

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6502337号  
(P6502337)

(45) 発行日 平成31年4月17日(2019.4.17)

(24) 登録日 平成31年3月29日(2019.3.29)

(51) Int.Cl.

F 1

A 6 1 K 39/395	(2006.01)	A 6 1 K 39/395	Z N A N
A 6 1 P 1/16	(2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 3/10	(2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 K 45/00	(2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 3/04	(2006.01)	A 6 1 P 3/04	

請求項の数 14 (全 106 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-524371 (P2016-524371)
(86) (22) 出願日	平成26年7月3日(2014.7.3)
(65) 公表番号	特表2016-528198 (P2016-528198A)
(43) 公表日	平成28年9月15日(2016.9.15)
(86) 國際出願番号	PCT/US2014/045389
(87) 國際公開番号	W02015/003122
(87) 國際公開日	平成27年1月8日(2015.1.8)
審査請求日	平成29年7月3日(2017.7.3)
(31) 優先権主張番号	61/842,745
(32) 優先日	平成25年7月3日(2013.7.3)
(33) 優先権主張国	米国(US)
(31) 優先権主張番号	61/982,611
(32) 優先日	平成26年4月22日(2014.4.22)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	508343375 アルダー・バイオファーマシューティカル ズ・インコーポレーテッド アメリカ合衆国ワシントン州98011, ボーセル, ノース・クリーク・パークウェ イ・サウス 11804
(74) 代理人	100140109 弁理士 小野 新次郎
(74) 代理人	100075270 弁理士 小林 泰
(74) 代理人	100101373 弁理士 竹内 茂雄
(74) 代理人	100118902 弁理士 山本 修

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】抗CGRP抗体を使用したグルコース代謝の調整

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

それを必要とする対象において、

- (a) 肝臓のグルコース利用を増加させる；
- (b) インスリン抵抗性を低減させる；または
- (c) 持続的な正常血糖を達成する；

ための医薬組成物であって、抗ヒトCGRP抗体または抗体断片を含み、

ここで前記抗ヒトCGRP抗体または抗体断片は、

a. それぞれ配列番号5、6および7のアミノ酸配列を有する相補性決定領域(CDR)1、CDR2およびCDR3ポリペプチドを含む可変軽(V<sub>L</sub>)鎖ならびにそれぞれ配列番号8、9および10のアミノ酸配列を有するCDR1、CDR2およびCDR3ポリペプチドを含む可変重(V<sub>H</sub>)鎖；

b. それぞれ配列番号15、16および17のアミノ酸配列を有するCDR1、CDR2およびCDR3ポリペプチドを含むV<sub>L</sub>鎖ならびにそれぞれ配列番号18、19および20のアミノ酸配列を有するCDR1、CDR2およびCDR3ポリペプチドを含むV<sub>H</sub>鎖；

c. それぞれ配列番号25、26および27のアミノ酸配列を有するCDR1、CDR2およびCDR3ポリペプチドを含むV<sub>L</sub>鎖ならびにそれぞれ配列番号28、29および30のアミノ酸配列を有するCDR1、CDR2およびCDR3ポリペプチドを含むV<sub>H</sub>鎖；

10

20

d. それぞれ配列番号35、36および37のアミノ酸配列を有するCDR1、CDR2およびCDR3ポリペプチドを含むV<sub>L</sub>鎖ならびにそれぞれ配列番号38、39および40のアミノ酸配列を有するCDR1、CDR2およびCDR3ポリペプチドを含むV<sub>H</sub>鎖；

e. それぞれ配列番号45、46および47のアミノ酸配列を有するCDR1、CDR2およびCDR3ポリペプチドを含むV<sub>L</sub>鎖ならびにそれぞれ配列番号48、49および50のアミノ酸配列を有するCDR1、CDR2およびCDR3ポリペプチドを含むV<sub>H</sub>鎖；

f. それぞれ配列番号55、56および57のアミノ酸配列を有するCDR1、CDR2およびCDR3ポリペプチドを含むV<sub>L</sub>鎖ならびにそれぞれ配列番号58、59および60のアミノ酸配列を有するCDR1、CDR2およびCDR3ポリペプチドを含むV<sub>H</sub>鎖；

g. それぞれ配列番号65、66および67のアミノ酸配列を有するCDR1、CDR2およびCDR3ポリペプチドを含むV<sub>L</sub>鎖ならびにそれぞれ配列番号68、69および70のアミノ酸配列を有するCDR1、CDR2およびCDR3ポリペプチドを含むV<sub>H</sub>鎖；

h. それぞれ配列番号75、76および77のアミノ酸配列を有するCDR1、CDR2およびCDR3ポリペプチドを含むV<sub>L</sub>鎖ならびにそれぞれ配列番号78、79および80のアミノ酸配列を有するCDR1、CDR2およびCDR3ポリペプチドを含むV<sub>H</sub>鎖；

i. それぞれ配列番号85、86および87のアミノ酸配列を有するCDR1、CDR2およびCDR3ポリペプチドを含むV<sub>L</sub>鎖ならびにそれぞれ配列番号88、89および90のアミノ酸配列を有するCDR1、CDR2およびCDR3ポリペプチドを含むV<sub>H</sub>鎖；

j. それぞれ配列番号95、96および97のアミノ酸配列を有するCDR1、CDR2およびCDR3ポリペプチドを含むV<sub>L</sub>鎖ならびにそれぞれ配列番号98、99および100のアミノ酸配列を有するCDR1、CDR2およびCDR3ポリペプチドを含むV<sub>H</sub>鎖；

k. それぞれ配列番号105、106および107のアミノ酸配列を有するCDR1、CDR2およびCDR3ポリペプチドを含むV<sub>L</sub>鎖ならびにそれぞれ配列番号108、109および110のアミノ酸配列を有するCDR1、CDR2およびCDR3ポリペプチドを含むV<sub>H</sub>鎖；

l. それぞれ配列番号115、116および117のアミノ酸配列を有するCDR1、CDR2およびCDR3ポリペプチドを含むV<sub>L</sub>鎖ならびにそれぞれ配列番号118、119および120のアミノ酸配列を有するCDR1、CDR2およびCDR3ポリペプチドを含むV<sub>H</sub>鎖；

m. それぞれ配列番号125、126および127のアミノ酸配列を有するCDR1、CDR2およびCDR3ポリペプチドを含むV<sub>L</sub>鎖ならびにそれぞれ配列番号128、129および130のアミノ酸配列を有するCDR1、CDR2およびCDR3ポリペプチドを含むV<sub>H</sub>鎖；および

n. それぞれ配列番号135、136および137のアミノ酸配列を有するCDR1、CDR2およびCDR3ポリペプチドを含むV<sub>L</sub>鎖ならびにそれぞれ配列番号138、139および140のアミノ酸配列を有するCDR1、CDR2およびCDR3ポリペプチドを含むV<sub>H</sub>鎖

からなる群より選択されるV<sub>L</sub>鎖配列およびV<sub>H</sub>鎖配列を含む、前記医薬組成物。

【請求項2】

2型糖尿病の発症を処置するまたは遅らせる及び/または機能的な膵細胞の損失を予防するのに有効である、ここで所望により外因性インスリンを投与する必要性が遅延される、請求項1に記載の医薬組成物

【請求項3】

10

20

30

40

50

前記対象が、

(i) 前糖尿病と診断されているまたは2型糖尿病の発症についての1つまたは複数のリスク因子を呈する；

(i i) 閉経前、閉経期前後、閉経期または閉経後である；

(i i i) 100 mg / dL から 125 mg / dL 間の空腹時血糖値；75グラムのグルコース溶液または75グラムの最大量までの1.75グラムのグルコース / 体重のキログラムのグルコース溶液を経口摂取した2時間後に 140 mg / dL から 199 mg / dL 間の血糖値；及び / または 5.7 パーセントから 6.4 パーセント間の糖化ヘモグロビンを含む、前糖尿病の1つまたは複数の症状を呈する；

(i v) 125 mg / dL を超える空腹時血糖値；75グラムのグルコース溶液または75グラムの最大量までの1.75グラムのグルコース / 体重のキログラムのグルコース溶液を経口摂取した2時間後に少なくとも 200 mg / dL の血糖値；及び / または少なくとも 6.5 パーセントの糖化ヘモグロビンを含む、糖尿病の1つまたは複数の症状を呈する；

(v) 2型糖尿病の家族歴；以前に2型糖尿病と診断された1つまたは複数の親または同胞；脂質異常症；少なくとも 200 mg / dL の血中総トリグリセリドレベル；35 mg / dL 未満の血中高密度リポタンパク質；肥満；25 kg / m<sup>2</sup> を超える肥満度指数；妊娠糖尿病の病歴；91 b/s を超える出生時体重の乳児を以前に出産；高血圧；少なくとも 140 mmHg の収縮期血圧；少なくとも 90 mmHg の拡張期血圧；少なくとも 99 mg / dL の空腹時血糖の以前の測定；血管疾患；多囊胞性卵巣症候群；または黒色表皮腫を含む、2型糖尿病の発症についての1つまたは複数のリスク因子を呈する；

(v i) 2型糖尿病と診断されている；

(v i i) 2型糖尿病と診断されており、かつ、GLP-1、エキセナチド-1、エキセンディン、エキセンディン類似体、エキセンディン作動薬、リラグルチド、エキセナチド L A R、D P P - 4 拮抗薬、GLP-1 受容体作動薬、または別の GLP-1 作動薬を用いた処置に不応性である；

請求項1または2に記載の医薬組成物。

#### 【請求項4】

請求項1～3のいずれか1つに記載の医薬組成物であって、抗ヒトCGRP抗体または抗体断片以外の抗糖尿病薬または抗肥満薬との組合せで使用するためのものであり、ここで所望により、

(i) 前記抗糖尿病薬または抗肥満薬は、アミリン、アミリン作動薬、スルホニル尿素薬、カルシトニン、グルカゴン、PPAR-α作動薬、GPL-1受容体作動薬、ジペプチジルペプチダーゼIV阻害薬、アミリン類似体、ビグアナイド、ドーパミンD2受容体作動薬、メグリチニド、-グルコシダーゼ阻害薬、抗脂質異常症の胆汁酸吸着剤、エキセンディン、エキセンディン類似体、エキセンディン作動薬、ガストリン阻害ペプチド(GIP)、インクレチンペプチド、インスリン、SGLT2阻害薬、グルコース再吸収阻害薬、フェノフィラート、フィラート、抗グレリン抗体または抗体断片、纖維芽細胞増殖因子受容体(FGFR)-1(IIB)、FGFR-1(ICIc)、抗体または抗体断片、及び / または FGFR-4(ICIc)、抗CD38抗体または抗体断片、抗MIC-1抗体、またはMIC-1結合断片、メトホルミンまたは前述の任意の組み合わせの1つまたは複数を含み；または

(i i) 糖尿病薬はメトホルミンである；

前記医薬組成物。

#### 【請求項5】

インビボでインスリン分泌を有意に増加させない、および / または、膵炎の発生率または膵臓の炎症に伴うマーカーもしくはサイトカインの発現の増加を生じない請求項1～4のいずれかに記載の医薬組成物。

#### 【請求項6】

薬学的に許容され得るキャリアをさらに含む、請求項1～5のいずれか1つに記載の医

10

20

30

40

50

薬組成物。

【請求項 7】

前記抗ヒト C G R P 抗体または抗体断片が前記対象に約 0.1 から 100.0 mg / レシピエント対象の体重の kg の投与量で投与される、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

【請求項 8】

前記抗ヒト C G R P 抗体または抗体断片が、ヒト抗体である；非天然型である；非天然型の抗体断片である；ヒト化抗体である；または、キメラ抗体である；請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

【請求項 9】

前記抗ヒト C G R P 抗体または抗体断片が、  
 (i) a. 配列番号 52 の  $V_L$  及び配列番号 54 の  $V_H$ ；  
 b. 配列番号 2 の  $V_L$  及び配列番号 4 の  $V_H$ ；  
 c. 配列番号 12 の  $V_L$  及び配列番号 14 の  $V_H$ ；  
 d. 配列番号 22 の  $V_L$  及び配列番号 24 の  $V_H$ ；  
 e. 配列番号 32 の  $V_L$  及び配列番号 34 の  $V_H$ ；  
 f. 配列番号 42 の  $V_L$  及び配列番号 44 の  $V_H$ ；  
 g. 配列番号 62 の  $V_L$  及び配列番号 64 の  $V_H$ ；  
 h. 配列番号 52 の  $V_L$  及び配列番号 54 の  $V_H$ ；  
 i. 配列番号 62 の  $V_L$  及び配列番号 64 の  $V_H$ ；  
 j. 配列番号 72 の  $V_L$  及び配列番号 74 の  $V_H$ ；  
 k. 配列番号 82 の  $V_L$  及び配列番号 84 の  $V_H$ ；  
 l. 配列番号 92 の  $V_L$  及び配列番号 94 の  $V_H$ ；  
 m. 配列番号 102 の  $V_L$  及び配列番号 104 の  $V_H$ ；及び  
 n. 配列番号 112 の  $V_L$  及び配列番号 114 の  $V_H$

からなる群より選択される可変軽 ( $V_L$ ) 鎖配列および可変重 ( $V_H$ ) 鎖配列に対し少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、または少なくとも 99% 同一である  $V_L$  鎖配列および  $V_H$  鎖配列を含む；または

(ii) 前記 a ~ n からなる群より選択される  $V_L$  鎖配列および  $V_H$  鎖配列を含む；  
 請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

該抗ヒト C G R P 抗体または抗体断片が、  
 (i) ヒト、キメラもしくはヒト化抗体；または  
 (ii) F a b、F ( a b ' )<sub>2</sub>、s c F v、もしくは I g N a r または別の一価抗体断片

を含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

前記抗ヒト C G R P 抗体が、エフェクター機能、半減期、タンパク質分解、および / またはグリコシル化を変化させるように修飾されている F c 領域を含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

前記抗ヒト C G R P 抗体または抗体断片が、アグリコシル化されているか、またはグリコシル化されている場合はマンノース残基のみを含む、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 13】

前記抗ヒト C G R P 抗体または抗体断片が、配列番号 52 の  $V_L$  および配列番号 54 の  $V_H$  を含む抗ヒト C G R P 抗体 A b 6 に含有される全 6 つの C D R を含む、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 14】

10

20

30

40

50

前記抗ヒトCGRP抗体または抗体断片が、配列番号52のV<sub>L</sub>および配列番号54のV<sub>H</sub>を含む、請求項1～13のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の開示

本出願は、そのそれがその全体において参照により本明細書に組み込まれる、2014年4月22日に出願された、米国仮出願第61/982,611号（代理人整理番号43257.3002号）及び2013年7月3日に出願された、米国仮出願第61/842,745号（代理人整理番号43257.3001号）の利益を主張する。

10

【0002】

本発明は、ヒトカルシトニン遺伝子関連ペプチド（「CGRP」）に対する抗体及びその断片（Fab断片を含む）に関し、それはCGRPに特異的に結合し、末梢組織におけるグルコース取り込み及び利用を促進する及び/または肝臓のグルコース産生を阻害する。主題の方法の例示的な実施形態は、機能的な臍細胞を保存し得、それにより明らかな糖尿病への進行を遅らせる。本発明は、インスリン抵抗性（グルコース、炭水化物及び脂肪代謝の障害を含む）と関連する疾患及び障害についてスクリーニングする方法及び前記抗体またはその断片を投与することによってインスリン抵抗性と関連する疾患及び障害を予防するまたは処置する方法にも関する。

【0003】

20

本出願は、EFS-Webを介してASCII形式で提出されており、その全体において参照により本明細書に組み込まれる生物学的配列表を含有する。2014年7月1日に作成された、前記ASCIIコピーは「4325703013.txt」という名称であり、203,678バイトのサイズである。

【背景技術】

【0004】

カルシトニン遺伝子関連ペプチド（CGRP）は、37アミノ酸の長さの多機能性神経ペプチドとして产生される。CGRPの2つの形態、すなわちCGRP-<sub>-</sub>及びCGRP-<sub>-</sub>形態がヒトにおいて存在し、両方は同様の活性を有する。CGRP-<sub>-</sub>及びCGRP-<sub>-</sub>は、ヒトにおいて3個のアミノ酸で異なり、異なる遺伝子に由来する。ペプチドのCGRPファミリーは、それぞれ異なる受容体及び生物学的活性を有するが、アミリン、アドレノメデュリン、及びカルシトニンも含む。Doods, H., Curr. Op. Invest. Drugs, 2(9):1261-68(2001)。CGRPタンパク質ファミリー内で、全体の相同性は異なるが、推定上の受容体結合部位でのアミノ酸残基は保存される。例えば、ヒトCGRP及びアミリンは、全体で46%アミノ酸配列同一性を共にし、一方でヒトカルシトニン及びCGRPは15%アミノ酸配列同一性を共にする。Wimalawansa, S. J., Endocrine Rev. 17(5):533-585(1996)。

30

【0005】

CGRPの生物学的効果は、CGRP受容体（CGRP-R）を介して媒介され、それは受容体関連膜タンパク質（RAMP）と合わせて、7回膜貫通型成分からなる。CGRP-Rは、Gタンパク質を通したアデニル酸シクラーゼへの有効なカップリング及びcAMPの产生に必須である、受容体成分タンパク質（RCP）の活性をさらに必要とする。Doods, H., Curr. Op. Invest. Drugs, 2(9):1261-68(2001)。

40

【0006】

CGRPは、末梢及び中枢神経系の全体を通して見出され、心血管系、神経系及び内分泌系に影響する。CGRPは、三叉神経などの組織から放出されると、それは髄膜内で神経ペプチドの逐次活性化及び放出をもたらし得、血管拡張、血管漏出、及びマスト細胞の分解によって特徴付けられる神経原性炎症を媒介する。Durham, P. L., New

50

Eng. J. Med., 350(11):1073-75(2004)。CGRPは、偏頭痛の発症において顕著な役割を果たすと考えられている。偏頭痛の頭痛期の間に、他の神経ペプチドを除いて、CGRPの血漿濃度が頸静脈血中で上昇すると示されている。Arulmozhi, D. K.ら、Vas. Pharma., 43:176-187(2005)。さらに、CGRP拮抗作用は、偏頭痛の処置に有効であると示されている。(Olesenら、N Engl J Med. 2004年3月11日; 350(11):1104-10)。

#### 【0007】

神経組織に加えて、CGRP受容体は、心臓血管組織、副腎、下垂体、腎臓、膵臓、及び骨において同定されている。Wimalawansa, S. J. , Endocrine 10

Rev. 17(5):533-585(1996)。インビトロ研究において、CGRP及びアミリンの両方は単離された膵臓組織を使用してインスリン分泌を阻害し、用量依存的様式でインスリン刺激性のグリコーゲン合成率に反作用し、単離された肝細胞におけるインスリンの作用を遮断することが見出された(Gomez-Foixら、Biochem. J. 276:607-610, 1991)。さらに、Leighton及びCooper(Nature, 335(6191):632-5, 1988)は、ラットCGRP-1が、インビトロで横紋ラットヒラメ筋における基礎及びインスリン刺激性のグリコーゲン合成率を阻害することを報告する。

#### 【0008】

グルコース恒常性は、ホルモングルカゴン及びグルコース利用及びホルモンインスリンによる組織への取り込みによりグリコーゲン合成とグリコーゲン分解のバランスをとることによって維持される。グルコースの存在は通常、骨格筋、筋細胞、脳及び脂肪細胞へのグルコースの輸送率を増加させるように機能するインスリン産生を刺激する。インスリンはまた、通常、脂肪細胞中の脂質分解を阻害する。前糖尿病または2型糖尿病の早期段階では、組織はインスリン抵抗性を発症するが、膵細胞がインスリンのレベルを増大させて分泌することによって補う。最終的には、筋肉及び肝臓のインスリン抵抗性が増大するため、補うための膵細胞の能力が消耗されるようになり、外因性インスリンが必要となる。

#### 【0009】

インスリン合成及びグルコース利用が損なわれた結果としてグルコース恒常性を厳密に制御することができなくなることは、深刻な代謝への影響及び健康への有害な影響を与える。最も一般的なのは、インスリン抵抗性及び2型糖尿病の診断につながる持続的な高血糖(高血糖症)の発症である。2011年には、米国で20歳以上の25,600,000人が糖尿病と診断され、そのうち95%が2型糖尿病であった。(疾病予防管理センター。National Diabetes Fact Sheet, 2011。Atlanta, GA: 疾病予防管理センター、アメリカ合衆国保健福祉省; 2011)。糖尿病のための医療費は、心臓発作、脳卒中、腎合併症及び神経障害のリスクの増加ゆえに、糖尿病でない人に対して平均して2倍高い。Imperatoreら、Am J Epidemiol. 160(6):531-539(2004)。CDCは、著しい変化がなければ、2050年までに米国で3人に1人の成人が糖尿病を有し得ると予測している。Boyleら、Popul. Health Metr. 8:29(2010)。世界中で、2011年に糖尿病と診断された人の総数は3億6600万人であると推定され、2030年までに5億5200万人まで増大すると推定された。(国際糖尿病連合、IDF糖尿病アトラス、第5版)。

#### 【0010】

グルコース代謝におけるCGRPの役割は、文献で明確に定義されていない。単離肝細胞における研究は、CGRP及びアミリンがインスリン刺激性のグリコーゲン合成率を阻害することを実証した。(Gomez-Foixら、Biochem. J. 276:607-610, 1991)。Beaumontら、Br J Pharmacol. Jul; 115(5):713-5(1995)は、CGRP受容体が、筋肉グルコース代謝の

10

20

30

40

50

効果を媒介しないことを発見した。Tanak aら、Exp. Clin Endocrinol no 1 Diabetes 121: 280 - 285 (2013) は、ラットモデルにおいて抗CGRP抗体がインスリン分泌に小さな変化を伴って第1相インスリン分泌のわずかな延長を生み出すことを提唱したが、しかしながら、該研究は、結果を混乱させる可能性がある、該抗体が他のカルシトニンファミリーベプチドに対して交差反応性であるかどうかについて報告しなかった。最後に、既存の米国特許は、CGRPはアミリン作動薬でありCGRPポリペプチド(CGRP拮抗薬とは反対)の投与は糖尿病を処置し得ると示して主張している(例えば、米国特許第5,641,744号及び5,175,145号を参照されたい)。

【発明の概要】

10

【0011】

一態様では、本開示は、それを必要とする対象において末梢の及び/または肝臓のグルコース利用を増加させる方法であって、抗ヒトCGRP抗体または抗体断片を含む有効量の組成物を前記対象に投与することを含む、前記方法を提供する。

【0012】

一態様では、本開示は、それを必要とする対象においてインスリン抵抗性を低減させる方法であって、抗ヒトCGRP抗体または抗体断片を含む有効量の組成物を前記対象に投与することを含む、前記方法を提供する。

【0013】

20

一態様では、本開示は、それを必要とする対象において肥満を処置する、予防するまたは制御する方法であって、抗ヒトCGRP抗体または抗体断片を含む有効量の組成物を前記対象に投与することを含む、前記方法を提供する。

【0014】

一態様では、本開示は、それを必要とする対象において持続的な正常血糖を達成するための方法であって、抗ヒトCGRP抗体または抗体断片を含む有効量の組成物を前記対象に投与することを含む、前記方法を提供する。

【0015】

一態様では、本開示は、それを必要とする対象において、除脂肪組織の体脂肪に対する比率を増加させるための方法であって、抗ヒトCGRP抗体または抗体断片を含む有効量の組成物を前記対象に投与することを含む、前記方法を提供する。

30

【0016】

主題の方法は、2型糖尿病の発症及び/または肥満を処置するまたは遅延させるのに有效であり得る。例えば、外因性インスリンを投与する必要性が遅延され得る。本方法は、臍細胞の損失を予防するまたは遅延させるのに有效であり得る。例えば、理論により限定されることを意図せず、本方法はインスリン抵抗性のヒトまたは非ヒト動物の臍細胞を休息させることを可能にし得、それにより機能的な臍細胞の損失を防ぐと考えられる。

【0017】

前記対象は、前糖尿病と診断されている可能性があるかまたは2型糖尿病の発症についての1つまたは複数のリスク因子を呈し得る。

40

【0018】

対象は、閉経前、閉経期前後、閉経期または閉経後であり得る。

【0019】

対象は、100mg/dLから125mg/dL間の空腹時血糖値；75グラムのグルコース溶液または75グラムの最大量までの1.75グラムのグルコース/体重のキログラムのグルコース溶液を経口摂取した2時間後に140mg/dLから199mg/dL間の血糖値；及び/または5.7パーセントから6.4パーセント間の糖化ヘモグロビンなどの、前糖尿病の1つまたは複数の症状を呈し得る。

【0020】

対象は、125mg/dLを超える空腹時血糖値；75グラムのグルコース溶液または

50

75グラムの最大量までの1.75グラムのグルコース/体重のキログラムのグルコース溶液を経口摂取した2時間後に少なくとも200mg/dLの血糖値；及び/または少なくとも6.5パーセントの糖化ヘモグロビンなどの、糖尿病の1つまたは複数の症状を呈し得る。

【0021】

対象は、2型糖尿病の家族歴；以前に2型糖尿病と診断された1または複数の親または同胞；脂質異常症；少なくとも200mg/dLの血中総トリグリセリドレベル；35mg/dL未満の血中高密度リポタンパク質；肥満；25kg/m<sup>2</sup>を超える肥満度指数；妊娠糖尿病の歴史；91bsを超える出生時体重の乳児を以前に出産；高血圧；少なくとも140mmHgの収縮期血圧；少なくとも90mmHgの拡張期血圧；少なくとも99mg/dLの空腹時血糖の以前の測定；血管疾患；多嚢胞性卵巣症候群；または黒色表皮腫などの、2型糖尿病の発症についての1つまたは複数のリスク因子を呈し得る。

10

【0022】

対象は、2型糖尿病と診断されている可能性がある。

【0023】

対象は、GLP-1、エキセナチド-1、エキセンディン、エキセンディン類似体、エキセンディン作動薬、リラグルチド、エキセナチドLAR、DPP-4拮抗薬、GLP-1受容体作動薬、及び別のGLP-1作動薬からなる群より選択される少なくとも1つの化合物を用いた処置に不応性であり得るか、またはかかる化合物は該対象への投与が禁忌であり得る。

20

【0024】

本方法は、前記対象に、抗ヒトCGRP抗体または抗体断片以外の抗糖尿病薬または抗肥満薬を投与することをさらに含み得る。前記抗糖尿病薬または抗肥満薬は、アミリン、アミリン作動薬、スルホニル尿素薬、カルシトニン、グルカゴン、PPAR-作動薬、GPL-1受容体作動薬、ジペプチジルペプチダーゼIV阻害薬、アミリン類似体、ビグニアイド、ドーパミンD2受容体作動薬、メグリチニド、-グルコシダーゼ阻害薬、抗脂質異常症の胆汁酸吸着剤(bile acid sequestrant)、エキセンディン、エキセンディン類似体、エキセンディン作動薬、ガストリン阻害ペプチド(GIP)、インクレチンペプチド、インスリン、SGLT2阻害薬、グルコース再吸収阻害薬、フェノフィラート、フィラート、抗グレリン抗体または抗体断片、纖維芽細胞増殖因子受容体(FGFR)-1(IIIb)、FGFR-1(IIIc)、抗体または抗体断片、及び/またはFGFR-4(IIIc)、抗CD38抗体または抗体断片、抗MIC-1抗体、またはMIC-1結合断片、メトホルミンまたは前述の任意の組み合わせの1つまたは複数を含み得る。

30

【0025】

例示的な実施形態では、前記抗糖尿病薬はメトホルミンである。

【0026】

本方法は、体重減少を引き起こすのに有効であり得る。

【0027】

投与される抗ヒトCGRP抗体または抗体断片は、インビボでインスリン分泌を有意に増加させない可能性がある、例えば、インビボで正常な生理学的レベルを超えるインスリン分泌を有意に増加させない可能性がある、または抗ヒトCGRP抗体または抗体断片の投与前のインスリン分泌のレベルと比較してインスリン分泌を有意に増加させない可能性がある。

40

【0028】

投与される抗ヒトCGRP抗体または抗体断片は、膵炎における発生率または膵臓の炎症に伴うマーカーまたはサイトカインの発現の増加をもたらさない可能性がある。

【0029】

前記組成物は、薬学的に許容され得るキャリアをさらに含み得る。

【0030】

50

前記抗ヒトCGRP抗体または抗体断片は、前記対象に、約0.1から100.0mg/レシピエント対象の体重のkgの投与量で投与され得る。

【0031】

前記抗ヒトCGRP抗体または抗体断片は、ヒト抗体であり得る。前記抗ヒトCGRP抗体または抗体断片は、非天然型であり得る。前記抗ヒトCGRP抗体または抗体断片は、非天然型の抗体断片であり得る。前記抗ヒトCGRP抗体または抗体断片は、ヒト化抗体またはその断片であり得る。前記抗ヒトCGRP抗体または抗体断片は、キメラ抗体であり得る。

【0032】

前記抗ヒトCGRP抗体または抗体断片は、インタクトなCGRPポリペプチドまたはその断片上の、(a)配列番号2のV<sub>L</sub>及び配列番号4のV<sub>H</sub>を含むAb1；(b)配列番号12のV<sub>L</sub>及び配列番号14のV<sub>H</sub>を含むAb2；(c)配列番号22のV<sub>L</sub>及び配列番号24のV<sub>H</sub>を含むAb3；(d)配列番号32のV<sub>L</sub>及び配列番号34のV<sub>H</sub>を含むAb4；(e)配列番号42のV<sub>L</sub>及び配列番号44のV<sub>H</sub>を含むAb5；(f)配列番号52のV<sub>L</sub>及び配列番号54のV<sub>H</sub>を含むAb6；(g)配列番号62のV<sub>L</sub>及び配列番号64のV<sub>H</sub>を含むAb7；(h)配列番号52のV<sub>L</sub>及び配列番号54のV<sub>H</sub>を含むAb8；(i)配列番号62のV<sub>L</sub>及び配列番号64のV<sub>H</sub>を含むAb9；(j)配列番号72のV<sub>L</sub>及び配列番号74のV<sub>H</sub>を含むAb10；(k)配列番号82のV<sub>L</sub>及び配列番号84のV<sub>H</sub>を含むAb11；(l)配列番号92のV<sub>L</sub>及び配列番号94のV<sub>H</sub>を含むAb12；(m)配列番号102のV<sub>L</sub>及び配列番号104のV<sub>H</sub>を含むAb13及び(n)配列番号112のV<sub>L</sub>及び配列番号114のV<sub>H</sub>を含むAb14からなる群より選択される抗ヒトCGRP抗体と同一の直鎖状または立体的なエピトープ(複数可)に特異的に結合し得る及び/または同一または重複する直鎖状または立体的なエピトープ(複数可)への結合について競合し得る。

【0033】

前記抗ヒトCGRP抗体または抗体断片は、(a)配列番号2のV<sub>L</sub>及び配列番号4のV<sub>H</sub>を含むAb1；(b)配列番号12のV<sub>L</sub>及び配列番号14のV<sub>H</sub>を含むAb2；(c)配列番号22のV<sub>L</sub>及び配列番号24のV<sub>H</sub>を含むAb3；(d)配列番号32のV<sub>L</sub>及び配列番号34のV<sub>H</sub>を含むAb4；(e)配列番号42のV<sub>L</sub>及び配列番号44のV<sub>H</sub>を含むAb5；(f)配列番号52のV<sub>L</sub>及び配列番号54のV<sub>H</sub>を含むAb6；(g)配列番号62のV<sub>L</sub>及び配列番号64のV<sub>H</sub>を含むAb7；(h)配列番号52のV<sub>L</sub>及び配列番号54のV<sub>H</sub>を含むAb8；(i)配列番号62のV<sub>L</sub>及び配列番号64のV<sub>H</sub>を含むAb9；(j)配列番号72のV<sub>L</sub>及び配列番号74のV<sub>H</sub>を含むAb10；(k)配列番号82のV<sub>L</sub>及び配列番号84のV<sub>H</sub>を含むAb11；(l)配列番号92のV<sub>L</sub>及び配列番号94のV<sub>H</sub>を含むAb12；(m)配列番号102のV<sub>L</sub>及び配列番号104のV<sub>H</sub>を含むAb13及び(n)配列番号112のV<sub>L</sub>及び配列番号114のV<sub>H</sub>を含むAb14からなる群より選択される抗体に含有される少なくとも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、または全6つのCDRを含み得る。

【0034】

前記抗ヒトCGRP抗体または抗体断片は、(a)配列番号2のV<sub>L</sub>及び配列番号4のV<sub>H</sub>を含むAb1；(b)配列番号12のV<sub>L</sub>及び配列番号14のV<sub>H</sub>を含むAb2；(c)配列番号22のV<sub>L</sub>及び配列番号24のV<sub>H</sub>を含むAb3；(d)配列番号32のV<sub>L</sub>及び配列番号34のV<sub>H</sub>を含むAb4；(e)配列番号42のV<sub>L</sub>及び配列番号44のV<sub>H</sub>を含むAb5；(f)配列番号52のV<sub>L</sub>及び配列番号54のV<sub>H</sub>を含むAb6；(g)配列番号62のV<sub>L</sub>及び配列番号64のV<sub>H</sub>を含むAb7；(h)配列番号52のV<sub>L</sub>及び配列番号54のV<sub>H</sub>を含むAb8；(i)配列番号62のV<sub>L</sub>及び配列番号64のV<sub>H</sub>を含むAb9；(j)配列番号72のV<sub>L</sub>及び配列番号74のV<sub>H</sub>を含むAb10；(k)配列番号82のV<sub>L</sub>及び配列番号84のV<sub>H</sub>を含むAb11；(l)配列番号92のV<sub>L</sub>及び配列番号94のV<sub>H</sub>を含むAb12；(m)配列番号102のV<sub>L</sub>及び配列番号104のV<sub>H</sub>を含むAb13及び(n)配列番号112のV<sub>L</sub>及び配列番号114のV<sub>H</sub>を含むAb14からなる群より選択される抗体に含有される少なくとも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、または全6つのCDRを含み得る。

10

20

30

40

50

104のV<sub>H</sub>を含むAb13及び(n)配列番号112のV<sub>L</sub>及び配列番号114のV<sub>H</sub>を含むAb14からなる群より選択される抗体に対し少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一であるポリペプチド配列を有し得る。

【0035】

前記抗ヒトCGRP抗体または抗体断片は、(a)配列番号2のV<sub>L</sub>及び配列番号4のV<sub>H</sub>を含むAb1；(b)配列番号12のV<sub>L</sub>及び配列番号14のV<sub>H</sub>を含むAb2；(c)配列番号22のV<sub>L</sub>及び配列番号24のV<sub>H</sub>を含むAb3；(d)配列番号32のV<sub>L</sub>及び配列番号34のV<sub>H</sub>を含むAb4；(e)配列番号42のV<sub>L</sub>及び配列番号44のV<sub>H</sub>を含むAb5；(f)配列番号52のV<sub>L</sub>及び配列番号54のV<sub>H</sub>を含むAb6；(g)配列番号62のV<sub>L</sub>及び配列番号64のV<sub>H</sub>を含むAb7；(h)配列番号52のV<sub>L</sub>及び配列番号54のV<sub>H</sub>を含むAb8；(i)配列番号62のV<sub>L</sub>及び配列番号64のV<sub>H</sub>を含むAb9；(j)配列番号72のV<sub>L</sub>及び配列番号74のV<sub>H</sub>を含むAb10；(k)配列番号82のV<sub>L</sub>及び配列番号84のV<sub>H</sub>を含むAb11；(l)配列番号92のV<sub>L</sub>及び配列番号94のV<sub>H</sub>を含むAb12；(m)配列番号102のV<sub>L</sub>及び配列番号104のV<sub>H</sub>を含むAb13；及び(n)配列番号112のV<sub>L</sub>及び配列番号114のV<sub>H</sub>を含むAb14からなる群より選択される抗体を含む。  
10

【0036】

抗ヒトCGRP抗体または抗体断片は、ヒト、キメラまたはヒト化抗体を含み得る。抗ヒトCGRP抗体または抗体断片は、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、scFv、IgNar、またはMetMabまたは別の一価抗体断片を含み得る。  
20

【0037】

別の態様では、本開示は、有効量の抗ヒトCGRP抗体または抗体断片及び抗ヒトCGRP抗体または抗体断片以外の抗糖尿病薬または抗肥満薬を備え得る、本明細書に記載された、例えば、先行する段落に列挙された方法における使用に好適な組成物を提供する。抗ヒトCGRP抗体または抗体断片は本明細書に記載のもの、例えば、インタクトなCGRPポリペプチドまたはその断片上の、(a)配列番号2のV<sub>L</sub>及び配列番号4のV<sub>H</sub>を含むAb1；(b)配列番号12のV<sub>L</sub>及び配列番号14のV<sub>H</sub>を含むAb2；(c)配列番号22のV<sub>L</sub>及び配列番号24のV<sub>H</sub>を含むAb3；(d)配列番号32のV<sub>L</sub>及び配列番号34のV<sub>H</sub>を含むAb4；(e)配列番号42のV<sub>L</sub>及び配列番号44のV<sub>H</sub>を含むAb5；(f)配列番号52のV<sub>L</sub>及び配列番号54のV<sub>H</sub>を含むAb6；(g)配列番号62のV<sub>L</sub>及び配列番号64のV<sub>H</sub>を含むAb7；(h)配列番号52のV<sub>L</sub>及び配列番号54のV<sub>H</sub>を含むAb8；(i)配列番号62のV<sub>L</sub>及び配列番号64のV<sub>H</sub>を含むAb9；(j)配列番号72のV<sub>L</sub>及び配列番号74のV<sub>H</sub>を含むAb10；(k)配列番号82のV<sub>L</sub>及び配列番号84のV<sub>H</sub>を含むAb11；(l)配列番号92のV<sub>L</sub>及び配列番号94のV<sub>H</sub>を含むAb12；(m)配列番号102のV<sub>L</sub>及び配列番号104のV<sub>H</sub>を含むAb13及び(n)配列番号112のV<sub>L</sub>及び配列番号114のV<sub>H</sub>を含むAb14からなる群より選択される抗ヒトCGRP抗体と、同一の直鎖状または立体的なエピトープ(複数可)に特異的に結合し得る、同一または重複する直鎖状または立体的なエピトープ(複数可)への結合について競合し得る、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一であるポリペプチド配列を有し得る、または前記抗ヒトCGRP抗体を含み得るものである。  
30  
40

【0038】

前記抗糖尿病薬または抗肥満薬は、アミリン、アミリン作動薬、スルホニル尿素薬、カルシトニン、グルカゴン、PPAR-α作動薬、GPL-1受容体作動薬、ジペプチジルペプチダーゼIV阻害薬、アミリン類似体、ビグアナイド、ドーパミンD<sub>2</sub>受容体作動薬、メグリチニド、-グルコシダーゼ阻害薬、抗脂質異常症の胆汁酸吸着剤、エキセンデイン、エキセンデイン類似体、エキセンデイン作動薬、ガストリン阻害ペプチド(GIP)、インクレチンペプチド、インスリン、SGLT2阻害薬、グルコース再吸収阻害薬、  
50

フェノフィブラーート、フィブラーート、メトホルミン、抗グレリン抗体または抗体断片、纖維芽細胞増殖因子受容体 ( F G F R ) - 1 ( I I I b ) 、 F G F R - 1 ( I I I c ) 、抗体または抗体断片、及び / または F G F R - 4 ( I I I c ) 、抗 C D 3 8 抗体または抗体断片、抗 M I C - 1 抗体または M I C - 1 結合断片、または前述の任意の組み合わせの 1 つまたは複数を含む。例えば、前記他の抗糖尿病薬または抗肥満薬は、メトホルミンを含み得る。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 3 9 】

【図 1】図 1 A ~ D。処置前後の血中グルコース及び血漿インスリンレベル。結果は、平均  $\pm$  S E M として表される。一元配置分散分析 + ダネットの事後検定を用いて、ビヒクル 10 に対して # #  $p < 0 . 0 1$ 。A : 血中グルコースを、摂食条件下で、処置前、ビヒクル、A b 1 4 及びメトホルミンを用いた処置の 1 8 時間後、ビヒクル及び A b 1 4 を用いた処置の 4 2 時間後に測定した。B : 血漿インスリンを、摂食条件下で、処置前、メトホルミンを用いた処置の 1 8 時間後及び、ビヒクル及び A b 1 4 を用いた処置の 4 2 時間後に測定した。C : H O M A - I R ( インスリン抵抗性指数 = グルコース ( m M )  $\times$  インスリン (  $\mu$  U / m L ) / 2 2 . 5 ) を、処置前、メトホルミンを用いた処置の 1 8 時間後及び、ビヒクル及び A b 1 4 を用いた処置の 4 2 時間後に算出した。D : 血中グルコースを、絶食条件下でクランプの直前に測定した ( メトホルミンを用いた処置の 2 4 時間後及びビヒクル及び A b 1 4 を用いた処置の 4 8 時間後 )。凡例 : 各群における最も左のバー、ビヒクル；各群における中間のバー、A b 1 4 処置；各群における最も右のバー、メトホルミン処置。

【図 2】図 2 A ~ C。クランプ処置中のグルコース注入率展開 ( A ) 、定常状態間の血中グルコース平均 ( B ) 及びクランプ終了時の血漿インスリンレベル ( C )。結果は、平均  $\pm$  S E M として表される。A : ( 二元配置分散分析とボンフェローニの事後検定を用いてビヒクルに対して、 \*  $p < 0 . 0 5$  、 \* \*  $p < 0 . 0 1$  、 \* \* \*  $p < 0 . 0 0 1$  )。図 2 A に関する凡例 : 上方ライン、メトホルミン処置；中間のライン、A b 1 4 処置；下方ライン、ビヒクル処置 ( 1 8 0 分時点 )。図 2 B ~ 2 C に対する凡例 : 各群における最も左のバー、ビヒクル；各群における中間のバー、A b 1 4 処置；各群における最も右のバー、メトホルミン処置。

【図 3】測定したグルコースフラックス。結果は、平均  $\pm$  S E M として表される。一元配置分散分析とダネットの事後検定を用いて、ビヒクルに対して #  $p < 0 . 0 5$  。6 時間の空腹条件下でクランプを実施した。0 . 3 U / K g / 時間のインスリン及び  $^3$  H - グルコースを 1 8 0 分間灌流した。グルコース注入率、全身代謝回転、肝臓のグルコース産生 ( H G P ) 、糖分解及びグリコーゲン合成の平均を、定常状態に対応する 1 4 0 から 1 8 0 分の間で算出した。凡例 : 各群における最も左のバー、ビヒクル；各群における中間のバー、A b 1 4 処置；各群における最も右のバー、メトホルミン処置。

【図 4】図 4 A ~ C。インビボでの組織特異的グルコース利用。結果は、平均  $\pm$  S E M として表される。一元配置分散分析とダネットの事後検定を用いてビヒクルに対して #  $p < 0 . 0 5$  、 # #  $p < 0 . 0 1$  。A : 精巣上体白色脂肪組織 ( E W A T ) 、鼠径部白色脂肪組織 ( I W A T ) 、及び皮膚 ( 陰性対照として ) におけるグルコース利用。B : 混合外側広筋 ( V L ) 及び糖分解長指伸筋 ( E D L ) におけるグルコース利用。C : 酸化的ヒラメ筋及び心尖におけるグルコース利用。凡例 : 各群における最も左のバー、ビヒクル；各群における中間のバー、A b 1 4 処置；各群における最も右のバー、メトホルミン処置。

【図 5】高脂肪フルクトース食を与えた動物または通常の飼料を与えた対照動物についての継時的な平均体重。凡例 : 上方のライン、高脂肪高フルクトース食；下方のライン、対照飼料。

【図 6】図 5 に示す動物群についての継時的な体重増加。上方のライン : 高脂肪高フルクトース食；下方のライン : 対照飼料。凡例 : 上方のライン、高脂肪高フルクトース食；下方のライン、対照飼料。

【図 7】A b 1 4 ( 1 0 、 3 0 、 または 1 0 0 m g / k g ) またはメトホルミンを用いた

10

20

30

40

50

処置後の高脂肪食を与えた動物、ならびにビヒクル処置された動物及び通常の飼料の与えられた対照動物についての継時的な体重増加。処置は0日目に投与した。グラフ上のラインは、7日目での最低から最高へ順番に：通常の飼料（NC）+ビヒクル；高脂肪食（HFD）+メトホルミン；HFD+Ab14 30mg/kg；HFD+Ab14 100mg/kgである。

【図8A】図8A。図7に示す動物についての食物摂取量。グラフ上のラインは、7日目での最低から最高へ順番に：高脂肪食（HFD）+メトホルミン；HFD+Ab14 30mg/kg；HFD+Ab14 100mg/kg；HFD+ビヒクル；通常の飼料（NC）+ビヒクルである。

【図8B】図8B。図7に示す動物についての累積食物摂取量。凡例：左から右へ順番にバーは：通常の飼料（NC）+ビヒクル；高脂肪食（HFD）+ビヒクル；HFD+Ab14 100mg/kg；HFD+Ab14 30mg/kg；HFD+Ab14 100mg/kg；HFD+メトホルミンである。

【図9】Ab14（10、30、または100mg/kg）またはメトホルミンを用いた処置後の高脂肪食を与えた動物、ならびにビヒクル処置された動物及び通常の飼料の与えられた対照動物についての空腹時血糖。処置は0日目に投与した。凡例：左から右へ順番にバーは図8Bの通りである。

【図10】Ab14（10、30、または100mg/kg）またはメトホルミンを用いた処置後の高脂肪食を与えた動物、ならびにビヒクル処置された動物及び通常の飼料の与えられた対照動物についての空腹時血漿インスリン。処置は0日目に投与した。凡例：左から右へ順番に各群のバーは図8Bの通りである。

【図11】Ab14またはメトホルミンを用いた処置の15日後に実施されたグルコースクランプ前及び最中の血漿インスリン（上方パネル）及びCペプチド（下方左及び右パネル）。動物は処置前6週間にわたって高脂肪食を与えた。凡例：左から右へ順番にバーは図8Bの通りである。

【図12】Ab14（10、30、または100mg/kg）またはメトホルミンを用いた処置後の高脂肪食を与えた動物、ならびにビヒクル処置された動物及び通常の飼料の与えられた対照動物についてのHOMA-IR。処置は0日目に投与した。凡例：左から右へ順番にバーは図8Bの通りである。

【図13】Ab14またはメトホルミンを用いた15日間の処置後、ならびにビヒクル処置された動物及び通常の飼料の与えられた対照動物に実施されたグルコースクランプについてのグルコース注入率。動物は処置前6週間にわたって高脂肪食を与えた。グルコースクランプは、2つの異なるインスリン注入率で行った（5mU/kg/分、およそ70~100分で定常状態に達した、及び15mU/kg/分、およそ170~210分で定常状態に達した）。凡例：丸マーク、通常の飼料；中程度の四角マーク、高脂肪食（HFD）+ビヒクル；上向き三角、HFD+Ab14 100mg/kg；下向き三角、HFD+Ab14 30mg/kg；菱形、HFD+Ab14 100mg/kg；大きい四角、HFD+メトホルミン。示すエラーバーは、平均プラスまたはマイナスSEMである。

【図14】図13に示すグルコースクランプ試験の定常状態中の平均グルコース注入率。グルコース注入率を低高インスリン注入率（5mU/kg/分、およそ70~100分で定常状態に達した、及び15mU/kg/分、およそ170~210分で定常状態に達した）について示した。各群におけるバーの順番は図8Bの通りである。

【図15】図13に示すグルコースクランプ試験中の平均グルコースフラックス。低い方の（5mU/kg/分）インスリン注入率、およそ70~100分で定常状態に達した、について結果を示す。凡例：各群におけるバーは左から右へ順番に：高脂肪食（HFD）+ビヒクル；HFD+Ab14 100mg/kg；HFD+Ab14 30mg/kg；HFD+Ab14 100mg/kg；HFD+メトホルミンである。

【図16】図13に示すグルコースクランプ試験中の平均グルコースフラックス。高い方の（15mU/kg/分）インスリン注入率、およそ170~210分で定常状態に達

10

20

30

40

50

した、について結果を示す。凡例：各群におけるバーの順番は図15の通りである。

【図17】雄スプラーグドーリーラットへの静脈内ボーラス注射後の抗CGRP抗体（具体的には、Ab6）の平均毒物動態学プロファイル。継時的な血漿濃度を168時間（7日間）にわたって示し、これは以下の実施例において実施される週毎投薬を支持する。凡例：四角マーカー、Ab14 10mg/kg/週；上向き三角マーカー、Ab14 30mg/kg/週；菱形マーカー、Ab14 100mg/kg/週。

【図18】図18A～D。8週齢ZDFラットにおける6時間空腹時のHOMA-IR（A）、血中グルコース（B）、血漿インスリン（C）及び体重（D）。結果は平均±SEMとして表される。#p<0.05；##p<0.001対ビヒクルZDF（マン・ホイットニー）。図18A～Dのバーの順番（左から右）は：（1）ビヒクル1及びビヒクル2で処置されたZDF除脂肪ラット；（2）ビヒクル1及びビヒクル2で処置されたZDFラット；（3）Ab14 20mg/kg/週及びビヒクル2で処置されたZDFラット；（4）Ab14 60mg/kg/週及びビヒクル2で処置されたZDFラット；（5）ビヒクル1及びメトホルミン（「met」）200mg/kg/日で処置されたZDFラット；（6）ビヒクル1及びピオグリタゾン10mg/kg/日で処置されたZDFラット；（7）Ab14 20mg/kg/週及びメトホルミン200mg/kg/日で処置されたZDFラット；及び（8）Ab14 60mg/kg/週及びメトホルミン200mg/kg/日で処置されたZDFラットである。

【図19A】図19A～B。体重（A）及び体重増加（B）経過観察。結果は平均±SEMとして表される。\$p<0.05（図19A：8日目のピオグリタゾンで処置されたラット；28日目のAb14 60mg/kg/週+メトホルミンで処置されたラット；図19B：22日目及び25日目のAb14 60mg/kg/週+メトホルミンで処置されたラット）；\$\$p<0.01（図19B：28日目のAb14 60mg/kg/週+メトホルミンで処置されたラット）；\$\$\$p<0.001対ビヒクルZDF（図19A：11～28日目間の全時点でのピオグリタゾンで処置されたラット；全時点でのビヒクルで処置されたZDF除脂肪ラット）（二元配置分散分析+ボンフェローニの事後検定）。

【図19B】図19A～B。体重（A）及び体重増加（B）経過観察。結果は平均±SEMとして表される。\$p<0.05（図19A：8日目のピオグリタゾンで処置されたラット；28日目のAb14 60mg/kg/週+メトホルミンで処置されたラット；図19B：22日目及び25日目のAb14 60mg/kg/週+メトホルミンで処置されたラット）；\$\$p<0.01（図19B：28日目のAb14 60mg/kg/週+メトホルミンで処置されたラット）；\$\$\$p<0.001対ビヒクルZDF（図19A：11～28日目間の全時点でのピオグリタゾンで処置されたラット；全時点でのビヒクルで処置されたZDF除脂肪ラット）（二元配置分散分析+ボンフェローニの事後検定）。

【図20A】図20A～B。食物摂取量経過観察（A）及び累積食物消費量（B）。結果は平均±SEMとして表される。図20Bのバーの順番は、図18A～Dと同じである。

\$p<0.05（図20A：20及び22日目のピオグリタゾンで処置されたラット）；\$\$p<0.01（図20A：15日目のピオグリタゾンで処置されたラット）；\$\$ \$p<0.001対ビヒクルZDF（図20a：全時点でのビヒクルで処置されたZDF除脂肪ラット）（二元配置分散分析+ボンフェローニの事後検定）# # p<0.01対ビヒクルZDF（マン・ホイットニー）

【図20B】図20A～B。食物摂取量経過観察（A）及び累積食物消費量（B）。結果は平均±SEMとして表される。図20Bのバーの順番は、図18A～Dと同じである。

\$p<0.05（図20A：20及び22日目のピオグリタゾンで処置されたラット）；\$\$p<0.01（図20A：15日目のピオグリタゾンで処置されたラット）；\$\$ \$p<0.001対ビヒクルZDF（図20a：全時点でのビヒクルで処置されたZDF除脂肪ラット）（二元配置分散分析+ボンフェローニの事後検定）# # p<0.01対ビヒクルZDF（マン・ホイットニー）

10

20

30

40

50

【図21A】図21A～D。6時間(0日目)または一晩(12、19、26日目)空腹条件下の血中グルコース(A)、血漿インスリン(B)、HOMA-IR(C)及びCペプチド(D)。結果は平均±SEMとして表される。図21A～Dの各群におけるバーの順番は、図18A～Dと同じである。#p<0.05; ##p<0.001対ビヒクルZDF(マン・ホイットニー) \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001対ビヒクルZDF(クラスカル-ウォリス+ダンの事後検定) ++p<0.01; 対メトホルミン群及びAb14 20mg/kg+メトホルミン群(一元配置分散分析+ニューマン-コイルス事後検定) \$p<0.05; \$\$p<0.01対ビヒクルZDF(二元配置分散分析+ボンフェローニの事後検定)

【図21B】図21A～D。6時間(0日目)または一晩(12、19、26日目)空腹条件下の血中グルコース(A)、血漿インスリン(B)、HOMA-IR(C)及びCペプチド(D)。結果は平均±SEMとして表される。図21A～Dの各群におけるバーの順番は、図18A～Dと同じである。#p<0.05; ##p<0.001対ビヒクルZDF(マン・ホイットニー) \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001対ビヒクルZDF(クラスカル-ウォリス+ダンの事後検定) ++p<0.01; 対メトホルミン群及びAb14 20mg/kg+メトホルミン群(一元配置分散分析+ニューマン-コイルス事後検定) \$p<0.05; \$\$p<0.01対ビヒクルZDF(二元配置分散分析+ボンフェローニの事後検定)

【図21C】図21A～D。6時間(0日目)または一晩(12、19、26日目)空腹条件下の血中グルコース(A)、血漿インスリン(B)、HOMA-IR(C)及びCペプチド(D)。結果は平均±SEMとして表される。図21A～Dの各群におけるバーの順番は、図18A～Dと同じである。#p<0.05; ##p<0.001対ビヒクルZDF(マン・ホイットニー) \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001対ビヒクルZDF(クラスカル-ウォリス+ダンの事後検定) ++p<0.01; 対メトホルミン群及びAb14 20mg/kg+メトホルミン群(一元配置分散分析+ニューマン-コイルス事後検定) \$p<0.05; \$\$p<0.01対ビヒクルZDF(二元配置分散分析+ボンフェローニの事後検定)

【図21D】図21A～D。6時間(0日目)または一晩(12、19、26日目)空腹条件下の血中グルコース(A)、血漿インスリン(B)、HOMA-IR(C)及びCペプチド(D)。結果は平均±SEMとして表される。図21A～Dの各群におけるバーの順番は、図18A～Dと同じである。#p<0.05; ##p<0.001対ビヒクルZDF(マン・ホイットニー) \*p<0.05; \*\*p<0.01対ビヒクルZDF(クラスカル-ウォリス+ダンの事後検定) ++p<0.01; 対メトホルミン群及びAb14 20mg/kg+メトホルミン群(一元配置分散分析+ニューマン-コイルス事後検定) \$p<0.05; \$\$p<0.01対ビヒクルZDF(二元配置分散分析+ボンフェローニの事後検定)

【図22】フルクトサミンレベル。結果は平均±SEMとして表される。図22の各群におけるバーの順番は、図18A～Dと同じである。##p<0.001対ビヒクルZDF(マン・ホイットニー) \*\*p<0.01対ビヒクルZDF(クラスカル-ウォリス+ダンの事後検定) \$\$p<0.001対ビヒクルZDF(二元配置分散分析+ボンフェローニの事後検定)

【図23】HbA1cレベル。結果は平均±SEMとして表される。図23の各群におけるバーの順番は、図18A～Dと同じである。##p<0.001対ビヒクルZDF(マン・ホイットニー) \*\*\*p<0.001対ビヒクルZDF(クラスカル-ウォリス+ダンの事後検定) +p<0.05; 対Ab14 60mg/kg群(一元配置分散分析+ニューマン-コイルス事後検定) \$p<0.05; \$\$p<0.01; \$\$\$p<0.001対ビヒクルZDF(二元配置分散分析+ボンフェローニの事後検定)

【図24】図24A～B。6時間(0日目)または一晩(12、19、26日目)空腹条件下の血漿トリグリセリド(A)及び遊離脂肪酸(B)レベル。結果は平均±SEMとして表される。図24A～Dの各群におけるバーの順番は、図18A～Dと同じである。

10

20

30

40

50

# # # p < 0 . 0 0 1 対ビヒクルZ D F (マン・ホイットニー) \* p < 0 . 0 5 ; \* \* p < 0 . 0 1 ; \* \* \* p < 0 . 0 0 1 対ビヒクルZ D F (クラスカル - ウオリス + ダンの事後検定) + p < 0 . 0 5 ; ++ p < 0 . 0 1 ; +++ p < 0 . 0 0 1 対メトホルミン群またはA b 1 4 6 0 m g / k g + メトホルミン群 (一元配置分散分析 + ニューマン - コイルス事後検定) \$ p < 0 . 0 5 ; \$\$ p < 0 . 0 1 ; \$\$\$ p < 0 . 0 0 1 対ビヒクルZ D F (二元配置分散分析 + ボンフェローニの事後検定)

【図25A】図25A～C。血漿総コレステロール(A)、HDL-コレステロール(B)及び非HDL-コレステロール(C)レベル。結果は平均±SEMとして表される。図25A～Cの各群におけるバーの順番は、図18A～Dと同じである。 # p < 0 . 0 5 ; # # p < 0 . 0 1 ; # # # p < 0 . 0 0 1 対ビヒクルZ D F (マン・ホイットニー) \* p < 0 . 0 5 ; \* \* p < 0 . 0 1 ; \* \* \* p < 0 . 0 0 1 対ビヒクルZ D F (一元配置分散分析 + ダネットの事後検定) + p < 0 . 0 5 ; ++ p < 0 . 0 1 対メトホルミン群またはA b 1 4 + メトホルミン群 (一元配置分散分析 + ニューマン - コイルス事後検定) \$\$ p < 0 . 0 1 対ビヒクルZ D F (二元配置分散分析 + ボンフェローニの事後検定)

【図25B】図25A～C。血漿総コレステロール(A)、HDL-コレステロール(B)及び非HDL-コレステロール(C)レベル。結果は平均±SEMとして表される。図25A～Cの各群におけるバーの順番は、図18A～Dと同じである。 # p < 0 . 0 5 ; # # p < 0 . 0 1 ; # # # p < 0 . 0 0 1 対ビヒクルZ D F (マン・ホイットニー) \* p < 0 . 0 5 ; \* \* p < 0 . 0 1 ; \* \* \* p < 0 . 0 0 1 対ビヒクルZ D F (一元配置分散分析 + ダネットの事後検定) + p < 0 . 0 5 ; ++ p < 0 . 0 1 対メトホルミン群またはA b 1 4 + メトホルミン群 (一元配置分散分析 + ニューマン - コイルス事後検定) \$\$ p < 0 . 0 1 対ビヒクルZ D F (二元配置分散分析 + ボンフェローニの事後検定)

【図25C】図25A～C。血漿総コレステロール(A)、HDL-コレステロール(B)及び非HDL-コレステロール(C)レベル。結果は平均±SEMとして表される。図25A～Cの各群におけるバーの順番は、図18A～Dと同じである。 # p < 0 . 0 5 ; # # p < 0 . 0 1 ; # # # p < 0 . 0 0 1 対ビヒクルZ D F (マン・ホイットニー) \* p < 0 . 0 5 ; \* \* p < 0 . 0 1 ; \* \* \* p < 0 . 0 0 1 対ビヒクルZ D F (一元配置分散分析 + ダネットの事後検定) + p < 0 . 0 5 ; ++ p < 0 . 0 1 対メトホルミン群またはA b 1 4 + メトホルミン群 (一元配置分散分析 + ニューマン - コイルス事後検定) \$\$ p < 0 . 0 1 対ビヒクルZ D F (二元配置分散分析 + ボンフェローニの事後検定)

【図26A】図26A～C。0日目と比較した血漿総コレステロール(A)、HDL-コレステロール(B)及び非HDL-コレステロール(C)レベル。結果は平均±SEMとして表される。図26A～Cの各群におけるバーの順番は、図18A～Dと同じである。

# p < 0 . 0 5 ; # # p < 0 . 0 1 ; # # # p < 0 . 0 0 1 対ビヒクルZ D F (対応のないt検定) \* p < 0 . 0 5 ; \* \* p < 0 . 0 1 対ビヒクルZ D F (一元配置分散分析 + ダネットの事後検定) + p < 0 . 0 5 ; 対メトホルミン群 (一元配置分散分析 + ニューマン - コイルス事後検定) \$ p < 0 . 0 5 ; \$\$ \$ p < 0 . 0 0 1 対ビヒクルZ D F (二元配置分散分析 + ボンフェローニの事後検定)

【図26B】図26A～C。0日目と比較した血漿総コレステロール(A)、HDL-コレステロール(B)及び非HDL-コレステロール(C)レベル。結果は平均±SEMとして表される。図26A～Cの各群におけるバーの順番は、図18A～Dと同じである。

# p < 0 . 0 5 ; # # p < 0 . 0 1 ; # # # p < 0 . 0 0 1 対ビヒクルZ D F (対応のないt検定) \* p < 0 . 0 5 ; \* \* p < 0 . 0 1 対ビヒクルZ D F (一元配置分散分析 + ダネットの事後検定) + p < 0 . 0 5 ; 対メトホルミン群 (一元配置分散分析 + ニューマン - コイルス事後検定) \$ p < 0 . 0 5 ; \$\$ \$ p < 0 . 0 0 1 対ビヒクルZ D F (二元配置分散分析 + ボンフェローニの事後検定)

【図26C】図26A～C。0日目と比較した血漿総コレステロール(A)、HDL-コレステロール(B)及び非HDL-コレステロール(C)レベル。結果は平均±SEMとして表される。図26A～Cの各群におけるバーの順番は、図18A～Dと同じである。

# p < 0 . 0 5 ; # # p < 0 . 0 1 ; # # # p < 0 . 0 0 1 対ビヒクルZ D F (対応の

10

20

30

40

50

ない t 検定) \*  $p < 0.05$  ; \*\*  $p < 0.01$  対ビヒクル ZDF (一元配置分散分析 + ダネットの事後検定) +  $p < 0.05$  ; 対メトホルミン群 (一元配置分散分析 + ニューマン - コイルス事後検定) \$  $p < 0.05$  ; \$\$\$  $p < 0.001$  対ビヒクル ZDF (二元配置分散分析 + ボンフェローニの事後検定)

【図 27 A】図 27 A ~ C。一晩空腹条件下の 26 日目の経口ブドウ糖負荷試験 (A)、T0 に測定された血中グルコースから算出した曲線化面積 (AUC) (B) 及び T0 に対する相対値から算出した曲線化面積 (AUC) (C)。結果は平均  $\pm$  SEM として表される。図 27 B ~ C のバーの順番は、18 A ~ D と同じである。\$\$\$  $p < 0.001$  対ビヒクル ZDF (二元配置分散分析 + ボンフェローニの事後検定) (図 27 A : ビヒクル処置された ZDF 除脂肪ラット及びピオグリタゾンで処置されたラットについて全時点が示される)。# # #  $p < 0.001$  対ビヒクル ZDF (マン・ホイットニー) \* \* \*  $p < 0.001$  対ビヒクル ZDF (クラスカル - ウオリス + ダンの事後検定)

【図 27 B】図 27 A ~ C。一晩空腹条件下の 26 日目の経口ブドウ糖負荷試験 (A)、T0 に測定された血中グルコースから算出した曲線化面積 (AUC) (B) 及び T0 に対する相対値から算出した曲線化面積 (AUC) (C)。結果は平均  $\pm$  SEM として表される。図 27 B ~ C のバーの順番は、18 A ~ D と同じである。\$\$\$  $p < 0.001$  対ビヒクル ZDF (二元配置分散分析 + ボンフェローニの事後検定) (図 27 A : ビヒクル処置された ZDF 除脂肪ラット及びピオグリタゾンで処置されたラットについて全時点が示される)。# # #  $p < 0.001$  対ビヒクル ZDF (マン・ホイットニー) \* \* \*  $p < 0.001$  対ビヒクル ZDF (クラスカル - ウオリス + ダンの事後検定)

【図 27 C】図 27 A ~ C。一晩空腹条件下の 26 日目の経口ブドウ糖負荷試験 (A)、T0 に測定された血中グルコースから算出した曲線化面積 (AUC) (B) 及び T0 に対する相対値から算出した曲線化面積 (AUC) (C)。結果は平均  $\pm$  SEM として表される。図 27 B ~ C のバーの順番は、18 A ~ D と同じである。\$\$\$  $p < 0.001$  対ビヒクル ZDF (二元配置分散分析 + ボンフェローニの事後検定) (図 27 A : ビヒクル処置された ZDF 除脂肪ラット及びピオグリタゾンで処置されたラットについて全時点が示される)。# # #  $p < 0.001$  対ビヒクル ZDF (マン・ホイットニー) \* \* \*  $p < 0.001$  対ビヒクル ZDF (クラスカル - ウオリス + ダンの事後検定)

【図 28】図 28 A ~ B。26 日目の経口ブドウ糖負荷試験中の血漿インスリン (A) 及び C ペプチド (B) レベル。結果は平均  $\pm$  SEM として表される。図 28 A ~ B の各群におけるバーの順番は、図 18 A ~ D と同じである。# # #  $p < 0.001$  対ビヒクル ZDF (マン・ホイットニー) \*  $p < 0.05$  対ビヒクル ZDF (クラスカル - ウオリス + ダンの事後検定) \$\$  $p < 0.01$  ; \$\$\$  $p < 0.001$  対ビヒクル ZDF (二元配置分散分析 + ボンフェローニの事後検定)

【図 29】図 29 A ~ B。26 日目の経口ブドウ糖負荷試験中の T - 60 の血漿インスリン (A) 及び C ペプチド (B) レベルからの相対発現。結果は平均  $\pm$  SEM として表される。図 29 A ~ B の各群におけるバーの順番は、図 18 A ~ D と同じである。#  $p < 0.05$  ; # # #  $p < 0.001$  対ビヒクル ZDF (マン・ホイットニー) \*  $p < 0.05$  対ビヒクル ZDF (一元配置分散分析 + ダネットの事後検定) +  $p < 0.05$  ; 対メトホルミン群 (一元配置分散分析 + ニューマン - コイルス事後検定) \$  $p < 0.05$  ; \$\$  $p < 0.01$  対ビヒクル ZDF (二元配置分散分析 + ボンフェローニの事後検定)

【図 30 A】図 30 A ~ C。臍臓の内容：プロインスリン (A)、インスリン (B) 及びプロインスリン / インスリン比率 (C)。結果は平均  $\pm$  SEM として表される。図 30 A ~ C のバーの順番 (左から右) は：ビヒクル 1 及びビヒクル 2 で処置された ZDF 除脂肪ラット；ビヒクル 1 及びビヒクル 2 で処置された ZDF ラット；Ab 14 60 mg / kg / 週及びビヒクル 2 で処置された ZDF ラット；ビヒクル 1 及びメトホルミン 200 mg / kg / 日で処置された ZDF ラット；及び Ab 14 60 mg / kg / 週及びメトホルミン 200 mg / kg / 日で処置された ZDF ラットである。#  $p < 0.05$  ; # #  $p < 0.001$  対ビヒクル ZDF (マン・ホイットニー) \*  $p < 0.05$  対ビヒクル ZDF (一元配置分散分析 + ニューマン - コイルス事後検定)

10

20

30

40

50

【図30B】図30A～C。膵臓の内容：プロインスリン（A）、インスリン（B）及びプロインスリン/インスリン比率（C）。結果は平均±SEMとして表される。図30A～Cのバーの順番（左から右）は：ビヒクル1及びビヒクル2で処置されたZDF除脂肪ラット；ビヒクル1及びビヒクル2で処置されたZDFラット；Ab14 60mg/kg/週及びビヒクル2で処置されたZDFラット；ビヒクル1及びメトホルミン200mg/kg/日で処置されたZDFラット；及びAb14 60mg/kg/週及びメトホルミン200mg/kg/日で処置されたZDFラットである。#p<0.05；##p<0.001対ビヒクルZDF（マン・ホイットニー）\*p<0.05対ビヒクルZDF（一元配置分散分析+ニューマン-コイルス事後検定）

【図30C】図30A～C。膵臓の内容：プロインスリン（A）、インスリン（B）及びプロインスリン/インスリン比率（C）。結果は平均±SEMとして表される。図30A～Cのバーの順番（左から右）は：ビヒクル1及びビヒクル2で処置されたZDF除脂肪ラット；ビヒクル1及びビヒクル2で処置されたZDFラット；Ab14 60mg/kg/週及びビヒクル2で処置されたZDFラット；ビヒクル1及びメトホルミン200mg/kg/日で処置されたZDFラット；及びAb14 60mg/kg/週及びメトホルミン200mg/kg/日で処置されたZDFラットである。#p<0.05；##p<0.001対ビヒクルZDF（マン・ホイットニー）\*p<0.05対ビヒクルZDF（一元配置分散分析+ニューマン-コイルス事後検定）

【図31】膵臓免疫組織化学的分析：インスリン標識定量化。図31のバーの順番（左から右）は：ビヒクル1及びビヒクル2で処置されたZDF除脂肪ラット；ビヒクル1及びビヒクル2で処置されたZDFラット；Ab14 60mg/kg/週及びビヒクル2で処置されたZDFラット；ビヒクル1及びメトホルミン200mg/kg/日で処置されたZDFラット；及びAb14 60mg/kg/週及びメトホルミン200mg/kg/日で処置されたZDFラットである。

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0040】

本発明者は、抗GRP抗体が、メトホルミンと比較して、白色脂肪組織におけるグルコース利用率のいずれの明らかな増加も伴わずに周辺筋肉における有意に増加されたグルコース利用を産生することを発見した。さらには、本明細書に記載の抗GRP抗体は心臓におけるグルコース利用を増大させ、一方でメトホルミンは心臓におけるグルコース利用率の低減を生じた。加えて、本明細書に記載の抗GRP抗体は、メトホルミンの投与から得られる効果と同様に、肝臓のグルコース産生を阻害した。

##### 【0041】

強力な機能的拮抗薬である、抗GRP抗体Ab14を、正常ラット（実施例1）において、メタボリック症候群を誘発するために高脂肪/高フルクトース食を6週間与えられていた高インスリン血症だが正常血糖の食餌誘発性肥満（DIO）ラット（実施例2）において、及び前糖尿病性の（高インスリン血症、正常血糖）状態から明らかな糖尿病の（低インスリン血症、高血糖）状態へと進行したZucker糖尿病肥満（ZDF）ラット（実施例3）において、インスリン感受性及び血糖コントロールに及ぼすその効果を決定するために正常な及び改変されたグルコース代謝の前臨床動物モデルにおいて評価した。

##### 【0042】

実施例1では、正常血糖、正常インスリン（normoinsulinemic）であり、正常な全身及び組織特異的インスリン感受性を有する正常ラットの、全身インスリン感受性ならびに特定の組織のインスリン感受性に及ぼすその効果を決定するために、高インスリン血症-正常血糖クランプ試験を、Ab14を用いて実施した。Ab14を、単回100mg/kg投与として正常ラットに高インスリン血症-正常血糖クランプ処置の48時間前に静脈内投与した。クランプ処置の直前に測定された血漿グルコース及びインスリンレベルの評価からの結果は、Ab14が血漿グルコースレベルを変えることなく、ビヒクルで処置された対照と比較して血漿インスリンレベルを低下させたことを示した。結果得られたHOMA-IRにおける低下は、全身インスリン感受性における改善を示した

10

20

30

40

50

。

#### 【 0 0 4 3 】

高インスリン血症 - 正常血糖クランプ処置は、CGRP拮抗作用による全身インスリン感受性におけるこの改善を確かにし、定常状態では、グルコース注入率及び全身グルコース代謝回転（利用）率の両方がビヒクル処置された対象と比較して上昇した。一定のインスリン注入を用いたグルコース注入率及び全身グルコース代謝回転の増加は、全身インスリン感受性の増加を示した。

#### 【 0 0 4 4 】

グルコース注入率及び全身グルコース代謝における増加と一致して、糖分解及びグリコーゲン合成のための肝臓のグルコース利用はビヒクルで処置された対照と比較して A b 1 4 によって増加し、肝臓のグルコース産生は低下した。これらの観察は、新規の肝臓のグルコース産生を阻害すると同時に、エネルギー産生及び貯蔵のためにより多く供給される内部に取り入れたグルコースの肝臓利用の増加をもたらす、CGRP拮抗作用による肝臓のインスリン感受性の増加を示す。

#### 【 0 0 4 5 】

CGRP拮抗作用は、糖分解ならびに酸化的骨格筋（糖分解 + 酸化の混合を示す外側広筋；糖分解を示す長指伸筋、及び酸化を示すヒラメ筋）におけるグルコース利用も増加させた。グルコース利用のもっとも大きな増加は、混合代謝外側広筋で生じた。これらの観察は、CGRP拮抗作用によって引き起こされる骨格筋インスリン感受性の増加を示す。CGRP拮抗作用は、心臓のグルコース利用も増加させた。対照的に、内臓または皮下脂肪デポにおけるグルコース利用率は影響を受けず、このことはCGRP拮抗作用が白色脂肪組織におけるインスリンを実質的に増加させなかつたことを示す。

#### 【 0 0 4 6 】

上述のように、本試験において使用する動物は、正常な全身及び組織特異的インスリン感受性を有する正常血糖ラットとし、これらの動物においてインスリン感受性の改善を与えることは、実証がより難しい。それゆえ、本試験において評価された個々のエンドポイントにおける改善のいくつかが統計学的な有意性に達しなかったとしても、それらがしたものと同じ方向への傾向を示した観察は、検出力（study power）の増大によって追加の測定パラメータが統計学的有意性に達することが可能になり得ることを示唆する。さらには、一般に実験動物において実施された高インスリン血症 - 正常血糖クランプ試験から臨床セッティングにて実施された高インスリン血症 - 正常血糖クランプ試験への結果の高度な翻訳があるため、これらの観察は、ヒトにおける全身及び組織特異的インスリン感受性を改善するCGRP拮抗作用の可能性を示唆する。

#### 【 0 0 4 7 】

実施例 2 では、インスリン抵抗性動物における肝臓及び末梢のインスリン感受性に及ぼす A b 1 4 の慢性投与によるCGRP拮抗作用の効果を、高脂肪 / 高フルクトース食を長期与えることによって高インスリン血症でインスリン抵抗性だが高血糖でないよう作成されたマウスにおいて評価した。ラットに、69 % 脂肪及び 14 % フルクトースを含有する食餌を化合物投与の開始前に 7 週間与えてメタボリック症候群を誘発した。7 週間の食餌処置期間の終わりに、ラットに高脂肪 / 高フルクトース食餌を受けさせ続け、加えて、A b 1 4 を 0 mg / kg (ビヒクル)、10 mg / kg、30 mg / kg、または 100 mg / kg の用量で週 1 回 2 週間静脈内に与えた。

#### 【 0 0 4 8 】

高脂肪食を与えたビヒクルで処置された対照群と比較したとき、CGRP拮抗作用は、食物消費量または体重に何の効果も与えず、これは下記で評価される追加のパラメータに及ぼすCGRP拮抗作用の効果がカロリー制限または体重減少によるものではないことを示す。

#### 【 0 0 4 9 】

処置期間の終わりに、全ての用量の A b 1 4 は、ビヒクルで処置された対照と比較して HOMA - IR を低下させ、これは全身インスリン感受性における改善を示した。HOM

10

20

30

40

50

A - I R におけるこの低下は、全ての用量の A b 1 4 で生じた、血漿インスリンレベルの低下に主に起因した。血漿インスリンにおける低下は、臍臓インスリン合成の副産物である血漿 C - ペプチドが血漿インスリンにおける低下に並行して低下されたために、インスリン分解の増加よりむしろインスリン産生の低下によるものであった。血漿グルコースレベルは A b 1 4 の少ない方の 2 つの用量によって微かにのみ低下されたが、ビヒクルで処置された対照と比較して 1 0 0 m g / k g 用量の A b 1 4 によって実質的に低下された。

#### 【 0 0 5 0 】

処置の最終日の直後、2段階の高インスリン血症 - 正常血糖クランプ処置を行い、まず生理学的量のインスリンの注入を用いて、次に、超生理学的インスリン濃度を用いた。全 3 つの用量の A b 1 4 は、生理学的及び超生理学的インスリン注入濃度の両方の後に、ビヒクルで処置された対照と比較して、定常状態グルコース注入率を増加させた。これは、全身インスリン感受性における改善と一致する。全 3 つの用量の A b 1 4 はまた、生理学的インスリン濃度の注入後に、ビヒクルで処置された対照と比較して、全身グルコース代謝回転（利用）率を増加させ、糖分解及びグリコーゲン合成のための肝臍のグルコース利用を増加させ、肝臍のグルコース産生を阻害した。これは、全身及び肝臍のインスリン感受性の両方における改善と一致する。肝臍のグルコース産生は、超生理学的インスリン濃度の注入後にも完全に予防された。

#### 【 0 0 5 1 】

正常なラットにおける C G R P 拮抗作用の急性効果（実施例 1 ）と正常血糖、高インスリン血症、インスリン抵抗性ラットにおけるその慢性効果（実施例 2 ）の間の類似性は、確立されたインスリン抵抗性を処置するために慢性的に機能する C G R P 拮抗作用の能力を示す。加えて、上述のように、一般に実験動物において実施された高インスリン血症 - 正常血糖クランプ試験から臨床セッティングにて実施された高インスリン血症 - 正常血糖クランプ試験への結果の高度な翻訳があるため、これらの観察は、 C G R P 拮抗作用が前糖尿病を有するまたはメタボリック症候群を有するインスリン抵抗性ヒトにおける全身及び組織特異的インスリン感受性を改善する可能性を示す。最後に、評価された最高用量においてのみであるが、これらの正常血糖動物における血漿グルコースレベルを低下させる C G R P 拮抗作用の能力は、 C G R P 拮抗作用が高血糖患者における血漿グルコースレベルも低下させる可能性を示唆する。

#### 【 0 0 5 2 】

実施例 3 では、 A b 1 4 の慢性投与がグルコース制御に及ぼす効果を、前糖尿病性の（高インスリン血症、正常血糖）状態から明らかな糖尿病の（低インスリン血症、高血糖）状態へと進行している Z D F ラットにおいて評価した。これらの動物は、生後 7 週までに、高血糖をほとんどから全く伴わないが、彼らが抱えるインスリン抵抗性を補うための顕著な高インスリン血症によって特徴付けられる、前糖尿病を発症する。これは、生後 1 0 ~ 1 2 週までに、臍細胞不全の結果としての低インスリン血症及び顕著な高血糖によって特徴づけられる明らかな糖尿病へと急速に進行する。

#### 【 0 0 5 3 】

生後 8 週で、 Z D F ラットを、それらの H O M A - I R に従いスクリーニングし、 A b 1 4 を 2 0 または 6 0 m g / k g で用いて週 1 回 2 8 日間処置した。この動物モデルにおける血糖コントロールに及ぼす C G R P 拮抗薬 A b 1 4 の作用を評価することに加えて、市販薬メトホルミン（ 2 0 0 m g / k g / 日 ）と組み合わせた C G R P 拮抗作用の効果も評価した。メトホルミン単独は、空腹時血中グルコースにおける上昇の部分的な予防、血漿インスリン及び C - ペプチドレベルにおける低下の部分的な予防、臍臓プロインスリンレベルにおける低下の完全な予防、臍臓インスリンレベルにおける低下の部分的な予防、及び臍島の空胞形成、過形成、及び線維化における低下を産生し、その程度は高用量の A b 1 4 について上述されたそれと類似した。しかしながら、 A b 1 4 及びメトホルミンの組み合わせは、いずれの化合物単独よりも、実質的に大きな、空腹時血中グルコースにおける上昇、血漿インスリン及び C - ペプチドレベルにおける低下、臍臓プロインスリン及びインスリンレベルにおける低下、及び臍島線維化における低下の予防を産生した。こ

10

20

30

40

50

れは、メトホルミンの効果が、A b 1 4などのC G R P拮抗薬によって増強され得ることを示す。

【0054】

加えて、A b 1 4及びメトホルミンの組み合わせは、28日間の処置後にビヒクルで処置された対照と比較して、HbA1cレベル(ヘモグロビン糖化のマーカー)における実質的な低下及びそれより少ない程度のフルクトサミンレベル(血漿アルブミン糖化のマーカー)におけるより低下をもたらした。これは、いずれかの薬剤単独よりもA b 1 4+メトホルミンの組み合わせによって產生される、血漿グルコースレベルのより大きな低下と一致する。これらの結果は、C G R P拮抗薬及びメトホルミンの併用が、高血糖が介在する糖尿病合併症に有利に影響することができることを示唆する。

10

【0055】

同様に、高用量のA b 1 4とメトホルミンの併用は、試験の26日目に実施された経口ブドウ糖負荷試験(O G T T)中のグルコースボーラス投与後、ビヒクルで処置された動物と比較してグルコース可動域及びグルコースA U Cにおける改善を示した。さらには、試験の26日目までにこれらの動物における細胞破壊がグルコース変化に応じてインスリン分泌を増加させる彼らの能力の点を超えて進行したため、O G T Tが2週間早くまたは完全な細胞破壊より前の時点で行われたとしたら、A b 1 4+メトホルミンの併用を用いてグルコース可動域及びグルコースA U Cにおけるさらにより多くの実質的な改善を観察することができたことが予期された。

【0056】

実施例3において使用されたZ D Fラットは、インスリン抵抗性前糖尿病性の状態からほんの数週間の時間経過にわたって生じた完全な細胞破壊を伴う明らかな糖尿病へと急速に進行した、糖尿病進行の非常に重症なモデルである。これは、これらの動物において実証することが難しい疾患進行における化合物関連改善及び細胞保護を表す、疾患進行の変調を評価する機会を制限する。それゆえ、上記に概説したC G R P拮抗薬A b 1 4による疾患進行の控えめな遅延の実証はいずれも、臨床における疾患進行にも影響する可能性を示唆する。加えて、C G R P拮抗作用とメトホルミンの併用を通して全体の処置有効性を改善する能力は、臨床における併用療法の有効性の改善も支持する。

20

【0057】

本出願に表す実施例の結果は、C G R P拮抗作用が、全身インスリン感受性、肝臓のインスリン感受性、及び骨格筋インスリン感受性を改善する能力を有することを示す。これらの改善は、正常インスリン及び正常血糖であり正常なインスリン感受性を有する正常な動物、ならびに高インスリン血症だがまだ高血糖ではないインスリン抵抗性動物において急性的または慢性的に観察されることができる。これらの結果は、C G R P拮抗作用が、メタボリック症候群、前糖尿病、または他の前糖尿病性の症状を有する患者に存在するインスリン抵抗性を低減させ得、さらにC G R P拮抗作用がこれらの疾患から明らかな糖尿病への進行を遅らせることができる可能性があることを示す。

30

【0058】

加えて、C G R P拮抗薬A b 1 4の、臍臓インスリン分泌を低下させることによってインスリン抵抗性動物に存在する高インスリン血症を低下させる能力は、A b 1 4が、インスリン抵抗性動物の臍臓が休息することを可能にすることにより臍臓細胞節約効果を有し得ることを示唆する。これは、臨床においてメタボリック症候群、前糖尿病、及び他の前糖尿病性の症状から明らかな糖尿病への進行をさらに遅延させ得る。

40

【0059】

さらには、インスリン抵抗性で、高インスリン血症だが正常血糖であるラットにおける血漿グルコースレベルを低下させる、及びZ D Fラットにおいて前糖尿病から明らかな糖尿病への進行を遅らせる、及びインスリン産生を増加させる能力がほとんどからまったく残っていない明らかな糖尿病の動物における血漿グルコースレベルの低下を維持する、A b 1 4の能力は、C G R P拮抗作用が上記に概説した前糖尿病性の状態のみでなく明らかな糖尿病においても疾患進行に影響する能力を有し得ることを示す。

50

## 【0060】

ゆえに、まとめると、これらの試験の結果は、A b 1 4などのC G R P拮抗薬が、前糖尿病性の症状を有する患者及び明らかな糖尿病を発症しそうまたは明らかな糖尿病を有する患者における臨床セッティングにおいてインスリン抵抗性及びグルコース制御異常に有利に影響し得ることを明確に示す。

## 【0061】

最後に、C G R P拮抗薬A b 1 4がZ D Fラットにおいてメトホルミンの作用を増強する能力は、前糖尿病性の症状を有する患者、糖尿病を発症しそうな患者、及び明らかな糖尿病を有する患者の処置に関して、A b 1 4 - メトホルミン併用療法が、A b 1 4またはメトホルミン単独のいずれかと比較してより優れた臨床有効性のものである可能性を有することを示唆する。

10

## 【0062】

## 定義

記載される特定の方法論、プロトコル、細胞株、動物の種または属、及び試薬は変更され得るため、本発明はそれらに限定されないことを理解されたい。本明細書において使用される用語は、特定の実施形態の説明のみを目的としており、添付の特許請求の範囲によってのみ限定される本発明の範囲の限定を意図しないことも理解されたい。本明細書で用いるとき、単数形は、別途文脈が明確に指示しない限り、複数形の指示物を含む。したがって、例えば、「細胞」への言及は複数のかかる細胞を含み、「タンパク質」への言及は1つまたは複数のタンパク質及び当業者に知られるその同等物を含む。本明細書において使用される全ての技術用語及び科学用語は、別途明確に指示されない限り、本発明が属する分野の当業者が一般的に理解するものと同じ意味を有する。

20

## 【0063】

カルシトニン遺伝子関連ペプチド(C G R P)：本明細書で使用されるとき、C G R Pは、A m e r i c a n P e p t i d e s (カリフォルニア州サニーヴェール)及びB a c h e m (カリフォルニア州トーランス)から入手可能な以下のホモサピエンスC G R P - 及びホモサピエンスC G R P - のアミノ酸配列を包含する。

## 【0064】

C G R P - : A C D T A T C V T H R L A G L L S R S G G V V K N N F V P T N V G S K A F - N H <sub>2</sub> (配列番号281)、ここでN末端のフェニルアラニンはアミド化されている。別段の指示がある場合を除き、一般に「C G R P」への言及は典型的にC G R P - を指す。C G R P - は、C G R Pまたは - C G R Pとして互換可能に言及される。

30

## 【0065】

C G R P - : A C N T A T C V T H R L A G L L S R S G G M V K S N F V P T N V G S K A F - N H <sub>2</sub> (配列番号282)、ここでN末端のフェニルアラニンはアミド化されており、それのみでなく、これらのC G R Pアミノ酸配列の任意の膜結合型、ならびにこの配列の変異体(m u t i e n s)、スプライスバリエント、アイソフォーム、オルソログ、ホモログ及びバリエントも包含する。C G R P - は、C G R Pまたは - C G R Pとして互換可能に言及される。

40

## 【0066】

正常血糖：本開示では、用語、正常血糖(n o r m o g l y c e m i a)または正常血糖(e u g l y c e m i a)は、正常な血中グルコース濃度を有する状態を指す。ヒトにおける例示的な正常な血中グルコース濃度は、空腹時成人において70 m g / d l から99 m g / d l であり、食後の成人において70 m g / d l から140 m g / d l である。持続的な正常血糖は、例えば、少なくとも1日、少なくとも2日、少なくとも1週間、少なくとも2週間、少なくとも1ヶ月、またはより長い、大規模な期間にわたる正常血糖の維持を指す。

## 【0067】

接合可能(m a t i n g c o m p e t e n t)な酵母種：本発明では、これは培養物

50

で増殖させることができる任意の二倍体または四倍体酵母を広く包含することが意図される。かかる酵母種は、一倍体、二倍体、または他の倍数体形態で存在し得る。所定の倍数性の細胞は、適切な条件下で、その形態で無限の世代にわたり増殖し得る。二倍体細胞はさらに胞子を形成して一倍体細胞を形成することもできる。連続接合の結果、二倍体株のさらなる接合または融合を通して四倍体株を得ることができる。本発明は、一倍体酵母の使用、ならびに、例えば、接合またはスフェロプラスト融合により生じた二倍体酵母細胞または他の倍数体酵母細胞の使用を企図する。

【0068】

本発明の一実施形態では、接合可能な酵母はサッカロミセス (*Saccharomyces* etaceae) 科のメンバーであり、それにはアルキオジマ属 (*Arxiozyma*) 、アスコボトリオジマ属 (*Ascobotryozyma*) 、シテロミセス属 (*Citeromyces*) 、デバリオミセス属 (*Debaryomyces*) 、デッケラ属 (*Dekkera*) 、エレモテシウム属 (*Eremothecium*) 、イッサチエンキア属 (*Issatchenkia*) 、カザクスタンニア属 (*Kazachstania*) 、クルイヴェロミセス属 (*Kluyveromyces*) 、コダマエア属 (*Kodamaea*) 、ロデロミセス属 (*Lodderomyces*) 、パキソレン属 (*Pachysolen*) 、ピキア属 (ピキア) 、サッカロミセス属 (*Saccharomyces*) 、サツルニスポラ属 (*Saturnispora*) 、テトラピシスボラ属 (*Tetrapisispora*) 、トルラスポラ属 (*Torulaspora*) 、ウィリオプシス属 (*Williopsis*) 及びジゴサッカロミセス属 (*Zygosaccharomyces*) が含まれる。本発明において有用である可能性がある他の種類の酵母には、ヤロウイア属 (*Yarrowia*) 、ロドスボリジウム属 (*Rhodosporidium*) 、カンジダ属 (*Candida*) 、ハンセヌラ属 (*Hansenula*) 、フィロバシウム属 (*Filobasium*) 、スボリジオボラス属 (*Sporidiobolus*) 、ブレラ属 (*Bullera*) 、ロイコスボリジウム属 (*Leucosporidium*) 、及びフィロバシデラ属 (*Filobasidella*) が含まれる。

【0069】

本発明のある実施形態では、接合可能な酵母はピキア属のメンバーである。本発明のさらなる実施形態では、ピキア属の接合可能な酵母は次の種のうちの1つである：ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) 、ピキア・メタノリカ (*Pichia methanolica*) 、及びハンセヌラ・ボリモルファ (*Hansenula polymorpha*) (ピキア・アングスタ (*Pichia angusta*))。本発明の例示的な実施形態では、ピキア属の接合可能な酵母はピキア・パストリス種である。

【0070】

一倍体酵母細胞：正常なゲノム（染色体）補体の各遺伝子を1コピー有する細胞。

【0071】

倍数体酵母細胞：正常なゲノム（染色体）補体を1コピーより多く有する細胞。

【0072】

二倍体酵母細胞：正常なゲノム相補体の基本的に全遺伝子を2コピー（アレル）有する細胞であって、典型的には2つの一倍体細胞の融合（接合）プロセスにより形成される細胞。

【0073】

四倍体酵母細胞：正常なゲノム相補体の基本的に全遺伝子を4コピー（アレル）有する細胞であって、典型的には2つの一倍体細胞の融合（接合）プロセスにより形成される細胞。四倍体は、2つ、3つ、4つ、またはそれより多い異なる発現カセットを有し得る。このような四倍体を、ホモ接合性ヘテロタリックの *a/a* 二倍体と / 二倍体を選択的に接合させることにより出芽酵母 (*S. cerevisiae*) において得ることができ、栄養要求性二倍体を得るために一倍体の連続接合によりピキア属において得ることができる。例えば、[ *met his* ] 一倍体を [ *ade his* ] 一倍体と接合させて二倍体 [ *his* ] を得ることができ；[ *met arg* ] 一倍体を [ *ade arg* ] 一倍体

10

20

30

40

50

と接合させて二倍体 [ a r g ] を得ることができ；次に二倍体 [ h i s ] を二倍体 [ a r g ] と掛け合わせて四倍体の原栄養株を得る。二倍体細胞の利点と使用についての言及は、四倍体細胞にも当てはまり得ることは当業者に理解されるであろう。

【 0 0 7 4 】

酵母の接合：2つの一倍体酵母細胞が自然に融合して1つの二倍体酵母細胞を形成するプロセス。

【 0 0 7 5 】

減数分裂：二倍体酵母細胞が還元分裂を経て4つの一倍体胞子産物を形成するプロセス。各胞子は、その後出芽して一倍体の栄養生長する細胞株を形成し得る。

【 0 0 7 6 】

選択可能マークター：選択可能マークターは、例えば形質転換事象を通してその遺伝子を受容する細胞に対して成長表現型（物理的な成長特性）を付与する遺伝子または遺伝子断片である。選択可能マークターは、その選択可能マークター遺伝子を受容しない細胞が増殖できない条件下で、選択的増殖培地でその細胞が生存及び増殖することを可能にする。選択可能マークター遺伝子は一般にいくつかの種類に分類され、細胞に抗生物質または他の薬品への耐性、2つの温度感受性（「 t s 」）変異体が交雑されるとき、または t s 変異体が形質転換されるときに温度への耐性を付与する遺伝子などのポジティブ選択可能マークター遺伝子；生合成遺伝子であって、その遺伝子を持たない全ての細胞に必要とされる特定の栄養素を欠く培地で増殖する能力を細胞に付与する生合成遺伝子、または変異型生合成遺伝子であって、野生型遺伝子を持たない細胞に増殖不能性を付与する変異型生合成遺伝子などのネガティブ選択可能マークター遺伝子；などを含む。好適なマークターとしては Z E O ； G 4 1 8 ； L Y S 3 ； M E T 1 ； M E T 3 a ； A D E 1 ； A D E 3 ； U R A 3 などが挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 7 7 】

発現ベクター：これらのDNAベクターは、標的宿主細胞内での外来タンパク質の発現のための操作を促進するエレメントを含む。好都合には、形質転換のためのDNAの配列の操作及び産生は、まず、細菌宿主、例えば大腸菌（ E . c o l i ）で実施され、通常、ベクターは細菌複製起点及び適切な細菌選択マークターを含む、かかる操作を促進する配列を含む。選択マークターは、選択培地における形質転換された宿主細胞の生存または増殖に必要なタンパク質をコードする。選択遺伝子を含有するベクターで形質転換されていない宿主細胞はその培地で生存しない。典型的な選択遺伝子は、（ a ）抗生物質または他の毒素に対する耐性を付与するタンパク質、（ b ）栄養要求性欠損を相補するタンパク質、または（ c ）複合培地から入手できない重要な栄養素を供給するタンパク質をコードする。酵母の形質転換のための例示的なベクター及び方法は、例えば、Burke, D . , D awson, D . , & Stearns, T . ( 2 0 0 0 ) . 「 M e t h o d s i n Y east G e n e t i c s : A C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y C o u r s e M a n u a l 」 . P l a i n v i e w , N . Y . : C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s に記載されている。

【 0 0 7 8 】

本発明の方法において使用される発現ベクターは、形質転換された酵母株を特定するための選択可能栄養要求性マークターまたは薬品マークターを含む、酵母特異的配列をさらに含むだろう。薬品マークターは、酵母宿主細胞内のベクターのコピー数を増幅するためにさらに使用され得る。

【 0 0 7 9 】

対象となるポリペプチドコード配列は、酵母細胞におけるポリペプチドの発現を提供する転写及び翻訳調節配列と操作可能に結合される。これらのベクター成分は以下の1つまたは複数を含むが、これらに限定されるものではない：エンハンサーエレメント、プロモーター、及び転写停止配列。ポリペプチドの分泌のための配列、例えば、シグナル配列なども含み得る。発現ベクターは多くの場合、酵母ゲノムに組み入れられるため、酵母複製起点は任意である。本発明の一実施形態では、対象のポリペプチドは、酵母二倍体細胞か

10

20

30

30

40

50

らのポリペプチドの最適化された分泌を提供する配列に操作可能に結合されるかまたは融合される。

【0080】

核酸は、別の核酸配列との機能的関係に置かれる場合に「操作可能に結合」される。例えば、シグナル配列のDNAは、ポリペプチドの分泌に関与するプレタンパク質として発現する場合に、ポリペプチドのDNAに操作可能に結合され、プロモーターまたはエンハンサーは、配列の転写に影響を及ぼす場合、コード配列に操作可能に結合する。一般に、「操作可能に結合」したとは、結合されるDNA配列が連續的であり、分泌リーダーである場合は連續的かつリーディングフレーム中にあることを意味する。しかし、エンハンサーは連續的である必要はない。結合は都合のよい制限部位でのライゲーションにより、あるいは当業者に公知のPCR／組換え方法(Gateway (登録商標) Technology; Invitrogen、カリフォルニア州カールスバッド)により達成され得る。このような部位が存在しない場合、従来の実施法に従って合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーを使用する。

【0081】

プロモーターは、それらが操作可能に結合された特定の核酸配列の転写及び翻訳を制御する、構造遺伝子(一般に約100～1000bp内)の開始コドンの上流(5')に位置する非翻訳配列である。このようなプロモーターはいくつかのクラス：誘導性プロモーター、構成的プロモーター、抑制性プロモーター(抑制因子の不在に応答して転写レベルを増加させる)に分けられる。誘導性プロモーターは、培養条件の何らかの変化、例えば栄養素の存在または不在や温度変化などに応答して、それらの制御下でDNAからの増大したレベルの転写を開始することができる。

【0082】

酵母プロモーター断片は、発現ベクターの相同的組換え及び酵母ゲノム内の同一部位への組み入れのための部位としても機能を果たし得る。あるいは、選択可能マーカーが相同的組換えのための部位として使用される。ピキア形質転換は、Cregr (1985) Mol. Cell. Biol. 5: 3376-3385、1985に記載されている。

【0083】

ピキア由来の好適なプロモーターの例としては、AOX1及びプロモーター(Cregr、Mol. Cell. Biol. 9: 1316-1323、(1989))；ICL1プロモーター(Menendezら、Yeast 20(13): 1097-108、(2003))；グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼプロモーター(GAP)(Waterhamら、Gene 186(1): 37-44(1997))；FLD1プロモーター(Shenら、Gene 216(1): 93-102(1998))が挙げられる。GAPプロモーターは強力な構成的プロモーターであり、AOX及びFLD1プロモーターは誘導性プロモーターである。

【0084】

他の酵母プロモーターとしては、ADH1、アルコールデヒドロゲナーゼII、GAL4、PHO3、PHO5、Pyk及びそれら由来のキメラプロモーターが挙げられる。加えて、哺乳類、昆虫、植物、爬虫類、両生類、ウイルス及び鳥類プロモーターなどの非酵母プロモーターが本発明で使用され得る。最も典型的には、プロモーターは哺乳類プロモーター(発現した遺伝子に対して潜在的に内因性)を含むか、酵母系において効率的な転写を提供する酵母またはウイルスプロモーターを含むだろう。

【0085】

対象のポリペプチドは、組換えによって、直接的だけでなく、異種性ポリペプチド、例えばシグナル配列または成熟タンパク質またはポリペプチドのN末端に特定の切断部位を有する他のポリペプチドとの融合ポリペプチドとしても产生され得る。一般に、シグナル配列はベクターの成分であるかまたはベクターに挿入されるポリペプチドコード配列の一部であり得る。宿主細胞内で利用可能な標準的経路の1つにより識別され処理される異種性シグナル配列が好ましくは選択される。出芽酵母の因子プレプロシグナルは、ピキア

10

20

30

40

50

・パストリス ( *P. pastoris* ) 由来の様々な組換えタンパク質の分泌に有効であることが証明されている。他の酵母シグナル配列としては、接合因子シグナル配列、インベルターゼシグナル配列、及び他の分泌型酵母ポリペプチド由来のシグナル配列が挙げられる。加えて、これらのシグナルペプチド配列を操作して二倍体酵母発現系における分泌を増強させてもよい。対象となる他の分泌シグナルは、哺乳類シグナル配列も含み、これは分泌されるタンパク質に対して異種性であり得るか、また分泌されるタンパク質の天然の配列であってよい。シグナル配列にはプレペプチド配列が含まれ、場合によってはプロペプチド配列が含まれ得る。免疫グロブリン鎖上で見いだされるシグナル配列、例えば K 28 プレプロ毒素配列、P H A - E 、 F A C E 、ヒトM C P - 1 、ヒト血清アルブミンシグナル配列、ヒト I g 重鎖、ヒト I g 軽鎖などを含む、多くのかかるシグナル配列は当該技術分野で公知である。例えば、 Hashimoto ら、 Protein Eng 11 ( 2 ) 75 ( 1998 ) ; Kobayashi ら、 Therapeutic Apheresis 2 ( 4 ) 257 ( 1998 ) を参照されたい。  
10

#### 【 0086 】

転写は、転写活性化配列をベクターに挿入することにより増加し得る。これらの活性化因子は、通常約 10 ~ 300 bp の D N A のシス作用性エレメントであり、プロモーターに作用してその転写を増加させる。転写エンハンサーは配向及び位置に比較的依存せず、インtron内、ならびにコード配列自体内で、転写単位の 5' 側及び 3' 側に見出されている。エンハンサーをコード配列に対して 5' または 3' 位で発現ベクター中にスプライシングすることができるが、好ましくはプロモーターから部位 5' に位置する。  
20

#### 【 0087 】

真核宿主細胞において使用される発現ベクターは、転写の停止及び m R N A の安定化に必要な配列も含み得る。かかる配列は一般に、真核またはウイルス D N A または c D N A の非翻訳領域の翻訳終止コドンの 3' 側から入手可能である。これらの領域は、 m R N A の非翻訳部分のポリアデニル化断片として転写されたヌクレオチドセグメントを含む。

#### 【 0088 】

上記の成分の 1 つまたは複数を含有する好適なベクターの構築は、標準的なライゲーション技術または P C R / 組換え法を採用する。単離されたプラスミドまたは D N A 断片は、必要とされるプラスミドまたは組換え法によって生成するために望ましい形態で切断、調整、および再ライゲートされる。構築されたプラスミド中の正しい配列を確認する分析のために、ライゲーション混合物を使用して宿主細胞を形質転換し、適切な場合には成果を挙げた形質転換体を抗生物質耐性（例えば、アンピシリンまたはゼオシン）によって選択する。形質転換体由来のプラスミドを調整し、制限エンドヌクレアーゼ消化によって分析及び / または配列決定する。  
30

#### 【 0089 】

断片の制限及びライゲーションの代替法として、 a t t 部位及び組換え酵素に基づく組換え法を使用して、 D N A 配列をベクターに挿入してよい。このような方法は、例えば、 Landy Ann. Rev. Biochem. 58 : 913 - 949 ( 1989 ) に記載されており、当業者にも公知である。このような方法は、ラムダ及び大腸菌コード化組換えタンパク質の混合物が介在する分子間の D N A 組換えを利用する。組換えは、相互作用 D N A 分子上の特定の付着 ( a t t ) 部位間で生じる。 a t t 部位の記述については、 Weisberg and Landy ( 1983 ) 「 Site - Specific Recombination in Phage Lambda, in Lambda II , Weisberg 編 . ( Cold Spring Harbor, NY : Cold Spring Harbor Press ) 、 pp. 211 - 250 を参照されたい。組換え後に、 a t t 部位が各親ベクターによって供与される配列から構成されるハイブリッド配列となるように、組換え部位に隣接する D N A セグメントが切り替えられる。組換えは、任意のトポロジーの D N A 間で生じることができる。  
40

#### 【 0090 】

対象の配列を適切なベクター内にライゲートする；特異的プライマーの使用を通して a  
50

t t B 部位を含有する P C R 産物を生成する； a t t 部位を含む適切なベクターにクローニングされた c D N A ライブライマーを生成する、などにより対象の配列内へと a t t 部位を導入し得る。

【 0 0 9 1 】

フォールディングとは、本明細書で用いるとき、アミノ酸残基間の相互作用が構造を安定化させるように作用する、ポリペプチド及びタンパク質の三次元構造を指す。構造の決定には非共有的相互作用が重要であるが、通常、対象となるタンパク質は 2 つのシステイン残基によって形成される分子内及び／または分子間共有ジスルフィド結合を有する。天然に存在するタンパク質及びポリペプチドまたはそれらの誘導体及び変異体に関して、適切なフォールディングは、典型的には最適な生物学的活性をもたらす配置であり、例えはリガンド結合、酵素活性などの活性に関するアッセイによって都合よくモニターすることができる。

【 0 0 9 2 】

場合によっては、例えは所望の産物が合成起源のものである場合、生物学的活性に基づくアッセイはあまり意味がない。かかる分子の適切なフォールディングは物理学的特性、エネルギー的考察、モデリング研究などに基づいて決定され得る。

【 0 0 9 3 】

発現宿主は、フォールディング及びジスルフィド結合形成を増強する 1 つまたは複数の酵素、すなわちフォルダーゼ、シャペロニンなどをコードする配列の導入によってさらに修飾することができる。かかる配列は、当該技術分野で公知のように、ベクター、マークーなどを使用して、酵母宿主細胞において構成的または誘導的に発現され得る。好ましくは、所望の発現パターンに十分な転写調節エレメントを含む配列を、標的化法によって酵母ゲノムに安定して組み入れる。

【 0 0 9 4 】

例えは、真核 P D I は、タンパク質システイン酸化及びジスルフィド結合異性化の効率的な触媒であるだけでなく、シャペロン活性も示す。 P D I の共発現は、複数のジスルフィド結合を有する活性なタンパク質の産生を促進することができる。 B I P ( 免疫グロブリン重鎖結合タンパク質 ) 、シクロフィリンなどの発現も興味深い。本発明の一実施形態では、一倍体の親株のそれぞれは、異なるフォールディング酵素を発現し、例えは、一方の株は B I P を発現し得、他方の株は P D I またはそれらの組み合わせを発現し得る。

【 0 0 9 5 】

用語「所望のタンパク質」または「所望の抗体」は、交換可能に使用され、一般的に、標的、すなわち C G R P またはキメラまたはヒト化抗体または本明細書中で記載されるようなそれら由来の結合部分に対して特異的な親抗体を指す。用語「抗体」は、エピトープとぴったり合い、エピトープを認識する特定の形状を有する任意のポリペプチド鎖含有分子構造を包含することが意図され、この場合、1 つまたは複数の非共有的結合相互作用が分子構造とエピトープとの間の複合体を安定化させる。抗体分子の原型は免疫グロブリンであり、あらゆる供給源、例えはヒト、げっ歯類、ウサギ、ウシ、ヒツジ、ブタ、イヌ、他の哺乳類、ニワトリ、他の鳥類などに由来する全種類の免疫グロブリン、 I g G 、 I g M 、 I g A 、 I g E 、 I g D などが「抗体」とみなされる。本発明に係る出発物質として有用な抗体の産生に好ましい供給源は、ウサギである。多くの抗体コード配列が記述されており、それ以外を当技術分野で公知の方法により生じてもよい。その例としては、キメラ抗体、ヒト抗体及び他の非ヒト哺乳類抗体、ヒト化抗体、単鎖抗体 ( s c F v s など ) 、キャメルボディ、ナノボディ、 I g N A R ( サメ由来の単鎖抗体 ) 、小モジュラー免疫医薬 ( S M I P ) 、及び F a b 、 F ( a b ' ) <sub>2</sub> などの抗体断片などが挙げられる。 S t r e l t s o v V A ら、 Structure of a shark Ig N A R antibody variable domain and modeling of an early - developmental isotype , Protein Sci . Nov ; 14 ( 11 ) : 2901 - 9 ( 2005 ) . E pub 2005 年 9 月 30 日 ; Greenberg A S ら、 A new antigen receptor g

10

20

30

40

50

ene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks, *Nature*. 3月9日; 374 (6518) : 168 - 73 (1995); Nuttall SDら、Isolation of the new antigen receptor from wobbegong sharks, and use as a scaffold for the display of protein loop libraries, *Mol Immunol*. Aug; 38 (4) : 313 - 26 (2001); Hamers-Castermansら、Naturally occurring antibody devoid of light chains, *Nature*. 1993年6月3日; 363 (6428) : 446 - 8; Gill DSら、Biopharmaceutical drug discovery using novel protein scaffolds, *Curr Opin Biotechnol*. Dec; 17 (6) : 653 - 8 (2006). Epub 2006年10月19日を参照されたい。  
10

#### 【0096】

例えは、抗体または抗原結合断片は、遺伝子工学によって產生され得る。この技術では、他の方法と同様に、所望の抗原または免疫原に対し抗体產生細胞を感作させる。抗体產生細胞から単離されたメッセンジャーRNAを鑄型として用いてPCR增幅法を使用してcDNAを作製する。最初の抗原特異性を保持している1つの重鎖遺伝子と1つの軽鎖遺伝子をそれぞれ含有するベクターのライプラリーを、増幅した免疫グロブリンcDNAの適切な切片を発現ベクターに挿入して作製する。重鎖遺伝子ライプラリーと軽鎖遺伝子ライプラリーを組み合わせることにより、コンビナトリアルライプラリーを構築する。こうして重鎖と軽鎖を共発現する（抗体分子のFab断片または抗原結合断片に類似する）クローンのライプラリーが得られる。これらの遺伝子を有するベクターを宿主細胞に共形質移入する。形質移入された宿主で抗体遺伝子合成が誘導されるとき、重鎖及び軽鎖タンパク質は自己組織化して、抗原または免疫原でのスクリーニングによって検出することができる活性な抗体を產生する。  
20

#### 【0097】

対象となる抗体コード配列には、天然の配列によってコードされるもの、ならびに遺伝子コードの縮重のために、開示された核酸と配列が同一でない核酸、及びその変異体が含まれる。変異体ポリペプチドは、アミノ酸（「aa」）置換、付加または欠失を含み得る。アミノ酸置換は、保存的アミノ酸置換、あるいはグリコシリ化部位を改変するため、または機能のために必要ではない1つまたは複数のシステイン残基の置換または欠失によるミスフォールディングを最小限にするためなど、非必須アミノ酸を除外する置換であり得る。変異体は、タンパク質の特定の領域（例えは、機能的ドメイン、触媒アミノ酸残基など）の増強された生物学的活性を保持または有するように設計されることができる。変異体はさらに、本明細書中で開示されたポリペプチドの断片、特に生物学的に活性な断片及び/または機能的ドメインに対応する断片も含む。クローンされた遺伝子のインビトロ突然変異生成のための技術は公知である。タンパク質分解に対するそれらの耐性を改善するため、または溶解特性を最適化するため、またはそれらを治療薬としてより好適にするために、通常の分子生物学的技術を使用して修飾されたポリペプチドも主題の発明に含まれる。  
30

#### 【0098】

キメラ抗体は、1つの種の抗体產生細胞から得られる可変軽鎖及び重鎖領域（V<sub>L</sub>及びV<sub>H</sub>）を別の種由来の定常軽鎖及び重鎖領域と組み合わせることによる組み換え手段によって作成され得る。典型的には、キメラ抗体は、主にヒトドメインを有する抗体を產生するために、げっ歯類またはウサギ可変領域及びヒト定常領域を利用する。かかるキメラ抗体の產生は当該技術分野で公知であり、そして標準的手段によって達成され得る（例えは、その全体において参照により本明細書に組み込まれる米国特許第5,624,659号で記載されているとおり）。本発明のキメラ抗体のヒト定常領域は、IgG1、IgG2  
40

、 $IgG3$ 、及び $IgG4$ 定常領域から選択され得ることがさらに企図される。

【0099】

さらに多くのヒト様免疫グロブリンドメインを含有するようにヒト化抗体を操作し、動物由来の抗体の相補性決定領域のみを組み込む。これは、モノクローナル抗体の可変領域の超可変ループの配列を調査し、そしてそれらをヒト抗体鎖の構造に適合させることによって達成される。表面的には複雑であるが、プロセスは実際には簡単である。例えば、参照により全体的に本明細書中に組み込まれる、米国特許第6,187,287号を参照されたい。

【0100】

全免疫グロブリン（またはそれらの組み換え型同等物）に加えて、エピトープ結合部位（例えば、 $Fab$ 、 $F(ab')_2$ 、または他の断片）を含む免疫グロブリン断片が合成され得る。「断片」、または最小免疫グロブリンは、組み換え免疫グロブリン技術を利用して設計され得る。例えば、本発明で使用するための「 $Fv$ 」免疫グロブリンは、融合した可変軽鎖領域及び可変重鎖領域を合成することによって产生することができる。抗体の組み合わせ、例えば2つの異なる $Fv$ 特異性を含む二重特異抗体も興味深い。本発明の別の実施形態では、SMIP（小分子免疫薬）、キャメルボディ、ナノボディ、及び $IgNAR$ が免疫グロブリン断片に包含される。

10

【0101】

免疫グロブリン及びその断片は、翻訳後に修飾して、例えば化学的リンカーなどのエフェクター部分、蛍光色素、酵素、毒素、基質、生物発光物質、放射性物質、化学発光部分などの検出可能部分を付加し得るか、またはストレプトアビジン、アビジンまたはビオチンなどの特異的結合部分などを、本発明の方法及び組成物で利用し得る。さらなるエフェクター分子の例を以下に提供する。

20

【0102】

遺伝コードに従ったポリヌクレオチド配列の翻訳によってポリペプチド配列が得られる（すなわち、ポリヌクレオチド配列がポリペプチド配列を「コード」する）場合、ポリヌクレオチド配列はポリペプチド配列に「対応」し、2つの配列が同じポリペプチド配列をコードする場合、1つのポリヌクレオチド配列は別のポリヌクレオチド配列に「対応」する。

【0103】

30

DNA構築物の「異種性」領域またはドメインは、更に大きなDNA分子の内部の識別可能なセグメントであって、自然界ではその更に大きなDNA分子に伴って見いだされないセグメントである。したがって、異種性領域が哺乳類遺伝子をコードする場合、遺伝子は通常、供給源生物のゲノムにおいて哺乳類ゲノムDNAに隣接しないDNAに隣接する。異種性領域の別の例は、コード配列自体が自然界で見出されない構築物である（例えば、ゲノムコード配列がイントロンを含むcDNA、または天然の遺伝子と異なるコドンを有する合成配列）。対立遺伝子変異または自然発生的な突然変異事象は、本明細書中で定義されるDNAの異種性領域を生じさせない。

【0104】

40

「コード配列」は、（遺伝コードを考慮して）タンパク質またはペプチド配列に対応するかまたはそれをコードするコドンのインフレーム配列である。2つのコード配列は、その配列またはそれらの相補配列が同じアミノ酸配列をコードする場合、互いに対応する。コード配列は、適切な調節配列と関連して転写され、ポリペプチドに翻訳され得る。ポリアデニル化シグナル及び転写停止配列は通常、コード配列に対して3'側に位置する。「プロモーター配列」は、細胞中のRNAポリメラーゼを結合することができ、下流（3'方向）コード配列の転写を開始することができるDNA調節領域である。プロモーター配列は、典型的にはコード配列の転写に影響を及ぼす調節分子（例えば、転写因子）の結合のためのさらなる部位を含有する。RNAポリメラーゼが細胞中のプロモーター配列を結合し、コード配列をmRNAに転写し、これが次にコード配列によってコードされるタンパク質に翻訳される場合、コード配列はプロモーター配列の「制御下」にあるか、または

50

プロモーターに「操作可能に結合」される。

【0105】

ベクターを使用して、DNA、RNAまたはタンパク質などの外来物質を、生物または宿主細胞に導入する。典型的なベクターとしては、組み換えウイルス（ポリヌクレオチドに関して）及びリポソーム（ポリペプチドに関して）が挙げられる。「DNAベクター」は、別のポリヌクレオチドセグメントを付着させて、付着したセグメントの複製をもたらし得るプラスミド、ファージまたはコスミッドなどのレプリコンである。「発現ベクター」は、適切な宿主細胞によってポリペプチド合成を指示する調節配列を含有するDNAベクターである。これは、通常、RNAポリメラーゼを結合し、mRNAの転写を開始するプロモーター、ならびにmRNAのポリペプチド（複数可）への翻訳を指示するリポソーム結合部位及び開始シグナルを意味する。ポリヌクレオチド配列を発現ベクターに適切な部位で、正しいリーディングフレーム中で組み入れ、続いてベクターによって適切な宿主細胞を形質転換することで、前記ポリヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドの產生が可能になる。

【0106】

ポリヌクレオチド配列の「増幅」は、特定の核酸配列の複数コピーのインビトロ產生である。増幅された配列は、通常、DNAの形態である。かかる増幅を実施するためのさまざまな技術が、Van Brunt (Bio/Technol., 8(4):291-294 (1990))による総説に記載されている。ポリメラーゼ連鎖反応またはPCRは、核酸増幅のプロトタイプであり、本明細書におけるPCRの使用は、他の好適な増幅技術の例とみなされるべきである。

【0107】

脊椎動物における抗体の一般構造は、現在、十分に理解されている (Edelman, G. M., Ann. N. Y. Acad. Sci., 190:5 (1971))。抗体は、分子量約23,000ダルトンの2本の同一の軽いポリペプチド鎖（「軽鎖」）、及び分子量53,000~70,000の2本の同一の重い鎖（「重鎖」）からなる。4本の鎖は、ジスルフィド結合によって「Y」字型に結合し、ここで、軽鎖が「Y」字型の開口部分から始まる重鎖を囲む。「Y」字型の「枝」部分はFab領域と呼ばれている。「Y」字型の幹部分はFc領域と呼ばれている。アミノ酸配列の配向は、「Y」字型の頂点のN末端から各鎖の底部のC末端へと向かう。N末端は、それを惹起する抗原に対する特異性を有する可変領域を有し、約100アミノ酸の長さであり、軽鎖と重鎖との間で若干の変動があり、また抗体ごとに若干変動がある。

【0108】

可変領域は、各鎖中で鎖の残りの長さに及び、抗体の特定のクラス内で抗体の特異性（すなわち、それを惹起する抗原）で変化しない定常領域に連結される。免疫グロブリン分子のクラスを決定する定常領域の5つの公知主要クラスがある（ $\gamma$ 、 $\mu$ 、 $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 及び（ガンマ、ミュー、アルファ、デルタ、またはイプシロン）重鎖定常領域に対応するIgG、IgM、IgA、IgD、及びIgE）。定常領域またはクラスは、相補体の活性化 (Kabat, E. A., Structural Concepts in Immunology and Immunochimistry, 第二版, p. 413-436, Holt, Rinehart, Winston (1976))、及び他の細胞応答 (Andrews, D. W. ら、Clinical Immunobiology, pp 1-18, W. B. Sanders (1980); Kohl, S. ら、Immunology, 48:187 (1983)) を含む抗体のその後のエフェクター機能を決定する；一方、可変領域はそれが反応する抗原を決定する。軽鎖は、（カッパ）または（ラムダ）のいずれかとして分類される。各重鎖クラスは、カッパまたはラムダ軽鎖のいずれかを用いて調製することができる。軽鎖及び重鎖は互いに共有結合し、2本の重鎖の「テール」部分は、ハイブリドーマによるかまたはB細胞によるかのいずれかで免疫グロブリンが產生されるときに、共有ジスルフィド結合によって互いに結合される。

【0109】

10

20

30

40

50

表現「可変領域」または「V R」は、抗体を抗原に結合するのに直接関与する、抗体中の軽鎖及び重鎖の各対内のドメインを指す。各重鎖は1端で可変ドメイン( $V_H$ )と、それに続いて複数の定常ドメインを有し；各軽鎖は1端で可変ドメイン( $V_L$ )と、その他端で定常ドメインを有し；軽鎖の定常ドメインは、重鎖の第一定常ドメインと整列し、この軽鎖可変ドメインは重鎖の可変ドメインと整列する。

【0110】

「相補性決定領域」、「超可変領域」、または「CDR」という表現は、抗体の軽鎖及び重鎖の可変領域で見いだされる1つまたは複数の超可変または相補性決定領域(CDR)を指す(Kabat, E. A. ら、Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, Md., (1987)を参照されたい)。これらの表現は、Kabatらによって定義される超可変領域("Sequences of Proteins of Immunological Interest," Kabat E. ら、US Dept. of Health and Human Services, 1983)または抗体の3次元構造における超可変ループ(Chothia and Lesk, J Mol. Biol. 196 901-917 (1987))を含む。各鎖中のCDRは、フレームワーク領域によってごく近接して保持され、他の鎖からのCDRとともに、抗原結合部位の形成に寄与する。CDR内には、抗体-抗原相互作用においてCDRによって使用される重要な接觸残基を表す選択性決定領域(SDR)として記載されている選択アミノ酸が存在する(Kashmiri, S., Methods, 36: 25-34 (2005))。

【0111】

「フレームワーク領域」または「FR」という表現は、抗体の軽鎖及び重鎖の可変領域内の1つまたは複数のフレームワーク領域を指す(Kabat, E. A. ら、Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, Md., (1987)を参照されたい)。これらの表現には、抗体の軽鎖及び重鎖の可変領域内でCDR間に挿入されるアミノ酸配列領域が含まれる。

【0112】

CGRPへの結合活性を有する抗CGRP抗体及びその結合断片

本発明の方法の例示的な実施形態は、抗CGRP抗体及びその断片を対象に投与することを含む。例示的な抗CGRP抗体及び断片は、その全体において参照により本明細書に組み込まれる米国特許公開第2012/0294797号に記載され、追加の例示的な抗CGRP抗体が以下の段落に記載される。

【0113】

抗体Ab1

【0114】

一実施形態では、本発明は、CGRPに対する結合特異性を有し、以下に示される配列を含む可変軽鎖配列を有する、キメラ抗体を含む：QVLTQTAASPVSAAVGSTVTINCQASQSVYDNNYLAWYQQKPGQPPKQLIYSTSTLASGVSSRFKGSGSGTQFTLTISDLECADAAATYYCLGSYDCSSGDCFVFGGGTEVVVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(配列番号1)。

【0115】

本発明は、CGRPに対する結合特異性を有し、以下に示される配列を含む軽鎖配列を有する、キメラ抗体も含む：QVLTQTAASPVSAAVGSTVTINCQASQSVYDNNYLAWYQQKPGQPPKQLIYSTSTLASGVSSRFKGSGSGTQFTLTISDLECADAAATYYCLGSYDCSSGDCFVFGGGTEVVVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(配列番号2)。

10

20

30

40

50

## 【0116】

本発明は、CGRPに対する結合特異性を有し、以下に示される配列を含む可変重鎖配列を有する、キメラ抗体をさらに含む：Q S L E E S G G R L V T P G T P L T L T C T V S G L D L S S Y Y M Q W V R Q A P G K G L E W I G V I G I N D N T Y Y A S W A K G R F T I S R A S S T T V D L K M T S L T T E D T A T Y F C A R G D I W G P G T L V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K R V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y A S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K (配列番号3)。

## 【0117】

本発明は、CGRPに対する結合特異性を有し、以下に示される配列を含む重鎖配列を有する、キメラ抗体も含む：Q S L E E S G G R L V T P G T P L T L T C T V S G L D L S S Y Y M Q W V R Q A P G K G L E W I G V I G I N D N T Y Y A S W A K G R F T I S R A S S T T V D L K M T S L T T E D T A T Y F C A R G D I W G P G T L V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K R V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y A S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K (配列番号4)。

10

## 【0118】

本発明は、配列番号1の可変軽鎖配列または配列番号2の軽鎖配列の相補性決定領域(CDR、または超可変領域)に対応する配列番号5、配列番号6、及び配列番号7のポリペプチド配列のうちの1つまたは複数、及び/または配列番号3の可変重鎖配列または配列番号4の重鎖配列の相補性決定領域(CDR、または超可変領域)に対応する配列番号8、配列番号9、及び配列番号10のポリペプチド配列のうちの1つまたは複数、またはこれらのポリペプチド配列の組合せを含む抗体をさらに企図する。本発明の別の実施形態では、本発明の抗体またはその断片は、上記のCDR、可変重鎖配列及び可変軽鎖配列、及び重鎖配列及び軽鎖配列のうちの1つまたは複数の組合せを含む、あるいはそれらの組合せからなる。

20

## 【0119】

本発明は、CGRPに対する結合特異性を有する抗体の断片も企図する。本発明の一実施形態では、本発明の抗体断片は、配列番号1または配列番号2のポリペプチド配列を含む、あるいはそのポリペプチド配列からなる。本発明の別の実施形態では、本発明の抗体断片は、配列番号3または配列番号4のポリペプチド配列を含む、あるいはそのポリペプチド配列からなる。

30

## 【0120】

本発明のさらなる実施形態では、CGRPに対する結合特異性を有する抗体の断片は、配列番号1の可変軽鎖配列または配列番号2の軽鎖配列の相補性決定領域(CDR、または超可変領域)に対応する配列番号5、配列番号6、及び配列番号7のポリペプチド配列のうちの1つまたは複数を含む、あるいはそれらのポリペプチド配列のうちの1つまたは複数からなる。

40

## 【0121】

本発明のさらなる実施形態では、CGRPに対する結合特異性を有する抗体の断片は、配列番号3の可変重鎖配列または配列番号4の重鎖配列の相補性決定領域(CDR、または超可変領域)に対応する配列番号8、配列番号9、及び配列番号10のポリペプチド配列のうちの1つまたは複数を含む、あるいはそれらのポリペプチド配列のうちの1つまたは複数からなる。

## 【0122】

本発明は、本明細書に記載される抗体断片のうちの1つまたは複数を含む抗体断片も企

50

図する。本発明の一実施形態では、CGRPに対する結合特異性を有する抗体の断片は、次の抗体断片のうちの1つ、2つ、3つ、またはそれより多く(全てを含む)を含む、またはそれらからなる:配列番号1の可変軽鎖領域;配列番号3の可変重鎖領域;配列番号1の可変軽鎖領域の相補性決定領域(配列番号5、配列番号6、及び配列番号7);及び配列番号3の可変重鎖領域の相補性決定領域(配列番号8、配列番号9、及び配列番号10)。

【0123】

本発明の特に好ましい実施形態では、キメラ抗CGRP抗体は、配列番号2及び配列番号4を含み、あるいはそれらからなり、本明細書に記載される生物学的活性のうちの少なくとも1つを有するAb1である。

10

【0124】

本発明のさらに好ましい実施形態では、抗体断片は、CGRPへの結合特異性を有するFab断片(抗原結合断片)を含む、あるいはそのFab断片からなる。抗体Ab1に関して、Fab断片は配列番号1の可変軽鎖配列及び配列番号3の可変重鎖配列を含む。本発明のこの実施形態は、CGRPへの結合特異性を保持したままでの、前記Fab中の配列番号1及び/または配列番号3への付加、欠失及びそれらの変異体をさらに企図する。

【0125】

本明細書において(下に)記載される本発明の一実施形態では、Fab断片は、Ab1の酵素(例えば、パパイン)消化により作製され得る。本発明の別の実施形態では、Ab1などの抗CGRP抗体またはそのFab断片は、CHO細胞、NSO細胞またはHEK293細胞などの哺乳類細胞、真菌系、昆虫系、または微生物系、例えば、酵母細胞(例えば、二倍体ピキア属などの二倍体酵母)及び他の酵母株における発現により作製され得る。好適なピキア属の種にはピキア・パストリスが含まれるが、これに限定されない。

20

【0126】

抗体Ab2

【0127】

一実施形態では、本発明は、CGRPに対する結合特異性を有し、以下に示される配列を含む可変軽鎖配列を有する、ヒト化抗体を含む:QVLQTQSPSSL SASVGDR VTIINCQASQSVYDNNYLA WYQQKPGKVPKQLIYSTSTLAS GVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE D V ATYYCLGSYDCSS GDC FVFGGGTKVEIKR(配列番号11)。

30

【0128】

本発明は、CGRPに対する結合特異性を有し、以下に示される配列を含む軽鎖配列を有する、ヒト化抗体も含む:QVLQTQSPSSL SASVGDR VTIINCQASQSVYDNNYLA WYQQKPGKVPKQLIYSTSTLAS GVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE D V ATYYCLGSYDCSS GDC FVFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS TLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(配列番号12)。

40

【0129】

本発明は、CGRPに対する結合特異性を有し、以下に示される配列を含む可変重鎖配列を有する、ヒト化抗体をさらに含む:EVQLV ESGGGL V Q PGGSLRLSCAVSGL AVSGLDLSSYYM QWVRQAPGKGLEWVGVI GINDNTYYASW AKGRFTISRDN SKTTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARGDIWG QGTLVTVSS(配列番号13)。

【0130】

本発明は、CGRPに対する結合特異性を有し、以下に示される配列を含む重鎖配列を有する、ヒト化抗体も含む:EVQLV ESGGGL V Q PGGSLRLSCAVSGL DLSSYYM QWVRQAPGKGLEWVGVI GINDNTYYASWAKGRF

50

T I S R D N S K T T V Y L Q M N S L R A E D T A V Y F C A R G D I W G Q G T L V  
 T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P  
 V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L  
 G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K R V E P K S C D K T H T C P P C P A P E  
 L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V  
 K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y A S T Y R V V S V L T V L H Q D W  
 L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P  
 S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T  
 T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H  
 N H Y T Q K S L S L S P G K (配列番号 14)。 10

【0131】

本発明は、配列番号 11 の可変軽鎖配列または配列番号 12 の軽鎖配列の相補性決定領域 (CDR、または超可変領域) に対応する配列番号 15、配列番号 16、及び配列番号 17 のポリペプチド配列のうちの 1 つまたは複数、及び / または配列番号 13 の可変重鎖配列または配列番号 14 の重鎖配列の相補性決定領域 (CDR、または超可変領域) に対応する配列番号 18、配列番号 19、及び配列番号 20 のポリペプチド配列のうちの 1 つまたは複数、またはこれらのポリペプチド配列の組合せを含む抗体をさらに企図する。本発明の別の実施形態では、本発明の抗体またはその断片は、上記の CDR、可変重鎖配列及び可変軽鎖配列、ならびに重鎖配列及び軽鎖配列のうちの 1 つまたは複数の (全てを含む) 組合せを含む、あるいはそれらの組合せからなる。 20

【0132】

本発明は、CGRP に対する結合特異性を有する抗体の断片も企図する。本発明の一実施形態では、本発明の抗体断片は、配列番号 11 または配列番号 12 のポリペプチド配列を含む、あるいはそのポリペプチド配列からなる。本発明の別の実施形態では、本発明の抗体断片は、配列番号 13 または配列番号 14 のポリペプチド配列を含む、あるいはそのポリペプチド配列からなる。

【0133】

本発明のさらなる実施形態では、CGRP に対する結合特異性を有する抗体の断片は、配列番号 11 の可変軽鎖配列または配列番号 12 の軽鎖配列の相補性決定領域 (CDR、または超可変領域) に対応する配列番号 15、配列番号 16、及び配列番号 17 のポリペプチド配列のうちの 1 つまたは複数を含む、あるいはそれらのポリペプチド配列のうちの 1 つまたは複数からなる。 30

【0134】

本発明のさらなる実施形態では、CGRP に対する結合特異性を有する抗体の断片は、配列番号 13 の可変重鎖配列または配列番号 14 の重鎖配列の相補性決定領域 (CDR、または超可変領域) に対応する配列番号 18、配列番号 19、及び配列番号 20 のポリペプチド配列のうちの 1 つまたは複数を含む、あるいはそれらのポリペプチド配列のうちの 1 つまたは複数からなる。

【0135】

本発明は、本明細書に記載の抗体断片のうちの 1 つまたは複数を含む、抗体断片も企図する。本発明の一実施形態では、CGRP に対する結合特異性を有する抗体の断片は、次の抗体断片のうちの 1 つ、2 つ、3 つ、またはそれより多く (全てを含む) を含む、またはそれらからなる：配列番号 11 の可変軽鎖領域；配列番号 13 の可変重鎖領域；配列番号 11 の可変軽鎖領域の相補性決定領域 (配列番号 15、配列番号 16、及び配列番号 17)；及び配列番号 13 の可変重鎖領域の相補性決定領域 (配列番号 18、配列番号 19、及び配列番号 20)。 40

【0136】

本発明のある実施形態では、ヒト化抗 CGRP 抗体は、配列番号 12 及び配列番号 14 を含み、あるいはそれらからなり、本明細書に記載される生物学的活性のうちの少なくとも 1 つを有する Ab2 である。 50

## 【0137】

本発明のさらなる実施形態では、抗体断片は、CGRPへの結合特異性を有するFab断片（抗原結合断片）を含む、あるいはそのFab断片からなる。抗体Ab2に関して、Fab断片は配列番号11の可変軽鎖配列及び配列番号13の可変重鎖配列を含む。本発明のこの実施形態は、CGRPへの結合特異性を保持したまでの、前記Fab中の配列番号11及び/または配列番号13への付加、欠失及びそれらの変異体をさらに企図する。

## 【0138】

本明細書において（下に）記載される本発明の一実施形態では、Fab断片は、Ab2の酵素（例えば、パパイン）消化により作製され得る。本発明の別の実施形態では、Ab2などの抗CGRP抗体またはそのFab断片は、CHO細胞、NSO細胞またはHEK293細胞などの哺乳類細胞、真菌系、昆虫系、または微生物系、例えば、酵母細胞（例えば、二倍体ピキア属などの二倍体酵母）及び他の酵母株における発現により作製され得る。好適なピキア属の種にはピキア・パストリスが含まれるが、これに限定されない。

## 【0139】

抗体Ab3

## 【0140】

一実施形態では、本発明は、CGRPに対する結合特異性を有し、以下に示される配列を含む可変軽鎖配列を有する、ヒト化抗体を含む：QVLTQSPSSL SASVGDR 10 VTIINCQASQSVYDNNYLA WYQQKPGKVPKQLIYSTSTLAS GVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCLGSYDCSS GDC FVFGGGTKVEIKR（配列番号21）。

## 【0141】

本発明は、CGRPに対する結合特異性を有し、以下に示される配列を含む軽鎖配列を有する、ヒト化抗体も含む：QVLTQSPSSL SASVGDR VTIINCQASQSVYDNNYLA WYQQKPGKVPKQLIYSTSTLAS GVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCLGSYDCSS GDC FVFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS TLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C 20（配列番号22）。

## 【0142】

本発明は、CGRPに対する結合特異性を有し、以下に示される配列を含む可変重鎖配列を有する、ヒト化抗体をさらに含む：EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGLAVSGLDLSSYYMQWVRQAPGKGLEWVGVI GINDNTYYASWAKGRFTISRDNSKTTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARGDIWGQGTLVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDARVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN A KTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESENQGPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALH 30（配列番号23）。

## 【0143】

本発明は、CGRPに対する結合特異性を有し、以下に示される配列を含む重鎖配列を有する、ヒト化抗体も含む：EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGLDLSSYYMQWVRQAPGKGLEWVGVI GINDNTYYASWAKGRFTISRDNSKTTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARGDIWGQGTLVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDARVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN A KTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESENQGPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALH 40（配列番号24）。

10

20

30

40

50

N H Y T Q K S L S L S P G K (配列番号24)。

【0144】

本発明は、配列番号21の可変軽鎖配列または配列番号22の軽鎖配列の相補性決定領域(CDR、または超可変領域)に対応する配列番号25、配列番号26、及び配列番号27のポリペプチド配列のうちの1つまたは複数、及び/または配列番号23の可変重鎖配列または配列番号24の重鎖配列の相補性決定領域(CDR、または超可変領域)に対応する配列番号28、配列番号29、及び配列番号30のポリペプチド配列のうちの1つまたは複数、またはこれらのポリペプチド配列の組合せを含む抗体をさらに企図する。本発明の別の実施形態では、本発明の抗体またはその断片は、上記のCDR、可変重鎖配列及び可変軽鎖配列、ならびに重鎖配列及び軽鎖配列のうちの1つまたは複数の(全てを含む)組合せを含む、あるいはそれらの組合せからなる。  
10

【0145】

本発明は、CGRPに対する結合特異性を有する抗体の断片も企図する。本発明の一実施形態では、本発明の抗体断片は、配列番号21または配列番号22のポリペプチド配列を含む、あるいはそのポリペプチド配列からなる。本発明の別の実施形態では、本発明の抗体断片は、配列番号23または配列番号24のポリペプチド配列を含む、あるいはそのポリペプチド配列からなる。

【0146】

本発明のさらなる実施形態では、CGRPに対する結合特異性を有する抗体の断片は、配列番号21の可変軽鎖配列または配列番号22の軽鎖配列の相補性決定領域(CDR、または超可変領域)に対応する配列番号25、配列番号26、及び配列番号27のポリペプチド配列のうちの1つまたは複数を含む、あるいはそれらのポリペプチド配列のうちの1つまたは複数からなる。  
20

【0147】

本発明のさらなる実施形態では、CGRPに対する結合特異性を有する抗体の断片は、配列番号23の可変重鎖配列または配列番号24の重鎖配列の相補性決定領域(CDR、または超可変領域)に対応する配列番号28、配列番号29、及び配列番号30のポリペプチド配列のうちの1つまたは複数を含む、あるいはそれらのポリペプチド配列のうちの1つまたは複数からなる。

【0148】

本発明は、本明細書に記載される抗体断片のうちの1つまたは複数を含む抗体断片も企図する。本発明の一実施形態では、CGRPに対する結合特異性を有する抗体の断片は、次の抗体断片のうちの1つ、2つ、3つ、またはそれより多く(全てを含む)を含む、またはそれらからなる:配列番号21の可変軽鎖領域;配列番号23の可変重鎖領域;配列番号21の可変軽鎖領域の相補性決定領域(配列番号25、配列番号26、及び配列番号27);及び配列番号23の可変重鎖領域の相補性決定領域(配列番号28、配列番号29、及び配列番号30)。  
30

【0149】

本発明のある実施形態では、キメラ抗CGRP抗体は、配列番号22及び配列番号24を含み、あるいはそれらからなり、本明細書に記載される生物学的活性のうちの少なくとも1つを有するAb3である。  
40

【0150】

本発明のさらなる実施形態では、抗体断片は、CGRPへの結合特異性を有するFab断片(抗原結合断片)を含む、あるいはそれからなる。抗体Ab3に関して、Fab断片は配列番号21の可変軽鎖配列及び配列番号23の可変重鎖配列を含む。本発明のこの実施形態は、CGRPへの結合特異性を保持したまでの、前記Fab中の配列番号21及び/または配列番号23への付加、欠失及びそれらの変異体をさらに企図する。

【0151】

本明細書において(下に)記載される本発明の一実施形態では、Fab断片は、Ab3の酵素(例えば、パパイン)消化により作製され得る。本発明の別の実施形態では、Ab  
50

3などの抗CGRP抗体またはそのFab断片は、CHO細胞、NSO細胞またはHEK293細胞などの哺乳類細胞、真菌系、昆虫系、または微生物系、例えば、酵母細胞（例えば、二倍体ピキア属などの二倍体酵母）及び他の酵母株における発現により作製され得る。好適なピキア属の種にはピキア・パストリスが含まれるが、これに限定されない。

## 【0152】

抗体Ab4

## 【0153】

一実施形態では、本発明は、CGRPに対する結合特異性を有し、以下に示される配列を含む可変軽鎖配列を有する、キメラ抗体を含む：QVLQTPTSPVSAAVGSTVTINCQASQSVYHNTYLAWYQQKPGQPPKQLIYDASTLASGVPSRFSGSGSGTQFTLTISGVQCNDAAAYYCLGSYDCTNGDCFVFGGGTEVVVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC（配列番号31）。

## 【0154】

本発明は、CGRPに対する結合特異性を有し、以下に示される配列を含む軽鎖配列を有する、キメラ抗体も含む：QVLQTPTSPVSAAVGSTVTINCQASQSVYHNTYLAWYQQKPGQPPKQLIYDASTLASGVPSRFSGSGSGTQFTLTISGVQCNDAAAYYCLGSYDCTNGDCFVFGGGTEVVVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC（配列番号32）。

## 【0155】

本発明は、CGRPに対する結合特異性を有し、以下に示される配列を含む可変重鎖配列を有する、キメラ抗体をさらに含む：QSLLEESGGRLVTPGTPLTLTCSSVSGIDVSGIDLSGYYMNWVRQAPGKGLEWIGVIGINGATYYASWAKGRFTISKTSSSTVDLKMTSLTTEDTATYFCARGDIWGPGLVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAPVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSEREMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESENQOPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVMHEALHNYTQKSLSLSPGK（配列番号33）。

## 【0156】

本発明は、CGRPに対する結合特異性を有し、以下に示される配列を含む重鎖配列を有する、キメラ抗体も含む：QSLLEESGGRLVTPGTPLTLTCSSVSGIDLSGYYMNWVRQAPGKGLEWIGVIGINGATYYASWAKGRFTISKTSSSTVDLKMTSLTTEDTATYFCARGDIWGPGLVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAPVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSEREMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESENQOPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVMHEALHNYTQKSLSLSPGK（配列番号34）。

## 【0157】

本発明は、配列番号31の可変軽鎖配列または配列番号32の軽鎖配列の相補性決定領域（CDR、または超可変領域）に対応する配列番号35、配列番号36、及び配列番号37のポリペプチド配列のうちの1つまたは複数、及び/または配列番号33の可変重鎖配列または配列番号34の重鎖配列の相補性決定領域（CDR、または超可変領域）に対応する配列番号38、配列番号39、及び配列番号40のポリペプチド配列のうちの1つまたは複数、またはこれらのポリペプチド配列の組合せを含む抗体をさらに企図する。本発明の別の実施形態では、本発明の抗体またはその断片は、上記のCDR、可変重鎖配列及び可変軽鎖配列、ならびに重鎖配列及び軽鎖配列のうちの1つまたは複数の（全てを含

10

20

30

40

50

む)組合せを含む、あるいはそれらの組合せからなる。

【0158】

本発明は、CGRPに対する結合特異性を有する抗体の断片も企図する。本発明の一実施形態では、本発明の抗体断片は配列番号31または配列番号32のポリペプチド配列を含む、あるいはそのポリペプチド配列からなる。本発明の別の実施形態では、本発明の抗体断片は配列番号33または配列番号34のポリペプチド配列を含む、あるいはそのポリペプチド配列からなる。

【0159】

本発明のさらなる実施形態では、CGRPに対する結合特異性を有する抗体の断片は、配列番号31の可変軽鎖配列または配列番号32の軽鎖配列の相補性決定領域(CDR、または超可変領域)に対応する配列番号35、配列番号36、及び配列番号37のポリペプチド配列のうちの1つまたは複数を含む、あるいはそれらのポリペプチド配列のうちの1つまたは複数からなる。

【0160】

本発明のさらなる実施形態では、CGRPに対する結合特異性を有する抗体の断片は、配列番号33の可変重鎖配列または配列番号34の重鎖配列の相補性決定領域(CDR、または超可変領域)に対応する配列番号38、配列番号39、及び配列番号40のポリペプチド配列のうちの1つまたは複数を含む、あるいはそれらのポリペプチド配列のうちの1つまたは複数からなる。

【0161】

本発明は、本明細書に記載される抗体断片のうちの1つまたは複数を含む抗体断片も企図する。本発明の一実施形態では、CGRPに対する結合特異性を有する抗体の断片は、次の抗体断片のうちの1つ、2つ、3つ、またはそれより多く(全てを含む)を含む、あるいはそれらからなる:配列番号31の可変軽鎖領域;配列番号33の可変重鎖領域;配列番号31の可変軽鎖領域の相補性決定領域(配列番号35、配列番号36、及び配列番号37);及び配列番号33の可変重鎖領域の相補性決定領域(配列番号38、配列番号39、及び配列番号40)。

【0162】

本発明のある実施形態では、ヒト化抗CGRP抗体は、配列番号32及び配列番号34を含み、あるいはそれらからなり、本明細書に記載される生物学的活性のうちの少なくとも1つを有するAb4である。

【0163】

本発明のさらなる実施形態では、抗体断片は、CGRPへの結合特異性を有するFab断片(抗原結合断片)を含む、あるいはそれからなる。抗体Ab4に関して、Fab断片は配列番号31の可変軽鎖配列及び配列番号33の可変重鎖配列を含む。本発明のこの実施形態は、CGRPへの結合特異性を保持したままでの、前記Fab中の配列番号31及び/または配列番号33への付加、欠失及びそれらの変異体をさらに企図する。

【0164】

本明細書において(下に)記載される本発明の一実施形態では、Fab断片は、Ab4の酵素(例えば、パパイン)消化により作製され得る。本発明の別の実施形態では、Ab4などの抗CGRP抗体またはそのFab断片は、CHO細胞、NSO細胞またはHEK293細胞などの哺乳類細胞、真菌系、昆虫系、または微生物系、例えば、酵母細胞(例えば、二倍体ピキア属などの二倍体酵母)及び他の酵母株における発現により作製され得る。好適なピキア属の種にはピキア・パストリスが含まれるが、これに限定されない。

【0165】

抗体Ab5

【0166】

一実施形態では、本発明は、CGRPに対する結合特異性を有し、以下に示される配列を含む可変軽鎖配列を有する、ヒト化抗体を含む:QVLTQSPSSL SASVGDR VTIINCQASQSVYHNTYLA WYQQKPGKVPKQLIYDASTLAS

10

20

30

40

50

G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D V A T Y Y C L G S Y D C T N  
G D C F V F G G G T K V E I K R (配列番号41)。

【0167】

本発明は、CGRPに対する結合特異性を有し、以下に示される配列を含む軽鎖配列を有する、ヒト化抗体も含む：Q V L T Q S P S S L S A S V G D R V T I N C Q A S Q S  
V Y H N T Y L A W Y Q Q K P G K V P K Q L I Y D A S T L A S G V P S R F S G S G  
S G T D F T L T I S S L Q P E D V A T Y Y C L G S Y D C T N G D C F V F G G G T  
K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R  
E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S  
K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C (配列番号42) 10

。

【0168】

本発明は、CGRPに対する結合特異性を有し、以下に示される配列を含む可変重鎖配列を有する、ヒト化抗体をさらに含む：E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C  
A V S G I D L S G Y Y M N W V R Q A P G K G L E W V G V I G I N G A T Y Y A S W  
A K G R F T I S R D N S K T T V Y L Q M N S L R A E D T A V Y F C A R G D I W G  
Q G T L V T V S S (配列番号43)。

【0169】

本発明は、CGRPに対する結合特異性を有し、以下に示される配列を含む重鎖配列を有する、ヒト化抗体も含む：E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A V S G I  
D L S G Y Y M N W V R Q A P G K G L E W V G V I G I N G A T Y Y A S W A K G R F  
T I S R D N S K T T V Y L Q M N S L R A E D T A V Y F C A R G D I W G Q G T L V  
T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P  
V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L  
G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K R V E P K S C D K T H T C P P C P A P E  
L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V  
K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y A S T Y R V V S V L T V L H Q D W  
L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P  
S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T  
T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H  
N H Y T Q K S L S L S P G K (配列番号44) 30

【0170】

本発明は、配列番号41の可変軽鎖配列または配列番号42の軽鎖配列の相補性決定領域(CDR、または超可変領域)に対応する配列番号45、配列番号46、及び配列番号47のポリペプチド配列のうちの1つまたは複数、及び/または配列番号43の可変重鎖配列または配列番号44の重鎖配列の相補性決定領域(CDR、または超可変領域)に対応する配列番号48、配列番号49、及び配列番号50のポリペプチド配列のうちの1つまたは複数、またはこれらのポリペプチド配列の組合せを含む抗体をさらに企図する。本発明の別の実施形態では、本発明の抗体またはその断片は、上記のCDR、可変重鎖配列及び可変軽鎖配列、ならびに重鎖配列及び軽鎖配列のうちの1つまたは複数の(全てを含む)組合せを含む、あるいはこれらの組合せからなる。 40

【0171】

本発明は、CGRPに対する結合特異性を有する抗体の断片も企図する。本発明の一実施形態では、本発明の抗体断片は、配列番号41または配列番号42のポリペプチド配列を含む、あるいはそのポリペプチド配列からなる。本発明の別の実施形態では、本発明の抗体断片は、配列番号43または配列番号44のポリペプチド配列を含む、あるいはそのポリペプチド配列からなる。

【0172】

本発明のさらなる実施形態では、CGRPに対する結合特異性を有する抗体の断片は、配列番号41の可変軽鎖配列または配列番号42の軽鎖配列の相補性決定領域(CDR、 50

または超可変領域)に対応する配列番号45、配列番号46、及び配列番号47のポリペプチド配列のうちの1つまたは複数を含む、あるいはそれらのポリペプチド配列のうちの1つまたは複数からなる。

【0173】

本発明のさらなる実施形態では、CGRPに対する結合特異性を有する抗体の断片は、配列番号43の可変重鎖配列または配列番号44の重鎖配列の相補性決定領域(CDR、または超可変領域)に対応する配列番号48、配列番号49、及び配列番号50のポリペプチド配列のうちの1つまたは複数を含む、あるいはそれらのポリペプチド配列のうちの1つまたは複数からなる。

【0174】

本発明は、本明細書に記載される抗体断片のうちの1つまたは複数を含む抗体断片も企図する。本発明の一実施形態では、CGRPに対する結合特異性を有する抗体の断片は、次の抗体断片のうちの1つ、2つ、3つ、またはそれより多く(全てを含む)を含む、あるいはそれらからなる:配列番号41の可変軽鎖領域;配列番号43の可変重鎖領域;配列番号41の可変軽鎖領域の相補性決定領域(配列番号45、配列番号46、及び配列番号47);及び配列番号43の可変重鎖領域の相補性決定領域(配列番号48、配列番号49、及び配列番号50)。

【0175】

本発明のある実施形態では、キメラ抗CGRP抗体は、配列番号42及び配列番号44を含み、あるいはそれらからなり、本明細書に記載される生物学的活性のうちの少なくとも1つを有するAb5である。

【0176】

本発明のさらなる実施形態では、抗体断片は、CGRPへの結合特異性を有するFab断片(抗原結合断片)を含む、あるいはそれからなる。抗体Ab5に関して、Fab断片は配列番号41の可変軽鎖配列及び配列番号43の可変重鎖配列を含む。本発明のこの実施形態は、CGRPへの結合特異性を保持したまでの、前記Fab中の配列番号41及び/または配列番号43への付加、欠失及びそれらの変異体をさらに企図する。

【0177】

本明細書において(下に)記載される本発明の一実施形態では、Fab断片は、Ab5の酵素(例えば、パパイン)消化により作製され得る。本発明の別の実施形態では、Ab5などの抗CGRP抗体またはそのFab断片は、CHO細胞、NSO細胞またはHEK293細胞などの哺乳類細胞、真菌系、昆虫系、または微生物系、例えば、酵母細胞(例えば、二倍体ピキア属などの二倍体酵母)及び他の酵母株における発現により作製され得る。好適なピキア属の種にはピキア・パストリスが含まれるが、これに限定されない。

【0178】

抗体Ab6

【0179】

一実施形態では、本発明は、CGRPに対する結合特異性を有し、以下に示される配列を含む可変軽鎖配列を有する、ヒト化抗体を含む:QVLTQSPSSL SASVGDR VTIINCQASQSVYHNTYLA WYQQKPGKVPKQLIYDASTLAS GVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCLGSYDCTNGDCFVFGG T GDCFVFGGGTKVEIKR(配列番号51)。

【0180】

本発明は、CGRPに対する結合特異性を有し、以下に示される配列を含む軽鎖配列を有する、ヒト化抗体も含む:QVLTQSPSSL SASVGDR VTIINCQASQSVYHNTYLA WYQQKPGKVPKQLIYDASTLAS GVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCLGSYDCTNGDCFVFGG T KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(配列番号52)

10

20

30

40

50

。

## 【0181】

本発明は、CGRPに対する結合特異性を有し、以下に示される配列を含む可変重鎖配列を有する、ヒト化抗体をさらに含む：EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSGYYMWNWVRQAPGKGLEWVGVIGINGATYYASWAKGRFTISRDNSKTTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARGDIWGQGTIVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDARVEPKSCDKTHTCPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK（配列番号53）。

## 【0182】

本発明は、CGRPに対する結合特異性を有し、以下に示される配列を含む重鎖配列を有する、ヒト化抗体も含む：EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSGYYMWNWVRQAPGKGLEWVGVIGINGATYYASWAKGRFTISRDNSKTTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARGDIWGQGTIVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDARVEPKSCDKTHTCPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK（配列番号54）。

## 【0183】

本発明は、配列番号51の可変軽鎖配列または配列番号52の軽鎖配列の相補性決定領域（CDR、または超可変領域）に対応する配列番号55、配列番号56、及び配列番号57のポリペプチド配列のうちの1つまたは複数、及び/または配列番号53の可変重鎖配列または配列番号54の重鎖配列の相補性決定領域（CDR、または超可変領域）に対応する配列番号58、配列番号59、及び配列番号60のポリペプチド配列のうちの1つまたは複数、またはこれらのポリペプチド配列の組合せを含む抗体をさらに企図する。本発明の別の実施形態では、本発明の抗体またはその断片は、上記のCDR、可変重鎖配列及び可変軽鎖配列、ならびに重鎖配列及び軽鎖配列のうちの1つまたは複数の（全てを含む）組合せを含む、あるいはそれらの組合せからなる。

## 【0184】

本発明は、CGRPに対する結合特異性を有する抗体の断片も企図する。本発明の一実施形態では、本発明の抗体断片は、配列番号51または配列番号52のポリペプチド配列を含む、あるいはそのポリペプチド配列からなる。本発明の別の実施形態では、本発明の抗体断片は、配列番号53または配列番号54のポリペプチド配列を含む、あるいはそのポリペプチド配列からなる。

## 【0185】

本発明のさらなる実施形態では、CGRPに対する結合特異性を有する抗体の断片は、配列番号51の可変軽鎖配列または配列番号52の軽鎖配列の相補性決定領域（CDR、または超可変領域）に対応する配列番号55、配列番号56、及び配列番号57のポリペプチド配列のうちの1つまたは複数を含む、あるいはこれらのポリペプチド配列のうちの1つまたは複数からなる。

## 【0186】

本発明のさらなる実施形態では、CGRPに対する結合特異性を有する抗体の断片は、配列番号53の可変重鎖配列または配列番号54の重鎖配列の相補性決定領域（CDR、または超可変領域）に対応する配列番号58、配列番号59、及び配列番号60のポリペプチド配列のうちの1つまたは複数を含む、あるいはこれらのポリペプチド配列のうちの1つまたは複数からなる。

## 【0187】

10

20

30

40

50

本発明は、本明細書に記載される抗体断片のうちの1つまたは複数を含む抗体断片も企図する。本発明の一実施形態では、CGRPに対する結合特異性を有する抗体の断片は、次の抗体断片のうちの1つ、2つ、3つ、またはそれより多く(全てを含む)を含む、あるいはそれらからなる:配列番号51の可変軽鎖領域;配列番号53の可変重鎖領域;配列番号51の可変軽鎖領域の相補性決定領域(配列番号55、配列番号56、及び配列番号57);及び配列番号53の可変重鎖領域の相補性決定領域(配列番号58、配列番号59、及び配列番号60)。

【0188】

本発明のある実施形態では、ヒト化抗CGRP抗体は、配列番号52及び配列番号54を含み、あるいはそれらからなり、本明細書に記載される生物学的活性のうちの少なくとも1つを有するAb6である。

10

【0189】

本発明のさらなる実施形態では、抗体断片は、CGRPへの結合特異性を有するFab断片(抗原結合断片)を含む、あるいはそれからなる。抗体Ab6に関して、Fab断片は配列番号51の可変軽鎖配列及び配列番号53の可変重鎖配列を含む。本発明のこの実施形態は、CGRPへの結合特異性を保持したままでの、前記Fab中の配列番号51及び/または配列番号53への付加、欠失及びそれらの変異体をさらに企図する。

【0190】

本明細書において(下に)記載される本発明の一実施形態では、Fab断片は、Ab6の酵素(例えば、パパイン)消化により作製され得る。本発明の別の実施形態では、Ab6などの抗CGRP抗体またはそのFab断片は、CHO細胞、NSO細胞またはHEK293細胞などの哺乳類細胞、真菌系、昆虫系、または微生物系、例えば、酵母細胞(例えば、二倍体ピキア属などの二倍体酵母)及び他の酵母株における発現により作製され得る。好適なピキア属の種にはピキア・パストリスが含まれるが、これに限定されない。

20

【0191】

抗体Ab7

【0192】

一実施形態では、本発明は、CGRPに対する結合特異性を有し、以下に示される配列を含む可変軽鎖配列を有する、キメラ抗体を含む:QVLTQTAASPVSAAVGSTVTINCQASQSVYNYNYLAWYQQKPGQPPKQLIYSTSTLASGVSSRFKGSGSGTQFTLTISDVQCDDAATYYCLGSYDCSTGDCFVFGGGTEVVVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE(配列番号61)。

30

【0193】

本発明は、CGRPに対する結合特異性を有し、以下に示される配列を含む軽鎖配列を有する、キメラ抗体も含む:QVLTQTAASPVSAAVGSTVTINCQASQSVYNYNYLAWYQQKPGQPPKQLIYSTSTLASGVSSRFKGSGSGTQFTLTISDVQCDDAATYYCLGSYDCSTGDCFVFGGGTEVVVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE(配列番号62)。

40

【0194】

本発明は、CGRPに対する結合特異性を有し、以下に示される配列を含む可変重鎖配列を有する、キメラ抗体をさらに含む:QEQLKESGGRLVTPGTSLTLC TVSGIDLSNHYMQWVRQAPGKGLEWIGVVGINGRTYYASWAKGRFTISRTSSTTVDLKMTRLTTEDTATYFCARGDIWGP GTLVTSS(配列番号63)。

【0195】

本発明は、CGRPに対する結合特異性を有し、以下に示される配列を含む重鎖配列を有する、キメラ抗体も含む:QEQLKESGGRLVTPGTSLTLC TVSGI

50

D L S N H Y M Q W V R Q A P G K G L E W I G V V G I N G R T Y Y A S W A K G R F  
 T I S R T S S T T V D L K M T R L T T E D T A T Y F C A R G D I W G P G T L V T  
 V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V  
 T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G  
 T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K R V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L  
 L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K  
 F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y A S T Y R V V S V L T V L H Q D W L  
 N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S  
 R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T  
 P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N 10  
 H Y T Q K S L S L S P G K (配列番号 64)。

## 【0196】

本発明は、配列番号 61 の可変軽鎖配列または配列番号 62 の軽鎖配列の相補性決定領域 (CDR、または超可変領域) に対応する配列番号 65、配列番号 66、及び配列番号 67 のポリペプチド配列のうちの 1 つまたは複数、及び / または配列番号 63 の可変重鎖配列または配列番号 64 の重鎖配列の相補性決定領域 (CDR、または超可変領域) に対応する配列番号 68、配列番号 69、及び配列番号 70 のポリペプチド配列のうちの 1 つまたは複数、またはこれらのポリペプチド配列の組合せを含む抗体をさらに企図する。本発明の別の実施形態では、本発明の抗体またはその断片は、上記の CDR、可変重鎖配列及び可変軽鎖配列、ならびに重鎖配列及び軽鎖配列のうちの 1 つまたは複数の (全てを含む) 組合せを含む、あるいはそれらの組合せからなる。 20

## 【0197】

本発明は、CGRPに対する結合特異性を有する抗体の断片も企図する。本発明の一実施形態では、本発明の抗体断片は、配列番号 61 または配列番号 62 のポリペプチド配列を含む、あるいはそのポリペプチド配列からなる。本発明の別の実施形態では、本発明の抗体断片は、配列番号 63 または配列番号 64 のポリペプチド配列を含む、あるいはそのポリペプチド配列からなる。

## 【0198】

本発明のさらなる実施形態では、CGRPに対する結合特異性を有する抗体の断片は、配列番号 61 の可変軽鎖配列または配列番号 62 の軽鎖配列の相補性決定領域 (CDR、または超可変領域) に対応する配列番号 65、配列番号 66、及び配列番号 67 のポリペプチド配列のうちの 1 つまたは複数を含む、あるいはそれらのポリペプチド配列のうちの 1 つまたは複数からなる。 30

## 【0199】

本発明のさらなる実施形態では、CGRPに対する結合特異性を有する抗体の断片は、配列番号 63 の可変重鎖配列または配列番号 64 の重鎖配列の相補性決定領域 (CDR、または超可変領域) に対応する配列番号 68、配列番号 69、及び配列番号 70 のポリペプチド配列のうちの 1 つまたは複数を含む、あるいはそれらのポリペプチド配列のうちの 1 つまたは複数からなる。

## 【0200】

本発明は、本明細書に記載される抗体断片のうちの 1 つまたは複数を含む抗体断片も企図する。本発明の一実施形態では、CGRPに対する結合特異性を有する抗体の断片は、次の抗体断片のうちの 1 つ、2 つ、3 つ、またはそれより多く (全てを含む) を含む、あるいはそれらからなる：配列番号 61 の可変軽鎖領域；配列番号 63 の可変重鎖領域；配列番号 61 の可変軽鎖領域の相補性決定領域 (配列番号 65、配列番号 66、及び配列番号 67)；及び配列番号 63 の可変重鎖領域の相補性決定領域 (配列番号 68、配列番号 69、及び配列番号 70)。

## 【0201】

本発明のある実施形態では、キメラ抗 CGRP 抗体は、配列番号 62 及び配列番号 64 を含み、あるいはそれらからなり、本明細書に記載される生物学的活性のうちの少なくと 50

も1つを有するA b 7である。

【0202】

本発明のさらなる実施形態では、抗体断片は、CGRPへの結合特異性を有するFab断片（抗原結合断片）を含む、あるいはそれからなる。抗体Ab7に関して、Fab断片は配列番号61の可変軽鎖配列及び配列番号63の可変重鎖配列を含む。本発明のこの実施形態は、CGRPへの結合特異性を保持したままでの、前記Fab中の配列番号61及び/または配列番号63への付加、欠失及びそれらの変異体をさらに企図する。

【0203】

本明細書において（下に）記載される本発明の一実施形態では、Fab断片は、Ab7の酵素（例えば、パパイン）消化により作製され得る。本発明の別の実施形態では、Ab7などの抗CGRP抗体またはそのFab断片は、CHO細胞、NSO細胞またはHEK293細胞などの哺乳類細胞、真菌系、昆虫系、または微生物系、例えば、酵母細胞（例えば、二倍体ピキア属などの二倍体酵母）及び他の酵母株における発現により作製され得る。好適なピキア属の種にはピキア・パストリスが含まれるが、これに限定されない。

【0204】

抗体Ab8

【0205】

一実施形態では、本発明は、CGRPに対する結合特異性を有し、以下に示される配列を含む可変軽鎖配列を有する、ヒト化抗体を含む：QVLQTQSPSSL SASVGDRVTINCQASQSVYNYNYLAWYQQKPGKVPKQLIYSTSTLASGVPSRFSGS GTDFTLTISSLQPEDVATYYCLGSYDCSTGDCFVFGGT（配列番号71）。

【0206】

本発明は、CGRPに対する結合特異性を有し、以下に示される配列を含む軽鎖配列を有する、ヒト化抗体も含む：QVLQTQSPSSL SASVGDRVTINCQASQSVYNYNYLAWYQQKPGKVPKQLIYSTSTLASGVPSRFSGS GTDFTLTISSLQPEDVATYYCLGSYDCSTGDCFVFGGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C（配列番号72）。

【0207】

本発明は、CGRPに対する結合特異性を有し、以下に示される配列を含む可変重鎖配列を有する、ヒト化抗体をさらに含む：EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNHYMQWVRQAPGKGLEWVGVVGINGRTYYASWAKGRFTISRDNSKTTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARGDIWGQGTLVTVSS（配列番号73）。

【0208】

本発明は、CGRPに対する結合特異性を有し、以下に示される配列を含む重鎖配列を有する、ヒト化抗体も含む：EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNHYMQWVRQAPGKGLEWVGVVGINGRTYYASWAKGRFTISRDNSKTTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARGDIWGQGTLVTVSSA STKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESENQGPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALH

10

20

30

40

50

N H Y T Q K S L S L S P G K (配列番号 74)。

【0209】

本発明は、配列番号 71 の可変軽鎖配列または配列番号 72 の軽鎖配列の相補性決定領域 (CDR、または超可変領域) に対応する配列番号 75、配列番号 76、及び配列番号 77 のポリペプチド配列のうちの 1つまたは複数、及び / または配列番号 73 の可変重鎖配列または配列番号 74 の重鎖配列の相補性決定領域 (CDR、または超可変領域) に対応する配列番号 78、配列番号 79、及び配列番号 80 のポリペプチド配列のうちの 1つまたは複数、またはこれらのポリペプチド配列の組合せを含む抗体をさらに企図する。本発明の別の実施形態では、本発明の抗体またはその断片は、上記の CDR、可変重鎖配列及び可変軽鎖配列、ならびに重鎖配列及び軽鎖配列のうちの 1つまたは複数の (全てを含む) 組合せを含む、あるいはそれらの組合せからなる。10

【0210】

本発明は、CGRPに対する結合特異性を有する抗体の断片も企図する。本発明の一実施形態では、本発明の抗体断片は、配列番号 71 または配列番号 72 のポリペプチド配列を含む、あるいはそのポリペプチド配列からなる。本発明の別の実施形態では、本発明の抗体断片は、配列番号 73 または配列番号 74 のポリペプチド配列を含む、あるいはそのポリペプチド配列からなる。

【0211】

本発明のさらなる実施形態では、CGRPに対する結合特異性を有する抗体の断片は、配列番号 71 の可変軽鎖配列または配列番号 72 の軽鎖配列の相補性決定領域 (CDR、または超可変領域) に対応する配列番号 75、配列番号 76、及び配列番号 77 のポリペプチド配列のうちの 1つまたは複数を含む、あるいはそれらのポリペプチド配列のうちの 1つまたは複数からなる。20

【0212】

本発明のさらなる実施形態では、CGRPに対する結合特異性を有する抗体の断片は、配列番号 73 の可変重鎖配列または配列番号 74 の重鎖配列の相補性決定領域 (CDR、または超可変領域) に対応する配列番号 78、配列番号 79、及び配列番号 80 のポリペプチド配列のうちの 1つまたは複数を含む、あるいはそれらのポリペプチド配列のうちの 1つまたは複数からなる。

【0213】

本発明は、本明細書に記載される抗体断片のうちの 1つまたは複数を含む抗体断片も企図する。本発明の一実施形態では、CGRPに対する結合特異性を有する抗体の断片は、次の抗体断片のうちの 1つ、2つ、3つ、またはそれより多く (全てを含む) を含む、あるいはそれらからなる：配列番号 71 の可変軽鎖領域；配列番号 73 の可変重鎖領域；配列番号 71 の可変軽鎖領域の相補性決定領域 (配列番号 75、配列番号 76、及び配列番号 77)；及び配列番号 73 の可変重鎖領域の相補性決定領域 (配列番号 78、配列番号 79、及び配列番号 80)。30

【0214】

本発明のある実施形態では、ヒト化抗CGRP抗体は、配列番号 72 及び配列番号 74 を含み、あるいはそれらからなり、本明細書に記載される生物学的活性のうちの少なくとも 1つを有する Ab8 である。40

【0215】

本発明のさらなる実施形態では、抗体断片は、CGRPへの結合特異性を有する Fab 断片 (抗原結合断片) を含む、あるいはそれからなる。抗体 Ab8 に関して、Fab 断片は配列番号 71 の可変軽鎖配列及び配列番号 73 の可変重鎖配列を含む。本発明のこの実施形態は、CGRPへの結合特異性を保持したままでの、前記 Fab 中の配列番号 71 及び / または配列番号 73 への付加、欠失及びそれらの変異体をさらに企図する。

【0216】

本明細書において (下に) 記載される本発明の一実施形態では、Fab 断片は、Ab8 の酵素 (例えば、パパイン) 消化により作製され得る。本発明の別の実施形態では、Ab50

8などの抗CGRP抗体またはそのFab断片は、CHO細胞、NSO細胞またはHEK293細胞などの哺乳類細胞、真菌系、昆虫系、または微生物系、例えば、酵母細胞（例えば、二倍体ピキア属などの二倍体酵母）及び他の酵母（yeast）株における発現により作製され得る。好適なピキア属の種にはピキア・パストリスが含まれるが、これに限定されない。

## 【0217】

抗体Ab9

## 【0218】

一実施形態では、本発明は、CGRPに対する結合特異性を有し、以下に示される配列を含む可変軽鎖配列を有する、キメラ抗体を含む：QVLQTQTPSPVSAAVGST  
VTINCQASQNVYNNNYLAWYQQKPGQPPKQLIYSTSTLAS  
GVSSRFRGSGSGTQFTLTISDVQCDDAATYYCLGSYDCSR  
GDCFVFGGGTEVVVKR（配列番号81）。

10

## 【0219】

本発明は、CGRPに対する結合特異性を有し、以下に示される配列を含む軽鎖配列を有する、キメラ抗体も含む：QVLQTQTPSPVSAAVGSTVTINCQASQNVYNNNYLAWYQQKPGQPPKQLIYSTSTLASGVSSRFRGSGSGTQFTLTISDVQCDDAATYYCLGSYDCSRGDCFVFGGGTEVVVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR  
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTSL  
KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE（配列番号82）

20

。

## 【0220】

本発明は、CGRPに対する結合特異性を有し、以下に示される配列を含む可変重鎖配列を有する、キメラ抗体をさらに含む：QSLLEESGGRLVTPGTPLTLTCT  
VSGIGLSSYYMQWVRQSPGGRGLEWIGVIGSDGKTYATWA  
KGRFTISKTSSTVDLRMASLTTEDTATYFCTRGRDIWGP  
TLVTVSS（配列番号83）。

## 【0221】

本発明は、CGRPに対する結合特異性を有し、以下に示される配列を含む重鎖配列を有する、キメラ抗体も含む：QSLLEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGIG  
LSSYYMQWVRQSPGGRGLEWIGVIGSDGKTYATWA  
KGRFTISKTSSTVDLRMASLTTEDTATYFCTRGRDIWGP  
TLVTVSS  
SASTKGPSVFP LAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEP  
VSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT  
QTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTC  
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV  
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLN  
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTI  
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPS  
PVLDS  
YTQKSLSLSPGK（配列番号84）。

30

## 【0222】

本発明は、配列番号81の可変軽鎖配列または配列番号82の軽鎖配列の相補性決定領域（CDR、または超可変領域）に対応する配列番号85、配列番号86、及び配列番号87のポリペプチド配列のうちの1つまたは複数、及び/または配列番号83の可変重鎖配列または配列番号84の重鎖配列の相補性決定領域（CDR、または超可変領域）に対応する配列番号88、配列番号89、及び配列番号90のポリペプチド配列のうちの1つまたは複数、またはこれらのポリペプチド配列の組合せを含む抗体をさらに企図する。本発明の別の実施形態では、本発明の抗体またはその断片は、上記のCDR、可変重鎖配列

40

50

及び可変軽鎖配列、ならびに重鎖配列及び軽鎖配列のうちの1つまたは複数の（全てを含む）組合せを含む、あるいはそれらの組合せからなる。

【0223】

本発明は、CGRPに対する結合特異性を有する抗体の断片も企図する。本発明の一実施形態では、本発明の抗体断片は、配列番号81または配列番号82のポリペプチド配列を含む、あるいはそのポリペプチド配列からなる。本発明の別の実施形態では、本発明の抗体断片は、配列番号83または配列番号84のポリペプチド配列を含む、あるいはそのポリペプチド配列からなる。

【0224】

本発明のさらなる実施形態では、CGRPに対する結合特異性を有する抗体の断片は、配列番号81の可変軽鎖配列または配列番号82の軽鎖配列の相補性決定領域（CDR、または超可変領域）に対応する配列番号85、配列番号86、及び配列番号87のポリペプチド配列のうちの1つまたは複数を含む、あるいはそれらのポリペプチド配列のうちの1つまたは複数からなる。

【0225】

本発明のさらなる実施形態では、CGRPに対する結合特異性を有する抗体の断片は、配列番号83の可変重鎖配列または配列番号84の重鎖配列の相補性決定領域（CDR、または超可変領域）に対応する配列番号88、配列番号89、及び配列番号90のポリペプチド配列のうちの1つまたは複数を含む、あるいはそれらのポリペプチド配列のうちの1つまたは複数からなる。

【0226】

本発明は、本明細書に記載される抗体断片のうちの1つまたは複数を含む抗体断片も企図する。本発明の一実施形態では、CGRPに対する結合特異性を有する抗体の断片は、次の抗体断片のうちの1つ、2つ、3つ、またはそれより多く（全てを含む）を含む、あるいはそれらからなる：配列番号81の可変軽鎖領域；配列番号83の可変重鎖領域；配列番号81の可変軽鎖領域の相補性決定領域（配列番号85、配列番号86、及び配列番号87）；及び配列番号83の可変重鎖領域の相補性決定領域（配列番号88、配列番号89、及び配列番号90）。

【0227】

本発明のある実施形態では、キメラ抗CGRP抗体は配列番号82及び配列番号84を含み、あるいはそれらからなり、本明細書に記載される生物学的活性のうちの少なくとも1つを有するAb9、である。

【0228】

本発明のさらなる実施形態では、抗体断片は、CGRPへの結合特異性を有するFab断片（抗原結合断片）を含む、あるいはそれからなる。抗体Ab9に関して、Fab断片は配列番号81の可変軽鎖配列及び配列番号83の可変重鎖配列を含む。本発明のこの実施形態は、CGRPへの結合特異性を保持したまでの、前記Fab中の配列番号81及び/または配列番号83への付加、欠失及びそれらの変異体をさらに企図する。

【0229】

本明細書において（下に）記載される本発明の一実施形態では、Fab断片は、Ab9の酵素（例えば、パパイン）消化により作製され得る。本発明の別の実施形態では、Ab9などの抗CGRP抗体またはそのFab断片は、CHO細胞、NSO細胞またはHEK293細胞などの哺乳類細胞、真菌系、昆虫系、または微生物系、例えば、酵母細胞（例えば、二倍体ピキア属などの二倍体酵母）及び他の酵母株における発現により作製され得る。好適なピキア属の種にはピキア・パストリスが含まれるが、これに限定されない。

【0230】

抗体Ab10

【0231】

一実施形態では、本発明は、CGRPに対する結合特異性を有し、以下に示される配列を含む可変軽鎖配列を有する、ヒト化抗体を含む：QVLTQSPSSL SASVGDR

10

20

30

40

50

VTINCQASQNVYNNNYLAWYQQKPGKVPKQLIYSTSTLAS  
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCLGSYDCSR  
GDCFVFGGGTKVEIKR (配列番号 91)。

## 【0232】

本発明は、CGRPに対する結合特異性を有し、以下に示される配列を含む軽鎖配列を有する、ヒト化抗体も含む：QVL T Q S P S S L S A S V G D R V T I N C Q A S Q N V Y N N N Y L A W Y Q Q K P G K V P K Q L I Y S T S T L A S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D V A T Y Y C L G S Y D C S R G D C F V F G G G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C (配列番号 92)。

## 【0233】

本発明は、CGRPに対する結合特異性を有し、以下に示される配列を含む可変重鎖配列を有する、ヒト化抗体をさらに含む：E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A V S G I G L S S Y Y M Q W V R Q A P G K G L E W V G V I G S D G K T Y Y A T W A K G R F T I S R D N S K T T V Y L Q M N S L R A E D T A V Y F C T R G D I W G Q G T L V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K R V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y A S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K (配列番号 93)。

## 【0234】

本発明は、CGRPに対する結合特異性を有し、以下に示される配列を含む重鎖配列を有する、ヒト化抗体も含む：E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A V S G I G L S S Y Y M Q W V R Q A P G K G L E W V G V I G S D G K T Y Y A T W A K G R F T I S R D N S K T T V Y L Q M N S L R A E D T A V Y F C T R G D I W G Q G T L V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K R V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y A S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K (配列番号 94)。

## 【0235】

本発明は、配列番号 91 の可変軽鎖配列または配列番号 92 の軽鎖配列の相補性決定領域 (CDR、または超可変領域) に対応する配列番号 95、配列番号 96、及び配列番号 97 のポリペプチド配列のうちの 1 つまたは複数、及び / または配列番号 93 の可変重鎖配列または配列番号 94 の重鎖配列の相補性決定領域 (CDR、または超可変領域) に対応する配列番号 98、配列番号 99、及び配列番号 100 のポリペプチド配列のうちの 1 つまたは複数、またはこれらのポリペプチド配列の組合せを含む抗体をさらに企図する。本発明の別の実施形態では、本発明の抗体またはその断片は、上記の CDR、可変重鎖配列及び可変軽鎖配列、ならびに重鎖配列及び軽鎖配列のうちの 1 つまたは複数の (全てを含む) 組合せを含む、あるいはこれらの組合せからなる。

## 【0236】

本発明は、CGRPに対する結合特異性を有する抗体の断片も企図する。本発明の一実施形態では、本発明の抗体断片は、配列番号 91 または配列番号 92 のポリペプチド配列を含む、あるいはそのポリペプチド配列からなる。本発明の別の実施形態では、本発明の抗体断片は、配列番号 93 または配列番号 94 のポリペプチド配列を含む、あるいはそのポリペプチド配列からなる。

## 【0237】

本発明のさらなる実施形態では、CGRPに対する結合特異性を有する抗体の断片は、

10

20

30

40

50

配列番号 9 1 の可変軽鎖配列または配列番号 9 2 の軽鎖配列の相補性決定領域 ( C D R 、または超可変領域) に対応する配列番号 9 5 、配列番号 9 6 、及び配列番号 9 7 のポリペプチド配列のうちの 1 つまたは複数を含む、あるいはそれらのポリペプチド配列のうちの 1 つまたは複数からなる。

【 0 2 3 8 】

本発明のさらなる実施形態では、 C G R P に対する結合特異性を有する抗体の断片は、配列番号 9 3 の可変重鎖配列または配列番号 9 4 の重鎖配列の相補性決定領域 ( C D R 、または超可変領域) に対応する配列番号 9 8 、配列番号 9 9 、及び配列番号 1 0 0 のポリペプチド配列のうちの 1 つまたは複数を含む、あるいはそれらのポリペプチド配列のうちの 1 つまたは複数からなる。

10

【 0 2 3 9 】

本発明は、本明細書に記載される抗体断片のうちの 1 つまたは複数を含む抗体断片も企図する。本発明の一実施形態では、 C G R P に対する結合特異性を有する抗体の断片は、次の抗体断片のうちの 1 つ、 2 つ、 3 つ、またはそれより多く ( 全てを含む ) を含む、あるいはそれらからなる : 配列番号 9 1 の可変軽鎖領域 ; 配列番号 9 3 の可変重鎖領域 ; 配列番号 9 1 の可変軽鎖領域の相補性決定領域 ( 配列番号 9 5 、配列番号 9 6 、及び配列番号 9 7 ) ; 及び配列番号 9 3 の可変重鎖領域の相補性決定領域 ( 配列番号 9 8 、配列番号 9 9 、及び配列番号 1 0 0 ) 。

【 0 2 4 0 】

本発明のある実施形態では、ヒト化抗 C G R P 抗体は、配列番号 9 2 及び配列番号 9 4 を含み、あるいはそれらからなり、本明細書に記載される生物学的活性のうちの少なくとも 1 つを有する A b 1 0 である。

20

【 0 2 4 1 】

本発明のさらなる実施形態では、抗体断片は、 C G R P への結合特異性を有する F a b 断片 ( 抗原結合断片 ) を含む、あるいはそれからなる。抗体 A b 1 0 に関して、 F a b 断片は配列番号 9 1 の可変軽鎖配列及び配列番号 9 3 の可変重鎖配列を含む。本発明のこの実施形態は、 C G R P への結合特異性を保持したままでの、前記 F a b 中の配列番号 9 1 及び / または配列番号 9 3 への付加、欠失及びそれらの変異体をさらに企図する。

【 0 2 4 2 】

本明細書において ( 下に ) 記載される本発明の一実施形態では、 F a b 断片は、 A b 1 0 の酵素 ( 例えば、パパイン ) 消化により作製され得る。本発明の別の実施形態では、 A b 1 0 などの抗 C G R P 抗体またはその F a b 断片は、 C H O 細胞、 N S O 細胞または H E K 2 9 3 細胞などの哺乳類細胞、真菌系、昆虫系、または微生物系、例えば、酵母細胞 ( 例えば、二倍体ピキア属などの二倍体酵母 ) 及び他の酵母株における発現により作製され得る。好適なピキア属の種にはピキア・パストリスが含まれるが、これに限定されない。

30

【 0 2 4 3 】

抗体 A b 1 1

【 0 2 4 4 】

一実施形態では、本発明は、 C G R P に対する結合特異性を有し、以下に示される配列を含む可変軽鎖配列を有する、キメラ抗体を含む : Q V L T Q T A S P V S P A V G S T V T I N C R A S Q S V Y Y N N Y L A W Y Q Q K P G Q P P K Q L I Y S T S T L A S G V S S R F K G S G S G T Q F T L T I S D V Q C D D A A T Y Y C L G S Y D C S N G D C F V F G G G T E V V V K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R ( 配列番号 1 0 1 ) 。

40

【 0 2 4 5 】

本発明は、 C G R P に対する結合特異性を有し、以下に示される配列を含む軽鎖配列を有する、キメラ抗体も含む : Q V L T Q T A S P V S P A V G S T V T I N C R A S Q S V Y Y N N Y L A W Y Q Q K P G Q P P K Q L I Y S T S T L A S G V S S R F K G S G S G T Q F T L T I S D V Q C D D A A T Y Y C L G S Y D C S N G D C F V F G G G T E V V V K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R

50

E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S  
K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C (配列番号102)  
).

【0246】

本発明は、CGRPに対する結合特異性を有し、以下に示される配列を含む可変重鎖配列を有する、キメラ抗体をさらに含む：Q S L E E S G G R L V T P G G S L T L T C T  
V S G I D V T N Y Y M Q W V R Q A P G K G L E W I G V I G V N G K R Y Y A S W A  
K G R F T I S K T S S T T V D L K M T S L T T E D T A T Y F C A R G D I W G P G  
T L V T V S S (配列番号103)。

【0247】

本発明は、CGRPに対する結合特異性を有し、以下に示される配列を含む重鎖配列を有する、キメラ抗体も含む：Q S L E E S G G R L V T P G G S L T L T C T V S G I D  
V T N Y Y M Q W V R Q A P G K G L E W I G V I G V N G K R Y Y A S W A K G R F T  
I S K T S S T T V D L K M T S L T T E D T A T Y F C A R G D I W G P G T L V T V  
S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T  
V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T  
Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K R V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L  
G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F  
N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y A S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N  
G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R  
E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P  
P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H  
Y T Q K S L S L S P G K (配列番号104)。

【0248】

本発明は、配列番号101の可変軽鎖配列または配列番号102の軽鎖配列の相補性決定領域（CDR、または超可変領域）に対応する配列番号105、配列番号106、及び配列番号107のポリペプチド配列のうちの1つまたは複数、及び/または配列番号103の可変重鎖配列または配列番号104の重鎖配列の相補性決定領域（CDR、または超可変領域）に対応する配列番号108、配列番号109、及び配列番号110のポリペプチド配列のうちの1つまたは複数、またはこれらのポリペプチド配列の組合せを含む抗体をさらに企図する。本発明の別の実施形態では、本発明の抗体またはその断片は、上記のCDR、可変重鎖配列及び可変軽鎖配列、ならびに重鎖配列及び軽鎖配列のうちの1つまたは複数の（全てを含む）組合せを含む、あるいはそれらの組合せからなる。

【0249】

本発明は、CGRPに対する結合特異性を有する抗体の断片も企図する。本発明の一実施形態では、本発明の抗体断片は、配列番号101または配列番号102のポリペプチド配列を含む、あるいはそのポリペプチド配列からなる。本発明の別の実施形態では、本発明の抗体断片は、配列番号103または配列番号104のポリペプチド配列を含む、あるいはそのポリペプチド配列からなる。

【0250】

本発明のさらなる実施形態では、CGRPに対する結合特異性を有する抗体の断片は、配列番号101の可変軽鎖配列または配列番号102の軽鎖配列の相補性決定領域（CDR、または超可変領域）に対応する配列番号105、配列番号106、及び配列番号107のポリペプチド配列のうちの1つまたは複数を含む、あるいはこれらのポリペプチド配列のうちの1つまたは複数からなる。

【0251】

本発明のさらなる実施形態では、CGRPに対する結合特異性を有する抗体の断片は、配列番号103の可変重鎖配列または配列番号104の重鎖配列の相補性決定領域（CDR、または超可変領域）に対応する配列番号108、配列番号109、及び配列番号110のポリペプチド配列のうちの1つまたは複数を含む、あるいはこれらのポリペプチド配

10

20

30

40

50

列のうちの 1 つまたは複数からなる。

【 0 2 5 2 】

本発明は、本明細書に記載される抗体断片のうちの 1 つまたは複数を含む抗体断片も企図する。本発明の一実施形態では、C G R P に対する結合特異性を有する抗体の断片は、次の抗体断片のうちの 1 つ、2 つ、3 つ、またはそれより多く（全てを含む）を含む、あるいはそれらからなる：配列番号 1 0 1 の可変軽鎖領域；配列番号 1 0 3 の可変重鎖領域；配列番号 1 0 1 の可変軽鎖領域の相補性決定領域（配列番号 1 0 5、配列番号 1 0 6、及び配列番号 1 0 7）；及び配列番号 1 0 3 の可変重鎖領域の相補性決定領域（配列番号 1 0 8、配列番号 1 0 9、及び配列番号 1 1 0）。

【 0 2 5 3 】

本発明のある実施形態では、キメラ抗 C G R P 抗体は、配列番号 1 0 2 及び配列番号 1 0 4 を含み、あるいはそれらからなり、本明細書に記載される生物学的活性のうちの少なくとも 1 つを有する A b 1 1 である。

【 0 2 5 4 】

本発明のさらなる実施形態では、抗体断片は、C G R P への結合特異性を有する F a b 断片（抗原結合断片）を含む、あるいはそれからなる。抗体 A b 1 1 に関して、F a b 断片は配列番号 1 0 1 の可変軽鎖配列及び配列番号 1 0 3 の可変重鎖配列を含む。本発明のこの実施形態は、C G R P への結合特異性を保持したままでの、前記 F a b 中の配列番号 1 0 1 及び / または配列番号 1 0 3 への付加、欠失及びそれらの変異体をさらに企図する。

【 0 2 5 5 】

本明細書において（下に）記載される本発明の一実施形態では、F a b 断片は、A b 1 1 の酵素（例えば、パパイン）消化により作製され得る。本発明の別の実施形態では、A b 1 1 などの抗 C G R P 抗体またはその F a b 断片は、C H O 細胞、N S O 細胞または H E K 2 9 3 細胞などの哺乳類細胞、真菌系、昆虫系、または微生物系、例えば、酵母細胞（例えば、二倍体ピキア属などの二倍体酵母）及び他の酵母株における発現により作製され得る。好適なピキア属の種にはピキア・パストリスが含まれるが、これに限定されない。

【 0 2 5 6 】

抗体 A b 1 2

【 0 2 5 7 】

一実施形態では、本発明は、C G R P に対する結合特異性を有し、以下に示される配列を含む可変軽鎖配列を有する、ヒト化抗体を含む：Q V L T Q S P S S L S A S V G D R V T I N C R A S Q S V Y Y N N Y L A W Y Q Q K P G K V P K Q L I Y S T S T L A S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D V A T Y Y C L G S Y D C S N G D C F V F G G G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C（配列番号 1 1 1）。

【 0 2 5 8 】

本発明は、C G R P に対する結合特異性を有し、以下に示される配列を含む軽鎖配列を有する、ヒト化抗体も含む：Q V L T Q S P S S L S A S V G D R V T I N C R A S Q S V Y Y N N Y L A W Y Q Q K P G K V P K Q L I Y S T S T L A S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D V A T Y Y C L G S Y D C S N G D C F V F G G G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C（配列番号 1 1 2）。

【 0 2 5 9 】

本発明は、C G R P に対する結合特異性を有し、以下に示される配列を含む可変重鎖配列を有する、ヒト化抗体をさらに含む：E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A V S G I D V T N Y Y M Q W V R Q A P G K G L E W V G V I G V N G K R Y Y A S W A K G R F T I S R D N S K T T V Y L Q M N S L R A E D T A V Y F C A R G D I W G

10

20

30

40

50

Q G T L V T V S S (配列番号 113)。

【0260】

本発明は、CGRPに対する結合特異性を有し、以下に示される配列を含む重鎖配列を有する、ヒト化抗体も含む：EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDVTNYYMQWVRQAPGKGLEWVGVIGVNGKRYYASWAKGRFTISRDNSKTTVYLMQNSLRAEDTAVYFCARGDIWGQGTLVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYPPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAPVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPGPCAPELLGGPSVFLFPFPKPKDTLMISRTPETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 114)。

10

【0261】

本発明は、配列番号 111 の可変軽鎖配列または配列番号 112 の軽鎖配列の相補性決定領域 (CDR、または超可変領域) に対応する配列番号 115、配列番号 116、及び配列番号 117 のポリペプチド配列のうちの 1 つまたは複数、及び / または配列番号 113 の可変重鎖配列または配列番号 114 の重鎖配列の相補性決定領域 (CDR、または超可変領域) に対応する配列番号 118、配列番号 119、及び配列番号 120 のポリペプチド配列のうちの 1 つまたは複数、またはこれらのポリペプチド配列の組合せを含む抗体をさらに企図する。本発明の別の実施形態では、本発明の抗体またはその断片は、上記の CDR、可変重鎖配列及び可変軽鎖配列、ならびに重鎖配列及び軽鎖配列のうちの 1 つまたは複数の (全てを含む) 組合せを含む、あるいはそれらの組合せからなる。

20

【0262】

本発明は、CGRPに対する結合特異性を有する抗体の断片も企図する。本発明の一実施形態では、本発明の抗体断片は、配列番号 111 または配列番号 112 のポリペプチド配列を含む、あるいはそのポリペプチド配列からなる。本発明の別の実施形態では、本発明の抗体断片は、配列番号 113 または配列番号 114 のポリペプチド配列を含む、あるいはそのポリペプチド配列からなる。

30

【0263】

本発明のさらなる実施形態では、CGRPに対する結合特異性を有する抗体の断片は、配列番号 111 の可変軽鎖配列または配列番号 112 の軽鎖配列の相補性決定領域 (CDR、または超可変領域) に対応する配列番号 115、配列番号 116、及び配列番号 117 のポリペプチド配列のうちの 1 つまたは複数を含む、あるいはこれらのポリペプチド配列のうちの 1 つまたは複数からなる。

【0264】

本発明のさらなる実施形態では、CGRPに対する結合特異性を有する抗体の断片は、配列番号 113 の可変重鎖配列または配列番号 114 の重鎖配列の相補性決定領域 (CDR、または超可変領域) に対応する配列番号 118、配列番号 119、及び配列番号 120 のポリペプチド配列のうちの 1 つまたは複数を含む、あるいはそれらのポリペプチド配列のうちの 1 つまたは複数からなる。

40

【0265】

本発明は、本明細書に記載される抗体断片のうちの 1 つまたは複数を含む抗体断片も企図する。本発明の一実施形態では、CGRPに対する結合特異性を有する抗体の断片は、次の抗体断片のうちの 1 つ、2 つ、3 つ、またはそれより多く (全てを含む) を含む、あるいはそれらからなる：配列番号 111 の可変軽鎖領域；配列番号 113 の可変重鎖領域；配列番号 111 の可変軽鎖領域の相補性決定領域 (配列番号 115、配列番号 116、及び配列番号 117)；及び配列番号 113 の可変重鎖領域の相補性決定領域 (配列番号

50

118、配列番号119、及び配列番号120)。

【0266】

本発明のある実施形態では、ヒト化抗CGRP抗体は、配列番号112及び配列番号114を含み、あるいはそれからなり、本明細書に記載される生物学的活性のうちの少なくとも1つを有するAb12である。

【0267】

本発明のさらなる実施形態では、抗体断片は、CGRPへの結合特異性を有するFab断片(抗原結合断片)を含む、あるいはそれからなる。抗体Ab12に関して、Fab断片は配列番号111の可変軽鎖配列及び配列番号113の可変重鎖配列を含む。本発明のこの実施形態は、CGRPへの結合特異性を保持したままでの、前記Fab中の配列番号111及び/または配列番号113への付加、欠失及びそれらの変異体をさらに企図する。

【0268】

本明細書において(下に)記載される本発明の一実施形態では、Fab断片は、Ab12の酵素(例えば、パパイン)消化により作製され得る。本発明の別の実施形態では、Ab12などの抗CGRP抗体またはそのFab断片は、CHO細胞、NSO細胞またはHEK293細胞などの哺乳類細胞、真菌系、昆虫系、または微生物系、例えば、酵母細胞(例えば、二倍体ピキア属などの二倍体酵母)及び他の酵母株における発現により作製され得る。好適なピキア属の種にはピキア・パストリスが含まれるが、これに限定されない。

【0269】

抗体Ab13

【0270】

一実施形態では、本発明は、CGRPに対する結合特異性を有し、以下に示される配列を含む可変軽鎖配列を有する、キメラ抗体を含む: AIVMTQTPTSSKSVPVGDTVTINCQASESLYNNNALAWFQQKPGQPPKRLIYDASKLASGVPSRFSGGSGTQFTLTISGVQCDDAATYYCGGYRSDSVDGVAFAGGTEVVVVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR

【0271】

本発明は、CGRPに対する結合特異性を有し、以下に示される配列を含む軽鎖配列を有する、キメラ抗体も含む: AIVMTQTPTSSKSVPVGDTVTINCQASESLYNNNALAWFQQKPGQPPKRLIYDASKLASGVPSRFSGGSGTQFTLTISGVQCDDAATYYCGGYRSDSVDGVAFAGGTEVVVVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR

【0272】

本発明は、CGRPに対する結合特異性を有し、以下に示される配列を含む可変重鎖配列を有する、キメラ抗体をさらに含む: QSVEESGGGLVQPEGSLTLTCTASGFDSSNAMWWVRQAPGKGLEWIGCIYNGDGSTYYASWVNGRF

【0273】

本発明は、CGRPに対する結合特異性を有し、以下に示される配列を含む重鎖配列を有する、キメラ抗体も含む: QSVEESGGGLVQPEGSLTLTCTASGFDSSNAMWWVRQAPGKGLEWIGCIYNGDGSTYYASWVNGRF

10

20

30

40

50

G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K R V E P K S C D K T H T C P P C P A P E  
 L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V  
 K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y A S T Y R V V S V L T V L H Q D W  
 L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P  
 S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T  
 T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H  
 N H Y T Q K S L S L S P G K (配列番号 124)。

## 【0274】

本発明は、配列番号 121 の可変軽鎖配列または配列番号 122 の軽鎖配列の相補性決定領域 (CDR、または超可変領域) に対応する配列番号 125、配列番号 126、及び配列番号 127 のポリペプチド配列のうちの 1 つまたは複数、及び / または配列番号 123 の可変重鎖配列または配列番号 124 の重鎖配列の相補性決定領域 (CDR、または超可変領域) に対応する配列番号 128、配列番号 129、及び配列番号 130 のポリペプチド配列のうちの 1 つまたは複数、またはこれらのポリペプチド配列の組合せを含む抗体をさらに企図する。本発明の別の実施形態では、本発明の抗体またはその断片は、上記の CDR、可変重鎖配列及び可変軽鎖配列、ならびに重鎖配列及び軽鎖配列のうちの 1 つまたは複数の (全てを含む) 組合せを含む、あるいはそれらの組合せからなる。

## 【0275】

本発明は、CGRPに対する結合特異性を有する抗体の断片も企図する。本発明の一実施形態では、本発明の抗体断片は、配列番号 121 または配列番号 122 のポリペプチド配列を含む、あるいはそのポリペプチド配列からなる。本発明の別の実施形態では、本発明の抗体断片は、配列番号 123 または配列番号 124 のポリペプチド配列を含む、あるいはそのポリペプチド配列からなる。

## 【0276】

本発明のさらなる実施形態では、CGRPに対する結合特異性を有する抗体の断片は、配列番号 121 の可変軽鎖配列または配列番号 122 の軽鎖配列の相補性決定領域 (CDR、または超可変領域) に対応する配列番号 125、配列番号 126、及び配列番号 127 のポリペプチド配列のうちの 1 つまたは複数を含む、あるいはこれらのポリペプチド配列のうちの 1 つまたは複数からなる。

## 【0277】

本発明のさらなる実施形態では、CGRPに対する結合特異性を有する抗体の断片は、配列番号 123 の可変重鎖配列または配列番号 124 の重鎖配列の相補性決定領域 (CDR、または超可変領域) に対応する配列番号 128、配列番号 129、及び配列番号 130 のポリペプチド配列のうちの 1 つまたは複数を含む、あるいはそれらのポリペプチド配列のうちの 1 つまたは複数からなる。

## 【0278】

本発明は、本明細書に記載される抗体断片のうちの 1 つまたは複数を含む抗体断片も企図する。本発明の一実施形態では、CGRPに対する結合特異性を有する抗体の断片は、次の抗体断片のうちの 1 つ、2 つ、3 つ、またはそれより多く (全てを含む) を含む、あるいはそれらからなる：配列番号 121 の可変軽鎖領域；配列番号 123 の可変重鎖領域；配列番号 121 の可変軽鎖領域の相補性決定領域 (配列番号 125、配列番号 126、及び配列番号 127)；及び配列番号 123 の可変重鎖領域の相補性決定領域 (配列番号 128、配列番号 129、及び配列番号 130)。

## 【0279】

本発明のある実施形態では、キメラ抗CGRP抗体は、配列番号 122 及び配列番号 124 を含み、あるいはそれらからなり、本明細書に記載される生物学的活性のうちの少なくとも 1 つを有する Ab13 である。

## 【0280】

本発明のさらなる実施形態では、抗体断片は、CGRPへの結合特異性を有する Fab 断片 (抗原結合断片) を含む、あるいはそれからなる。抗体 Ab13 に関して、Fab 断

10

20

30

40

50

片は配列番号121の可変軽鎖配列及び配列番号123の可変重鎖配列を含む。本発明のこの実施形態は、CGRPへの結合特異性を保持したままでの、前記Fab中の配列番号121及び/または配列番号123への付加、欠失及びそれらの変異体をさらに企図する。

【0281】

本明細書において(下に)記載される本発明の一実施形態では、Fab断片は、Ab13の酵素(例えば、パパイン)消化により作製され得る。本発明の別の実施形態では、Ab13などの抗CGRP抗体またはそのFab断片は、CHO細胞、NSO細胞またはHEK293細胞などの哺乳類細胞、真菌系、昆虫系、または微生物系、例えば、酵母細胞(例えば、二倍体ピキア属などの二倍体酵母)及び他の酵母株における発現により作製され得る。好適なピキア属の種にはピキア・パストリスが含まれるが、これに限定されない。

10

【0282】

抗体Ab14

【0283】

一実施形態では、本発明は、CGRPに対する結合特異性を有し、以下に示される配列を含む可変軽鎖配列を有する、ヒト化抗体を含む: QVLTQSPSSL SASVGDR VTIINCQASQNVYNNNYLAWYQQKPGKVPKQLIYSTSTLAS GVPNSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCLGSYDCSR GDCFVFGGGTKVEIKR(配列番号131)。

20

【0284】

本発明は、CGRPに対する結合特異性を有し、以下に示される配列を含む軽鎖配列を有する、ヒト化抗体も含む: QVLTQSPSSL SASVGDRVTIINCQASQNVYNNNYLAWYQQKPGKVPKQLIYSTSTLAS GVPNSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCLGSYDCSRGDCFVFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE(配列番号132)。

【0285】

30

本発明は、CGRPに対する結合特異性を有し、以下に示される配列を含む可変重鎖配列を有する、ヒト化抗体をさらに含む: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIGLSSYYMQWVRQAPGKGLEWVGVI GSDGKTYYATWAKGRFTISRDN SKTTVY LQMNSLRAEDTAVYFCTR GDIWGQGT LV

TVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVN HKPSNTKVDARVEPKSCDKTHTCP PCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN A KTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWE SNGQ PENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS C S VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(配列番号134)。

40

【0287】

50

本発明は、配列番号 131 の可変軽鎖配列または配列番号 132 の軽鎖配列の相補性決定領域 (CDR、または超可変領域) に対応する配列番号 135、配列番号 136、及び配列番号 137 のポリペプチド配列のうちの 1つまたは複数、及び / または配列番号 133 の可変重鎖配列または配列番号 134 の重鎖配列の相補性決定領域 (CDR、または超可変領域) に対応する配列番号 138、配列番号 139、及び配列番号 140 のポリペプチド配列のうちの 1つまたは複数、またはこれらのポリペプチド配列の組合せを含む抗体をさらに企図する。本発明の別の実施形態では、本発明の抗体またはその断片は、上記の CDR、可変重鎖配列及び可変軽鎖配列、ならびに重鎖配列及び軽鎖配列のうちの 1つまたは複数の (全てを含む) 組合せを含む、あるいはそれらの組合せからなる。

【0288】

10

本発明は、CGRPに対する結合特異性を有する抗体の断片も企図する。本発明の一実施形態では、本発明の抗体断片は配列番号 131 または配列番号 132 のポリペプチド配列を含む、あるいはそのポリペプチド配列からなる。本発明の別の実施形態では、本発明の抗体断片は配列番号 133 または配列番号 134 のポリペプチド配列を含む、あるいはそのポリペプチド配列からなる。

【0289】

本発明のさらなる実施形態では、CGRPに対する結合特異性を有する抗体の断片は、配列番号 131 の可変軽鎖配列または配列番号 132 の軽鎖配列の相補性決定領域 (CDR、または超可変領域) に対応する配列番号 135、配列番号 136、及び配列番号 137 のポリペプチド配列のうちの 1つまたは複数を含む、あるいはそれらのポリペプチド配列のうちの 1つまたは複数からなる。

20

【0290】

本発明のさらなる実施形態では、CGRPに対する結合特異性を有する抗体の断片は、配列番号 133 の可変重鎖配列または配列番号 134 の重鎖配列の相補性決定領域 (CDR、または超可変領域) に対応する配列番号 138、配列番号 139、及び配列番号 140 のポリペプチド配列のうちの 1つまたは複数を含む、あるいはそれらのポリペプチド配列のうちの 1つまたは複数からなる。

【0291】

30

本発明は、本明細書に記載される抗体断片のうちの 1つまたは複数を含む抗体断片も企図する。本発明の一実施形態では、CGRPに対する結合特異性を有する抗体の断片は、次の抗体断片のうちの 1つ、2つ、3つ、またはそれより多く (全てを含む) を含む、あるいはそれらからなる：配列番号 131 の可変軽鎖領域；配列番号 133 の可変重鎖領域；配列番号 131 の可変軽鎖領域の相補性決定領域 (配列番号 135、配列番号 136、及び配列番号 137)；及び配列番号 133 の可変重鎖領域の相補性決定領域 (配列番号 138、配列番号 139、及び配列番号 140)。

【0292】

本発明のある実施形態では、ヒト化抗CGRP抗体は、配列番号 132 及び配列番号 134 を含み、あるいはそれらからなり、本明細書に記載される生物学的活性のうちの少なくとも 1つを有する Ab14 である。

【0293】

40

本発明のさらなる実施形態では、抗体断片は、CGRPへの結合特異性を有する Fab 断片 (抗原結合断片) を含む、あるいはそれからなる。抗体 Ab14 に関して、Fab 断片は配列番号 131 の可変軽鎖配列及び配列番号 133 の可変重鎖配列を含む。本発明のこの実施形態は、CGRPへの結合特異性を保持したままでの、前記 Fab 中の配列番号 131 及び / または配列番号 133 への付加、欠失及びそれらの変異体をさらに企図する。

【0294】

本明細書において (下に) 記載される本発明の一実施形態では、Fab 断片は、Ab14 の酵素 (例えば、パパイン) 消化により作製され得る。本発明の別の実施形態では、Ab14 などの抗CGRP抗体またはその Fab 断片は、CHO細胞、NSO細胞または H

50

E K 2 9 3 細胞などの哺乳類細胞、真菌系、昆虫系、または微生物系、例えば、酵母細胞（例えば、二倍体ピキア属などの二倍体酵母）及び他の酵母株における発現により作製され得る。好適なピキア属の種にはピキア・パストリスが含まれるが、これに限定されない。

【 0 2 9 5 】

別の実施形態では、抗体断片は、次の非限定の形態：F a b 抗体形態、F a b ' 抗体形態、F ( a b ' )<sub>2</sub> 抗体形態、F v 及び単鎖F v 抗体形態のうちの1つまたは複数の形態で存在し得る。好ましい実施形態では、本明細書に記載される抗C G R P 抗体は、以下に示される配列を含む 定常軽鎖配列をさらに含む：

【 0 2 9 6 】

V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C (配列番号283)。

【 0 2 9 7 】

別の好ましい実施形態では、本明細書に記載される抗C G R P 抗体は、以下に示される配列を含む - 1 定常重鎖ポリペプチド配列をさらに含む：

【 0 2 9 8 】

A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K R V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y A S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K (配列番号284)。

【 0 2 9 9 】

別の実施形態では、本発明は、配列番号3、13、23、33、43、53、63、73、83、93、103、113、123、または133から選択されるV<sub>H</sub> ポリペプチド配列またはその変異体を含み、そして、配列番号1、11、21、31、41、51、61、71、81、91、101、111、121、または131から選択されるV<sub>L</sub> ポリペプチド配列またはその変異体をさらに含む単離抗C G R P 抗体であって、前記V<sub>H</sub> ポリペプチドまたはV<sub>L</sub> ポリペプチド中のフレームワーク残基（F R 残基）のうちの1つまたは複数が別のアミノ酸残基で置換されており、C G R P に特異的に結合する抗C G R P 抗体がその結果生じる、単離抗C G R P 抗体を企図する。本発明は、これらの抗体のヒト化形態及びキメラ形態を企図する。キメラ抗体は、I g G 1 定常領域、I g G 2 定常領域、I g G 3 定常領域、I g G 4 定常領域、I g G 5 定常領域、I g G 6 定常領域、I g G 7 定常領域、I g G 8 定常領域、I g G 9 定常領域、I g G 1 0 定常領域、I g G 1 1 定常領域、I g G 1 2 定常領域、I g G 1 3 定常領域、I g G 1 4 定常領域、I g G 1 5 定常領域、I g G 1 6 定常領域、I g G 1 7 定常領域、I g G 1 8 定常領域またはI g G 1 9 定常領域に由来するF c を含み得る。

【 0 3 0 0 】

本発明の一実施形態では、該抗体またはV<sub>H</sub> ポリペプチドまたはV<sub>L</sub> ポリペプチドは、本明細書において言及されるヒト化処理の開始前に1つまたは複数のウサギB細胞集団に起源を発する、または1つまたは複数のウサギB細胞集団から選択される。

【 0 3 0 1 】

本発明の別の実施形態では、抗C G R P 抗体及びその断片は、C G R P - R への結合特異性を有しない。本発明のさらなる実施形態では、抗C G R P 抗体及びその断片は、C G R P のC G R P - R との会合を阻害する。本発明の別の実施形態では、抗C G R P 抗体及びその断片は、C G R P のC G R P - R 及び / または追加のタンパク質及び / またはそれ

10

20

30

40

50

らのマルチマーとの会合を阻害する、及び／または、それらの生物学的效果を拮抗する。

【0302】

上述のように、抗体及びその断片を翻訳後に修飾して、化学リンカーなどのエフェクター部分、例えば蛍光性色素、酵素、基質、生物発光物質、放射性物質及び化学発光部分などの検出可能部分、または、例えばストレプトアビシン、アビシン、ビオチン、細胞毒素、細胞傷害剤及び放射性物質などの機能部分を付加し得る。

【0303】

抗体またはその断片はまた、化学的に修飾されて、ポリペプチドの溶解性、安定性及び循環時間（インビボ半減期）の増加または免疫原性の低下などの追加の利点を提供し得る（米国特許第4,179,337号を参照されたい）。誘導体化のための化学部分は、ポリエチレングリコール、エチレングリコール／プロピレングリコール共重合体、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコールなどのような水溶性高分子から選択され得る。抗体及びその断片は、その分子内の無作為な位置、またはその分子内の所定の位置で修飾され得、1つ、2つ、3つ、またはより多くの結合化学部分を含み得る。

【0304】

高分子は任意の分子量でよく、分岐型でも非分岐型でもよい。ポリエチレングリコールについては、好ましい分子量は、使いやすさと製造しやすさのため、約1kDaから約100kDa（用語「約」は、ポリエチレングリコールの調製においては、規定の分子量よりもいくつかの分子は重く、いくつかの分子は軽いということを表している）間である。所望の治療プロファイル（例えば、所望の持続性放出の期間、もしあれば、生物活性に対する効果、使いやすさ、抗原性の程度またはその欠如、及び治療性タンパク質または類似体に対するポリエチレングリコールの他の公知の効果）に応じて他のサイズを使用してよい。例えば、ポリエチレングリコールは、約200、500、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、8500、9000、9500、10,000、10,500、11,000、11,500、12,000、12,500、13,000、13,500、14,000、14,500、15,000、15,500、16,000、16,500、17,000、17,500、18,000、18,500、19,000、19,500、20,000、25,000、30,000、35,000、40,000、50,000、55,000、60,000、65,000、70,000、75,000、80,000、85,000、90,000、95,000、または100,000kDaの平均分子量を有し得る。分岐型ポリエチレングリコールは、例えば、米国特許第5,643,575号、Morpurgorら、Appl. Biochem. Biotechnol. 56:59-72 (1996); Vorobjevら、Nucleosides Nucleotides 18:2745-2750 (1999); 及びCalicetiら、Bioconjug. Chem. 10:638-646 (1999)に記載されており、それらのそれぞれの開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【0305】

当業者が利用することができる多数の結合方法が存在し、例えば、欧州特許第0401384号、参照により本明細書に組み込まれる（G-CSFへのPEGの結合）を参照されたい。（トレシルクロリドを使用するGM-CSFのPEG化を報告する）Malikら、Exp. Hematol. 20:1028-1035 (1992)も参照されたい。例えば、ポリエチレングリコールは、遊離アミノ基または遊離カルボキシル基などの反応性基を介してアミノ酸残基を通して共有結合され得る。反応性基は、活性型ポリエチレングリコール分子が結合され得る基である。遊離アミノ基を有するアミノ酸残基には、リシン残基及びN末端アミノ酸残基が含まれ得る。遊離カルボキシル基を有するアミノ酸残基には、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基及びC末端アミノ酸残基が含まれ得る。スルフヒドリル基もポリエチレングリコール分子を結合するための反応性基として用いられ

10

20

30

40

50

得る。N末端またはリシン基での結合など、アミノ基での結合が治療目的にとって好ましい。

【0306】

上で示唆されているように、ポリエチレングリコールは、多数のアミノ酸残基のうちのいずれかへの結合を介してタンパク質に結合され得る。例えば、ポリエチレングリコールは、リシン残基、ヒスチジン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、またはシステイン残基への共有結合を介してポリペプチドに結合することができる。1つまたは複数の反応化学を用いてポリエチレングリコールを特定のアミノ酸残基（例えば、リシン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、またはシステイン）に、または複数の種類のアミノ酸残基（例えば、リシン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、システイン及びそれらの組合せ）に結合し得る。 10

【0307】

あるいは、抗体またはその断片は、アルブミン（組換えヒト血清アルブミンまたはその断片または変異体（例えば、1999年3月2日に発行された米国特許第5,876,969号、欧州特許第0 413 622号、及び1998年6月16日に発行された米国特許第5,766,883号を参照されたく、それらはその全体において参照により本明細書に組み込まれる）を含むが、これらに限定されない）またはトランスフェリンまたはフェリチンなどの他の循環血中タンパク質との融合を介して増加したインビボ半減期を有し得る。好ましい実施形態では、本発明のポリペプチド及び/または抗体（それらの断片または変異体を含む）は、成熟型のヒト血清アルブミン（すなわち、その全体において参照により本明細書に組み込まれる、欧州特許第0 322 094号の図1及び図2に示されるヒト血清アルブミンのアミノ酸1~585）と融合される。本発明の融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドも本発明に包含される。 20

【0308】

検出可能部分に関して、さらに例示的な酵素には、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、アルカリホスファターゼ、-ガラクトシダーゼ及びルシフェラーゼが含まれるが、これらに限定されない。さらに例示的な蛍光性物質には、ローダミン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ウンベリフェロン、ジクロロトリアジニルアミン、フィコエリトリン及びダンシルクロリドが含まれるが、これらに限定されない。さらに例示的な化学発光部分には、ルミノールが含まれるが、これに限定されない。さらに例示的な生物発光物質には、ルシフェリン及びイクオリンが含まれるが、これらに限定されない。さらに例示的な放射性物質にはヨウ素125(<sup>125</sup>I)、炭素14(<sup>14</sup>C)、イオウ35(<sup>35</sup>S)、トリチウム(<sup>3</sup>H)及びリン32(<sup>32</sup>P)が含まれるが、これらに限定されない。 30

【0309】

機能部分に関して、例示的な細胞傷害剤には、メトトレキサート、アミノブテリン、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシルダカルバジン；メクロレタミン、チオテパクロラムブチル、メルファラン、カルムスチン(BSN)、マイトマイシンC、ロムスチン(CCNU)、1-メチルニトロソウレア、シクロホスファミド、メクロレタミン、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC、cis-ジクロロジアミンプラチナ(II)(DDP)、シスプラチニン、カルボプラチニン(パラプラチニン)などのアルキル化剤；ダウノルビシン(以前のダウノマイシン)、ドキソルビシン(アドリアマイシン)、デトルビシン、カルミノマイシン、イダルビシン、エピルビシン、ミトキサントロン及びビサントレンを含むアントラサイクリン類；ダクチノマイシン(アクチノマイシンD)、ブレオマイシン、カリケアマイシン、ミトラマイシン、及びアントラマイシン(AMC)を含む抗生物質；及び、ビンカアルカロイド、ビンクリスチン及びビンプラスチンなどの抗有糸分裂剤が含まれるが、これらに限定されない。他の細胞傷害剤には、パクリタキセル(タキソール)、リシン、緑膿菌外毒素、ゲムシタビン、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化工チジウム、エメチン、エトポシド、テニポシド、コルヒチン、ジヒドロキシアントラシンジオン、1- 40

デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、ピューロマイシン、プロカルバジン、ヒドロキシウレア、アスパラギナーゼ、コルチコステロイド、ミトタン( O , P ' - ( D D D ) )、インターフェロン、及びこれらの細胞傷害剤の混合物が含まれる。

【0310】

さらなる細胞傷害剤には、カルボプラチニン、シスプラチニン、パクリタキセル、ゲムシタビン、カリケアマイシン、ドキソルビシン、5 - フルオロウラシル、マイトマイシンC、アクチノマイシンD、シクロホスファミド、ビンクリスチン及びブレオマイシンなどの化学療法剤が含まれるが、これらに限定されない。リシン、ジフテリア毒素及び綠膿菌毒素などの植物及び細菌に由来する毒性酵素をヒト化抗体またはキメラ抗体、またはそれらの結合断片、にコンジュゲートして細胞種特異的殺滅剤を作製し得る ( Youleら、Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 77 : 5483 ( 1980 ) ; Gillilandら、Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 77 : 4539 ( 1980 ) 、Krolickら、Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 77 : 5419 ( 1980 ) )。

【0311】

他の細胞傷害剤には、Goldenbergにより米国特許第6,653,104号に記載される細胞傷害性リボヌクレーゼが含まれる。本発明の実施形態は、粒子または

粒子を放射する放射性核種が、複合体形成剤を使用して、または使用せずに抗体またはその結合断片に安定的に連結されている放射性免疫複合体にも関する。かかる放射性核種には、リン - 32 ( <sup>32</sup>P ) 、スカンジウム - 47 ( <sup>47</sup>Sc ) 、銅 - 67 ( <sup>67</sup>Cu ) 、ガリウム - 67 ( <sup>67</sup>Ga ) 、イットリウム - 88 ( <sup>88</sup>Y ) 、イットリウム - 90 ( <sup>90</sup>Y ) 、ヨウ素 - 125 ( <sup>125</sup>I ) 、ヨウ素 - 131 ( <sup>131</sup>I ) 、サマリウム - 153 ( <sup>153</sup>Sm ) 、ルテチウム - 177 ( <sup>177</sup>Lu ) 、レニウム - 186 ( <sup>186</sup>Re ) またはレニウム - 188 ( <sup>188</sup>Re ) などの放射体、及びアスタチン - 211 ( <sup>211</sup>At ) 、鉛 - 212 ( <sup>212</sup>Pb ) 、ビスマス - 212 ( <sup>212</sup>Bi ) または - 213 ( <sup>213</sup>Bi ) またはアクチニウム - 225 ( <sup>225</sup>Ac ) などの放射体が含まれる。

【0312】

抗体またはその結合断片を検出可能部分などにコンジュゲートするための方法、例えば、Hunterら、Nature 144 : 945 ( 1962 ) ; Davidら、Bioc hemistry 13 : 1014 ( 1974 ) 、Painら、J. Immunol. Meth. 40 : 219 ( 1981 ) 、及び Nygren, J., Histochem. and Cytochem. 30 : 407 ( 1982 ) によって記載される方法などは当技術分野において周知である。

【0313】

本明細書に記載される実施形態は、本明細書に記載される抗体、抗体断片、ディアボディ、SMIP、キャメルボディ、ナノボディ、IgNAR、ポリペプチド、可変領域及びCDRと実質的に相同である変異体及び同等物をさらに含む。これらは、例えば、保存的置換型変異(すなわち、1つまたは複数のアミノ酸の類似のアミノ酸による置換)を含有し得る。例えば、保存的置換は、同一の一般的分類内での1つのアミノ酸の別のアミノ酸での置換、例えば、1つの酸性アミノ酸の別の酸性アミノ酸での置換、1つの塩基性アミノ酸の別の塩基性アミノ酸での置換、または1つの中性アミノ酸の別の中性アミノ酸による置換を指す。保存的アミノ酸置換によって意図されることは、当技術分野において周知である。

【0314】

別の実施形態では、本発明は、本明細書に記載される抗体断片、可変領域及びCDRのポリペプチド配列のうちの任意の1つまたは複数に対して少なくとも90%またはそれを超える配列相同性を有するポリペプチド配列を企図する。より好ましくは、本発明は、本明細書に記載される抗体断片、可変領域及びCDRのポリペプチド配列のうちの任意の1

10

20

30

40

50

つまたは複数に対して、少なくとも 95% またはそれを超える配列相同性、さらにより好みしくは少なくとも 98% またはそれを超える配列相同性、及びより一層好みしくは少なくとも 99% またはそれを超える配列相同性を有するポリペプチド配列を企図する。核酸配列及びアミノ酸配列間の相同性を決定するための方法は、当業者に周知である。

【 0 3 1 5 】

別の実施形態では、本発明は、本明細書に記載される抗体断片、可変領域及び CDR の上に列挙したポリペプチド相同物であって、抗 CGRP 活性をさらに有する相同物をさらに企図する。抗 CGRP 活性の非限定的な例は、本明細書に記載されている。

【 0 3 1 6 】

別の実施形態では、本発明は、任意の前述の配列を結合する抗イディオタイプ抗体の作製と使用をさらに企図する。例示的な実施形態では、かかる抗イディオタイプ抗体は、抗 CGRP 抗体の効果を調節する、低下させる、または中和するために、抗 CGRP 抗体を受けたことがある対象に投与されることができる。かかる抗イディオタイプ抗体は、抗 CGRP 抗体の存在を特徴とする自己免疫疾患の処置にも有用であり得る。かかる抗イディオタイプ抗体のさらなる使用例は、本発明の抗 CGRP 抗体の検出のための使用であり、例えば、対象の血液または他の体液の中に存在する抗 CGRP 抗体のレベルをモニターするための使用である。

【 0 3 1 7 】

本発明は、本明細書に記載される任意の他のポリヌクレオチド配列と置換される本明細書に記載される任意のポリペプチド配列またはポリヌクレオチド配列を含む抗 CGRP 抗体も企図する。例えば、限定されないが、本発明は、本明細書に記載される任意の可変軽鎖配列及び可変重鎖配列の組合せを含む抗体を企図し、本明細書に記載される任意の CDR 配列による本明細書に記載される任意の他の CDR 配列の置換により生じる抗体をさらに企図する。

【 0 3 1 8 】

本発明のさらなる例示的な実施形態

別の実施形態では、本発明は、インタクトなヒト CGRP ポリペプチドまたはその断片上にある、Ab1、Ab2、Ab3、Ab4、Ab5、Ab6、Ab7、Ab8、Ab9、Ab10、Ab11、Ab12、Ab13 または Ab14 から選択される抗ヒト CGRP 抗体と同一の直鎖状または立体的エピトープ（複数可）に特異的に結合する及び / または同一の直鎖状または立体的エピトープ（複数可）への結合について競合する 1 つまたは複数の抗ヒト CGRP 抗体またはその抗体断片を企図する。前記 1 つまたは複数の抗ヒト CGRP 抗体またはその抗体断片は、非天然型の抗体、例えばヒト化抗体またはキメラ抗体、非天然型の抗体断片、タグまたは標識を組み込んだ抗体などであってよい。好みしい実施形態では、該抗ヒト CGRP 抗体またはその断片は、インタクトなヒト CGRP ポリペプチドまたはその断片上にある、Ab3、Ab6、Ab13 または Ab14 と同一の直鎖状または立体的エピトープ（複数可）に特異的に結合する及び / または同一の直鎖状または立体的エピトープ（複数可）への結合について競合する。

【 0 3 1 9 】

本発明の好みしい実施形態は、CGRP への結合特異性を有し、CGRP の CGRP 受容体への結合により仲介される生物学的活性を阻害するキメラ抗体またはヒト化抗体及びそれらの断片（Fab 断片を含む）を対象とする。本発明のある実施形態では、そのキメラ抗 CGRP 抗体またはヒト化抗 CGRP 抗体は、Ab3、Ab6、Ab13、または Ab14 から選択される。

【 0 3 2 0 】

本発明の別の実施形態では、抗ヒト CGRP 抗体は、インタクトな CGRP ポリペプチドまたはその断片上にある、Ab3、Ab6、Ab13 または Ab14 が特異的に結合するエピトープと同一の直鎖状または立体的エピトープであって、天然ヒト CGRP ポリペプチドの全長にわたる重複する直鎖状ペプチド断片を使用するエピトープマッピングによって確定されるエピトープに特異的に結合する抗体である。

10

20

30

40

50

## 【0321】

本発明は、Ab1、Ab2、Ab3、Ab4、Ab5、Ab6、Ab7、Ab8、Ab9、Ab10、Ab11、Ab12、Ab13またはAb14から選択される抗CGRP抗体を含むが、これに限定されない、本明細書において開示される抗体または抗体断片と同一のCGRPエピトープと結合する、及び/またはCGRPへの結合について抗CGRP抗体と競合する抗CGRP抗体も対象とする。

## 【0322】

別の実施形態では、本発明は、3、13、23、33、43、53、63、73、83、93、103、113、123、または133から選択されるV<sub>H</sub>ポリペプチド配列またはその変異体に含有されるCDRのうちの1つまたは複数、及び/または1、11、21、31、41、51、61、71、81、91、101、111、121、または131から選択されるV<sub>L</sub>ポリペプチド配列またはその変異体に含有されるCDRのうちの1つまたは複数を含む単離抗CGRP抗体または抗体断片も対象とする。

10

## 【0323】

本発明は、上で論じられている1つまたは複数の抗ヒトCGRP抗体が、アグリコシル化(aglycosylated)されているか、またはグリコシル化されている場合はマンノース残基のみを含有し；エフェクター機能、半減期、タンパク質分解及び/またはグリコシル化を変化させるように修飾されているFc領域を含有し；ヒト抗体、ヒト化抗体、単鎖抗体またはキメラ抗体であり；ウサギ(親)抗ヒトCGRP抗体に由来するヒト化抗体であることをさらに企図する。

20

## 【0324】

本発明は、1つまたは複数の抗ヒトCGRP抗体であって、前記抗体の軽鎖可変領域及び重鎖可変領域のそれぞれの中にあるフレームワーク領域(FR)が非修飾型のヒトFRであるか、または軽鎖可変領域または重鎖可変領域内の1つまたは複数のヒトFR残基が親ウサギ抗体の対応するFR残基で置換されることにより修飾されているヒトFRである、及び、前記ヒトFRが、ヒト生殖系列抗体配列のライブラリーに含まれる他のヒト生殖系列抗体配列と比べて、対応するウサギ可変重鎖領域または可変軽鎖領域に対する高レベルの相同性に基づいてそのライブラリーから選択されたヒト可変重鎖抗体配列及び可変軽鎖抗体配列より得られたものである、抗ヒトCGRP抗体をさらに企図する。

30

## 【0325】

本発明の一実施形態では、抗ヒトCGRP抗体または断片は、CGRP発現ヒト細胞及び/または循環可溶性CGRP分子にインビボで特異的に結合し、それにはCGRPを発現する細胞と関連がある疾患有する患者のヒト細胞上に発現するCGRPまたはそのヒト細胞によって発現されるCGRPが含まれる。

## 【0326】

本発明は、検出可能標識または治療薬に直接的または間接的に付着されている抗ヒトCGRP抗体または断片をさらに企図する。

## 【0327】

本発明は、上記の抗ヒトCGRP抗体または抗体断片の発現をもたらす、酵母好適性コドンまたはヒト好適性コドンを含むものあるいはそれらからなるものを含む1つまたは複数の核酸配列も企図する。本発明は、前記核酸配列(複数可)を含むベクター(プラスミドベクターまたは組換えウイルスベクターを含む)も企図する。本発明は、上記の抗体の少なくとも1つを発現する、哺乳類細胞、酵母細胞、細菌細胞及び昆虫細胞を含む宿主細胞または組換え宿主細胞も企図する。好ましい実施形態では、宿主細胞は酵母細胞である。さらに好ましい実施形態では、酵母細胞は二倍体酵母細胞である。例示的な実施形態では、酵母細胞はピキア酵母である。

40

## 【0328】

本発明は、CGRP発現細胞に関連する疾患有する患者に本明細書に記載される治療有効量の少なくとも1つの抗ヒトCGRP抗体または断片を投与することを含む処置の方法も企図する。本発明は、その処置方法が本明細書において開示される2つ以

50

上の抗CGRP抗体またはその断片の投与を必然的に含み得ることも企図する。1つよりも多い抗体が患者に投与される場合、複数の抗体を同時または共に投与してよく、または、それらをずらして投与してよい。

【0329】

本発明の抗CGRP抗体及びCGRPに対する結合特異性を有するその断片の抗CGRP活性を、CGRPへのそれらの結合力またはそれらの親和性によっても記載し得る。本発明の一実施形態では、本発明の抗CGRP抗体及びCGRPに対する結合特異性を有するその断片は、 $5 \times 10^{-7}$  M、 $10^{-7}$  M、 $5 \times 10^{-8}$  M、 $10^{-8}$  M、 $5 \times 10^{-9}$  M、 $10^{-9}$  M、 $5 \times 10^{-10}$  M、 $10^{-10}$  M、 $5 \times 10^{-11}$  M、 $10^{-11}$  M、 $5 \times 10^{-12}$  M、 $10^{-12}$  M、 $5 \times 10^{-13}$  M、または $10^{-13}$  M以下の解離定数( $K_D$ )でCGRPに結合する。好ましくは、抗CGRP抗体及びその断片は、 $10^{-11}$  M、 $5 \times 10^{-12}$  M、または $10^{-12}$  M以下の解離定数でCGRPに結合する。本発明の別の実施形態では、本発明の抗CGRP抗体及びCGRPに対する結合特異性を有するその断片は、直鎖状CGRPエピトープまたは立体的CGRPエピトープに結合する。

【0330】

本発明の別の実施形態では、本発明の抗CGRP抗体及びCGRPに対する結合特異性を有するその断片の抗CGRP活性は、 $10^{-4}$  S<sup>-1</sup>、 $5 \times 10^{-5}$  S<sup>-1</sup>、 $10^{-5}$  S<sup>-1</sup>、 $5 \times 10^{-6}$  S<sup>-1</sup>、 $10^{-6}$  S<sup>-1</sup>、 $5 \times 10^{-7}$  S<sup>-1</sup>、または $10^{-7}$  S<sup>-1</sup>以下の解離速度でCGRPに結合する。

【0331】

本発明のさらなる実施形態では、本発明の抗CGRP抗体及びCGRPに対する結合特異性を有するその断片の抗CGRP活性は、CGRPに関連する疾患及び障害の症状を予防、改善、または軽減することにより、あるいはその疾患及び障害を処置することにより抗CGRP活性を呈する。CGRPに関連する疾患及び障害の非限定的な例は、本明細書に記載される。

【0332】

抗CGRP抗体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

【0333】

例示的な実施形態では、抗CGRP抗体は、本明細書に含有される生物学的配列表に記載のポリヌクレオチド配列、または当業者によって容易に同定され得る他のコードするポリヌクレオチドによってコードされ得る。その例としては、配列番号141のポリヌクレオチド(配列番号1のポリペプチドをコードする)、配列番号142のポリヌクレオチド(配列番号2のポリペプチドをコードする)、配列番号143のポリヌクレオチド(配列番号3のポリペプチドをコードする)、配列番号144のポリヌクレオチド(配列番号4のポリペプチドをコードする)、配列番号151のポリヌクレオチド(配列番号11のポリペプチドをコードする)、配列番号152のポリヌクレオチド(配列番号12のポリペプチドをコードする)、配列番号153のポリヌクレオチド(配列番号13のポリペプチドをコードする)、配列番号154のポリヌクレオチド(配列番号14のポリペプチドをコードする)、配列番号161のポリヌクレオチド(配列番号21のポリペプチドをコードする)、配列番号162のポリヌクレオチド(配列番号22のポリペプチドをコードする)、配列番号163のポリヌクレオチド(配列番号23のポリペプチドをコードする)、配列番号164のポリヌクレオチド(配列番号24のポリペプチドをコードする)、配列番号171のポリヌクレオチド(配列番号31のポリペプチドをコードする)、配列番号172のポリヌクレオチド(配列番号32のポリペプチドをコードする)、配列番号173のポリヌクレオチド(配列番号33のポリペプチドをコードする)、配列番号174のポリヌクレオチド(配列番号34のポリペプチドをコードする)、配列番号181のポリヌクレオチド(配列番号41のポリペプチドをコードする)、配列番号182のポリヌクレオチド(配列番号42のポリペプチドをコードする)、配列番号183のポリヌクレオチド(配列番号43のポリペプチドをコードする)、配列番号184のポリヌクレオチド(配列番号44のポリペプチドをコードする)。

10

20

30

40

50

ド（配列番号 44 のポリペプチドをコードする）、配列番号 191 のポリヌクレオチド（配列番号 51 のポリペプチドをコードする）、配列番号 192 のポリヌクレオチド（配列番号 52 のポリペプチドをコードする）、配列番号 193 のポリヌクレオチド（配列番号 53 のポリペプチドをコードする）、配列番号 194 のポリヌクレオチド（配列番号 54 のポリペプチドをコードする）、配列番号 201 のポリヌクレオチド（配列番号 61 のポリペプチドをコードする）、配列番号 202 のポリヌクレオチド（配列番号 62 のポリペプチドをコードする）、配列番号 203 のポリヌクレオチド（配列番号 63 のポリペプチドをコードする）、配列番号 204 のポリヌクレオチド（配列番号 64 のポリペプチドをコードする）、配列番号 211 のポリヌクレオチド（配列番号 71 のポリペプチドをコードする）、配列番号 212 のポリヌクレオチド（配列番号 72 のポリペプチドをコードする）、配列番号 213 のポリヌクレオチド（配列番号 73 のポリペプチドをコードする）10、配列番号 214 のポリヌクレオチド（配列番号 74 のポリペプチドをコードする）、配列番号 221 のポリヌクレオチド（配列番号 81 のポリペプチドをコードする）、配列番号 222 のポリヌクレオチド（配列番号 82 のポリペプチドをコードする）、配列番号 223 のポリヌクレオチド（配列番号 83 のポリペプチドをコードする）、配列番号 224 のポリヌクレオチド（配列番号 84 のポリペプチドをコードする）、配列番号 231 のポリヌクレオチド（配列番号 91 のポリペプチドをコードする）、配列番号 232 のポリヌクレオチド（配列番号 92 のポリペプチドをコードする）、配列番号 233 のポリヌクレオチド（配列番号 93 のポリペプチドをコードする）、配列番号 234 のポリヌクレオチド（配列番号 94 のポリペプチドをコードする）、配列番号 241 のポリヌクレオチド（配列番号 101 のポリペプチドをコードする）、配列番号 242 のポリヌクレオチド（配列番号 102 のポリペプチドをコードする）、配列番号 243 のポリヌクレオチド（配列番号 103 のポリペプチドをコードする）、配列番号 244 のポリヌクレオチド（配列番号 104 のポリペプチドをコードする）、配列番号 251 のポリヌクレオチド（配列番号 111 のポリペプチドをコードする）、配列番号 252 のポリヌクレオチド（配列番号 112 のポリペプチドをコードする）、配列番号 253 のポリヌクレオチド（配列番号 113 のポリペプチドをコードする）、配列番号 254 のポリヌクレオチド（配列番号 114 のポリペプチドをコードする）、配列番号 261 のポリヌクレオチド（配列番号 121 のポリペプチドをコードする）、配列番号 262 のポリヌクレオチド（配列番号 122 のポリペプチドをコードする）、配列番号 263 のポリヌクレオチド（配列番号 123 のポリペプチドをコードする）、配列番号 264 のポリヌクレオチド（配列番号 124 のポリペプチドをコードする）、配列番号 271 のポリヌクレオチド（配列番号 131 のポリペプチドをコードする）、配列番号 272 のポリヌクレオチド（配列番号 132 のポリペプチドをコードする）、配列番号 273 のポリヌクレオチド（配列番号 133 のポリペプチドをコードする）、または配列番号 274 のポリヌクレオチド（配列番号 134 のポリペプチドをコードする）が挙げられる。20

【0334】

B 細胞のスクリーニング及び単離

【0335】

一実施形態では、本発明は、少なくとも 1 つの C G R P 抗原特異的細胞を単離するために使用され得る抗原特異的 B 細胞のクローニング集団の調製及び単離を企図しており、その C G R P 抗原特異的細胞は、C G R P に対するモノクローナル抗体（所望の C G R P 抗原に特異的である）またはかかる抗体に対応する核酸配列の作製に使用されることができる。40 抗原特異的 B 細胞の前記クローニング集団を調製及び単離する方法は、例えば、Carvalho - Jensen らの米国特許公開第 2007/0269868 号に教示されており、その開示は、その全体において参照により本明細書に組み込まれる。抗原特異的 B 細胞の前記クローニング集団を調製及び単離する方法は、本明細書中の実施例においても教示される。サイズまたは密度によって細胞集団を「濃縮する」方法は当技術分野において公知である。例えば、米国特許第 5,627,052 号を参照されたい。これらのステップは、抗原特異性による細胞集団の濃縮に加えて使用され得る。50

## 【0336】

抗体のヒト化方法

## 【0337】

別の実施形態では、本発明は、抗体の重鎖及び軽鎖をヒト化するための方法を企図する。抗CGRP抗体に適用され得る、抗体の重鎖及び軽鎖をヒト化するための方法は、例えば、Olsonらの米国特許出願公開第2009/0022659号及びGarcia-Martinezらの米国特許第7,935,340号に教示されており、それらのそれぞれの開示はそれらの全体において参照により本明細書に組み込まれる。

## 【0338】

スクリーニングアッセイ

10

## 【0339】

本発明は、CGRP関連疾患または障害の症状を呈する患者におけるCGRPに関連する疾患または障害の同定において支援するように設計されたスクリーニングアッセイも含む。例えば、本発明は、対象におけるインスリン不感受性（抵抗性）またはグルコース利用を検出するアッセイを含む。前記対象は、任意選択的に空腹状態または食後状態であり得る。

## 【0340】

本発明の一実施形態では、本発明の抗CGRP抗体またはそのCGRP結合断片を使用して、CGRPに関連する疾患または障害の症状を呈する患者から取得した生体試料中のCGRPの存在を検出する。CGRPが存在すること、または同等の生体試料中の疾患前CGRPレベルと比較してそのレベルが上昇していることは、CGRPに関連する疾患または障害の診断において有益であり得る。

20

## 【0341】

本発明の別の実施形態は、本明細書に明記するCGRP関連疾患または障害の症状を呈する患者におけるCGRPに関連する疾患または障害の診断を支援するための診断アッセイまたはスクリーニングアッセイを提供し、このアッセイは、翻訳後に改変された抗CGRP抗体またはその結合断片を使用して、前記患者からの生体試料中のCGRP発現のレベルをアッセイすることを含む。抗CGRP抗体またはその結合断片を翻訳後に改変して、本開示で上述したような検出可能部分を含み得る。

30

## 【0342】

生体試料中のCGRPレベルは、本明細書に記載の改変された抗CGRP抗体またはその結合断片を使用すること、及び標準のCGRPレベル（例えば、正常な生体試料中のレベル）と生体試料中のCGRPレベルを比較することで決定され得る。熟練した臨床医であれば、正常な生体試料間に若干の変動が存在することを理解し、結果を評価するときにそれを考慮に入れるであろう。本発明の一実施形態では、本発明の抗CGRP抗体を使用して、CGRP発現レベルと特定のグルコース代謝の障害のステージとを相關させ得る。例えば、循環CGRPのレベルとグルコースレベル及び/またはインスリンレベルを相關させることは、インスリン不感受性、または高血糖のレベルを確立することを可能にするだろう。インスリン感受性は、例えば、その全体において参照により本明細書に組み込まれるMuniyappaら、(Am J Physiol Endocrinol Metab 294: E15-E26, 2008)に記載のような、当該分野で公知の方法を使用して対象においてさらに測定され得る。簡潔には、インスリン感受性は、高インスリン血症正常血糖グルコースクリンプ、インスリン分泌抑制試験、QUIICKI、HOMA、1/インスリン、またはMatusda indexを含む種々の方法を用いて測定されてよい。臨床的に規定されたステージの糖尿病の発症または前糖尿病に対応するCGRP発現の範囲を確立するために、当業者であれば多くの対象においてCGRPを測定することができるだろう。

40

## 【0343】

上記のアッセイは、疾患または障害のモニタリングにおいても有用であり得る。この場合、CGRP関連疾患または障害を有すると考えられる患者からの生体試料において得ら

50

れたCGRPレベルを、同一患者から以前に得た生体試料中のCGRPレベルと比較することにより、前記患者のCGRPレベルが、例えば処置レジメンによって変化したかどうかを確認する。当業者であれば、患者のCGRPを様々な時間間隔で測定することにより、グルコースを代謝する個々の能力に対する障害の進行が決定され得ることを理解するであろう。

【0344】

本発明は、インビボで画像化する方法にも関し、この方法は、CGRPを発現する細胞の存在を検出するものであり、診断有効量の診断組成物を投与することを含む。前記検出は、糖尿病を発症するリスクを有する患者または糖尿病についての有効な処置プロトコルを設計するための計画レジメンの一部として有用であることができる。

10

【0345】

一実施形態では、本発明の方法は、インスリン抵抗性、インスリン分泌の障害または高血糖などのグルコース代謝の障害を処置するために、本明細書に開示の抗CGRP抗体と組み合わせて使用される1つまたは複数の組成物を含む。特に対象となるのは、例えば、スルホニル尿素薬、PPAR-作動薬、GLP-1受容体作動薬、ジペプチジルペプチダーゼIV阻害薬、アミリン類似体、ビグアナイド、ドーパミンD2受容体作動薬、メグリチニド、-グルコシダーゼ阻害薬、抗脂質異常症の胆汁酸吸着剤、インスリン、サイトカイン療法、遺伝子療法、及び抗体療法の1つまたは複数、ならびに抗CGRP抗体またはその断片である。ビグアナイドの例としては：メトホルミン、例えばGlucophage及びGlucophage XR (Bristol Myers Squibb/Merck Serono)、Fortamet (Watson)、Glumetza (Bioavail/Depomed/Santarus)、及び後発医薬品が挙げられる。スルホニル尿素薬の例としては、グリメピリド、例えばAmaryl (Sanofi) 及び後発医薬品；グリビジド、例えばGlucotrol及びGlucotrol XL (Pfizer) 及び後発医薬品；グリブリド/グリベンクラミド、例えばDiabeta (Sanofi)、Micronase/Glynase (Pfizer) 及び後発医薬品；メトホルミン+グリブリド、例えばGlucovance (Bristol Myers Squibb)、Suguan M (Sanofi-Aventis)、Glicorest、Gluconorm (Abiogen)、Bi-Euglucon (Rochelle) 及び後発医薬品；メトホルミン+グリビジド、例えばMetaglip (Bristol Myers Squibb)、及び後発医薬品が挙げられる。PPAR-作動薬の例としては：ロシグリタゾン、例えばAvandia (GlaxoSmithKline)；ピオグリタゾン、例えばActos (武田薬品工業) 及び後発医薬品；ロシグリタゾン+メトホルミン、例えばAvandamet (GlaxoSmithKline)；ピオグリタゾン+メトホルミン、例えばActoplus Met XR (武田薬品工業)；ピオグリタゾン+グリメピリド、例えばAvandaryl/Avaglim (GlaxoSmithKline)；ピオグリタゾン+グリメピリド、例えばDuetact/Tandemact/Soniias (武田薬品工業) が挙げられる。GLP-1受容体作動薬の例としては：エキセナチド、例えばByetta (Bristol Myers Squibb/AstraZeneca)；リラグルチド、例えばVictoza (Novo Nordisk)；エキセナチドLAR、例えばBydureon (Bristol Myers Squibb/AstraZeneca) が挙げられる。ジペプチジルペプチダーゼIV (DPP-IVまたはDPP4) 阻害薬の例としては：シタグリブチン、例えばJanuvia (Merck)；ビルダグリブチン、例えばGalvus (Novartis)；サクサグリブチン、例えばOnglyza (Bristol Myers Squibb/AstraZeneca)；アログリブチン、例えばNesina (武田薬品工業/Furiex)；リナグリブチン、例えばTrazenta (Boehringer Ingelheim/Eli Lilly)；テネリグリブチン、例えばTenelia (田辺三菱製薬/第一三共)；シタグリブチン+メトホルミン、例えばJanumet (Merck) 及びJanumet XR (Merck)；シタグリブチン

20

30

40

50

+シンバスタチン、例えばJuvisync (Merck) ; ビルダグリプチン+メトホルミン、例えばEurcreas (Novartis) ; サクサグリプチン+メトホルミン、例えばKombiglyze / Kombiglyze XR (AstraZeneca / Bristol Myers Squibb) ; アログリプチン+ピオグリタゾン、例えばLiovel (武田薬品工業 / Furiex) ; リナグリプチン+メトホルミン、例えばJentadueto (Boehringer Ingelheim / Eli Lilly) が挙げられる。メグリチニドの例としては：レパグリニド、例えばGlucosNorm / Prandin / NovoNorm (第一三共 / Fournier Pharma / Novo Nordisk) ; ナテグリニド、例えばStarlix (Novartis) 、Fastic (第一三共) 、Starsis (アステラス製薬) 及び後発医薬品；ミチグリニド、例えばGlufast (キッセイ薬品工業 / 武田薬品工業) が挙げられる。-グルコシダーゼ阻害薬の例としては：アカルボース、例えばPrecose / Glucobay (Bayer) 及び後発医薬品；ミグリトール、例えばGlyset (Pfizer) 、Diastabol (Sanofi) 、Seiabile (三和化学研究所) 及び後発医薬品；ボグリボース、例えばBasen (武田薬品工業) 及び後発医薬品が挙げられる。胆汁酸吸着剤の例としては：コレセベラム、例えばCholestage 1 (Sanofi) 、Welchol (第一三共) が挙げられる。ドーパミンD2受容体作動薬の例としては、プロモクリプチン、例えばCycloset (Santarus) が挙げられる。アミリン類似体の例としては、プラムリンチド、例えばSymlin (Bristol Myers Squibb / AstraZeneca) が挙げられる。超速効型インスリンの例としては：インスリンリスプロ、例えばHumalog (Eli Lilly) ；インスリンアスパルト、例えばNovolog (Novo Nordisk) 、NovoRapid (Novo Nordisk) 、インスリングルリジン、例えばApidra (Sanofi) が挙げられる。レギュラーヒトインスリンの例としては：Humulin / Umaline Rapide (Eli Lilly) 、Novolin R (Novo Nordisk) 、Actrapid (Sanofi) が挙げられる。中間型インスリンの例としては：Humulin N (Eli Lilly) 、Novolin N (Novo Nordisk) が挙げられる。持効型インスリンとしては：インスリングラルギン、例えばLantus (Sanofi) 及びインスリンデテミール、例えばLevemir (Novo Nordisk) が挙げられる。 10 20 30

#### 【0346】

本発明は、本発明の抗CGRP抗体とCGRPの結合を検出するためのキットをさらに提供する。具体的には、本発明の抗CGRP抗体またはその免疫反応性断片と特異的に反応するCGRPの存在を検出するために、キットが使用され得る。キットには、基質に結合した抗体、抗原と反応する二次抗体、及び二次抗体と抗原の反応を検出するための試薬も含まれ得る。このようなキットはELISAキットであってよく、適宜、基質、一次抗体及び二次抗体を含むことができ、検出可能部分、酵素基質、呈色試薬などの任意の他の必要な試薬、例えば本明細書に記載の試薬を含むことができる。診断キットは、免疫プロットキットの形態であってもよい。診断キットは、化学発光キット (Meso Scale Discovery、メリーランド州ガイサーズバーグ) の形態であってもよい。診断キットは、ランタニド系検出キット (PerkinElmer、カリフォルニア州サンノゼ) であってもよい。 40

#### 【0347】

熟練した臨床医であれば、生体試料には、血清、血漿、尿、唾液、粘液、胸水、滑液及び髄液が含まれるが、これらに限定されないことを理解するであろう。

#### 【0348】

CGRPに関連する疾患及び障害の症状を改善または軽減する方法、またはCGRPに関連する疾患及び障害を処置または予防する方法

本発明の別の実施形態では、本明細書に記載の抗CGRP抗体またはその断片は、CGRPに関連する疾患及び障害の症状の改善または軽減、またはCGRPに関連する疾患及

び障害の処置または予防に有用である。本明細書に記載の抗 C G R P 抗体またはその断片ならびに組み合わせは、C G R P に関する疾患及び障害の処置を必要とする患者に治療有効量で、以下でより詳しく述べる医薬組成物の形で投与することもできる。

【 0 3 4 9 】

本発明の別の実施形態では、本明細書に記載の抗 C G R P 抗体またはその断片は、グルコース耐性の障害、インスリン抵抗性（不感受性）、インスリン分泌の障害、脂肪毒性、高血糖、糖尿病の結果としての膵 細胞不全、前糖尿病、1型糖尿病、2型糖尿病、または妊娠糖尿病の症状の改善または軽減、またはこれらの処置または予防に有用である。

【 0 3 5 0 】

例示的な実施形態では、本明細書に記載の抗 C G R P 抗体またはその断片は、糖尿病を発症するリスクを有する個体、例えば前糖尿病と診断された個体に投与され得る。理論により限定されることを意図せず、インスリン感受性を回復することによって、主題の抗 C G R P 抗体が糖尿病への進行を遅延させるまたは予防することが可能であり得ると考えられる。

【 0 3 5 1 】

さらなる例示的な実施形態では、本明細書に記載の抗 C G R P 抗体またはその断片は、別の処置、例えば、メトホルミン、ピオグリタゾン、スルホニル尿素薬、グリニド、ピオグリタゾンなどの経口チアゾリジンジオン（T Z D）、エキセナチドなどのグルカゴン様ペプチド1（G L P - 1）作動薬、シタグリプチン、ビルダグリプチン、サクサグリプチン、アログリプチン、リナグリプチン、またはテネリグリプチンなどのD P P 4 阻害薬、またはメトホルミン及びピオグリタゾン、メトホルミン及びスルホニル尿素薬、メトホルミン及びグリニド、メトホルミン及びT Z D、メトホルミン及びピオグリタゾン、メトホルミン及びG L P - 1 作動薬、メトホルミン及びエキセナチド、シタグリプチン及びメトホルミン、シタグリプチン及びシンバスタチン、ビルダグリプチン及びメトホルミン、サクサグリプチン及びメトホルミン、アログリプチン及びピオグリタゾン、またはリナグリプチン及びメトホルミンなどの併用療法を用いた処置の投与では正常血糖を達成しなかった患者に投与され得る。

【 0 3 5 2 】

さらなる例示的な実施形態では、本明細書に記載の抗 C G R P 抗体またはその断片は、肥満の予防または処置のため、例えば少なくとも 25 の肥満度指数を有する個体に投与される。理論により限定されることを意図せず、主題の抗 C G R P 抗体は末梢の及び/または肝臓のグルコース利用を増大させ得、それにより代謝率を増加させ、体重減少に寄与すると考えられる。前記抗 C G R P 抗体は、オルリストット、リモナバン、シブトラミン、ペプチドYY（P YY、食欲を低下させる 36 個のアミノ酸ペプチド）、P YY 類似体、C B - 1 拮抗薬、リモナバン、レプチニン、レプチニン類似体、またはフェンテルミンなどの別の抗肥満薬と組み合わせて投与されてよい。

【 0 3 5 3 】

投与

本発明の一実施形態では、本明細書に記載の抗 C G R P 抗体またはその断片、ならびに前記抗体または抗体断片の組み合わせは、対象レシピエントの体重 1 kg あたり約 0.1 から 100.0 mg の濃度で対象に投与される。本発明のある実施形態では、本明細書に記載の抗 C G R P 抗体またはその C G R P 結合断片、ならびに前記抗体または抗体断片の組み合わせは、対象レシピエントの体重 1 kg あたり約 0.4 mg の濃度で対象に投与される。本発明の別の実施形態では、本明細書に記載の抗 C G R P 抗体またはその C G R P 結合断片、ならびに前記抗体または抗体断片の組み合わせは、26 週間またはそれより短い期間に 1 回、例えば 16 週間またはそれより短い期間に 1 回、8 週間またはそれより短い期間に 1 回、4 週間またはそれより短い期間に 1 回、2 週間またはそれより短い期間に 1 回、1 週間またはそれより短い期間に 1 回、または 1 日またはそれより短い期間に 1 回で、対象レシピエントに投与される。

【 0 3 5 4 】

10

20

30

40

50

Fab断片は、2週間またはそれより短い期間に1回、1週間またはそれより短い期間に1回、1日またはそれより短い期間に1回、1日に複数回、及び／または数時間ごとに投与され得る。本発明の一実施形態では、患者は、1日あたり0.1mg/kgから40mg/kgのFab断片を、1日1～6回の分割量で、または所望の結果を得るのに有効な徐放形態で投与される。

【0355】

所与の患者に投与する抗体またはFabの濃度は、2つ前の段落にて上記の例示的な投与濃度より高いか低い場合があることが理解されたい。

【0356】

当業者であれば、例えば本発明の開示内容及びGoodman, L. S., Gilman, A., Brunton, L. L., Lazo, J. S., & Parker, K. L. (2006). Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. New York: McGraw-Hill; Howland, R. D., Mycek, M. J., Harvey, R. A., Champe, P. C., & Mycek, M. J. (2006). Pharmacology. Lippincott's illustrated reviews. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 及びGolan, D. E. (2008). Principles of pharmacology: the pathophysiological basis of drug therapy. Philadelphia, Pa., [etc.]: Lippincott Williams & Wilkinsの教示内容に従った、通常の実験を通じて、投与の有効量及び頻度を決定できるであろう。10  
及びGolan, D. E. (2008). Principles of pharmacology: the pathophysiological basis of drug therapy. Philadelphia, Pa., [etc.]: Lippincott Williams & Wilkinsの教示内容に従った、通常の実験を通じて、投与の有効量及び頻度を決定できるであろう。20

【0357】

本発明の別の実施形態では、本明細書に記載の抗CGRP抗体またはそのCGRP結合断片、ならびに前記抗体または抗体断片の組み合わせは、医薬製剤の形で対象に投与される。

【0358】

「医薬組成物」とは、哺乳類への投与に好適な化学組成物または生物学的組成物を指す。このような組成物は、頬、皮膚上、硬膜外、吸引、動脈内、心臓内、脳室内、皮内、筋肉内、鼻腔内、眼内、腹腔内、脊髄内、髄腔内、静脈内、経口、非経口、浣腸または坐剤による直腸内、皮下、真皮下、舌下、経皮、及び経粘膜を含むがこれらに限定されない多数の経路のうちの1つまたは複数を介する投与用として、特異的に製剤化され得る。加えて、投与は注射剤、粉末、液体、ゲル、液滴、または他の投与手段により生じができる。30

【0359】

本発明の一実施形態では、本明細書に記載の抗CGRP抗体またはそのCGRP結合断片、ならびに前記抗体または抗体断片の組み合わせを、任意選択的に1つまたは複数の活性薬剤と組み合わせて投与してもよい。このような活性薬剤の例としては、鎮痛剤、抗ヒスタミン剤、解熱剤、抗炎症剤、抗生物質製剤、抗ウイルス剤、及び抗サイトカイン剤が挙げられる。活性薬剤には、TNF-、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12、IL-13、IL-18、IFN-、IFN-、BAFF、CXCL13、IP-10、VEGF、EPO、EGF、HRG、肝細胞増殖因子(HGF)、ヘプシジンのアゴニスト、アンタゴニスト、及び調節物質が含まれ、これらの物質には、これらの物質のいずれかに対して反応する抗体、及びこれらの物質の受容体のいずれかに対して反応する抗体が含まれる。また、活性薬剤には、2-アリールプロピオン酸類、アセクロフェナク、アセメタシン、アセチルサリチル酸(アスピリン)、アルクロフェナク、アルミノプロフェン、アモキシプリン(Amoxiprin)、アンピロン、アリールアルカン酸類、アザプロパゾン、ベノリラート(Benorylate/Benorilate)、ベノキサプロフェン、プロムフェナク、カルプロフェン、セレコキシブ、サリチル酸コリンマグネシウム、クロフェゾン、COX-2阻害剤、デクスイブプロフェン、デク40  
50

スケトプロフェン、ジクロフェナク、ジフルニサル、ドロキシカム、エテンザミド、エトドラク、エトリコキシブ、ファイスラミン (Faislamine)、フェナム酸類、フェンブフェン、フェノプロフェン、フルフェナム酸、フルノキサプロフェン、フルルビブロフェン、イブプロフェン、イブプロキサム、インドメタシン、インドプロフェン、ケブゾン、ケトプロフェン、ケトロラク、ロルノキシカム、ロキソプロフェン、ルミラコキシブ、サリチル酸マグネシウム、メクロフェナム酸、メフェナム酸、メロキシカム、メタミゾール、サリチル酸メチル、モフェブタゾン、ナブメトン、ナプロキセン、N-アリールアントラニル酸類、神経成長因子 (NGF)、オキサメタシン、オキサプロジン、オキシカム類、オキシフェンブタゾン、パレコキシブ、フェナゾン、フェニルブタゾン、フェニルブタゾン、ピロキシカム、ピルプロフェン、プロフェン類、プログルメタシン、ピラゾリジン誘導体、ロフェコキシブ、サリチルサリチル酸、サリチルアミド、サリチル酸類、サブスタンスP、スルフィンピラゾン、スリンダク、スプロフェン、テノキシカム、チアプロフェン酸、トルフェナム酸、トルメチン、及びバルデコキシブも含まれるが、これらに限定されない。  
10

## 【0360】

抗ヒスタミン剤は、ヒスタミンの作用に対抗する、または細胞（例えばマスト細胞）からのその放出に対抗する任意の化合物であることができる。抗ヒスタミン剤には、アクリバスチン、アステミゾール、アザタジン、アゼラスチン、ベタタスタン (beta-statin)、プロムフェニラミン、ブクリジン、セチリジン、セチリジン類似体、クロルフェニラミン、クレマスチン、CS560、シプロヘプタジン、デスロラタジン、デクスクロルフェニラミン、エバスチン、エピナスチン、フェキソフェナジン、HSR609、ヒドロキシジン、レボカバスチン、ロラチジン、メトスコポラミン、ミゾラスチン、ノルアステミゾール、フェニンダミン、プロメタジン、ピリラミン、テルフェナジン、及びトランニラストが含まれるが、これらに限定されない。  
20

## 【0361】

抗生物質には、アミカシン、アミノグリコシド類、アモキシシリン、アンピシリン、アンサマイシン類、アルスフェナミン、アジスロマイシン、アズロシリン、アズトレオナム、バシトラシン、カルバセフェム、カルバペネム類、カルベニシリン、セファクロール、セファドロキシル、セファレキシン、セファロチン (cefalothin)、セファロチン (cefalotin)、セファマンドール、セファゾリン、セフジニル、セフジトレン、セフェピム、セフィキシム、セフォペラゾン、セフォタキシム、セフォキシチニン、セフポドキシム、セフプロジル、セフタジジム、セフチブテン、セフチゾキシム、セフトビプロール、セフトリアキソン、セフロキシム、セファロスポリン類、クロラムフェニコール、シラスタチン、シプロフロキサシン、クラリスロマイシン、クリンダマイシン、クロキサシリン、コリスチン、コトリモキサゾール、ダルホブリスチン、デメクロサイクリン、ジクロキサシリン、ジリスロマイシン、ドリペネム、ドキシサイクリン、エノキサシン、エルタペネム、エリスロマイシン、エタンブトール、フルクロキサシリン、ホスホマイシン、フラゾリドン、フシジン酸、ガチフロキサシン、ゲルダナマイシン、ゲンタマイシン、グリコペプチド類、ハービマイシン、イミペネム、イソニアジド、カナマイシン、レボフロキサシン、リンコマイシン、リネゾリド、ロメフロキサシン、ロラカルベフ、マクロライド類、マフェニド、メロペネム、メチシリン、メトロニダゾール、メズロシリン、ミノサイクリン、モノバクタム類、モキシフロキサシン、ムピロシン、ナフシリン、ネオマイシン、ネチルマイシン、ニトロフラントイント、ノルフロキサシン、オフロキサシン、オキサシリン、オキシテトラサイクリン、パロモマイシン、ペニシリン、ペニシリン類、ピペラシリン、プラテンシマイシン、ポリミキシンB、ポリペプチド類、プロントジル、ピラジナミド、キノロン類、キヌプリスチン、リファンピシン、リファンピン、ロキシスロマイシン、スペクチノマイシン、ストレプトマイシン、スルファセタミド、スルファメチゾール、スルファニルイミド、スルファサラジン、スルフイソキサゾール、スルホンアミド類、テイコプラニン、テリスロマイシン、テトラサイクリン、テトラサイクリン類、チカルシリン、チニダゾール、トプラマイシン、トリメトプリム、トリメトプリムスル  
30  
40  
50

ファメトキサゾール、トロレアンドマイシン、トロバフロキサシン、及びバンコマイシンが含まれるが、これらに限定されない。

【0362】

活性薬剤には、アルドステロン、ベクロメタゾン、ベタメタゾン、副腎皮質ステロイド剤、コルチゾール、酢酸コルチゾン、酢酸デオキシコルチコステロン、デキサメタゾン、酢酸フルドロコルチゾン、グルココルチコイド類、ヒドロコルチゾン、メチルプレドニゾロン、プレドニゾロン、プレドニゾン、ステロイド剤、及びトリアムシノロンも含まれる。これらの活性薬剤の任意の好適な組み合わせも企図される。

【0363】

「医薬賦形剤」または「薬学的に許容され得る賦形剤」とは、通常は液体であり、その中に活性治療薬が製剤化される担体である。本発明の一実施形態では、活性治療薬は、本明細書に記載のヒト化抗体、またはその1つまたは複数の断片である。一般に、賦形剤は、製剤に対していずれの薬理学的活性も与えないが、化学的及び/または生物学的な安定性及び放出特性を提供し得る。例示的な製剤は、例えば、参照により組み込まれる Remington's Pharmaceutical Sciences, 第19版, Greenharno, A. 編, 1995に記載されている。

10

【0364】

本明細書で用いる「薬学的に許容され得る担体」または「賦形剤」は、生理学的に適合するあらゆる溶媒、分散媒、皮膜剤、抗菌剤及び抗真菌剤、等張剤及び吸収遅延剤を含む。一実施形態では、担体は非経口投与に好適である。あるいは、担体は、静脈内投与、腹腔内投与、筋肉内投与、または舌下投与に適することができる。薬学的に許容され得る担体には、無菌の水溶液または分散剤、及び無菌の注射剤または分散剤を即時調製するための無菌粉末が含まれる。薬剤的活性物質へのかかる媒体及び薬剤の使用は、当該分野で周知である。任意の従来の媒体または薬剤が活性化合物と適合しない場合を除き、本発明の医薬組成物においてそれを使用することが企図される。補助的な活性化合物も組成物に組み込むことができる。

20

【0365】

一般的に、医薬組成物は、製造及び保管の条件下で無菌及び安定でなければならない。本発明は、医薬組成物が凍結乾燥した形態で存在することを企図する。組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、リポソーム、または高薬物濃度に好適な他の秩序構造の形で製剤化することができる。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）、及びその好適な混合物を含有した溶媒または分散媒であることができる。本発明は、医薬組成物中に安定剤を含めることをさらに企図する。例えば、分散剤の場合には必要な粒径を維持することにより、及び界面活性剤を使用することにより、適切な流動性を維持することができる。

30

【0366】

多くの場合、組成物中に等張剤、例えば、糖類、マンニトール、ソルビトールなどのポロアルコール、または塩化ナトリウムを含むことにより、注射用組成物の吸収を持続させることができる。さらには、アルカリ性ポリペプチドを、例えば持続放出ポリマーを含む組成物において、徐放性製剤に製剤化することができる。活性化合物は、インプラント及びマイクロカプセル化送達システムを含む制御放出製剤などの、急速な放出から化合物を保護するだろう担体を用いて調製することができる。エチレン酢酸ビニル、ポリ酸無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、ポリ乳酸、及びポリ乳酸・ポリグリコール酸コポリマー（PLG）などの、生物分解性の生体適合性ポリマーを使用することができる。このような製剤を調製するための多くの方法が、当業者に周知である。

40

【0367】

列記されている実施形態の各々について、様々な剤形で化合物を投与することができる。当業者に周知の任意の生物学的に許容可能な剤形及びその組み合わせが企図される。このような剤形の例として、再構成可能な散剤、エリキシル剤、液剤、溶剤、懸濁液、乳剤

50

、散剤、顆粒剤、粒子、微小粒子、分散性顆粒剤、カシェ、吸入剤、エアロゾル吸入剤、パッチ、粒子吸入剤、インプラント、デボーインプラント、注射剤（皮下、筋肉内、静脈内、皮内を含む）、注入液、及びこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0368】

本発明の上記に例示する各種実施形態の説明は、網羅的であるという意図はなく、本発明を精密な開示形態に限定する意図もない。本発明の具体的な実施形態及び実施例は、例示目的で本明細書に記載されているが、種々の同等の修正は、関連する分野の当業者が認識する通り本発明の範囲内で可能である。本明細書で提供する本発明の教示内容を、上記の例以外の他の目的に適用することができる。

10

#### 【0369】

上記の詳細な説明に鑑みて、これらの変更及び他の変更を本発明になすことができる。概して、以下の請求項において、使用される用語は、本明細書及び請求項で開示される具体的な実施形態に本発明を限定するものと解釈すべきではない。したがって、本発明は本開示に限定されるのでなく、本発明の範囲は、以下の請求項によって全面的に決定されるものである。

#### 【0370】

本発明は、上記の説明及び実施例に具体的に記載されている方法以外の方法で実施され得る。上記の教示内容を鑑みて、本発明の多くの修正及び変更が可能であり、ゆえにこれらの修正及び変更は、添付の請求項の範囲内である。

20

#### 【0371】

抗原特異的B細胞のクローン集団を取得するための方法に関連するある特定の教示が、2006年5月19日に出願された米国仮特許出願第60/801,412号に開示されており、その開示内容はその全体において参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【0372】

ウサギ由来モノクローナル抗体のヒト化、及び抗原結合親和性を維持するための好ましい配列修飾に関連するある特定の教示が、2008年5月21日に出願された国際出願PCT/US2008/064421号（名称「Novel Rabbit Antibody Humanization Methods and Humanized Rabbit Antibodies」の国際公開WO/2008/144757号に対応する）に開示されており、その開示内容はその全体において参照により本明細書に組み込まれる。

30

#### 【0373】

接合可能な酵母を用いた抗体またはその断片の作製に関連するある特定の教示、及び対応する方法が、2006年5月8日に出願された米国特許出願第11/429,053号（米国特許出願公開第2006/0270045号）に開示されており、その開示内容はその全体において参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【0374】

ある特定のCGRP抗体ポリヌクレオチド及びポリペプチドが本特許出願に添付の配列表で開示されており、前記配列表の開示内容はその全体において参照により本明細書に組み込まれる。

40

#### 【0375】

発明の背景技術、詳細な説明、及び実施例で引用される各文書（特許、特許出願、論文、抄録、マニュアル、書籍、またはその他の開示を含む）の全開示は、その全体において参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【0376】

以下の実施例は、主題の発明の作成方法及び使用方法の完全な開示と説明を当業者に提供するために提示されるものであり、本発明とみなされるものの範囲を限定することを意図しない。使用する数字（例えば量、温度、濃度など）に関して正確を期すよう努力しているが、いくらかの実験誤差及び偏差は許容されるべきである。別段の指示がない限り、

50

割合は重量部であり、分子量は平均分子量であり、温度は摂氏度単位であり、圧力は大気圧時または近大気圧時の圧力である。

### 【0377】

#### 実施例

##### 実施例 1

### 【0378】

正常なラットを A b 1 4 100 mg / kg (静脈内経路を介して、クランプ処置の 48 時間に単回投与) を用いて処置し、メトホルミン 500 mg / kg (傾向経路を介して、クランプ処置の 24 時間前及び 4 時間に 2 投与) と効果を比較した。この実施例において使用された抗体は、配列番号 132 及び 134 の軽鎖ポリペプチド及び重鎖ポリペプチドからなる。

10

### 【0379】

血中グルコースを摂食条件下で処置前、メトホルミン及び A b 1 4 を用いた処置の 18 時間後、及び A b 1 4 を用いた処置の 42 時間後に測定した。これらの条件下では 2 つの化合物は血中グルコースに影響しなかった。血中グルコースを、絶食条件下で、クランプの直前に測定し、メトホルミンのみが有意な低減効果を有した (17%)。処置前及びメトホルミンを用いた処置の 18 時間後及び A b 1 4 を用いた処置の 42 時間後に摂食条件下で測定された血漿インスリンは、2 つの化合物によって微かに低減され、ならびにインスリン抵抗性指数 H O M A - I R も微かに低減された (有意でない)。

### 【0380】

20

血漿試料を、クランプ処置の直前、処置の 48 時間後に A b 1 4 で処置された動物から取得し、A b 1 4 濃度を決定した。この分析の結果により、クランプ処置を受けたラットにおいて A b 1 4 の 642 から 797  $\mu$ g / mL の範囲の全身曝露を確認した。

### 【0381】

全身インスリン感受性に及ぼす効果を評価するため、クランプ処置を 0.3 U / kg / 時間のインスリン及び  $^3$ H - グルコースを用いて実施した。ラットを 180 分間の灌流前に 6 時間絶食させた。定常状態は、140 分間の注入後に達し、グルコース注入率 (G I R)、全身グルコース代謝回転 (G T O)、肝臓のグルコース産生 (H G P)、糖分解、及びグリコーゲン合成の平均は、140 分から 180 分で算出された。クランプの終了時の 1 時間に 14 - C - 2 - デオキシグルコースをボーラス投与して、組織特異的グルコース利用を測定した。想定通り、メトホルミンは、糖分解及びグリコーゲン合成を増加させることにより G I R (27% 増加) 及び G T O (30% 増加) を有意に増加させた。メトホルミンは、混合外側広筋 (V L、49% 増加  $p < 0.05$ )、糖分解糖分解系の長指伸筋 (E D L、19% 増加、N S) におけるグルコース利用を増加させ、心臓 (-39%、 $p < 0.01$ ) におけるグルコース利用を低減させ、これはおそらく心筋の脂肪酸酸化 (oxidation 1) の刺激のためと思われる。A b 1 4 は、G I R 及び G T O (N S) を増加させる傾向にあり、V L (70% 増加、 $p < 0.01$ )、E D L (26% 増加、N S)、及び酸化的ヒラメ筋 (27% 増加、N S) におけるグルコース利用に対してメトホルミンよりも強い効果を有した。また心臓におけるグルコース利用も増加させる傾向にあった (21% 増加、N S)。メトホルミンと同様、A b 1 4 は白色脂肪組織 (深部及び皮下) におけるグルコース利用率に影響しなかった。

30

### 【0382】

結論として、A b 1 4 は、筋肉 (V L) におけるグルコース利用率に有意な効果を伴い、急性処置後の正常なラットにおいて全身グルコース利用を改善する良好な傾向を有した。

### 【0383】

#### 方法

### 【0384】

雄スプラーグドーリーラットを、実験段階の全期間を通して収容ケージ (1500 cm<sup>2</sup> × 21 cm) に収容した。動物のケージ敷料は週に 1 回交換した。順化期間中は 3 ~ 4

40

50

匹の群で収容し、それから手術後クランプ処置まで個々に収容した。12時間明暗サイクル(午前8:00に消灯)、22±2及び相対湿度55±10%。標準飼料(RM1(E)801492、SDS)及び水道水は自由摂取とした。

【0385】

2週間の順化期間の後、ラットを麻酔(イソフルラン)し、カテーテルを大腿静脈内に実装した。回復期間はクランプ処置の前5~6日間経過した。

【0386】

血中グルコース(BG)を、午前7:30から8:00(消灯の直前)の間に尾の先端から血糖測定器を用いて測定し、直後に採血(EDTA上)を実施して血漿インスリンを測定した。下記の表は条件を示す：

【表1】

	クランプ2日前 (血液量)	クランプ1日前 (血液量)	クランプ当日 (血液量)
第1群	BG+インスリン(約40μL)	BG(約1μL)	BG+インスリン(約40μL)
第2群	BG+インスリン(約40μL)	BG(約1μL)	BG+インスリン+曝露 (約200μL)
第3群	—	BG+インスリン(約40μL)	BG+インスリン(約40μL)

【0387】

血漿試料を、インスリン測定(ELISA法を使用)まで-80に保った。

【0388】

血液の試料(約200μL)を、クランプ処置の直前に、第2群各動物について取得し、血漿(約60μL)へと処理し、後でメソスケールディスカバリー(MSD)ELISAプラットフォームを活用してAb14濃度を決定するために-80に維持した。

【0389】

ビヒクル及びAb14を、静脈内経路でクランプ処置のT0の48時間前(クランプ2日前の午後02:00)に投与した。

【0390】

メトホルミンを、経口経路でクランプ処置のT0の24時間前及び4時間前(クランプ前日の午後02:00及びクランプ当日の午前10:00)に投与した。

【0391】

ラットをクランプの開始前に6時間絶食させた(採血の直後、約8時間後)。

【0392】

高インスリン血症-正常血糖クランプを、<sup>3</sup>H-グルコースをトレーサーとして使用し、0.3U/kg/時間のインスリンを午後2:00(T0)から午後5:00(T+3時間)まで注入して、実施した。グルコース溶液を並行して注入し、注入率を定常状態(約100+/-10mg/dL)に達するように調整した。血中グルコースを10分毎に血糖測定器を使用して尾の先端から測定した。最後の時間(定常状態)に、血液を尾の先端から採取(10μL)し、以下のパラメータを評価した:グルコース注入率;全身グルコース利用率;肝臓のグルコース産生率;全身グリコーゲン及び糖分解率。

【0393】

個々の組織のグルコース利用率を決定するため、ラット1匹あたり100μCiのデオキシ-D-グルコース2-<sup>14</sup>C(<sup>14</sup>C-2-DOG)のボーラス注射を、大腿静脈を通してD-[3-<sup>3</sup>H]-グルコース注入の終了の60分前に実施した。注射の0、5、

10

20

30

40

50

10、15、20、25、30、45、及び60分後に尾静脈の先端から得られた10μL滴の血液において血漿<sup>14</sup>C-2-DOG消失及びグルコース濃度を決定した。実験の終了時に、外側広筋(VL)、長指伸筋(EDL)及びヒラメ筋、精巣上体白色脂肪組織及び鼠径部白色脂肪組織、心尖、及び皮膚(陰性対照として)を解剖し、瞬間冷凍して-80に保った。各組織の小片を1M NaOHに溶解し、次いで1M HClを用いて中和した。D-2-<sup>14</sup>Cデオキシグルコース6-リン酸。D-2-<sup>14</sup>Cデオキシグルコースを、水酸化亜鉛(0.3M)溶液または過塩素酸溶液(6%)の使用により、差次的に沈殿させた。両方の放射能含有量を測定してng/mg/分として表されるグルコース取り込みを評価した。

## 【0394】

10

血漿インスリンレベルをクランプの終了時に測定した。

## 【0395】

GraphPad prismソフトウェアを使用して統計分析を行った。ヒストグラムを一元配置分散分析とダネットの事後検定を使用して分析し、曲線を二元配置分散分析とボンフェローニの事後検定を使用して分析した。p値が<0.05であるときに差異は有意であるとされた。NS:有意でない。

## 【0396】

結果及び考察

## 【0397】

血中グルコース及びインスリン測定。摂食条件下で、血糖値は、Ab14 100mg/kgを用いた処置の42時間後及びメトホルミンメトホルミン 500mg/kgを用いた処置の18時間後にビヒクル群と比較して影響を受けなかった(図1A)。同時に、Ab14及びメトホルミンは、血漿インスリンレベルをそれぞれ11%及び18%低減させた(有意でない、図1B)。次いで、インスリン抵抗性指数であるHOMA-IRは、同様の様式でビヒクル群と比較して低減された(図1C)。一方で、6時間の空腹条件下で、メトホルミンは、処置の30時間後に、血中グルコースを有意に低減(17%低減)させた(図1D)。

20

## 【0398】

全身グルコースフラックス。高インスリン血症正常血糖クランプを、6時間空腹条件下で、Ab14 100mg/kgの単回投与の48時間後、及びメトホルミン 500mg/kgの最後の投与の4時間後に実施した。

30

## 【0399】

メトホルミンは、ビヒクル群と比較して注入の開始60分後からGIR展開を有意に増加させた。Ab14は、注入の大体130分後にGIR展開を増加させる傾向を有した(図2A)。

## 【0400】

全ての群において140分からグルコース注入率はプラトーに達した。血糖値はこの正常状態の間、全ての群において同様であった(図2B)。クランプ終了時の血漿インスリンレベルも、全ての群において同様であった(図2C)。クランプ終了時に達した血漿インスリンレベルは、摂食条件下で測定されたものとほぼ同一であり、つまり高インスリン血症を得るために使用されたインスリンの用量は生理学的であった。

40

## 【0401】

次いで、グルコースフラックスを、注入の140分~180分で算出した(図3)。Ab14及びメトホルミンは、グルコース注入率をそれぞれ18%(NS)及び27%(p<0.05)増加させ、ならびにグルコース代謝回転をそれぞれ18%(NS)及び30%(p<0.05)増加させた。肝臓のグルコース産生は、3つの群において超生理的用量のインスリンにより完全に阻害された。Ab14は、糖分解率に影響しなかったが、一方でメトホルミンは糖分解率を43%(NS)増加させた。Ab14は、メトホルミンと同様にグリコーゲン合成率を23%(NS)増加させた。

## 【0402】

50

個々の組織のグルコース利用率もまた、D - [ 3 - <sup>3</sup> H ] - グルコース注入の終了の60分前に導入した、大腿静脈を通すラット1匹あたり100 μCiのデオキシ-D-グルコース2 - <sup>14</sup>C (<sup>14</sup>C - 2 - D O G) のボーラス注射を使用して決定した。両方の放射能含有量を測定して、ng / mg / 分として表されるグルコース取り込みを評価した。図4 A ~ C に示すように、メトホルミンは、混合外側広筋 (V L、49% 増加 p < 0.05)、糖分解糖分解系の長指伸筋 (E D L、19% 増加 N S) におけるグルコース利用を増加させ、心臓におけるグルコース利用を低減させた (- 39%、p < 0.01)。これは、心筋の脂肪酸酸化の刺激のためであると考えられるメトホルミンの既知の効果である。A b 1 4 は、グルコース注入率及び全身グルコース代謝回転 (N S) を増加させる傾向にあり、V L (70% 増加、p < 0.01)、E D L (26% 増加、N S)、及び酸化的ヒラメ筋 (27% 増加、N S) におけるグルコース利用に対してメトホルミンより強い効果を有した。A b 1 4 は心臓 (21% 増加、N S) におけるグルコース利用も増加させる傾向にある。メトホルミンと同様、A b 1 4 は、白色脂肪組織 (深部及び皮下) におけるグルコース利用率に影響しなかった。

#### 【0403】

A b 1 4 血漿濃度分析。クランプ処置を受けた第2群の動物についてのA b 1 4 血漿濃度は、642から797 μg / mL の範囲であり、最大48時間までの全身曝露を支持した。

#### 【0404】

結論。A b 1 4 を用いた急性処置は、血漿インスリンを微かに低減させ、グリコーゲン合成及び筋肉グルコース利用を増加させることにより、全身グルコース利用を増加させる傾向にあった。

#### 【0405】

##### 実施例2

#### 【0406】

この実施例は、インスリン抵抗性のラットモデルインスリン感受性を改善するA b 1 4 の能力を評価する。このモデルでは、ラットに高脂肪 (69%) 及び高フルクトース (14%) 食 (H F D) を6週間にわたって与えて耐糖能障害を誘発し、通常の飼料を与えられた対照動物と比較して有意に増加するようになった血漿インスリンレベル及び微かに増加するようになった糖血 (g l y c a e m i a) を伴う。この実施例において使用された抗体は、配列番号132及び134の軽鎖ポリペプチド及び重鎖ポリペプチドからなる。

#### 【0407】

6週間H F D を与えられたラットを、A b 1 4 を用いて2週間処置し、2段階の高インスリン血症正常血糖クランプを実施してインスリン感受性を評価した。生理学的用量のインスリンを第一段階中に使用し、薬理学的用量のインスリンを第二段階中に使用して、これら2つの条件下で、それぞれ末梢の及び肝臓のインスリン感受性の効果を評価した。

#### 【0408】

##### 概要

#### 【0409】

6週間のH F D の後、ラットをその耐糖能障害 (経口ブドウ糖負荷試験 (O G T T) 中のA U C 算出) 及びそのH O M A - I R (インスリン抵抗性指数) に従って処置群に無作為化した。H F D ラットを、10、30及び100 mg / kg / 週のA b 1 4 を用いて15日間処置 (静脈内、1週空けて2回投与)、または200 mg / kg / 日のメトホルミンを飲料水にいれて毎日15日間処置した。

#### 【0410】

体重及び食物消費量を処置の10日まで週に3回測定した。H O M A - I R を10日目及び15日目に測定した。2段階のクランプ (5 mU / kg / 分、次いで15 mU / kg / 分のインスリン) を15日目または16日目に実施した。グルコース代謝回転 (G T O) を、クランプ処置中に<sup>3</sup> H - グルコーストレーサーを注入して評価した。

#### 【0411】

10

20

30

40

50

本試験の終了時に、通常の飼料を与えられた対照ラットと比較したとき、HFDラットは体重、空腹時血中グルコース、血漿インスリン、及びCペプチドにおいて有意な増加を、ならびに2段階の高インスリン血症正常血糖クランプ中にグルコース注入率(GIR)において有意な低減を呈することが観察された。

【0412】

HFD+ビヒクル対照群と比較したとき、Ab14の処置は、体重または食物消費量に効果を与えたが、一方でメトホルミン群は、両方のパラメータにおいて有意に低減した。

【0413】

100mg/kgでのAb14は、15日間の処置後(空腹時血糖ならびに血漿インスリンを低減させることによって)HOMA-I Rを有意に低減(38%低減)させた。メトホルミンは、15日目でHOMA-I Rに対して有意でない(ns)低減効果を示した。C-ペプチドもまた、Ab14処置によって有意に低減された(10mg/kgで30%低減及び100mg/kgで29%低減)。

【0414】

クランプの第一段階では、HFDビヒクル対照群と比較したとき、Ab14処置群においてGIRの増加(ns)が観察され、一方でメトホルミンは、GIRに対して大きさにおいて相対的に少ない増加効果を有した。クランプの第二段階では、30または100mg/kgでのAb14及びメトホルミン処置は、GIRを有意に増加させた(それぞれ、36%、28%、及び27%増加)。

【0415】

クランプ処置の第一段階では、30mg/kgでのAb14は、HFDビヒクル対照群と比較したときGTOを増加させる傾向(17%増加、ns)がある。30mg/kgでのAb14は、両方のクランプ段階中に、糖分解及びグリコーゲン合成に対して微かな増加効果(ns)を有した。

【0416】

肝臓のグルコース産生(HGP)は、クランプの第一段階中にAb14またはメトホルミン処置によって有意ではないが微かに(11~20%)低減した。第二段階では、HGPは、HFDビヒクル対照群と比較して、10mg/kgでのAb14によって有意でなく(78%)低減し、HGPは30または100mg/kgでのAb14及びメトホルミンによって完全に阻害された。

【0417】

結論として、HFDラットモデルにおいてAb14を用いた静脈内投与後に(主に肝臓の)インスリン抵抗性の改善が観察された。

【0418】

方法

【0419】

82匹のスプラーグドーリーラット(試験開始時に8週齢、平均体重約250グラム)を実験段階の全期間を通して収容ケージ(904cm<sup>2</sup> × 23cm)に収容した。動物のケージ敷料は週に3回交換した。順化、HFD及び処置期間中は2~3匹の群で収容した。それから、ラットを手術後クランプ処置まで個々に収容した。ラットを12時間明暗サイクル(午前8:00に消灯)、22±2に維持された飼育温度及び相対湿度55±10%で収容した。少なくとも5日間の順化期間を、HFD摂食の開始前に提供した。順化段階中、標準食(RM1(E)801492、SDS)及び水道水を自由摂取とした。

【0420】

順化段階の後、実験全期間を通して、10匹のラットに通常の飼料(NC)を与え、一方で72匹のラットにはHFD(RD1、SAFE)を与えた。

【0421】

高脂肪食組成は以下の通りである(Kcal%)：タンパク質：17.3%；炭水化物(フルクトース)：14%；脂肪(ラード)：68.7%；コレステロール1.65%、

10

20

30

40

50

コール酸 0 . 6 5 %。

【 0 4 2 2 】

6 週間 H F D 食を与えた後、ラットを 6 時間絶食させ、グルコース耐性試験を行った。最低 A U C ( 約 1 7 % ) を表すラットは本試験から除外した。残りのラットを、次いでその A U C ( グルコース耐性指数 ) 及び H O M A - I R ( インスリン抵抗性指数 ) に従って異なる群に無作為に割り振った。

【 0 4 2 3 】

A b 1 4 ( 1 0 、 3 0 、 1 0 0 m g / k g ) 及びビヒクルを、週 1 回静脈内経路を介して ( 尾静脈を介して、イソフルラン麻酔下 ) 、午前に、処置の 1 日目及び 8 日目に投与した。

10

【 0 4 2 4 】

メトホルミン ( 2 0 0 m g / k g / 日 ) を、クランプ処置まで約 2 週間にわたり飲料水に入れて投与した。メトホルミンで処置されたラットは、1 日目及び 8 日目にはビヒクルを用いて ( 尾静脈を介して ) 処置された。

【 0 4 2 5 】

検査群は以下の通りである :

【 0 4 2 6 】

第 1 群 : N C + ビヒクル静脈内 ( n = 1 0 )

【 0 4 2 7 】

第 2 群 : H F D + ビヒクル静脈内 ( n = 1 0 )

20

【 0 4 2 8 】

第 3 群 : H F D + A b 1 4 1 0 m g / k g 静脈内 ( n = 1 0 )

【 0 4 2 9 】

第 4 群 : H F D + A b 1 4 3 0 m g / k g 静脈内 ( n = 1 0 )

【 0 4 3 0 】

第 5 群 : H F D + A b 1 4 1 0 0 m g / k g 静脈内 ( n = 1 0 )

【 0 4 3 1 】

第 6 群 : H F D + メトホルミン 2 0 0 m g / k g ( 飲料水中 ) + ビヒクル静脈内 ( n = 1 0 )

【 0 4 3 2 】

30

H F D 食餌の最後の週では、スクリーニングの前に、水消費量を週 3 回測定して水道水中のメトホルミン希釈を評価した。

【 0 4 3 3 】

6 週間の通常の飼料及び H F D の後、8 2 匹のラットを午前 8 : 0 0 から午後 2 : 0 0 まで ( 6 時間 ) 絶食させた。グルコースを午後 2 : 0 0 ( t 0 ) にボーラス投与 ( 2 . 5 g / k g ) した。血中グルコースを、 t - 3 0 、 0 、 1 5 、 3 0 、 6 0 、 9 0 、 1 2 0 、 1 5 0 分に ( 血糖測定器を使用して、尾の先端から採取した一滴の血液中で ) 測定した。血液を尾の先端から ( E D T A 上に 4 0  $\mu$  L ) t - 3 0 に採取して血漿インスリンを測定した ( E L I S A 法 ) 。

【 0 4 3 4 】

40

曲線下面積 ( A U C ) を算出した。最高 A U C を表す 1 2 匹の H F D 食餌ラットは、耐糖能障害の度合いが低いと考えられ、本試験から除外された。6 0 匹の残りのラットを均一な A U C 、 H O M A - I R 、及び体重に従って 6 つの群に無作為に割り振った。

【 0 4 3 5 】

H F D の最初の 6 週間、体重を週 1 回測定した。処置の最初の 1 0 日間、体重を週 3 回測定した。食物消費量は、4 8 時間または 7 2 時間にわたって、処置の直前及び手術処置 ( 1 1 日目 ) までの処置期間中に週 3 回測定した。

【 0 4 3 6 】

処置の開始 ( O G T T 当日 ) 前及び処置の 1 0 日目に、全てのラットを午前 8 : 0 0 から絶食させた。午後 1 : 3 0 に、血液を尾の先端から採取した ( E D T A 上に 4 0  $\mu$  L )

50

。血液グルコース（血糖測定器を使用）及び血漿インスリン（ELISA法）を測定した。

【0437】

11日目に、ラットを麻酔（イソフルラン）し、大腿静脈にカテーテルを埋め込んだ。回復期間はクランプ処置の前に4日間経過した。

【0438】

クランプ当日の朝、ラットを6時間（午前8:00から午後2:00まで）絶食させた。血液の試料（約160 μL、EDTA上）を、クランプ処置の直前（約午後1:00pm）に、第3、4、5、6群の各マウスの尾の先端から採取し、血漿（約60 μL）へと処理し、Ab14濃度の評価まで-80で維持した。対照及びメトホルミン群は抗体濃度について分析していないが、第1、2、7群のラットから同様の量の血液を採取（及び破棄）した。

【0439】

15日目または16日目に、2段階高インスリン血症-正常血糖クランプを、<sup>3</sup>H-グルコースをトレーサーとして使用し（通常の飼料群を除く）、5mU/kg/分のインスリンを午後2:00(T0)から午後4:00(T+2h)まで注入し、その後15mU/kg/分のインスリンを午後4:00から午後5:30(t+3.5h)まで注入して実施した。グルコース溶液を並行して注入し、注入率は定常状態(100+/-10mg/dL)に達するように調節された。血中グルコースを10分毎に血糖測定器を使用して尾の先端から測定した。血液を各ステップの定常状態の間に尾の先端から定期的に採取した(10 μL)。

【0440】

以下のパラメータを評価した：グルコース注入率（全群）；全身グルコース利用率（通常の飼料群以外）；肝臓のグルコース産生率（通常の飼料群以外）；全身グリコーゲン及び糖分解率（通常の飼料群以外）。

【0441】

さらには、通常の飼料群を除いて、クランプ実験の終了の1時間前に、<sup>14</sup>C-2DOGのボーラス注射を実施し、以下の組織の試料をクランプの終了時に採取し、さらなる評価のために保持した：

【0442】

外側広筋(VL)；長指伸筋(EDL)；ヒラメ筋 心尖；精巣上体白色脂肪組織 鼠径部白色脂肪組織 皮膚(負の対照)。

【0443】

血漿インスリン及びCペプチドレベルを、注入開始の直前（約T-30）、段階1の定常状態の終了時（T2時間）、及び段階2の定常状態の終わり（T3.5時間）で測定した。これについては、尾の先端からの採血を実施した（約100 μL、EDTA上）。

【0444】

統計解析を、GraphPad prismソフトウェアを使用して実施した。曲線を二元配置分散分析とボンフェローニの事後検定を使用して分析した。ヒストグラムを、t検定を使用して分析してHFD+ビヒクリ对照群及び通常の飼料+ビヒクリ对照群を比較した。ヒストグラムはANOVAを使用して分析した。差異は、p値が<0.05であった場合に有意であると考えられた。NS：有意でない。

【0445】

結果

【0446】

動物モデル及びスクリーニング。8週齢のラットに、フルクトースが濃縮された高脂肪食(HFD、69%脂肪及び16%フルクトース)を処置の開始前に7週間与えた。体重は、HFD群において $522 \pm 5$ gであり、対して通常の飼料を与えられた対照群では $448 \pm 13$ gであった。次いで、体重の増加が16%あった(HFD下で42日目のt検定でp<0.001(図5))。7週間後、体重は、HFD集団において $187 \pm 3$ g増

加し、対して通常の飼料を与えられた対照群において  $158 \pm 9$  g 増加した (42日目の t 検定で  $p < 0.001$ 、図 6)。

【0447】

HFD の 7 週目では、経口ブドウ糖負荷試験を実施して HFD 集団の耐糖能障害を評価した。血糖値は HFD 集団においてグルコース投与の 150 分後まで高いままであった (図示されず)。T0 に対して算出された AUC は、対照飼料を与えられたラットと比較して HFD ラットにおいて有意に高かった (9%) (図示されず)。

【0448】

HOMA - IR (インスリン抵抗性指数) を、OGTT の t - 30 で算出した。高 AUC 及び高 HOMA - IR を表すラットを 6 つの群に無作為に割り振った。対照飼料を与えられた群と比較して、HFD 群において AUC は高く (約 9%、図示されず)、ならびに HOMA - IR も高く (34%、図示されず)、体重も高かった (約 17%、 $p < 0.01$ 、図 7)。

【0449】

体重及び食物摂取量経過観察。体重を処置の 10 日間経過観察した。Ab14 処置は体重に効果を有さなかった。対照飼料を与えられたラットの体重は、HFD ビヒクルラットよりも有意に低いままだった (図 7)。処置の 2 日目以降からの体重増加を、Ab14 (30 mg / kg) は微かに低減させ (ns)、メトホルミン 200 mg / kg は有意に低減させた。

【0450】

食物消費量は、想定通り対照飼料を与えられた群よりも HFD ビヒクル群において低かった。Ab14 処置は、経過観察した食物摂取量 (図 8A) または累積食物摂取量 (図 8B、図示されず) に効果を有さなかった。メトホルミンは、累積食物消費量を有意に低減 (25% 低減) させた。手術処置の前の動物の絶食により、9 日目と 10 日目の間の食物消費量測定を中断した。

【0451】

生化学的パラメータ。対照飼料を与えられた群と比較したとき、HFD ビヒクル群における空腹時血糖は、0 日目、10 日目、15 日目にそれぞれ 5% (ns)、11% (ns)、及び 20% ( $p < 0.001$ ) 増加した。Ab14 またはメトホルミンを用いた処置は 10 日目には効果を有さなかった。100 mg / kg で Ab14 を用いた処置は、HFD ビヒクル群と比較したとき、15 日目の空腹時血糖に有意な低減効果を有した (図 9)。

【0452】

空腹時血漿インスリンは、対照飼料を与えられた群と比較して HFD ビヒクル群において 0 日目、10 日目、15 日目でそれぞれ 33% (ns)、49% (ns) 及び 67% ( $p < 0.01$ ) 増加した。Ab14 処置は 10 日目で効果を有さなかったが、メトホルミンは血漿インスリンを 37% (ns) 低減させた。10、30 または 100 mg / kg の Ab14 処置は、15 日間の処置後、血漿インスリンをそれぞれ 26%、16%、または 18% (ns) 低減させ、メトホルミンは血漿インスリンを 11% 低減させた (ns、図 10)。

【0453】

想定通り、15 日目の血漿 C - ペプチドレベルプロファイルは、血漿インスリンレベルに類似したが、効果はより顕著で変動が少なかった。C - ペプチドは、対照飼料を与えられた群と比較して HFD ビヒクル群において有意に増加 (67% 増加) した。10、30 または 100 mg / kg の Ab14 処置は、C - ペプチドレベルをそれぞれ 30% ( $p < 0.05$ )、23% (ns)、及び 29% ( $p < 0.05$ ) 低減させ、メトホルミンは C - ペプチドを 13% (ns) 低減させた (図 11、下方左パネル)。

【0454】

インスリン抵抗性の指標である HOMA - IR は、対照飼料を与えられた群と比較して HFD ビヒクル群において 0 日目に 36% (ns)、10 日目に 42% (ns) 及び 15

10

20

30

40

50

日目に 9.8% (p < 0.01) 増加した。HFD ビヒクルと比較して、Ab14 は 10 日間の処置後に効果を有さなかったが、メトホルミンは 3.6% の低減効果 (ns) を有した。15 日間の処置後、10、30 または 100 mg / kg での Ab14 処置は、HOMA-IR をそれぞれ 33% (ns)、17% (ns) 及び 38% (p < 0.05) 低減させ、メトホルミンは HOMA-IR を 18% 低減させる傾向にあった (ns、図 12)。

#### 【0455】

高インスリンクランプ。図 13 は、2 段階高インスリンクランプ中の継時的なグルコース注入率 (GIR) を示す。第一段階 (5 mU / kg / 分のインスリン) では、肝臓のグルコース產生 (HGP) は不完全に阻害され、肝臓のグルコース產生が阻害されたとき第二段階 (15 mU / kg / 分のインスリン) 中よりもグルコース注入率 (GIR) は低かった。

10

#### 【0456】

対照飼料を与えられた群の GIR は、クランプの両段階で HFD ビヒクル群よりも高く、HFD ラットが 8 ~ 9 週間の食餌後にインスリン抵抗性表現型を有したことを確かにした。メトホルミンは、第一クランプ段階中は GIR に効果を有さなかったが、GIR プラトナーは Ab14 処置群の方が微かに高かった (ns)。全ての処置群において、第二クランプ段階中に HFD ビヒクル群よりも高い GIR プラトナーが観察され、メトホルミン及び 30 または 100 mg / kg での Ab14 については有意差が観察された (図 13)。統計学的有意性は、二元配置分散分析とボンフェローニの事後検定を HFD に対して使用して評価された。第一クランプ段階では、GIR は、50 分及び 60 分の時点で通常の飼料対照、ビヒクル処置ラットについてのみ有意に異なった (それぞれ p < 0.01 及び p < 0.05)。第二クランプ段階では、GIR は、30 mg / kg の Ab14 で処置された HFD ラットについて 160 ~ 210 分の時点で (160 分の時点で p < 0.05 及び 170 ~ 210 分の時点で p < 0.01)、100 mg / kg の Ab14 で処置された HFD ラットについて 170 ~ 210 分の時点で (190 分時点で p < 0.01 及び 170 ~ 180 分及び 200 ~ 210 分の時点で p < 0.05)、メトホルミンで処置された HFD ラットについて 170 ~ 210 分の時点で (180 分及び 190 分時点で p < 0.01、及び 170 分及び 200 ~ 210 分の時点で p < 0.05) 有意に異なった。

20

#### 【0457】

GIR 平均を各プラトナーについて算出した (図 14)。GIR は、対照飼料を与えられた群と比較して HFD ビヒクル群において有意に低減し、第一段階及び第二段階中にそれぞれ 3.2% (p < 0.05) 及び 1.7% (p < 0.01) 低減した。10、30、または 100 mg / kg の Ab14 は、GIR を、第一段階中に増加させ (ns) (それぞれ 2.6%、3.7%、及び 2.9% 増加)、メトホルミンも 1.1% 増加させる効果 (ns) を有した。第二段階では、HFD ビヒクル群と比較して全ての処置が GIR を増加させた：10、30、または 100 mg / kg の Ab14 は、それぞれ 1.9% (ns)、3.6% (p < 0.01)、及び 2.8% (p < 0.05)、メトホルミンは 2.7% (p < 0.05) 増加させた。

30

#### 【0458】

2 つのクランプ段階中の血中グルコース平均は、想定通り正常血糖状態に対応した。第一段階中は対照飼料を与えられた群と HFD ビヒクル群との間に有意差があったが、糖血は正常な範囲のままであり、生物学的な状態は両群において同一であった (図 14)。

40

#### 【0459】

血漿インスリンをクランプ処置中に測定した。想定通り、インスリンレベルは 2 つのクランプ段階の終了時に全群間で同様であった。第一クランプ段階では、インスリン濃度はおよそ 140 μU / mL であり、摂食状態で予期される生理学的なレベルであった。第二クランプ段階後のインスリン濃度はおよそ 490 μU / mL であり、それは薬理学的なレベルであった (図 11、上方のパネル)。

#### 【0460】

C-ペプチドも、クランプ処置中に測定した (図 11、下方右パネル)。正常血糖状態

50

中は、細胞によるインスリン分泌が阻害され、血漿C-ペプチドレベルはそれゆえ低く、解釈可能ではなかった。

#### 【0461】

<sup>3</sup>H-グルコースを、全てのHFD群においてクランプ処置中にインスリンと共に注入した（対照飼料を与えられた群では行わなかった）。全身グルコースフラックスを次いで算出した。第一クランプ段階では、グルコース代謝回転（GTO）は全群において同様であったが、30mg/kgのAb14は、HFDビヒクル群と比較してGTOを増加させる傾向にあった（17%、ns）。糖分解及びグリコーゲン合成は、30mg/kgのAb14で処置した後、それぞれ15%及び16%増加する傾向にあった（ns、図15）。

10

#### 【0462】

第二クランプ段階では、GTO、糖分解、及びグリコーゲン合成は全ての処置群において同様であり、HFDビヒクル群と比較してAb14 30mg/kgで処置された群においてグリコーゲン合成の微かな増加（10%、ns）が観察された。30mg/kgでのAb14（p < 0.05）及び100mg/kgでのAb14（ns）はHGPを完全に阻害し、メトホルミンもHGPを完全に阻害した（ns）。10mg/kgでのAb14処置はHGPを78%低減させた（ns、図16）。

#### 【0463】

結論。Ab14を用いた処置は、HFDラットモデルにおいて空腹時血糖ならびに血症インスリンレベルを低減させることによりHOMA-IRを低減させた。さらには、肝臓インスリン感受性は、Ab14によって顕著に改善され、一方で全身末梢のインスリン感受性に及ぼす効果は明確には観察されなかった。想定通り、メトホルミン処置も肝臓インスリン感受性を改善した。

20

#### 【0464】

##### 実施例3

#### 【0465】

この実施例は、Ab14が、糖尿病のラットモデル、Zucker糖尿病肥満（ZDF）ラットのモデルにおけるグルコース代謝及び血糖コントロールに与える効果を評価する。Ab14の慢性投与がグルコース制御に与える効果を、前糖尿病性の（高インスリン血症、正常血糖）状態から明らかな糖尿病の（低インスリン血症、高血糖）状態へと進行しているZDFラットにおいて評価した。これらの動物は、生後7週までに、高血糖をほとんどから全く伴わないが、彼らが抱えるインスリン抵抗性を補うための顕著な高インスリン血症によって特徴付けられる、前糖尿病を発症している。これは、生後10～12週までに、臍細胞不全の結果としての低インスリン血症及び顕著な高血糖によって特徴づけられる明らかな糖尿病へと急速に進行する。この実施例において使用される抗体は、配列番号132及び134の軽鎖ポリペプチド及び重鎖ポリペプチドからなる。

30

#### 【0466】

##### 方法

#### 【0467】

81匹のZDF-fa/faラット（Charles River Laboratory Institutes、フランス）及び10匹の除脂肪ZDF-/-ラット（対照）を1～2匹の群で通常の12時間照明サイクル（午後8時に消灯）、22±2及び相対湿度50±10%の、換気されて充実した（enriched）収容ケージに収容した。ラットは、到着時7週齢であり、試験開始の前1週間にわたって順化された。ラットに、ZDFラット用の標準食（Purina 5008、Charles River）を与え、水道水は自由摂取とした。全ての動物を、本試験の全期間を通して、体調不良の任意のサイン、処置に対する副作用、または罹患性について少なくとも1日1回モニターした。

40

#### 【0468】

8週齢の雄ZDF-fa/faラットは、高インスリン血症で軽度の糖尿病であった。この状態での血中グルコース及びインスリンレベルが多様であるため、ZDFラットをそ

50

のHOMA-IRに従ってスクリーニングし、選択した。

【0469】

Ab14で処置された群については、抗体を週1回、1日目、8日目、15日目、及び22日目に尾静脈を介して、2つの異なる用量で、つまり20mg/kg/週（第3群及び第7群）または60mg/kg/週（第4群及び第8群）で投与した（静脈内、5mL/kg）。全ての他の群は、週1回ビヒクル1で処置した（静脈内、5mL/kg）。静脈内処置は、イソフルラン麻酔下で1日目、8日目、15日目、及び22日目の朝に実施した。投与の量を、最近の体重に従って個々に適用した。

【0470】

メトホルミン（Met）及びピオグリタゾン（PIO）を28日間にわたって1日1回、経口経路（経口、5mL/kg）を介して午前8:00から10:00の間に投与し、これは、OGTTの当日または静脈内処置の後を例外とし、いくつかの経口処置は午前10:00以降に完了された。第5、7、及び8群は、200mg/kg/日のメトホルミンで処置し、第6群は10mg/kg/日のピオグリタゾンで処置した。全ての他の群は、毎日ビヒクル2（経口、5mL/kg）で28日間処置した。最近の体重を使用して、各群における平均投与量を算出した。

【0471】

検査群を以下の表にまとめる。Met：メトホルミン。

【表2】

群	数	処置	用量	経路	頻度	
第1群 (除脂肪 Z u c k e r ラッ ト)	10	ビヒクル ビヒクル	— —	静脈内 経口	1日目、8日目、15 日目、及び22日目 毎日	10
第2群 (Z D F ラット)	10	ビヒクル ビヒクル	— —	静脈内 経口	1日目、8日目、15 日目、及び22日目 毎日	
第3群 (Z D F ラット)	10	Ab 14 ビヒクル	20 m g / k g /週 —	静脈内 経口	1日目、8日目、15 日目、及び22日目 毎日	
第4群 (Z D F ラット)	10	Ab 14 ビヒクル	60 m g / k g /週 —	静脈内 経口	1日目、8日目、15 日目、及び22日目 毎日	20
第5群 (Z D F ラット)	10	ビヒクル Met	— 200 m g / k g / 日	静脈内 経口	1日目、8日目、15 日目、及び22日目 毎日	
第6群 (Z D F ラット)	10	ビヒクル PIO	— 10 m g / k g /日	静脈内 経口	1日目、8日目、15 日目、及び22日目 毎日	30
第7群 (Z D F ラット)	10	Ab 14 Met	20 m g / k g /週 200 m g / k g / 日	静脈内 経口	1日目、8日目、15 日目、及び22日目 毎日	
第8群 (Z D F ラット)	10	Ab 14 Met	60 m g / k g /週 200 m g / k g / 日	静脈内 経口	1日目、8日目、15 日目、及び22日目 毎日	40

## 【0472】

1週間の順化期間の後、全てのラットの体重をはかり、6時間絶食させた（午前約8：00から午後約2：00）。午後約2：00に、血液を尾の先端から採取した（約150  $\mu$  L、EDTA）。血中グルコース（血糖測定器）及び血漿インスリン（ELISA）を測定し、HOMA-IR（インスリン抵抗性指数）を算出した。HOMA-IR極値を表

す 11 匹の ZDF fa / fa ラットを、本試験から除外したが、本試験終了時の血漿採取のために 28 日間収容し続けた。次いで、70 匹の残りのラットを、その HOMA - IR 及び体重に従って 7 つの処置群に無作為に割り振った。除脂肪ラットを全て第 1 群に保持し、ビヒクルのみで処置した。

## 【0473】

4 週間の処置中は体重を週 2 回測定した。

## 【0474】

食物消費量をスクリーニング手順の直前に測定し、それから処置の最初の 3 週間は、週 2 回 24 時間にわたって測定した。食物消費量は OGTT の週（第 4 週）には週 1 回測定した。

10

## 【0475】

絶食（0 日目の午前 8:00 から午後 2:00 までの 6 時間、及び 12 日目、19 日目、及び 26 日目の午後約 6:00 から午前約 8:00 まで一晩）を各採血の前に実施した。血液を尾の先端から、0 日目の午後約 2:00（スクリーニング前、150 μL、カリウム EDTA）、及び 12 日目（110 μL、カリウム EDTA）、19 日目（150 μL、カリウム EDTA）及び 26 日目（110 μL、カリウム EDTA）の投薬の前の午前約 8:00 に採取した。

## 【0476】

空腹時血糖（血糖測定器）を 0 日目、12 日目、19 日目、及び 26 日目に測定した。空腹時血漿インスリン、ペプチド - C（ELISA 法）、遊離脂肪酸、トリグリセリド、総コレステロール（比色法）、及び HDL - コレステロール（リンタンゲステン酸塩沈殿、比色法）を 0 日目、及び 12 日目、19 日目及び 26 日目の投薬の前に測定した。非 HDL - コレステロールを総コレステロールから HDL - コレステロールを引いて算出した。フルクトサミンを 0 日目、19 日目及び 28 日目に測定した。HbA1c（DCA2000）を 0 日目及び 28 日目に測定した。

20

## 【0477】

経口ブドウ糖負荷試験（OGTT）を以下のように実施した。25 日目に、ラットを午後約 6:00 に絶食させ、経口ブドウ糖負荷試験を翌日（26 日目）に実施した。午前約 8:00（T - 60）に、採血（110 μL、EDTA）を生化学的なパラメータ測定のために実施した。1 時間後（午前約 9:00）に、経口グルコースをボーラス投与した（1.5 g / kg）（T0）。血中グルコースを（血糖測定器または高糖血の場合には比色法）、T - 60、T0、T15、T30、T60、T90、T120、及び T180 分に測定した。曲線下面積（AUC）を、T0 で測定された血中グルコース値に基づいて算出した。血漿インスリン及び C - ペプチドを T - 60、T15（約 40 μL の血液、EDTA）、及び T30 分（約 40 μL の血液、EDTA）に測定した（ELISA 法）。

30

## 【0478】

2 時間の食餌制限（午前 8:00 から午前 10:00）の後、本試験からの 80 匹のラットをイソフルランで 28 日目に麻酔した。Ab14 の血漿濃度を決定するために血液を採取した（腹静脈から約 3000 μL、K2 - EDTA 上）。血漿（約 200 μL の 3 アリコート）を検査まで -80 に保った。次いで脾臓組織を切除した。ラットを腹静脈及び大動脈の切開により安樂死させた。

40

## 【0479】

各脾臓を、2 つの部分（縦方向カット）に分割した。一片を病理組織学的処理のために 10 % ホルマリン溶液中で固定した。脾臓の他片は、瞬間凍結してインスリン及びプロインスリンレベルの決定のために -80 に保った。

## 【0480】

本試験から除外された 11 匹の ZDF fa / fa ラットを 28 日間収容した後で屠殺した。ラットはイソフルランで麻酔された。血液を腹静脈から採取した（カリウム EDTA 上で最大容量）。血漿試料（各 1 mL の 2 アリコート）をさらなる検査のために凍結した。ラットを腹静脈及び大動脈の切開により安樂死させた。

50

## 【0481】

各臍臓試料を酸性緩衝液中で均質化し、インスリン及びプロインスリン含有率をELISAキットを使用して以下の群において測定した。

## 【0482】

第1群：除脂肪ラット + ビヒクル (n = 10)

## 【0483】

第2群：ZDFラット + ビヒクル (n = 10)

## 【0484】

第4群：ZDFラット + Ab14 60mg/kg/週 (n = 10)

## 【0485】

第5群：ZDFラット + メトホルミン 200mg/kg/日 (n = 10)

10

## 【0486】

第8群：ZDFラット + Ab14 60mg/kg/週 + メトホルミン 200mg/kg/日 (n = 10)

## 【0487】

各臍臓試料を、最大24~48時間の間、4%ホルマリン中で固定した；ホルマリンの容量は、適切な固定を確かにするために試料の容量よりも5~10倍高くした。48時間後、試料を70%エタノールに入れた。試料を次いで、以下の群における組織学的処理のためにパラフィンに含めた。

## 【0488】

20

第1群：除脂肪ラット + ビヒクル (n = 10)

## 【0489】

第2群：ZDFラット + ビヒクル (n = 10)

## 【0490】

第4群：ZDFラット + Ab14 60mg/kg/週 (n = 10)

## 【0491】

第5群：ZDFラット + メトホルミン 200mg/kg/日 (n = 10)

## 【0492】

第8群：ZDFラット + Ab14 60mg/kg/週 + メトホルミン 200mg/kg/日 (n = 10)

30

## 【0493】

ランゲルハンス島を描写した後、表面及びインスリン標識の強度を、標識領域（茶色）及び非標識（青）領域の画像解析により定量化した。

## 【0494】

ビヒクルZDFラット及び除脂肪ラットの平均を、フィッシャー検定が変数における有意差を示さなかったときに、スチューデント検定を使用して比較した。そうでない場合、ノンパラメトリックなマン・ホイットニー検定を使用した。

## 【0495】

処置されたZDFラットの平均を一元配置分散分析 + ダネットの事後検定を使用してビヒクルZDFラットと比較した。バートレットの検定が変数における有意差を示した場合には、ノンパラメトリックなクラスカル - ウオリス + ダンの事後検定を使用した。

40

## 【0496】

Ab14 20mg/kg単独の平均を、一元配置分散分析 + ニューマン - コイルス事後検定を使用して、メトホルミン 200mg/kg単独またはAb14 20mg/kgとの併用と比較した。

## 【0497】

Ab14 60mg/kg単独の平均を、一元配置分散分析 + ニューマン - コイルス事後検定を使用して、メトホルミン 200mg/kg単独またはAb14 60mg/kgとの併用と比較した。

## 【0498】

50

曲線を、二元配置分散分析 + ボンフェローニの事後検定を使用して分析した。

【0499】

ラットは全てまたはほぼ全てパラメータが外れ値である場合に除外された。この結果、4匹のラットが除外され、それぞれ異なる群のラットだった。

【0500】

結果

【0501】

8週齢のZDFラットでは想定通り、HOMA - IRは除脂肪ラットと比較して強く増加した(約111対3.5、図18A)。ZDFラットは軽度に高血糖(約180対113mg/dL、図18B)であり、高インスリン血症(約250対12.6μU/mL、図18C)であった。体重はZDFラットにおいて微かに増加した(図18D)。

【0502】

除脂肪ラットと比較して、ZDFラットの体重は全処置期間にわたって高いままであった(図19A)。一方で、体重増加は除脂肪ラットとZDFラット間で同様であった(図19B)。

【0503】

ピオグリタゾンはZDFビヒクルラットと比較して処置の8日目から体重を有意に増加させ、体重増加は処置の終了時には3倍高かった(図19A及びB)。全ての他の薬物処置は、ビヒクルZDFラットと比較して体重に有意な効果を有さなかった。Ab14 60mg/kg + メトホルミン 200mg/kgの併用は、処置の22日目から体重増加を有意に増加させた(図19B)。

【0504】

食物摂取量は、除脂肪ラットと比較してビヒクルZDFラットにおいて約2倍増加した(13日目に有意)。ピオグリタゾンで処置されたラットは、ZDFビヒクルラットと比較して食物消費量がより高い傾向を示した(15日目、20日目及び22日目に有意、図20A)。累積食物摂取量は除脂肪群と比較してビヒクルZDF群において94%(p < 0.01)、及びビヒクルZDF群と比較してピオグリタゾン群において14%(NS、図20B)増加した。他の処置は、ビヒクルで処置されたZDFラットと比較して、食物摂取量に効果を有さなかった。

【0505】

空腹時血糖は、6時間絶食後または一晩絶食後のいずれにおいても除脂肪ラットでは26日間の処置中正常な範囲のままであった(図21A)。これは正常なインスリンレベルと相關した(図21B)。ビヒクルZDFラットでは、一晩絶食時の血糖は12日目(10週齢)に $362 \pm 32 \text{ mg/dL}$ に達し、処置の終了時まで除脂肪ラットより有意に高いままであった(図21A)。これは12日目、19日目、及び26日目に測定された、血漿インスリンレベルの低減(除脂肪ラットに対して $49.2 \pm 6.7$ 、 $41.2 \pm 4.8$ 、及び $36.6 \pm 2.7 \mu\text{U/mL}$  -  $p < 0.001$ 、図21B)及び血漿C-ペプチドレベルの低減(除脂肪ラットに対して、 $2813 \pm 249$ 、 $2472 \pm 195$ 、 $2156 \pm 165 \text{ pM}$  -  $p < 0.001$ )と相關した(図21D)。除脂肪ラット及びビヒクルZDFラットにおけるHOMA - IRの展開は、血中グルコース及び血漿インスリンレベルにおける変化を反映した(図21C)。

【0506】

ピオグリタゾンは、12日間の処置から一晩絶食時の血糖値を正常なレベルへと有意に低減させた( $p < 0.001$ 、図21A)。両方の用量でAb14は血中グルコースを12日、19日または26日間の処置後に約15%低減させた(n.s、図21A)。Ab14と比較して、メトホルミン 200mg/kgは、12日目に同様の効果を有したが、この効果は19日目及び26日目にはされなかった。ビヒクルで処置されたZDFラットと比較して、Ab14 20mg/kg + メトホルミンの併用は、12日目に血中グルコースを微かに低減させ(12%、n.s)、19日目及び26日目には効果を示さなかった(図21A)。対照的に、メトホルミンとAb14 60mg/kgの併用は12日目

に血糖値を有意に低下させた（38%、 $p < 0.01$  対ビヒクルで処置されたZDFラット）。統計学的に有意ではないが、血液減少は19日目及び26日目にまだ観察された（それぞれ22%及び27%、図21A）。

【0507】

ピオグリタゾンは、ビヒクルZDFラットと比較して12日目、19日目、及び26日に血漿インスリン及びC-ペプチドレベルに効果を示さないために、インスリン分泌に保護的効果を有さないものと思われる（図21B及びD）。ゆえに、血糖値の低下は、ピオグリタゾンのインスリン感作効果に関し、ピオグリタゾンは、ビヒクルZDFラットと比較してHOMA-IRを12日目、19日目及び26日目にそれぞれ67%、62%及び54%低下させた。（図21C）。

10

【0508】

ビヒクルで処置されたZDFラットと比較して、Ab14 20mg/kgは、12日目、19日目及び26日目の血漿インスリン及びC-ペプチドレベル、ならびにHOMA-IRを変化させなかった（図21B～D）。一方で、Ab14 60mg/kgは12日目、19日目及び26日目に血漿インスリンレベルをそれぞれ74%、21%及び19%増加させた（ns対ビヒクルZDFラット、図21B）。

【0509】

Ab14 60mg/kgは、血漿C-ペプチドレベルを12日目に10%（ns）増加させ、19日目及び26日目には効果を有さなかった（図21D）。

【0510】

ビヒクルで処置されたZDFラットと比較して、メトホルミンは、12日目、19日目及び26日に血漿インスリンレベルをそれぞれ79%、55%及び48%増加させた（ns、図21B）。メトホルミンは、12日目、19日目及び26日目に血漿C-ペプチドレベルをそれぞれ23%、21%、及び9%増加させた（NS対ビヒクルで処置されたZDFラット、図21D）。

20

【0511】

ビヒクルで処置されたZDFラットと比較して、Ab14 20mg/kg+メトホルミンの併用は、12日目、19日目及び26日目に血漿インスリンレベルを倍増させた（NS、図21B）。Ab14 20mg/kg+メトホルミンの併用は、12日目、19日目及び26日目に血漿C-ペプチドレベルをそれぞれ21%、23%及び25%増加させた（NS、図21D）。

30

【0512】

ビヒクルで処置されたZDFラットと比較して、Ab14 60mg/kg+メトホルミンの併用は、12日目、19日目及び26日目に血漿インスリンレベルを有意に増加させ、それぞれ2.5倍、2.3倍及び2.7倍に増加させた。Ab14 60mg/kg+メトホルミンの併用は、血漿C-ペプチドレベルを12日目から有意に増加させ、45%（12日目）、48%（19日目）、及び52%（26日目）増加させた（ $p < 0.05$  対ビヒクルで処置されたZDFラット、図21D）。

【0513】

インスリン分泌が継続的に低下したこのモデルでは、HOMA-IRの増加はインスリン分泌の増加を反映した。ゆえに、HOMA-IRの増加は、ビヒクルZDF群と比較して、メトホルミン単独またはAb14との併用処置群において観察され、この増加は12日目、19日目及び26日目に維持された（図21C）。

40

【0514】

除脂肪ラットと比較して、フルクトサミンは、8週齢のビヒクルで処置されたZDFラットにおいて有意に高かった（66%）（ $144 \pm 2$  対して  $208 \pm 6 \mu M$ 、 $p < 0.001$ ）。フルクトサミンレベルは、処置期間中、除脂肪ラットでは同様の範囲のままであったが、ビヒクルZDFラットでは19日（ $253 \pm 5 \mu M$ 、 $p < 0.001$ ）及び28日（ $234 \pm 6 \mu M$ 、 $p < 0.001$ ）間の処置後に増加した（図22）。想定通り、ピオグリタゾンは、フルクトサミンレベルを19日目から有意に低下させた（19日目に

50

は 30%、及び 28 日目には 25%、 $p < 0.001$ ）。Ab14 20 及び 60 mg / kg は、フルクトサミンレベルに効果を有さなかった。ビヒクルで処置されたラットと比較して、メトホルミンは、19 日目（6% 低下、ns）においてのみフルクトサミンレベルが低くなる傾向を示した。ビヒクルで処置された ZDF ラットと比較して、Ab14 20 mg / kg + メトホルミンの併用は、19 日目と 28 日目にそれぞれ 10% と 8% フルクトサミンレベルを低くする有意でない傾向を示した。同様に、Ab14 60 mg / kg + メトホルミンの併用は、28 日目にフルクトサミンレベルを低くする（9%）有意でない傾向を示した。（図 22）。

#### 【0515】

除脂肪ラットと比較して、HbA1c は 8 週齢の ZDF ラットにおいてより高かった（3.1 ± 0.04% に対して 4.3 ± 0.1%）が、これらの値は正常な範囲内であった。

#### 【0516】

12 週齢の ZDF ラットでは、HbA1c は、28 日目に 8.8 ± 0.2% の病理学的な値に達した（ $p < 0.001$  ZDF 対除脂肪ラット、図 23）。ビヒクルで処置された ZDF ラットと比較して、Ab14 20 及び 60 mg / kg は、28 日間の処置後 HbA1c レベルに効果を有さなかった。28 日間の処置後、ピオグリタゾン及びメトホルミンは HbA1c を有意に低減させ、それぞれ 44% 及び 15% 低減させた（図 23）。メトホルミンと Ab14 20 mg / kg の併用及びメトホルミンと 60 mg / kg の併用は HbA1c を有意に低下させ、それぞれ 11% 及び 19% 低下させた（図 23）。

#### 【0517】

除脂肪ラットと比較して、血漿トリグリセリドレベルは、8 週齢の ZDF ラットにおいて強く増加された（約 0.7 mM に対して約 8 mM、図 24A）。

#### 【0518】

ビヒクルと比較して、ピオグリタゾンは、血漿トリグリセリドレベルを処置の 12 日目から強く低減させた。Ab14 20 mg / kg は、12 日目及び 19 日目に血漿トリグリセリドレベルを微かに低減させ（それぞれ 15% 及び 7%、ns）、26 日目には効果を有さなかった。Ab14 60 mg / kg は、12 日目、19 日目及び 26 日目に血漿トリグリセリドレベルを微かに低減させ、それぞれ 14%、9% 及び 12% 低減させた（ns）。メトホルミンは、12 日目、19 日目及び 26 日目に血漿トリグリセリドレベルをそれぞれ 26%、40%、及び 49% 増加させた（19 日目から有意）。メトホルミン + Ab14 20 mg / kg の併用は、ビヒクル ZDF 群と比較して 19 日目及び 26 日目に血漿トリグリセリドを高くする傾向（それぞれ 13% 及び 23%、ns）を示した。メトホルミン + Ab14 60 mg / kg の併用は、12 日目、19 日目及び 26 日目に血漿トリグリセリドを高くする傾向（それぞれ 9%、48% 及び 43%、19 日目から有意、図 24A）を示した。

#### 【0519】

6 時間の絶食の後、血漿遊離脂肪酸レベルは、除脂肪ラットよりも 8 週齢の ZDF ラットにおいて高かった（約 0.59 mM に対して約 0.85 mM）。一晩絶食（最大脂肪分解条件）の後、遊離脂肪酸レベルは、10 週及び 11 週で同様であった（約 1.3 mM）。処置の 12 週目で、より低くなる遊離脂肪酸レベルで示されるように、除脂肪ラットと比較して、ZDF ラットの脂肪分解能力が低減した（ $1.38 \pm 0.03$  に対して  $1.05 \pm 0.06$  mM、図 24B）。ビヒクル ZDF ラットと比較して、ピオグリタゾンで処置されたラットは、12 日目に 35%（ $p < 0.001$ ）、19 日目に 17%（ns）及び 26 日目に 30%（ $p < 0.05$ ）低い血漿遊離脂肪酸レベルを示した。Ab14 20 及び 60 mg / kg は効果を有さなかった。メトホルミンは、ビヒクル ZDF ラットと比較した時、遊離脂肪酸レベルを 12 日目、19 日目及び 26 日目に 14%、25% 及び 8% 増加させたが、有意ではなかった。メトホルミン単独または Ab14 20 mg / kg との併用の効果は同様であった。一方で、Ab14 60 mg / kg と併用した時、メ

10

20

30

40

50

トホルミンは、ビヒクルZDF群と比較したとき19日においてのみ増加効果を示した（20%増加、NS、図24B）。

#### 【0520】

除脂肪ラットと比較して、血漿総コレステロール及びHDL-コレステロールレベルは8週齢のZDFラットにおいてより高く、その後4週間にわたって徐々に増加した（図25A～B、図26A～B）。血漿非-HDLコレステロールレベルは、生後8週目では除脂肪ラット及びZDFラットで同様であったが、10週目から除脂肪ラットに対してZDFラットにおいて継続的に増加した（図25C及び図26C）。0日目のZDF群間で総コレステロール及びHDL-コレステロールにおいて有意差があったため（図25）、結果を0日目からの相対値で表した（図26）。図26Aに示すように、ピオグリタゾンは継続的な血漿総コレステロールレベルの増加を防ぐ傾向があった。Ab14 20mg/kg及びメトホルミンは効果を示さなかった。Ab14 60mg/kgは、ビヒクルZDF群と比較して、総コレステロールを12日目、19日目、及び26日目にそれぞれ8%、14%、及び15%増加させた。メトホルミンと併用したとき、ビヒクルZDF群と比較して、Ab14 20mg/kgは、総コレステロールを12日目及び26日目にそれぞれ15%及び10%増加させ、一方でAb14 60mg/kgは総コレステロールを12日目、19日目及び26日目にそれぞれ24%、21%及び13%増加させた。ビヒクルと比較して、ピオグリタゾンは血漿HDL-コレステロールを12日目、19日目、26日目にそれぞれ38%、17%及び19%増加させた。メトホルミン単独は効果を有さなかった。Ab14 20mg/kg及び60mg/kgの単独、またはそれらのメトホルミンとの併用は、血漿HDL-コレステロールレベルを12日、19日、26日間の処置後、11%から22%増加させた。血漿非HDL-コレステロールレベル（図26C）は、12日間の処置後全てのZDF群において同様であった。ビヒクルと比較して、Ab14 20mg/kg、Ab14 60mg/kg、メトホルミン（単独またはAb14と併用）は、非HDL-コレステロールレベルに効果を有さなかった。ピオグリタゾンのみが、血漿非HDL-コレステロールレベルを有意に低減し、19日目及び26日目にそれぞれ49%及び47%低減させた。

#### 【0521】

経口ブドウ糖負荷試験は、26日間の処置後に実施した。ビヒクルで処置された除脂肪ラットと比較して、血糖値はグルコース負荷の前後で、ビヒクルで処置されたZDFラットにおいて想定通り高かった（図27A）。ビヒクルで処置されたZDFラットと比較して、ピオグリタゾンで処置されたZDFラットのみが、全時点で有意に低下した血糖値を示した。ビヒクルと比較して、Ab14 60mg/kg及びメトホルミンの併用は、t-60分で血糖値を低下させる傾向にあり（図27A）、一方で他の薬物処置は有意な効果を示さなかった。除脂肪ラットと比較して、血中グルコース曲線下化面積（AUC）は、ビヒクルで処置されたZDFラットにおいて有意に増加され、3.7倍に増加された。ビヒクルで処置されたZDFラットと比較して、ピオグリタゾンで処置されたラットは、血中グルコースAUCにおいて有意な54%の低下を示した。Ab14 20mg/kg、Ab14 60mg/kg及びメトホルミン（単独または20mg/kgまたは60mg/kgのAb14との併用）は、AUCの有意でない低下を示した（それぞれ、7%、11%、6%、7%及び17%）。Ab14 60mg/kg+メトホルミンの併用は、AUCの低下においてAb14またはメトホルミン単独と比較して微かにより効果的であった（図27B）。

#### 【0522】

血漿インスリン及びC-ペプチドレベルを、グルコース負荷の15分後及び30分後に測定した。濃度対時間プロファイルは、インスリン及びC-ペプチドの両方について類似した。インスリン及びC-ペプチドレベルは、ビヒクル、Ab14 20mg/kg及びAb14 60mg/kg処置群間で類似し、メトホルミン及びピオグリタゾン処置群において微かに増加し、メトホルミンと組み合わせたAb14 20mg/kg及びAb14 60mg/kgで処置された群において用量依存的様式でより増加した（図28A～

B）。グルコース負荷に応答するインスリンまたはC-ペプチド分泌能力を、T-60分から算出した相対値で結果を表すことによって評価した。想定通り、ビヒクルZDFラットは、除脂肪ラットと比較して、グルコース負荷に応答してインスリン及びC-ペプチドを分泌するその能力を有意に喪失した。（図29A～B）。ビヒクルで処置されたZDFラットと比較したとき、ピオグリタゾンで処置されたラットは、インスリン分泌をT15及びT30分の時点でそれぞれ20%（p < 0.05）及び5%増加させた。全ての他の処置はT15時点でインスリン分泌に効果を有さなかった。メトホルミンは、インスリン分泌をT30の時点で26%低減させた（p < 0.01）。Ab14 20mg/kg単独は、T30時点で効果を有さず、メトホルミンと併用してインスリン分泌を低減させる傾向（14%、ns）を示した。Ab14 60mg/kg単独またはメトホルミンとの併用は、インスリン分泌を低減させる傾向を示し、それぞれ19%及び18%低減させた（図29A）。除脂肪ラットと比較して、グルコース負荷に応答するC-ペプチド分泌（図29B）は、ビヒクルで処置されたZDFラットにおいて有意に低下し、T15及びT30の時点で約40%低下した。ビヒクルで処置されたZDFラットと比較した時、ピオグリタゾンのみが、C-ペプチド分泌を有意に増加させ、T15及びT30の時点でそれぞれ21%及び22%増加させた。

#### 【0523】

想定通り、膵臓プロインスリン（図30A）及びインスリン（図30B）レベルは、除脂肪ラットと比較して12週齢のZDFラットにおいて有意に低かった。Ab14 60mg/kg及びメトホルミンは、プロインスリンの低下を完全に予防し、メトホルミンと組み合わせたAb14 60mg/kgは、プロインスリンレベルを有意に増加させた（p < 0.05対ビヒクル）（図30A）。Ab14 60mg/kgは、膵臓インスリンレベルを微かに増加させ、メトホルミンまたはメトホルミンと組み合わせたAb14 60mg/kgは、インスリンレベルを有意に増加させた（p < 0.05対ビヒクル）（図30B）。除脂肪ラットと比較して、プロインスリン/インスリン比率はZDFラットにおいて有意に増加したが、薬物処置で変化は観察されなかった（図30C）。

#### 【0524】

ビヒクル、Ab14、メトホルミンまたはAb14/メトホルミン併用のいずれかで処置された除脂肪またはZDFラットの膵臓の顕微鏡的变化に焦点をあてた本試験において毒性の証拠は報告されなかった。

#### 【0525】

膵島過形成に対応する、限局性から多巣性の大/巨大な膵島（複数可）及び膵島線維症の発生率及び重症度がより高いことがビヒクル対照を与えられたZDFラットにおいて認められた（表1及び表2）。

#### 【0526】

表1. 病理組織学的（Histopathological）所見の発生率。全ての処置群は、別段の指示がない限りZDFラットとした。Met.：メトホルミン 200mg/kg/日。

【表3-1】

所見	重症度	ビヒクルのみ (ZDF 除脂肪ラット)	ビヒクルのみ	Ab 1460mg/kg/週.	Met.	Ab 1460mg/kg/週. + Met.
膵島線維症	0	6	—	—	—	—
	1	2	—	4	3	7
	2	2	2	3	7	1
	3	—	7	2	—	1
褐色色素貪食	0	4	—	—	—	—
	1	4	6	7	7	8
	2	2	3	2	3	1
	3	—	—	—	—	—
単核細胞浸潤	0	4	—	—	—	—
	1	5	7	9	10	8
	2	1	2	—	—	1
	3	—	—	—	—	—
膵島細胞の空胞化	0	10	—	—	1	1
	1	—	1	6	4	7
	2	—	8	3	5	1
	3	—	—	—	—	—
膵島細胞単細胞壊死	0	9	3	5	7	3
	1	1	6	4	3	6
	2	—	—	—	—	—
	3	—	—	—	—	—
膵島赤血球大小不同症 / 核大小不同症	0	10	1	5	2	1
	1	—	8	4	8	8
	2	—	—	—	—	—
	3	—	—	—	—	—
膵島顆粒球浸潤	0	8	6	5	6	7
	1	2	3	4	4	2
	2	—	—	—	—	—
	3	—	—	—	—	—

10

20

30

40

【表3-2】

膵島出血	0	8	7	7	8	7	
	1	2	2	2	2	2	
	2	—	—	—	—	—	
	3	—	—	—	—	—	
膵島細胞 の有糸分裂	0	9	6	7	5	8	10
	1	1	3	2	5	1	
	2	—	—	—	—	—	
	3	—	—	—	—	—	
間質性出血	0	2	2	3	4	2	
	1	7	5	4	6	5	
	2	1	2	2	—	2	
	3	—	—	—	—	—	
間質性纖維増殖／ 線維症	0	5	5	8	9	8	20
	1	5	3	1	1	1	
	2	—	1	—	—	—	
	3	—	—	—	—	—	
動脈、中膜 ／内膜肥大	0	10	6	6	9	7	
	1	—	2	3	1	2	
	2	—	1	—	—	—	
	3	—	—	—	—	—	
膵管過形成	0	9	3	9	5	8	30
	1	1	6	—	5	1	
	2	—	—	—	—	—	
	3	—	—	—	—	—	
外分泌細胞 の空胞化	0	8	8	8	10	7	
	1	2	1	1	—	2	
	2	—	—	—	—	—	
	3	—	—	—	—	—	
好酸性顆粒球浸潤	0	9	6	8	10	5	40
	1	1	3	1	—	3	
	2	—	—	—	—	1	
	3	—	—	—	—	—	
大／巨大 な膵島	0	5	1	—	1	—	
	1	5	2	4	1	1	
	2	—	5	3	3	5	
	3	—	1	2	5	3	

【0527】

表2. 病理組織学的分析：基本的所見の群平均スコア。別段の指示がない限り、全処置群はZDFラットとした。Met.：メトホルミン 200mg/kg/日。

【表4-1】

臓器	所見	ビヒクルのみ(ZD F 除脂肪ラット)	ビヒクルのみ	A b 1 4 6 0 m g / k g / 週.	M e t.	A b 1 4 6 0 m g / k g / 週. + M e t.
脂肪組織	脂肪組織壊死	0	0	0	0	0
リンパ節	褐色色素貪食マクロファージ	0	1	0	0	1
	好酸性顆粒球浸潤	1	1	0. 5	0. 5	0
	赤血球貪食-類洞	1	1. 5	1	0	1
	P i n k p r o t e i n が豊富な類洞 リンパ (P i n k p r o t e i n r i c h s i n u s o i d a l l y m p h )	0	0	0	0	0
	類洞出血	1	0. 5	0	0	1
	類洞マスト細胞	0	0	0	0	0

10

20

30

【表4-2】

脾臓	動脈、中膜／内膜肥大	0	0	0	0	0
	褐色色素貪食マクロファージ	1	1	1	1	1
	好酸性顆粒球浸潤	0	0	0	0	0.5
	外分泌細胞の空胞化	0	0	0	0	0
	間質性纖維増殖／線維症	0.5	0	0	0	0
	間質性出血	1	1	1	1	1
	脾島細胞赤血球大小不同症／核大小不同症	0	1	0.5	1	1
	脾島細胞有糸分裂	0	0	0	0.5	0
	脾島細胞単細胞壊死	0	1	0.5	0	1
	脾島細胞の空胞化	0	2	1	1.5	1
	脾島線維症	0	3	2	2	1
	脾島の顆粒球浸潤	0	0	0	0	0
	脾島出血	0	0	0	0	0
	大／巨大脾島(複数可)	0.5	2	1.5	2.5	2
	単核細胞浸潤	1	1	1	1	1
	脾管過形成	0	1	0	0.5	0

## 【0528】

除脂肪ラットと比較して、ビヒクルで処置されたZDFラットは、微かな脾島細胞の空胞化を有し、脾島線維症の発生率及び重症度が増加した。全ての薬物処置、Ab14-60mg/kg、メトホルミン、またはAb14とメトホルミンの併用で、空胞化及び脾島線維症の重症度における低減に向かう一致した傾向があった。これらの効果は、Ab14とメトホルミンが併用された時により明白だった。

## 【0529】

想定通り、免疫組織化学によって測定された脾臓インスリンは、ZDFラットにおいてインスリン標識の低下を示した。インスリン含有率測定から観察されるように(図30B)、薬物処置は、このインスリン標識低下を微かに予防し、Ab14とメトホルミンが組み合わされたときにより良好な効果を示した(図31)。

## 【0530】

考察

10

20

30

40

50

**【 0 5 3 1 】**

著しいインスリン抵抗性であり重度の高インスリン血症であるが軽度にのみ高血糖である 8 週齢の ZDF ラットに、Ab14 を静脈内に 0 mg / kg ( ビヒクル ) 、 20 mg / kg 、または 60 mg / kg の用量で週 1 回 4 週間与えた。この期間中、ビヒクルで処置された対照は、本試験の 12 日目までに明らかな糖尿病へと進行して重度の低インスリン血症及び著しい高血糖であり、これは生後 10 週までの完全な膵細胞不全と矛盾しない。これは、その両方が実質的に低下した膵臓インスリン及びプロインスリンレベルの直接測定によって、及びこれまた劇的に低下した膵臓インスリン標識の免疫組織化学的評価を通して、本試験の終了時に確認された。加えて、本試験の終了時に行われた組織学的分析はまた、これらの動物における膵島空胞化、膵島過形成 ( 大 / 巨大膵島 ( 複数可 ) ) 、及び膵島線維症の発生率及び重症度の増加を実証し、これは糖尿病膵島の病理と一致した。  
10

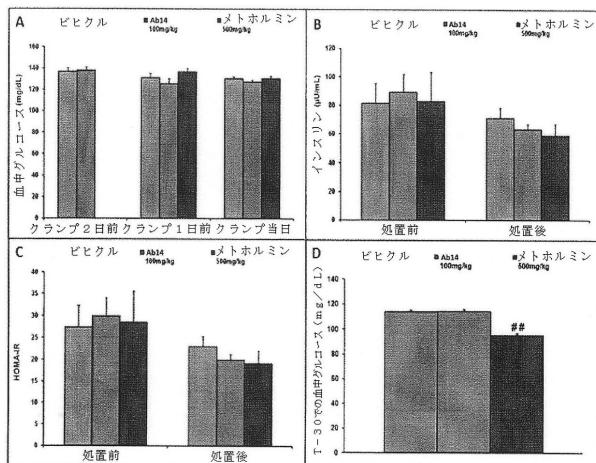
**【 0 5 3 2 】**

それに対し、本試験の 12 日目でのビヒクルで処置された対照における空腹時血糖の上昇は、両用量の Ab14 によって部分的に予防され、この部分的予防は本試験の 19 日目及び 26 日目にも観察された。加えて、高用量の Ab14 はまた、本試験の 12 日目にビヒクルで処置された対照において観察された血漿インスリン及び C - ペプチドレベルの低下を部分的に予防した。この部分的予防は、より少ない程度ではあるが、本試験の 19 日目及び 26 日目でも観察され、これは疾患進行 ( 膵細胞不全 ) のわずかな遅延を示し、化合物による部分的な膵臓細胞保護を示唆する。実際に、高用量の Ab14 は、膵臓組織を本試験終了時 ( 28 日目 ) に得たときにビヒクルで処置された対照において観察された膵臓プロインスリンレベルの低下も完全に予防し、直接的にまたは免疫組織化学的な分析を通して測定されたとき、膵臓インスリンレベルの低下も部分的に予防した。さらには、Ab14 は、本試験終了時の組織学的評価の際にビヒクルで処置された動物において認められた膵島空胞化、膵島線維症、及び膵島過形成を一貫して低減し、これは糖尿病の膵島病理への好ましい影響をさらに示す。  
20

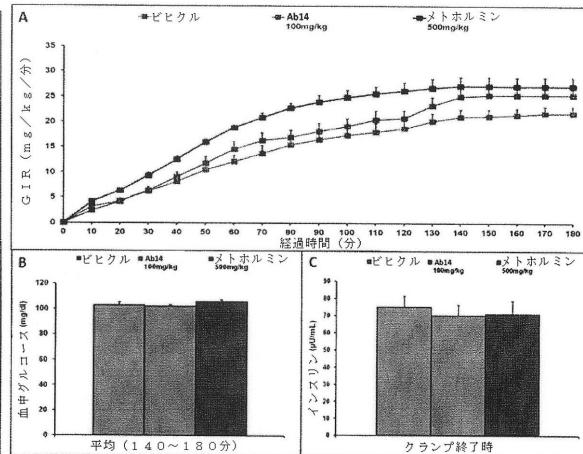
**【 0 5 3 3 】**

実施例 2 において実証されるように、ビヒクルで処置された対照群と比較したとき、Ab14 は、食物消費量または体重に効果を有さず、これは上記で評価されたパラメータに及ぼす Ab14 の効果は、カロリー制限または体重減少の結果でないことを示す。

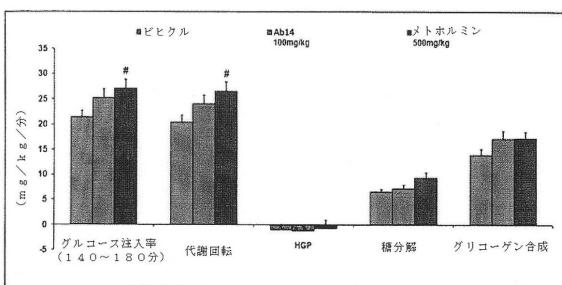
【図1】



【図2】

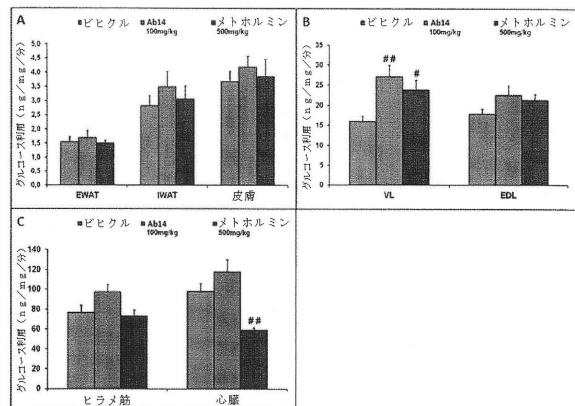


【図3】

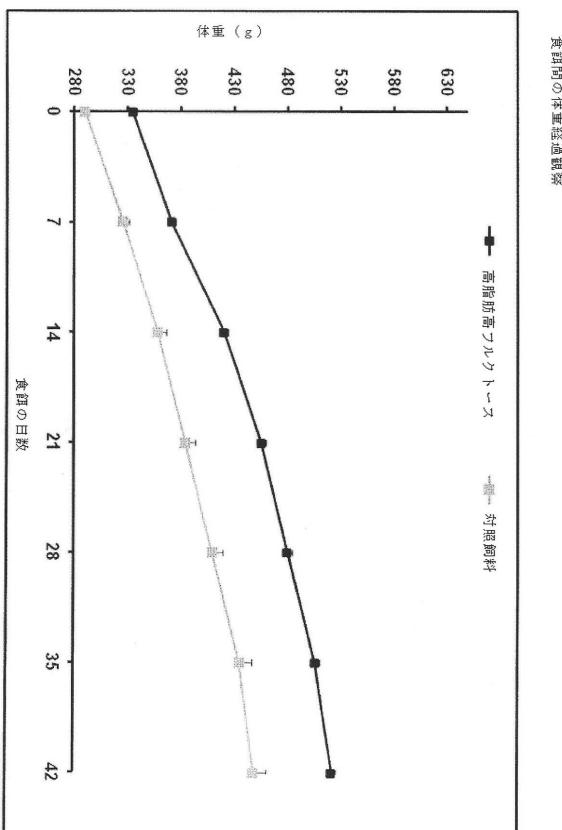


測定したグルコースフラックス。

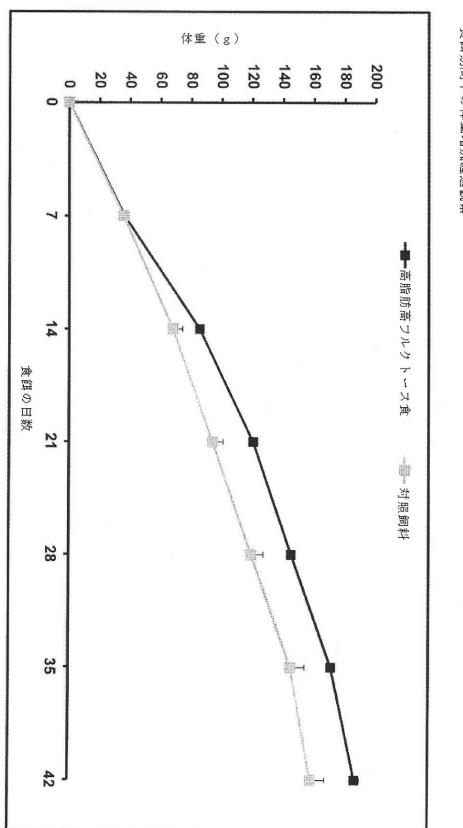
【図4】



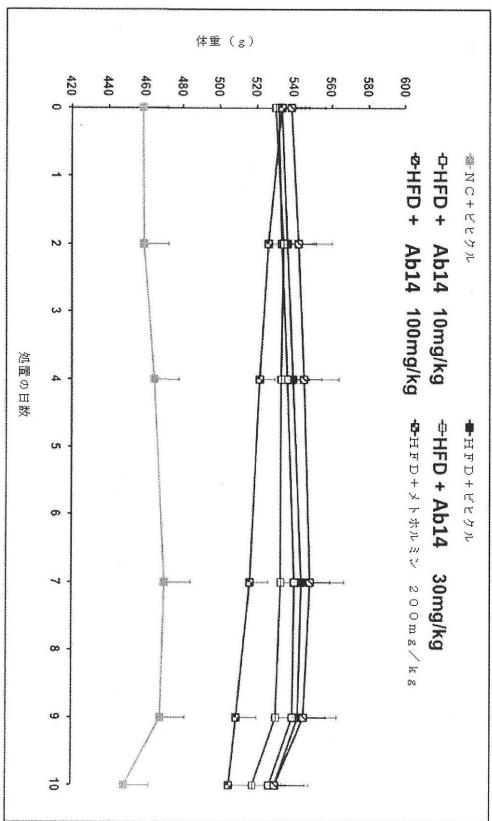
【図5】



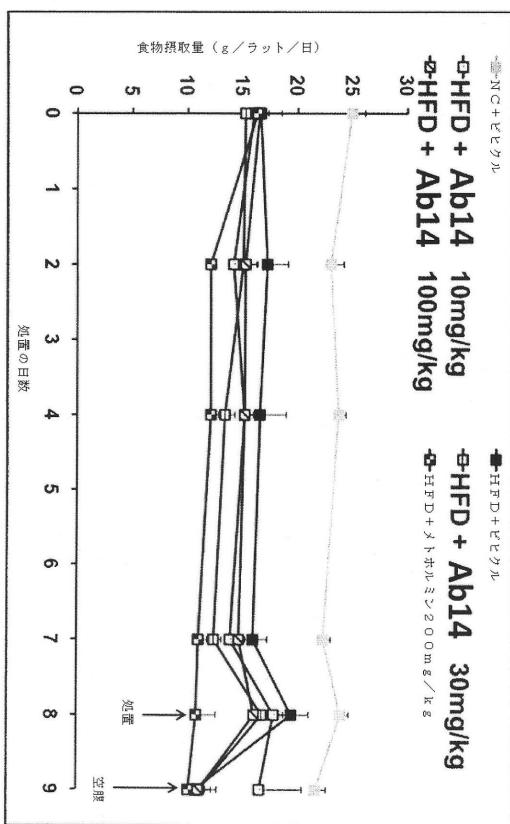
【図 6】



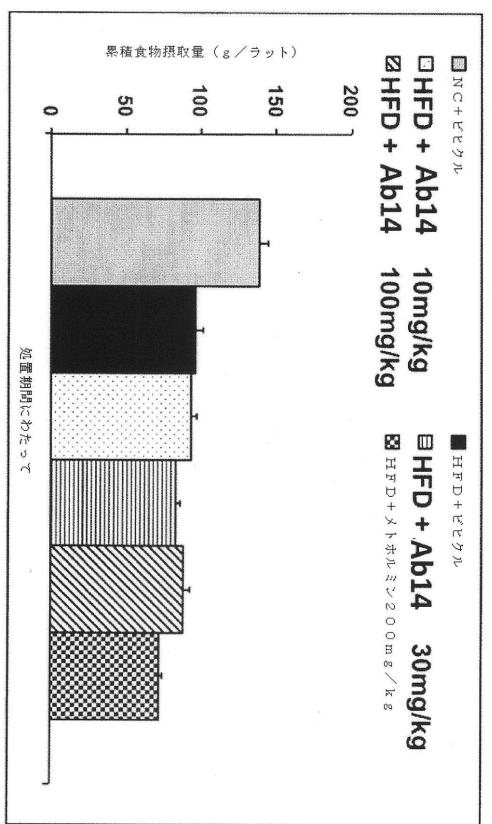
【図 7】



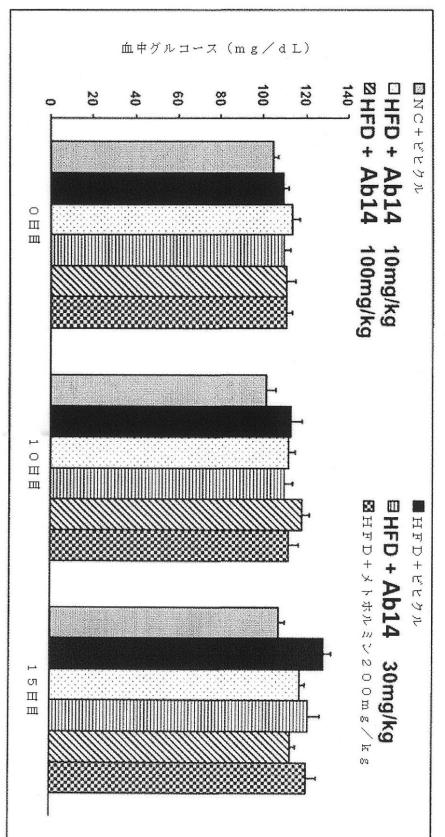
【図 8 A】



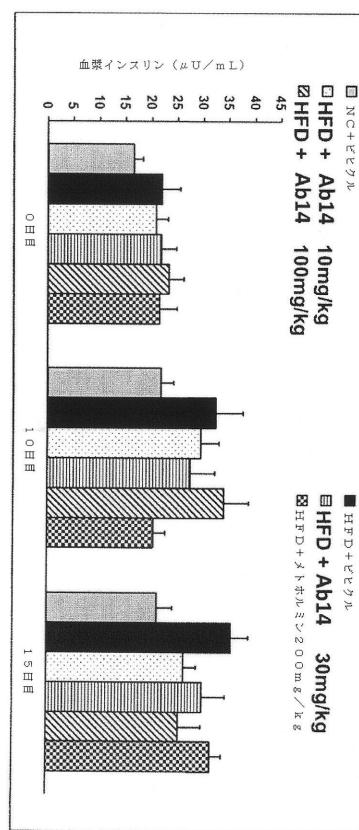
【図 8 B】



【図 9】

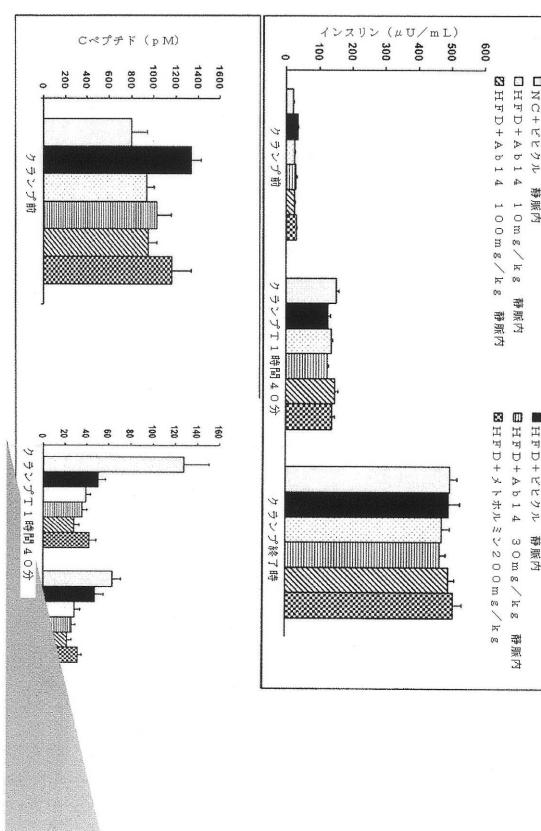


【図 10】

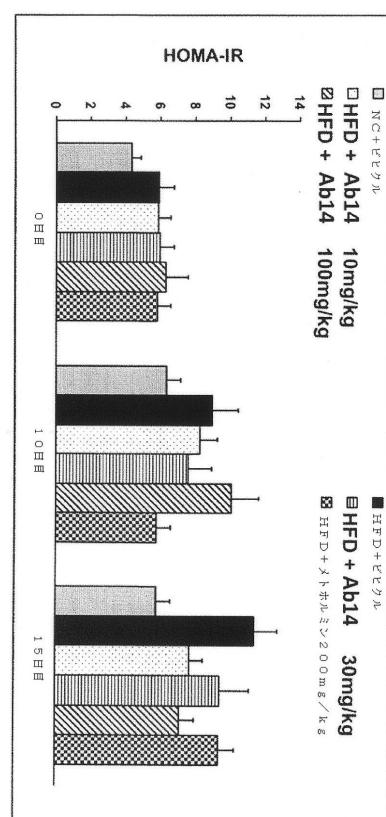


空腹時血漿インスリン

【図 11】



【図 12】



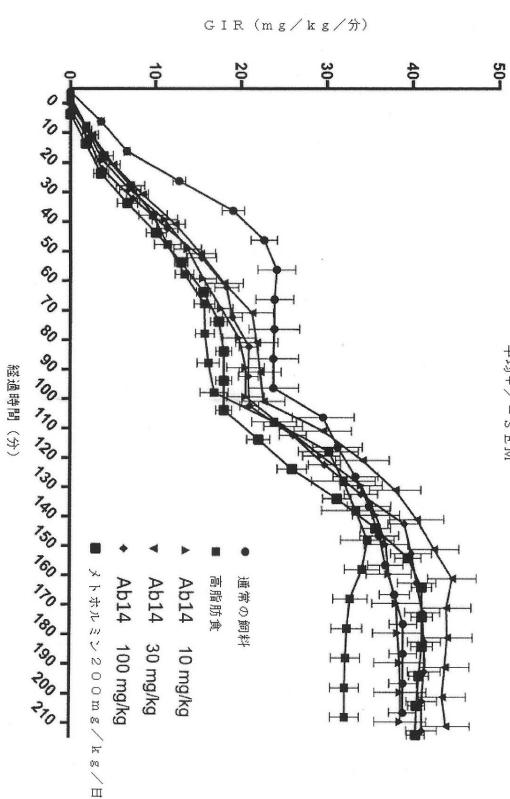
HOMA-IR

クランプ処置中の間の血漿インスリン及びCペプチド

2週間の処置後のグルコース挿入率

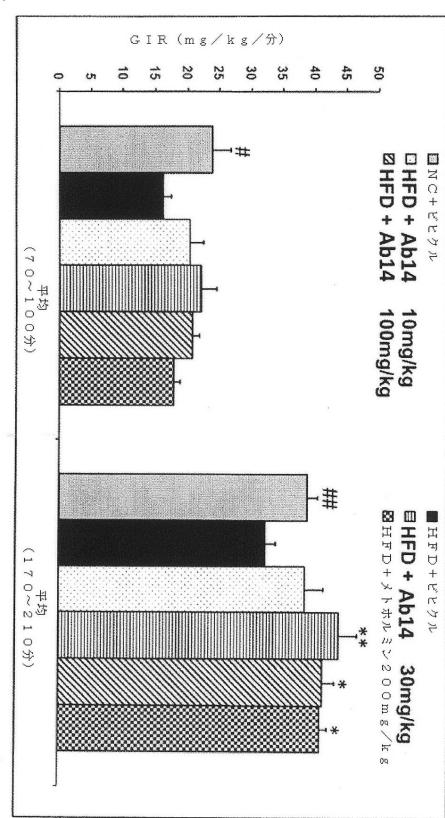
1.5mU/kg/分のインスリンを用いたクランプ処置中の15日間の処置後のグルコースフラックス

【図13】



(99)

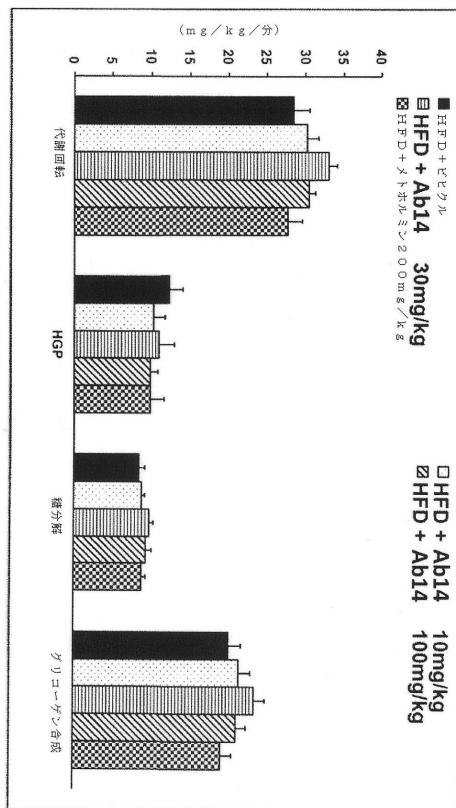
【図14】



T検定(片側)対HFD。# :  $p < 0.05$ ; ## :  $p < 0.01$   
 一元配置分散分析+ダネットの事後検定対HFD。\* :  $p < 0.05$ ; \*\* :  $p < 0.01$

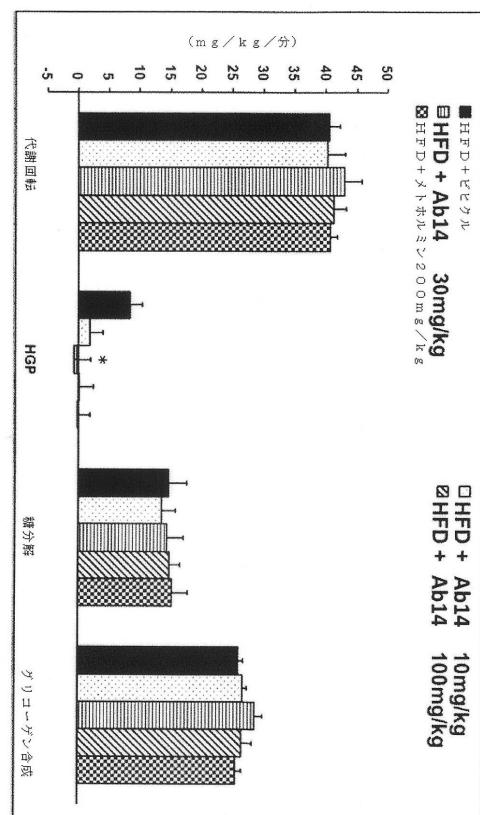
※インスリンランプ。

【図15】

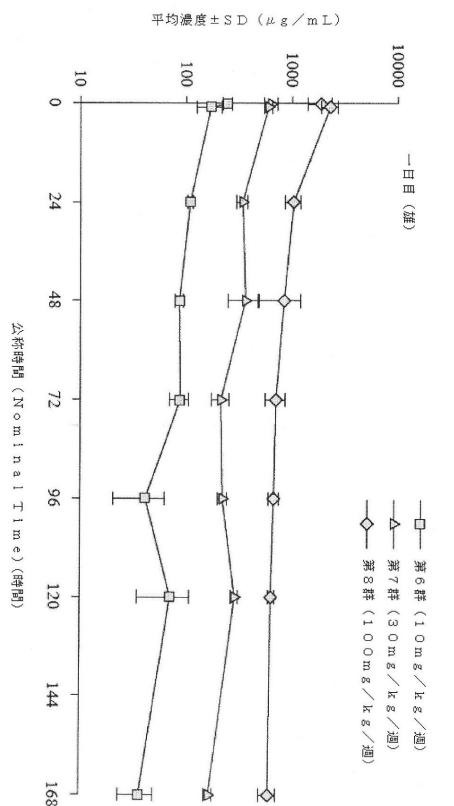


5mU/kg/分のインスリンを用いたクランプ処置中の15日間の処置後のグルコースフラックス

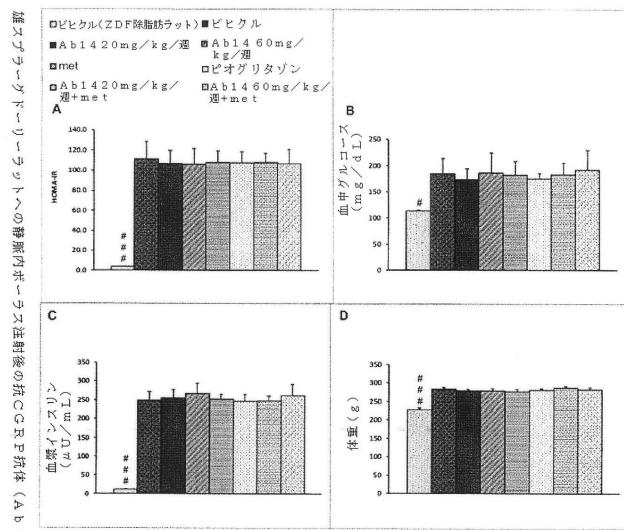
【図16】

一元配置分散分析+ダネットの事後検定対HFD。\* :  $p < 0.05$

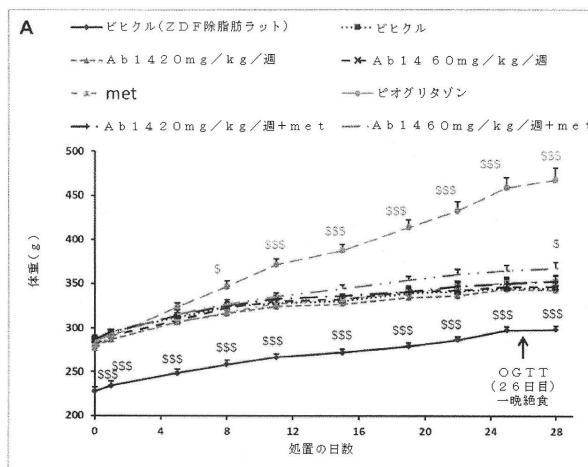
【図17】



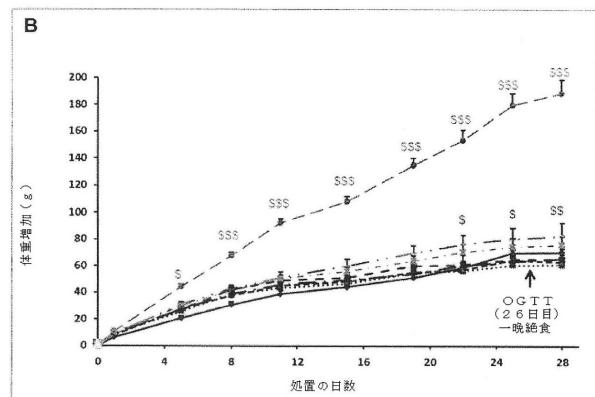
【図18】



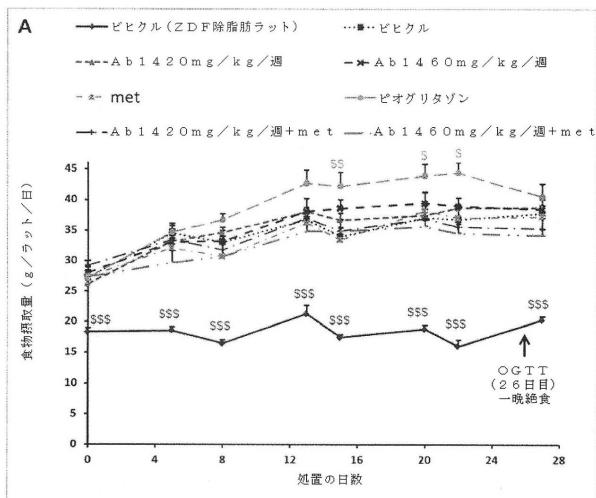
【図19A】



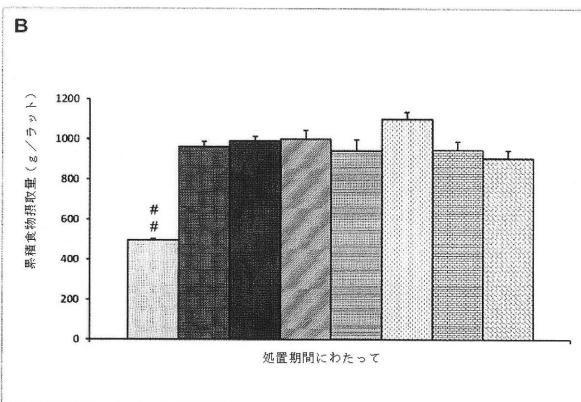
【図19B】



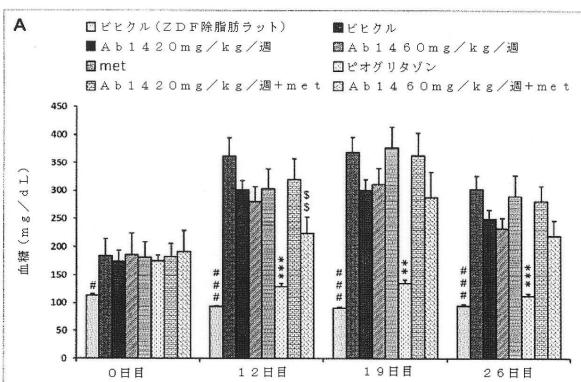
【図20A】



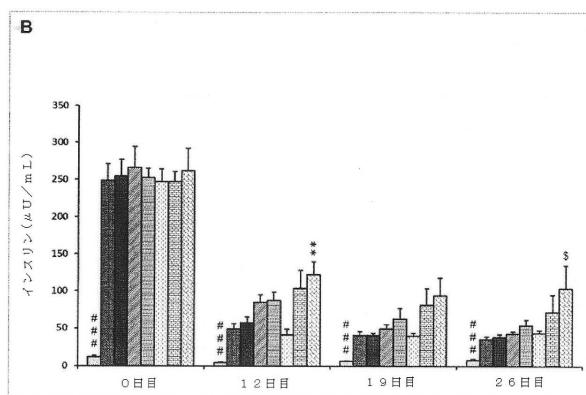
【図20B】



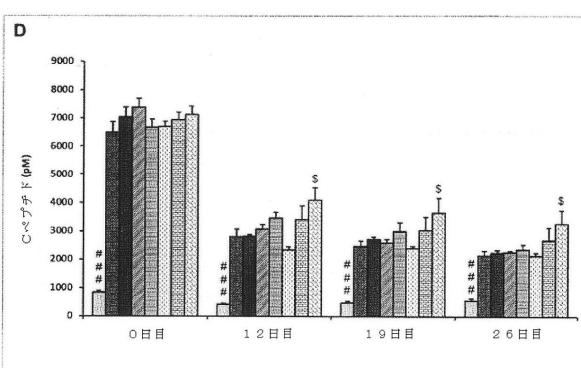
【図21A】



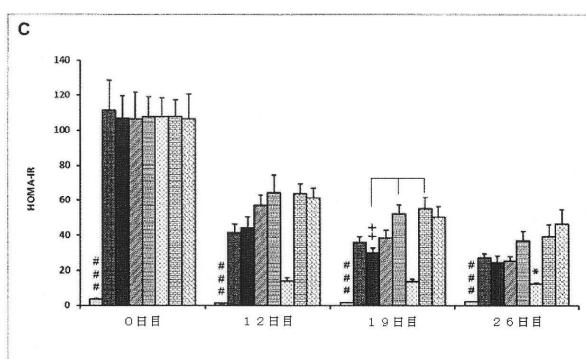
【図21B】



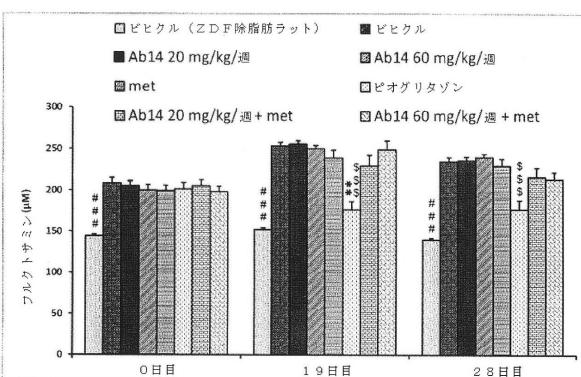
【図21D】



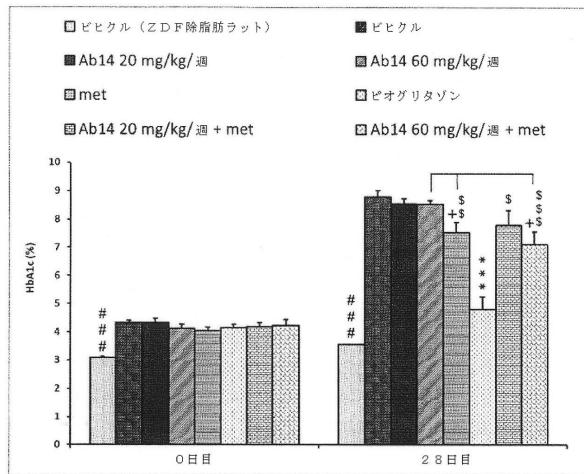
【図21C】



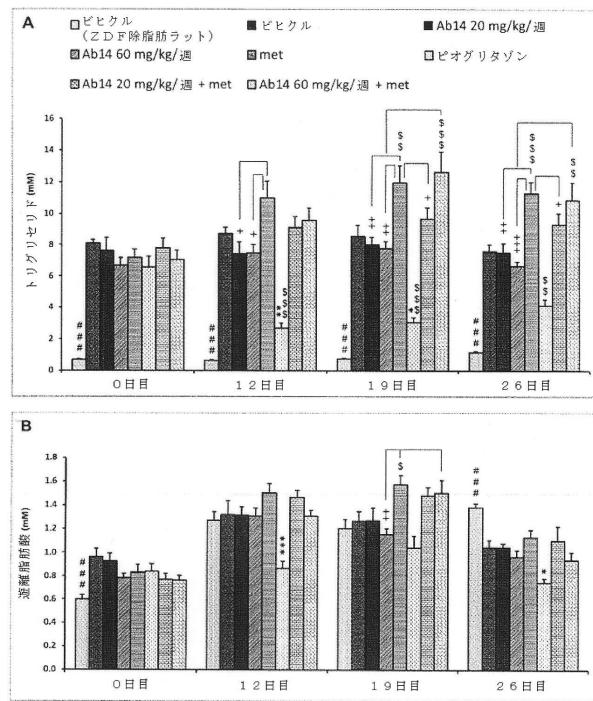
【図22】



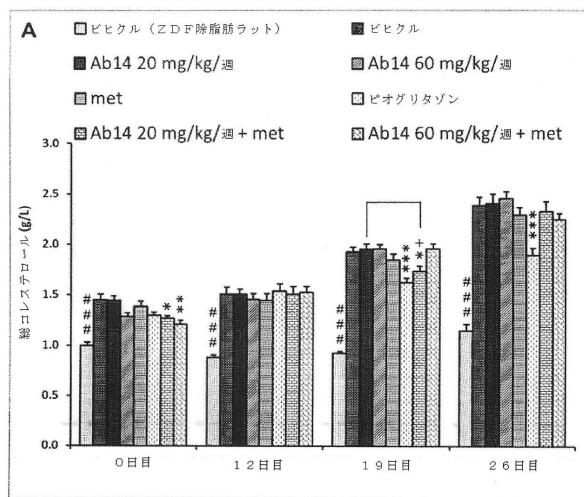
【図23】



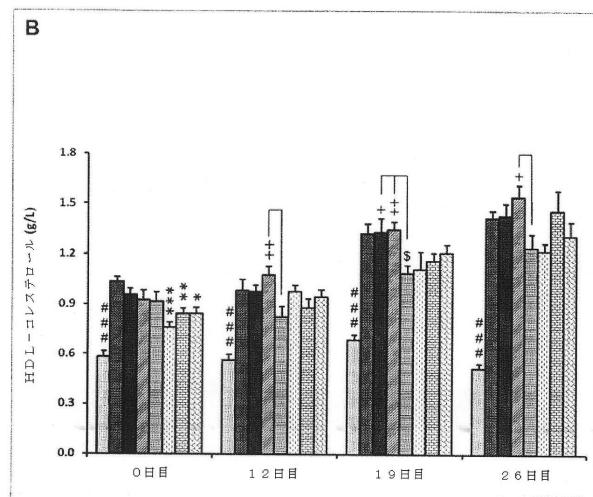
【図24】



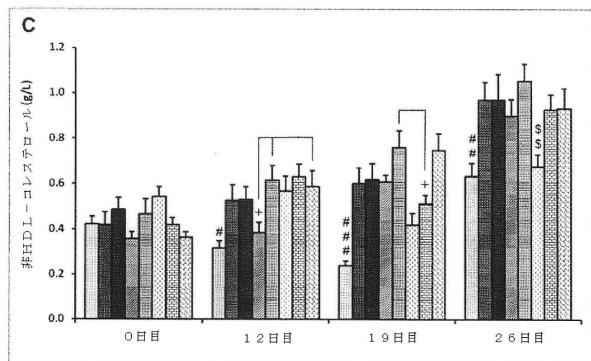
【図25A】



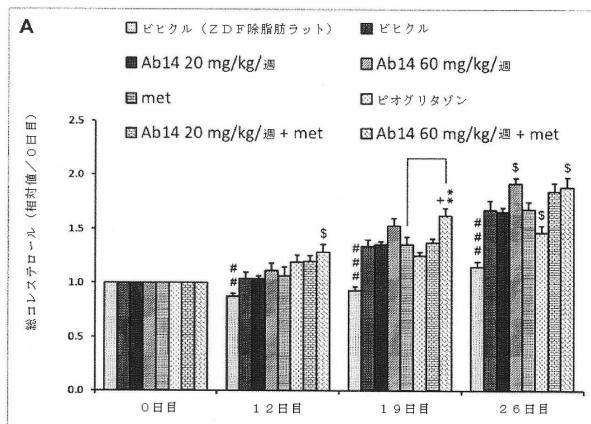
【図25B】



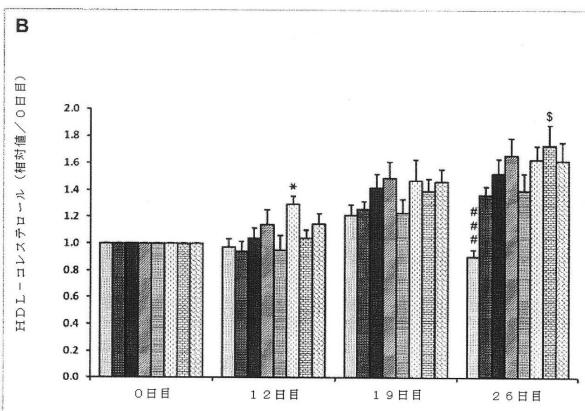
【図 25 C】



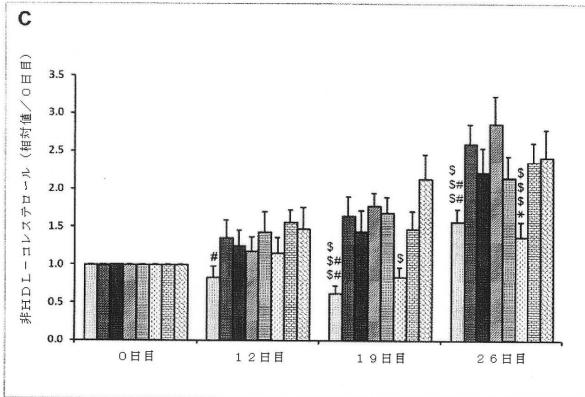
【図 26 A】



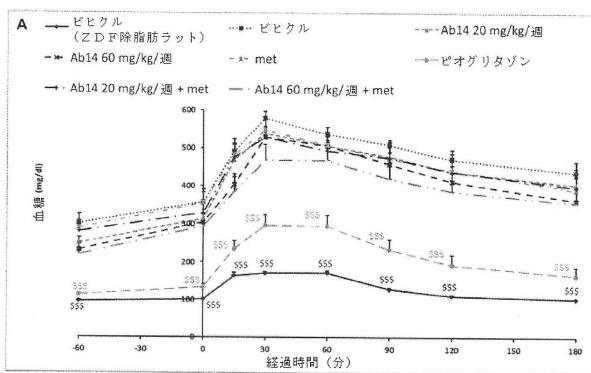
【図 26 B】



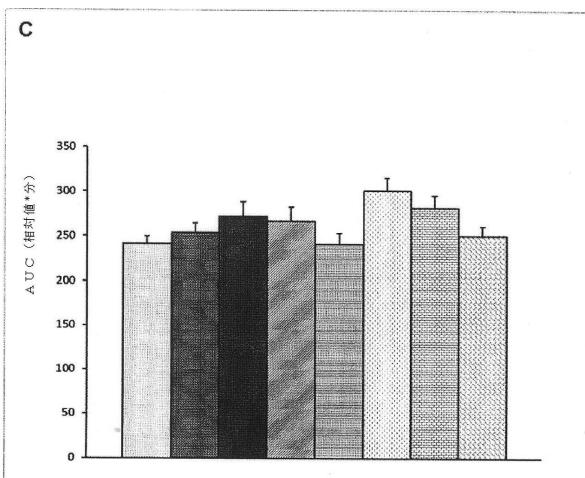
【図 26 C】



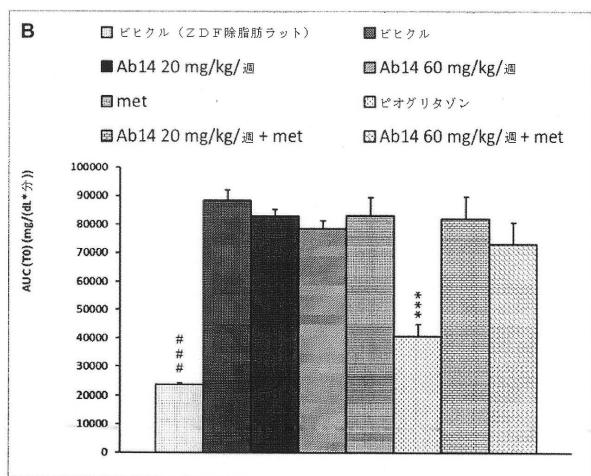
【図 27 A】



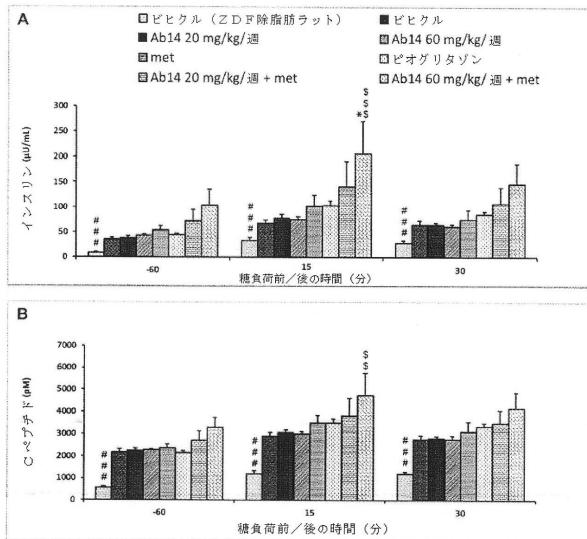
【図 27 C】



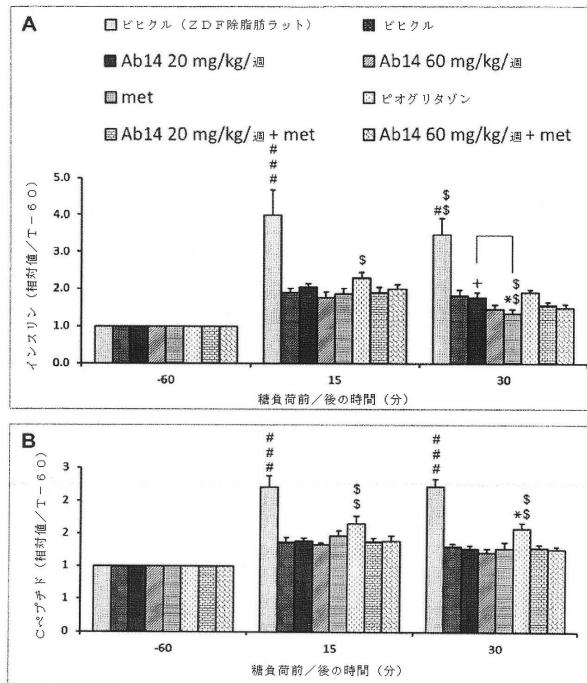
【図 27 B】



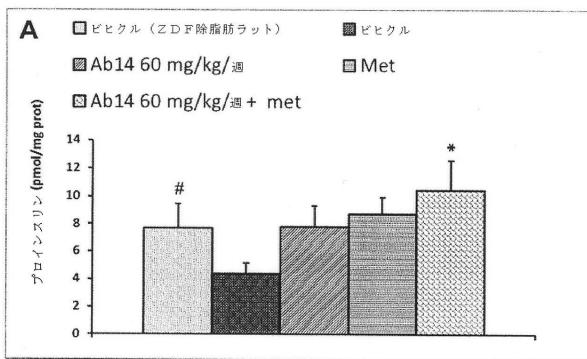
【図 28】



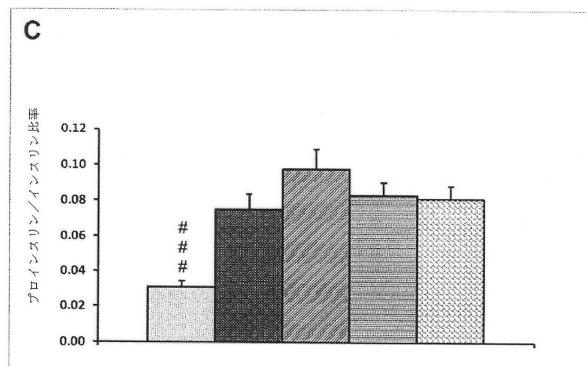
【図 29】



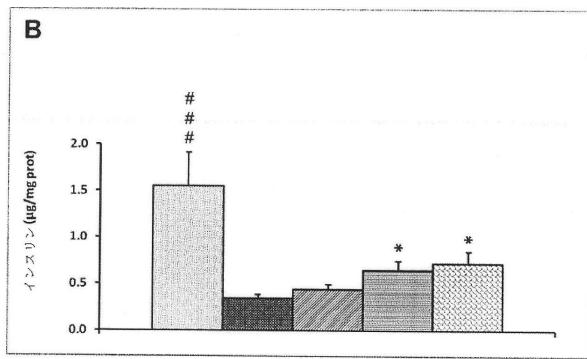
【図 30 A】



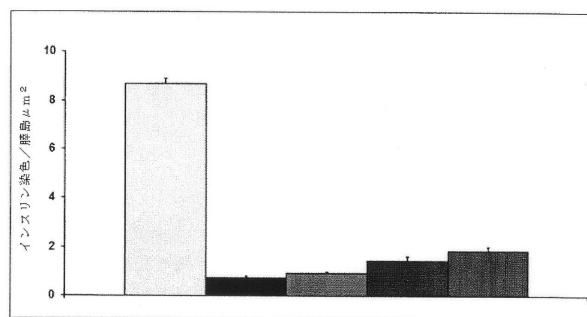
【図 30 C】



【図 30 B】



【図 31】



【配列表】

0006502337000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13

(74)代理人 100128750  
弁理士 廣瀬 しのぶ

(72)発明者 ラザム, ジョン・エイ  
アメリカ合衆国ワシントン州 98119, シアトル, ノースウェスト, テンス・アベニュー 24  
09

(72)発明者 スミス, ジェフリー・ティー・エル  
アメリカ合衆国ワシントン州 98004, ベルビュー, ノースイースト・トウェルブス・ストリー  
ト 10270, アパートメント エフ307

(72)発明者 ベイカー, ブライアン  
アメリカ合衆国ワシントン州 98034, カークランド, ノースイースト・ワンハンドレッドサー  
ティフィフス・プレイス 6475

審査官 菊池 美香

(56)参考文献 特表平03-501611 (JP, A)  
国際公開第2012/162253 (WO, A2)  
特表2005-523418 (JP, A)  
特表平04-500688 (JP, A)  
Vascular Health and Risk Management, 2008, 4(3), 481-492  
Vascular Health and Risk Management, 2007, 3(5), 665-671  
Exp Clin Endocrinol Diabetes, May 2013, 121, 280-285

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K	3 9 / 3 9 5
A 6 1 K	4 5 / 0 0
A 6 1 P	1 / 1 6
A 6 1 P	3 / 0 4
A 6 1 P	3 / 1 0
C 0 7 K	1 6 / 1 8
C 1 2 N	1 5 / 1 3
J ST P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )	
C a p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )	