合部位に関してアゴニストと競合する。非競合またはアロステリックなアンタゴニストは、アゴニストとは別個の結合部位に結合し、その別個の結合部位を介してそれらの作用をその受容体にもたらす。したがって、それらは、結合に関してアゴニストと競合しない。非競合アンタゴニストは、それらが別個のアロステリック結合部位に結合することができる前に、それらがアゴニストによる受容体活性化を必要とするという点で、非競合アンタゴニストとは異なる。

【０１０４】

「インスリン抵抗性」は、インスリンの生理学的量が細胞または組織からの正常なインスリン応答をもたらすのに不十分である状態を説明する。

【０１０５】

本開示は、既存の療法に対して特有の利点を提供するインスリン－ＩＮＳＲシグナル伝達複合体調節因子の使用を包含する。それらは、望まない副作用を最小にしながら、インスリンの作用の全範囲の誘発を可能にするはずのＩＮＳＲのレベルで作用する。抗体はグルコース及びインスリンのレベルのより正確な制御を提供することができると仮定される。ＩＮＳＲの細胞外領域を標的とすることにより、内因性インスリンの作用を調節するインスリン－ＩＮＳＲシグナル伝達複合体調節因子としての生物学的分子の使用が可能となり、それらは半減期の改善、投薬量もしくは投薬の頻度の低減、毒性の低減、及び製造のさらなる容易さなどの利点を有し得る。

【０１０６】

インスリンシグナル伝達の調節因子である抗体を特定する方法は、共同米国特許第８，９２６，９７６号、ならびに特許出願第Ｕ．Ｓ．Ｓ．Ｎ．１４／５５５，２３３号及び同第Ｕ．Ｓ．Ｓ．Ｎ．１２／８９０，５９０号に開示されており、参照により本明細書に組み込まれる。

【０１０７】

インスリン受容体（ＩＮＳＲ）

ＩＮＳＲは、刺胞動物及び昆虫のような原始的な生物に見られるチロシンキナーゼ受容体である。より高等な生物において、これはグルコース恒常性に必須である。マウスノックアウト試験は、ＩＮＳＲが脂肪形成、血管新生、肝性グルコース合成の制御、及びグルコース誘発膵臓インスリン分泌に重要であることも示した（Ｋｉｔａｍｕｒａ ｅｔ ａｌ，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｐｈｙｓｉｏｌ ６５：３１３－３３２，２００３）。ＩＮＳＲシグナル伝達は、食物摂取、末梢脂肪沈着、及び生殖内分泌系の制御、ならびに学習及び記憶に関与する脳においても重要である（Ｗａｄａ ｅｔ ａｌ，Ｊ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｓｃｉ ９９：１２８－１４３，２００５）。機能障害ＩＮＳＲシグナル伝達は、Ｉ型及びＩＩ型糖尿病、認知症、及び癌を含む疾患に関係している。

【０１０８】
密接に関連するインスリン様成長因子受容体（ＩＧＦＲ－１）のドメインはＩＮＳＲと高いアミノ酸同一性（４７～６７％）を呈する。構造が類似するが、ＩＧＦ－ＩＲ及びＩＮＳＲは異なる生理学的機能を果たす。ＩＧＦ－ＩＲは、それ自体がＩＧＦ－Ｉ産生の主な部位である肝臓を除き、ほぼ全ての正常な成人組織において発現される。ＩＮＳＲは主に代謝機能に関与する一方で、ＩＧＦ－ＩＲは成長及び分化を媒介する（Ａｄａｍｓ ｅｔ ａｌ，Ｃｅｌｌ．Ｍｏｌ．Ｌｉｆｅ Ｓｃｉ．５７：１０５０－１０９３，２０００）。

【０１０９】
ＩＮＳＲは、ＩＮＳＲ－Ａ及びＩＮＳＲ－Ｂの２つのスプライス変異型アイソフォームとして存在し、これらは、それぞれ、エクソン１１によってコードされる１２アミノ酸を欠如または含有する。より長い変異型ＩＮＳＲ－Ｂは、シグナル伝達代謝応答に関与するアイソフォームである。対照的に、ＩＮＳＲ－Ａは主に分裂促進応答をシグナル伝達し、いくつかの癌において、優先的に発現されたアイソフォームであり（（Ｄｅｎｌｅｙ ｅｔ ａｌ．，Ｈｏｒｍ．Ｍｅｔａｂ．Ｒｅｓ．３５：７７８－７８５，２００３）、また高親和性でインスリン様成長因子２（ＩＧＦ－ＩＩ）を結合することができる（Ｄｅｎｌｅｙ ｅｔ ａｌ，Ｍｏｌ．Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．１８：２５０２－２５１２，２００４）。

【０１１０】
成熟ヒトＩＮＳＲは、２つのαサブユニット及び２つのβサブユニット（鎖）を含むホモ二量体である。α及びβ鎖は、単一の遺伝子によってコードされ、残基７２０～７２３に位置するフリン切断部位で、１３７０アミノ酸前駆体の翻訳後切断から生じる。α鎖及びβ鎖の１９４残基は、ＩＮＳＲの細胞外部分を含む。単一の膜貫通配列及びチロシンキナーゼを含有する４０３残基細胞質ドメインがある。各外部ドメイン単量体のＮ末端半分は、約１５０個のアミノ酸の２つの相同ロイシン豊富反復ドメイン（Ｌ１及びＬ２）からなり、これらはサイズが同じく約１５０個のアミノ酸であるシステイン豊富領域（ＣＲ）によって分離される。各外部ドメイン単量体のＣ末端半分（約４６０残基）は、３つのフィブロネクチンＩＩＩ型ドメイン（ＦｎＩＩＩ－１、ＦｎＩＩＩ－２、及びＦｎＩＩＩ－３）からなる。ＦｎＩＩＩ－２ドメインは、約１２０残基の挿入ドメイン（ＩＤ）を含有し、その中に成熟受容体のα及びβ鎖を生成するフリン切断部位が位置する。細胞内に、各単量体は、シグナル伝達分子のためのホスホチロシン結合部位を含有する２つの制御領域（膜近傍領域及びＣ－テイル）に隣接するチロシンキナーゼ触媒ドメインを含有する（Ｗａｒｄ ｅｔ ａｌ，Ａｃｔａ Ｐｈｙｓｉｏｌ．１９２：３－９，２００８）。

【０１１１】
インスリン結合モデルは、基礎状態で、ＩＮＳＲホモ二量体が各単量体上に同一の２対の結合部位（部位１及び部位２と称される）を含有することを提案する（Ｄｅ Ｍｅｙｔｓ，Ｂｉｏｅｓｓａｙｓ ２６：１３５１－１３６２，２００４）。１つのαサブユニット上の低親和性部位（部位１）へのインスリンの結合の後に、結合されたインスリンと第２のＩＮＳＲαサブユニット（部位２）の異なる領域との間の第２の結合事象が続く。２つのαサブユニット間のこのリガンド媒介架橋は、シグナル伝達をもたらす高親和性状態を生成する。対照的に、そのＣ末端で連結されない可溶性ＩＮＳＲ外部ドメインは、高親和性受容体－リガンド複合体を生成することができない。それは、その２つの部位１でインスリンの２つの分子を同時に結合することができるが、低親和性でしか結合できない（Ａｄａｍｓ ｅｔ ａｌ，Ｃｅｌｌ．Ｍｏｌ．Ｌｉｆｅ Ｓｃｉ．５７：１０５０－１０９３，２０００）。部位１はＬ１ドメインの中央βシートからの要素及びα鎖の最後１６残基（ＣＴペプチドと称される）から構成されると考えられる。部位２は、ＦｎＩＩＩ－１及びＦｎＩＩＩ－２の接合部でループを含む可能性が高い。インスリン結合は、インスリン及びその受容体の両方において構造的変化を伴うと考えられる（Ｗａｒｄ ａｎｄ Ｌａｗｒｅｎｃｅ，ＢｉｏＥｓｓａｙｓ ３１：４２２－４３４，２００９）。

【０１１２】

インスリン分子が受容体に結合し、その作用をもたらすと、それは細胞外環境に放出し戻され得るか、または細胞によって分解され得る。分解は通常、インスリン－ＩＮＳＲ複合体のエンドサイトーシスに続いて、インスリン分解酵素の作用を伴う。大半のインスリン分子は肝細胞によって分解される。典型的なインスリン分子は、最終的に、循環内へのその初期の放出後約７１分で分解されると推定されている（Ｄｕｃｋｗｏｒｔｈ　ｅｔａｌ，Ｅｎｄｏｃｒ．Ｒｅｖ．１９（５）：６０８－２４，１９９８）。

【０１１３】

インスリンシグナル伝達

インスリンは、代謝及び成長に関与するエフェクタータンパク質にＩＮＳＲから情報を運ぶ分子のシグナル伝達ネットワークを誘発する。ＩＮＳＲへのインスリン結合は、内在性チロシンキナーゼ活性の活性化を促進する立体構造の変化を誘発し、ＩＮＳＲβサブユニットの自己リン酸化をもたらす。インスリン受容体基質（ＩＲＳ）タンパク質は、リン酸化されたＩＮＳＲとの相互作用を通して原形質膜に動員され、これらもチロシン残基上でリン酸化され、２つの主な経路である、（１）成長に対してある程度の影響を及ぼす、主に代謝を制御するＰＩ３キナーゼ／ＰＤＫ１／ＰＫＢ経路、及び（２）主に細胞成長を制御するＲａｓ／ＥＲＫ分裂促進経路を通してシグナル伝達をもたらす複合体への追加のシグナル伝達タンパク質の動員を促進する。

【０１１４】

ある特定の販売されているインスリン類似体が、培養された癌細胞においてＩＧＦ－１様分裂促進及び抗アポトーシス活性を表すことが報告され、ヒトにおけるそれらの長期安全性に対して疑問が生じている（Ｗｅｉｎｓｔｅｉｎ　ｅｔ　ａｌ，Ｄｉａｂｅｔｅｓ　Ｍｅｔａｂ　Ｒｅｓ　Ｒｅｖ　２５：４１－４９，２００９）。

【０１１５】

抗体の種類及び源

本開示は、インスリン受容体またはインスリン／インスリン受容体複合体に結合する標的特異的抗体の使用を包含する。例示的な実施形態では、本明細書に記載される標的特異的抗体は、ヒトカッパ（κ）もしくはヒトラムダ（λ）軽鎖、またはそれに由来するアミノ酸配列、あるいはヒト重鎖またはそれに由来する配列、あるいは１本鎖、二量体、四量体、もしくは他の形態において一緒に重鎖及び軽鎖両方を含み得る。いくつかの実施形態では、標的特異的免疫グロブリンの重鎖及び軽鎖は、異なるアミノ酸分子である。他の実施形態では、同じアミノ酸分子は、標的特異的抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含有する。

【０１１６】

「抗体」という用語は、広い意味で使用され、完全に組み立てられた抗体、四量体抗体、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、ヒト及びヒト化抗体、抗原を結合することができる抗体断片（例えば、Ｆａｂ’、Ｆ’（ａｂ）２、Ｆｖ、１本鎖抗体、ダイアボディ）、ならびにそれらが所望の生物学的活性を呈する限り、前述を含む組換えペプチドを含む。「免疫グロブリン」または「四量体抗体」とは、２本の重鎖及び２本の軽鎖からなり、それぞれが可変領域及び定常領域を含む、四量体糖タンパク質である。抗原結合部分は、組換えＤＮＡ技法により、または無傷抗体の酵素もしくは化学的切断により産生され得る。抗体断片または抗原結合部分には、特に、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆｖ、ドメイン抗体（ｄＡｂ）、相補性決定領域（ＣＤＲ）断片、１本鎖抗体（ｓｃＦｖ）、１本鎖抗体断片、キメラ抗体、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ミニボディ、直鎖状抗体、キレート化組換え抗体、トリボディもしくはバイボディ、イントラボディ、ナノボディ、小モジュラー免疫薬（ＳＭＩＰ）、抗原結合ドメイン免疫グロブリン融合タンパク質、ラクダ化抗体、ＶＨＨ含有抗体、またはその変異型もしくは誘導体、及び抗体が所望の生物学的活性を保持する限り、ポリペプチドに特異的抗原結合を付与するのに十分である免疫グロブリンの少なくとも一部を含有するポリペプチドが含まれる。

【０１１７】

天然に生じる免疫グロブリンにおいて、各四量体は、同一の２対のポリペプチド鎖からなり、各対は、１本の「軽」鎖（約２５ｋＤａ）と、１本の「重」鎖（約５０～７０ｋＤａ）とを有する。各鎖のアミノ末端部分は、主に抗原認識に関与する、約１００～１１０以上のアミノ酸の可変領域を含む。各鎖のカルボキシ末端部分は、主にエフェクター機能に関与する定常領域を定義する。ヒト軽鎖は、カッパ（κ）及びラムダ（λ）軽鎖に分類される。重鎖は、ミュー（μ）、デルタ（Δ）、ガンマ（γ）、アルファ（α）、及びエプシロン（ε）に分類され、それぞれ、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＧ、ＩｇＡ、及びＩｇＥのように抗体のアイソタイプを定義する。軽鎖及び重鎖内で、可変及び定常領域は、約１２個以上のアミノ酸の「Ｊ」領域により結合され、重鎖も約１０個以上のアミノ酸の「Ｄ」領域を含む。一般的に、Ｆｕｎｄａｍｅｎｔａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，Ｃｈ．７（Ｐａｕｌ，Ｗ．，ｅｄ．，２ｎｄ ｅｄ．Ｒａｖｅｎ Ｐｒｅｓｓ，Ｎ．Ｙ．（１９８９））を参照されたい（全ての目的のため、参照によりその全体が組み込まれる）。各軽鎖／重鎖対の可変領域は、無傷免疫グロブリンが２つの結合部位を有するように、抗体結合部位を形成する。

【０１１８】

各重鎖は、一端に可変ドメイン（V_H）、続いていくつかの定常ドメインを有する。各軽鎖は、一端に可変ドメイン（V_L）、及びそのもう一端に定常ドメインを有し、軽鎖の定常ドメインは重鎖の第１の定常ドメインと整合され、軽鎖可変ドメインは重鎖の可変ドメインと整合される。特定のアミノ酸残基は、軽鎖と重鎖可変ドメインとの間に界面を形成すると考えられている（Ｃｈｏｔｈｉａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６：９０１－９１７，１９８７）。

【０１１９】

免疫グロブリン可変ドメインは、３つの超可変領域またはＣＤＲによって結合される比較的保存されたフレームワーク領域（ＦＲ）の同じ一般的な構造を呈する。Ｎ末端からＣ末端まで、軽鎖及び重鎖の両方は、ドメインＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３、及びＦＲ４を含む。アミノ酸の各ドメインへの割り当ては、Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，Ｍｄ．，１９８７ ａｎｄ １９９１））、Ｃｈｏｔｈｉａ＆Ｌｅｓｋ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６：９０１－９１７，１９８７、またはＣｈｏｔｈｉａ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３４２：８７８－８８３，１９８９の定義に従う。

【０１２０】

抗体の超可変領域は、抗原結合に関与する抗体のＣＤＲアミノ酸残基を指す。超可変領域は、ＣＤＲからのアミノ酸残基（すなわち、Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，５th Ｅｄ．Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，Ｍｄ．，１９９１により記載されるように、軽鎖可変ドメインの残基２４～３４（Ｌ１）、５０～５６（Ｌ２）、及び８９～９７（Ｌ３）、ならびに重鎖可変ドメインの３１～３５（Ｈ１）、５０～６５（Ｈ２）、及び９５～１０２（Ｈ３）、及び／または超可変ループからのそれらの残基（すなわち、Ｃｈｏｔｈｉａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６：９０１－９１７，１９８７により記載されるように、軽鎖可変ドメインの残基２６～３２（Ｌ１）、５０～５２（Ｌ２）、及び９１～９６（Ｌ３）、ならびに重鎖可変ドメインの２６～３２（Ｈ１）、５３～５５（Ｈ２）、及び９６～１０１（Ｈ３））を含む。しかしながら、当業者は、特定の抗体の配列が特定されるとき、ＣＤＲ残基の実際の位置が上述の予測された残基とは異なり得ることを理解する。

【０１２１】

フレームワークまたはＦＲ残基は、超可変領域残基以外のそれらの可変ドメイン残基である。

【０１２２】
それらの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列により、免疫グロブリンは、ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ、及びＩｇＭの異なるクラスに割り当てられ、これらはさらに、サブクラスまたはアイソタイプ、例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ１、及びＩｇＡ２に分類され得る。免疫グロブリンの異なるクラスのサブユニット構造及び３次元構成は周知である。異なるアイソタイプは異なるエフェクター機能を有し、例えば、ＩｇＧ１及びＩｇＧ３アイソタイプはＡＤＣＣ活性を有する。本明細書で使用される抗体は、定常ドメインを含む場合、これらのサブクラスまたはアイソタイプのいずれかのものであり得る。
【０１２３】
例示的な実施形態では、本明細書に記載され、また本方法において使用される抗体またはその断片は、ヒトカッパ（κ）もしくはヒトラムダ（λ）軽鎖、またはそれに由来するアミノ酸配列、あるいはヒト重鎖またはそれに由来する配列、あるいは１本鎖、二量体、四量体、もしくは他の形態において一緒に重鎖及び軽鎖両方を含み得る。
【０１２４】
モノクローナル抗体は、実質的に均質な抗体の集団から得られた抗体を指す。モノクローナル抗体は、一般的に、高度に特異的であり、典型的には、異なる決定基（エピトープ）に対して指向される異なる抗体を含む従来の（ポリクローナル）抗体調製物とは対照的に、単一の抗原部位に対して指向され得る。それらの特異性に加えて、モノクローナル抗体は、均質な培養により合成され、異なる特異性及び特徴を有する他の免疫グロブリンで汚染されていないという点で有利である。
【０１２５】
本開示により使用されるモノクローナル抗体は、最初にＫｏｈｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　２５６：４９５－７，１９７５により説明されたハイブリドーマ法により作製され得るか、または組換えＤＮＡ技法（例えば、米国特許第４，８１６，５６７号を参照されたい）により作製され得る。モノクローナル抗体またはその断片はまた、例えば、Ｃｌａｃｋｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　３５２：６２４－６２８，１９９１及びＭａｒｋｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２２：５８１－５９７，１９９１に説明される技法を使用して、ファージ抗体ライブラリからも単離されるか、またはそれにも由来し得る。
【０１２６】
ハイブリドーマ法において、マウスまたは他の適切な宿主動物、例えば、ハムスターまたはマカクザルは、免疫化のために使用されるタンパク質に特異的に結合する抗体を産生するか、または産生することができるリンパ球を誘発するように免疫化される（Ｈａｒｌｏｗ＆Ｌａｎｅ；Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ：Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ，１９８８。
【０１２７】
抗体の組換え産生
本開示は、本方法に有用な抗体をコードする核酸分子も包含する。いくつかの実施形態では、異なる核酸分子は、抗原特異的抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域をコードする。他の実施形態では、同じ核酸分子は、抗原特異的抗体の重鎖及び軽鎖をコードする。
【０１２８】
本明細書に記載されるモノクローナル抗体をコードするＤＮＡは、従来の手順を使用して（例えば、モノクローナル抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを使用することにより）抗体を分泌するハイブリドーマ細胞から単離され、配列決定され得る。配列決定は、一般的に、対象の遺伝子またはｃＤＮＡの少なくとも一部の単離を必要とする。一般的に、これは、モノクローナル抗体をコードするＤＮＡ、または好ましくはｍＲＮＡ（すなわち、ｃＤＮＡ）のクローニングを必要とする。クローニングは、標準的な技法を使用して行われる（例えば、Ｓａｍ

ｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｇｕｉｄｅ，Ｖｏｌｓ １－３，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓ，１９８９を参照されたく、これは参照により本明細書に組み込まれる）。例えば、ｃＤＮＡライブラリは、ポリＡ＋ｍＲＮＡ、好ましくは膜関連ｍＲＮＡの逆転写により構築され得、ライブラリは、ヒト免疫グロブリンポリペプチド遺伝子配列に特異的なプローブを使用してスクリーニングされる。ヌクレオチドプローブ反応及び他のヌクレオチドハイブリダイゼーション反応が、特定の条件下で互いにハイブリダイズするポリヌクレオチドの特定を可能にする条件で行われる。ハイブリダイゼーション条件は、Ｓａｍｂｒｏｏｋ，ｅｔ ａｌ．，（Ｅｄｓ．），Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ：Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９８９），ｐｐ．９．４７～９．５１に記載されるように計算され得る。

【０１２９】

好ましい実施形態では、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）が、対象の免疫グロブリン遺伝子セグメント（例えば、軽鎖可変セグメント）をコードするｃＤＮＡ（または完全長ｃＤＮＡの一部）を増幅するために使用される。増幅された配列は、任意の好適なベクター、例えば、発現ベクター、ミニ遺伝子ベクター、またはファージディスプレイベクター内に容易にクローニングされ得る。対象の免疫グロブリンポリペプチドのある一部の配列を決定することができる限り、使用されるクローニングの特定の方法は重要ではないことが理解されよう。本明細書で使用されるとき、「単離された」核酸分子または「単離された」核酸配列は、（１）通常、核酸の天然源に関連する少なくとも１つの汚染物質の核酸分子から特定及び分離されるか、または（２）クローニングされる、増幅される、タグ付けされる、ないしは別の方法で対象の核酸の配列が決定され得るように、背景核酸から区別され、単離されたと思われるいずれかである核酸分子である。単離された核酸分子は、自然界で見出される形態または設定以外のものである。単離された核酸分子は、したがって、天然の細胞に存在するときの核酸分子と区別される。しかしながら、単離された核酸分子は、例えば、核酸分子が天然の細胞の染色体位置とは異なる染色体位置にある抗体を通常発現する細胞に含有される核酸分子を含む。

【０１３０】

クローニング及び配列決定に使用されたＲＮＡの１つの源は、トランスジェニックマウスからＢ細胞を得、そのＢ細胞を不死細胞と融合することにより産生されたハイブリドーマである。あるいは、ＲＮＡは、免疫化された動物のＢ細胞（または全脾臓）から単離され得る。ハイブリドーマ以外の源が使用されるとき、特定の結合特徴を有する免疫グロブリンまたは免疫グロブリンポリペプチドをコードする配列についてスクリーニングすることが望ましい場合がある。かかるスクリーニングの一方法は、ファージディスプレイ技術の使用である。ファージディスプレイは、本明細書においてさらに記載され、また当該技術分野において周知である。例えば、ＤｏｗｅｒらのＷＯ ９１／１７２７１、ＭｃＣａｆｆｅｒｔｙらのＷＯ ９２／０１０４７、及びＣａｔｏｎ ａｎｄ Ｋｏｐｒｏｗｓｋｉ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８７：６４５０－５４，１９９０（それらのそれぞれは、参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい。一実施形態では、免疫化されたトランスジェニックマウスからのｃＤＮＡ（例えば、全脾臓ｃＤＮＡ）が単離され、免疫グロブリンポリペプチドの一部、例えば、ＣＤＲ領域をコードするｃＤＮＡ配列を増幅するために、ポリメラーゼ連鎖反応が使用され、増幅された配列がファージベクター内に挿入される。対象のペプチド、例えば、所望の結合特徴を有する可変領域ペプチドをコードするｃＤＮＡがパニングなどの標準的なファージディスプレイ技術によって特定される。

【０１３１】

次に、増幅された、またはクローニングされた核酸の配列が決定される。典型的には、免疫グロブリンポリペプチドの全可変領域をコードする配列が決定されるが、可変領域の一部のみ、例えば、ＣＤＲコード部分を配列決定することが適切であるときもある。典型

的には、配列決定された一部は、長さが少なくとも３０塩基であり、より頻繁には可変領域の約１／３または少なくとも約１／２の長さのコードに基づき配列決定される。

【０１３２】

配列決定は、ｃＤＮＡライブラリから単離されたクローンに対して、またはＰＣＲが使用されるとき、増幅された配列をサブクローニングした後、または増幅されたセグメントの直接ＰＣＲ配列決定により行われ得る。配列決定は、標準的な技法を使用して行われる（例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｇｕｉｄｅ，Ｖｏｌｓ １－３，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓ，１９８９、及びＳａｎｇｅｒ，Ｆ．ｅｔ ａｌ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ７４：５４６３－５４６７，１９７７を参照されたく、これらは、参照により本明細書に組み込まれる）。クローニングされた核酸の配列を、公開されたヒト免疫グロブリン遺伝子及びｃＤＮＡの配列と比較することにより、当業者は、配列決定される領域により、（ｉ）ハイブリドーマ免疫グロブリンポリペプチド（重鎖のアイソタイプを含む）の生殖系列セグメントの使用、ならびに（ｉｉ）Ｎ領域付加及び体細胞突然変異のプロセスから生じる配列を含む、重鎖及び軽鎖可変領域の配列を容易に決定することができる。免疫グロブリン遺伝子配列情報の１つの源は、Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｌｉｂｒａｒｙ ｏｆ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，Ｍｄ．である。

【０１３３】

単離されたら、ＤＮＡは、発現ベクター内に配置され得、これは次に、組換え宿主細胞においてモノクローナル抗体の合成を得るために、Ｅ．ｃｏｌｉ細胞、サルＣＯＳ細胞、ヒト胚性腎臓２９３細胞（例えば、２９３Ｅ細胞）、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、もしくはさもなければ免疫グロブリンタンパク質を産生しない骨髄腫細胞などの宿主細胞内にトランスフェクトされる。抗体の組換え産生は当該技術分野において周知である。

【０１３４】

発現制御配列は、特定の宿主生物における作動可能に連結されたコード配列の発現に必要なＤＮＡ配列を指す。例えば、原核生物に好適である制御配列は、プロモーター、任意選択でオペレーター配列、及びリボソーム結合部位を含む。真核細胞は、プロモーター、ポリアデニル化シグナル、及びエンハンサーを利用することが知られている。

【０１３５】

代替えの実施形態では、対象の免疫グロブリンのアミノ酸配列は、直接タンパク質配列決定により決定され得る。好適なコードヌクレオチド配列は、普遍コドン表（ｕｎｉｖｅｒｓａｌ ｃｏｄｏｎ ｔａｂｌｅ）に従い設計され得る。

【０１３６】

所望の抗体のアミノ酸配列変異型は、適切なヌクレオチド変化をコード化ＤＮＡ内に導入することにより、またはペプチド合成によって調製され得る。かかる変異型は、例えば、抗体のアミノ酸配列内の残基からの欠失及び／またはその中への挿入及び／またはその置換を含む。欠失、挿入、及び置換の任意の組み合わせが行われて最終構築物に到達するが、但し、最終構築物が所望の特徴を保有することを条件とする。アミノ酸変化は、グリコシル化部位の数または位置の変化など、抗体の翻訳後プロセスも変更し得る。

【０１３７】

抗体のアミノ酸配列変異型をコードする核酸分子は、当該技術分野において既知である様々な方法によって調製される。これらの方法には、天然源からの単離（天然に生じるアミノ酸配列変異型の場合）、またはオリゴヌクレオチド媒介（もしくは部位指向的）突然変異誘発、ＰＣＲ突然変異誘発、及び先に調製された抗体の変異型もしくは非変異型バージョンのカセット突然変異誘発による調製が含まれるが、これらに限定されない。

【０１３８】

本開示は、本明細書に企図される抗体をコードする単離された核酸、任意選択で宿主細

胞、ベクター、及び核酸を含む宿主細胞によって認識される作動可能に連結された制御配列、ならびに核酸が発現されるように宿主細胞を培養すること、及び任意選択で抗体を宿主細胞培養物または培養培地から回収することを含む、抗体の産生のための組換え技法も提供する。抗体産生のための種々の系及び方法は、Ｂｉｒｃｈ＆Ｒａｃｈｅｒ　Ａｄｖ．Ｄｒｕｇ　Ｄｅｌｉｖ．Ｒｅｖ．６７１－６８５　２００６）に概説される。

【０１３９】

抗体または抗体断片の組換え産生に関して、それをコードする核酸は、単離され、さらなるグローニングのため（ＤＮＡの増幅）または発現のために複製可能なベクター内に挿入される。モノクローナル抗体をコードするＤＮＡは、従来の手順を使用して（例えば、抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを使用することにより）、容易に単離され、配列決定される。多くのベクターが利用可能である。ベクターの構成成分は一般的に、以下のうちの１つ以上を含むが、これらに限定されない：シグナル配列、複製起点、１つ以上の選択マーカー遺伝子、エンハンサー要素、プロモーター、及び転写終結配列。

【０１４０】

本明細書のベクターにおいてＤＮＡをグローニングまたは発現するのに好適な宿主細胞は、原核生物、酵母、または高等真核生物細胞である。この目的のための適な原核生物には、真正細菌、例えば、グラム陰性もしくはグラム陽性生物、例えば、ＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａなどのＥｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒｉａｃｅａｅ、例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ、Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒ、Ｅｒｗｉｎｉａ、Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ、Ｐｒｏｔｅｕｓ、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ、例えば、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍ、Ｓｅｒｒａｔｉａ、例えば、Ｓｅｒｒａｔｉａ ｍａｒｃｅｓｃａｎｓ、及びＳｈｉｇｅｌｌａ、ならびにＢ．ｓｕｂｔｉｌｉｓ及びＢ．ｌｉｃｈｅｎｉｆｏｒｍｉｓなどのＢａｃｉｌｌｉ（例えば、１９８９年４月１２日に公開されたＤＤ　２６６，７１０に開示されたＢ．ｌｉｃｈｅｎｉｆｏｒｍｉｓ　４１　Ｐ）、Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ及びＳｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓなどのＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓが含まれる。１つの好ましいＥ．ｃｏｌｉクローニング宿主は、Ｅ．ｃｏｌｉ　２９４（ＡＴＣＣ　３１，４４６）であるが、Ｅ．ｃｏｌｉ　Ｂ、Ｅ．ｃｏｌｉ　Ｘ１７７６（ＡＴＣＣ　３１，５３７）、及びＥ．ｃｏｌｉ　Ｗ３１１０（ＡＴＣＣ　２７，３２５）などの他の株も好適である。これらの例は、限定ではなく例示である。

【０１４１】

種々の実施形態では、本明細書のＦａｂタンパク質の製造は、ＣＨＯ細胞またはＷａｃｋｅｒ　Ｃｈｅｍｉｅ　ＥＳＥＴＥＣ（登録商標）技術の使用、例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ　Ｋ１２細胞（Ｗａｃｋｅｒ　Ｃｈｅｍｉｅ　ＡＧ，Ｍｕｎｉｃｈ，Ｇｅｒｍａｎｙ）を使用するタンパク質の産生を含む。

【０１４２】

原核生物に加えて、糸状真菌または酵母などの真核微生物は、抗体コードベクターの好適なクローニングまたは発現宿主である。Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅまたは一般的なパン酵母は、下等真核宿主微生物の中で最も一般的に使用される。しかしながら、いくつかの他の属、種、及び株、例えば、シゾサッカロミセス・ポンベ（Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｐｏｍｂｅ）；クルイウェロマイセス属（Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ）宿主、例えば、Ｋ．ラクティス（Ｋ．ｌａｃｔｉｓ）、Ｋ．フラギリス（Ｋ．ｆｒａｇｉｌｉｓ）（ＡＴＣＣ　１２，４２４）、Ｋ．ブルガリクス（Ｋ．ｂｕｌｇａｒｉｃｕｓ）（ＡＴＣＣ　１６，０４５）、Ｋ．ウィッケラミイ（Ｋ．ｗｉｃｋｅｒａｍｉｉ）（ＡＴＣＣ　２４，１７８）、Ｋ．ワルティ（Ｋ．ｗａｌｔｉｉ）（ＡＴＣＣ　５６，５００）、Ｋ．ドロソフィラルム（Ｋ．ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａｒｕｍ）（ＡＴＣＣ　３６，９０６）、Ｋ．サーモトレランス（Ｋ．ｔｈｅｒｍｏｔｏｌｅｒａｎｓ）、及びＫ．マルキシアヌス（Ｋ．ｍａｒｘｉａｎｕｓ）など；ヤロウイア属（ｙａｒｒｏｗｉａ）（ＥＰ　４０２，２２６）；ピキア・パストリス（Ｐｉｃｈｉａ ｐａｓｔｏｒｓ）（ＥＰ　１８３，０７０）；カンジダ属（Ｃａｎｄｉｄａ）；トリコデルマ・

レシア（Ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ ｒｅｅｓｉａ）（ＥＰ ２４４，２３４）；ニューロスポラ・クラッサ（Ｎｅｕｒｏｓｐｏｒａ ｃｒａｓｓａ）；シュワニオミセス・オクシデンタリス（Ｓｃｈｗａｎｎｉｏｍｙｃｅｓ ｏｃｃｉｄｅｎｔａｌｉｓ）などのシュワニオミセス属（Ｓｃｈｗａｎｎｉｏｍｙｃｅｓ）；ならびに糸状真菌、例えば、ニューロスポラ属（Ｎｅｕｒｏｓｐｏｒａ）、ペニシリウム属（Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｕｍ）、トリポクラディウム属（Ｔｏｌｙｐｏｃｌａｄｉｕｍ）、及びアスペルギルス属（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）宿主、例えば、Ａ．ニデュランス（Ａ．ｎｉｄｕｌａｎｓ）及びＡ．ニガー（Ａ．ｎｉｇｅｒ）が一般的に利用可能であり、本明細書において有用である。

【０１４３】

グリコシル化抗体の発現に好適な宿主細胞は、多細胞生物に由来する。無脊椎細胞の例としては、植物及び昆虫細胞が挙げられる。多くのバキュロウイルス株及び変異型、ならびにスポドプテラ・フルギペルダ（Ｓｐｏｄｏｐｔｅｒａ ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａ）（イモムシ）、ネッタイシマカ（Ａｅｄｅｓ ａｅｇｙｐｔｉ）（カ）、セスジヤブカ（Ａｅｄｅｓ ａｌｂｏｐｉｃｔｕｓ）（カ）、キイロショウジョウバエ（Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ ｍｅｌａｎｏｇａｓｔｅｒ）（ショウジョウバエ）、及びカイコ（Ｂｏｍｂｙｘ ｍｏｒｉ）などの宿主からの対応する許容昆虫宿主細胞が特定されている。トランスフェクションのための様々なウイルス株、例えば、オートグラファ・カリフォルニカ（Ａｕｔｏｇｒａｐｈａ ｃａｌｉｆｏｒｎｉｃａ）ＮＰＶのＬ－１変異型及びカイコ（Ｂｏｍｂｙｘ ｍｏｒｉ）ＮＰＶのＢｍ－５株が公的に利用可能であり、かかるウイルスは、本開示による、特にスポドプテラ・フルギペルダ（Ｓｐｏｄｏｐｔｅｒａ ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａ）細胞のトランスフェクションのための本明細書のウイルスとして使用され得る。

【０１４４】

綿、トウモロコシ、ジャガイモ、ダイズ、ペチュニア、トマト、タバコ、アオウキクサ、及び他の植物細胞の植物細胞培養物も宿主として利用することができる。

【０１４５】

有用な哺乳類宿主細胞系の例は、チャイニーズハムスター卵巣細胞、ＣＨＯＫ１細胞（ＡＴＣＣ ＣＣＬ６１）、ＤＸＢ－１１、ＤＧ－４４、及びチャイニーズハムスター卵巣細胞／－ＤＨＦＲ（ＣＨＯ、Ｕｒｌａｕｂ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ７７：４２１６（１９８０））を含む；ＳＶ４０により形質転換されたサル腎臓ＣＶ１系（ＣＯＳ－７、ＡＴＣＣ ＣＲＬ １６５１）；ヒト胚性腎臓系（２９３細胞、または浮遊培養における成長のためにサブクローニングされた２９３細胞（Ｇｒａｈａｍ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｇｅｎ Ｖｉｒｏｌ．３６：５９，１９７７）；ベビーハムスター腎臓細胞（ＢＨＫ、ＡＴＣＣ ＣＣＬ １０）；マウスセルトリ細胞（ＴＭ４，Ｍａｔｈｅｒ，（Ｂｉｏｌ．Ｒｅｐｒｏｄ．２３：２４３－２５１，１９８０）；サル腎臓細胞（ＣＶ１ ＡＴＣＣ ＣＣＬ ７０）；アフリカミドリザル腎臓細胞（ＶＥＲＯ－７６、ＡＴＣＣ ＣＲＬ－１５８７）；ヒト頚部細胞腫細胞（ＨＥＬＡ、ＡＴＣＣ ＣＣＬ ２）；イヌ腎臓細胞（ＭＤＣＫ、ＡＴＣＣ ＣＣＬ ３４）；バッファローラット肝臓細胞（ＢＲＬ ３Ａ、ＡＴＣＣ ＣＲＬ １４４２）；ヒト肺細胞（Ｗ１３８、ＡＴＣＣ ＣＣＬ ７５）；ヒト肝臓細胞（Ｈｅｐ Ｇ２、ＨＢ ８０６５）；マウス乳房腫瘍（ＭＭＴ ０６０５６２、ＡＴＣＣ ＣＣＬ５１）；ＴＲＩ細胞（Ｍａｔｈｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ａｎｎａｌｓ Ｎ．Ｙ Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．３８３：４４－６８（１９８２））；ＭＲＣ ５細胞；ＦＳ４細胞；及びヒト肝細胞腫系（Ｈｅｐ Ｇ２）である。

【０１４６】

宿主細胞は、抗体産生のための上述の発現もしくはクローニングベクターで形質転換またはトランスフェクトされ、プロモーターの誘発、形質転換体の選択、または所望の配列をコードする遺伝子の増幅に適切であるように修飾された従来の栄養素培地中で培養される。加えて、新規ベクター及び選択マーカーにより分離された転写単位の複数コピーでトランスフェクトされた細胞系は、特に有用であり、所望の抗原を結合する抗体の発現に好ましい。

【０１４７】

所望の抗体または抗体断片核酸配列を含有する宿主細胞は、様々な培地中で培養することができる。ハムＦ１０（Ｓｉｇｍａ）、最小必須培地（（ＭＥＭ），（Ｓｉｇｍａ）、ＲＰＭＩ－１６４０（Ｓｉｇｍａ）、及びダルベッコ改変イーグル培地（（ＤＭＥＭ），Ｓｉｇｍａ）などの市販の培地が宿主細胞の培養に好適である。加えて、Ｈａｍ ｅｔ ａｌ．Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚ．５８：４４，１９７９、Ｂａｒｎｅｓ ｅｔ ａｌ．Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１０２：２５５，１９８０、米国特許第４，７６７，７０４号、同第４，６５７，８６６号、同第４，９２７，７６２号、同第４，５６０，６５５号、もしくは同第５，１２２，４６９号、ＷＯ９０１０３４３０、ＷＯ ８７／００１９５、または米国特許再発行第３０，９８５号に記載される培地のいずれかが宿主細胞の培養培地として使用され得る。これらの培地のいずれかは、必要に応じて、ホルモン及び／もしくは他の成長因子（インスリン、トランスフェリン、または表皮成長因子など）、塩（塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、及びリン酸塩など）、緩衝剤（ＨＥＰＥＳなど）、ヌクレオチド（アデノシン及びチミジンなど）、抗生物質（ＧＥＮＴＡＭＹＣＩＮ（商標）薬物など）、微量元素（マイクロモル範囲の最終濃度で通常存在する無機化合物として定義される）、及びグルコース、または同等のエネルギー源で補足され得る。任意の他の必要な補足物も、当業者に既知であろう適切な濃度で含まれてもよい。温度、ｐＨなどの培養条件は、発現のために選択された宿主細胞で以前に使用されたものであり、当業者には明らかでる。

【０１４８】

組換え技法を使用するとき、抗体または抗体断片は、細胞内で、細胞膜周辺腔で産生されるか、または微生物培養物からを含む、培地中に直接分泌され得る。抗体が細胞内で産生される場合、最初のステップとして、宿主細胞または溶解された断片のいずれかの微粒子残屑が、例えば、遠心分離または限外濾過により除去される。Ｂｅｔｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４０：１０４１－４３，１９８８、ＩＣＳＵ Ｓｈｏｒｔ Ｒｅｐｏｒｔｓ １０：１０５，１９９０、及びＰｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９０：４５７－４６１，１９９３は、Ｅ．ｃｏｌｉの細胞膜周辺腔に分泌される抗体を単離するための手順を記載している。（Ｃａｒｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １０：１６３－１６７，１９９２も参照されたい）。

【０１４９】

抗体または抗体断片組成物は、例えば、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーカチオンもしくはアニオン交換クロマトグラフィー、及び親和性クロマトグラフィーを使用して精製され得るが、親和性クロマトグラフィーが好ましい精製技法である。親和性リガンドとしてのタンパク質Ａの適合性は、種及び抗体に存在する任意の免疫グロブリンＦｃドメインのアイソタイプに依存する。タンパク質Ａは、ヒトγ１、γ２、またはγ４重鎖に基づく抗体を精製するために使用され得る（Ｌｉｎｄｍａｒｋ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈ．６２：１－１３，１９８３）。タンパク質Ｇは、全てのマウスアイソタイプ及びヒトγ３に推奨される（Ｇｕｓｓ ｅｔ ａｌ．，ＥＭＢＯ Ｊ．５：１５６７１５７５，１９８６）。親和性リガンドが結合される基質は、アガロースであることが最も多いが、他の基質も利用可能である。制御多孔性ガラスまたはポリ（スチレンジビニル）ベンゼンなどの機械的に安定した基質は、アガロースで達成され得るよりも迅速な流速及び短い処理時間を可能にする。抗体がC_H ３ドメインを含む場合、Ｂａｋｅｒｂｏｎｄ ＡＢＸ（商標）脂（Ｊ．Ｔ．Ｂａｋｅｒ，Ｐｈｉｌｌｉｐｓｂｕｒｇ，Ｎ．Ｊ．）が精製に有用である。イオン交換カラム上での分留、エタノール沈殿、逆相ＨＰＬＣ、シリカでのクロマトグラフィー、ヘパリンでのクロマトグラフィーアニオンまたはカチオン交換樹脂（ポリアスパラギン酸カラムなど）でのＳＥＰＨＡＲＯＳＥ（商標）クロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ、及び硫酸アンモニウム沈殿などのタンパク質精製のための他の技法も、回収される抗体により利用可能である。

【０１５０】

例示的な抗体のアミノ酸配列は図６及び図１９に記載される。

【０１５１】

例示的な実施形態では、本方法は、以下の使用を企図する：
それぞれ、配列番号５～１０、または配列番号５０～１１２及び配列番号１１～１６、または配列番号２０～２８のうちのいずれか１つのＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、もしくはＬＣＤＲ３のうちのいずれか１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つを保持し、任意選択で、かかるＣＤＲ（複数可）のいずれかに１つまたは２つの突然変異、例えば、保存的または非保存的置換を含む、モノクローナル抗体、
配列番号１、２、もしくは２９～４９のうちのいずれか１つのＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３の全て、または重鎖可変領域を保持し、任意選択で、かかるＣＤＲ（複数可）のいずれかに１つまたは２つの突然変異を含む、モノクローナル抗体、
いずれか１つの配列番号３もしくは４、または１７～１９のＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、ＬＣＤＲ３の全て、あるいは軽鎖可変領域を保持し、任意選択で、かかるＣＤＲ（複数可）のいずれかに１つまたは２つの突然変異を含み、任意選択で、任意の好適な軽鎖定常領域、例えば、カッパもしくはラムダ軽鎖定常領域、そのヒトヒト配列、またはそのハイブリッドもしくはそのヒトコンセンサスをさらに含む、モノクローナル抗体、
例えば、Ｘ線結晶学、または重水素交換質量分析、アラニン走査、及びペプチド断片ＥＬＩＳＡなどの他の生物学的もしくは生化学的技法により決定されるとき、配列番号１～４、１７～１９、及び／または２９～４９に記載される可変領域を含む抗体として、ＩＮＳＲの同じ直鎖状または３次元エピトープに結合するモノクローナル抗体、
約７５％超、約８０％超、または約８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、または９５％超でヒトＩＮＳＲに結合するために、配列番号１～４、１７～１９、及び／または２９～４９に記載される可変領域を含む抗体と競合するモノクローナル抗体、
配列番号１、２、２９～４９、及び４または１７～１９のいずれか１つに記載される重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含むモノクローナル抗体の精製調製物、
配列番号２及び４、または１７～１９のいずれか１つに記載される重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含むモノクローナル抗体の精製調製物。

【０１５２】
いくつかの実施形態では、抗体は、表１に記載されるように対合される、３つ全ての軽鎖ＣＤＲ、３つ全ての重鎖ＣＤＲ、または軽鎖及び重鎖の６つ全てのＣＤＲを含む。いくつかの例示的な実施形態では、抗体からの２つの軽鎖ＣＤＲは、異なる抗体からの第３の軽鎖ＣＤＲと組み合わせられ得る。あるいは、１つの抗体からのＬＣＤＲ１は、特にＣＤＲが高度に相同である場合、異なる抗体からのＬＣＤＲ２及びまた別の抗体からのＬＣＤＲ３と組み合わせられ得る。同様に、ある抗体からの２つの重鎖ＣＤＲが、異なる抗体からの第３の重鎖ＣＤＲと組み合わせられ得るか、または１つの抗体からのＨＣＤＲ１が、特にＣＤＲが高度に相同である場合、異なる抗体からのＨＣＤＲ２及びまた別の抗体からのＨＣＤＲ３と組み合わせられ得る。

【０１５３】
コンセンサスＣＤＲも使用され得る。本明細書において得られるコンセンサスＣＤＲのうちのいずれか１つは、抗体のいずれかの同じ鎖（例えば、重または軽）からの２つの他のＣＤＲと組み合わされて、例えば、好適な重鎖または軽鎖可変領域を形成することができる。

【０１５４】
いくつかの実施形態では、配列番号１、２、または２９～４９に記載される重鎖可変領域と少なくとも約６５％、７０％、７５％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％以上同一であるアミノ酸配列及び／または配列番号３、４、及び１７～１９に記載される軽鎖可変領域と少なくとも約６５％、７０％、７５％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、

９９％以上同一であるアミノ酸配列アミノ酸配列を有するポリペプチドを含む抗体が提供され、本抗体は、ＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２、ＣＤＲＨ３、ＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２、またはＣＤＲＬ３のうちの少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または全てをさらに含む。いくつかの実施形態では、軽鎖可変領域と同一パーセントを有するアミノ酸配列は、１１～１６、または配列番号２０～２８に記載される軽鎖ＣＤＲのうちの１つ、２つ、または３つを含み得る。他の実施形態では、重鎖可変領域と同一パーセントを有するアミノ酸配列は、５～１０、または配列番号５０～１１２に記載される重鎖ＣＤＲのうちの１つ、２つ、または３つを含み得る。

【０１５５】

本明細書に使用される抗体は、抗体のＣＤＲ領域に１つまたは２つ以上のアミノ酸置換、例えば、非保存的または保存的置換を有し得る。

【０１５６】

関連実施形態では、フレームワークの残基は改変される。改変され得る重鎖フレームワーク領域は、重鎖ＣＤＲ残基を囲む指定された領域であるＨ－ＦＲ１、Ｈ－ＦＲ２、Ｈ－ＦＲ３、及びＨ－ＦＲ４内に位置し、改変され得る軽鎖フレームワーク領域の残基は、軽鎖ＣＤＲ残基を囲む指定された領域であるＬ－ＦＲ１、Ｌ－ＦＲ２、Ｌ－ＦＲ３、及びＬ－ＦＲ４内に位置する。フレームワーク領域内のアミノ酸は、例えば、ヒトフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワークにおいて特定される任意の好適なアミノ酸と交換され得る。

【０１５７】

本開示は、配列番号３、４、もしくは１７～１９のアミノ酸配列のうちのいずれか１つに融合された配列番号１、２または２９～４９のアミノ酸配列のうちのいずれか１つ、または配列番号１、２、もしくは２９～４９及び配列番号３、４、もしくは１７～１９の少なくとも一部を含むその断片を含む精製されたポリペプチドの使用を提供することがさらに企図され、このポリペプチドは、インスリン受容体またはインスリン／インスリン受容体複合体を結合する。

【０１５８】

別の態様では、本開示は、本明細書に記載される軽鎖可変領域の少なくとも１つのＣＤＲを含む精製されたポリペプチドの使用を提供し、この軽鎖可変領域は、配列番号１１～１６または配列番号２０～２８に記載されるＬＣＤＲ配列と少なくとも９０％同一のアミノ酸配列を含む。一実施形態では、ポリペプチドは、配列番号１１～１６または配列番号２０～２８に記載されるＬＣＤＲのうちのいずれか１つと９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％同一であり得る。さらなる態様では、本開示は、本明細書に記載される重鎖可変領域の少なくとも１つのＣＤＲを含む精製されたポリペプチドの使用を企図し、この重鎖可変領域は、配列番号５～１０または配列番号５０～１１２に記載されるＨＣＤＲ配列と少なくとも９０％同一のアミノ酸配列を含む。一実施形態では、ポリペプチドは、配列番号５～１０または配列番号５０～１１２に記載されるＨＣＤＲのうちのいずれか１つと９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％同一であり得る。

【０１５９】

抗体重鎖及び軽鎖のＣＤＲは、抗体結合親和性を改善し得、例えば、親和性成熟により誘導される変異型アミノ酸配列を含むことがさらに企図される。一態様では、本明細書で使用される抗体は、配列番号１、２、または２９～４９に記載される親抗体配列のＨＣＤＲ１と約５０％、６０％、７０％、８０％、または９０％同一性を有する重鎖ＨＣＤＲ１配列を含むことが企図される。一態様では、本明細書で使用される抗体は、配列番号１、２、または２９～４９に記載される親抗体配列のＨＣＤＲ２と約５０％、６０％、７０％、８０％、または９０％同一性を有する重鎖ＨＣＤＲ２配列を含むことが企図される。関連態様では、本明細書で使用される抗体は、配列番号１、２、または２９～４９に記載される親抗体配列のＨＣＤＲ３と約５０％、６０％、７０％、８０％、または９０％同一性を有する重鎖ＨＣＤＲ３配列を含むことが企図される。

【０１６０】
一態様では、本明細書で使用される抗体は、配列番号３、４、または７～１９に記載される親抗体配列のＬＣＤＲ１と約５０％、６０％、７０％、８０％、または９０％同一性を有する軽鎖ＬＣＤＲ１配列を含むことが企図される。一態様では、本明細書で使用される抗体は、配列番号３、４、または７～１９に記載される親抗体配列のＬＣＤＲ２と約５０％、６０％、７０％、８０％、または９０％同一性を有する重鎖ＬＣＤＲ２配列を含むことが企図される。関連態様では、本明細書で使用される抗体は、配列番号３、４、または７～１９に記載される親抗体配列のＬＣＤＲ３と約５０％、６０％、７０％、８０％、または９０％同一性を有する重鎖ＬＣＤＲ３配列を含むことが企図される。

【０１６１】
一実施形態では、本開示は、配列番号１～４、１７～１９、及び／または２９～４９のうちのいずれか１つに記載される可変領域アミノ酸配列を有する、機能性断片を含む、抗原結合化合物の使用を企図する。関連実施形態では、前述の抗原結合化合物は、抗体の１つ以上のＣＤＲ配列を含み、所望の生物学的活性を呈する、完全に組み立てられた四量体抗体、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体（ＨＵＭＡＮ　ＥＮＧＩＮＥＥＲＥＤ（商標）抗体を含む）、ヒト化抗体、ヒト抗体、キメラ抗体、多特異性抗体、抗体断片、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆｖ、ｓｃＦｖもしくは１本鎖抗体断片、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ミニボディ、直鎖状抗体、キレート化組換え抗体、トリボディもしくはバイボディ、イントラボディ、ナノボディ、小モジュラー免疫薬（ＳＭＩＰ）、結合ドメイン免疫グロブリン融合タンパク質、ラクダ化抗体、V_{HH}含有抗体、またはこれらの抗体のうちのいずれか１つの変異型もしくは誘導体からなる群から選択される。抗原結合化合物は、好ましくは、表面プラズモン共鳴により測定されるとき、10^{-5}、10^{-6}、10^{-7}、10^{-8}、10^{-9}、10^{-10}、10^{-11}、10^{-12}Ｍ以下の結合親和性を保持する。

【０１６２】
一態様では、本方法に有用な抗体は、任意選択で、表１で対合されるように、それぞれ、アミノ酸配列配列番号２及び配列番号４に記載される重鎖可変領域または軽鎖可変領域を含む。

【０１６３】

【表１】

抗体	重鎖可変配列番号	HCDR1, HCDR2, HCDR3 配列番号	軽鎖可変配列番号	LCDR1, LCDR2, LCDR3 配列番号
XPA.15.247	1	5-7	3	11-13
XPA.15.247.2.018	2	8-10	4	14-16
XPA.15.247.014	2		17	20-22
XPA.15.247.011	2		18	23-25
XPA.15.247.019	1		19	26-28
RHF.15.05896.004	29	50-52		
RHF.15.05896.006	30	53-55		
RHF.15.05896.012	31	56-58		
RHF.15.05896.015	32	59-61		
RHF.15.05896.020	33	62-64		
RHF.15.05896.022	34	65-67		
RHF.15.05896.028	35	68-70		
RHF.15.05896.032	36	71-73		
RHF.15.05896.036	37	74-76		
RHF.15.05896.040	38	77-79		
RHF.15.05896.044	39	80-82		
RHF.15.05896.048	40	83-85		
RHF.15.05896.052	41	86-88		
RHF.15.05896.056	42	89-91		
RHF.15.05896.059	43	92-94		

抗体	重鎖可変配列番号	HCDR1, HCDR2, HCDR3 配列番号	軽鎖可変配列番号	LCDR1, LCDR2, LCDR3 配列番号
RHF.15.05896.064	44	95-97		
RHF.15.05896.068	45	98-100		
RHF.15.05896.072	46	101-103		
RHF.15.05896.075	47	104-106		
RHF.15.05896.079	48	107-109		
RHF.15.05896.084	49	110-112		

【０１６４】

抗体は上記のアミノ酸配列に記載される抗体の全てまたは一部を含み得ることがさらに企図される。一実施形態では、抗体は、任意選択で、表１で対合されるように、配列番号１、２、または２９～４９の重鎖のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、もしくはＣＤＲ３のうちの少なくとも１つ、または配列番号３もしくは４、または１７～１９の軽鎖のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、またはＣＤＲ３のうちの少なくとも１つを含む。

【０１６５】

一実施形態では、重鎖は、重鎖ＣＤＲ３配列として特定されたアミノ酸配列を含む。かかる「重鎖ＣＤＲ３配列」（ＨＣＤＲ３）は、配列番号７、１０、５２、５５、５８、６１、６４、６７、７０、７３、７６、７９、８２、８５、８８、９１、９４、９７、１００、１０３、１０６、１０９、及び１１２に記載される重鎖ＣＤＲ３配列として特定されたアミノ酸配列を含む。あるいは、ＨＣＤＲ３配列は、配列番号７、１０、５２、５５、５８、６１、６４、６７、７０、７３、７６、７９、８２、８５、８８、９１、９４、９７、１００、１０３、１０６、１０９、及び１１２に記載される任意のＨＣＤＲ３アミノ酸配列と比較して、１つ以上のアミノ酸変化、すなわち、置換、挿入、または欠失を含有するアミノ酸配列を含む。好ましい置換は、本明細書の別のＨＣＤＲ３内の対応する位置のアミノ酸に対する置換を含む。あるいは、ＨＣＤＲ３配列は、本明細書に記載されるＨＣＤＲ３のコンセンサスアミノ酸配列を含み得る。

【０１６６】

上述の抗体のＨＣＤＲ３配列を含む重鎖は、「重鎖ＣＤＲ１配列」をさらに含み得、これは、配列番号５、８、５０、５３、５６、５９、６２、６５、６８、７１、７４、７７、８０、８３、８６、８９、９２、９５、９８、１０１、１０４、１０７、及び１１０において特定された任意の重鎖ＣＤＲ１と比較して１つ以上のアミノ酸変化、好ましくは本明細書の別の重鎖ＣＤＲ１内の対応する位置のアミノ酸に対する置換を含有する配列番号５、８、５０、５３、５６、５９、６２、６５、６８、７１、７４、７７、８０、８３、８６、８９、９２、９５、９８、１０１、１０４、１０７、及び１１０アミノ酸配列において重鎖ＣＤＲ１として特定されたアミノ酸配列のいずれか、または本明細書に記載される重鎖ＣＤＲ１のコンセンサス配列を含む。

【０１６７】

あるいは、上述の抗体のＨＣＤＲ３配列を含む重鎖は、「重鎖ＣＤＲ２配列」（ＨＣＤＲ２）をさらに含み得、これは、配列番号６、９、５１、５４、５７、６０、６３、６６、６９、７２、７５、７８、８１、８４、８７、９０、９３、９６、９９、１０２、１０

５、１０８、及び１１１において特定された任意のＨＣＤＲ２と比較して１つ以上のアミノ酸変化を含有する配列番号６、９、５１、５４、５７、６０、６３、６６、６９、７２、７５、７８、８１、８４、８７、９０、９３、９６、９９、１０２、１０５、１０８、及び１１１アミノ酸配列においてＨＣＤＲ２として特定されたアミノ酸配列のいずれか、または本明細書に記載される重鎖ＣＤＲ２のコンセンサス配列を含む。

【０１６８】

上述の重鎖ＣＤＲ３配列を含む重鎖は、（ａ）上述の重鎖ＣＤＲ１配列及び（ｂ）上述の重鎖ＣＤＲ２配列の両方も含み得る。

【０１６９】

本開示の一態様は、本明細書に記載される重鎖ＣＤＲ配列のうちのいずれか１つ、２つ、及び／または３つを含む重鎖を含む標的抗原を結合する抗体の使用を企図する。

【０１７０】

上述の重鎖ＣＤＲ配列のいずれかは、ＣＤＲのいずれかの端部に付加されたアミノ酸も含み得る。親和性成熟またはアミノ酸類似体を含有する変異型もしくは誘導体の調製を含む、抗体の変異型及び誘導体ならびに抗原結合化合物の調製は、本明細書にさらに詳細に記載される。例示的な変異型は、アミノ酸配列内の対応するアミノ酸の保存的もしくは非保存的置換、またはアミノ酸の、ヒト抗体配列の対応するアミノ酸との交換を含有するものを含む。

【０１７１】

上述の重鎖のうちのいずれか１つを含む抗体は、軽鎖、好ましくは標的抗原に結合する軽鎖、最も好ましくは以下に記載される軽鎖ＣＤＲ配列を含む軽鎖をさらに含み得る。

【０１７２】

本開示の別の態様は、以下に記載される軽鎖ＣＤＲ配列のうちのいずれか１つ、２つ、及び／または３つを含む軽鎖を含む標的抗原を結合する抗体の使用を提供する。

【０１７３】

好ましくは、軽鎖は、軽鎖ＣＤＲ３配列として特定されたアミノ酸配列を含む。かかる「軽鎖ＣＤＲ３配列」（ＬＣＤＲ３）は、配列番号１３、１６、２２、２５、または２８に記載される軽鎖ＣＤＲ３配列として特定されたアミノ酸配列を含む。あるいは、軽鎖ＣＤＲ３配列は、配列番号１３、１６、２２、２５、または２８に記載される任意の軽鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列と比較して１つ以上のアミノ酸変化、すなわち、以下に記載される軽鎖ＣＤＲ３の置換、挿入、もしくは欠失を含有するアミノ酸配列、またはそのコンセンサス配列を含む。

【０１７４】

上述の軽鎖ＣＤＲ３配列を含む軽鎖は、「軽鎖ＣＤＲ１配列」をさらに含み得、これは、配列番号１１、１４、２０、２３、または２６において特定された任意の軽鎖ＣＤＲ１と比較して１つ以上のアミノ酸変化、好ましくは本明細書の別の軽鎖ＣＤＲ１内の対応する位置のアミノ酸に対する置換を含有する配列番号１１、１４、２０、２３、または２６アミノ酸配列において軽鎖ＣＤＲ１として特定されたアミノ酸配列のいずれか、または本明細書に記載される軽鎖ＣＤＲ１のコンセンサス配列を含む。

【０１７５】

あるいは、上述の軽鎖ＣＤＲ３配列を含む軽鎖は、「軽鎖ＣＤＲ２配列」をさらに含み得、これは、配列番号１２、１５、２１、２４、または２７の任意の軽鎖ＣＤＲ２と比較して１つ以上のアミノ酸変化、好ましくは配列番号１２、１５、２１、２４、または２７の別の軽鎖ＣＤＲ２内の対応する位置のアミノ酸に対する置換を含有する配列番号１２、１５、２１、２４、または２７のアミノ酸配列において軽鎖ＣＤＲ２として特定されたアミノ酸配列のうちのいずれか、または軽鎖ＣＤＲ２のコンセンサス配列を含む。

【０１７６】

関連態様では、本開示は、配列番号１、２、もしくは２９～４９の少なくとも１つのＨＣＤＲ、または配列番号３、４、または１７～１９のＬＣＤＲを含む精製されたポリペプチドの使用を企図し、重鎖可変領域のフレームワーク領域及び軽鎖可変領域のフレームワ

ーク領域は、ヒト抗体からのフレームワーク領域を含む。別の実施形態では、重鎖可変領域のフレームワーク領域及び軽鎖可変領域のフレームワーク領域は、ヒト抗体配列により相同であるようにアミノ酸置換によって化学的に改変される。例えば、各重鎖フレームワーク領域（Ｈ－ＦＲ１－４）内で、マウス重鎖可変領域の少なくとも１つ、少なくとも２つ、少なくとも３つ、少なくとも４つ、少なくとも５つ、または少なくとも６つの天然フレームワーク領域残基がアミノ酸置換により改変されており、各軽鎖フレームワーク領域（Ｌ－ＦＲ１－４）内で、マウス軽鎖可変領域の少なくとも１つ、少なくとも２つ、少なくとも３つ、少なくとも４つ、少なくとも５つ、または少なくとも６つの天然フレームワーク残基がアミノ酸置換により改変されていることが企図される。

【０１７７】

上述の軽鎖ＣＤＲ３配列を含む軽鎖は、（ａ）上述の軽鎖ＣＤＲ１配列及び（ｂ）上述の軽鎖ＣＤＲ２配列の両方も含み得る。

【０１７８】

上述の軽鎖可変領域のうちのいずれか１つを含む抗体は、任意選択で、表１に記載されるように対合された、重鎖可変領域、好ましくは標的抗原に結合する重鎖可変領域、最も好ましくは上述の重鎖ＣＤＲ配列を含む重鎖可変領域をさらに含み得る。

【０１７９】

関連実施形態では、負の調節因子抗体は、以下の抗体断片を含むが、これらに限定されない：ＸＰＡ．１５．２４７（配列番号１及び３）及びＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８（配列番号２及び４）。表１からの重鎖及び軽鎖の他の組み合わせを有する抗体も企図される。

【０１８０】

さらなる態様では、抗体は、インスリン受容体またはインスリン／インスリン受容体複合体への結合に関して、本明細書に記載される抗体のいずれかと競合する抗体である。ある特定の実施形態では、抗体は、部分競合を呈する。関連実施形態では、部分競合は、約３０％～７０％、約３０％～８０％、または約３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、または８０％の競合である。いくつかの実施形態では、抗体は、完全競合を呈する。一実施形態では、完全競合は、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、または１００％超の競合である。抗体の競合を測定するための例示的なアッセイは、当該技術分野において記載される受容体負荷アッセイ及びエピトープビニングアッセイを含むが、これらに限定されない。

【０１８１】

インスリン受容体を結合する他の例示的な抗体は、Ｓｏｏｓ ｅｔ ａｌ，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｊ．２３５：１９９－２０８，１９８６、Ｔａｙｌｏｒ ｅｔ ａｌ，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｊ．２４２：１２３－１２９，１９８７、Ｐｒｉｇｅｎｔ ｅｔ ａｌ，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６５（１７）：９９７０－９９７７，１９９０、Ｂｒｉｎｄｌｅ ｅｔ ａｌ，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｊ．２６８：６１５－６２０，１９９０、Ｓｔｅｅｌｅ－Ｐｅｒｋｉｎｓ ａｎｄ Ｒｏｔｈ，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６５（１６）：９４５８－９４６３，１９９０、ＭｃＫｅｒｎ ｅｔ ａｌ，Ｎａｔｕｒｅ ４４３（１４）：２１８－２２１、Ｂｏａｄｏ ｅｔ ａｌ，Ｂｉｏｔｅｃｈ ａｎｄ ＢｉｏＥｎｇ．９６（２）：３８１－３９１、ＷＯ０４／０５００１６、Ｒｏｔｈ ｅｔ ａｌ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ７９：７３１２－７３１６，１９８２、Ｍｏｒｇａｎ ｅｔ ａｌ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８３：３２８－３３２，１９８６、Ｌｅｂｒｕｎ ｅｔ ａｌ，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６８（１５）：１１２７２－１１２７７，１９９３、Ｆｏｒｓａｙｅｔｈ ｅｔ ａｌ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８４：３４４８－３４５１，１９８７、Ｆｏｒｓａｙｅｔｈ ｅｔ ａｌ，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６２（９）：４１３４－４１４０，Ｇｏｏｄｍａｎ ｅｔ ａｌ，Ｊ．Ｒｅｃｅｐｔｏｒ Ｒｅｓ．１４（６－８），３８１－３９８，１９９４、Ｇａｎｄｅｒｔｏｎ ｅｔ ａｌ，Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｊ．２８８：１９５－２０５，１９９２、Ｓｐａｓｏｖ ｅｔ ａｌ，Ｂｕｌｌ．ｏｆ Ｅｘｐ．Ｂｉ

ｏｌ．ａｎｄ Ｍｅｄ．１４４（１）：４６－４８，２００７、及びＥＰ ２ ０３６５７４ Ａ１に報告されているものを含む。

【０１８２】

抗体断片

抗体断片は、無傷完全長抗体の一部、好ましくは無傷抗体の抗原結合または可変領域を含む。抗体断片の例としては、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆｃａｂ及びＦｖ断片；ダイアボディ；直鎖状抗体；１本鎖抗体分子（例えば、ｓｃＦｖ）；二重特異性、三重特性等の抗体などの多特異性抗体断片（例えば、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ）；ミニボディ；キレート化組換え抗体；トリボディもしくはバイボディ；イントラボディ；ナノボディ；小モジュラー免疫薬（ＳＭＩＰ）、結合ドメイン免疫グロブリン融合タンパク質；ラクダ化抗体；V_{HH}含有抗体；及び抗体断片から形成された他のポリペプチドが挙げられる。例えば、Ｈｏｌｌｉｇｅｒ&Ｈｕｄｓｏｎ，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．２３（９）１１２６－３６，２００５、Ｅｙｅｒ&Ｈｒｕｓｋａ（Ｖｅｔｅｒｉｎａｒｎｉ Ｍｅｄｉｃｉｎａ ５７：４３９－５１３，２０１２）を参照されたい。

【０１８３】

抗体のパパイン消化は、各々単一の抗原結合部位を有するV_L、V_H、C_L、及びC_Hドメイン、ならびにその名称が容易に結晶化するその能力を反映する残存「Ｆｃ」断片からなる一価の断片である、「Ｆａｂ」断片と呼ばれる２つの同一の抗原結合断片を産生する。ペプシン処理は、ヒンジ領域でジスルフィド架橋により連結された２つのＦａｂ断片を含む二価の断片である、Ｆ（ａｂ’）$_2$断片をもたらし、これは、抗体のV_H及びV_Lドメインを含む２つの「１本鎖Ｆｖ」または「ｓｃＦｖ」抗体断片を有し、これらのドメインは単一ポリペプチド鎖に存在する。好ましくは、Ｆｖポリペプチドは、Ｆｖが抗原結合に関して所望の構造を形成することを可能にする、V_HとV_Lドメインとの間にポリペプチドリンカーをさらに含み、V_L及びV_H領域が対合して、それらが単一のタンパク質鎖として作製されることを可能にする合成リンカーを介して一価の分子を形成する、１本鎖抗体（ｓｃＦｖ）をもたらす（Ｂｉｒｄ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４２：４２３－４２６，１９８８及びＨｕｓｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８５：５８７９－５８８３，１９８８）。ｓｃＦｖの考察に関しては、Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎ，ｉｎ Ｔｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ ｏｆ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，ｖｏｌ．ｌ １３，Ｒｏｓｅｎｂｕｒｇ ａｎｄ Ｍｏｏｒｅ ｅｄｓ．，Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ｐｐ．２６９－３１５，１９９４を参照されたい。Ｆｄ断片は、V_H及びC_H１ドメインからなる。

【０１８４】

Ｆａｂ断片などの抗体断片は、当該技術分野において既知であり、また本明細書に記載される組換え技法を使用しても作製することができる。哺乳類、細菌、または他の細胞系において組換え抗体断片を作製するための例示的な方法は、Ｆｒｅｎｚｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｆｒｏｎｔ Ｉｍｍｕｎｏｌ．４：２１７，２０１３（参照により本明細書に組み込まれる）に開示されている。

【０１８５】

追加の抗体断片は、V_Hドメインからなるドメイン抗体（ｄＡｂ）断片（Ｗａｒｄ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３４１：５４４－５４６，１９８９）を含む。ダイアボディは、V_H及びV_Lドメインが単一のポリペプチド鎖上で発現されるが、同じ鎖上で２つのドメイン間の対合を可能にするには短すぎるリンカーを使用し、それによって、ドメインを別の鎖の相補的ドメインと対合させ、２つの抗原結合部位を創出する、二価の抗体である（例えば、ＥＰ ４０４，０９７、ＷＯ ９３／１１１６１、Ｈｏｌｌｉｇｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９０：６４４４－６４４８，１９９３及びＰｏｌｊａｋ ｅｔ ａｌ．，Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ２：１１２１－１１２３，１９９４を参照されたい）。ダイアボディは、二重特異性または単一特異性であり得る。

【０１８６】
軽鎖を含まない機能性重鎖抗体は、コモリザメ（Ｇｒｅｅｎｂｅｒｇ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３７４：１６８－７３，１９９５）、テンジクザメ（Ｎｕｔｔａｌｌ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｉｍｍｕｎｏｌ．３８：３１３－２６，２００１）、ならびにラクダ、ヒトコブラクダ、アルパカ、及びラマなどのラクダ科（Ｈａｍｅｒｓ－Ｃａｓｔｅｒｍａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３６３：４４６－８，１９９３、Ｎｇｕｙｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２７５：４１３，１９９８）において天然に生じる。抗原結合部位は、これらの動物において、ＶＨＨドメインの単一ドメインに還元される。これらの抗体は、重鎖可変領域のみを使用して、抗原結合領域を形成する、すなわち、これらの機能性抗体は、構造H_2L_2のみを有する重鎖のホモ二量体（「重鎖抗体」または「ＨＣＡｂ」と称される）である。ラクダ科V_{HH}は、報告によれば、ヒンジ、ＣＨ２、及びＣＨ３ドメインを含有し、ＣＨ１ドメインを欠くＩｇＧ２及びＩｇＧ３定常領域と再結合する（Ｈａｍｅｒｓ－Ｃａｓｔｅｒｍａｎ ｅｔ ａｌ．、上記）。例えば、ラマＩｇＧ１は、V_HがヒンジＣＨ１、ＣＨ２、及びＣＨ３ドメインを含有する定常領域と再結合する、従来（H_2L_2）の抗体アイソタイプである一方で、ラマＩｇＧ２及びＩｇＧ３はＣＨ１ドメインを欠き、軽鎖を含有しない重鎖のみのアイソタイプである。ラクダ科V_{HH}ドメインは、高親和性で抗原に結合し（Ｄｅｓｍｙｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７６：２６２８５－９０，２００１）、溶液中で高い安定性を有する（Ｅｗｅｒｔ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ４１：３６２８－３６，２００２）ことが分かっている。古典的なV_Hのみの断片は、可溶形態での産生が困難であるが、フレームワーク残基がよりVH_H様になるように改変されるとき、溶解度及び特異的結合の改善を得ることができる。（例えば、Ｒｅｉｃｈｍａｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ ２３１：２５－３８，１９９９を参照されたい）ラクダ科重鎖を有する抗体を生成する方法は、例えば、米国特許公開第２００５０１３６０４９号及び同第２００５００３７４２１号に記載されている。

【０１８７】
１５ｋＤａのみの分子量を有する完全機能性抗原結合断片である抗体重鎖の可変ドメインは、ナノボディと称される（Ｃｏｒｔｅｚ－Ｒｅｔａｍｏｚｏ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ６４：２８５３－５７，２００４）。ナノボディライブラリは、Ｃｏｎｒａｔｈら（Ａｎｔｉｍｉｃｒｏｂ Ａｇｅｎｔｓ Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒ ４５：２８０７－１２，２００１）に記載される免疫化ヒトコブラクダから、またはＲｅｖｅｔｓ ｅｔ ａｌ，Ｅｘｐｅｒｔ Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｌ．Ｔｈｅｒ．５（１）：１１１－２４，２００５に記載される組換え法を使用して生成され得る。

【０１８８】
二重特異性Ｆａｂ－ｓｃＦｖ（「バイボディ」）及び三重特異性Ｆａｂ－（ｓｃＦｖ）（２）（「トリボディ」）の産生は、Ｓｃｈｏｏｎｊａｎｓら（Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６５：７０５０－５７，２０００）及びＷｉｌｌｅｍｓら（Ｊ Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒ Ｂ Ａｎａｌｙｔ Ｔｅｃｈｎｏｌ Ｂｉｏｍｅｄ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉ．７８６：１６１－７６，２００３）に記載されている。バイボディまたはトリボディに関して、ｓｃＦｖ分子が$VL－CL$（Ｌ）及び$VH－CH_1$（Ｆｄ）鎖のうちの１つまたは両方に融合され、例えば、トリボディを産生するためには、２つのｓｃＦｖがＦａｂのＣ末端に融合されるが、バイボディでは、１つのｓｃＦｖがＦａｂのＣ末端に融合される。さらなるＦａｂベースの二重特異性形式は、Ｗｕら（ｍＡｂｓ ７：４７０－４８２，２０１５）に記載されている。

【０１８９】
ペプチドリンカー（ヒンジなし）を介して、またはＩｇＧヒンジを介してＣＨ３に融合されたｓｃＦｖからなる「ミニボディ」は、Ｏｌａｆｓｅｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ Ｄｅｓ Ｓｅｌ．１７（４）：３１５－２３，２００４に記載されている。

【０１９０】

イントラボディは、細胞内発現を示す１本鎖抗体であり、細胞内タンパク質機能を操作することができる（Ｂｉｏｃｃａ，ｅｔ　ａｌ．，ＥＭＢＯ　Ｊ．９：１０１－１０８，１９９０、Ｃｏｌｂｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　Ｕ　ＳＡ．１０１：１７６１６－２１，２００４）。細胞内領域に抗体構築物を保持する細胞シグナル配列を含むイントラボディは、Ｍｈａｓｈｉｌｋａｒ　ｅｔ　ａｌ．ＥＭＢＯ　Ｊ　１４：１５４２－５１，１９９５及びＷｈｅｅｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．ＦＡＳＥＢ　Ｊ．１７：１７３３－５．２００３に記載されるように産生され得る。トランスボディは、タンパク質形質導入ドメイン（ＰＴＤ）が１本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）抗体と融合される細胞透過性抗体であるＨｅｎｇ　ｅｔ　ａｌ．Ｍｅｄ　Ｈｙｐｏｔｈｅｓｅｓ．６４：１１０５－８，２００５。

【０１９１】

ＳＭＩＰまたは抗原に特異的な結合ドメイン免疫グロブリン融合タンパク質である抗体がさらに企図される。これらの構築物は、抗体エフェクター機能を実行するのに必要な免疫グロブリンドメインに融合した抗原結合ドメインを含む１本鎖ポリペプチドである。例えば、ＷＯ０３／０４１６００、米国特許公開２００３／０１３３９３９及び米国特許公開２００３／０１１８５９２を参照されたい。

【０１９２】

１つ以上のＣＤＲが共有結合または非共有結合のいずれかで分子内に組み込まれて、それをイムノアドヘシンにすることができる。イムノアドヘシンは、より大きいポリペプチド鎖の一部としてＣＤＲ（複数可）を組み込むことができるか、別のポリペプチド鎖にＣＤＲを共有結合により連結し得るか、または非共有結合によりＣＤＲ（複数可）を組み込むことができる。ＣＤＲは、イムノアドヘシンが対象の特定の抗原に特異的に結合することを可能にする。

【０１９３】

また別の実施形態では、抗体または抗原結合化合物は、ヒト抗体配列の定常領域、ならびに１つ以上の重鎖及び軽鎖可変フレームワーク領域を含む。関連実施形態では、抗体は、ヒトＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４の修飾された、または未修飾の定常領域を含む。

【０１９４】

あるいは、抗体断片は、タンパク質足場に融合され得る。タンパク質足場のライブラリは、アドネクチン、アフィボディ、アンチカリン、ＤＡＲＰｉｎｓ、操作されたＫｕｎｉｔｚ型阻害剤、テトラネクチン、Ａ－ドメインタンパク質、リポカリン、アンキリン反復タンパク質などの反復タンパク質、免疫タンパク質、α２ｐ８ペプチド、昆虫ディフェンシンＡ、ＰＤＺドメイン、カリブドトキシン、ＰＨＤフィンガー、ＴＥＭ－１　β－ラクタマーゼ、フィブロネクチンＩＩＩ型ドメイン、ＣＴＬＡ－４、Ｔ細胞レスプター、ノッチン、ネオカルチノスタチン、炭水化物結合モジュール４－２、緑色蛍光タンパク質、チオレドキシンを含むが、これらに限定されない（Ｇｅｂａｕｅｒ＆Ｓｋｅｒｒａ，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．１３：２４５－５５，２００９、Ｇｉｌｌ＆Ｄａｍｌｅ，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈ　１７：６５３－５８，２００６、Ｈｏｓｓｅ　ｅｔ　ａｌ，Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｓｃｉ．１５：１４－２７，２００６、Ｓｋｅｒｒａ，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈ　１８：２９５－３０４，２００７）。

【０１９５】

したがって、抗体の重鎖可変領域または軽鎖可変領域の１つ、２つ、及び／または３つのＣＤＲを含む様々な組成物が、当該技術分野において既知の技法により生成され得る。

【０１９６】

キメラ及びヒト化抗体

キメラまたはヒト化抗体は、ヒトにおいて親マウスモノクローナル抗体よりもあまり免疫原性ではないため、それらは、アナフィラキシーのリスクが非常に少なくヒトの治療に使用することができる。

【０１９７】

マウスモノクローナル抗体の可変Ｉｇドメインがヒト定常Ｉｇドメインに融合されるキメラモノクローナル抗体は、当該技術分野において既知の標準的な手順を使用して生成され得る（Ｍｏｒｒｉｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８１，６８４１－６８５５，１９８４及びＢｏｕｌｉａｎｎｅ　ｅｔ　ａｌ，Ｎａｔｕｒｅ　３１２，６４３－６４６，１９８４を参照されたい）。一部のキメラモノクローナル抗体はヒトにおいてあまり免疫原性ではないことが証明されたが、マウス可変Ｉｇドメインは、それでも顕著なヒト抗マウス応答をもたらす可能性がある。

【０１９８】

ヒト化抗体は、例えば、（１）非ヒト相補性決定領域（ＣＤＲ）をヒトフレームワーク及び定常領域上にグラフトすること（当該技術分野において「ＣＤＲグラフト」を通してヒト化することと称されるプロセス）、（２）全非ヒト可変ドメインを移植するが、表面残基の交換によるヒト様表面でそれらを「覆う」こと（当該技術分野において「ベニアリング」と称されるプロセス）、ないしは別の方法で、（３）抗原結合またはタンパク質折り畳みのいずれかに悪影響を与える可能性はないが、ヒト環境において免疫原性を低減すると決定された位置でヒトアミノ酸を置換すること（当該技術分野においてＨＵＭＡＮ　ＥＮＧＩＮＥＥＲＩＮＧ（商標）と称されるプロセス）を含む、様々な方法により達成され得る。本開示において、ヒト化抗体は、「ヒト化」、「ベニアリング」、及び「ＨＵＭＡＮ　ＥＮＧＩＮＥＥＲＥＤ（商標）」抗体の両方を含む。これらの方法は、例えば、Ｊｏｎｅｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　３２１：５２２　５２５，１９８６、Ｍｏｒｒｉｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，Ｕ．Ｓ．Ａ．，８１：６８５１－６８５５，１９８４、Ｍｏｒｒｉｓｏｎ　ａｎｄ　Ｏｉ，Ａｄｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，４４：６５－９２，１９８８、Ｖｅｒｈｏｅｙｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２３９：１５３４－１５３６，１９８８、Ｐａｄｌａｎ，Ｍｏｌｅｃ．Ｉｍｍｕｎ．２８：４８９－４９８，１９９１、Ｐａｄｌａｎ，Ｍｏｌｅｃ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．３１：１６９－２１７，１９９４、Ｋｅｔｔｌｅｂｏｒｏｕｇｈ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｎｇ．４：７７３－７８３，１９９１、Ｓｔｕｄｎｉｃｋａらの米国特許第５，７６６，８８６号、Ｓｔｕｄｎｉｃｋａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｎｇ　７：８０５－８１４，１９９４に開示されており、それらの各々は参照により本明細書に組み込まれる。ＣＤＲグラフト技法は、当該分野において既知であり、例えば、Ｒｉｅｃｈｍａｎｎ，ｅｔ　ａｌ．１９８８　Ｎａｔｕｒｅ　３３２：３２３－２７を参照されたい）。さらなる抗体ヒト化の方法は、Ｓａｆｄａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈ．Ｇｅｎ．Ｅｎｇ．Ｒｅｖ．２９：１７５－８６，２０１３によって考察されている。

【０１９９】

トランスジェニック動物からのヒト抗体

抗原に対するヒト抗体は、内因性免疫グロブリン産生がなく、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を含有するように操作されるトランスジェニック動物を使用して産生することもできる。例えば、ＷＯ９８／２４８９３は、動物が内因性重鎖及び軽鎖遺伝子座の不活性化に起因する機能性内因性免疫グロブリンを産生しない、ヒトＩｇ遺伝子座を有するトランスジェニック動物を開示している。ＷＯ９１／００９０６も、免疫原に対する免疫応答を開始させることができるトランスジェニックの非霊長類哺乳類宿主を開示しており、この抗体は、霊長類の定常及び／または可変領域を有し、遺伝子座をコードする内因性免疫グロブリンが置換されるか、または不活性化される。ＷＯ９６／３０４９８及び米国特許第６，０９１，００１号は、Ｃｒｅ／Ｌｏｘ系を使用して、定常もしくは可変領域の全てまたは一部を交換して、修飾された抗体分子を形成するなどの、哺乳類の免疫グロブリン遺伝子座の修飾を開示している。ＷＯ９４／０２６０２は、不活性化された内因性Ｉｇ遺伝子座及び機能性ヒトＩｇ遺伝子座を有する非ヒト哺乳類宿主を開示している。米国特許第５，９３９，５９８号は、マウスが内因性重鎖を欠き、１つ以上の異種定常領域を含む外因性免疫グロブリン遺伝子座を発現する、トランスジェニックマウスの作製方法を開示している。例えば、米国特許第６，１１４，５９８号、同第６，６５７，１０３号、及び同第６，８３３，２６８号を参照されたい。

【０２００】
上述のトランスジェニック動物を使用して、免疫応答が選択された抗原に対して産生され得、細胞を産生する抗体が動物から取り出され、ヒトモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを産生するために使用され得る。免疫化プロトコル、アジュバントなどは当該技術分野において既知であり、例えば、ＷＯ９６／３３７３５に記載されるように、トランスジェニックマウスの免疫化に使用される。この刊行物は、ＩＬ－６、ＩＬ－８、ＴＮＦａ、ヒトＣＤ４、Ｌセレクチン、ｇｐ３９、及び破傷風毒素を含む、様々な抗原に対するモノクローナル抗体を開示している。モノクローナル抗体は、対応するタンパク質の生物学的活性もしくは生理学的作用を阻害または中和する能力に関して試験され得る。ＷＯ９６／３３７３５は、ＩＬ－８で免疫化されたトランスジェニックマウスの免疫細胞に由来するＩＬ－８に対するモノクローナル抗体が好中球のＩＬ－８誘発機能を遮断したことを開示している。トランスジェニック動物を免疫化するために使用された抗原に特異性を有するヒトモノクローナル抗体も、ＷＯ９６／３４０９６、ならびに米国特許公開第２００３／０１９４４０４号及び米国特許公開第２００３／００３１６６７号に開示されている。

【０２０１】
モノクローナル抗体を作製するのに有用なさらなるトランスジェニック動物は、米国特許第５，７７０，４２９号及びＦｉｓｈｗｉｌｄ，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１４：８４５－８５１，１９９６に記載される、Ｍｅｄａｒｅｘ ＨｕＭＡｂ－ＭＯＵＳＥ（登録商標）を含み、これは、ヒト抗体の重鎖及び軽鎖をコードする再配列されていないヒト抗体遺伝子からの遺伝子配列を含有する。ＨｕＭＡｂ－ＭＯＵＳＥ（登録商標）の免疫化は、抗原に対する完全ヒトモノクローナル抗体の産生を可能にする。

【０２０２】
また、Ｉｓｈｉｄａ ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌｓ．４：９１－１０２，２００２は、ヒトＤＮＡのメガベースの大きさのセグメントを含み、全ヒト免疫グロブリン（ｈＩｇ）遺伝子座を組み込む、ＴｒａｎｓＣｈｒｏｍｏ Ｍｏｕｓｅ（ＴＣＭＯＵＳＥ（商標））を記載している。ＴＣＭＯＵＳＥ（商標）は、ＩｇＧのサブクラス（ＩｇＧ１～Ｇ４）全てを含む、ｈＩｇの十分に多様なレパートリーを有する。種々のヒト抗原でのＴＣＭＯＵＳＥ（商標）の免疫化は、ヒト抗体を含む抗体応答をもたらす。

【０２０３】
Ｊａｋｏｂｏｖｉｔｓ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９０：２５５１，１９９３、Ｊａｋｏｂｏｖｉｔｓ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，３６２：２５５－２５８，１９９３、Ｂｒｕｇｇｅｒｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，Ｙｅａｒ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌ．，７：３３，１９９３、Ｇｒｅｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，１１：７４－８４，２０１４、及び米国特許第５，５９１，６６９号、米国特許第５，５８９，３６９号、米国特許第５，５４５，８０７号、ならびに米国特許公開第２００２／０１９９２１３号も参照されたい。米国特許公開第２００３／００９２１２５号は、所望のエピトープに対する動物の免疫応答を偏らせる方法を記載している。ヒト抗体は、インビトロ活性化Ｂ細胞によっても生成され得る（米国特許第５，５６７，６１０号及び同第５，２２９，２７５号を参照されたい）。

【０２０４】
ディスプレイ技術からのヒト抗体
組換えヒト抗体遺伝子のレパートリーを作製するための技術の開発及び繊維状バクテリオファージの表面上でのコードされた抗体断片のディスプレイは、ヒト抗体を直接作製するための手段を提供してきた。ファージディスプレイ技術により産生された抗体は、細菌における抗原結合断片（通常ＦｖまたはＦａｂ断片）として産生されるため、エフェクター機能を欠く。エフェクター機能は、２つの戦略のうちの１つによって導入され得る。断片が哺乳類細胞における発現のための完全な抗体、またはエフェクター機能を開始させる

ことができる第２の結合部位を有する二重特異性抗体断片のいずれかに操作され得る。
【０２０５】
ファージ上でヒト抗体のライブラリを合成するステップと、抗原またはその一部でライブラリをスクリーニングするステップと、抗原を結合するファージを単離するステップと、ファージから抗体を得るステップと、を含む、抗原特異的抗体またはその抗原結合部分を産生するための方法が利用可能である。例として、ファージディスプレイ技術において使用するための抗体のライブラリを調製する１つの方法は、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を含む非ヒト動物を抗原またはその抗原性部分で免疫化して免疫応答を創出するステップと、免疫化した動物から細胞を産生する抗体を抽出するステップと、抽出した細胞からＲＮＡを単離するステップと、ＲＮＡを逆転写してｃＤＮＡを産生するステップと、プライマーを使用してｃＤＮＡを増幅するステップと、抗原がファージ上で発現されるように、ｃＤＮＡをファージディスプレイベクター内に挿入するステップと、を含む。本明細書で有用な組換え抗原特異的抗体はこの方法で得ることができる。別の例では、細胞を産生する抗体を免疫化されていない動物から抽出し、抽出された細胞からＲＮＡを単離し、逆転写してｃＤＮＡを産生し、これを、プライマーを使用して増幅し、抗体がファージ上で発現されるように、ファージディスプレイベクター内に挿入することができる。ファージディスプレイプロセスは、繊維状バクテリオファージの表面上の抗体レパートリーのディスプレイを通して免疫選択を模倣し、その後、選択した抗原へのそれらの結合によりファージを選択する。かかる技法の１つはＷＯ９９／１０４９４に記載されており、これは、かかるアプローチを使用してＭＰＬ及びｍｓｋ受容体の高親和性及び機能性アゴニスト抗体の単離を説明している。抗体は、組換えコンビナトリアル抗体ライブラリ、例えば、ｓｃＦｖもしくはＦａｂファージディスプレイライブラリをスクリーニングすることにより単離され、ヒトリンパ球に由来するｍＲＮＡから調製されたヒトV_L及びV_H ｃＤＮＡを使用して調製され得る。かかるライブラリの調製及びスクリーニング方法論は当該技術分野において既知である。例えば、米国特許第５，９６９，１０８号を参照されたい。ファージディスプレイライブラリを生成するための市販のキットがある（例えば、Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ Ｐｈａｇｅ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｓｙｓｔｅｍ、カタログ番号２７－９４００－０１及びＳｔｒａｔａｇｅｎｅ ＳｕｒｆＺＡＰ（商標）ファージディスプレイキット、カタログ番号２４０６１２）。抗体ディスプレイライブラリの生成及びスクリーニングに使用することができる他の方法もある（例えば、Ｌａｄｎｅｒらの米国特許第５，２２３，４０９号、ＫａｎｇらのＰＣＴ公開第ＷＯ９２／１８６１９号、ＤｏｗｅｒらのＰＣＴ公開第ＷＯ９１／１７２７１号、ＷｉｎｔｅｒらのＰＣＴ公開第ＷＯ９２／２０７９１号、ＭａｒｋｌａｎｄらのＰＣＴ公開第ＷＯ９２／１５６７９号、ＢｒｅｉｔｌｉｎｇらのＰＣＴ公開第ＷＯ ９３／０１２８８号、ＭｃＣａｆｆｅｒｔｙらのＰＣＴ公開第ＷＯ９２／０１０４７号、ＧａｒｒａｒｄらのＰＣＴ公開第ＷＯ９２／０９６９０号、Ｆｕｃｈｓ ｅｔ ａｌ．Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ９：１３７０－１３７２，１９９１、Ｈａｙ ｅｔ ａｌ．Ｈｕｍ．Ａｎｔｉｂｏｄ．Ｈｙｂｒｉｄｏｍａｓ ３：８１－８５，１９９２、Ｈｕｓｅ ｅｔ ａｌ．Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４６：１２７５－１２８１，１９８９、ＭｃＣａｆｆｅｒｔｙ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３４８：５５２－５５４，１９９０、Ｇｒｉｆｆｉｔｈｓ ｅｔ ａｌ．ＥＭＢＯ Ｊ １２：７２５－７３４，１９９３、Ｈａｗｋｉｎｓ ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２６：８８９－８９６，１９９２、Ｃｌａｃｋｓｏｎ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ ３５２：６２４－６２８，１９９１、Ｇｒａｍ ｅｔ ａｌ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８９：３５７６－３５８０，１９９２、Ｇａｒｒａｄ ｅｔ ａｌ．Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ９：１３７３－１３７７，１９９１、Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｍ ｅｔ ａｌ．Ｎｕｃ Ａｃｉｄ Ｒｅｓ １９：４１３３－４１３７，１９９１、Ｂａｒｂａｓ ｅｔ ａｌ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８８：７９７８－７９８２，１９９１、及びＯｍｉｄｆａｒ＆Ｄａｎｅｓｈｐｏｕｒ，Ｅｘｐ．Ｏｐ．Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃ．１０：６５１－６６９，２０１５を参照されたい。
【０２０６】

一実施形態では、所望の結合特徴を有する、抗原に特異的なヒト抗体を単離するために、ヒトV_H及びV_Lライブラリをスクリーニングして、所望の特異性を有する抗体断片を選択する。この方法において使用された抗体ライブラリは、本明細書及び当該技術分野（McCaffertyらのPCT公開第WO92／01047号、McCafferty et al.，Nature 348：552－554，1990、Griffiths et al.，EMBO J 12：725－734，1993、及びSchwimmer et al，J. Immunol. Methods 391：60－71，2013）において記載されるように調製及びスクリーニングされたscFvライブラリであり得る。抗体ライブラリは、好ましくは、抗原を使用してスクリーニングされる。

【0207】

あるいは、抗体のFd断片（V_H－C_H1）及び軽鎖（V_L－C_L）がPCRにより別個にクローニングされ、コンビナトリアルファージディスプレイライブラリにおいて無作為に組換えられ、その後、これは、特定の抗原に対する結合に関して選択され得る。Fab断片は、ファージ表面上で発現される、すなわち、それらをコードする遺伝子に物理的に連結される。したがって、抗原結合によるFabの選択は、配列をコードするFabに関して同時選択（co－select）し、これは後に増幅され得る。パンニングと呼ばれる手順である数回の抗原結合及び再増幅を通して、抗原に特異的なFabは富化され、最終的に単離される。

【0208】

1994年に、「誘導された選択」と呼ばれる抗体のヒト化のためのアプローチが説明された。誘導された選択は、マウスモノクローナル抗体のヒト化のためのファージディスプレイ技法の力を利用する（Jespers，L. S.，et al.，Bio／Technology 12，899－903，1994を参照されたい）。これに関して、マウスモノクローナル抗体のFd断片はヒト軽鎖ライブラリと共にディスプレイされ得、次いで、得られたハイブリッドFabライブラリは抗原を用いて選択され得る。マウスFd断片は、それにより、選択を誘導するためのテンプレートを提供する。その後、選択されたヒト軽鎖はヒトFd断片ライブラリと組み合わせられる。得られたライブラリの選択は完全なヒトFabをもたらす。

【0209】

ファージディスプレイライブラリからヒト抗体を導くための様々な手順が記載されている（例えば、Hoogenboom et al.，J. Mol. Biol.，227：381，1991、Marks et al.，J. Mol. Biol，222：581－597，1991、米国特許第5，565，332号及び第5，573，905号、Clackson，T.，and Wells，J. A.，TIBTECH 12，173－184，1994を参照されたい）。特に、ファージディスプレイライブラリから導かれた抗体のインビトロ選択及び進化は、強力なツールとなった（Burton，D. R.，and Barbas III，C. F.，Adv. Immunol. 57，191－280，1994、Winter，G.，et al.，Annu. Rev. Immunol. 12，433－455，1994、米国特許公開第2002／0004215号及びWO92／01047、米国特許公開第2003／0190317号、ならびに米国特許第6，054，287号及び同第5，877，293号を参照されたい。

【0210】

Fv断片は、可溶性断片として発現された相補鎖との、ファージタンパク質融合（例えば、M13遺伝子IIIと）として発現された1本の鎖の会合によりファイージの表面上にディスプレイされる。ファージは、クラスIファージ：fd、M13、f1、If1、lke、ZJ／Z、Ffのうちの1つ、ならびにクラスIIファージ：aXf、Pf1、及びPf3のうちの1つなど、繊維状ファージであり得ることが企図される。ファージは、M13、またはfdもしくはその誘導体であり得る。

【0211】

最初のヒトV_L及びV_Hセグメントが選択されたら、選択されたV_L及びV_Hセグメン

トの異なる対合が抗原結合に関してスクリーニングされ、好ましいV_L／V_H対の組み合わせを選択する、「ミックス・アンド・マッチ」実験（例えば、Ｋａｎｇ　ｅｔ　ａｌ（１９９１）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．８８：１１１２０－１１１２３を参照されたい）。加えて、抗体の質をさらに改善するために、好ましいV_L／V_H対（複数可）のV_L及びV_Hセグメントは、自然免疫応答の間の抗体の親和性成熟に関与するインビボ体細胞突然変異プロセスに類似するプロセスにおいて、好ましくは、V_H及び／またはV_LのＣＤＲ１、ＣＤＲ２、またはＣＤＲ３領域のいずれか内で無作為に変異され得る。このインビトロ親和性成熟は、それぞれ、V_H　ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３、またはV_L　ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３に相補的なＰＣＲプライマーを使用して、V_L及びV_H領域を増幅することにより達成され得、このプライマーは、得られるＰＣＲ産物が、無作為突然変異がV_H及び／またはV_LのＣＤＲ３領域内に導入されたV_L及びV_Hセグメントをコードするように、ある特定の位置で４つのヌクレオチド塩基の無作為混合物で「スパイク」されている。これらの無作為に変異されたV_L及びV_Hセグメントは、抗原への結合に関して再度スクリーニングされてもよい。

【０２１２】

組換え免疫グロブリンディスプレイライブラリからの標的特異的抗体のスクリーニング及び単離の後、選択された抗体をコードする核酸は、ディスプレイパッケージから（例えば、ファージゲノムから）回収され、標準的な組換えＤＮＡ技法により他の発現ベクター内にサブクローニングされ得る。所望する場合、核酸は、さらに操作されて、以下に記載されるように、他の抗体形態を創出することができる。コンビナトリアルライブラリのスクリーニングにより単離された組換えヒト抗体を発現するために、抗体をコードするＤＮＡは、本明細書に記載されるように、組換え発現ベクター内にクローニングされ、哺乳類宿主細胞内に導入される。

【０２１３】

ファージディスプレイ法が細菌または宿主細胞の変異誘発株において実行され得ることが企図される。変異誘発株は、その中で複製されたＤＮＡをその親ＤＮＡに対して変異させる遺伝的欠損を有する宿主細胞である。例示的な変異誘発株は、ＮＲ９０４６ｍｕｔＤ５及びＮＲ９０４６　ｍｕｔ　Ｔ１である。

【０２１４】

ファージディスプレイ法は、ヘルパーファージを使用して実行することができることも企図される。これは、欠損ファージゲノムを含有する細胞を感染させるために使用され、欠損を補完するように機能するファージである。欠損ファージゲノムは、ファージミドまたは除去された遺伝子配列をコードするある機能を有するファージであり得る。ヘルパーファージの例は、Ｍ１３Ｋ０７、Ｍ１３Ｋ０７遺伝子ＩＩＩ　ｎｏ．３ハイパーファージ、及びカプシドタンパク質に融合した結合分子をディスプレイまたはコードするファージである。

【０２１５】

抗体は、ＨまたはＬ鎖いずれかのクローンを含有する個々のコロニーが他の鎖（ＬまたはＨ）をコードするクローンの完全なライブラリを感染させるように使用され、得られた２鎖特異性結合メンバーが本明細書に記載されるものなどのファージディスプレイ技法により選択される、ＷＯ　９２／０１０４７に開示される階層的な二重コンビナトリアルアプローチを使用するファージディスプレイスクリーニング法を介しても生成することができる。この技法は、Ｍａｒｋｓ　ｅｔ　ａｌ，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，１０：７７９－７８３，１９９２にも開示されている。

【０２１６】

ウイルス、酵母、微生物、及び哺乳類細胞の表面上にポリペプチドをディスプレイするための方法は、抗原特異的抗体を特定するためにも使用されている。例えば、米国特許第５，３４８，８６７号、第５，７２３，２８７号、第６，６９９，６５８号、Ｗｉｔｔｒｕｐ，Ｃｕｒｒ　Ｏｐ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．１２：３９５－９９，２００１、Ｌｅｅ　ｅｔ　ａｌ，Ｔｒｅｎｄｓ　ｉｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈ．２１（１）４５－５２，２００３、Ｓｕ

ｒｇｅｅｖａ ｅｔ ａｌ，Ａｄｖ．Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖ．Ｒｅｖ．５８：１６２２－５４，２００６を参照されたい。抗体ライブラリは、免疫系におけるＢ細胞により抗体の細胞表面ディスプレイを効果的に模倣する、凝集素などの酵母タンパク質に接着され得る。

【０２１７】

ファージディスプレイ法に加えて、抗体は、リボソームディスプレイ及びｍＲＮＡディスプレイを含むインビトロディスプレイ法を使用して単離することができる（Ａｍｓｔｕｔｚ ｅｔ ａｌ，Ｃｕｒｒ．Ｏｐ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．１２：４００－０５，２００１）。リボソームディスプレイを使用するポリペプチドの選択は、Ｈａｎｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ，９４：４９３７－４９４２，１９９７、ならびに米国特許第５，６４３，７６８号及び同第５，６５８，７５４号（Ｋａｗａｓａｋｉに対して発行された）に記載されている。リボソームディスプレイは、抗体の迅速な大規模な突然変異分析にも有用である。選択的突然変異誘発アプローチは、リボソームディスプレイ技法を使用して選択することができる、改善された活性を有する抗体を産生する方法も提供する。

【０２１８】

改変されたグリコシル化

親抗体に対して修飾されたグリコシル化パターン、例えば、抗体において見られる１つ以上の炭水化物部分の欠失及び／または抗体に存在しない１つ以上のグリコシル化部位の付加を有する抗体変異型を産生することもできる。

【０２１９】

抗体のグリコシル化は、典型的には、Ｎ連結またはＯ連結のいずれかである。Ｎ連結は、炭水化物部分の、アスパラギン残基の側鎖への接着を指す。トリペプチド配列のアスパラギン－Ｘ－セリン及びアスパラギン－Ｘ－スレオニン（ここで、Ｘはプロリンを除く任意のアミノ酸である）は、炭水化物部分のアスパラギン側鎖への酵素接着のための認識配列である。ポリペプチドにおけるこれらのトリペプチド配列のいずれかの存在は、潜在的なグリコシル化部位を創出する。したがって、Ｎ連結グリコシル化部位は、これらのトリペプチド配列のうちの１つ以上を含有するようにアミノ酸配列を改変することにより抗体に付加され得る。Ｏ連結グリコシル化は、糖Ｎ－アセイルガラクトサミン、ガラクトース、またはキシロースのヒドロキシアミノ酸、最も一般的にはセリンまたはスレオニンのうちの１つの接着を指すが、５－ヒドロキシプロリンまたは５－ヒドロキシリジンも使用され得る。Ｏ連結グリコシル化部位は、１つ以上のセリンまたはスレオニン残基を元の抗体の配列に挿入するか、または置換することによって抗体に付加され得る。

【０２２０】

Ｆｃグリカンは、ＩｇＧのＦｃ受容体及びＣ１ｑへの結合に影響を及ぼすため、ＩｇＧエフェクター機能に重要である。修飾されたＦｃグリカン及び改変されたエフェクター機能を有する抗体変異型を産生することができる。例えば、シアル酸、コアフコース、二分Ｎ－アセチルグルコサミン、及びマンノース残基などの修飾された末端糖を有する抗体は、改変されたＦｃγＲＩＩＩａ受容体への結合及び改変されたＡＤＣＣ活性を有し得る。さらなる実施例では、修飾された末端ガラクトース残基を有する抗体は、改変されたＣ１ｑへの結合及び改変されたＣＤＣ活性を有し得る（Ｒａｊｕ，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２０：４７１－７８，２００８）。

【０２２１】

改善されたＡＤＣＣ活性を呈するフコシル化を有さない、または低減されたフコシル化を有する抗体分子も企図される。これを達成するための様々な方法が当該技術分野において既知である。例えば、ＡＤＣＣエフェクター活性は、抗体分子のＦｃγＲＩＩＩ受容体への結合により媒介され、これは、ＣＨ２ドメインのＡｓｎ－２９７のＮ連結グリコシル化の炭水化物構造に依存することが示された。非フコシル化抗体は、増加した親和性でこの受容体を結合し、天然のフコシル化抗体よりも効率的にＦｃγＲＩＩＩ媒介エフェクター機能を開始させる。例えば、アルファ－１，６－フコシルトランスフェラーゼ酵素がノ

ックアウトされているＣＨＯ細胞における非フコシル化抗体の組換え産生は、１００倍増加したＡＤＣＣ活性を有する抗体をもたらす（Ｙａｍａｎｅ－Ｏｈｎｕｋｉ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ Ｂｉｏｅｎｇ．８７：６１４－２２，２００４）。同様の作用が、フコシル化経路におけるこのまたは他の酵素の活性を減少させることにより、例えば、ｓｉＲＮＡもしくはアンチセンスＲＮＡ処理により、酵素（複数可）をノックアウトするように細胞系を操作することにより、または選択的グリコシル化阻害剤と培養することにより達成され得る（Ｒｏｔｈｍａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｉｍｍｕｎｏｌ．２６：１１１３－２３，１９８９）。一部の宿主細胞株、例えば、Ｌｅｃ１３またはラットハイブリドーマＹＢ２／０細胞系は、低フコシル化レベルの抗体を天然に産生する。（Ｓｈｉｅｌｄｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ．２７７：２６７３３－４０，２００２、Ｓｈｉｎｋａｗａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ．２７８：３４６６－７３，２００３）。例えば、ＧｎＴＩＩＩ酵素を過剰発現する細胞における組換えによる抗体の産生による、二分された炭水化物のレベルの増加は、ＡＤＣＣ活性を増加させることも決定された（Ｕｍａｎａ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１７：１７６－８０，１９９９）。２つのフコース残基のうちの１つのみの不在がＡＤＣＣ活性を増加させるのに十分であり得ることが予測された（Ｆｅｒｒａｒａ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ Ｂｉｏｅｎｇ．９３：８５１－６１，２００６）。抗体のグリコシル化及び方法は、Ｎｉｅｗａ ａｎｄ Ｓａｔｏｈ，Ｊ．Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ １０４：９３０－４１，２０１５において考察されている。

【０２２２】

改変されたエフェクター機能を有する変異型

抗体の他の修飾が企図される。一態様では、例えば、エフェクター機能に対して、本方法に有用な抗体を修飾する、例えば、癌または他の状態の治療における抗体の有効性を増強することが望ましい場合がある（Ｎａｔｓｕｍｅ ｅｔ ａｌ，Ｄｒｕｇ Ｄｅｓｉｇｎ Ｄｅｖ’ｔ＆Ｔｈｅｒ．３：７－１６，２００９）。例示的なエフェクター機能には、Ｃｌｑ結合、ＣＤＣ、Ｆｃ受容体結合、ＡＤＣＣ、ファゴサイトーシス、細胞表面受容体（例えば、Ｂ細胞受容体、ＢＣＲ）の下方調節などが含まれる。エフェクター機能を修飾するための一方法は、システイン残基（複数可）がＦｃ領域に導入され得、それにより、この領域における鎖間ジスルフィド結合形成を可能にすることを教示する。このように生成されたホモ二量体抗体は、改善された内在化能、ならびに／または増加した補体媒介細胞死滅及び抗体依存性細胞性細胞傷害（ＡＤＣＣ）を有し得る。Ｃａｒｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｅｘｐ Ｍｅｄ．１７６：１１９１－１１９５，１９９２及びＳｈｏｐｅｓ，Ｂ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４８：２９１８－２９２２，１９９２を参照されたい。増強された抗腫瘍活性を有するホモ二量体抗体は、Ｗｏｌｆｆ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ５３：２５６０－２５６５，１９９３に記載されるように、ヘテロ二官能性架橋剤を使用して調製することもできる。あるいは、二重Ｆｃ領域を有し、それにより、増強された補体溶解及びＡＤＣＣ能を有する抗体が操作され得る。Ｓｔｅｖｅｎｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ａｎｔｉ－Ｃａｎｃｅｒ Ｄｒｕｇ Ｄｅｓｉｇｎ ３：２１９－２３０，１９８９を参照されたい。本開示のある特定の実施形態では、無傷抗体よりも抗体断片を使用することが望ましい場合がある。この場合、その血清半減期を増加させるために、例えば、ＰＥＧまたは他の水溶性ポリマーなど（多糖類ポリマーを含む）の分子を抗体断片に付加して半減期を増加させることにより、抗体断片を修飾することが望ましい場合がある。これは、例えば、サルベージ受容体結合エピトープを抗体断片に組み込むことによっても（例えば、抗体断片の適切な領域の突然変異により、または例えば、ＤＮＡまたはペプチド合成により、後に端部または中央のいずれかの抗体断片に融合されるペプチドタグ内にエピトープを組み込むことにより）達成され得る（例えば、ＷＯ９６／３２４７８を参照されたい）。

【０２２３】

したがって、本明細書に企図される抗体は、ジスルフィド結合に関与するシステインが修飾もしくは除去される、ならびに／またはメチオニンがＮ末端に付加され、かつ／もし

くはＮ末端の２０個のアミノ酸のうちの１つ以上が除去され、かつ／もしくはＣ１ｑ結合部位などの補体と相互作用する領域が除去され、かつ／もしくはＡＤＣＣ部位が除去される変異型を含む、Ｆｃサルベージ受容体と相互作用する能力を保持するヒトＦｃ部分、ヒトコンセンサスＦｃ部分、またはそれらの変異型を含み得る（例えば、Ｓａｒｍａｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌｅｃ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２９：６３３－９，１９９２を参照されたい）。

【０２２４】

以前の試験は、ＦｃＲのヒト及びマウスＩｇＧ上の結合部位を、主にＩｇＧ残基２３３～２３９から構成される低ヒンジ領域にマッピングした。他の試験は、さらに広いセグメント、例えば、ヒトＦｃ受容体ＩのＧｌｙ３１６－Ｌｙｓ３３８、ヒトＦｃ受容体ＩＩＩのＬｙｓ２７４－Ａｒｇ３０１及びＴｙｒ４０７－Ａｒｇ４１６を提案したか、または低ヒンジの外側のいくつかの特定の残基、例えばマウスＦｃ受容体ＩＩと相互作用するマウスＩｇＧ２ｂのＡｓｎ２９７及びＧｌｕ３１８を見出した。ヒトＦｃ受容体ＩＩＩＡを有するヒトＩｇＧ１　Ｆｃ断片の３．２－Å結晶構造の報告は、ＩｇＧ１残基Ｌｅｕ２３４－Ｓｅｒ２３９、Ａｓｐ２６５－Ｇｌｕ２６９、Ａｓｎ２９７－Ｔｈｒ２９９、及びＡｌａ３２７－Ｉｌｅ３３２を、Ｆｃ受容体ＩＩＩＡへの結合に関与すると記述した。低ヒンジ（Ｌｅｕ２３４～Ｇｌｙ２３７）に加えて、結晶構造に基づき、ＩｇＧ　ＣＨ２ドメインループＦＧ（残基３２６～３３０）及びＢＣ（残基２６５～２７１）の残基がＦｃ受容体ＩＩＡへの結合に役割を果たす可能性があることを示唆した。Ｓｈｉｅｌｄｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２７６：６５９１－６０４，２００１を参照されたい）（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。Ｆｃ受容体結合部位内の残基の突然変異は、改変されたＡＤＣＣもしくはＣＤＣ活性などの改変されたエフェクター機能、または改変された半減期をもたらし得る。上述のように、潜在的な突然変異は、１つ以上の残基の挿入、欠失、または置換を含み、これには、アラニンでの置換、保存的置換、非保存的置換、または異なるＩｇＧサブクラスからの同じ位置の対応するアミノ酸残基との交換（例えば、その位置でＩｇＧ１残基を対応するＩｇＧ２残基と交換する）が含まれる。

【０２２５】

Ｓｈｉｅｌｄｓらは、全てのヒトＦｃ受容体への結合に関与するＩｇＧ１残基がヒンジに近接するＣＨ２ドメインに位置し、以下の２つのカテゴリーに入ることを報告した：１）ＦｃＲと直接相互作用し得る位置は、Ｌｅｕ２３４－Ｐｒｏ２３８、Ａｌａ３２７、及びＰｒｏ３２９（及びおそらくＡｓｐ２６５）、２）炭水化物の性質及び位置に影響を及ぼす位置は、Ａｓｐ２６５及びＡｓｎ２９７を含む。Ｆｃ受容体ＩＩへの結合に影響を与えたさらなるＩｇＧ１残基は、以下の通りである：（作用が最も大きい）Ａｒｇ２５５、Ｔｈｒ２５６、Ｇｌｕ２５８、Ｓｅｒ２６７、Ａｓｐ２７０、Ｇｌｕ２７２、Ａｓｐ２８０、Ａｒｇ２９２、Ｓｅｒ２９８、及び（作用が小さい）Ｈｉｓ２６８、Ａｓｎ２７６、Ｈｉｓ２８５、Ａｓｎ２８６、Ｌｙｓ２９０、Ｇｌｎ２９５、Ａｒｇ３０１、Ｔｈｒ３０７、Ｌｅｕ３０９、Ａｓｎ３１５、Ｌｙｓ３２２、Ｌｙｓ３２６、Ｐｒｏ３３１、Ｓｅｒ３３７、Ａｌａ３３９、Ａｌａ３７８、及びＬｙｓ４１４。Ａ３２７Ｑ、Ａ３２７Ｓ、Ｐ３２９Ａ、Ｄ２６５Ａ、及びＤ２７０Ａは結合を低減した。全てのＦｃＲに関して上記で特定された残基に加えて、Ｆｃ受容体ＩＩＩＡへの結合を４０％以上低減したさらなるＩｇＧ１残基は、以下の通りである：Ｓｅｒ２３９、Ｓｅｒ２６７（Ｇｌｙのみ）、Ｈｉｓ２６８、Ｇｌｕ２９３、Ｇｌｎ２９５、Ｔｙｒ２９６、Ａｒｇ３０１、Ｖａｌ３０３、Ｌｙｓ３３８、及びＡｓｐ３７６。ＦｃＲＩＩＩＡの結合を改善した変異型には、Ｔ２５６Ａ、Ｋ２９０Ａ、Ｓ２９８Ａ、Ｅ３３３Ａ、Ｋ３３４Ａ、及びＡ３３９Ｔが含まれる。Ｌｙｓ４１４はＦｃＲＩＩＡ及びＦｃＲＩＩＢに関する結合において４０％の低減、Ａｒｇ４１６はＦｃＲＩＩＡ及びＦｃＲＩＩＩＡに関して３０％の低減、Ｇｌｎ４１９はＦｃＲＩＩＡに対して３０％の低減、そしてＦｃＲＩＩＢに対して４０％の低減を示し、Ｌｙｓ３６０はＦｃＲＩＩＩＡに対して２３％の改善を示した。特定のＦｃガンマ受容体（Ｒ）のみへの結合を改善したか、または同時に１つの種類のＦｃガンマＲへの結合を改善し、

別の種類への結合を低減したＩｇＧ１のＦｃ領域におけるいくつかの位置が見出されたことを記載したＰｒｅｓｔａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．Ｔｒａｎｓ．３０：４８７－４９０，２００１も参照されたい（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。次に、ＦｃガンマＲＩＩＩａへの改善された結合を有する選択されたＩｇＧ１変異型は、インビトロ抗体依存性細胞性細胞傷害（ＡＤＣＣ）アッセイにおいて試験され、末梢血単核球またはナチュラルキラー細胞のいずれかが使用されたとき、ＡＤＣＣの増強を示した。

【０２２６】

例えば、米国特許第６，１９４，５５１号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）は、アミノ酸位置３２９、３３１、または３２２（Ｋａｂａｔ番号付けを使用）で、ヒトＩｇＧ　Ｆｃ領域に突然変異を含有する改変されたエフェクター機能を有する変異型を記載しており、そのうちのいくつかは低減されたＣ１ｑ結合またはＣＤＣ活性を示す。

【０２２７】

共有結合修飾

ポリペプチド結合剤、例えば、抗体の共有結合修飾も本開示の範囲内に含まれる。それらは、適切な場合、化学合成により、またはポリペプチド結合剤の酵素的もしくは化学的切断により行われ得る。ポリペプチド結合剤の他の種類の共有結合修飾は、ポリペプチド結合剤の標的とされるアミノ酸残基を、選択された側鎖またはＮもしくはＣ末端残基と反応することができる有機誘導体化剤と反応させることにより、分子内に導入される。

【０２２８】

他の修飾は、プロリン及びリジンのヒスチドリル、リジニル、アルギニル、チロシル、グルタミニル、及びアスパラギニルのヒドロキシル化を含む。かかる修飾を行うための方法は、米国特許第８，９２６，９７６号（参照により本明細書に組み込まれる）、及び当該技術分野において開示されている。

【０２２９】

誘導体

誘導体は、ユビキチン化、標識（例えば、放射性核種または種々の酵素で）、ペグ化などの共有結合ポリマー接着（ポリエチレングリコールによる誘導体化）、及びオルニチンなどのアミノ酸の化学合成による挿入または置換などの技法により化学修飾された抗体を含む、ポリペプチド結合剤を指す。抗体などの本明細書に記載されるポリペプチド結合剤の誘導体は、治療剤としても有用であり、本明細書に記載される方法により産生され得る。

【０２３０】

コンジュゲートされた部分は、例えば、放射性ヌクレオチド、またはストレプトアビジンにより認識されるビオチン化ヌクレオチドの組み込みなど、共有結合、またはイオン、ファンデルワールス、もしくは水素結合のいずれかによるポリペプチド結合剤に組み込まれるか、またはそれに接着され得る。

【０２３１】

ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）は、インビボにおけるより長い半減期をもたらすために、ポリペプチド結合剤に接着され得る。ＰＥＧ基は、任意の従来の分子量のものであってよく、直鎖状または分岐状であり得る。ＰＥＧの平均分子量は、好ましくは、約２キロダルトン（「ｋＤ」）～約１００ｋＤａ、より好ましくは約５ｋＤａ～約５０ｋＤａ、最も好ましくは約５ｋＤａ～約１０ｋＤａの範囲である。ＰＥＧ基は、一般的に、ＰＥＧ部分上の天然のまたは操作された反応基（例えば、アルデヒド、アミノ、チオール、またはエステル基）による、ポリペプチド結合剤上の反応基（例えば、アルデヒド、アミノ、またはエステル基）へのアシル化または還元的アルキル化を介してポリペプチド結合剤に接着される。ＰＥＧ部分のポリペプチド結合剤への付加は、当該技術分野において周知の技法を使用して実行され得る。例えば、国際公開第ＷＯ９６／１１９５３号及び米国特許第４，１７９，３３７号を参照されたい。

【０２３２】
ポリペプチド結合剤のＰＥＧとのライゲーションは通常、水相で行われ、逆相分析ＨＰＬＣにより容易に監視することができる。ＰＥＧ化物質は、分取ＨＰＬＣにより精製され、分析ＨＰＬＣアミノ酸分析及びレーザー脱離質量分析により特徴付けされる。
【０２３３】
抗体複合体
ポリペプチド結合剤は、その「裸」または非コンジュゲート形態で投与され得るか、または他の治療剤もしくは診断剤に直接コンジュゲートされ得るか、またはかかる他の治療剤もしくは診断剤を含むキャリアポリマーに間接的にコンジュゲートされ得る。いくつかの実施形態では、ポリペプチド結合剤は、化学療法薬、薬物、成長阻害薬、毒素（例えば、細菌、真菌、植物、もしくは動物起源の酵素的に活性な毒素、またはその断片）、または放射性同位元素（すなわち、放射性複合体）などの細胞傷害性薬にコンジュゲートされる。好適な化学療法薬には、ダウノマイシン、ドキソルビシン、メトトレキサート、及びビンデシンが含まれる（Ｒｏｗｌａｎｄ ｅｔ ａｌ．，１９８６、上記）。好適な毒素には、ジフテリア毒素などの細菌毒素、リシンなどの植物毒素、ゲルダナマイシン（Ｍａｎｄｌｅｒ ｅｔ ａｌ Ｊ．Ｎａｔｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｉｎｓｔ．９２（１９）：１５７３－８１，２０００、Ｍａｎｄｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．Ｌｅｔｔｅｒｓ １０：１０２５－１０２８，２０００、Ｍａｎｄｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍ．１３．７８６－９１，２００２）、マイタンシノイド（ＥＰ１３９１２１３、Ｌｉｕ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９３：８６１８－２３，１９９６）、アウリスタチン（Ｄｏｒｏｎｉｎａ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．２１：７７８－８４，２００３）、及びカリチアマイシン（Ｌｏｄｅ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５８：２９２８，１９９８、Ｈｉｎｍａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５３：３３３６－３３４２，１９９３、Ｂｒａｎｄｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｒｅｖ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．１１：６３７－６４８，２０１４も参照されたい）などの小分子毒素が含まれる。
【０２３４】
ポリペプチド結合剤は、放射性同位元素、親和性標識（ビオチン、アビジンなど）、酵素標識（西洋ワサビペルオキシターゼ、アルカリホスファターゼなど）、蛍光もしくは発光もしくは生物発光標識（ＦＩＴＣまたはローダミンなど）、常磁性原子などの使用により検出可能に標識され得る。かかる標識を達成するための手順は、当該技術分野において周知であり、例えば、（Ｓｔｅｒｎｂｅｒｇｅｒ，Ｌ．Ａ．ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｈｉｓｔｏｃｈｅｍ．Ｃｙｔｏｃｈｅｍ．１８：３１５，１９７０、Ｂａｙｅｒ，Ｅ．Ａ．ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍ．６２：３０８，１９７９、Ｅｎｇｖａｌ，Ｅ．ｅｔ ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｏｌ．１０９：１２９，１９７２、Ｇｏｄｉｎｇ，Ｊ．Ｗ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈ．１３：２１５，１９７６）を参照されたい。
【０２３５】
ポリペプチド結合剤部分のコンジュゲーションは、米国特許第６，３０６，３９３号に記載されている。一般的な技法は、Ｓｈｉｈ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ ４１：８３２－８３９，１９８８、Ｓｈｉｈ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ ４６：１１０１－１１０６，１９９０、及びＳｈｉｈらの米国特許第５，０５７，３１３号にも記載されている。この一般的な方法は、酸化炭水化物部分を有するポリペプチド結合剤構成成分を、少なくとも１つの遊離アミン機能を有し、複数の薬物、毒素、キレート剤、ボロンアデンド、または他の治療剤で装填されるキャリアポリマーと反応させることを伴う。この反応は、二級アミンに還元されて最終複合体を形成することにより安定化され得る、初期のシッフ塩基（イミン）連結をもたらす。
【０２３６】
キャリアポリマーは、例えば、少なくとも５０のアミノ酸残基のアミノデキストランまたはポリペプチドであり得る。薬物または他の薬剤をキャリアポリマーにコンジュゲート

するための種々の技法が当該技術分野において既知である。ポリペプチドキャリアはアミノデキストランの代わりに使用され得るが、ポリペプチドキャリアは鎖に少なくとも５０のアミノ酸残基、好ましくは１００～５０００のアミノ酸残基を有するべきである。アミノ酸の少なくともいくつかは、リジン残基、またはグルタメートもしくはアスパルテート残基であるべきである。リジン残基のペンダントアミン、ならびにグルタミン及びアスパルテートのペンダントカルボキシレートは、薬物、毒素、免疫調節薬、キレート剤、ボロンアデンド、または他の治療剤の接着に都合がよい。得られる装填されたキャリア及び複合体に所望の溶解特性を付与するための好適なポリペプチドキャリアの例としては、ポリリジン、ポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸、それらのコポリマー、ならびにこれらのアミノ酸及びその他、例えば、セリンの混合ポリマーが挙げられる。

【０２３７】

あるいは、コンジュゲートされたポリペプチド結合剤は、ポリペプチド結合剤構成成分を治療剤と直接コンジュゲートすることにより調製され得る。一般的な手順は、治療剤が酸化ポリペプチド結合剤構成成分に直接接着されることを除き、間接的なコンジュゲーション方法に類似する。例えば、ポリペプチド結合剤の炭水化物部分は、半減期を延長するためにポリエチレングリコールに接着され得る。

【０２３８】

あるいは、治療剤は、ジスルフィド結合形成を介して、またはＮ－スクシニル３－（２－ピリジルジチオ）プロピオネート（ＳＰＤＰ）などのヘテロ二官能性架橋剤を使用して、還元された抗体構成成分のヒンジ領域で接着され得る。Ｙｕ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ ５６：２４４，１９９４。かかるコンジュゲーションの一般的な技法は当該技術分野において周知である。例えば、Ｗｏｎｇ，Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ Ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｃｏｎｊｕｇａｔｉｏｎ ａｎｄ Ｃｒｏｓｓ－Ｌｉｎｋｉｎｇ，ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ，１９９１、Ｕｐｅｓｌａｃｉｓ ｅｔ ａｌ．，“Ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ｂｙ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ，”ｉｎ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，Ｂｉｒｃｈ ｅｔ ａｌ．（ｅｄｓ．），ｐａｇｅｓ １８７－２３０，Ｗｉｌｅｙ－Ｌｉｓｓ，Ｉｎｃ．，１９９５、Ｐｒｉｃｅ，“Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ａｎｄ Ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ ｏｆ Ｓｙｎｔｈｅｔｉｃ Ｐｅｐｔｉｄｅ－Ｄｅｒｉｖｅｄ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，”ｉｎ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ，Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ａｎｄ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ，Ｒｉｔｔｅｒ ｅｔ ａｌ．（ｅｄｓ．），ｐａｇｅｓ ６０－８４，Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ，１９９５を参照されたい。Ｎ－スクシンイミジル－３－（２－ピリジルジチオール）プロピオネート（ＳＰＤＰ）、イミノチオラン（ＩＴ）、イミドエステルの二官能性誘導体（ジメチルアジピミダートＨＣＬなど）、活性エステル（スベリン酸ジスクシンイミジルなど）、アルデヒド（グルタルエルデヒドなど）、ビスーアジド化合物（ビス（ｐ－アジドベンゾイル）ヘキサンジアミン）、ビス－ジアゾニウム誘導体（ビス－（ｐ－ジアゾニウムベンゾイル）－エチレンジアミン）、ジイソシアネート（トリエン２，６－ジイソシアネート）、及びビス－活性化フッ素化合物（１，５－ジフルオロ－２，４－ジニトロベンゼン）などの、様々な二官能性タンパク質カップリング剤が当該技術分野において既知である。

【０２３９】

抗体融合タンパク質

抗体融合タンパク質を作製する方法は当該技術分野において周知である。例えば、米国特許第６，３０６，３９３号を参照されたい。インターロイキン－２部分を含む抗体融合タンパク質は、Ｂｏｌｅｔｉ ｅｔ ａｌ．，Ａｎｎ．Ｏｎｃｏｌ．６：９４５，１９９５、Ｎｉｃｏｌｅｔ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．２：１６１，１９９５、Ｂｅｃｋｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９３：７８２６，１９９６、Ｈａｎｋ ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２：１９５１，１９９６、及びＨｕ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５

６：４９９８，１９９６により記載される。加えて、Ｙａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｈｕｍ．Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ｈｙｂｒｉｄｏｍａｓ ６：１２９，１９９５は、Ｆ（ａｂ’）$_2$断片及び腫瘍壊死因子アルファ部分を含む融合タンパク質を説明している。抗体融合タンパク質のさらなる例は、Ｐａｓｔａｎ ｅｔ ａｌ，Ｎａｔ．Ｒｅｖｉｅｗｓ Ｃａｎｃｅｒ ６：５５９－６５，２００６、及びＡｌｅｗｉｎｅ ｅｔ ａｌ．Ｔｈｅ Ｏｎｃｏｌｏｇｉｓｔ，２０：１７６－１８５，２０１５により記載される。

【０２４０】

組換え分子が１つ以上の抗体構成成分及び毒素または化学療法薬を含む抗体－毒素融合タンパク質を作製する方法も当業者に既知である。例えば、抗体－Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ外毒素Ａ融合タンパク質は、Ｃｈａｕｄｈａｒｙ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３３９：３９４，１９８９、Ｂｒｉｎｋｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８８：８６１６，１９９１、Ｂａｔｒａ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８９：５８６７，１９９２、Ｆｒｉｅｄｍａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５０：３０５４，１９９３、Ｗｅｌｓ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃａｎ．６０：１３７，１９９５、Ｆｏｍｉｎａｙａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７１：１０５６０，１９９６、Ｋｕａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ３５：２８７２，１９９６、及びＳｃｈｍｉｄｔ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃａｎ．６５：５３８，１９９６により記載されている。ジフテリア毒素部分を含有する抗体－毒素融合タンパク質は、Ｋｒｅｉｔｍａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｌｅｕｋｅｍｉａ ７：５５３，１９９３、Ｎｉｃｈｏｌｌｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６８：５３０２，１９９３、Ｔｈｏｍｐｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７０：２８０３７，１９９５、及びＶａｌｌｅｒａ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ ８８：２３４２，１９９６により記載されている。Ｄｅｏｎａｒａｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｔｕｍｏｒ Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ １：１７７，１９９５は、ＲＮａｓｅ部分を有する抗体－毒素融合タンパク質を記載する一方で、Ｌｉｎａｒｄｏｕ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｐｈｙｓ．２４－２５：２４３，１９９４は、ＤＮａｓｅ Ｉ構成成分を含む抗体－毒素融合タンパク質を産生した。ゲロニンは、Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ａｂｓｔｒａｃｔｓ ｏｆ ｔｈｅ ２０９ｔｈ ＡＣＳ Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｍｅｅｔｉｎｇ，Ａｎａｈｅｉｍ，Ｃａｌｉｆ．，Ａｐｒ．２－６，１９９５，Ｐａｒｔ １，ＢＩＯＴ００５の抗体－毒素融合タンパク質において毒素部分として使用された。さらなる例として、Ｄｏｈｌｓｔｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９１：８９４５，１９９４は、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃａｌ外毒素－Ａを含む抗体－毒素融合タンパク質を報告した。

【０２４１】

かかる融合タンパク質の調製に好適に用いられる毒素の例示としては、リシン、アブリン、リボヌクレアーゼ、ＤＮａｓｅ Ｉ、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃａｌ外毒素－Ａ、アメリカヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、ゲロニン、ジフテリン毒素、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ外毒素、及びＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ内毒素である。例えば、Ｐａｓｔａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ ４７：６４１，１９８６及びＧｏｌｄｅｎｂｅｒｇ，ＣＡ Ａ Ｃａｎｃｅｒ Ｊｏｕｒｎａｌ ｆｏｒ Ｃｌｉｎｉｃｉａｎｓ ４４：４３，１９９４を参照されたい。他の好適な毒素は当業者に既知である。

【０２４２】

本明細書の抗体は、プロドラッグ（例えば、ペプチド化学療法薬、ＷＯ８１／０１１４５を参照されたい）を活性抗癌薬に変換するプロドラック活性化酵素に抗体をコンジュゲートすることによりＡＤＥＰＴにおいて使用され得る。例えば、ＷＯ８８／０７３７８及び米国特許第４，９７５，２７８号を参照されたい。

【０２４３】

ＡＤＥＰＴに有用な免疫複合体の酵素構成成分は、プロドラッグを、そのより活性な細胞傷害性形態に変換するような方法でプロドラッグに作用することができる任意の酵素を含む。

【０２４４】
本開示の目的に有用である酵素は、アルカリホスファターゼ；アリールスルファターゼ；シトシンデアミナーゼ、５－フルオロウラシル；セラチアプロテアーゼ、サーモリシン、サブチリシ、カルボキシペプチダーゼ、及びカテプシン（カテプシンＢ及びＬなど）などのプロテアーゼ；Ｄ－アラニルカルボキシペプチダーゼ；β－ガラクトシダーゼ及びノイラミニダーゼなどの炭水化物切断酵素；β－ラクタマーゼ；ならびにペニシリンＶアミダーゼまたはペニシリンＧアミダーゼなどのペニシリンアミダーゼを含むが、これらに限定されない。あるいは、当該技術分野においてアザイムとしても知られる酵素活性を有する抗体は、プロドラッグを有利活性薬物に変換するために使用され得る（例えば、Ｍａｓｓｅｙ，Ｎａｔｕｒｅ　３２８：４５７－４５８，１９８７を参照されたい）。抗体－アブザイム複合体は、アブザイムを腫瘍細胞集団に送達するために、本明細書に記載されるように調製され得る。

【０２４５】
酵素は、上述のヘテロ二官能性架橋試薬の使用など、当該技術分野において周知の技法により、抗体に共有結合され得る。あるいは、酵素の少なくとも機能的に活性な部分に連結された、本明細書に記載される抗体の少なくとも抗原結合領域を含む融合タンパク質は、当該技術分野において周知の組換えＤＮＡ技法を使用して構築され得る（例えば、Ｎｅｕｂｅｒｇｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　３１２：６０４－６０８，１９８４を参照されたい）。

【０２４６】
アミノ酸配列変異型
抗体もしくはポリペプチド結合剤の１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、及び／または６つのＣＤＲを含む修飾されたポリペプチド組成物が生成されることが企図され、ＣＤＲまたは非ＣＤＲ領域は改変されて、抗原に対して増加した特異性もしくは親和性をもたらすか、または標的とそのシグナル伝達パートナーとの間の結合親和性の増加した調節をもたらす。例えば、抗体ＣＤＲ内の部位は、典型的には、順次に、例えば、最初に保存的選択（例えば、同一でない疎水性アミノ酸に置換された疎水性アミノ酸）と、次に、より異なる選択（例えば、荷電されたアミノ酸に置換された疎水性アミノ酸）と置換することにより修飾され、次に、欠失または挿入が標的とされる部位に行われ得る。ＣＤＲ内の保存的置換は可変領域が生物学的活性を保持することを可能にすることが企図される。例えば、ＣＤＲを囲む保存的フレームワーク配列を使用して、これらのコンセンサス配列に相補的なＰＣＲプライマーが生成されて、プライマー領域間に位置する抗原特異的ＣＤＲ配列を増幅する。ヌクレオチド及びポリペプチド配列をクローニング及び発現するための技法は当該技術分野において十分に確立されている［例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，２ｎｄ　Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ，１９８９を参照されたい］。増幅されたＣＤＲ配列は、適切なプラスミドにライゲーションされる。１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、及び／または６つのクローニングされたＣＤＲを含むプラスミドは、任意選択で、ＣＤＲに連結された領域をコードする追加のポリペプチドを含有する。

【０２４７】
修飾されたＣＤＲを含むポリペプチド結合剤は、元の抗原に対する結合親和性に関してスクリーニングされる。加えて、抗体またはポリペプチドは、その抗原の活性を中和するその能力に関してさらに試験される。例えば、本明細書の抗体は、標的の生物学的活性に干渉するそれらの能力を決定するために、実施例に記載されるように分析され得る。

【０２４８】
修飾は、以下により詳細に記載される保存的または非保存的アミノ酸置換により行われ得る。「挿入」または「欠失」は、好ましくは約１～２０個のアミノ酸、より好ましくは１～１０個のアミノ酸の範囲である。変形は、組換えＤＮＡ技法を使用して抗体ポリペプチド分子におけるアミノ酸の置換を系統的に行い、活性に関して得られた組換え変異型を

アッセイすることにより導入され得る。核酸改変は、異なる種からの核酸が異なる部位（可変位置）または高度に保存的領域（定常領域）で行われ得る。抗体配列を改変し、本発明に有用な抗体ポリペプチド組成物を発現する方法は、以下により詳細に記載される。

【０２４９】

アミノ酸配列の挿入は、長さが１つの残基から数百以上の残基を含有するポリペプチドの範囲であるアミノ及び／またはカルボキシル末端融合、ならびに単一もしくは複数のアミノ酸残基の配列内挿入を含む。末端挿入の例としては、Ｎ末端メチオニル残基を有する抗体、またはエピトープタグもしくはサルベージ受容体エピトープに融合された抗体（抗体断片を含む）が挙げられる。抗体分子の他の挿入変異型は、例えば、Ｎ末端もしくはＣ末端での、抗体の血清半減期を増加させるポリペプチドへの融合を含む。

【０２５０】

「エピトープタグ付けされた」という用語は、エピトープタグに融合された抗体を指す。エピトープタグポリペプチドは、それに対抗する抗体が作製され得るエピトープを提供するのに十分な残基を有するが、抗体の活性に干渉しないように十分に短い。エピトープタグは、好ましくは、それに対抗する抗体が実質的に他のエピトープと交差反応しないように、十分に固有である。好適なタグポリペプチドは一般的に、少なくとも６つのアミノ酸残基、通常約８～５０のアミノ酸残基（好ましくは約９～３０の残基）を有する。例としては、インフルエンザヘマグルチニン（ＨＡ）タグポリペプチド及びその抗体１２ＣＡ５（Ｆｉｅｌｄ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．８：２１５９－２１６５，１９８８）、ｃ－ｍｙｃタグ、ならびにそれに対する８Ｆ９、３Ｃ７、６Ｅ１０、Ｇ４、Ｂ７、及び９Ｅ１０抗体（Ｅｖａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．５：３６１０－１６，１９８５）、ならびに単純ヘルペス糖タンパク質Ｄ（ｇＤ）タグ及びその抗体（Ｐａｂｏｒｓｋｙ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ３：５４７－５３，１９９０）が挙げられる。他の例示的なタグは、ニッケルキレート化を使用してそのように標識される化合物の単離を可能にする、一般的に約６つのヒスチジン残基の、ポリ－ヒスチジン配列である。周知であり、当該技術分野において慣習的に使用される、ＦＬＡＧ（登録商標）タグ（Ｅａｓｔｍａｎ Ｋｏｄａｋ，Ｒｏｃｈｅｓｔｅｒ，ＮＹ）などの他の標識及びタグが本発明により包含される。

【０２５１】

本明細書で使用されるとき、「サルベージ受容体結合エピトープ」という用語は、ＩｇＧ分子のインビボ血清半減期の増加に関与するＩｇＧ分子（例えば、IgG_1、IgG_2、IgG_3、またはIgG_4）のＦｃ領域のエピトープを指す。

【０２５２】

別の種類の変異型は、アミノ酸置換変異型である。これらの変異型は、抗体分子の少なくとも１つのアミノ酸残基が除去され、異なる残基がその場所に挿入される。超可変もしくはＣＤＲ領域またはフレームワーク領域のいずれか内の置換突然変異誘発が企図される。保存的置換は、アミノ酸を、そのクラスの別のメンバーと交換することを伴う。非保存的置換は、これらのクラスのうちの１つのメンバーを別のクラスのメンバーと交換することを伴う。

【０２５３】

保存的アミノ酸置換は、関与する残基の極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性、及び／または両親媒性に基づき行われる。例えば、非極性（疎水性）アミノ酸には、アラニン（Ａｌａ、Ａ）、ロイシン（Ｌｅｕ、Ｌ）、イソロイシン（Ｉｌｅ、Ｉ）、バリン（Ｖａｌ、Ｖ）、プロリン（Ｐｒｏ、Ｐ）、フェニルアラニン（Ｐｈｅ、Ｆ）、トリプトファン（Ｔｒｐ、Ｗ）、及びメチオニン（Ｍｅｔ、Ｍ）が含まれ、極性中性アミノ酸には、グリシン（Ｇｌｙ、Ｇ）、セリン（Ｓｅｒ、Ｓ）、スレオニン（Ｔｈｒ、Ｔ）、システイン（Ｃｙｓ、Ｃ）、チロシン（Ｔｙｒ，Ｙ）、アスパラギン（Ａｓｎ、Ｎ）、及びグルタミン（Ｇｌｎ、Ｑ）が含まれ、正に電荷された（塩基性）アミノ酸には、アルギニン（Ａｒｇ、Ｒ）、リジン（Ｌｙｓ、Ｋ）、及びヒスチジン（Ｈｉｓ、Ｈ）が含まれ、負に電荷された（酸性）アミノ酸には、アスパラギン酸；（Ａｓｐ、Ｄ）及びグルタミン酸（Ｇｌｕ，Ｅ

）が含まれる。

【０２５４】

抗体の適切な立体構造の維持に関与しない任意のシステイン残基も、分子の酸化安定性を改善し、異常架橋を防止するために、一般的に、セリンで置換され得る。対照的に、その安定性を改善するために（特に、抗体がＦｖ断片などの抗体断片である場合）、システイン結合（複数可）が抗体に付加され得る。

【０２５５】

医薬組成物の製剤化

ポリペプチド結合剤をヒトまたは試験哺乳動物に投与するために、ポリペプチド結合剤を、１つ以上の滅菌された医薬上許容される担体を含む滅菌組成物に製剤化することが好ましい。「医薬上または薬理学上許容される」という句は、以下に記載されるように、当該技術分野において周知の経路を使用して投与されるとき、アレルギーまたは他の有害な反応をもたらさない分子実体及び組成物を指す。「医薬上許容される担体」には、任意の及び全ての臨床的に有用な溶媒、分散培地、コーティング、抗菌剤及び抗真菌剤、等張剤及び吸収遅延剤などが含まれる。

【０２５６】

ポリペプチド結合剤は、非経口、皮下、腹腔内、肺内、及び鼻孔内、ならびに局所治療に所望される場合、病巣内投与を含む、任意の好適な手段により投与される。非経口注入には、静脈内、動脈内、腹腔内、筋肉内、皮内、または皮下投与が含まれる。好ましくは、投薬は、一部、投与が短時間または長期間であるかどうかにより、注射により、最も好ましくは静脈内もしくは皮下注射により与えられる。局所（ｔｏｐｉｃａｌ）、特に、経皮、経粘膜、直腸、経口、または局所（ｌｏｃａｌ）投与、例えば、所望の部位の注入ポンプまたはデポ剤付近に設置されたカテーテルによる投与を含む、他の投与方法が企図され、任意選択で、ポンプ、スマートデバイス、及びセンサなどの送達デバイスの使用を含む。

【０２５７】

活性成分として本明細書に記載されるポリペプチド結合剤を含有する本発明に有用な医薬組成物は、投与経路により、滅菌された医薬上許容される担体または添加剤を含有し得る。かかる担体または添加剤の例としては、水、医薬上許容される有機溶媒、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルデンプンナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、ゼラチン、寒天、ジグリセリン、グリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン（ＨＳＡ）、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、医薬上許容される界面活性剤などが挙げられる。使用される添加剤は、本明細書に使用される剤形により、必要に応じて、上記またはそれらの組み合わせから選択されるが、これらに限定されない。溶液またはエマルジョンに関して、好適な担体としては、例えば、生理食塩水及び緩衝媒体を含む、水性またはアルコール／水性の溶液、エマルジョン、または懸濁液が挙げられる。非経口ビヒクルとしては、塩化ナトリウム溶液、リンゲルデキストロース、デキストロース及び塩化ナトリウム、乳酸リンゲル、または固定油を挙げることができる。静脈内ビヒクルとしては、種々の添加剤、保存剤、または流体、栄養素、もしくは電解質補填剤を挙げることができる。様々な水性担体、例えば、滅菌されたリン酸緩衝生理食塩水溶液、静菌水、水、緩衝水、０．４％生理食塩水、０．３％グリシンなどが好適であり、安定性を増強するために、軽度の化学修飾などを経たアルブミン、リポタンパク質、グロブリンなどの他のタンパク質を含んでもよい。

【０２５８】

ポリペプチド結合剤の治療用製剤は、所望の純度を有するポリペプチド結合剤を任意選択の生理学上許容される担体、賦形剤、または安定剤（Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ　Ｐｈａ

ｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ １６ｔｈ ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｏｓｏｌ，Ａ．Ｅｄ．（１９８０））と混合することにより、保管のために凍結乾燥製剤または水溶液の形態に調製される。許容される担体、賦形剤、または安定剤は、用いられる投薬量及び濃度でレシピエントに非毒性であり、リン酸、クエン酸、コハク酸、及び他の有機酸などの緩衝剤；アスコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤；保存剤（塩化オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチル、もしくはベンジルアルコール；メチルもしくはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；３－ペンタノール；及びｍ－クレゾールなど）；低分子量（約１０残基未満）のポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、もしくはリジンなどのアミノ酸；単糖、二糖、及びグルコース、マンノース、もしくはデキストリンを含む他の炭水化物；ＥＤＴＡなどのキレート剤；スクロース、マンニトール、トレハロース、もしくはソルビトールなどの糖；ナトリウムなどの塩形成対イオン；金属錯体（例えば、Ｚｎ－タンパク質錯体）、ならびに／またはＴＷＥＥＮ（商標）、ＰＬＵＲＯＮＩＣＳ（商標）、もしくはポリエチレングリコール（ＰＥＧ）などの非イオン性界面活性剤を含む。

【０２５９】

活性成分はまた、例えば、それぞれ、コアセルベーション技法により、または界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えば、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチンマイクロカプセル、及びポリ－（メチルメタクリレート）マイクロカプセルに、コロイド状薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミン小球体、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル）に、またはマクロエマルジョンに封入されてもよい。かかる技法は、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ １６ｔｈ ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｏｓｏｌ，Ａ．Ｅｄ．，１９８０に開示されている。

【０２６０】

インビボ投与に使用される製剤は滅菌されなければならない。これは、滅菌濾過膜を通した濾過により容易に達成される。

【０２６１】

水性懸濁液は、水性懸濁液の製造に好適な賦形剤との混和により活性化合物を含有し得る。かかる賦形剤は、懸濁剤、例えば、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリドン、トラガカントゴム、及びアカシアゴムであり、分散剤または湿潤剤は、天然に生じるホスファチド、例えば、レシチン、またはアルキレンオキシドと脂肪酸、例えば、ステアリン酸ポリオキシエチレンとの縮合産物、もしくはエチレンオキシドと長鎖脂肪族アルコール、例えば、ヘプタデカエチル－エネオキシセタノールとの縮合産物、もしくはエチレンオキシドと脂肪酸由来の部分エステル及びポリオキシエチレンソルビトールモノオレエートなどのヘキシトールとの縮合産物、もしくはエチレンオキシドと脂肪酸由来の部分エステル及びヘキシトール無水物、例えばポリエチレンソルビタンモノオレエートとの縮合産物であり得る。水性懸濁液は、１つ以上の保存剤、例えば、エチル、またはｎ－プロピル、ｐ－ヒドロキシベンゾエートも含有し得る。

【０２６２】

ある特定の実施形態では、本方法に使用されるポリペプチド結合剤は、界面活性剤、酸化防止剤、安定剤、アミノ酸、及び／糖のうちの１つ以上を含む医薬組成物に含有される。

【０２６３】

種々の実施形態では、抗体を含む医薬組成物は、例えば、ｐＨ６．８～５．５、または７．２～５．５で、１～２０ｍＭヒスチジン、１～２０ｍＭメチオニン、１５０～５００ｍＭソルビトール、または０．５％～７％ソルビトール、０．００５～０．１％ポリソルベート２０をさらに含む。種々の実施形態では、組成物は、コハク酸緩衝液、リン酸ナト

リウム緩衝液、酢酸緩衝液、または医薬組成物に有用な他の緩衝液など、緩衝液も含む。

【０２６４】

本明細書に記載される抗体は、保存のために凍結乾燥され、使用前に好適な担体において再構成され得る。この技法は、従来の免疫グロブリンで有効であることが示されている。任意の好適な凍結乾燥及び再構成技法を用いることができる。当業者であれば、凍結乾燥及び再構成が様々な程度の抗体活性の損失をもたらす可能性があり、使用レベルが補正のために調整されなければならない場合があることが理解されよう。

【０２６５】

水の添加による水性懸濁液の調製に好適な分散性粉末及び顆粒は、分散剤または湿潤剤、懸濁剤、及び１つ以上の保存剤との混和により活性化合物を提供する。好適な分散剤または湿潤剤及び懸濁剤は、上記に既に記述されているものにより例示される。

【０２６６】

これらの製剤中のポリペプチド結合剤の濃度は、例えば、約０．５％未満、通常約１重量％または少なくとも約１重量％未満～１５または２０重量％ほどまで広く変動し得、選択された特定の投与モードにより、主に液量、粘度などに基づき選択される。したがって、非経口注射用の典型的な医薬組成物は、１ｍｌの滅菌緩衝水及び５０ｍｇのポリペプチド結合剤を含有するように構成され得る。静脈注入用の典型的な組成物は、２５０ｍｌの滅菌リンゲル液及び１５０ｍｇのポリペプチド結合剤を含有するように構成され得る。非非経口投与可能な組成物を調製するための実際の方法は当業者には既知であるか、または明らかであり、また例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅ，１５ｔｈ ｅｄ．，Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｅａｓｔｏｎ，Ｐａ．，１９８０により詳細に記載される。ポリペプチド結合剤の有効投薬量は、０．０１ｍｇ～２５ｍｇ／体重ｋｇ／投与の範囲内である。

【０２６７】

医薬組成物は、滅菌された注射可能な水性、油性の懸濁液、分散液、または滅菌された注射可能溶液もしくは分散液の即時調製用の滅菌粉末の形態であり得る。懸濁液は、上述されているそれらの好適な分散剤もしくは湿潤剤及び懸濁剤を使用して、既知の技術により製剤化され得る。滅菌された注射可能な調製物は、例えば、１，３－ブタンジオール中の溶液として、非毒性の非経口的に許容される希釈剤もしくは溶媒中の滅菌された注射可能な溶液または懸濁液であってもよい。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコールなど）、それらの好適な混合物、植物油、リンゲル液、及び等張塩化ナトリウム溶液を含有する溶媒または分散培地であり得る。加えて、滅菌された固定油は便宜的に溶媒または懸濁培地として用いられる。この目的に関して、合成モノ－またはジグリセリドを含む、任意の無刺激固定油が用いられてもよい。加えて、オレイン酸などの脂肪酸が注射剤の調製に使用される。

【０２６８】

全ての場合において、形態は滅菌されなければならず、容易に注射器に注入できる程度に流体でなければならない。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用により、分散の場合には必要な粒径の維持により、及び界面活性剤の使用により維持され得る。それは、製造及び保管条件下で安定していなければならず、細菌及び真菌などの微生物の汚染作用を防止しなければならない。微生物の作用の防止は、種々の抗菌剤及び抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサールなどによってもたらされ得る。多くの場合、等張剤、例えば、糖または塩化ナトリウムを含むことが望ましい。注射可能組成物の持続吸収は、吸収を遅延する薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンを組成物に使用することによってもたらされ得る。

【０２６９】

投与に有用な組成物は、それらの有効性を増加させるために、取り込みまたは吸収エンハンサーと共に製剤化され得る。かかるエンハンサーは、例えばサリチレート、グリココ

レート／リノレート、グリコレート、アプロチニン、バシトラシン、ＳＤＳ、カプレートなどを含む。例えば、Ｆｉｘ，Ｊ．Ｐｈａｒｍ．Ｓｃｉ．８５：１２８２－１２８５，１９９６）、及びＯｌｉｙａｉ ａｎｄ Ｓｔｅｌｌａ，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｔｏｘｉｃｏｌ．，３２：５２１－５４４，１９９３を参照されたい。

【０２７０】

投与及び投薬

一態様では、本開示は、本明細書に記載される負の調節因子抗体を含む医薬組成物を投与する方法を提供する。

【０２７１】

本発明の方法は、限定されないが、注射、注入、経口摂食、鼻孔内、局所、経皮、非経口、吸入スプレー、膣、または直腸投与を含む、哺乳類対象内に直接または間接的に治療薬を導入するための任意の医学上許容される手段を使用して行われる。本明細書で使用されるとき、非経口という用語は、皮下、静脈内、筋肉内、及び大槽内注射、ならびにカテーテルまたは注入技法を含む。皮内、乳房内、腹腔内、クモ膜下腔内、眼球後、肺内注射による投与、及びまたは特定の部位での外科移植も企図される。好適な送達デバイスは、インスリンの送達に関して開発されたものを含み得る（例えば、Ｏｗｅｎｓ ｅｔ ａｌ Ｄｉａｂｅｔｉｃ Ｍｅｄ．２０（１１）：８８６－８９８，２００３、ＵＳ２０１４／０１２８８０３及びＰｅｙｓｅｒ ｅｔ ａ；．，Ａｎｎａｌｓ ＮＹ Ａｃａｄ Ｓｃｉ，１３１１：１０２－１２３，２０１４を参照されたい）。

【０２７２】

一態様では、投与は、部位への直接注射による治療を必要とする患部組織の部位で、または内部的に製剤を送達することができる持続送達もしくは持続放出機構を介して行われる。例えば、生分解性小球体もしくはカプセル、または組成物の持続送達を可能にする他の生分解性ポリマー構成（例えば、可溶性ポリペプチド、抗体、または小分子）が、部位に移植された、本開示に有用な製剤に含まれ得る。

【０２７３】

治療用組成物は、複数部位でも患者に送達される。複数投与は、同時に与えられ得るか、または一定期間にわたって投与され得る。ある特定の場合では、治療用組成物の連続流を提供することが有益である。追加の療法が定期的に、例えば、毎時間、毎日、毎週、隔週、３週間毎、または毎月投与され得る。

【０２７４】

本明細書に記載される第２の薬剤を伴う抗体組成物など、複数剤の投与も本方法に企図される。

【０２７５】

所与の投薬量における抗体組成物の量は、療法が投与される個人のサイズ、ならびに治療される障害の特徴により変動する。例示的な治療において、用量当たりまたは１日当たり約０．１～約２５ｍｇ／ｋｇ、または約０．０５～１０ｍｇ／ｋｇ、約０．３～６ｍｇ／ｋｇ、もしくは約０．１～３ｍｇ／ｋｇを投与する必要がある場合がある。例示的な用量としては、０．１ｍｇ／ｋｇ、０．３ｍｇ／ｋｇ、０．５ｍｇ／ｋｇ、１ｍｇ／日、０．７５ｍｇ／ｋｇ、１．０ｍｇ／ｋｇ、１．５ｍｇ／ｋｇ、２ｍｇ／ｋｇ、３ｍｇ／ｋｇ、４ｍｇ／ｋｇ、５ｍｇ／ｋｇ、６ｍｇ／ｋｇ、７ｍｇ／ｋｇ、８ｍｇ／ｋｇ、９ｍｇ／ｋｇ、１０ｍｇ／ｋｇ、１１ｍｇ／ｋｇ、１２ｍｇ／ｋｇ、１３ｍｇ／ｋｇ、１４ｍｇ／ｋｇ、１５ｍｇ／ｋｇ、１６ｍｇ／ｋｇ、１７ｍｇ／ｋｇ、１８ｍｇ／ｋｇ、１９ｍｇ／ｋｇ、２０ｍｇ／ｋｇ、２１ｍｇ／ｋｇ、２２ｍｇ／ｋｇ、２３ｍｇ／ｋｇ、２４ｍｇ／ｋｇ、または２５ｍｇ／ｋｇが挙げられる。他の用量としては、１ｍｇ／日、２．５ｍｇ／日、５ｍｇ／日、１０ｍｇ／日、２０ｍｇ／日、２５ｍｇ／日、５０ｍｇ／日、７５ｍｇ／日、１００ｍｇ／日、１５０ｍｇ／日、２００ｍｇ／日、２５０ｍｇ／日、５００ｍｇ／日、または１０００ｍｇ／日が挙げられる。これらの濃度は、単一投薬形態として、もしくは複数用量として、または連続的に投与され得る。最初に動物モデル、そして次に臨床試験において、標準的な用量応答試験は、特定の疾患状態及び患者集団に最適な投薬

量を明らかにする。
【０２７６】
併用療法
一実施形態では、本明細書に記載される抗体は、本明細書に記載される疾患または障害を治療するのに有用な第２の薬剤と共に投与される。本明細書に記載される１つ以上の抗体を含む組成物は、標的ポリペプチドに関連して治療される状態または障害に罹患している、またはそれに罹患し易い個人または哺乳動物に投与され得る。
【０２７７】
２つの治療剤の並行投与は、薬剤がそれらの治療作用をもたらす時間期間が重複する限り、その薬剤が同時にまたは同じ経路で投与される必要はない。異なる日または週での投与のように、同時または連続投与が企図される。
【０２７８】
第２の薬剤は、抗糖尿病薬、サイトカイン、成長因子、他の抗炎症剤、抗凝固薬、血圧を低下もしくは低減する薬剤、コレステロール、トリグリセリド、ＬＤＬ、ＶＬＤＬ、もしくはリポタンパク質（ａ）を低減する、またはＨＤＬを増加させる薬剤、コレステロール調節タンパク質のレベルを増加もしくは減少させる薬剤、抗新生物薬もしくは分子などの他の治療剤であり得る。癌または腫瘍などの過剰増殖障害を有する患者に関して、放射線療法、化学療法、光線力学療法、または手術などの第２の治療モダリティとの併用も企図される。
【０２７９】
例示的な薬剤としては、インスリン、グルカゴン、アカルボース、オクトレオチド、ベラパミル、ジアゾキシド、及び低血糖、または低血糖に関連する副作用に有用な他の薬剤が挙げられるが、これらに限定されない。種々の実施形態では、本明細書に記載される抗体は、任意選択で、送達デバイス、例えばスマート送達デバイス（例えば、ＵＳ２０１４／０１２８８０３を参照されたい）、または二重センサ／ポンプ（例えば、人工膵臓システム）において、インスリン及び／またはグルカゴンと共に投与される。
【０２８０】
本明細書に記載される前述の抗体またはその断片のいずれかは、補助療法として、当該技術分野において既知の、または本明細書に記載される抗糖尿病薬である第２の薬剤と共に並行投与され得る。他の抗糖尿病薬と共に本発明の前述の抗体またはポリペプチドのいずれかを含む組成物も企図される。
【０２８１】
いくつかの抗糖尿病薬が既知であり、これには、１）スルホニル尿素（例えば、グリメピリド、グリセンチド、スルホニル尿素、ＡＹ３１６３７）、２）ビグアニド（例えば、メトホルミン）、３）アルファ－グルコシダーゼ阻害剤（例えば、アカルボース、ミグリトール）、４）チアゾール－イジンジオン（例えば、トログリタゾン、ピオグリタゾン、ロシグリタゾン、グリピジド、バラグリタゾン、リボグリタゾン、ネトグリタゾン、トログリタゾン、エングリタゾン、ＡＤ　５０７５、Ｔ　１７４、ＹＭ　２６８、Ｒ　１０２３８０、ＮＣ　２１００、ＮＩＰ　２２３、ＮＩＰ　２２１、ＭＫ　０７６７、シグリタゾン、アダグリタゾン、ＣＬＸ　０９２１、ダルグリタゾン、ＣＰ　９２７６８、ＢＭ　１５２０５４）、５）グルカゴン様ペプチド（ＧＬＰ）及びＧＬＰ類似体、またはＧＬＰ－１受容体のアゴニスト（例えば、キセンディン）もしくはその安定剤（例えば、ＤＰＰ４阻害剤、シタグリプチンなど）、６）インスリンまたはその類似体もしくは模倣物（例えば、ＬＡＮＴＵＳ（登録商標））、ならびに７）グルカゴン（例えば、ＧｌｕｃａＧｅｎ　ｈｙｐｏＫｉｔ）が含まれるが、これらに限定されない。
【０２８２】
抗体及び第２の薬剤が同じ製剤で同時に与えられ得ることが企図される。薬剤は、別個の製剤で投与され、並行して投与されることがさらに企図され、並行とは互いに３０分以内に与えられる薬剤を指す。
【０２８３】

別の態様では、第２の薬剤は、抗体組成物の投与前に投与される。投与前は、抗体での治療１週間前、抗体の投与最大３０分前の範囲内で第２の薬剤を投与することを指す。第２の薬剤は、抗体組成物の投与後に投与されることがさらに企図される。投与後は、抗体治療３０分後から抗体投与最大１週間後の投与を説明することを意味する。

【０２８４】

適切な場合、他の補助療法が施され得ることがさらに企図される。例えば、患者は、適切な場合、低血糖患者のために設計された食事療法または食事計画、外科療法、または放射線療法も施される場合がある。

【０２８５】

投薬は、従来の治療薬が本明細書に記載される治療薬と併用して投与される場合、修正され得ることも明らかである。

【０２８６】

使用方法

ＩＮＳＲを結合する負の調節因子抗体が低血糖及び高インスリン血に関連する症状を治療及び予防するのに有用であることが、本明細書において企図される。種々の実施形態では、治療または予防される障害または状態は、カポジ肉腫、インスリノーマ、不安定型糖尿病、人工膵臓手順後低血糖、異常なグルコース代謝、肥満手術後の低血糖、運動誘発性低血糖、糖尿病性腎疾患、癌、低血糖、夜間低血糖、スルホニル尿素誘発性低血糖、インスリン誘発性低血糖、膵島細胞症（ＫＡＴＰ－Ｈｌびまん性疾患、ＫＡＴＰ－Ｈｌ局限性疾患、または「ＰＨＨＩ」）、ＧＤＨ－Ｈｌ（高インスリン症／高アンモニア血症症候群（ＨＩ／ＨＡ）、ロイシン感受性低血糖、またはジアゾキシド感受性低血糖）、島細胞調節不全症候群、乳児期の特発性低血糖、乳児期の持続性高インスリン性低血糖（ＰＨＨＩ）、先天性高インスリン症、（意図的な）インスリン過量、腎不全に起因する低血糖（急性または慢性）、先天性代謝疾患に起因する低血糖（例えば、Ｄｏｕｉｌｌａｒｄ　ｅｔ　ａｌ．，Ｏｒｐｈａｎｅｔ　Ｊ　Ｒａｒｅ　Ｄｉｓｅａｓｅ，７：２６，２０１２を参照されたい）、Ｎｉｓｓｅｎ噴門腎形成術、膵島細胞の肝臓への自家移植に起因する低血糖、及び慢性腎疾患、例えば、ＩＩＩ型、ＩＶ型、もしくはＶ型からなる群から選択される。

【０２８７】

低血糖の他の状態は当該技術分野において認識されており、以下に論じられる。これらの症状のいくつかは、肥満手術後の低血糖において観察され、本明細書に記載される抗体で肥満手術後の低血糖をどのように治療し、その治療を監視するかの情報を伝えることができる。

【０２８８】

スルホニル尿素誘発性低血糖及びインスリン誘発性低血糖

低血糖は、異常な低血中グルコース（血糖）レベル（通常７０ｍｇ／ｄｌ未満）を特徴とする状態であり、命に関わる場合がある。全ＥＭＴ呼び出しの約５～１５％はインスリン誘発性低血糖によりよるものであり、全ＥＤ訪問の約１０％インスリン関連低血糖によるものである。

【０２８９】

低血糖は、スルホニル尿素誘発性低血糖及びインスリン自体を含む、ある特定の薬物の投与により誘発され得る。インスリン及びスルホニル尿素誘発性低血糖は、最も一般的な種類の薬物適用誘発性低血糖のうちの２つである。

【０２９０】

スルホニル尿素誘発性低血糖は、血清インスリンレベルを増加させることによる、２型糖尿病を治療するのに使用されるスルホニル尿素（ＳＵ）薬物適用により生じる。スルホニル尿素は、膵臓のベータ細胞からのインスリン放出を刺激することにより作用する。現在使用されているスルホニル尿素としては、アセトヘキサミド、クロルプロパミド、トラザミド、トルブタミド、グリベンクラミド、グリクラジド、グリピジド、及びグリメピリドが挙げられる。グリベンクラミド及びクロルプロパミドは、より高い低血糖のリスクに

関連する
【０２９１】
第１世代ＳＵ（アセトヘキサミド、クロルプロパミド、トラザミド、トルブタミド）は、低血糖のリスクを増加する薬物－薬物相互作用によってより影響を受ける。第２世代ＳＵ（グリベンクラミド、グリクラジド、グリピジド、グリメピリド）は、低血糖を誘発する薬物－薬物相互作用の可能性を低減した。
【０２９２】
インスリン誘発性低血糖（医原性低血糖）は、外因性インスリン投与、例えば、血漿グルコースの有害な低下を引き起こす可能性があるインスリンの過量により生じる。重度の低血糖は、スルホニル尿素化合物よりもインスリンを摂取している患者においてさらにより頻繁に生じる。異なる種類のインスリンが過量を生じさせる場合がある。即時作用インスリンは注射後約１５分で作用する一方で、通常作用インスリンは注射後約３０後に作用する。長期作用インスリンにおいて、開始は注射後数時間であり、作用は等しく２４時間の期間にわたって持続する。インスリン過量は、患者が偶発的に間違った用量もしくは間違った種類のインスリンを注射したか、またはさもなければ正しい用量を注射した後の食事／スナックを抜いた場合に生じ得る。間違ったインスリン製品の摂取が長期作用及び即時作用製品を混同した患者により最も一般的に報告されている。食事炭水化物含量の計算ミスもインスリン過量をもたらし得る。食事に関連する間違いには、インスリン投与の直後に摂食を怠ること、またはカロリー摂取を低減した場合にインスリンレジメンを調整しないことが含まれる。意図的なインスリン過量が生じる場合もある。最近の試験により、米国において毎年、推定１００，０００人が低血糖のために緊急外来を訪れ、それらのおよそ３分の１（３０，０００）が入院となることが分かった。この試験で、症例の半分以上で５０ｍｇ／ｄＬ以下の血中グルコースレベル、及びほぼ３分の２で重度の神経症状が特定された（Ｇｅｌｌｅｒ　ＡＩ，ＪＡＭＡ　Ｉｎｔｅｒｎ　Ｍｅｄ．１７５（５）：６７８－６８６，２０１４）。
【０２９３】
両ＳＵ及びインスリン誘発性低血糖に対する典型的な治療は、１５～２０グラムのグルコースまたは単純炭水化物の飲食からなる。より重度の低血糖には、グルカゴン及び／またはデキストロース５０％（Ｄ５０）が投与される。グルカゴンは不安定で、調製が簡単ではなく、１０分以内に作用するが、作用が短すぎる（２０～６０分）ことが多い。グルカゴンは、複数の副作用（潮紅、嘔吐、はきけ）を有し、高用量インスリン救済または持続性低血糖には効果的ではなく、インスリノーマ対象には禁忌である。グルカゴンは、枯渇される可能性があり、比較的容易にインスリンによって取り除かれる可能性があるグリコーゲン貯蔵を必要とする。
【０２９４】
デキストロースは静脈内投与されるため、家（または学校）で投与することができない。それは粘稠であり、「力」に限界があり（例えば、高いインスリン過量のため）、一過性であり、例えば、ＥＭＴで治療された成人の低血糖患者の２０％は２４時間以内に後発事象を有する。デキストロースは、注射部位の静脈炎及び血栓症、高浸透圧症候群のリスク、流体過負荷、ならびに反跳性低血糖などの副作用も有する。インスリン過量に関して、グルカゴンまたはＤ５０のいずれも結果として生じる低血糖を取り除くことができない。
【０２９５】
夜間低血糖。
夜間低血糖は、インスリンで治療された糖尿病患者によく起こる。幼児は特に夜間低血糖の重度で長期エピソードの影響を受けやすい（Ｍａｔｙｋａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｈｏｒｍ　Ｒｅｓ．５７（ｓｕｐｐｌ　１）：８５－９０，２００２）。血中グルコースは睡眠中に定期的に監視されないため、夜間低血糖は通常検出されず、これが日中の低血糖よりも夜間低血糖をさらに危険なものとする。夜間低血糖は通常、鮮明な夢もしくは悪夢、質の悪い睡眠もしくは睡眠中の不穏、朝の頭痛、慢性疲労、気分変化、筋緊張の増加、寝汗、

痙攣、及び小児の尿失禁をもたらす（Ｓｔｅｐｈｅｎ Ａ Ｂｒｕｎｔｏｎ，ＭｅｄＧｅｎＭｅｄ．９（２）：３８，２００７）。頻繁な検出されない夜間低血糖は低血糖の無認識にも寄与し、長期神経認知欠損を引き起こす。夜間低血糖の重度のエピソードは、突然死（高齢患者における「ベッド死症候群」）をもたらす心不整脈の誘起因子として関係付けられた（Ａｌｌｅｎ ＫＶ，Ｆｒｉｅｒ ＢＭ．Ｅｎｄｏｃ Ｐｒａｃｔ．９（６）：５３０－４３，２００３）。重度の夜間低血糖エピソードを恐れて、患者は就寝前の彼らのインスリン用量を低減することが多く、これは不適切な血糖制御及び朝のインスリンレジメントの変更につながる。加えて、低血糖は、小児において、食物摂取調節の難しさと組み合わされた過度の労作及び身体活動により悪化する可能性がある。夜間低血糖の現在の治療は、起床した個人のためのベッド横のスナック、及び起きられない患者のためのグルカゴンである。本明細書の抗体は、重度のエピソードのリスクが高い患者における予防としての用途を有し得る。重要なことには、効果的な予防は、良好な（厳密な）グルコース制御を可能にし得る（低血糖のリスクが軽減されるように）。

【０２９６】

乳児の持続性高インスリン性低血糖（ＰＨＨＩ）及び夜間低血糖。

低血糖は、特に生後２日の新生児において一般的な代謝問題であり、ＮＩＣＵへの入院の主な原因である。重要なことには、長期低血中グルコースレベルを伴う乳児は、幼児期後期に問題を発達させるリスクがより高い。

【０２９７】

夜間低血糖に関してスクリーニングする、それを診断及び管理するための最良のアプローチに対して未だ多少議論があり、低グルコース濃度のレベルを特定することは不利な可能性がある場合がある。低血糖のリスクがあり、それについて頻繁にスクリーニングされる新生児には、後期早産児、在胎期間に対して大きい新生児、在胎期間に対して小さい新生児、成長が制限された新生児、及び母親が糖尿病の乳児が含まれる。大半の低血糖は軽度で一過性であり、発生することなく消散する。典型的な治療には、処方による補給、またはいくつかの場合では、静脈内グルコース投与が含まれる。最近開発された選択肢は、デキストロースゲルの頬側送達である。

【０２９８】

本明細書に記載される抗体は、グルコースに十分に応答しない、及び／または低血糖が消散しない（例えば、最初の４８～７２時間で）患者に有用であり得る。

【０２９９】

腎臓機能の変化、多剤療法、及び危険徴候に対する感受性の低減に起因する高齢集団における低血糖の発生率は高い。例えば、リスクは８０歳を超える患者において２倍高い。

【０３００】

治療は、現在の治療選択肢に対する応答が不良な患者、または現在の治療、例えば、デキストロース溶液の静脈アクセスが反作用を示すそれらの個人に使用することができる。例えば、現在の療法は、アルコール依存症またはアルコール症に起因するグリコーゲン枯渇を有する個人に有効ではない場合があるか、または肝臓からのグリコーゲンの枯渇を伴う患者は、グルカゴンによる予測された作用がない。

【０３０１】

この分野において企図される低血糖の代替療法は、人工膵臓の使用を含み、これは、インスリンポンプ、継続的なグルコースの監視（ＣＧＭ）、及び必要なインスリンの用量の自動投与を兼ね備える（例えば、Ｍｅｄｔｒｏｎｉｃ ＭｉｎｉＭｅｄ ６７０Ｇハイブリッド閉ループシステム）。人工膵臓は本明細書に記載される抗体またはＦａｂで補足され得ることが企図される。

【０３０２】

先天性高インスリン血

先天性高インスリン血は、個人に異常に高いインスリンレベルをもたらす状態であり、結果として頻繁に低血糖（低血糖）となる。低血糖の反復発生は、呼吸困難、発作、知的障害、視力喪失、脳損傷、及び昏睡などの重篤な事象のリスクを増加させる。いくつかの

遺伝子における突然変異が先天性高インスリン症を生じることが分かり、これらの突然変異は、ベータ細胞からのインスリンの過剰分泌及び血流からのグルコースの枯渇をもたらすことが多い。

【０３０３】

現在、持続性先天性高インスリン血（ＣＨＩ）の治療アプローチはいくつかしかない［Ａｒｎｏｕｘ Ｊ．，ｅｔ ａｌ．Ｏｒｐｈａｎｅｔ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｒａｒｅ Ｄｉｓｅａｓｅｓ ６：６３（２０１１）、Ｙｏｒｉｆｕｊｉ Ｔ．，Ａｎｎ Ｐｅｄｉａｔｒ Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ Ｍｅｔａｂ．１９：５７－６８（２０１４）］。ＫＡＴＰチャネル活性化剤であるジアゾキシドは、膵β細胞におけるインスリン分泌を阻害する。最も頻繁な有害作用は多毛症（男性型多毛）である。他の副作用としては、うっ血性心不全を誘起し得るナトリウム及び流体貯留が挙げられる。ジアゾキシドは、一般的に、ＣＨＩの最も一般的な原因のうちの１つである、ＫＡＴＰチャネル突然変異に起因するＣＨＩを有するそれらの患者には有効ではない。オクトレオチドは、インスリン放出を阻害するソマトスタチン類似体である。ＣＨＩには承認されていないが、オクトレオチドは、ジアゾキシド不応性ＣＨＩに利用される。その短い半減期のため（１～２時間）、１日数回の注射として、もしくはポンプで連続して皮下（ＳＣ）、または静脈内（ＩＶ）投与される。一般的な有害事象としては、胃腸症状及び胆嚢合併症が挙げられる。部分膵切除は局限型病変の選択肢であり、大半の場合において治癒し得る。しかしながら、病変は術前撮像により示される部位で常に可視または触知可能ではない。びまん型の患者は、主に、連続グルコース供給または適応外薬物適用により治療される。ほぼ全ての膵切除は治療と考えられるが、これは糖尿病のリスクが高いことを特徴とする。

【０３０４】

インスリノーマ

インスリノーマは、多くの場合ベータ細胞で開始する膵臓の腫瘍であり、インスリンの分泌増加をもたらす。インスリノーマの患者の治療選択肢としては、低血糖の症状を制御するための、ジアゾキシドまたはソマトスタチン類似体での医学療法が挙げられるが、外科的除去／部分膵切除でしか治癒しない。インスリノーマ誘発性低血糖は、外科的除去が成功した数年後に再発する可能性がある（散在性インスリノーマの患者において再発率は５～７％である）。

【０３０５】

インスリノーマの約５～１０％（毎年約１２５人の新患者に相当する）が悪性及び転移性である。悪性インスリノーマは一般的に、従来の化学療法薬レジメンにはほとんど応答せず、したがって、この集団における血糖制御の高い必要性は満たされていない。加えて、低血糖を制御するために化学療法と同時に施され得るインスリン標的治療が対象のものであろう。

【０３０６】

食後低血糖

食後高インスリン性低血糖が、胃のバイパス手術の副作用または合併症として最近観察されている（Ｓｉｎｇｈ ｅｔ ａｌ．，Ｄｉａｂｅｔｅｓ Ｓｐｅｃｔｒｕｍ ２５：２１７－２２１，２０１２、Ｐａｔｔｉ ｅｔ ａｌ．，Ｄｉａｂｅｔｏｌｏｇｉａ ４８：２２３６－２２４０，２００５、Ｓｅｒｖｉｃｅ ｅｔ ａｌ．Ｎ Ｅｎｇｌ Ｊ Ｍｅｄ ３５３：２４９－２５４，２００５）。胃のバイパス手術の一般的な方法としては、Ｒｏｕｘ－ｅｎ－Ｙ胃バイパス法（ＲＹＧＢ）、スリーブ状胃切除（Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｓｕｒｇｉｃａｌ Ｌａｐａｒｏｓｃｏｐｙ，Ｅｎｄｏｓｃｏｐｙ＆Ｐｅｒｃｕｔａｎｅｏｕｓ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ２４：１－１１，２０１４）、胃緊縛術、または胃形成が挙げられる。胃のバイパス手術のしばしば観察される副作用は「ダンピング」であり、これは、単糖の摂食、及び食物の小腸への迅速な排出の結果である。これは、血管運動症状（潮紅、頻拍）、腹痛、及び下痢を特徴とすることが多い。後期ダンピング、または反応性低血糖の形態は、食後最大数時間で生じ得、近位小腸からの単糖の迅速な吸収に起因する高血糖に応答するインスリンに起因する。術後直ぐに認められ、経時的に改善

するダンピングとは対照的に、高インスリン性低血糖は、胃のバイパス手術後、数ヶ月から数年間（通常、約１年、最大３年）見られる。この症候群は、典型的にはダンピングが見られない重度の食後神経低糖症の発症、ならびに膵性膵島細胞症（島細胞拡大、管上皮からのβ細胞出芽、及び管に並置する島）により、ダンピングとは異なる。ダンピングとは異なり、栄養改善は食後低血糖（ＰＰＨ）の症状を軽減しない。

【０３０７】

肥満手術後の高インスリン性低血糖の診断及び確認は、インスリン（＞３μＵ／ｍｌ）及びＣ－ペプチド（＞０．６ｎｇ／ｍｌ）の上昇、ならびに陰性経口血糖降下薬スクリーニングに基づくことが多い（Ｓｅｒｖｉｃｅ Ｆ．Ｊ．，Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ Ｍｅｔａｂ Ｃｌｉｎ Ｎｏｒｔｈ Ａｍ ２８：５０１－５１７，１９９９）。

【０３０８】

一般的に、低血糖は軽度であり、不安及び空腹などの症状をもたらすが、患者は、発作、昏睡、及びさらには死を引き起こす可能性がある重度の低血糖のリスクにもある。患者が訴える低血糖に関連する典型的な症状としては、疲労、脱力感、震え、及び空腹が挙げられる。多くの患者は、低血糖の症状を予防するために頻繁に食べなければならない。一部の患者は、低血糖のため、精神症状を発達させる場合がある。

【０３０９】

インスリンシグナル伝達の負の調節因子である抗体の投与が肥満手術後ＰＰＨの治療に有益であることが企図される。本方法が、Ｒｏｕｘ－ｅｎ－Ｙ胃バイパス法（ＲＹＧＢ）、スリーブ状胃切除、胃緊縛術、または胃形成を含むがこれらに限定されない、当該技術分野において既知であり、本明細書に記載される胃の手術のいずれかの後に有用であることが企図される。一態様では、低血糖／高インスリン血は、インスリン作用を負に調節するヒトインスリン受容体（ＩＮＳＲ）に対してモノクローナル抗体を使用して治療される。一態様では、抗体は、ＩＮＳＲ（Ａ及びＢ）の両形態への結合、ＩＮＳＲ自己リン酸化の阻害、Ａｋｔを介したＩＮＳＲシグナル伝達の阻害からなる群から選択される特徴のうちの１つ以上を有し、特異的であり、インスリンの結合を阻害することができ、またＩＧＦ－１Ｒに結合しないか、またはＩＧＦ－１Ｒシグナル伝達に影響を与える。

【０３１０】

本明細書で使用するのに企図される抗体は、ＩＮＳＲの負の調節因子を通してインスリンに対する細胞抵抗性を付与し、それにより、高インスリン血患者における血中グルコースレベルを増加及び正常化すると仮定される。種々の実施形態では、抗体は、高インスリン血または過剰なインスリンシグナル伝達を低減する。種々の実施形態では、投与は、対象における食後血中グルコースを１．５～１０倍または１０～４０％増加させる。種々の実施形態では、投与は、対象における食後血中グルコースを約１０ｍｇ／ｄＬ増加させる。種々の実施形態では、投与は、血中グルコースを増加させ、正常な範囲に戻す。

【０３１１】

投与は、本明細書の抗体の投与後約１、２、３、４、５、６、７、８、及び最大１２時間にわたって血中グルコースレベルを安定することがさらに企図される。本明細書に記載される投与が治療を受ける対象に高血糖をもたらすことなく、対象における低血糖を反転することも提供される。

【０３１２】

加えて、食後の低血糖の動態は、本明細書に記載される抗体により改善され得る。例えば、約＜７０ｍｇ／ｄＬまたは＜６０ｍｇ／ｄＬの食後低血糖が食後１～４時間で生じ得る。本明細書に記載される抗体による治療は、かかる食後レベルを正常な無症状範囲に向かって低減することが企図される。かかる低減は、約１０～３０ｍｇ／ｄＬであり得、例えば、低減は、約１０、１５、２０、２５、または３０ｍｇ／ｄＬ以上、またはこれらの数字間の任意の量であり得る。負の調節因子抗体の対象への投与の作用は、インビボ及びインビトロで測定される。一実施形態では、インスリン／インスリン受容体活性を負に調節する抗体がインスリン感受性、ならびにＨｂＡ１ｃ及びグルコースのインビボレベルを減少させることが企図される。これらの因子は、当業者に一般的な技法を使用して測定さ

れる。
【０３１３】
負の調節因子抗体を受容する対象は、改善されたインスリン分泌、血糖制御（グルコース負荷試験（ＧＴＴ）または混合食試験（ＭＭＴ）により測定される）、インスリン耐性試験（ＩＴＴ）により測定されるインスリン感受性、ベータ細胞機能（例えば、細胞塊、インスリン分泌、Ｃ－ペプチドレベルにより測定される）、ベータ細胞休眠、及び／または脂質代謝異常も示し得る。
【０３１４】
例えば、ＡＤＡは成人において７％未満のＨｂＡ１ｃ標的レベルを推奨している。小児に関して、ＡＤＡはＡ１ｃのより高い標的レベルを推奨している。６歳未満の小児において、推奨レベルは７．５％～８．５％である。６～１２歳の小児において、推奨レベルは、８％未満である。１３～１９歳の１０代の推奨レベルは７．５％未満である。Ａ１ｃは、血糖レベルが２～３ヶ月前に対してどのくらいよく標的範囲内にとどまったかの基準である。（Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｄｉａｂｅｔｅｓ Ａｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ，Ｄｉａｂｅｔｅｓ Ｃａｒｅ，２８（１）：１８６－２１２，２００５）ＰＰＨを治療するための抗体の投与が、Ａ１ｃレベルを、低血糖ではない個人において観察されるレベルにもってくる、例えば、患者におけるＡ１ｃレベルを、絶対ＨｂＡ１ｃ率測定の少なくとも０．５％、０．７％、１．０％、または１．５％以上増加させることが企図される。ランゲルハンスの膵島のベータ細胞は、血液中のグルコースのレベルを制御するホルモンであるインスリンを作製及び放出する。膵臓によって維持されるインスリンのベースラインレベルがあるが、同時にさらに産生しながら、貯蔵されたインスリンを放出することによって血中グルコースのスパイクに迅速に応答することができる。応答時間はかなり迅速である。例えば、１型糖尿病において、ベータ細胞の斬進的かつ大規模な損失は、分泌されたインスリンレベルの減少をもたらし、最終的に、高血糖（血液中の異常に高いグルコースレベル）をもたらす。２型糖尿病において、ベータ細胞は、初めは、インスリン出力を増加することによって、対象におけるインスリン抵抗性を補うが、経時的に、細胞は正常なグルコースレベルを維持するのに十分なインスリンを産生することができなくなる。インスリンの作用に対する標的組織の抵抗性及びインスリン分泌の減少の両方が、一部、ベータ細胞の破損により生じると考えられる。
【実施例】
【０３１５】
本発明は、以下の例示的な非限定的な実施例によりさらに説明される。
【０３１６】
実施例１
ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８変異型の構築
ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８抗体及びＦａｂ変異型を構築するために、ＸＰＡ．１５．２４７の重鎖及び軽鎖（ＷＯ２０１１／０３８３０２を参照されたい、参照により本明細書に組み込まれる）を増幅し、Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅキットを使用して、標準的な部位指向的突然変異誘発プロトコルを使用して変異させた。ＶＨにおいて変異された残基は、隣接する残基グリシンで異性化を引き起こすことができるため、ＣＤＲ２においてアスパルテート５４からセリンであった。潜在的な酸化部位であるため、ＣＤＲ３において、メチオニン１０５は、フェニルアラニンに変異された。変異された第３の残基はバリン１０７からＴｙｒであった。これら３つ全ての残基は、生殖系列（Ｄ５４Ｓ、Ｍ１０５Ｆ、Ｖ１０７Ｙ）に変更され、これは、製造可能性を改善することが意図されるが、意外にも、親抗体と比較して、ＩＮＳＲに対する親和性及び変異型の効力を改善した。ＸＰＡ．１５．２４７変異型重鎖は、ＸＰＡ．１５．２４７．２（配列番号２）と称される。ＸＰＡ．１５．２４７の重鎖及び軽鎖配列（配列番号１及び３）ならびにＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８（配列番号２及び４）は下の表２に示され、ＣＤＲは下線が引かれ、アミノ酸修飾は太字のイタリック体である。
【０３１７】

【表２】

	配列
XPA.15.247 VH	EVQLVETGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPG KGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARHEWGFGMDVWGQGTTVTVSS (配列番号 1)
XPA.15.247.2 VH	EVQLVETGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPG KGLEWVAVISY*S*GSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARHEWGFG*F*D*Y*WGQGTTVTVSS (配列番号 2)
XPA.15.247 VL	DVVMTQSPLSLSVTLGQPASISCRSSLSLVYGDENTYLNWFQQ RPGQSPRRLLYKVSDRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEADD VGVYYCMQGTHWPYTFGQGTKLEIKRTVAAPS (配列番号 3)
XPA.15.247.2.018 VL	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSS*Q*SLVYGD*G*NTYLNWFQQ RPGQSPRRL*I*YKVS*N*RDSGVPDRFSGSGSGT*E*FTLKISRVEA*E*D VGVY*F*CMQGT*Y*WPGTFG*G*GTKLEIKRTVAAPS (配列番号 4)

【０３１８】

実施例２

結合アッセイ

修飾されたＦａｂのインスリン受容体への結合能力を決定するために、結合アッセイを実行した。

【０３１９】

ＩＮＳＲヒト、ラット、及びカニクイザルのオルソログを過剰発現するＣＨＯＫ１細胞を、ウェル当たり２５，０００細胞で９６ウェル丸底プレート（Ｃｏｓｔａｒ、カタログ番号３７９９）に平板培養した。親抗体結合を評価するために、アッセイの前日に、細胞をＰＢＳで洗浄し、ＲＰＭＩ　１６４０（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、２ｍＭ　Ｌ－グルタミン、及び０．５％ＢＳＡを含有する「飢餓培地」中に1×10^{6}細胞／ｍＬで再懸濁し、３７℃、５％CO_2インキュベータにおいて１６～２０時間インキュベートし、次に、４℃で４０分間、５０ｕｌのＦＡＣＳ緩衝液（ＰＢＳ＋０．５％ＢＳＡ＋０．１ｍＭアジ化ナトリウム）中０．００１～１００ｕｇ／ｍｌの範囲の抗体濃度でインキュベートした。Ｆａｂ染色に関して、細胞を二次抗体のマウス抗ｃ－ｍｙｃ　ＩｇＧ（Ｒｏｃｈｅ，Ｂａｓｅｌ，Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）で染色した。ＦＡＣＳ緩衝液で２回洗浄した後、細胞を、次に、４℃で２０分間、１：１００希釈で、ヤギ抗ヒトＩｇＧアロフィコシアニン（Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｉｍｍｕｎｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，Ｗｅｓｔ　Ｇｒｏｖｅ，ＰＡ）（ＩｇＧ分析のため）またはヤギ抗マウスＩｇＧアロフィコシアニン（Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｉｍｍｕｎｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，Ｗｅｓｔ　Ｇｒｏｖｅ，ＰＡ）（Ｆａｂ分析のため）の

いずれかで染色した。細胞をＦＡＣＳ緩衝液で２回洗浄し、細胞をＦＡＣＳＣａｎｔｏＩＩ（商標）フローサイトメトリー（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）で分析した。データは、ＦｌｏｗＪｏ（商標）（Ｔｒｉｓｔａｒ，Ｐａｓｏ　Ｒｏｂｌｅｓ，ＣＡ）及びＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ　５（ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ，Ｌａ　Ｊｏｌｌａ，ＣＡ）の両方を使用して分析された。

【０３２０】

ＸＰＡ．１５．２４７抗体は、ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８抗体の０．７５１４と比較して（図１）、３２．３５のＥＣ５０を有し、ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　ＩｇＧが親分子よりもＩＮＳＲに対して約４３倍高い親和性を有したことを示した。Ｆａｂ断片に関して、ＸＰＡ．１５．２４７　Ｆａｂは、ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８の０．１８６４と比較して（図２）、２．５３０のＥＣ５０を有し、ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂが親ＦａｂよりもＩＮＳＲに対して１３倍を超える高い親和性を有したことを示した。

【０３２１】

抗ヒトＩＮＳＲ調節抗体の動態及び結合親和性は、ワンショット動態法を使用して、２５℃で、ＰｒｏｔｅＯｎ　ＸＰＲ３６機器（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）で行われた表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）により決定された。ＳＰＲは、標識不含環境で、リアルタイムで生体分子の相互作用を測定する。ＣＨＯ－ｈＩＮＳＲ－Ｂ細胞は、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、２０ｍＭトリス（ｐＨ７．５）、１ｍＭ　ＥＤＴＡ、１ｍＭ　ＥＧＴＡ、及びプロテアーゼ阻害剤カクテル（Ｒｏｃｈｅ，＃０５８９２７９１００１）で補足された１％ＴｒｉｔｏｎＴＭ　Ｘ－１００からなるトリス溶解緩衝液（ＴＬＢ）に可溶化された。簡潔に、１ｍｌのＴＢＬを、約２×１０^{6}細胞に添加し、細胞懸濁液を４℃の振動部上で攪拌した。２時間後、この溶液を、卓上遠心機を使用して、１４，０００ｒｐｍで２０分間、４℃で遠心分離した。可溶化したＩＮＳＲを含有する上清を濾過して、分析直前に解凍するまで、－８０℃で凍結させておいた。ＩＮＳＲ捕捉のためのＳＰＲ検出表面を調製するために、標準的なアミンカップリング化学を使用して、ＩＮＳＲのカルボキシ末端部分を認識するＣＴ－３　ｍＡｂ（Ｆｉｓｈｅｒ，＃ＭＳ－６３６－ＰＡＢＸ）をセンサチップ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ　ＧＬＭ，＃１７６－５０１２）上に共有結合により固定化した。簡潔に、１０ｍＭ　ＳＤＳ、５０ｍＭ　ＮａＯＨ、１００ｍＭトリス（ｐＨ９．５）、及び１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、１５０ｍＭ塩化ナトリウム、３ｍＭ　ＥＤＴＡ、０．０５％ポリソルベート２０（Ｔｅｋｎｏｖａ，＃Ｈ８０２２）からなる泳動緩衝液の毎分１００μＬの流量の連続注入により、ＧＬＭセンサチップを前処理した。次に、チップ表面を、毎分２５μＬの流量の、新しく調製した０．１Ｍ　Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）及び０．４Ｍ　１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミドの１：１溶液の５分間注入で活性化した。活性化後、約１０，０００ＲＵの捕捉抗体がセンサ表面上に固定化されるまで、ｐＨ４．５酢酸緩衝液中の１０μｇ／ｍＬのＣＴ－３抗体を、毎分３０μＬの流量で注入した。表面を遮断するために、１Ｍエタノールアミン塩酸塩－ＮａＯＨ（ｐＨ８．５）を５分間注入した。１μｇ／ｍｌのヒトインスリン（Ｓｉｇｍａ，＃Ａ３０５９０）と共に、またはそれなしで、１ｍｇ／ｍｌのＢＳＡで補足された泳動緩衝液中に１：１希釈された可溶化されたＩＮＳＲを、ＣＴ－３抗体でコーティングされた垂直流路上に１０００～１２００ＲＵの密度で捕捉した。水平配向に切り替えた後、及びベースライン安定化の１０分後に、毎分３０μｌの流量で、１３３、４４、１４．７、４．９、及び１．６４ｎＭの濃度で、抗ヒトＩＮＳＲ調節抗体を捕捉した可溶化されたＩＮＳＲ上に注入した。会合は５分間監視され、解離は１０分間監視された。表面は、抗ヒトＩＮＳＲ調節抗体の注入後に１００ｍＭ　ＨＣｌで再生された。二重参照データは、オン速度（ｋａ）及びオフ速度（ｋｄ）の動態パラメータを得るために、ＰｒｏｔｅＯｎ（商標）ソフトウェアを使用して単純な１：１結合モデルで曲線当てはめされた。平衡結合定数（K_D）値は、動態パラメータ（ｋｄｋａ）の比率から計算された。表３は、インスリンの存在下または不在下での、抗ヒトＩＮＳＲ調節ＸＰＡ．１５．２４７親抗体及びその変異型ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８のヒトＩＮＳＲへの結合動態及び親和性パラメータを示す。

【０３２２】
【表３】

抗体	オン速度 ka (M-1s-1)	オフ速度 kd (1/s)	親和性 K_D (nM)
XPA.15.247	3.85E+04	4.71E-04	10 ± 2
XPA.15.247 + インスリン	4.25E+04	1.31E-03	29 ± 2
XPA.15.247.2.018	1.85E+05	1.22E-03	6.6 ± 0.6
XPA.15.247.2.018 + インスリン	1.96E+05	1.68E-03	8.5 ± 0.16

【０３２３】
ＸＰＡ．１５．２４７は、インスリンの不在下で、約１０ｎＭの親和性でｈＩＮＳＲを結合した。オン速度は３．８×１０^{4}Ｍ$^{-1}$秒$^{-1}$であり、オフ速度は４．７×１０$^{-4}$秒$^{-1}$であった。インスリンの存在下で、ＸＰＡ．１５．２４７の親和性は約３倍低かった（ＫＤ＝２９ｎＭ）。インスリンとでは、ｈＩＮＳＲに結合するＸＰＡ．１５．２４７のオン速度は４．２５×１０^{4}Ｍ$^{-1}$秒$^{-1}$であり、オフ速度は１．３×１０$^{-3}$秒$^{-1}$であった。対照的に、ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８は、インスリンの不在下で、約６ｎＭの親和性でｈＩＮＳＲを結合した。オン速度は１．８５×１０^{5}Ｍ$^{-1}$秒$^{-1}$であり、オフ速度は１．２２×１０$^{-3}$^{4}秒$^{-1}$であった。インスリンの存在下で、ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８の親和性は２倍未満低かった（ＫＤ＝８．５ｎＭ）。インスリンとでは、ｈＩＮＳＲに結合するＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８のオン速度は１．９６×１０^{5}Ｍ$^{-1}$秒$^{-1}$であり、オフ速度は１．６８×１０$^{-3}$秒$^{-1}$であった。変異型は、オン速度パラメータの増加により、ＸＰＡ．１５．２４７親抗体と比較して、高い親和性を呈した。さらに、親抗体とは対照的に、インスリンの存在は、変異型のオン速度またはオフ速度のいずれも大幅に減少されなかった。
【０３２４】
実施例３
ＡＫＴのＩＮＳＲ誘発リン酸化に対する抗ＩＮＳＲ調節抗体の作用
ＩＮＳＲは、インスリン結合の後に自己リン酸化を経て、続いてインスリン受容体基質（ＩＲＳ）ファミリーメンバーのＳｈｃ及びＧａｂ１などの細胞内タンパク質のリン酸化を触媒するチロシンキナーゼである。これらのタンパク質の各々は、ＰＩ（３）Ｋ／ＡＫＴ及びＭＡＰキナーゼ（ＭＡＰＫ）経路を含む種々のシグナル伝達経路の活性化をもたらす下流シグナル伝達分子の動員のためのドッキング部位として機能する。これらの経路は、最終的に、細胞成長及び分化、遺伝子発現、グリコーゲン、タンパク質及び脂質合成、ならびにグルコース代謝を調節するために調整される。
【０３２５】
ＩＮＳ／ＩＮＳＲ複合体を介したシグナル伝達に対する試験抗体の作用は、抗体がＩＮＳＲシグナル伝達経路に特異的であるＡＫＴ及びＭＡＰＫ（ＥＲＫ１／２）などの特定の細胞内タンパク質のインスリン誘発性セリンまたはチロシンリン酸化を増大する能力を評価することによって測定され得る。これらのタンパク質のリン酸化は、電気化学発光、ウエスタンブロッティング、ＥＬＩＳＡ、及び当該技術分野において既知の他の技法により、測定及び定量化され得る。
【０３２６】
ヒトＩＮＳＲのＢ形態を発現するように操作されたＣＨＯＫ１細胞がシグナル伝達アッセイに使用された。これらの細胞は、ＣＨＯ細胞用のＥＸ－ＣＥＬＬ　３０２無血清培地（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）、４ｍＭ　Ｌ－グルタミン、

及び０．４ｍｇ／ｍＬのＧＥＮＥＴＩＣＩＮ（登録商標）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）を含有する成長培地中で維持された。親ＣＨＯＫ１細胞は対照として使用され、ＧＥＮＥＴＩＣＩＮ（登録商標）なしの成長培地中で維持された。

【０３２７】

アッセイの前日に、細胞をＰＢＳで洗浄し、ＲＰＭＩ　１６４０（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、２ｍＭ　Ｌ－グルタミン、０．４ｍｇ／ｍＬのＧＥＮＥＴＩＣＩＮ（登録商標）、及び０．５％ＢＳＡを含有する「飢餓培地」中に1×10^{6}細胞／ｍＬで再懸濁し、３７℃、５％CO_2インキュベータにおいて１６～２０時間インキュベートした。親ＣＨＯＫ１細胞を、ＧＥＮＥＴＩＣＩＮ（登録商標）なしで、「飢餓培地」中でインキュベートした。翌日、細胞を０．５％ＢＳＡと共にＰＢＳに再懸濁し、1×10^{5}細胞を９６ウェルプレートのウェルに添加した。インスリンの添加１５分前に、試験抗体を５００ｎＭの飽和濃度で添加した。次に、組換えヒトインスリン（ｒｈＩｎｓｕｌｉｎ，Ｓｉｇｍａ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）を、０．０００８～２００ｎＭの範囲の７つの濃度で添加した。インスリンの存在下で、３７℃、５％　CO_2インキュベータにおいて、さらに１０分間インキュベートした後、処理した細胞を遠心分離し、培地をデカントし、４℃で振盪しながら１時間、２０ｍＭトリス－ＨＣｌ（ｐＨ７．５）、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、１ｍＭ　ＥＤＴＡ、１ｍＭ　ＥＧＴＡ、１％ＴｒｉｔｏｎＸ－１００、１０ｍＭ　ＮａＦ、ホスファターゼ阻害剤カクテル１及び２（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、ならびに完全ミニプロテアーゼ阻害剤（Ｒｏｃｈｅ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｉｎｄｉａｎａｐｏｌｉｓ，ＩＮ）を含有する緩衝液に細胞を溶解した。４８５　ｘ　ｇで３分間遠心分離することにより、可溶化液を清澄化した。ＭｅｓｏＳｃａｌｅ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ多重スポットアッセイシステム（Ｍｅｓｏ　Ｓｃａｌｅ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ，Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ，ＭＤ）を使用する電気化学発光ＥＬＩＳＡを使用して、可溶化液内に存在するリン酸化ＡＫＴの量を定量化した。４－パラメータロジスティックス方程式からＥＣ５０値を計算するために、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ（登録商標）（ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ　Ｉｎｃ．，Ｌａ　Ｊｏｌｌａ，ＣＡ）ソフトウェアを使用してデータを分析した。

【０３２８】

図３は、ＩｇＧ抗体またはＦａｂ断片のいずれかとしてのＸＰＡ．１５．２４７及びＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８抗体のｐＡＫＴアッセイの結果を示す。ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　ＩｇＧ抗体及びＦａｂの両方は、インスリン媒介ＡＫＴリン酸化の顕著に増強された阻害を示した。ＸＰＡ．１５．２４７抗体及びＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８抗体またはＦａｂの効力は、インスリンのＥＣ８０及びＥＣ６５濃度で比較された。インスリンのＥＣ８０濃度で、ＥＣ５０は、ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８抗体の２．０、及びＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂの７．７と比較して、ＸＰＡ．１５．２４７抗体に関して３４．７ｎＭであり、親抗体と比較して、ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８抗体に関して１７倍超高い効力、及びＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂに関して４倍超高い効力を示した（図３Ｂ）。ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８抗体及びＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂも、カニクイザル及びラットＩＮＳＲオルソログで試験したとき、親抗体に対して改善された機能活性を呈した。

【０３２９】

実施例４

スルホニル尿素誘発性低血糖に対する抗ＩＮＳＲ調節抗体の作用

グリベンクラミド誘発性低血糖に対するＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　ＩｇＧ及びＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂの作用を評価した。７週齢のウィスターラットの雄を２．５時間絶食させた後、ビヒクル１（ＰＯ）または１０ｍｇ／ｋｇのグリベンクラミド（ＰＯ）を投薬した。６０分後、動物にビヒクル２（ＩＶ）、３０ｍｇ／ｋｇのＸＰＡ．１５．２４７抗体（ＩＶ）、３ｍｇ／ｋｇ、もしくは１０ｍｇ／ｋｇのＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　ＩｇＧ、または３ｍｇ／ｋｇもしくは１０ｍｇ／ｋｇのＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂを投薬した。血中グルコースは、最初の投薬前

、ならびに投薬３０分後、６０分後、９０分後、１２０分後、１８０分後、２４０分後、６時間後、８時間後、２４時間後、及び４８時間後に読まれた。

【０３３０】

グリベンクラミドは血中グルコースの緩徐かつ安定した減少を誘発し、これは３０ｍｇ／ｋｇのＸＰＡ．１５．２４７抗体（図４Ａ）で反転され、有効な閾値用量であるように思えた。比較すると、ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　ＩｇＧ及びＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａは、顕著な用量依存様式で、３ｍｇ／ｋｇ及び１０ｍｇ／ｋｇの両用量で、低血糖を効果的に反転した（図４Ｂ及びＣ）。ＸＰＡ．１５．２４７及びＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　ＩｇＧと比較すると、ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａは、作用開始が速く（約３０分）、持続期間が短い（図４Ｄ）。

【０３３１】

実施例５

インスリン誘発性低血糖に対する抗ＩＮＳＲ調節抗体の作用

インスリン誘発性低血糖に対するＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａの作用も評価された。７週齢の雄のスプラーグドーリーラットを絶食させた後、１Ｕ／ｋｇでインスリン（Ｈｕｍｕｌｉｎ　Ｒ，Ｅｌｉ　Ｌｉｌｌｙ，Ｉｎｄｉａｎａｐｏｌｉｓ，ＩＮ）を皮下投薬した。２０分後、動物に３０ｍｇ／ｋｇのＸＰＡ．１５．２４７抗体（ＩＶ）、または３ｍｇ／ｋｇもしくは１０ｍｇ／ｋｇのＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂ（ＩＶ）を投薬した。血中グルコースは、インスリン投与後の最初の９０分間にわたって１０分毎に、そして最大４時間、３０分毎に測定された。

【０３３２】

インスリンは血中グルコースの迅速な減少を誘発した。ＸＰＡ．１５．２４７抗体は、３０ｍｇ／ｋｇで、インスリン誘発性低血糖を効果的に反転させた（図５Ａ）。比較すると、ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａは、３ｍｇ／ｋｇ及び１０ｍｇ／ｋｇの両用量で低血糖を効果的に反転させ（図５Ｂ）、これは、１０ｍｇ／ｋｇ投薬後１０分以内、及び３ｍｇ／ｋｇの投薬後２０分以内の迅速な開始であった。３ｍｇ／ｋｇ～１０ｍｇ／ｋｇのＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂ処置群で顕著な用量依存有効性が観察された。全体的に、ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂは両ラット株において類似する動態を有する。ＸＰＡ．１５．２４７親抗体と比較して、ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　ＩｇＧはより高い応力を有し、ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂはより速い作用開始及びより短い持続期間を有した。

【０３３３】

実施例６

追加の結合アッセイ

ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８のミニブタインスリン受容体への結合能力を決定するために、さらなる結合アッセイを実行した。ＸＰＡ．１５．２４７の２つの追加の変異型である１５．２４７．２．０１１及び１５．２４７．２．０１４も、種々のインスリン受容体オルソログを使用して結合アッセイにおいて試験された。結合アッセイは、ヤギ抗ヒトカッパフルオロセインイソチオシアネート二次抗体（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ）を使用してＦａｂを検出したことを除き、実施例２に記載されるように行われた。この表のＩｇＧを検査する実験のための二次抗体は、実施例２／図１と同じ抗ヒトＩｇＧ抗体（ヤギ抗ヒトＩｇＧアロフィコシアニン（Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｉｍｍｕｎｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，Ｗｅｓｔ　Ｇｒｏｖｅ，ＰＡ）であった。

【０３３４】

表４は、インスリン受容体オルソログに結合する、ＸＰＡ．１５．２４７、ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８、及び２つの追加の変異型抗体のｎＭでのＥＣ５０値を示す。

【０３３５】

【表４】

Fab	ヒト	ラット	カニクイザル	ミニブタ
XPA.15.247	34.8	11.8	93.0	39.8
XPA.15.247.2.018	1.6	1.9	21.9	2.0
XPA.15.247.2.011	2.7	1.9	17.2	5.8
XPA.15.247.2.014	1.8	1.7	10.2	2.9
IgG				
XPA.15.247	8.8	9.7	13.6	12.0
XPA.15.247.2.018	0.3	0.4	1.4	0.5
XPA.15.247.2.011	1.0	1.3	3.3	1.5
XPA.15.247.2.014	0.7	0.7	1.1	0.9

【０３３６】

実施例７

ＡＫＴのＩＮＳＲオルソログ誘発リン酸化に対する抗ＩＮＳＲ調節抗体の作用

種々のＩＮＳＲオルソログ、例えば、ラット、サル、及びミニブタＩＮＳＲを発現するように操作されたＣＨＯＫ１細胞を使用して、ＸＰＡ．１５．２４７及び３つの変異型抗体を、実施例３に記載されるｐＡＫＴシグナル伝達アッセイにおいて試験した。結果を表５に示す。

【０３３７】

【表５】

EC50 (nM)				
Fab	ヒト	ラット	カニクイザル	ミニブタ
XPA.15.247	44.0	46.6	82.4	20.7
XPA.15.247.2.018	3.3	4.2	2.8	2.5
XPA.15.247.2.011	5.0	7.8	6.2	4.4
XPA.15.247.2.014	9.6	~15.63	~15.09	8.4
IgG				
XPA.15.247	34.5	46.2	30.7	20.7
XPA.15.247.2.018	0.3	0.4	0.2	0.3
XPA.15.247.2.011	1.5	3.1	1.3	1.7
XPA.15.247.2.014	2.1	4.2	1.7	2.3

【０３３８】

実施例８

インスリンの存在下及び不在下でのＸＰＡ．１５．２４７変異型ＦａｂのヒトＩＮＳＲへの結合の動態分析

抗体結合の動態分析は、ＰｒｏｔｅＯｎ（商標）ＸＰＲ３６（ＢｉｏＲａｄ，Ｈｅｒｃｕｌｅｓ，ＣＡ）を使用して、表面プラズモン共鳴を使用して行われた。インスリン受容体のＢアイソフォームを発現するＣＨＯ細胞からの、トリス溶解緩衝液（１５０ｍＭ ＮａＣｌ、２０ｍＭトリスｐＨ７．５、１ｍＭ ＥＤＴＡ、１ｍＭ ＥＧＴＡ、及びプロテアーゼ阻害剤カクテル（Ｒｏｃｈｅ，＃０５８９２７９１００１）で補足された１％Ｔｒｉｔｏｎ（商標）Ｘ－１００）を使用して可溶化されたヒトＩＮＳＲを、固定化モノクローナル抗ＩＮＳＲβサブユニット抗体（クローンＣＴ－３，Ｆｉｓｈｅｒ，＃ＭＳ－６３６－ＰＡＢＸ）を介してセンサ表面上に捕捉した。３．７～３００ｎＭの範囲の増加濃度のＦａｂを、捕捉した受容体上に注入して、会合及び解離動態を得た。結果を表６に示す。

【０３３９】

【表６】

－ インスリン			
Fab	オン速度 (1/Ms)	オフ速度 (1/s)	親和性 (nM)
XPA.15.247	3.74E+04	2.11E-03	56 ± 3.5
XPA.15.247.2.018	9.48E+04	6.55E-04	6.9 ±0.4
XPA.15.247.2.011	7.04E+04	7.05E-04	10 ± 0.3
XPA.15.247.2.014	1.37E+05	7.05E-04	3.7 ± 0.2
＋ インスリン			
XPA.15.247	2.61E+04	2.41E-03	92 ± 13
XPA.15.247.2.018	6.84E+04	1.18E-03	17 ±1.0
XPA.15.247.2.011	6.62E+04	1.08E-03	16 ± 0.2
XPA.15.247.2.014	1.09E+05	9.98E-04	9.2 ± 0.2

【０３４０】

実施例９

ＸＰＡ．１５．２４７変異型ＦａｂのｐＩ測定

製造業者の指示に従い、Ｐｈａｒｍａｌｙｔｅ（登録商標）３－１０キャリア両性電解質（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を使用して、Ｆａｂ試料を調製した。ｃＩＥＦ　Ｐｈａｒｍａｌｙｔｅ　Ｂａｓｉｃ　Ｓｅｐａｒａｔｉｏｎを使用して試料を分離し、合成ペプチドｐＩマーカー（９．７７、９．５、及び６．６１）またはＢｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ　ｐＩマーカー１０．０、７．０、または６．７）と比較した。３２　Ｋａｒａｔソフトウェアにおける定性分析を使用して、試料の実験ｐＩ値を計算した。ＸＰＡ．１５．２４７変異型Ｆａｂの理論（ナイーブ）及び実験（ＣＥ　ＩＥＦ）ｐＩ値を表７に示す。

【０３４１】

【表７】

Fab (またはIgG?)	ナイーブpI 値	実験 pI 値
XPA.15.247	8.41	7.71
XPA.15.247.2.018	8.63	9.45
XPA.15.247.2.011	8.63	9.47
XPA.15.247.2.014	8.74	9.62

【０３４２】

実施例１０

ＸＰＡ．１５．２４７変異型Ｆａｂのヘパリンへの結合

低ｐＩのタンパク質は一般的に、より低い非特異的タンパク質結合を呈し、したがって、身体からのクリアランスがあまり非特異的ではない。この低減した非特異的結合は、インビボにおける分子の半減期に対して正の作用を有し得る。例えば、Ｄａｔｔａ－Ｍａｎｎａｎら（ｍＡｂｓ，７：４８３－４９３，２０１５）を参照されたく、これは、より低いｐＩのタンパク質がヘパリンにあまり結合せず、インビボにおけるクリアランスがあまり非特異的ではないことを記載するが、非特異的結合を低減するための抗体の電荷及びｐＩの変更が低減した標的への結合などの抗体の他の特性に影響を与える可能性があることに注意する。

【０３４３】
本明細書に記載される変異型Ｆａｂの比較的高いｐＩ値は、それらがヘパリンなどのタンパク質への高レベルの非特異的結合を有する可能性を示した。したがって、ヘパリン結合のＥＬＩＳＡアッセイが展開された。ポリ－Ｄ－リジンプレートを２５ｕｇ／ｍｌのヘパリン（Ｓｉｇｍａ）でコーティングし、カゼイン遮断薬（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）で遮断した。試験タンパク質結合を３７℃で２時間実行した。ヤギ抗ヒトＦａｂ（Ｃａｌｔａｇ）アッセイ緩衝液に１：２０００に希釈された）、続いてＨＲＰにコンジュゲートされたロバ抗ヤギ抗体（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）でＦａｂを検出した。ヘパリンを結合することが知られているため、組換えＩＬ－８（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）を陽性対照として使用した。ＩＬ－８は、ビオチン化された抗ＩＬ－８抗体（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）、続いて、アッセイ緩衝液に１：５０００に希釈されたストレプトアビジンＨＲＰ（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈ）で検出された。ＥＬＩＳＡは、１００μＬのＴＭＢ（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ）で展開され、５０μＬの２Ｍ硫酸で停止された。ＳｐｅｃｔｒａＭａｘ（登録商標）Ｐｌｕｓマイクロプレートリーダー（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ）で、４５０ｎｍでプレートを読み取り、対照ポリ－Ｄ－リジンプレートからの背景読み取りを差し引いた。結果を表８及び図７に示す。

【０３４４】
意外にも、その比較的高いｐＩにも関わらず、ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８は、１５．２４７．２．０１１及び１５．２４７．２．０１４とは対照的に、ヘパリンに結合しなかった。

【０３４５】
【表８】

IL-8 ug/ml	平均 A450 IL-8	Fab ug/ml	平均 A450 .018	平均 A450 .011	平均 A450 .014	平均 A450 低 pI Fab
1.00	1.03	100	0.09	0.88	1.26	0.03
0.50	0.61	50	0.02	0.32	0.41	-0.01
0.25	0.23	25	0.01	0.21	0.24	0.00
0.125	0.09	12.5	0.01	0.10	0.16	0.00
0.063	-0.01	6.25	0.00	0.05	0.07	0.00
0.03125	0.01	3.125	0.00	0.02	0.03	-0.01
0.015625	-0.05	1.56	0.00	0.01	0.02	0.00
0.000	0.05	0	0.00	0.00	0.00	-0.01

【０３４６】
実施例１１
重度のインスリン誘発性低血糖に対する抗ＩＮＳＲ調節抗体の作用
重度のインスリン誘発性低血糖に対するＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂの作用を評価するために、Ｆａｂがインスリン投薬の２０分後ではなく、インスリン投薬の４５分後に追加されたことを除き、実施例５に記載されるように、ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂをスプラーグドーリーラットにおいて評価した。得られた結果を表８に示す。１０ｍｇ／ｋｇのＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂは、インスリン誘発性低血糖を効果的に（２０分未満で）反転させた。作用の持続期間は、数時間にわたった。これは、初期に投与されたとき、ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂがインスリン誘導性低血糖を反転させるだけでなく、血中グルコースが既に５０ｍｇ／ｄＬを下回るときでも、直ちに重度の低血糖をうまく救済することができることを示す。

【０３４７】
実施例１２
ラットにおけるＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂの薬物動態
７週齢の雄のスプラーグドーリーラットを２．５時間絶食させた後、コハク酸緩衝液（

５ｍＭ　ＮａＳｕｃｃｉｎａｔｅ、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ６．０）において製剤化したＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂを静脈内投与した。ＰＫ分析の試料を投薬の前（投薬前）、そして投薬５分後、１５分後、３０分後、１時間後、２時間後、４時間後、８時間後、２４時間後、及び４８時間後に採取した。結果を表９ならびに図９Ａ及び９Ｂに示す。ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂの静脈内投与後、一般的に、最大濃度（３ｍｇ／ｋｇ群では１４３μｇ／ｍｌ及び１０ｍｇ／ｋｇ群では３６０μｇ／ｍｌ）が最初の試料採取時間の投薬５分後に観察された（表９）。その後血清濃度は降下し、平均半減期は、１０ｍｇ／ｋｇ群では４．９時間、そして３ｍｇ／ｋｇ群では１．４時間であった。

【０３４８】

【表９】

群	N	Cmax (ug/ml)	AUC最終 (ug*時間/ml)	Tmax (時間)	T1/2 (時間)	CL (ml/kg/時間)	Vss (ml/kg)
3mg/kg	3	143 (24)	63 (10)	~0.1	1.4 (0.3)	48 (7)	26 (5)
10 mg/kg	3	360 (127)	175 (43)	~0.1	4.9 (0.5)	59 (15)	82 (67)

【０３４９】

実施例１３

ミニブタにおけるＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂの薬物動態

インビボでのＸＭｅｔ　Ｆａｂ変異型の作用を試験するために、インスリン誘導性低血糖ミニブタモデルを使用した。４匹の雄のゲッチンゲンミニブタ（約１０ｋｇ）を２．５時間絶食させた（６：００ａｍに給餌し、餌を取り除いた）。ｔ０で、静脈内、筋肉内、または皮下のいずれかで、１０ｍｇ／ｋｇのＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂを投与した。ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂは、リン酸ナトリウム緩衝液に製剤化された。薬物動態の試料は以下の時間点で回収された：投薬前、投薬５分後、１０分後、３０分後、６０分後、１２０分後、２４０分、８時間後（食事を戻す）、及び２４時間後。

【０３５０】

図１０Ａ～１０Ｃは、３つ全ての経路の血清薬物濃度の動態を示す。静脈内投与では、ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂは、最初の試料採取時間の投薬５分後に最大濃度に達し、３．３時間の平均半減期であった。筋肉内投与後、ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂの吸収は緩徐であり、最大濃度（平均２４．１μｇ／ｍＬ）が投薬２．０時間後に観察された。Ｃｍａｘに達した後、その後血清濃度は降下し、平均半減期は５．６時間であり、生物学的利用能は６６．９％であった。ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂの皮下投与後、平均最大濃度は１５．９μｇ／ｍＬであり、３つの経路の中で最も低く、投薬１．７時間後に観察され、平均半減期は１０．５時間であり、生物学的利用能は６５．５％であった。結論として、ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　ＦａｂのＩＶ投与と比較して、ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　ＦａｂのＩＭ及びＳＣ投与は遅いT_{max}，及び低いC_{max}をもたらした。

【０３５１】

正常なミニブタにおけるＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂの作用は、血中グルコースの変化により測定された（図１０Ｃ）。４匹の雄のゲッチンゲンミニブタ（約１

０ｋｇ）を２．５時間絶食させた。ｔ０で、静脈内、筋肉内、または皮下のいずれかで、１０ｍｇ／ｋｇのＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂを投与した。静脈内及び筋肉内経路の血中グルコースを以下の時間点：投薬前、投薬５分後、１０分後、３０分後、６０分後、１２０分後、２４０分後、８時間後、及び２４時間後、皮下経路に関しては、以下の時間点：投薬前、投薬１５分後、３０分後、１時間後、１．５時間後、２時間後、２．５時間後、３時間後、３．５時間後、４時間後、４．５時間後、５時間後、５．５時間後、６時間後、及び７時間後に測定した。図１０Ｃに示されるように、ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂの静脈内投与は最も血中グルコースを上昇させ、最大３５０ｍｇ／ｄＬであり、皮下投与は血中グルコースの上昇が最も小さく、１５０ｍｇ／ｄＬのみであり、筋肉内投与は中間の２５０ｍｇ／ｄＬであった。ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂの作用はミニブタにおいて、約８時間にわたった。これは、ＩＶ経路が最も高いＣｍａｘを有し、ＳＣ経路が最も低いＣｍａｘを有するため、ＰＫ結果と密接に相関する。

【０３５２】

実施例１４

ミニブタにおけるヒューマリンＲ誘発性低血糖におけるＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂの作用

ミニブタ実験は、長期作用インスリン（Ｈｕｍｉｌｉｎ　Ｒ，Ｅｌｉ　Ｌｉｌｌｙ，Ｉｎｄｉａｎａｐｏｌｉｓ，ＩＮ）の投与後のＦａｂ変異型の作用を評価するために実行された。４匹の雄のゲッチンゲンミニブタ（約１０ｋｇ）を２．５時間絶食させた（６：００ａｍに給餌し、餌を取り除いた）。ブタ７０８３、７０８４、７０８６には０．１５Ｕ／ｋｇ、そしてブタ７０８５には０．１Ｕ／ｋｇのインスリン（ヒューマリンＲ）を皮下（ｓ．ｃ．）投与した。インスリン投薬２０分後にＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂが筋肉内投与された。血中グルコースレベルは以下の時間点で測定された：投薬前、投薬１０分後、２０分後、３０分後、４０分後、５０分後、６０分後、７５分後、９０分後、１０５分後、１２０分後、１５０分後、１８０分後、２１０分後、２４０分後、２７０分後、６時間後（食事を戻す）、及び２４時間後。ミニブタの救済は、血中グルコースレベルが４０ｍｇ／ｄＬ以下であったときに実行された。救済は、ブタにマシュマロを与えることにより行われた。血中グルコースを増加させるために２個以上のマシュマロが必要な場合、別個の救済事象と見なされた。結果を表１０に示す。（＊４０ｍｇ／ｄＬ以下の血中グルコース読み取り。）

【０３５３】

【表１０】

ミニブタ	ヒューマリンR [SC] t=0 分	XPA.15.247.2.018-Fab [IM] t=20 分	救済が必要であった* （マシュマロ）
7083	0.15 IU/kg	N/A	なし
		10mg/kg	なし
7084	0.15 IU/kg	N/A	なし
		10mg/kg	なし
7085	0.1 IU/kg	N/A	30 分 ,40 分
		10mg/kg	なし
7086	0.15 IU/kg	N/A	30 分
		10mg/kg	なし

【０３５４】

これらの結果は、ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂがヒューマリンにより生じた血中グルコースの減少を容易に鈍らせ、血中グルコースが４０ｍｇ／ｄＬを下回って降下するのを防止することを示唆する。

【０３５５】
実施例１５
異なる投与経路を介したミニブタにおけるベツリン誘発性低血糖の救済におけるＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂの作用
４匹の雄のゲッチンゲンミニブタ（約１０ｋｇ）を２．５時間絶食させた（６：００ａｍに給餌し、餌を取り除いた）。０．５ＩＵ／ｋｇのベツリン（精製されたブタインスリン）またはビヒクル対照のいずれかをｔ０で皮下（ｓ．ｃ．）投与した。血中グルコースレベルを種々の時間点で測定した（ベツリン群に関しては、最初の２時間は、３０分毎、その後、２時間～５時間は２０分毎、その後、５．５時間、６時間、６．５時間、７時間、及び８時間、ビヒクル対照群に関しては、最初の５時間は２０分毎、その後、５．５時間、６時間、６．５時間、７時間、及び８時間）。
【０３５６】
ベツリンは血中グルコースを迅速に低下させ、ｔ４５分で５０ｍｇ／ｄＬに達し、そのレベルを約６～７時間維持した。ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂは、１０ｍｇ／ｋｇまたは２ｍｇ／ｋｇ用量のいずれかで、ｔ４５分で静脈内投与された。血中グルコースは、ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂ投与後の最初の２つの時間点では１５分毎に、そしてｔ６時間まで３０分毎、及び７時間に測定された。ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂは、両用量で１５分以内にベツリン誘発性低血糖を効果的に反転させ、顕著な用量依存作用を示した（図１１Ａ）。２ｍｇ／ｋｇのＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂは有効であるだけでなく、６時間超にわたって、ミニブタにおいて正常血糖に血中グルコースを安定させた。これは、適切な投薬量でのＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂの静脈内投与が顕著な変動をもたらすことなく血中グルコースを安定させることができることを示す。
【０３５７】
５ｍｇ／ｋｇのＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂを、ベツリン後ｔ３５分で、筋肉内注射を介して投与した。血中グルコースは、ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂ投与後の最初の２つの時間点では１５分毎に、そしてｔ６時間まで３０分毎、及び７時間に測定された。５ｍｇ／ｋｇのＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂは、効果的に、１５分以内に血中グルコースの降下を示し、投与後約３０分以内に低血糖の反転を開始させた（図１１Ｂ）。作用は数時間にわたって持続した。４時間後にわずかな血中グルコースの上昇があったが、１５０ｍｇ／ｄＬを超えなかった。これは、ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂが筋肉内投与を介してインスリンによって生じた血中グルコース降下を遅らせ、高血糖を生じさせることなく重度の低血糖を反転させるのに十分な生物学的利用能を有することを示す。筋肉内注射を介したＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂの成功は、医療従事者及び非医療関係者の両方によって容易に使用され得る経路を提供する。
【０３５８】
ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂの作用もこのモデルにおいて皮下注射を介して試験された。９ｍｇ／ｋｇのＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂを、ベツリン後ｔ３０分で、皮下投与した。血中グルコースは、ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂ投与後の最初の２つの時間点では１５分毎に、そしてｔ６時間まで３０分毎、及び７時間に測定された。図１１Ｃに示されるように、皮下投与を介したＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂは、インスリンにより生じた血中グルコース降下を鈍らせるが、投与後３０～６０分以内のベツリン単独対照群に対する血中グルコースを上昇させたのみであった。
【０３５９】
実施例１６
皮下投与経路を介したミニブタにおけるベツリン誘発性低血糖の予防におけるＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂの作用
ミニブタにおけるベツリン誘発性低血糖の持続期間及び重症度は、ヒトにおける夜間低

血糖の良好なモデルを表す。したがって、夜間低血糖の予防におけるＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂの作用を評価するためにも使用された。４匹の雄のゲッチンゲンミニブタ（約１０ｋｇ）を２．５時間絶食させた（６：００ａｍに給餌し、餌を取り除いた）。９ｍｇ／ｋｇのＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂを、ｔ９０分で、皮下投与した。０．５ＩＵ／ｋｇのベツリンをｔ０で皮下（ｓ．ｃ．）投与した。血中グルコースは、ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂ投与後の最初の２つの時間点では１５分毎に、そしてｔ６時間まで３０分毎、及び７時間に測定された。図１２に示されるように、皮下投与を介したＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂは、インスリン誘発性低血糖を良好に予防する。試験中のいずれの時間点でも、ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂ投与後に大幅な血中グルコースの上昇はなかった。これは、ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂの皮下投与が低血糖を生じるリスクなしで夜間低血糖を効果的に予防することができることを示す。

【０３６０】

実施例１７

正常なラットにおける反復投薬でのＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　ＩｇＧの作用

ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　ＩｇＧの反復投与の作用を試験するために、３週間にわたって１週間に１回、１ｍｇ／ｋｇ、３ｍｇ／ｋｇ、及び１０ｍｇ／ｋｇのＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　ＩｇＧを正常なスプラーグドーリーラットに静脈内投与した。血清試料を回収し、血中グルコースレベルを８時間の絶食条件下または給餌条件下のいずれかの種々の時間点で測定した。絶食血清試料及びグルコース読み取りは、投薬前、投薬後４日目、８日目、１１日目、１５日目、及び１８日目に収集した（８日目及び１５日目の試料は２回目の投薬前及び３回目の投薬前であった）。給餌血清試料及びグルコース読み取りは、４時間、８時間、２日目、４日目＋４時間及び４日目＋１０時間、５日目、８日目＋６時間、９日目、１１日目＋６時間、１２日目、１５日目＋４時間、１５日目＋１０時間、１６日目、１７日目、１８日目＋４時間、１８日目＋１０時間、ならびに１９日目に収集された。１０ｍｇ／ｋｇのＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　ＩｇＧは、大半の時間点の絶食条件下（図１３Ａ）で顕著な高血糖を引き起こした。改善されたグルコース上昇有効性もＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　ＩｇＧの多用量投与時に観察された。ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　ＩｇＧは、１０ｍｇ／ｋｇの給餌下でさらにより重度の高血糖を引き起こした（図１３Ｂ）。しかしながら、１ｍｇ／ｋｇ及び３ｍｇ／ｋｇ群の血中グルコースレベルは、絶食条件下で大幅に上昇せず、給餌条件下の３ｍｇ／ｋｇ群で一貫性のないわずかな上昇があった（図１３Ａ及びＢ）。

【０３６１】

全時間点でのｃ－ペプチド及びインスリンレベルに関して血清試料を分析した。ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　ＩｇＧは、絶食条件下、用量依存様式で、特にグルコースが上昇した用量レベルでｃ－ペプチドを上昇させ（図１４Ａ）、正常な生理学的応答と一致した。しかしながら、類似する傾向は給餌条件下では観察されなかった。Ｃ－ペプチドレベルは、最初の投薬後ｔ１０時間で初期のスパイクを示し、その後、両用量群に関して、安定したレベル（約５～６×10^{3}ｐＭ）で維持された（図１４Ｂ）。

【０３６２】

インスリンレベルに関して、ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　ＩｇＧも、絶食条件下で、用量依存様式で内因性インスリンレベルを上昇させた（図１４Ｃ）。インスリンレベルのピーク濃度は、１０ｍｇ／ｋｇ用量で、ｃ－ペプチドのピーク（図１４Ａ及びＣ）と一致した。しかしながら、給餌条件下で、インスリンレベルは、２及び３週目で、１０ｍｇ／ｋｇと３ｍｇ／ｋｇ群との間でほぼ重なる（図１４Ｄ）。１０ｍｇ／ｋｇ群でインスリンレベルの大幅な上昇が観察され、これはｃ－ペプチドレベルと相関した（図１４Ｂ）。

【０３６３】

３ｍｇ／ｋｇでの血中グルコースにおける変化は最小であるにも関わらず、ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　ＩｇＧは、閾値グルコース上昇を示唆し、敏感な拮抗調節イン

スリン分泌を伴うｃ－ペプチド及び内因性インスリンレベルの両方を大幅に上昇させた。

【０３６４】

試験中の体重変化を記録し、試験の最後に臓器（肝臓及び腎臓）を回収した。ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　ＩｇＧは、１０ｍｇ／ｋｇ群において最初の１週間にいくらかの体重喪失をもたらした（図１５Ａ）。その後、動物は２週目では体重を維持し、３週目の間に残りの群と類似する速度で体重が増加し始めた（図１５Ａ）。３ｍｇ／ｋｇのＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　ＩｇＧは、１ｍｇ／ｋｇ群及びビヒクル対照群と比較して、体重増加の傾向をあまり示さなかった。ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　ＩｇＧの作用機構に基づき、肝臓はその豊富なインスリン受容体発現により標的臓器と見られる。大幅な重量変化は全群の肝臓において観察されなかった（図１５Ｂ）。しかしながら、研究の最後に、１０ｍｇ／ｋｇ群の腎臓の重量（図１５Ｃ）においてわずかな増加があった。したがって、１０ｍｇ／ｋｇのＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　ＩｇＧの３回の反復投薬で、初期の体重喪失が観察され、これは試験を続けるにつれて回復する傾向にあった。ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　ＩｇＧは、本試験において顕著に肝臓の重量に影響を及ぼさず、腎臓の重量においてわずかな増加をもたらしたのみであった。

【０３６５】

実施例１８

正常なラットにおける反復投薬でのＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂの作用

ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂの反復投与の作用を試験するために、３日間にわたって１日に１回、３ｍｇ／ｋｇ及び１０ｍｇ／ｋｇでそれを正常なスプラーグドーリーラットに静脈内投与した。血清試料を回収し、血中グルコースレベルを８時間の絶食条件下または給餌条件下の種々の時間点で測定した。絶食血清試料及びグルコース読み取りは、投薬前及び３日目（３回目の投薬前）に収集された。給餌血清試料及びグルコース読み取りは、１５分、１時間、３時間、及び７時間、ならびに２日目（２回目の投薬前）、３日目＋１５分、３日目＋１時間、３日目＋３時間、３日目＋７時間、及び４日目に収集された。ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂは、１０ｍｇ／ｋｇ及び３ｍｇ／ｋｇの両方の用量レベルで血中グルコースレベルを増加させ、その作用は数時間にわたった（図１６Ａ及びＢ）。ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂは、投薬２４時間後の血中グルコースレベルにおいて何の変化ももたらさず（図１６Ａ及びＢ）、またｃ－ペプチド及びインスリンのレベルも増加させなかった（図１７Ａ、Ｂ、Ｃ、及びＤ）。しかしながら、ｃ－ペプチド及びインスリンレベルの大幅な上昇が血中グルコースの上昇中に観察され（図１７Ａ、Ｂ、Ｃ、及びＤ）、これは用量依存様式であった。

【０３６６】

動物の体重の大幅な変化は、試験全体を通して観察されず、また肝臓及び腎臓の重量において何の変化も試験の最後に観察されなかった（図１８Ａ、Ｂ、及びＣ）。したがって、ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂは、１０ｍｇ／ｋｇ用量レベルでも、動物の体重、ならびに肝臓及び腎臓の重量に対する影響は最小であった。

【０３６７】

実施例１９

ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　ＩｇＧの薬物動態

ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　ＩｇＧ反復投薬試験中に収集された血清試料は、ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　ＩｇＧの薬物動態を理解するための血清薬物濃度を分析するためにも使用された。結果を表１１に示す。ＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　ＩｇＧの静脈内投与後、最大濃度は、最初の試料採取時間点の投薬５分後で観察された（１０ｍｇ／ｋｇ群では３３６．７μｇ／ｍｌ、そして３ｍｇ／ｋｇ群では１２６μｇ／ｍｌ）。その後血清濃度は降下し、平均半減期は、１０ｍｇ／ｋｇ群で３．８日、そして３ｍｇ／ｋｇ群では１．２日であった。

【０３６８】

【表１１】

	n	Cmax (ug/ml)	AUC(ug*時間/ml)	Tmax(時間)	t1/2(時間)	t1/2 (日)
10 mg/kg	3	336.7	13457.2	10	91	3.8
3 mg/kg	3	126	2862.2	10	29	1.2

【０３６９】

実施例２０

クローンＸＰＡ２４７．２．０１８重鎖可変領域の親和性成熟

ＸＰＡ１５．２４７．２．０１８重鎖可変領域は親和性成熟を経て、ｈＩＮＳＲに対するその親和性及び効力を増加させられた。重鎖の標的親和性増強（ＴＡＥ）により生成された配列変異型のライブラリは、ビオチン化ｈ－ＩＮＳＲを使用してパニングされた。ＶＨ　ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３の全ての残基を変異させた。各残基をＮＨＴ、ＶＡＡ、及びＢＧＧと交換した。これらの縮重プライマーは、システイン及びメチオニンを除き、１８の突然変異体をもたらした（米国特許第９，１０２，７１１号を参照されたい）。

【０３７０】

所望の突然変異領域は、プライマーの中央及び突然変異に隣接する両側の正確な配列の約２０塩基に保たれた。４つ全ての断片の重なるＰＣＲは、Ｈ１＋Ｈ２＋Ｈ３　ＣＤＲの組み合わせライブラリを生成するために行われた。完全長断片は、Ａｓｃ１／Ｎｏｔ１制限酵素で消化され、ｐＸＨＭＶ３１カッパファージミドベクター内にライゲーションされ、シャペロンｃｙｔＦＫＰＡを含有するＴＧ１細胞内に形質転換された。

【０３７１】

ＨＣ　ＴＡＥライブラを使用して可溶性パンニングを３回行った。１回目のファージパンニングに関して、１．３×10^{10}ｃｆｕのファージ粒子を、穏やかに回転させながら、１ｍｌのＰＢＳ緩衝液中５％脱脂粉乳（Ｍａｒｖｅｌ，Ｐｒｅｍｉｅｒ　Ｆｏｏｄｓ，ＵＫ）中で、室温で１時間遮断した。遮断したファージは、ＰＢＳ中５％乳で遮断された、ストレプトアビジンコーティングされた磁気ＤＹＮＡＢＥＡＤＳ（登録商標）Ｍ－２８０（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｄｙｎａｌ　ＡＳ，Ｏｓｌｏ，Ｎｏｒｗａｙ）に対して４５分間、２回解除された。ビオチン化された受容体を解除されたＤｙｎａｌビーズ上に捕捉して未ビオチン化受容体を除去した。ビオチン化されたｈ－ＩＮＳＲの量は、厳密性を増加させるために、連続した各回のパンニングにおいて低減された。

【０３７２】

ＫＩＮＧＦＩＳＨＥＲ９６（登録商標）システム（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ）がビーズの洗浄及びファージの溶出に使用されたにおいて、２０ＲＰＭで穏やかに回転させながら、ビオチン化されたｈ－ＩＮＳＲにより結合されたビーズと共に、解除されたファージを室温で１時間インキュベートすることにより選択を行った。受容体結合ファージをＰＢＳ－０．０５％　Ｔｗｅｅｎ、続いてＰＢＳで洗浄した。洗浄の持続期間は、選択の厳密性を増加させるために、連続した各回のパンニングにおいて増加された。加えて、１００×の冷受容体による一晩にわたる洗浄が追加された。

【０３７３】

ｈ－ＩＮＳＲ結合ファージは、１００ｍＭトリエチルアミン（ＴＥＡ）と共に室温で３０分間インキュベートし、続いて１Ｍトリス－ＨＣｌ（ｐＨ７．４）で中和することにより溶出された。OD_{600}が０．５に等しくなったときに、各回のパニングから溶出されたファージを使用して、ｃｙｔ－ＦｋｐＡシャペロン変異型を発現するＴＧ１細菌細胞を感染させた（Ｌｅｖｙ　ｅｔ　ａｌ．２０１３　Ｊ．Ｉｍｍｕｎ．Ｍｅｔｈ．３９４（１－２）：１０－２１）。ＴＧ１細胞を、３４ｕｇ／ｍｌのクロラムフェニコールで補足された　２ＹＴ培地中で成長させた。感染は３７℃で１時間行われた。細胞を回転させ、細

胞ペレットを、１００μｇ／ｍｌのカルベニシリン及び２％（ｗ／ｖ）グルコースで補足された２ＹＴ成長培地に再懸濁した。再懸濁した細胞を、１００μｇ／ｍｌのカルベニシリン、３４ｕｇ／ｍｌのクロラムフェニコール、及び２％グルコースを含有する２ＹＴ寒天プレート上で平板培養し、３０℃で一晩インキュベートした。

【０３７４】

２０の感染多重度（ＭＯＩ）で、ファージをＭ１３Ｋ０７ヘルパーファージ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ）で救済した。１回目及び２回目の選択出力クローンはＯＤ６００約０．５に成長した。１００ＲＰＭで振盪させながら、３７℃で１時間、細胞をヘルパーファージに感染させた。感染後、細胞を回転させ、シャペロンｃｙｔＦｋｐＡの発現を可能にするために、細胞ペレットを、１００μｇ／ｍｌのカルベニシリン、５０μｇ／ｍｌのカナマイシン、及び０．２％アラビノースで補足された２ＹＴ培地に再懸濁し、２５℃で一晩成長させた。２５℃で細菌培養物を一晩成長させた後、４℃で遠心分離した後にファージを採取した後、次回のパニングの入力として使用するためにＰＥＧ沈殿させた。

【０３７５】

ファージ選択から得られた濃縮を推定するために、入力及び出力ファージの量を滴定し、適切な抗生物質で補足された２ＹＴ寒天プレート上で平板培養した。

【０３７６】

周辺質抽出物（ＰＰＥ）の調製：クローンを３回目の出力から選定し、３４ｕｇ／ｍｌのクロラムフェニコール、１００μｇ／ｍｌのカルベニシリン、及び０．１％（ｗ／ｖ）グルコースで補足された２ＹＴ成長培地中で成長させた。クローンを２～３時間約ＯＤ６００－０．５に成長させ、次に、０．２％アラビノースを添加し、培養物を３０℃で成長させた。３０分後、１ｍＭの最終濃度までイソプロピルβ－Ｄ－１－チオガラクトピラノシド（ＩＰＴＧ）を添加し、２５℃で一晩インキュベートした。細胞をペレット化し、１：４希釈の７５μｌの氷冷ＰＰＢスクロース緩衝液（Ｔｅｋｎｏｖａ）及びＥＤＴＡを含まないプロテアーゼ阻害剤カクテル（Ｒｏｃｈｅ）１錠に再懸濁した。４℃で１時間インキュベートした後、試料を３０分間遠心分離し、周辺質抽出物を含有する上清を回収した。次に、ＰＰＥは、ＳＰＲ及びＦＡＣＳによりｈ－ＩＮＳＲ結合剤をスクリーニングするために使用された。

【０３７７】

Ｆａｂ周辺質抽出物の親和性ランク付け：インスリン受容体に対して増強された結合親和性を有するＦａｂ断片変異型を特定するために、直接結合表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）アプローチを使用した。

【０３７８】

ＳＰＲ分析は、２５℃で、Ｂｉａｃｏｒｅ ４０００（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）で行われた。ＳＰＲは、無標識の環境で、リアルタイムでの生体分子の相互作用を測定する。ＳＰＲ分析のために、組換えヒトインスリン受容体（Ｂ形態）ＥＣＤ（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ ＭＮ）を使用した。ＳＰＲ検出表面を調製するために、以下に詳述される再活性化ステップを含む修正されたプロトコルを用いて、標準的なアミンカップリング化学（アミンカップリングキット－ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅから使用された試薬）を使用して、ＩＮＳＲ－ＥＣＤを、シリーズＳ ＣＭ５センサチップ（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）上に共有結合により固定化した。１０μＬ／分の流量で、０．１Ｍ Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）及び０．４Ｍ １－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド（ＥＤＣ）の新しく調製された１：１溶液を１０分間注入して、チップ表面を活性化した。活性化後、１０ｍＭ酢酸ナトリウム（ｐＨ４．５）中１０μｇ／ｍＬのＩＮＳＲ－ＥＣＤを毎分１０μＬの流量で７分間注入し、約４，０００ＲＵの固定化されたタンパク質を達成した。次に、新しく混合したＥＤＣ／ＮＨＳをさらに５分間注入してセンサ表面を活性化した。これは、固定化されたタンパク質複合体をさらに安定化させるように機能する。次に、表面を１Ｍエタノール塩酸塩－ＮａＯＨ、ｐＨ８．５で７分間遮断した。固定化用の泳動緩衝液は、１０ｍＭ ＨＥＰＥ

Ｓ、１５０ｍＭ塩化ナトリウム、３ｍＭ　ＥＤＴＡ、０．０５％ポリソルベート２０（Ｔｅｋｎｏｖａ，Ｈｏｌｌｉｓｔｅｒ　ＣＡ）からなる１Ｘ　ＨＢＳ－ＥＰ＋泳動緩衝液であった。

【０３７９】

対象のＦａｂを含有する周辺質抽出物を５ｍｇ／ｍＬのＢＳＡを含有するＨＢＳ－ＥＰ＋で１：１希釈し、０．２μＭ　Ｍｉｌｌｅｘ　ＧＶフィルタプレート（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）を通して濾過し、３００秒の解離で、２４０秒間３０μＬ／分で注入した。各ＰＰＥ注入後の再生は、３Ｍ　$MgCl_2$の２回の５０秒注入を使用することにより行われた。使用された泳動緩衝液は、２．５ｍｇ／ｍＬのＢＳＡ（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ　ＭＯ）を含むＨＢＳ－ＥＰ＋であった。ＢＩＡＣＯＲＥ　４０００ソフトウェアにおける安定性初期報告点は、ＰＰＥ結合レベルを評価し、解離速度定数（k_d）を計算するために使用された。

【０３８０】

改善されたオフ速度、または改善されたオン速度を示唆する高結合応答を有するクローンが特定され、さらなる分析のために選択された。選択に使用されたk_dカットオフは、各アッセイにおける改善されたクローンの分布により、5×10^{-4}～2.3×10^{-4}（１／ｓ）の範囲であった。

【０３８１】

精製されたＦａｂ断片の親和性測定：種々の精製されたＦａｂ断片のオン速度（ｋａ）及びオフ速度（ｋｄ）定数を測定するために、ＳＰＲアプローチが実行された。

【０３８２】

ＳＰＲ分析は、２５℃で、Ｂｉａｃｏｒｅ　２０００（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）で行われた。ＳＰＲ検出表面を調製するために、ＩＮＳＲ－ＥＣＤはＣＭ５センサチップ上に共有結合により固定化され、チップは上述のように活性化された。活性化後、１０ｍＭ酢酸ナトリウム（ｐＨ４．５）中１０μｇ／ｍＬのＩＮＳＲ－ＥＣＤを毎分１０μＬの流量で２分間注入し、約１，４００ＲＵの固定化されたタンパク質を達成した。次に、上述のようにセンサ表面を再活性化し、遮断した。固定化用の泳動緩衝液は１Ｘ　ＨＢＳ－ＥＰ＋であり、動態分析は２４０秒間４０μＬ／分でＦａｂを注入し、続いて３００秒の解離により行われた。Ｆａｂは、２００ｎＭ及び４０ｎＭの少なくとも２つの濃度で注入された。各ＰＰＥ注入後の再生は、１回の３Ｍ　ＭｇCl_2の６０秒注入、続いて１回の１０ｍＭグリシン（ｐＨ２．０）の７．５秒注入を使用して行われた。緩衝液ブランク注入は、これらのデータを二重参照するために使用された（対照スポット及びブランク注入の両方は差し引かれた）。次に、これらのデータを、ＳＣＲＵＢＢＥＲ　２（ＢｉｏＬｏｇｉｃ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ，Ｃａｍｐｂｅｌｌ　Ａｕｓｔｒａｌｉａ）評価ソフトウェアを使用して１：１結合モデルで曲線当てはめして、オン速度（k_a）及びオフ速度（k_d）の動態パラメータを得た。平衡結合定数（K_D）値は、動態パラメータ（ｋｄ／ｋａ）の比率から計算された。

【０３８３】

オフ速度分析に基づいて１６のクローンを選択した。ＰＰＥスクリーニングからＸＰＡ．２４７．２．０１８親と比較して２～４倍の改善がある特定のクローンにおいて観察された。Ｒｕ結合に基づいてさらに５つのクローンを選択した。２１のクローンを未標識Ｆａｂに再形式設定した。Ｅｘｐｉ２９３細胞内へのトランスフェクションのために、親和性成熟された重鎖をＬＣ１８と対合した。

【０３８４】

親和性成熟された重鎖クローンの配列は図１９に記載される。図１９は、異なる親和性成熟されたクローンの親和性及び効力も示す。特定された親和性突然変異体は、オン及びオフ速度の両方で親のＸＰＡ．１５．２４７．２．０１８　Ｆａｂに対して改善を有した。

【０３８５】

突然変異ホットスポットの検出：さらなるスクリーニングから、重鎖ＣＤＲ１及びＣＤ

Ｒ３における突然変異ホットスポットが現れた。ＨＣＤＲ１のアミノ酸残基スレオニン２８は、最も頻繁にＫ及びＲ残基に変異され、選択されたクローンの約７７％において変異した。これらの突然変異及び頻度は、それが改善されたｋ$_{オフ}$に対して正の影響を有することを示唆する。

【０３８６】

これらの２つの残基のみを組み込むために小さいライブラリが作製され、Ｔは親残基（Ｔ、Ｋ、及びＲ）として含まれた。ＨＣＤＲ３に関して、フェニルアラニン１０３、フェニルアラニン１０５、及びチロシン１０７のアミノ酸残基は、選択されたクローンにおいて、それぞれ、１０％、２８％、及び５２％変異した。これら３つのＦＦＹ残基は、２０個全てのアミノ酸、すなわちＮＮＳに変異することができた。チロシン１０７からＲ／Ｅへの突然変異は、Ｒ／Ｅが改善されたｋ$_{オフ}$に対して正の影響を有することを示唆する。突然変異の頻度は、図２０において、Ｑ及びＫも改善に寄与し得ることを示唆する。フェニルアラニン１０５のチロシンへの突然変異は、図１９及び２０において改善されたｋ$_{オン}$を有する５つのクローンのうち４つのクローンがこの突然変異（０６８，０７２，０７５，０７９）を有し、この突然変異（０８４）を欠くクローンがｋ$_{オン}$において不十分な改善を有することに基づき、改善されたｋ$_{オン}$、と強い相関を有する。トリプトファンもこの位置で観察され、この残基からも改善された親和性を示唆する。位置１０３は、重く変異されないが、観察された突然変異の頻度に基づき、１０７、１０５、及び１０３が標的との相互作用の位置である可能性がある。

【０３８７】

突然変異はこれらのホットスポットで好まれるため、新しいライブラリは、これら全ての突然変異を組み合わせるように設計された。これらの突然変異のうちの２つ以上の組み合わせがおそらく相乗効果を示す。

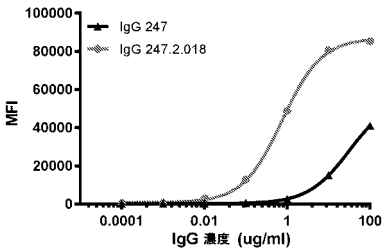
【０３８８】

重要なことには、ＨＣＤＲ２は、ＣＤＲ２につき最大１つの突然変異を有するＴＡＥライブラリとして保持された。突然変異の頻度表は、ＣＤＲ２にわたって顕著な突然変異を示すが、結合への寄与は明らかではない。しかしながら、図１９の突然変異の頻度は、何のアミノ酸が選択された抗体のより高い親和性プール内の特定の位置内で許容されるかを示す。

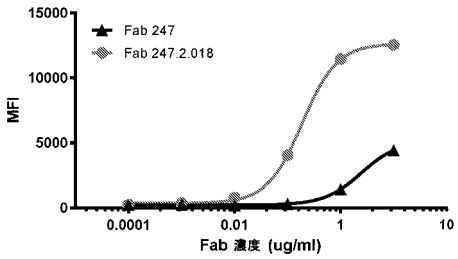
【０３８９】

上記の図示的な実施例に記載されるように、本発明において多くの修正及び変形が当業者に生じると予想される。したがって、添付の特許請求の範囲に記載するようなかかる制限のみが本発明に課されるべきである。

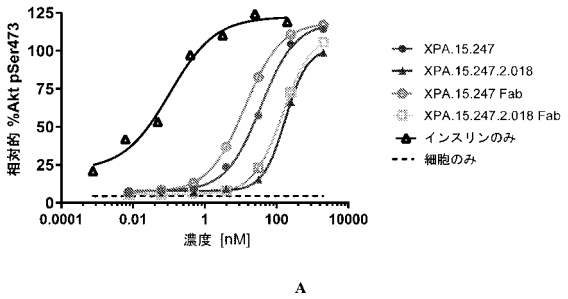
【図１】



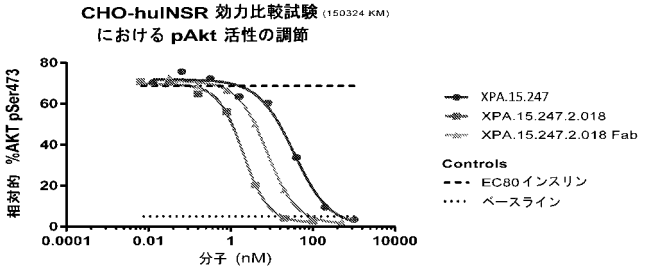
【図２】



【図３】

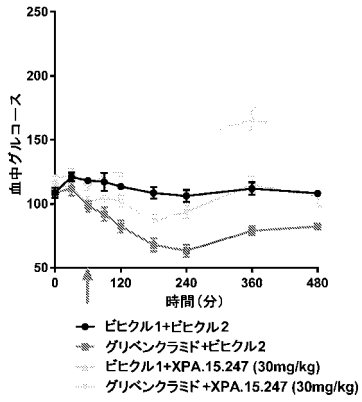


A

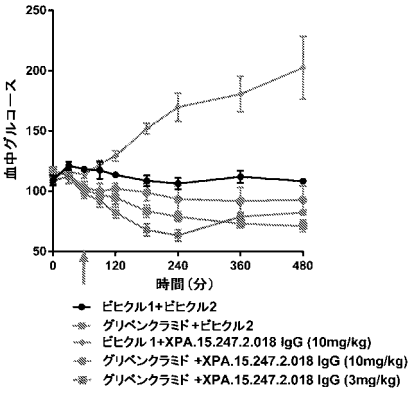


B

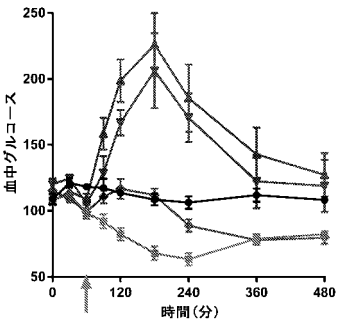
【図４Ａ】



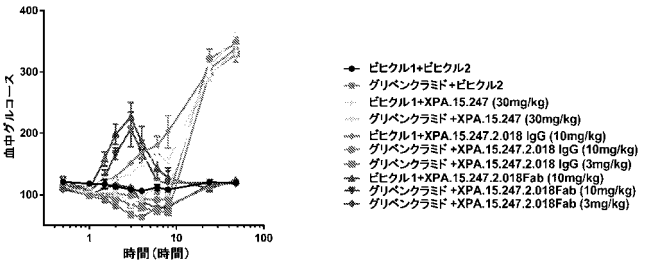
【図４Ｂ】



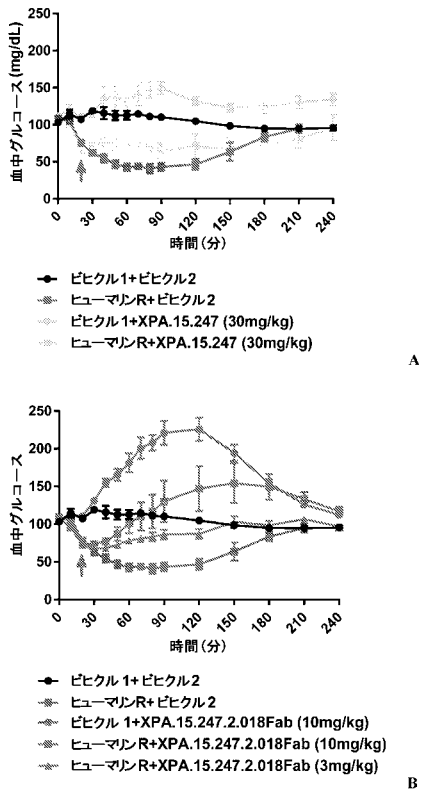
【図４Ｃ】



【図４Ｄ】



【図５】



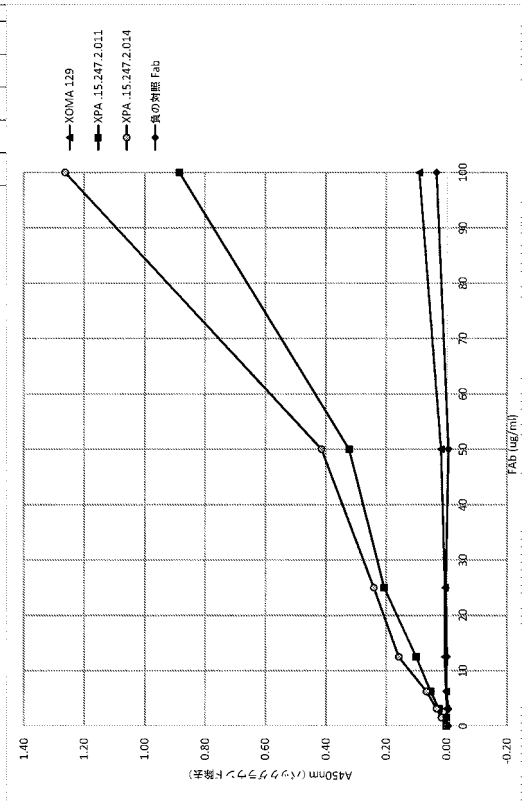
【図６－１】

	配列	配列番号
XPA.15.247 VH	EVQLVETGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAP GKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARHEWGFGMDVWGQGTTVTVSS	1
XPA.15.247.2.018 VH	EVQLVETGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAP GKGLEWVAVISYSGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARHEWGFGFDYWGQGTTVTVSS	2
XPA.15.247 VL	DVVMTQSPLSLSVTLGQPASISCRSSLSLVYGDENTYLNWFQ QRPGQSPRRLLYKVSDRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVE ADDVGVYYCMQGTHWPYTFGQGTKLEIKRTVAAPS	3
XPA.15.247.2.018 VL	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVYGDGNTYLNWFQ QRPGQSPRRLIYKVSNRDSGVPDRFSGSGSGTEFTLKISRVEA EDVGVYFCMQGTYWPGTFGGGTKLEIKRTVAAPS	4
XPA.15.247 VH CDR1	GFTFSSYA	5
XPA.15.247 VH CDR2	ISYDGSNK	6
XPA.15.247 VH CDR3	ARHEWGFGMDV	7
XPA.15.247.2.018 VH CDR1	GFTFSSYA	8
XPA.15.247.2.018 VH CDR2	ISYSGSNK	9
XPA.15.247.2.018 VH CDR3	ARHEWGFGFDY	10
XPA.15.247 VL CDR1	LSLVYGDENTY	11
XPA.15.247 VL CDR2	KVS	12
XPA.15.247 VL CDR3	YTFGQGTKLEIK	13
XPA.15.247.2.018 VL CDR1	QSLVYGDENTY	14
XPA.15.247.2.018 VL CDR2	KVS	15
XPA.15.247.2.018 VL CDR3	MQGTYWP	16
XPA.15.247.014 VL	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVYGDGNTYLNWFQ QRPGQSPRRLIYKVSKRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDVGVYYCMQGTYWPMTFGGGTKLEIKR	17
XPA.15.247.011 VL	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSHSLVYGDGNTYLNWFH QRPGQSPRRLIYKVSNRDSGVPDRFAGSGSGTDFTLKISRVEA DDFGVFYCMQGTHWPYTFGQGTKLEIKR	18
XPA.15.247.019 VL	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSESLVYGDENTYLNWFQ QRPGQSPRRLIYKVSNRDSGVPSRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDVGVYYCMQGTHWPYTFGQGTKLEIKR	19
XPA.15.247.014 VL CDR1	QSLVYGDGNTY	20
XPA.15.247.014 VL CDR2	KVS	21
XPA.15.247.014 VL CDR3	MQGTYWPMT	22
XPA.15.247.011 VL	HSLVYGDGNTY	23

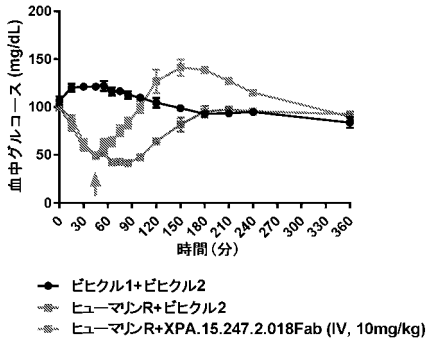
【図６－２】

CDR1		
XPA.15.247.011 VL CDR2	KVS	24
XPA.15.247.011 VL CDR3	MQGTHWPYT	25
XPA.15.247.019 VL CDR1	ESLVYGDENTY	26
XPA.15.247.019 VL CDR2	KVS	27
XPA.15.247.019 VL CDR3	MQGTHWPYT	28

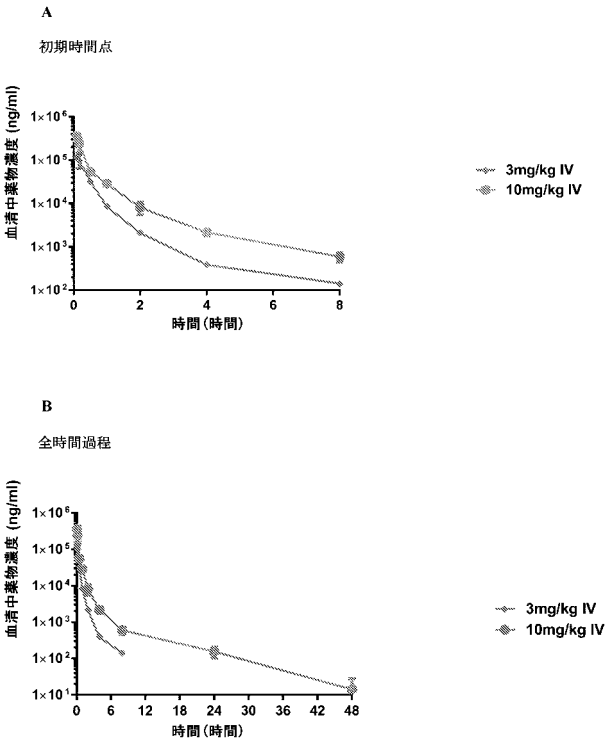
【図７】



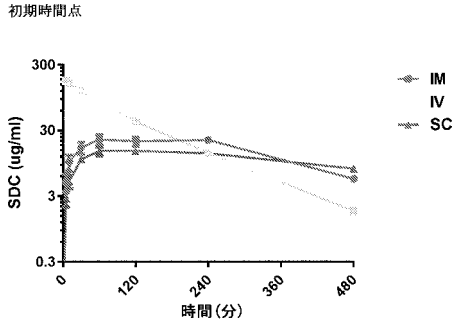
【図８】



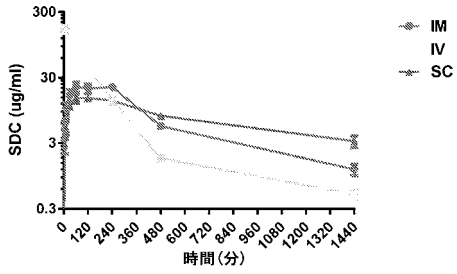
【図９】



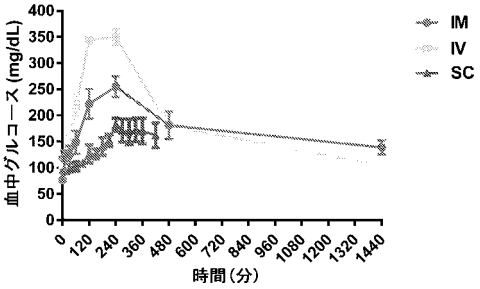
【図１０Ａ】



【図１０Ｂ】

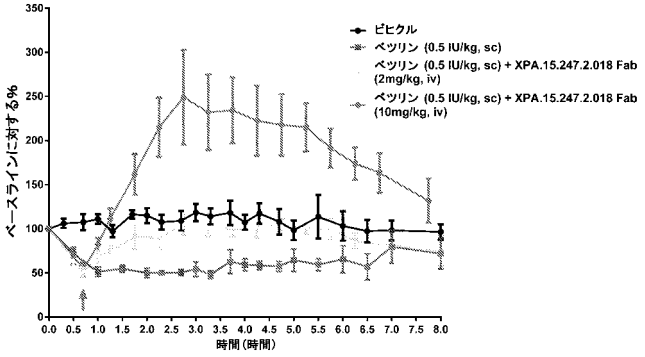


【図１０Ｃ】

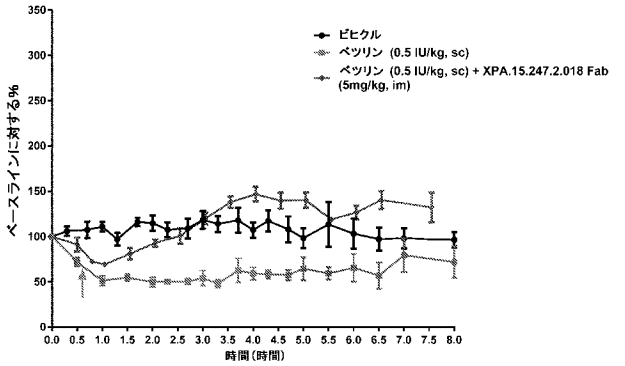


	n	Cmax (ug/ml)	Tmax (時間)	AUC (ug*時間/ml)	t1/2 (時間)	F%
IV	4	172.8	0.1	280.3	3.3	n/a
IM	4	24.1	2	185.3	5.6	66.9
SC	3	15.9	1.7	183.3	10.5	65.5

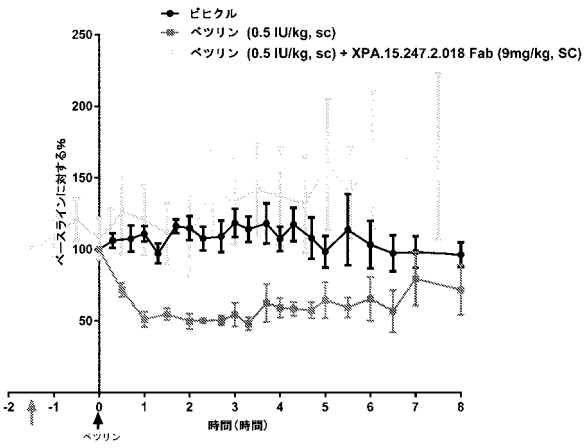
【図１１Ａ】



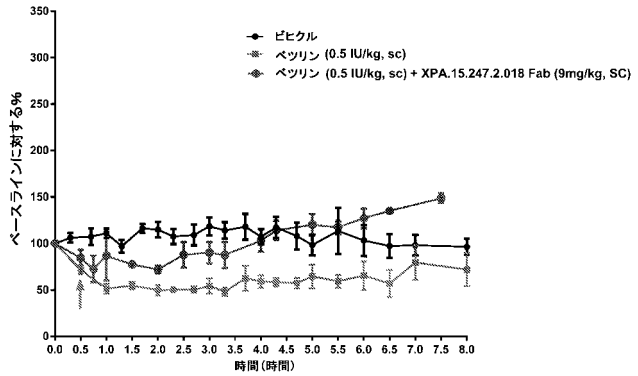
【図１１Ｂ】



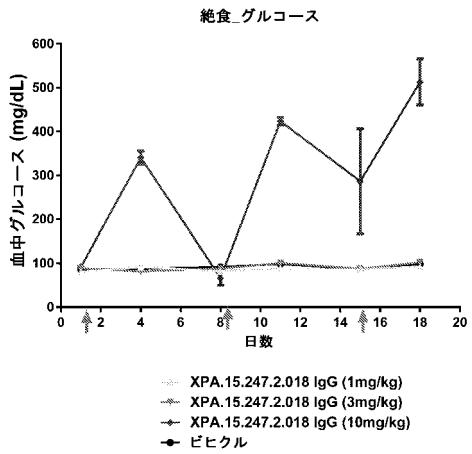
【図１２】



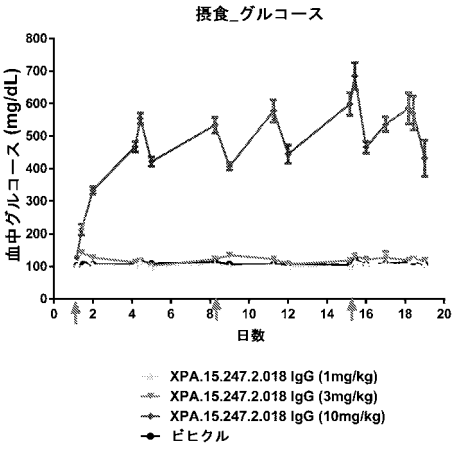
【図１１Ｃ】



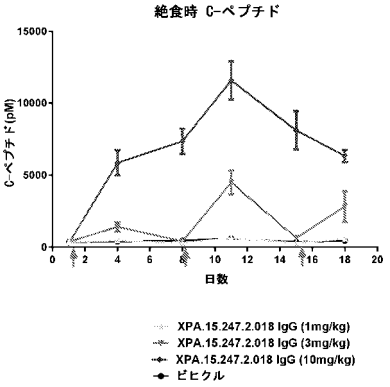
【図１３Ａ】



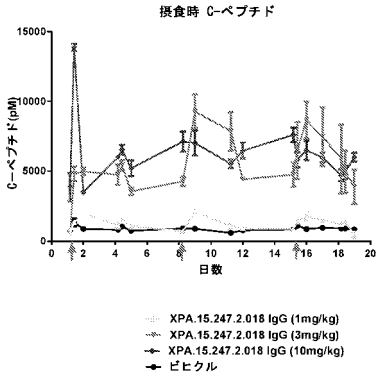
【図１３Ｂ】



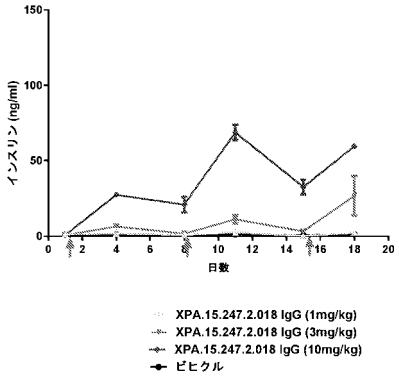
【図１４Ａ】



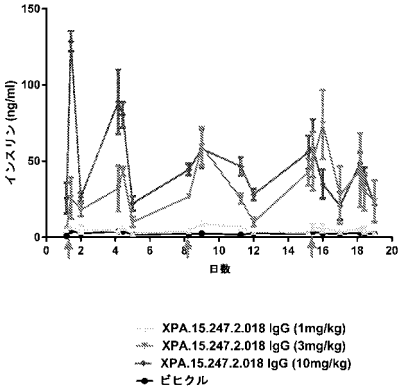
【図１４Ｂ】



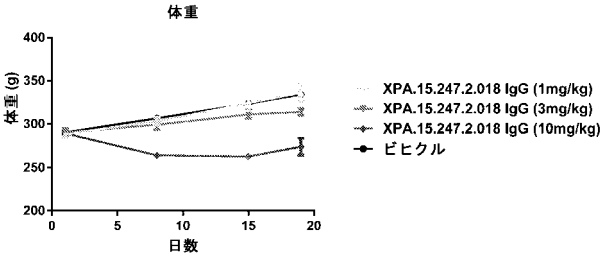
【図１４Ｃ】



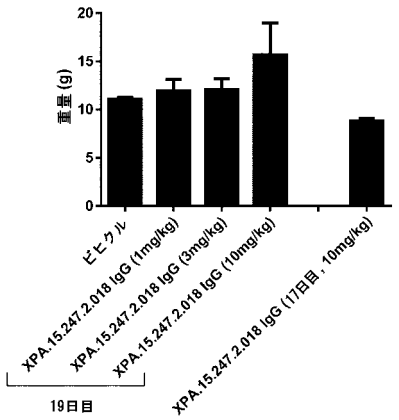
【図１４Ｄ】



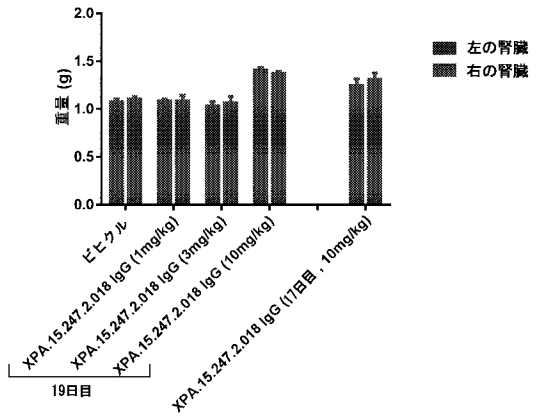
【図１５Ａ】



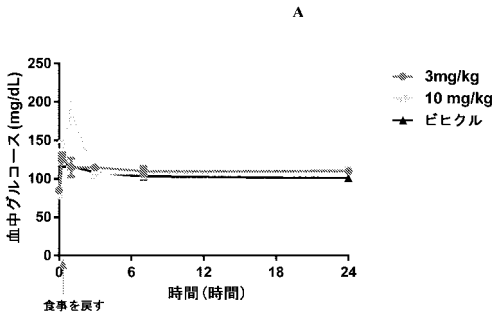
【図１５Ｂ】

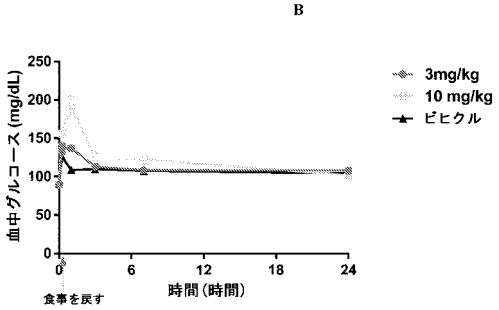


【図１５Ｃ】

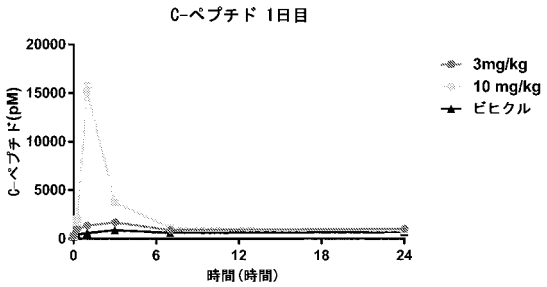


【図１６】

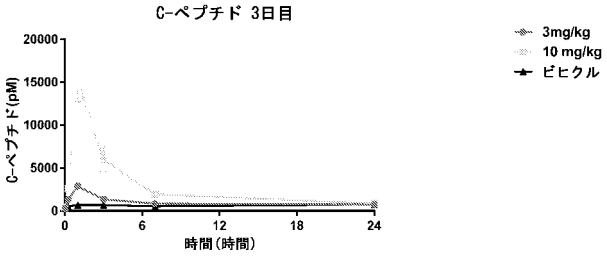




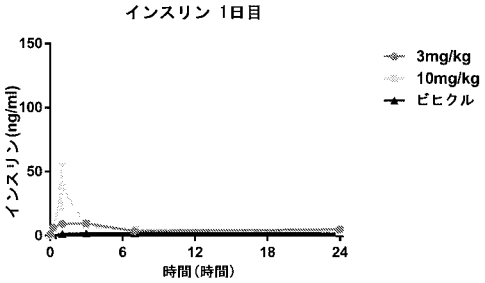
【図１７Ａ】



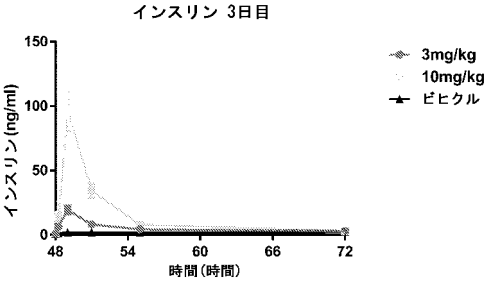
【図１７Ｂ】



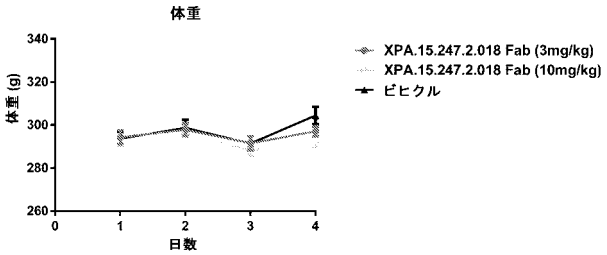
【図１７Ｃ】



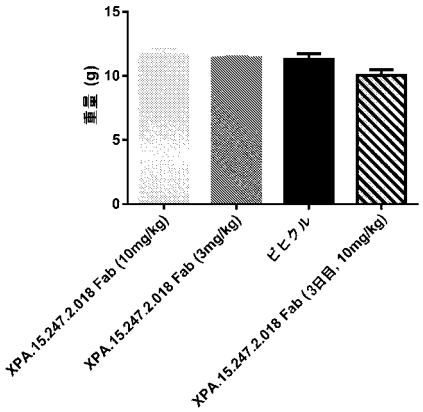
【図１７Ｄ】



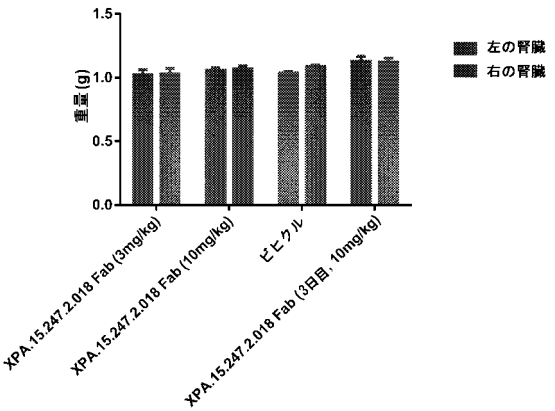
【図１８Ａ】



【図１８Ｂ】



【図１８Ｃ】



【図１９－１】

名称	配列番号	H-cdr1	配列番号	H-cdr2	配列番号	H-cdr3	配列番号	親和性：K_D (M)	K_D 改善倍率
247.2.018 Fab	2	GFTFSSYA	5	ISYSGSNK	6	ARHEWGFGFDY	7	9.7 nM	1.0
RHF.15.05896.004	29	GFRFSSYA	50	ISYSGSNK	51	ARHEWGFGFDE	52	1.6 nM	6.1
RHF.15.05896.006	30	GFKFSSYA	53	ISYSGDNK	54	ARHEWGFGFDR	55	1.9 nM	5.2
RHF.15.05896.012	31	GFTFSSWA	56	ISYSGENK	57	ARHEWGFPFDY	58	460 pM	21.0
RHF.15.05896.015	32	GFKFSSYA	59	ISYSGRNK	60	ARHEWGFGQDY	61	3.0 nM	3.3
RHF.15.05896.020	33	GFKFSSYA	62	ISWSGSNK	63	ARHEWGFGFDE	64	1.5 nM	6.4
RHF.15.05896.022	34	GFTFSSWA	65	ISYSGSNT	66	ARHEWGFPFDY	67	680 pM	14.2
RHF.15.05896.028	35	GFKFSSYA	68	ISGSGSNK	69	ARHEWGLGFDY	70	1.4 nM	7.0
RHF.15.05896.032	36	GFKFSSYA	71	ISYSGENK	72	ARHEWGFGFDE	73	1.1 nM	8.6
RHF.15.05896.036	37	GFKFSSYA	74	ISYSGGNK	75	ARHEWGFGFDL	76	1.8 nM	5.4
RHF.15.05896.040	38	GFKFSSYA	77	ISNSGSNK	78	ARHEWGFGFDW	79	1.8 nM	5.5
RHF.15.05896.044	39	GFKFSSYA	80	ISNSGSNK	81	ARHEWGFGFDK	82	1.3nM	7.4
RHF.15.05896.048	40	GFTFRSYA	83	ISYSGSVK	84	ARHEWGFGFDE	85	1.3nM	7.5
RHF.15.05896.052	41	GFKFSSYA	86	ISYSGGNK	87	ARHEWGFGFDE	88	1.1nM	9.0
RHF.15.05896.056	42	GFKFSSYA	89	ISYGGSNK	90	ARHEWGFGFDE	91	1.4nM	6.9
RHF.15.05896.059	43	GFRFSSYA	92	ISYSGSVK	93	ARHEWGFGFDR	94	1.3nM	7.4
RHF.15.05896.064	44	GFKFSSYA	95	ISYSGSHK	96	ARHEWGFGQDY	97	2.6nM	3.7
RHF.15.05896.068	45	GFKFSSYA	98	ISYSGGNK	99	ARHEWGFGYDY	100	1.2nM	8.3
RHF.15.05896.072	46	GFRFSSYA	101	ISYSGGNK	102	ARHEWGFGYDY	103	1.4nM	6.8
RHF.15.05896.075	47	GFKFSSYA	104	ISYSGSNK	105	ARHEWGFGYDY	106	1.4nM	7.0
RHF.15.05896.079	48	GFKFSSYA	107	ISWSGSNK	108	ARHEWGFGYDY	109	1.2nM	8.1
RHF.15.05896.084	49	GFRFSSYA	110	ISWSGSNK	111	ARHEWGFGFDK	112	2.2nM	4.4

【図１９－２】

名称	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	効力 EC50 値 [nM]	CHO ヒト INSR	CHO ヒト INSR	CHO カニクイザル INSR	CHO ラット INSR	CHO カニクイザル INSR	CHOラット INSR
247.2.018 Fab	1.1E+05	1.1E-03	1.309	2.204	1.634	2.615	1.279	2.615	1.279
RHF.15.05896.004	1.3E+05	2.1E-04		2.426					
RHF.15.05896.006	1.3E+05	2.4E-04		2.946					
RHF.15.05896.012	7.2E+04	3.3E-05	2.200	4.525					
RHF.15.05896.015	8.4E+04	2.5E-04		4.350					
RHF.15.05896.020	1.1E+05	1.7E-04		1.955	0.838	0.9108	0.661	0.9108	0.6605
RHF.15.05896.022	7.3E+04	5.0E-05		3.724					
RHF.15.05896.028	1.1E+05	1.5E-04		2.014					
RHF.15.05896.032	9.1E+04	1.0E-04		3.098					
RHF.15.05896.036	1.2E+05	2.2E-04		3.036					
RHF.15.05896.040	9.2E+04	1.6E-04		2.923					
RHF.15.05896.044	1.3E+05	1.7E-04		2.518					
RHF.15.05896.048	1.6E+05	2.1E-04		2.075					
RHF.15.05896.052	1.3E+05	1.3E-04		1.853					
RHF.15.05896.056	1.2E+05	1.7E-04		2.264					
RHF.15.05896.059	1.9E+05	2.5E-04		2.509					
RHF.15.05896.064	6.0E+04	1.6E-04		6.298					
RHF.15.05896.068	3.2E+05	3.8E-04		1.249	0.762	0.8538	0.533	0.8538	0.5328
RHF.15.05896.072	3.8E+05	5.4E-04	1.084	1.052	0.609	0.7718	1.039	0.7718	1.039
RHF.15.05896.075	3.2E+05	4.5E-04	1.160	1.065	0.791	0.7282	0.621	0.7282	0.6212
RHF.15.05896.079	2.9E+05	3.5E-04		1.264					
RHF.15.05896.084	1.7E+05	3.8E-04	1.138	1.865	0.692	0.7284	0.799	0.7284	0.7986

【図２０】

H-CDR1

位置	アミノ酸	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	X	Y	突然変異%
26	G	0	0	0	0	0	271	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00%
27	F	0	0	0	0	268	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	1.11%
28	T	2	0	0	1	1	9	1	0	127	1	0	2	4	8	53	1	61	0	0	0	0	77.49%
29	F	0	0	0	0	270	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.37%
30	S	0	0	1	1	0	5	1	0	2	0	0	2	1	1	5	252	0	0	0	0	0	7.01%
31	S	1	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	264	0	0	0	0	0	2.58%
32	Y	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16	0	255	5.90%
33	A	271	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00%

H-CDR2

位置	アミノ酸	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	X	Y	突然変異%
51	I	0	0	0	0	0	0	0	269	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0.74%
52	S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	271	0	0	0	0	0	0.00%
53	Y	0	0	0	0	0	6	0	1	1	0	0	6	0	0	0	6	3	1	10	0	237	12.55%
54	S	0	0	14	17	0	6	3	0	2	0	0	4	0	5	0	222	0	0	0	0	0	18.08%
55	G	0	0	0	0	0	271	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00%
56	S	2	0	9	18	1	20	1	1	1	1	0	4	0	4	1	202	1	0	3	0	0	25.46%
57	N	2	0	3	7	0	0	3	0	0	0	0	244	1	1	0	1	1	5	0	0	0	9.96%
58	K	5	0	3	17	0	6	2	0	214	0	0	1	0	7	7	2	2	3	2	0	0	21.03%

H-CDR3

位置	アミノ酸	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	X	Y	突然変異%
97	A	269	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0.74%
98	R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	271	0	0	0	0	0	0	0.00%
99	H	0	0	0	0	0	0	271	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00%
100	E	0	0	0	271	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00%
101	W	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	271	0	0	0.00%
102	G	0	0	0	0	0	271	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00%
103	F	0	0	3	0	244	2	6	0	0	5	0	7	0	1	0	0	0	0	0	0	3	9.96%
104	G	0	0	0	0	0	266	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	1.85%
105	F	0	0	0	0	194	3	3	0	0	0	0	0	0	9	0	0	0	0	24	0	40	28.41%
106	D	0	0	271	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00%
107	Y	2	0	0	69	0	7	3	1	12	7	0	0	0	17	11	5	2	1	5	0	130	52.03%

PPEスクリーニングに基づくオフ速度改善を伴う選択されたクローン - 特有の配列ではない
特有の248/271配列

【配列表】
2018532693000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2016/045917

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

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

   a. [X] forming part of the international application as filed:

      [X] in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      [ ] on paper or in the form of an image file.

   b. [ ] furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      [ ] in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).

      [ ] on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. [ ] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2016/045917

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

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

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

2. ☒ Claims Nos.: 1, 2, 5, 6, 9-25, 28-46(all partially)
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
3, 4, 7, 8, 26, 27(completely); 1, 2, 5, 6, 9-25, 28-46(partially)

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2016/045917

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/395 C07K16/28
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K A61K

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2011/038302 A2 (XOMA TECHNOLOGY LTD [US]; CORBIN JOHN [US]; WHITE MARK LESLIE [US]; WA) 31 March 2011 (2011-03-31) cited in the application The whole document, in particular the examples and antibodies	1-46
X	WO 2011/038301 A2 (XOMA TECHNOLOGY LTD [US]; WHITE MARK LESLIE [US]; ROELL MARINA [US]; C) 31 March 2011 (2011-03-31) The whole document, in particular the examples	1-46

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
11 April 2017	28/04/2017

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Chapman, Rob

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2016/045917

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	VINAY BHASKAR ET AL: "A Fully Human, Allosteric Monoclonal Antibody That Activates the Insulin Receptor and Improves Glycemic Control", DIABETES, vol. 61, no. 5, 8 March 2012 (2012-03-08), pages 1263-1271, XP055325190, US ISSN: 0012-1797, DOI: 10.2337/db11-1578 The whole document, in particular XMetA	1-46
X	JOHN A. CORBIN ET AL: "Improved Glucose Metabolism In Vitro and In Vivo by an Allosteric Monoclonal Antibody That Increases Insulin Receptor Binding Affinity", PLOS ONE, vol. 9, no. 2, 12 February 2014 (2014-02-12), page e88684, XP055325357, DOI: 10.1371/journal.pone.0088684 The whole document, in particular XMetA	1-46
X	JOHN A CORBIN ET AL: "Inhibition of insulin receptor function by a human, allosteric monoclonal antibody", MABS, vol. 6, no. 1, 28 October 2013 (2013-10-28), pages 262-272, XP055325361, US ISSN: 1942-0870, DOI: 10.4161/mabs.26871 The whole document, in particular XMetA	1-46
X	D. H. BEDINGER ET AL: "Differential Pathway Coupling of the Activated Insulin Receptor Drives Signaling Selectivity by XMetA, an Allosteric Partial Agonist Antibody", JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS, vol. 353, no. 1, 22 January 2015 (2015-01-22), pages 35-43, XP055325364, DOI: 10.1124/jpet.114.221309 The whole document, in particular XMetA	1-46

-/--

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2016/045917

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MARIA A SOOS ET AL: "Monoclonal antibodies reacting with multiple epitopes on the human insulin receptor", BIOCHEMICAL JOURNAL, PORTLAND PRESS LTD, GB, vol. 235, no. 244, 1 January 1986 (1986-01-01), pages 199-208, XP007917677, ISSN: 0264-6021 The whole document, in particular the antibodies	1-46
E	WO 2016/141111 A1 (XOMA LLC [US]) 9 September 2016 (2016-09-09) the whole document	1-46
A	BRUNTON STEPHEN A: "Nocturnal hypoglycemia: answering the challenge with long-acting insulin analogs", MEDGENMED: MEDSCAPE GENERAL MEDI, WEBMD MEDSCAPE HEALTH NETWORK, NEW YORK, NY, vol. 9, no. 2, 1 January 2007 (2007-01-01) , page 38, XP009192742, ISSN: 1531-0132 the whole document	18,20
A	"Variable chain engineering - humanization and optimization approaches ED - William R Strohl; Lila M Strohl", 1 January 2012 (2012-01-01), THERAPEUTIC ANTIBODY ENGINEERING: CURRENT AND FUTURE ADVANCES DRIVING THE STRONGEST GROWTH AREA IN THE PHARMACEUTICAL INDUSTRY (WOODHEAD PUBLISHING SERIES IN BIOMEDIC, WOODHEAD PUBLISHING, PAGE(S) 111 - 130, XP009192745, ISBN: 978-1-907568-37-4 the whole document	1

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2016/045917

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011038302 A2	31-03-2011	AU 2010298037 A1	05-04-2012
		CA 2773099 A1	31-03-2011
		CN 102985110 A	20-03-2013
		CN 106084050 A	09-11-2016
		DK 2480254 T3	11-04-2016
		EA 201270465 A1	29-03-2013
		EP 2480254 A2	01-08-2012
		EP 2957296 A1	23-12-2015
		ES 2565058 T3	31-03-2016
		HK 1173668 A1	17-02-2017
		IL 218770 A	31-07-2016
		JP 5849050 B2	27-01-2016
		JP 2013505953 A	21-02-2013
		JP 2016102120 A	02-06-2016
		KR 20140015135 A	06-02-2014
		NZ 598713 A	27-06-2014
		NZ 625360 A	26-02-2016
		SG 10201406070U A	27-11-2014
		US 2011076284 A1	31-03-2011
		US 2015322157 A1	12-11-2015
		US 2016009800 A1	14-01-2016
		WO 2011038302 A2	31-03-2011
		ZA 201202162 B	28-11-2012
WO 2011038301 A2	31-03-2011	AU 2010298036 A1	05-04-2012
		CA 2772945 A1	31-03-2011
		CN 102597775 A	18-07-2012
		EP 2480888 A2	01-08-2012
		JP 5885664 B2	15-03-2016
		JP 2013506140 A	21-02-2013
		JP 2016048240 A	07-04-2016
		US 2011274692 A1	10-11-2011
		WO 2011038301 A2	31-03-2011
WO 2016141111 A1	09-09-2016	NONE	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

International Application No. PCT/US2016/045917

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 3, 4, 7, 8, 26, 27(completely); 1, 2, 5, 6, 9-25, 28-46(partially)

Antibodies to insulin receptor comprising a heavy chain region comprising CDR sequences of SEQ ID NOs:8-10 and a light chain comprising CDRs of SEQ ID NOs:14-16, and related subject-matter

---

2-100. claims: 1, 2, 5, 6, 9-25, 28-46(all partially)

An antibody or fragment thereof comprising three heavy chain CDRs having the amino acid sequence set out in SEQ ID NOs: 5-7, 8-10 and 50-112 and three light chain CDRs have the amino acid sequences set out in SEQ ID NOs: 14-16 or SEQ ID NOs: 20-28 wherein the antibody or fragment thereof binds to i) insulin receptor or (ii) a complex comprising insulin and insulin receptor, or both (i) and (ii).

International Application No. PCT/ US2016/ 045917

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 1, 2, 5, 6, 9-25, 28-46(all partially)

The present application comprises 46 claims relating to hundreds of possible antibodies. According to Rule 6.1(a) PCT, the number of claims shall be reasonable in consideration of the nature of the invention claimed, which is not the case here.
The application further relates to sequence combinations which may or may not generate an antibody with defined technical properties. The examiner is unable to search the millions of combinations claimed without undue burden, furthermore, it is apparent that such a search would not be useful, since only an antibody defined by at least 6 CDRs (HCDR1-3, LCDR1-3) has any defined technical properties of binding. In the present case, the examiner could not determine which CDRs should be combined to form a single, defined antibody.
In the interests of clarity and for the purposes of an incomplete search, the applicant was requested to identify the subject-matter to be searched in more detail, for example, with reference to fully defined antibodies disclosed in the application and claims.
The applicant replied with a request to search the sequences of antibodies comprising a heavy chain region comprising CDR sequences of SEQ ID NO:8-10, corresponding to antibodies with the internal designations XPA.15.247.2.018, XPA.15.247.2.014, and XPA.15.247.2.011 (each with different light chain CDR regions).
The applicant further requested the opportunity to have additional sequences searched by way of an invitation to pay additional search fees, should there be no common linking inventive concept found between the defined antibodies, in the sense of Rule 13 PCT.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guidelines C-IV, 7.2), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*15/13*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/13	
Ｃ１２Ｐ	*21/08*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｐ	21/08	

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

(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
(74)代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀
(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘
(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
(72)発明者 ルビン ポール
アメリカ合衆国 ９４７１０ カリフォルニア州 バークレー セブンス ストリート ２９１０ ゾーマ （ユーエス） エルエルシー内
(72)発明者 タケウチ トシヒコ
アメリカ合衆国 ９４７１０ カリフォルニア州 バークレー セブンス ストリート ２９１０ ゾーマ （ユーエス） エルエルシー内
(72)発明者 イサフラス ハッサン
アメリカ合衆国 ９４７１０ カリフォルニア州 バークレー セブンス ストリート ２９１０ ゾーマ （ユーエス） エルエルシー内
(72)発明者 アルワリア キランジット カウアー
アメリカ合衆国 ９４７１０ カリフォルニア州 バークレー セブンス ストリート ２９１０ ゾーマ （ユーエス） エルエルシー内
(72)発明者 コービン ジョン エー.
アメリカ合衆国 ９４７１０ カリフォルニア州 バークレー セブンス ストリート ２９１０ ゾーマ （ユーエス） エルエルシー内
(72)発明者 ゴールドフィーン アイラ
アメリカ合衆国 ９４７１０ カリフォルニア州 バークレー セブンス ストリート ２９１０ ゾーマ （ユーエス） エルエルシー内
(72)発明者 ジョンソン カーク ダブリュ.
アメリカ合衆国 ９４７１０ カリフォルニア州 バークレー セブンス ストリート ２９１０ ゾーマ （ユーエス） エルエルシー内
(72)発明者 リー ウー

アメリカ合衆国　９４７１０　カリフォルニア州　バークレー　セブンス　ストリート　２９１０　ゾーマ　（ユーエス）　エルエルシー内
(72)発明者　ベディンガー　ダニエル　エイチ.
アメリカ合衆国　９４７１０　カリフォルニア州　バークレー　セブンス　ストリート　２９１０　ゾーマ　（ユーエス）　エルエルシー内

Ｆターム(参考) 4B064 AG27 CA19 CC24 DA01
4C085 AA14 AA16 BB41 CC23 DD62 EE01 GG01 GG02 GG03 GG04
GG05 GG06 GG08
4H045 AA11 BA10 BA50 DA76 EA20 EA27 FA74