

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6328769号
(P6328769)

(45) 発行日 平成30年5月23日 (2018. 5. 23)

(24) 登録日 平成30年4月27日 (2018. 4. 27)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 39/395 (2006. 01)
A 6 1 P 3/04 (2006. 01)
A 6 1 P 3/10 (2006. 01)
A 6 1 P 3/00 (2006. 01)
A 6 1 P 1/16 (2006. 01)

A 6 1 K 39/395 N
A 6 1 P 3/04
A 6 1 P 3/10
A 6 1 P 3/00
A 6 1 P 1/16

請求項の数 6 (全 41 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-540507 (P2016-540507)
(86) (22) 出願日 平成26年12月17日 (2014. 12. 17)
(65) 公表番号 特表2017-501165 (P2017-501165A)
(43) 公表日 平成29年1月12日 (2017. 1. 12)
(86) 国際出願番号 PCT/US2014/070901
(87) 国際公開番号 W02015/095354
(87) 国際公開日 平成27年6月25日 (2015. 6. 25)
審査請求日 平成28年8月2日 (2016. 8. 2)
(31) 優先権主張番号 61/917, 136
(32) 優先日 平成25年12月17日 (2013. 12. 17)
(33) 優先権主張国 米国 (US)
(31) 優先権主張番号 61/974, 660
(32) 優先日 平成26年4月3日 (2014. 4. 3)
(33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 516242356
エムエイチエス ケアーイノベーション
エルエルシー
アメリカ合衆国 オハイオ 44109,
クリーブランド, メトロヘルス ドラ
イブ 2500
(74) 代理人 100078282
弁理士 山本 秀策
(74) 代理人 100113413
弁理士 森下 夏樹
(74) 代理人 100181674
弁理士 飯田 貴敏
(74) 代理人 100181641
弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 脂肪組織の集積を処置するための組成物および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- (1) 肥満症を治療する、
(2) I I 型糖尿病を治療する、
(3) 食物誘導性クッシング症候群を治療する、
(4) メタボリックシンドロームを治療する、
(5) 肝臓内での脂肪組織の集積を減少させる、
(6) 網内での脂肪組織の集積を減少させる、または
(7) 皮下脂肪組織の集積を減少させる

ための組成物であって、

薬学的有効量の胃抑制ポリペプチド (G I P) の分子アンタゴニストを含み、
前記分子アンタゴニストが、軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインを含み、
前記軽鎖可変ドメインが、配列番号 20 のアミノ酸配列に対して 100% の同一性を有する第1の相補性決定領域 (C D R) と、配列番号 21、配列番号 23 または配列番号 24 のアミノ酸配列に対して 100% の同一性を有する第2の C D R と、配列番号 22 のアミノ酸配列に対して 100% の同一性を有する第3の C D R とを有し、
前記重鎖可変ドメインが、配列番号 31 のアミノ酸配列に対して 100% の同一性を有する第1の C D R と、配列番号 32 のアミノ酸配列に対して 100% の同一性を有する第2の C D R と、配列番号 33 のアミノ酸配列に対して 100% の同一性を有する第3の C D R とを有する、組成物。

10

20

【請求項 2】

軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインを含む胃抑制ポリペプチド（G I P）の分子アンタゴニストであって、

前記軽鎖可変ドメインが、配列番号 20 のアミノ酸配列に対して 100% の同一性を有する第1の相補性決定領域（C D R）と、配列番号 21、配列番号 23 または配列番号 24 のアミノ酸配列に対して 100% の同一性を有する第2の C D R と、配列番号 22 のアミノ酸配列に対して 100% の同一性を有する第3の C D R とを有し、

前記重鎖可変ドメインが、配列番号 31 のアミノ酸配列に対して 100% の同一性を有する第1の C D R と、配列番号 32 のアミノ酸配列に対して 100% の同一性を有する第2の C D R と、配列番号 33 のアミノ酸配列に対して 100% の同一性を有する第3の C D R とを有する、胃抑制ポリペプチド（G I P）の分子アンタゴニスト。

10

【請求項 3】

前記アンタゴニストが、単鎖可変断片（s c F v）、F（a b'）₂断片、F a b もしくは F a b'断片、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、またはモノクローナル抗体である、請求項 2 に記載の分子アンタゴニスト。

【請求項 4】

前記アンタゴニストが、ヒト定常領域を含むモノクローナル抗体全体である、請求項 2 に記載の分子アンタゴニスト。

【請求項 5】

前記アンタゴニストが、約 30 k D a ～約 500 k D a の分子量を有する、請求項 2 に記載の分子アンタゴニスト。

20

【請求項 6】

約 0.1 n M ～約 7 n M の I C₅₀ によって特徴付けられる、G I P に対する結合親和性を有する、請求項 2 から 5 までのいずれか一項に記載の分子アンタゴニスト。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2013 年 12 月 17 日に提出された米国仮特許出願第 61/917,136 号、2014 年 4 月 3 日に提出された米国仮特許出願第 61/974,660 号、2014 年 6 月 3 日に提出された米国仮特許出願第 62/007,255 号、2014 年 9 月 3 日に提出された米国仮特許出願第 62/045,189 号、2014 年 11 月 3 日に提出された米国仮特許出願第 62/074,225 号、2014 年 11 月 3 日に提出された米国仮特許出願第 62/074,227 号、および 2014 年 11 月 3 日に提出された米国仮特許出願第 62/074,234 号に基づく優先権を主張する。これらの出願の開示は、本明細書に参照により完全に組み込まれる。

30

【背景技術】

【0002】

背景

配列表は、ファイル名「MHMS200014US01_ST25.txt」、2014 年 12 月 17 日作成、ファイルサイズ 24,995 バイトの A S C I I テキストファイルとしてここに提出されている。このテキストファイル内のデータは、参照により本明細書に完全に組み込まれる。

40

【0003】

本開示は、種々の例示的な実施形態において、一般に、グルコース依存性インスリン分泌ポリペプチド（G I P）に結合するモノクローナル抗体（m A b）などの分子アンタゴニストを使用して、組織内での脂肪の集積を治療するための組成物および方法に関する。脂肪組織の集積は、いくつかの異なる疾患または状態において起こり、そのようなアンタゴニスト／モノクローナル抗体を使用して治療することができる。本開示はそのようなアンタゴニスト／モノクローナル抗体を投与することにより、血清インスリンの上昇を必要

50

とせずに耐糖能を改善することによるそのような疾患または状態の治療にも関する。

【0004】

肥満症とは、健康に対して負の影響を及ぼすほどに過剰な体脂肪が蓄積している医学的状态である。米国では、肥満症は、人間の体重を人間の身長²の二乗で割ることにより算出される人間の肥満度指数（BMI）が 30 kg/m^2 またはそれ超になると生じると考えられる。肥満症は、過剰なカロリー摂取、不健康な食事、身体活動の不足、遺伝、年齢、および睡眠不足を含めた因子の組合せから生じ得る。肥満症により、心疾患、2型糖尿病、閉塞性睡眠時無呼吸、いくつかのがん、および変形性関節症を含めた種々の疾患の可能性が上昇する。

【0005】

以下の医学的状态5つのうち3つが共に診断され多場合に、メタボリックシンドロームと診断される：血圧上昇、ウエスト周囲の過剰な体脂肪、空腹時血中グルコースが高いこと、血清トリグリセリドが高いこと、および高密度コレステロール（HDL）レベルが低いこと。メタボリックシンドロームによっても、2型糖尿病、冠動脈心疾患、リポジストロフィー、および潜在的にいくつかの精神病を含めた疾患のリスクが上昇する。治療は、生活様式の変化および薬物療法を含む。

【0006】

高脂血症とは、血液中の脂質および／またはリポタンパク質のレベルが異常に上昇する状態である。原発性高脂血症は通常、遺伝的原因によるものであるが、二次性高脂血症は、真性糖尿病、ある特定の薬物の使用、およびアルコール消費などの他の基礎的因子から生じる。高脂血症は、高コレステロール血症と高トリグリセリド血症に分けることができる。高コレステロール血症は、一般に、米国では、総コレステロールレベルが 240 mg/dl を超えた場合に診断される。高トリグリセリド血症は通常、米国では、トリグリセリドレベルが 500 mg/dl よりも高い場合に診断される。

【0007】

インスリン非依存性（II型）真性糖尿病は、インスリン抵抗性として知られている状態である、身体の細胞がインスリンに適正に応答しない場合に起こる。結果として、高血糖レベルが長期間にわたって持続する。主要な原因は、体重が過剰であること、および運動が不十分であることである。長期合併症としては、心血管疾患、脳卒中、腎不全、および眼の損傷が挙げられる。

【0008】

クッシング症候群は、異常に高いレベルのホルモンコルチゾールへの長期曝露に関連する。コルチゾールは、副腎において産生され、通常、コルチコトロピンによって誘導される。しかし、食物誘導性クッシング症候群は、副腎が胃抑制ポリペプチド（GIP）に対して異常に応答する場合に起こる。

【0009】

脂肪肝疾患（FLD）は、成体と小児の両方で生じる世界的な慢性健康問題である。臨床的にカテゴリー化すると、FLDは2つの広範な群：非アルコール性FLD（NAFLD）およびアルコール性FLD（ALFD）に入る。NAFLDおよびALFDは、肝臓の脂肪含有率が5～10%を超えることによって特徴付けられ、区別する因子は疾患の根本的原因のみである。しかし、一般に、この2つのクラスのFLDを形態学的特徴だけに基づいて区別することは難しい。一般に、FLDは、過剰量のアルコールを消費する者、脂肪酸代謝に影響を及ぼす代謝障害もしくは遺伝的素因を有する可能性がある者、および／または肥満の者において発症する。一般的な共存症としては、肥満症、2型（インスリン非依存性）真性糖尿病、および高脂血症が挙げられる。

【0010】

FLDの中心的な病態としては、硬変症への進行を伴う肝脂肪症および脂肪性肝炎が挙げられる。脂肪症は、肝臓内の脂質含有率が5～10重量%を超えると発症し、脂質小胞の保持の異常および脂肪酸酸化の阻害を示すものである。脂肪症は、疾患の根本的原因が同定され、消散すれば、可逆的であると考えられる。

10

20

30

40

50

【0011】

脂肪症が持続すると、重症度および誘因に応じて非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）またはアルコール性脂肪性肝炎（ASH）に進展する可能性がある。脂肪症とは異なり、NASHおよびASHは可逆的ではなく、治療可能なのである。これらは、より多くの脂肪の蓄積、混合小葉炎症、肝細胞の風船変性、肝細胞核のグリコーゲン形成（glycogenated hepatocyte nuclei）、および細胞周囲線維症によって特徴付けられる。これらは硬変症、最終的には肝がんに行進し得る。

【0012】

FLDに対する現行の療法としては、（１）適度な食事および運動の計画に従うこと、（２）突発的な体重減少または薬物乱用によって起こり得る肝臓損傷の悪化を回避すること、（３）体重を減少させること、（４）インスリン抵抗性を低下させ、血中グルコースを制御するためにインスリン抵抗性改善剤を摂取すること、（５）血中脂質を減少させる薬物または肝疾患を好転させるための薬物を使用すること、ならびに（６）肝移植を試みることが挙げられる。

10

【0013】

臨床の場合では、食欲抑制薬は、一部において、悪心を生じさせることによって働く。したがって、当該プロセスの間に気分が悪くなることを厭わないのであれば、体重を減少させることができる。そのような副作用は、特に、患者に体重減少レジメンのコンプライアンスを維持するよう患者に求めることに関して、望ましくない。

20

【0014】

FLDおよび脂肪の集積を伴う他の疾患に対する追加的な療法が望ましい。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0015】

本開示の概要

本開示は、グルコース依存性インスリン分泌ポリペプチドとしても知られている胃抑制ポリペプチド（GIP）に結合するモノクローナル抗体（mAb）、および、そのようなmAbの、組織内での脂肪の集積を伴う疾患を治療するための使用方法を対象とする。

【0016】

いくつかの異なる疾患または状態を治療する方法が、本明細書において種々の実施形態で開示されている。これらとしては、肥満症、I I型糖尿病、食物誘導性クッシング症候群、またはメタボリックシンドロームが挙げられる。肝臓内の組織内、網内の組織内、または皮下組織内での脂肪の蓄積を減少させる方法も開示されている。これらの方法は全て、人間に薬学的有効量の胃抑制ポリペプチド（GIP）の分子アンタゴニストを含む組成物を投与するステップを含む。

30

【0017】

分子アンタゴニストは、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号31、配列番号32、および配列番号33からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも80%の同一性を有する相補性決定領域（CDR）を少なくとも1つ含む。

40

【0018】

特定の実施形態では、分子アンタゴニストは、第1のCDRと第2のCDRとを有する軽鎖可変ドメインを含み、各CDRが、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、および配列番号24からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも95%の同一性を有する。分子アンタゴニストの第1のCDRと第2のCDRは、連結基によって互いに接合している。連結基は、アミノ酸の鎖であってよい。

【0019】

他の実施形態では、分子アンタゴニストは、配列番号20のアミノ酸配列に対して少なくとも80%の同一性を有する第1のCDRと、配列番号21のアミノ酸配列に対して少なくとも80%の同一性を有する第2のCDRと、配列番号22のアミノ酸配列に対して

50

少なくとも８５％の同一性を有する第３のＣＤＲとを有する軽鎖可変ドメインを含む。分子アンタゴニストの第１のＣＤＲ、第２のＣＤＲ、および第３のＣＤＲは、連結基によって互いに接合している。連結基は、独立にアミノ酸の鎖であってよい。

【００２０】

さらに他の実施形態では、分子アンタゴニストは、配列番号１６、配列番号１７、配列番号１８、および配列番号１９からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも８０％の同一性を有する軽鎖可変ドメインを含む。

【００２１】

さらなる実施形態では、分子アンタゴニストは、配列番号３１のアミノ酸配列に対して少なくとも８０％の同一性を有する第１のＣＤＲと、配列番号３２のアミノ酸配列に対して少なくとも８０％の同一性を有する第２のＣＤＲと、配列番号３３のアミノ酸配列に対して少なくとも８０％の同一性を有する第３のＣＤＲとを有する重鎖可変ドメインを含む。

10

【００２２】

一部の実施形態では、分子アンタゴニストは、配列番号２７、配列番号２８、配列番号２９、および配列番号３０からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも８０％の同一性を有する重鎖可変ドメインを含む。

【００２３】

特定の実施形態では、分子アンタゴニストは、軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインとを含み、ここで、軽鎖可変ドメインは、第１のＣＤＲと第２のＣＤＲとを含み、各ＣＤＲは、配列番号２０、配列番号２１、配列番号２２、配列番号２３、および配列番号２４からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも９５％の同一性を有し、重鎖可変ドメインは、配列番号３１のアミノ酸配列に対して少なくとも８０％の同一性を有する第１のＣＤＲと、配列番号３２のアミノ酸配列に対して少なくとも８０％の同一性を有する第２のＣＤＲと、配列番号３３のアミノ酸配列に対して少なくとも８０％の同一性を有する第３のＣＤＲとを含む。分子アンタゴニストは、単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、Ｆ（ａｂ'）_２断片、ＦａｂもしくはＦａｂ'断片、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、またはモノクローナル抗体であってよい。

20

【００２４】

他の実施形態では、分子アンタゴニストは、軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインとを含み、軽鎖可変ドメインは、配列番号１６、配列番号１７、配列番号１８、および配列番号１９からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも８０％の同一性を有し、重鎖可変ドメインは、配列番号２７、配列番号２８、配列番号２９、および配列番号３０からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも８０％の同一性を有する。分子アンタゴニストは、単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、Ｆ（ａｂ'）_２断片、ＦａｂもしくはＦａｂ'断片、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、またはモノクローナル抗体であってよい。

30

【００２５】

特定の実施形態では、分子アンタゴニストは、配列番号１８に対して少なくとも８０％の同一性を有する軽鎖可変ドメインと、配列番号２８、配列番号２９、および配列番号３０からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも８０％の同一性を有する重鎖可変ドメインとを有するモノクローナル抗体である。

40

【００２６】

さらなる特定の実施形態では、分子アンタゴニストは、配列番号１８に対して少なくとも９０％の同一性を有する軽鎖可変ドメインと、配列番号２９に対して少なくとも９０％の同一性を有する重鎖可変ドメインとを有するモノクローナル抗体全体である。

【００２７】

分子アンタゴニストは、ＧＩＰのアミノ酸配列に結合し得、アミノ酸配列は、配列番号１、配列番号２、配列番号３、および配列番号４からなる群から選択される。

【００２８】

50

特定の実施形態では、分子アンタゴニストは、ヒト定常領域を含むモノクローナル抗体全体である。

【0029】

分子アンタゴニストは、約30kDa～約500kDaのMWを有し得る。分子アンタゴニストは、約0.1nM～約7nMのIC₅₀によって特徴付けられる、GIPに対する結合親和性を有し得る。

【0030】

組成物は、静脈内、腹腔内、または皮下に投与することができる。組成物は、緩衝剤、界面活性剤、保存剤、増量剤、ポリマー、および安定化剤からなる群から選択される不活性な医薬賦形剤をさらに含んでよい。組成物は、散剤、注射剤、液剤、懸濁剤、または乳剤の形態であってよい。

10

【0031】

組成物は、組成物1ミリリットル当たり約0.1ミリグラムから約1000ミリグラムまでの量のモノクローナル抗体アンタゴニストを含有してよい。時には、組成物は凍結乾燥されていてよい。

【0032】

脂肪肝疾患は、アルコール性脂肪肝疾患または非アルコール性脂肪肝疾患のいずれかであり得る。

【0033】

モノクローナル抗体全体およびそのバリエーションなどのいくつかの形態をとり得る、胃抑制ポリペプチド（GIP）の分子アンタゴニストも本明細書に開示されている。分子アンタゴニストは上記の通りである。

20

【0034】

配列番号35、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号40、配列番号41、および配列番号42からなる群から選択されるDNA配列に対して少なくとも85%の同一性を有する相補DNA配列も本明細書に開示されている。

【0035】

本発明は、例えば、以下項目も提供する。

(項目1)

肥満症を治療する方法であって、

30

人間に薬学的有効量の胃抑制ポリペプチド（GIP）の分子アンタゴニストを含む組成物を投与するステップ

を含み、

前記分子アンタゴニストが軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインとを含み、

前記軽鎖可変ドメインが、配列番号20のアミノ酸配列に対して少なくとも80%の同一性を有する第1のCDRと、配列番号21のアミノ酸配列に対して少なくとも80%の同一性を有する第2のCDRと、配列番号22のアミノ酸配列に対して少なくとも85%の同一性を有する第3のCDRとを有し、

前記重鎖可変ドメインが、配列番号31のアミノ酸配列に対して少なくとも80%の同一性を有する第1のCDRと、配列番号32のアミノ酸配列に対して少なくとも80%の同一性を有する第2のCDRと、配列番号33のアミノ酸配列に対して少なくとも80%の同一性を有する第3のCDRとを有する、方法。

40

(項目2)

前記軽鎖可変ドメインの前記第1のCDR、前記第2のCDR、および前記第3のCDRが、連結基によって互いに接合している、項目1に記載の方法。

(項目3)

前記連結基が独立にアミノ酸の鎖である、項目2に記載の方法。

(項目4)

前記重鎖可変ドメインの前記第1のCDR、前記第2のCDR、および前記第3のCDRが、連結基によって互いに接合している、項目1に記載の方法。

50

(項目 5)

前記連結基が独立にアミノ酸の鎖である、項目 4 に記載の方法。

(項目 6)

前記分子アンタゴニストが、単鎖可変断片 (s c F v)、F (a b ')₂ 断片、F a b もしくは F a b ' 断片、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、またはモノクローナル抗体である、項目 1 に記載の方法。

(項目 7)

前記分子アンタゴニストが、配列番号 1 8 に対して少なくとも 8 0 % の同一性を有する軽鎖可変ドメインと、配列番号 2 8、配列番号 2 9、および配列番号 3 0 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 8 0 % の同一性を有する重鎖可変ドメインとを有するモノクローナル抗体である、項目 1 に記載の方法。

10

(項目 8)

前記分子アンタゴニストが、配列番号 1 8 に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有する軽鎖可変ドメインと、配列番号 2 9 に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有する重鎖可変ドメインとを有するモノクローナル抗体全体である、項目 1 に記載の方法。

(項目 9)

肥満症を治療する方法であって、

人間に薬学的有効量の胃抑制ポリペプチド (G I P) の分子アンタゴニストを含む組成物を投与するステップ

を含み、

20

前記分子アンタゴニストが、配列番号 2 0、配列番号 2 1、配列番号 2 2、配列番号 2 3、配列番号 2 4、配列番号 3 1、配列番号 3 2、および配列番号 3 3 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 8 0 % の同一性を有する相補性決定領域 (C D R) を少なくとも 1 つ含む、方法。

(項目 1 0)

I I 型糖尿病を治療する方法であって、

人間に薬学的有効量の胃抑制ポリペプチド (G I P) の分子アンタゴニストを含む組成物を投与するステップ

を含み、

30

前記分子アンタゴニストが、配列番号 2 0、配列番号 2 1、配列番号 2 2、配列番号 2 3、配列番号 2 4、配列番号 3 1、配列番号 3 2、および配列番号 3 3 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 8 0 % の同一性を有する相補性決定領域 (C D R) を少なくとも 1 つ含む、方法。

(項目 1 1)

食物誘導性クッシング症候群を治療する方法であって、

人間に薬学的有効量の胃抑制ポリペプチド (G I P) の分子アンタゴニストを含む組成物を投与するステップを含み、

前記分子アンタゴニストが、配列番号 2 0、配列番号 2 1、配列番号 2 2、配列番号 2 3、配列番号 2 4、配列番号 3 1、配列番号 3 2、および配列番号 3 3 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 8 0 % の同一性を有する相補性決定領域 (C D R) を少なくとも 1 つ含む、方法。

40

(項目 1 2)

メタボリックシンドロームを治療する方法であって、

人間に薬学的有効量の胃抑制ポリペプチド (G I P) の分子アンタゴニストを含む組成物を投与するステップを含み、

前記分子アンタゴニストが、配列番号 2 0、配列番号 2 1、配列番号 2 2、配列番号 2 3、配列番号 2 4、配列番号 3 1、配列番号 3 2、および配列番号 3 3 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 8 0 % の同一性を有する相補性決定領域 (C D R) を少なくとも 1 つ含む、方法。

(項目 1 3)

50

肝臓内での脂肪組織の集積を減少させるための方法であって、
人間に薬学的有効量の胃抑制ポリペプチド（G I P）の分子アンタゴニストを含む組成物を投与するステップを含み、

前記分子アンタゴニストが、配列番号 2 0、配列番号 2 1、配列番号 2 2、配列番号 2 3、配列番号 2 4、配列番号 3 1、配列番号 3 2、および配列番号 3 3 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 8 0 % の同一性を有する相補性決定領域（C D R）を少なくとも 1 つ含む、方法。

（項目 1 4）

網内での脂肪組織の集積を減少させるための方法であって、
人間に薬学的有効量の胃抑制ポリペプチド（G I P）の分子アンタゴニストを含む組成物を投与するステップを含み、

前記分子アンタゴニストが、配列番号 2 0、配列番号 2 1、配列番号 2 2、配列番号 2 3、配列番号 2 4、配列番号 3 1、配列番号 3 2、および配列番号 3 3 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 8 0 % の同一性を有する相補性決定領域（C D R）を少なくとも 1 つ含む、方法。

（項目 1 5）

皮下脂肪組織の集積を減少させるための方法であって、
人間に薬学的有効量の胃抑制ポリペプチド（G I P）の分子アンタゴニストを含む組成物を投与するステップを含み、

前記分子アンタゴニストが、配列番号 2 0、配列番号 2 1、配列番号 2 2、配列番号 2 3、配列番号 2 4、配列番号 3 1、配列番号 3 2、および配列番号 3 3 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 8 0 % の同一性を有する相補性決定領域（C D R）を少なくとも 1 つ含む、方法。

（項目 1 6）

前記分子アンタゴニストが第 1 の C D R と第 2 の C D R とを有する軽鎖可変ドメインを含み、各 C D R が、配列番号 2 0、配列番号 2 1、配列番号 2 2、配列番号 2 3、および配列番号 2 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の同一性を有する、項目 9 から 1 5 までのいずれか一項に記載の方法。

（項目 1 7）

前記分子アンタゴニストの前記第 1 の C D R と前記第 2 の C D R が、連結基によって互いに接合している、項目 1 6 に記載の方法。

（項目 1 8）

前記連結基がアミノ酸の鎖である、項目 1 7 に記載の方法。

（項目 1 9）

前記分子アンタゴニストが、配列番号 2 0 のアミノ酸配列に対して少なくとも 8 0 % の同一性を有する第 1 の C D R と、配列番号 2 1 のアミノ酸配列に対して少なくとも 8 0 % の同一性を有する第 2 の C D R と、配列番号 2 2 のアミノ酸配列に対して少なくとも 8 5 % の同一性を有する第 3 の C D R とを有する軽鎖可変ドメインを含む、項目 9 から 1 5 までのいずれか一項に記載の方法。

（項目 2 0）

前記分子アンタゴニストの前記第 1 の C D R、前記第 2 の C D R、および前記第 3 の C D R が、連結基によって互いに接合している、項目 1 9 に記載の方法。

（項目 2 1）

前記連結基が独立にアミノ酸の鎖である、項目 2 0 に記載の方法。

（項目 2 2）

前記分子アンタゴニストが、配列番号 1 6、配列番号 1 7、配列番号 1 8、および配列番号 1 9 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 8 0 % の同一性を有する軽鎖可変ドメインを含む、項目 9 から 1 5 までのいずれか一項に記載の方法。

（項目 2 3）

前記分子アンタゴニストが、配列番号 3 1 のアミノ酸配列に対して少なくとも 8 0 % の

10

20

30

40

50

同一性を有する第1のCDRと、配列番号32のアミノ酸配列に対して少なくとも80%の同一性を有する第2のCDRと、配列番号33のアミノ酸配列に対して少なくとも80%の同一性を有する第3のCDRとを有する重鎖可変ドメインを含む、項目9から15までのいずれか一項に記載の方法。

(項目24)

前記分子アンタゴニストが、配列番号27、配列番号28、配列番号29、および配列番号30からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも80%の同一性を有する重鎖可変ドメインを含む、項目9から15までのいずれか一項に記載の方法。

(項目25)

前記分子アンタゴニストが軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインとを含み、

前記軽鎖可変ドメインが第1のCDRと第2のCDRとを含み、各CDRが、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、および配列番号24からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも95%の同一性を有し、

前記重鎖可変ドメインが、配列番号31のアミノ酸配列に対して少なくとも80%の同一性を有する第1のCDRと、配列番号32のアミノ酸配列に対して少なくとも80%の同一性を有する第2のCDRと、配列番号33のアミノ酸配列に対して少なくとも80%の同一性を有する第3のCDRとを含む、項目9から15までのいずれか一項に記載の方法。

(項目26)

前記分子アンタゴニストが軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインとを含み、

前記軽鎖可変ドメインが、配列番号16、配列番号17、配列番号18、および配列番号19からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも80%の同一性を有し、

前記重鎖可変ドメインが、配列番号27、配列番号28、配列番号29、および配列番号30からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも80%の同一性を有する、項目9から15までのいずれか一項に記載の方法。

(項目27)

前記分子アンタゴニストが、単鎖可変断片(s c F v)、F(a b')₂断片、F a bもしくはF a b'断片、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、またはモノクローナル抗体である、項目25から26までのいずれか一項に記載の方法。

(項目28)

前記分子アンタゴニストが、配列番号18に対して少なくとも80%の同一性を有する軽鎖可変ドメインと、配列番号28、配列番号29、および配列番号30からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも80%の同一性を有する重鎖可変ドメインとを有するモノクローナル抗体である、項目9から15までのいずれか一項に記載の方法。

(項目29)

前記分子アンタゴニストが、配列番号18に対して少なくとも90%の同一性を有する軽鎖可変ドメインと、配列番号29に対して少なくとも90%の同一性を有する重鎖可変ドメインとを有するモノクローナル抗体全体である、項目28に記載の方法。

(項目30)

前記分子アンタゴニストが、G I Pのアミノ酸配列に結合し、前記アミノ酸配列が、配列番号1、配列番号2、配列番号3、および配列番号4からなる群から選択される、項目1から15までのいずれか一項に記載の方法。

(項目31)

前記分子アンタゴニストが、ヒト定常領域を含むモノクローナル抗体である、項目1から15までのいずれか一項に記載の方法。

(項目32)

前記分子アンタゴニストが、約30 k D a～約500 k D aの分子量を有する、項目1から15までのいずれか一項に記載の方法。

(項目33)

10

20

30

40

50

前記分子アンタゴニストが、約0.1 nM～約7 nMのIC₅₀によって特徴付けられる、GIPに対する結合親和性を有する、項目1から15までのいずれか一項に記載の方法。

(項目34)

前記組成物が静脈内、腹腔内、または皮下に投与される、項目9から15までのいずれか一項に記載の方法。

(項目35)

前記組成物が、緩衝剤、界面活性剤、保存剤、増量剤、ポリマー、および安定化剤からなる群から選択される医薬賦形剤をさらに含む、項目1から15までのいずれか一項に記載の方法。

(項目36)

前記組成物が、散剤、注射剤、液剤、懸濁剤、または乳剤の形態である、項目1から15までのいずれか一項に記載の方法。

(項目37)

前記組成物が、前記組成物1ミリリットル当たり約0.1ミリグラムから約1000ミリグラムまでの量の前記モノクローナル抗体アンタゴニストを含有する、項目1から15までのいずれか一項に記載の方法。

(項目38)

前記組成物が、凍結乾燥されている、項目1から15までのいずれか一項に記載の方法。

(項目39)

配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号31、配列番号32、および配列番号33からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも80%の同一性を有する相補性決定領域(CDR)を少なくとも1つ含む、胃抑制ポリペプチド(GIP)の分子アンタゴニスト。

(項目40)

第1のCDRと第2のCDRとを有する軽鎖可変ドメインを含み、各CDRが、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、および配列番号24からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも95%の同一性を有する、項目39に記載の分子アンタゴニスト。

(項目41)

前記第1のCDRと前記第2のCDRが、連結基によって互いに接合している、項目40に記載の分子アンタゴニスト。

(項目42)

前記連結基がアミノ酸の鎖である、項目41に記載の分子アンタゴニスト。

(項目43)

配列番号20のアミノ酸配列に対して少なくとも80%の同一性を有する第1のCDRと、配列番号21のアミノ酸配列に対して少なくとも80%の同一性を有する第2のCDRと、配列番号22のアミノ酸配列に対して少なくとも85%の同一性を有する第3のCDRとを有する軽鎖可変ドメインを含む、項目39に記載の分子アンタゴニスト。

(項目44)

前記第1のCDR、前記第2のCDR、および前記第3のCDRが、連結基によって互いに接合している、項目43に記載の分子アンタゴニスト。

(項目45)

前記連結基が独立にアミノ酸の鎖である、項目44に記載の分子アンタゴニスト。

(項目46)

配列番号16、配列番号17、配列番号18、および配列番号19からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも80%の同一性を有する軽鎖可変ドメインを含む、項目39に記載の分子アンタゴニスト。

(項目47)

10

20

30

40

50

配列番号 31 のアミノ酸配列に対して少なくとも 80 % の同一性を有する第 1 の C D R と、配列番号 32 のアミノ酸配列に対して少なくとも 80 % の同一性を有する第 2 の C D R と、配列番号 33 のアミノ酸配列に対して少なくとも 80 % の同一性を有する第 3 の C D R とを有する重鎖可変ドメインを含む、項目 39 に記載の分子アンタゴニスト。

(項目 48)

配列番号 27、配列番号 28、配列番号 29、および配列番号 30 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 80 % の同一性を有する重鎖可変ドメインを含む、項目 39 に記載の分子アンタゴニスト。

(項目 49)

軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインとを含み、

前記軽鎖可変ドメインが第 1 の C D R と第 2 の C D R とを含み、各 C D R が、配列番号 20、配列番号 21、配列番号 22、配列番号 23、および配列番号 24 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の同一性を有し、

前記重鎖可変ドメインが、配列番号 31 のアミノ酸配列に対して少なくとも 80 % の同一性を有する第 1 の C D R と、配列番号 32 のアミノ酸配列に対して少なくとも 80 % の同一性を有する第 2 の C D R と、配列番号 33 のアミノ酸配列に対して少なくとも 80 % の同一性を有する第 3 の C D R とを含む、項目 39 に記載の分子アンタゴニスト。

(項目 50)

軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインとを含み、

前記軽鎖可変ドメインが、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 18、および配列番号 19 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 80 % の同一性を有し、

前記重鎖可変ドメインが、配列番号 27、配列番号 28、配列番号 29、および配列番号 30 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 80 % の同一性を有する、項目 39 に記載の分子アンタゴニスト。

(項目 51)

前記軽鎖可変ドメインおよび前記重鎖可変ドメインが、単鎖可変断片 (s c F v)、F (a b')₂ 断片、F a b もしくは F a b' 断片、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、またはモノクローナル抗体の一部である、項目 49 から 50 までのいずれか一項に記載の分子アンタゴニスト。

(項目 52)

配列番号 18 に対して少なくとも 80 % の同一性を有する軽鎖可変ドメインと、配列番号 28、配列番号 29、および配列番号 30 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 80 % の同一性を有する重鎖可変ドメインとを有するモノクローナル抗体である、項目 39 に記載の分子アンタゴニスト。

(項目 53)

配列番号 18 に対して少なくとも 90 % の同一性を有する軽鎖可変ドメインと、配列番号 29 に対して少なくとも 90 % の同一性を有する重鎖可変ドメインとを有するモノクローナル抗体全体である、項目 52 に記載の分子アンタゴニスト。

(項目 54)

G I P のアミノ酸配列に結合し、前記アミノ酸配列が、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、および配列番号 4 からなる群から選択される、項目 39 から 53 までのいずれか一項に記載の分子アンタゴニスト。

(項目 55)

ヒト定常領域を含むモノクローナル抗体全体である、項目 39 から 53 までのいずれか一項に記載の分子アンタゴニスト。

(項目 56)

約 30 k D a ～ 約 500 k D a の分子量を有する、項目 39 から 53 までのいずれか一項に記載の分子アンタゴニスト。

(項目 57)

約 0.1 nM～約 7 nM の IC_{50} によって特徴付けられる、GIP に対する結合親和性を有する、項目 39 から 53 までのいずれか一項に記載の分子アンタゴニスト。

(項目 58)

配列番号 35、配列番号 36、配列番号 37、配列番号 38、配列番号 39、配列番号 40、配列番号 41、および配列番号 42 からなる群から選択される DNA 配列に対して少なくとも 85% の同一性を有する相補 DNA 配列。

本開示のこれらおよび他の非限定的な特徴を以下により詳細に論じる。

【0036】

本特許または出願のファイルは、カラーで製作された少なくとも 1 つの図面を含有する。カラーの図面を伴う本特許または特許出願公開のコピーは、要請し、必要な料金を支払えば、特許庁により提供されるであろう。

10

【0037】

以下は、図面の簡単な説明であり、本明細書に開示されている例示的な実施形態を例示する目的で示すものであり、それらを限定する目的のものではない。

【図面の簡単な説明】

【0038】

【図 1A】図 1A は、17 週の試験期間にわたる、3 つの異なるマウスのセットについての、時間に対するマウスの体重を示すグラフである。高脂肪食を与えた C57BL/6 マウスは、食餌誘導性の肥満および付随するメタリックシンドロームの確立されたモデルである。「HFD-対照」マウスには、高脂肪食 (HFD) を与え、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を腹腔内注射によって投与した。「HFD-mAb」マウスには、HFD 食を与え、PBS 中の胃抑制ポリペプチドのモノクローナル抗体アンタゴニスト (GIP mAb) を 1 週間当たり体重 (BW) 1 kg 当たり 60 mg で腹腔内注射によって投与した。「Iso 食」マウスには、低脂肪の等カロリー食を与え、処置を行わなかった。HFD 食では、総カロリーの約 60% が脂肪に由来するが、等カロリー食では、総カロリーの約 10% が脂肪に由来する。GIP mAb を投与したマウスの体重増加ははるかに緩やかであった。17 週の試験期間にわたる HFD-対照マウスの平均体重増加は 21.5 ± 1.0 グラムであった。17 週の試験期間にわたる HFD-mAb マウスの平均体重増加は 11.5 ± 0.5 グラムであった。これらの 2 つの群間の体重増加の差異は、 p 値 0.00000007 で有意であった。

20

30

【0039】

【図 1B】図 1B は、3 つの異なるマウスのセットについての、時間に対するパーセント体重増加を示すグラフである。GIP mAb を投与したマウスの体重増加ははるかに緩やかであった。HFD-対照マウスの体重増加は、HFD-mAb マウスの速度のほぼ 2 倍であった。

【0040】

【図 2】図 2 は、腹腔内 (i.p.) グルコース負荷試験 (IPGTT) の結果を示すグラフである。17 週の試験期間後、各群から 6 匹のマウスを IPGTT に供した。グルコース溶液 (マウス体重 1 kg 当たりグルコース 2 mg) を i.p. 投与した後、0 分、10 分、30 分、60 分および 120 分の時点で血液を採取し、グルコース含量を測定した。グラフでは、血中グルコース濃度が時間に対してプロットされている。HFD-対照マウスは、HFD-mAb マウスまたは Iso 食マウスのいずれと比べても、i.p. グルコース負荷に対応するそれらの能力の効率が低かった。これは、HFD-対照マウスでは耐糖能障害が発生したが HFD-mAb マウスまたは Iso 食マウスでは耐糖能障害が発生しなかったことと一致する。

40

【0041】

【図 3】図 3 は、マウスの代表的な磁気共鳴画像である。HFD-対照マウスからの代表的な画像 (左側) および HFD-mAb マウスからの代表的な画像 (右側) が示されている。画像はマウスの側面画像を示すものであり、マウスの前側が画像の上になっており、マウスの後側が画像の下になっている。白色または明るいエリアは、脂肪含量が多いエリ

50

アを表す。

【0042】

【図4】図4は、緩和補正脂肪フラクション (Relaxation Compensated Fat Fraction) (RCFF) MRI から導き出された肝臓内脂肪フラクションを示すグラフである。17週の食餌期間の最後に、各群から6匹のマウスを麻酔し、MRI に供した。RCFF技法を使用して、各マウスにおける肝臓内脂肪フラクションを定量的に評価した。各処置群についての平均肝臓内脂肪フラクションがプロットされている。対照の動物の肝臓内に蓄積した脂肪体積は、GIP特異的mAbを用いて処置したマウスの2倍であった ($p = 0.03$)。

【0043】

【図5】図5は、17週の食餌期間後に緩和補正脂肪フラクション (RCFF) MRI から導き出された網内脂肪フラクションを示すグラフである。各処置群についての平均網内脂肪フラクションがプロットされている。対照の動物において蓄積した網内脂肪体積は、GIP特異的mAbを用いて処置したマウスのほぼ3.5倍であった ($p = 0.0005$)。

【0044】

【図6】図6は、緩和補正脂肪フラクション (RCFF) MRI によって導き出された皮下脂肪フラクションを示すグラフである。各処置群についての平均皮下脂肪フラクションがプロットされている。対照の動物において蓄積した皮下脂肪体積は、GIP特異的mAbを用いて処置したマウスのおよそ2倍であった ($p = 0.0002$)。

【0045】

【図7】図7は、17週の試験期間後に屠殺したマウスから取得した肝臓の染色した組織断面の代表的な写真である。肝臓を取り出し、ホルマリン中に固定した。固定した組織を切片作製し、中性トリグリセリドおよび脂質を染色するために使用されるリゾクロム (lysochrome) ジアゾ色素であるオイルレッドOを用いて染色した。パネルは代表的な試料を示し、HFD-mAbマウス (右側) における、HFD-対照マウス (左側) と比較した肝臓内の暗赤色の脂肪滴の顕著な減少が示されている。

【0046】

【図8】図8は、17週の試験期間後にHFD-対照マウスにおいて見いだされた網内脂肪 (左側) とHFD-mAbマウスにおいて見いだされた網内脂肪 (右側) を比較する2枚の写真のセットである。脂肪は、白色であり、HFD-対照マウスでは、はるかに多くの脂肪が見える。

【0047】

【図9】図9は、マウスの血清において測定されたトリグリセリド (TG) レベルを示すグラフである。17週の食餌期間の最後に、マウスを屠殺し、全血を採取し、血清を調製し、血清トリグリセリドを測定した。各群のマウスについての平均血清TGレベルがプロットされている。HFD-対照マウスにおけるTGレベルは、HFD-mAbマウスにおけるTGレベルの1.44倍であった ($p = 0.02$)。TGレベルが高いことは、肥満症およびメタボリックシンドロームに関連する。

【0048】

【図10】図10は、17週の食餌期間後にマウスの血清において測定された総コレステロール (TC) レベルを示すグラフである。HFD-対照マウスにおけるTCレベルは、HFD-mAbマウスにおけるTCレベルの1.55倍であった ($p = 0.006$)。TCレベルが高いことは、肥満症およびメタボリックシンドロームに関連する。

【0049】

【図11】図11は、17週の食餌期間後にマウスの血清において測定された総コレステロール (TC) に対する高密度リポタンパク質 (HDL) の比を示すグラフである。各群についての平均値がプロットされている。HFD-mAbマウスにおける総コレステロールに対するHDLの比は、HFD-対照マウスにおける総コレステロールレベルに対するHDLの比よりも25%高かった (p 値 = 0.03)。総コレステロールレベルに対する

10

20

30

40

50

HDLの比が高いことは、低比率であることが肥満症およびメタボリックシンドロームに関連するので、望ましい。

【0050】

【図12】図12は、17週の食餌期間後にマウスの血清において測定された低密度リポタンパク質（LDL）レベルを示すグラフである。各群のマウスについての平均血清LDLレベルがプロットされている。HFD-対照マウスにおけるLDLレベルは、HFD-mAbマウスにおけるLDLレベルの1.95倍であった（ $p=0.007$ ）。LDL（「悪玉」コレステロール）レベルが高いことは、肥満症およびメタボリックシンドロームに関連する。

【0051】

【図13】図13は、17週の食餌期間後にマウスの血清において測定されたインスリンレベルを示すグラフである。各群から5匹のマウスについての平均血清インスリンレベルがプロットされている。HFD-対照マウスにおけるインスリンレベルは、HFD-mAbマウスにおけるインスリンレベルの2.6倍であった（ $p=0.03$ ）。インスリンレベルが高いことは、肥満症、インスリン抵抗性、およびメタボリックシンドロームに関連する。y軸の単位はピコグラム／ミリリットルであることに留意されたい。

【0052】

【図14】図14は、17週の食餌期間後にマウスの血清において測定されたアディポネクチンレベルを示すグラフである。各群のマウスについての平均血清アディポネクチンレベルがプロットされている。HFD-対照マウスにおけるアディポネクチンレベルは、HFD-mAbマウスにおけるアディポネクチンレベルの1.35倍であった。アディポネクチンレベルが高いことは、総体脂肪量の増加に関連する。y軸の単位はマイクログラム／ミリリットルであることに留意されたい。

【0053】

【図15】図15は、17週の食餌期間後にマウスの血清において測定されたレプチンレベルを示すグラフである。各群のマウスについての平均血清レプチンレベルがプロットされている。HFD-対照マウスにおけるレプチンレベルは、HFD-mAbマウスにおけるレプチンレベルの5.73倍であった（ $p=0.006$ ）。レプチンレベルが高いことは、総体脂肪の増加に関連する。y軸の単位はピコグラム／ミリリットルであることに留意されたい。

【0054】

【図16】図16は、17週の食餌期間後にマウスの血清において測定されたグルカゴンレベルを示すグラフである。各群のマウスについての平均血清グルカゴンレベルが上にプロットされている。群間で血清グルカゴンのレベルに有意差はなかった。y軸の単位はピコグラム／ミリリットルであることに留意されたい。

【0055】

【図17】図17は、17週の食餌期間後にマウスの血清において測定されたグルカゴン様ペプチド1（GLP-1）レベルを示すグラフである。各群のマウスについての平均血清GLP-1レベルがプロットされている。群間で血清GLP-1のレベルに有意差はなかった。y軸の単位はピコグラム／ミリリットルであることに留意されたい。

【0056】

【図18】図18は、*in vitro*中和アッセイにおける、GIPに対するヒト化抗体3種と、併せて、元の抗体、陽性対照、および陰性対照の相対的な活性を示すグラフである。y軸は相対的な活性であり、単位はない。

【発明を実施するための形態】

【0057】

詳細な説明

「a（1つの）」、「an（1つの）」、および「the（その）」という単数形は、文脈により明確に別段の規定がなされない限り、複数の指示対象を包含する。

【0058】

10

20

30

40

50

本明細書および特許請求の範囲において使用される場合、オープンエンドの移行句「含む (comprise(s))」、「含む (include(s))」、「有する (having)」、「含有する (contain(s))」およびその変形は、指定された成分／ステップの存在を必要とし、かつ他の成分／ステップの存在が許容される。これらの句はまた、指定された成分／ステップおよび不可避の不純物のみが許容され、他の成分／ステップは排除されるクローズドエンドの句「からなる (consist of)」または「から本質的になる (consist essentially of)」も開示するものと解釈されるべきである。

【0059】

本出願の明細書および特許請求の範囲における数値は、同じ数の有効数字に減少させた場合に同じである数値、および、明示された値と、値を決定するための本出願に記載されている型の従来の測定技法の実験誤差未満だけ異なる数値を包含するものと理解されるべきである。

【0060】

本明細書に開示されている範囲は全て、列挙された終点を含み、独立に組み合わせ可能である（例えば、「2グラムから10グラムまで」という範囲は、終点である2グラムおよび10グラム、ならびに全ての中間値を含む）。

【0061】

「約」という用語を使用して、変動し得る任意の数値を、その値の基本的な機能を変化させずに含めることができる。範囲に使用される場合、「約」は、2つの終点の絶対値によって定義される範囲も開示し、例えば、「約2～約4」は、「2から4まで」の範囲も開示する。「約」という用語は、示されている数のプラス10%またはマイナス10%を指し得る。

【0062】

「同一性」という用語は、配列（ヌクレオチドまたはアミノ酸）の対間の類似性を指す。同一性は、同一の残基の数を残基の総数で割り、その結果に100を掛けて百分率を得ることによって測定する。したがって、正確に同じ配列の2つのコピーは100%の同一性を有するが、あまり高度に保存的ではなく、欠失、付加、または置き換えを有する配列は、より低い程度の同一性を有し得る。配列同一性を決定するために、BLASTなどのアルゴリズムを使用するものなどのいくつかのコンピュータプログラムが利用可能であることが当業者には認識されよう。BLASTヌクレオチド検索はNBLASTプログラムを用いて実施し、BLASTタンパク質検索はBLASTPプログラムを実施し、それぞれのプログラムの初期パラメータを使用する。

【0063】

2つの異なる配列は、その配列によりコードされるタンパク質の全体的な機能に影響を及ぼすことなく互いに変動し得る。この点について、化学的に類似したアミノ酸を、多くの場合、機能を変化させることなく互いに置き換えることができることが当技術分野で周知である。関連する特性としては、酸性／塩基性、極性／非極性、電荷、疎水性、および化学構造が挙げられ得る。例えば、塩基性残基LysおよびArgは、化学的に類似しているとみなされ、多くの場合、互いに置き換えられ、酸性残基AspおよびGlu、ヒドロキシル残基SerおよびThr、芳香族残基Tyr、PheおよびTrp、および非極性残基Ala、Val、Ile、LeuおよびMetも同様である。これらの置換は、「保存的」とであるとみなされる。同様に、ヌクレオチドコドンおよび許容される変動が当技術分野で公知である。例えば、コドンACT、ACC、ACA、およびACGは全てアミノ酸トレオニンをコードする、すなわち、3番目のヌクレオチドを、生じるアミノ酸を変化させずに改変することができる。類似性は、類似した残基の数を残基の総数で割り、その結果に100を掛けて百分率を得ることによって測定する。類似性と同一性の測定値は特性が異なることに留意されたい。

【0064】

「抗体」とは、免疫系により、標的抗原を同定するために使用されるタンパク質である

10

20

30

40

50

。抗体の基本的な機能単位は、免疫グロブリン単量体である。単量体は、2つの同一の重鎖と2つの同一の軽鎖とで構成され、Y形のタンパク質が形成される。各軽鎖は定常ドメイン1つと可変ドメイン1つとで構成される。軽鎖に関しては、定常ドメインは「定常領域」とも称することができ、可変ドメインは「可変領域」とも称することができる。各重鎖は可変ドメイン1つと定常ドメイン3つまたは4つとで構成される。重鎖に関しては、定常ドメインは合わせて「定常領域」と称され、可変ドメインも「可変領域」と称することができる。Yのアームは断片、抗原結合性（F a b）領域と称され、各アームはF a b断片と称される。各F a b断片は重鎖からの定常ドメイン1つと可変ドメイン1つ、および軽鎖からの定常ドメイン1つと可変ドメイン1つで構成される。Yの基部はF c領域と称され、これは各重鎖からの定常ドメイン2つまたは3つで構成される。F a b領域内の重鎖および軽鎖の可変ドメインは、抗体のG I Pと結合する部分である。より詳細には、可変ドメインの相補性決定領域（C D R）は、それらの抗原（すなわちG I P）に結合する。各可変ドメインのアミノ酸配列内には、3つC D Rが非連続的に配置されている。「全体」という用語は、本明細書では、F a b領域とF c領域とを含有する抗体を指すために使用される。

10

【0065】

「G I Pのアンタゴニスト」とは、本開示によると、G I Pに結合し、G I Pの生物学的作用に干渉する分子である。

【0066】

本開示は、G I Pと拮抗する、すなわち、G I Pに結合する分子を用いて患者を治療する方法に関する。この点について、胃抑制ポリペプチドまたはG I Pとも称されるグルコース依存性インスリン分泌ポリペプチドは、食後の期間に腸のK細胞から放出されるインスリン分泌性ペプチドである。インクレチンと同様に、G I Pは、食物摂取に応答して膵ベータ細胞を刺激することによってインスリン分泌を刺激する。G I Pは、本明細書ではG I P（1-42）とも記され、主に42アミノ酸のポリペプチドとして循環しているが、N末端アミノ酸の最初の2つを欠く形態（G I P（3-42））でも存在する。G I P（1-30）-NH₂またはG I P（1-30）-アルファアミドは、C末端アミノ酸の最後の12個を欠くG I P（1-42）の合成誘導体である。G I P（1-30）-NH₂はG I P（1-42）と同じ生物学的功能を有する。天然に存在するG I P（1-30）-NH₂は、仮説は立てられているが、いかなる生物種においても同定されていない。

20

30

【0067】

G I Pは、標的細胞の表面上に見いだされるその同族受容体（G I P R）に結合することによって機能する。G I P Rは、膜貫通ドメインを7つ有するGタンパク質共役受容体（G P C R）のグルカゴン-セクレチンファミリーのメンバーである。ネイティブなG I P（1-42）および合成誘導体G I P（1-30）-NH₂は、高親和性でG I P Rに結合し、アゴニスト性を有する。G I P受容体は、脂肪細胞においても、脂肪細胞内のグルコースの取り込み、脂肪酸合成、および脂肪酸の脂質への組み入れの増加に伴うG I Pレベルの上昇に応答して発現する。ネイティブなG I P（1-42）および合成誘導体G I P（1-30）-NH₂は同様に、グルカゴンとイソプロテレノールを含めたβ-アドレナリン作動性受容体アゴニストとによって誘導される脂肪細胞における脂肪分解を阻害する。

40

【0068】

G I Pは、ヒト（Homo sapiens）（配列番号1）、マウス（Mus musculus）（配列番号2）、ラット（Rattus norvegicus）（配列番号3）、およびブタ（Sus scrofa）（配列番号4）の間で良く保存されている。これらの4つの配列の間では置換が4つのみあり、その全てが保存的である。これらの4種からの42アミノ酸配列を以下に列挙する：

【化 1】

配列番号 1: Y A E G T F I S D Y S I A M D K I **H** Q Q D F V N W L L A Q **K** G K K N D W K H N I T Q
配列番号 2: Y A E G T F I S D Y S I A M D K I **R** Q Q D F V N W L L A Q **R** G K K S D W K H N I T Q
配列番号 3: Y A E G T F I S D Y S I A M D K I **R** Q Q D F V N W L L A Q **K** G K K N D W K H N **L** T Q
配列番号 4: Y A E G T F I S D Y S I A M D K I **R** Q Q D F V N W L L A Q **K** G K K S D W K H N I T Q

【0069】

本出願は、G I P に結合する分子アンタゴニストを含有する組成物を使用して、脂肪肝疾患（F L D）ならびに脂肪組織の集積を伴う他の疾患を治療する方法に関する。特定の
実施形態では、分子アンタゴニストは、モノクローナル抗体全体（すなわち、G I P m
A b）である。脂肪肝疾患では、脂肪症により、肝臓細胞内でのトリグリセリド脂肪の蓄
積が生じる。経口的グルコース投与後、血清 G I P レベルが 5 ～ 6 倍に上昇し、それにより、
インスリン放出が刺激され、それにより、グルコースの取り込みが促進されることが
知られている。G I P はまた、A k t / P K B を活性化し、それにより、グルコーストラン
スポーター 4 の膜移行が促進され、グルコースの脂肪細胞取り込みが増強され、それ
により、脂肪の生成および貯蔵が導かれる。結果として、G I P と拮抗し、その生物活性
を低下させることにより、グルコースの吸収が阻害され、したがって、脂肪の生成および
貯蔵が減少することが仮定された。本開示は、患者に G I P モノクローナル抗体アンタゴ
ニストを含む組成物を投与することによって肝臓、網、または皮下組織における脂肪の保
持を減少させることができることを示す。モノクローナル抗体の C D R に関する変形であ
る他の分子アンタゴニストも、脂肪組織の集積を減少させるのに有効であり得る。

【0070】

本明細書に記載の G I P 分子アンタゴニストは、肥満症、メタボリックシンドローム、
高脂血症、I I 型糖尿病、および食物誘導性クッシング症候群などの、G I P 発現を低下
させることによって、またはカロリー摂取を減少させるもしくは体重を減少させること
によって治療することができる他の疾患または状態を好転させることにも役立ち得る。

【0071】

本開示の G I P モノクローナル抗体アンタゴニストは、以下の様式で生成し、スクリー
ニングすることができる。以下のアミノ酸配列を有する 2 つのペプチドを化学的に合成し
た：

【化 2】

GIP(1-17)+C: Y A E G T F I S D Y S I A M D K I C (配列番号 5)

C+mGIP(26-42): C L L A Q **R** G K K S D W K H N I T Q (配列番号 6)

【0072】

G I P (1 - 1 7) + C のアミノ酸配列は、一般に成熟ヒト、マウス、ラット、および
ブタ G I P に共有される最初の 1 7 アミノ酸に対応する。この配列は、N 末端に、キーホ
ールリンペットヘモシアニン（K L H）とのコンジュゲーションを容易にする余剰のシス
테인残基も含有する。C + m G I P (2 6 - 4 2) のアミノ酸配列は、成熟マウス G I
P の最後の 1 7 アミノ酸に対応し、これは、ヒト G I P またはブタ G I P と別々に比較し
た場合には置換を 2 つ有するのみであり、ラット G I P と比較した場合には置換を 3 つ有
するのみである。この配列は、C 末端に、K L H とのコンジュゲーションを容易にする付
加的なシステイン残基も含有する。この 2 つのペプチドを K L H とコンジュゲートした。
次いで、各コンジュゲートを別々に使用して、4 つの異なる場合においてマウス 4 匹の群
に注射した。脾臓を採取する 1 週間前、4 週間前、7 週間前、1 0 週間前および 2 4 週間
前にマウスに注射した。

【0073】

免疫したマウスから脾臓を取り出し、脾細胞を単離した後に B 細胞を不死化骨髓腫細胞

10

20

30

40

50

と *in vitro* で融合した。効率を上昇させるために融合プロセスにポリエチレングリコール (PEG) を含めた。融合した細胞またはハイブリドーマをヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン (HAT) 培地中で 14 日間インキュベートして、B 細胞と融合しなかった骨髓腫細胞を死滅させた。次いで、ハイブリドーマ細胞をインキュベーション培地で希釈し、一連の 96 ウェルプレートに移した。希釈は、各ウェルがおよそ 1 つの細胞を含有する程度までのものであった。ハイブリドーマ細胞を数日間増大させた後、馴化培地または上清をスクリーニングのために収集した。

【0074】

96 ウェルプレートを、合成マウス GIP (1-42) (Phoenix Pharmaceuticals) を、PBS 中 $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ 溶液 $50 \mu\text{l}$ で使用してコーティングした。次いで、ハイブリドーマ上清を収集し、マウス GIP (1-42) を含有するウェルに添加して 37°C で 4 時間置いた。次いで、上清を取り出し、洗浄してマウス GIP に結合しないあらゆる抗体を除去した。次に、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) とコンジュゲートしたヤギ抗マウス IgG の溶液をウェルに添加した。ヤギ抗マウス IgG-HRP は、Jackson Laboratories から入手し、5000 分の 1 の希釈度で使用した。 37°C で 1 時間インキュベートした後、抗体溶液を除去し、ウェルを、PBS 中 $0.4 \text{ mg}/\text{ml}$ の BSA を用いて 2 回洗浄した。

【0075】

次いで、 $0.4 \text{ mg}/\text{ml}$ の尿素・過酸化水素および 0.05 M のリン酸クエン酸、 $\text{pH } 5.0$ 中 $4 \text{ mg}/\text{ml}$ の HRP 基質 o -フェニレンジアミン二塩酸塩 (OPD) を含有する溶液を各ウェルに添加した。HRP 活性を定量化するために、各ウェルについて 490 nm の波長における吸光度を、ELISA プレートリーダーを使用して測定した。これにより、ウェル内のマウス GIP に結合するモノクローナル抗体を生成したハイブリドーマを同定することが可能になった。

【0076】

次に、これらの同定されたハイブリドーマ由来の上清をその後にマウス GIP の $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ 溶液と混合して 37°C で 30 分置き、次いで、上記の通りマウス GIP でコーティングしたウェルに添加した。 37°C で 1 時間インキュベートした後、ウェルを洗浄し、ヤギ抗マウス IgG-HRP をウェルに添加した。1 時間インキュベートした後、試料を洗浄し、 $0.4 \text{ mg}/\text{ml}$ の尿素・過酸化水素、および 0.05 M のリン酸クエン酸、 $\text{pH } 5.0$ 中 $4 \text{ mg}/\text{ml}$ の HRP 基質 OPD を含有する溶液を各ウェルに添加した。各ウェルにおける HRP 活性を定量化した。このスクリーニングでは、懸濁液中の GIP に結合したモノクローナル抗体は「中和」され、ウェルに固定された GIP には結合することができない。したがって、HRP 活性が低いウェルは、懸濁液中の GIP により有効に結合したモノクローナル抗体に対応する。これらの基準を使用して、懸濁液中のマウス GIP に結合するモノクローナル抗体 (mAb) を最も良好に生成する 5 つのハイブリドーマを同定した。マウス GIP とヒト GIP の間の同一性の対応が高度であるので、マウス GIP に結合したこれらの mAb はヒト GIP にも結合することが予測された。

【0077】

次に、GIP を中和し、リガンド-受容体相互作用、受容体の活性化および受容体依存性シグナル伝達を妨げるハイブリドーマ上清の能力を、細胞培養系を使用して試験した。この系では、環状アデノシンリン酸 (cAMP) - 応答性プロモーターの制御下で lacZ 遺伝子を有し、細胞表面上にラット GIPR を発現するレポーター細胞 (LGIPR2 細胞) を使用した。これらの細胞への GIP の添加により、GIPR の活性化、cAMP の蓄積を導くシグナル伝達カスケードの誘導、lacZ 遺伝子の誘導および β -ガラクトシダーゼの合成が導かれる。試験試料を添加し、4 時間インキュベートした後、比色定量アッセイを用いて細胞溶解物中の β -ガラクトシダーゼ含量を測定した。色の変化の程度は β -ガラクトシダーゼ活性のレベルに比例する。 β -ガラクトシダーゼ活性のレベルは、試験試料中の遊離の生物活性 GIP の量に左右される。

【0078】

懸濁液アッセイにおいて陽性にスコア付けされた、培養物中で成長させた5つのハイブリドーマクローン由来の上清を、マウスG I PまたはヒトG I Pの溶液を用いて1：1および1：20に希釈した。次いで、混合物をL G I P R 2細胞に添加し、インキュベートした後、洗浄し、β-ガラクトシダーゼについてアッセイした。5つの上清のうち3つで、1：1に希釈した場合にマウスG I Pの有意な阻害が示され、これらの3つの上清のうち2つで、1：20に希釈した場合にマウスG I Pの有意な阻害が示された。

【0079】

モノクローナル抗体がG I Pに特異的であることを実証するために、懸濁液アッセイにおいて陽性にスコア付けされた5つのハイブリドーマ由来の上清を、ヒトグルカゴン様ペプチド-1 (G L P-1) の0.1 nM溶液を用いて1：1に希釈した。次いで、混合物をL G L P-1 R細胞に添加した。L G L P-1 R細胞は、G L P-1受容体を発現し、G I P Rを発現しないこと以外はL G I P R 2細胞と同一である。細胞を37℃で4時間インキュベートした後、混合物を取り出し、細胞を洗浄し、β-ガラクトシダーゼ含量をアッセイした。ネイティブなG L P-1を阻害した上清はなく、これにより、G I Pに対する特異性が示される。

【0080】

次に、1：20に希釈した場合にマウスG I Pの有意な阻害を示す上清を産生した2つのハイブリドーマを増大させ、細胞およそ 5×10^5 個を採取し、Ambionから購入したキット(RN aqueous-4 PCR、Life Technologies)を使用して全RNAを調製した。Life Technologiesから購入したcDNA合成用のSuperscript III first-strand systemを使用して第1鎖cDNAを作出するために全RNA 2マイクログラムを使用した。得られたcDNAを使用して、重鎖可変配列および軽鎖可変配列をコードするcDNAを2つの別々のポリメラーゼ連鎖反応(PCR)において増幅した。

【0081】

重鎖可変配列を増幅するために、配列CAGTCGAAGC TTTGAGGAGA CGGTGACCGTG GTCCCTTGGC CCCAG(配列番号43)を有するオリゴヌクレオチドをリバースプライマーとして使用し、配列：CAACTAGGATCCAGGTSMAR CTGCAGSAGT CWGG(配列番号44)を有するオリゴヌクレオチドをフォワードプライマーとして使用した。リバースプライマーは、その5'末端に配列AAGCTT(配列番号45)を含有し、これは、制限酵素HindIIIに対する認識配列である。フォワードプライマーは、その5'末端に配列GGATCC(配列番号46)を含有し、これは、制限酵素BamHIに対する認識配列である。得られたPCR産物を酵素HindIIIおよびBamHIで消化し、次いで、同様に制限酵素HindIIIおよびBamHIを用いて消化したプラスミドpUC18にライゲーションした。ライゲーション反応を、Epicentreから購入したFast-Linkキットを使用して実施した。ライゲーション反応物を使用してE. coli DH5α細菌細胞(Life Technologies)を形質転換した。50マイクログラム/ミリリットル(μg/ml)のカルベニシリンを含有する寒天プレート上で、プラスミドを取り込んだ細菌を選択した。カルベニシリン寒天プレート上で成長したコロニーを選び取り、培養物2 ml中で16時間成長させた。細菌を採取し、プラスミドDNAを、アルカリ性溶解ミニプレップ法を使用して単離した。精製したプラスミドDNAを、制限酵素BamHIおよびHindIIIを用いて消化した後、DNAを、Tris-ホウ酸緩衝液中1.2%アガロースゲルを通じた電気泳動によって分解した。ゲル中のDNA断片を臭化エチジウムで染色し、紫外線ランプを使用して可視化した。およそその分子サイズが374塩基対である制限断片を生じたプラスミドについて、Eurofins MWG Operon(Huntsville, AL)から購入したサービスを使用して配列決定した。

【0082】

軽鎖可変配列を増幅するために、上記と同じ手順に概ね従った。主要な差異は、配列：

CAGTCGAAGC TTGTTAGATC TCCAGCTTG GTCCC (配列番号47)を有するオリゴヌクレオチドをフォワードプライマーとして使用し、配列CAACTAGGAT CCGACATTCA GCTGACCCAG TCTCCA (配列番号48)を有するオリゴヌクレオチドをリバープライマーとして使用したことである。重ねて、フォワードプライマーはHindIIIに対する認識配列(配列番号45)を含有し、リバープライマーはBamHIに対する認識配列(配列番号46)を含有する。およその分子サイズが355塩基対である制限断片を生じたプラスミドについて、Eurofins MWG Operon (Huntsville、AL)から購入したサービスを使用して配列決定した。

【0083】

上記の手順を使用して同定して得られたmAbはマウス抗体である。これらのマウス抗体を、ヒト重鎖定常領域およびヒト軽鎖定常領域にそれぞれ融合したマウス重鎖の可変ドメインおよびマウス軽鎖の可変ドメインを有するキメラ抗体を形成することによって部分的にヒト化した。これは、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を使用して重鎖可変配列および軽鎖可変配列を増幅することによって行った。PCRに使用した鋳型は、対応する可変重鎖cDNA配列または可変軽鎖cDNA配列を含有するpUC18誘導体であった。重鎖可変領域は、配列TCACGAATTC TCAGGTCCAG CTGCAGGAGT (配列番号49)を有するオリゴヌクレオチドをフォワードプライマーとして使用し、配列TTGGTGCTAG CTGAGGAGAC GGTGACCGT (配列番号50)を有するオリゴヌクレオチドをリバープライマーとして使用して増幅した。フォワードプライマーは、その5'末端に配列GAATTC (配列番号51)を含有し、これは、制限酵素EcoRIに対する認識配列である。リバープライマーは、その5'末端に配列GCTAGC (配列番号52)を含有し、これは、制限酵素NheIに対する認識配列である。PCR増幅の後、DNA断片をEcoRIおよびNheIで消化し、同様に制限酵素EcoRIおよびNheIを用いて消化したプラスミドpFUSEss-CHlg-hG1とライゲーションした。プラスミドpFUSEss-CHlg-hG1は、InvivoGen (San Diego、CA)から購入した哺乳動物発現ベクターである。可変重鎖cDNA配列をこのプラスミドにクローニングすることにより、マウス可変領域とヒト定常領域とからなるキメラ重鎖をコードする遺伝子を作製した。ライゲーション反応を、Episentreから購入したFast-Linkキットを使用して実施した。ライゲーション反応物を使用して、E. coli DH5α細菌細胞(Life Technologies)を形質転換した。50μg/mlのゼオマイシンを含有する寒天プレート上で、プラスミドを取り込んだ細菌を選択した。ゼオマイシン寒天プレート上で成長したコロニーを選び取り、培養物2ml中で16時間成長させた。細菌を採取し、プラスミドDNAを、アルカリ性溶解ミニプレップ法を使用して単離した。精製したプラスミドDNAを、制限酵素EcoRIおよびNheIを用いて消化した後、DNAを、Tris-ホウ酸緩衝液中1.2%アガロースゲルを通じた電気泳動によって分解した。ゲル中のDNA断片を臭化エチジウムで染色し、紫外線ランプを使用して可視化した。クローニングの成功を、分子サイズが373塩基対のDNA断片を同定することによって確認した。

【0084】

軽鎖可変領域を、制限酵素EcoRIに対する認識配列(配列番号51)を含有する配列GTCACGAATTCAGACATTCAGCTGACCCAG (配列番号55)を有するオリゴヌクレオチドをフォワードプライマーとして使用し、配列AGCCACCGTA CGTTTGATCT CCAGCTTGGT CCA (配列番号53)を有するオリゴヌクレオチドをリバープライマーとして使用して増幅した。リバープライマーは、その5'末端に配列CGTACG (配列番号54)を含有し、これは、制限酵素BsiWIに対する認識配列である。PCR増幅の後、DNA断片をEcoRIおよびBsiWIで消化し、同様に制限酵素EcoRIおよびBsiWIを用いて消化したプラスミドpFUSE2ss-CLlg-hKとライゲーションした。プラスミドpFUSE2ss

10

20

30

40

50

s-CL Ig-hKは、InvivoGen (San Diego, CA) から購入した哺乳動物発現ベクターである。可変軽鎖cDNA配列をこのプラスミドにクローニングすることにより、マウス可変領域とヒト定常領域とからなるキメラ軽鎖をコードする遺伝子を作製した。ライゲーション反応を、Epicentreから購入したFast-Linkキットを使用して実施した。ライゲーション反応物を使用してE. coli DH5α細菌細胞 (Life Technologies) を形質転換した。50 μg/mlのプラスミドサイジンを含む寒天プレート上で、プラスミドを取り込んだ細菌を選択した。プラスミドサイジン寒天プレート上で成長したコロニーを選び取り、培養物2 ml中で16時間成長させた。細菌を採取し、プラスミドDNAを、アルカリ性溶解ミニプレップ法を使用して単離した。精製したプラスミドDNAを、制限酵素EcoRIおよびBsiWIを用いて消化した後、DNAを、Tris-ホウ酸緩衝液中1.2%アガロースゲルを通じた電気泳動によって分解した。ゲル中のDNA断片を臭化エチジウムで染色し、紫外線ランプを使用して可視化した。クローニングの成功を、分子サイズが353塩基対のDNA断片を同定することによって確認した。

【0085】

ハイブリドーマからクローニングされた可変領域とヒト定常領域とを含有するキメラ抗体を発現させるために、それぞれ可変重鎖配列および可変軽鎖配列を含有するpFUSE ss-CH Ig-hG1誘導体およびpFUSE 2 ss-CL Ig-hK誘導体を培養物中のチャイニーズハムスター卵巣 (CHO-1) 細胞に導入した。DNAの培養細胞への侵入を容易にするためにカチオン性脂質試薬Turbofect (Thermo Scientific, Pittsburgh, PA) を使用したトランスフェクションによってプラスミドDNAを導入した。トランスフェクションの2日後、細胞上清を収集し、GIP-中和活性について分析した。キメラmAbのGIPを中和する能力を実証するために、細胞上清を等体積の 2×10^{-9} MのhGIPと混合した後、培養物中のLGIPR2細胞に添加した。37℃で4時間インキュベートした後、細胞を溶解させ、β-ガラクトシダーゼ活性をアッセイした。このアッセイでは、ハイブリドーマ由来の可変軽鎖配列および可変重鎖配列を含有するプラスミドの組合せは、10g10と称され、細胞に基づくレポーターアッセイにおいてGIP活性を中和することができるものであった。

【0086】

上に開示されている手順を使用して作出し、同定したmAbの可変領域を維持し、定常領域をヒト定常領域で置換した。あるいは、GIP mAbアンタゴニストは、「完全」ヒトmAbが作出されるように、トランスジェニックマウスを使用して作出することもでき、他の技術を使用することもできる。例えば、マウス抗体において保存されている可変ドメイン内のアミノ酸をヒト抗体において保存されているアミノ酸で置き換えることができる。

【0087】

したがって、生じたモノクローナル抗体アンタゴニストはGIPに結合する。特定の実施形態では、本開示の組成物に使用される分子アンタゴニストは、配列番号1、配列番号2、配列番号3、および配列番号4からなる群から選択されるアミノ酸配列に結合することができる。言い換えると、アンタゴニスト (例えば、モノクローナル抗体) は、これらの4つの配列に含有されるエピトープに結合する。

【0088】

種々の実施形態では、分子アンタゴニストは、約120 kDa～約500 kDaを含めた、約30 kDa～約500 kDaの分子量 (MW) を有する。他の実施形態では、分子アンタゴニストは、約0.1 nM～約7 nMのIC₅₀によって特徴付けられる、GIPに対する結合親和性を有する。

【0089】

既に論じた通り、GIPに結合するモノクローナル抗体アンタゴニストは、GIPに結合する軽鎖および重鎖内の可変ドメイン、またはより詳細には、GIPに結合する軽鎖および重鎖の可変ドメインのCDRを有する。本開示の分子アンタゴニストは、GIPに結

合する相補性決定領域（CDR）を少なくとも1つ含有することが一般に意図されている。より詳細には、分子アンタゴニストは、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号31、配列番号32、および配列番号33からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも80%の同一性を有するCDRを少なくとも1つ含有する。これらのCDRは、上記の10g10ハイブリドーマにおいて同定された軽鎖および重鎖内の可変ドメインの種々の改変を通じて同定した。これらの改変は、下の実施例の節においてより詳細に論じられている。CDR（複数可）は、少なくとも85%、または少なくとも90%、または少なくとも95%の同一性を有すること、またはこれらのアミノ酸配列に対して100%の同一性を有することがより望ましい。さらなる特定の実施形態では、分子アンタゴニストは、上記の群内の2つ、3つ、4つ、5つ、または6つの異なるアミノ酸配列に対して必要な同一性を有するCDRを2つ、3つ、4つ、5つ、または6つ含有する。

10

【0090】

いくつかのさらなる特定の実施形態では、分子アンタゴニストは、第1のCDRと第2のCDRとを有する軽鎖可変ドメインを含み、各CDRは、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、および配列番号24からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも95%の同一性を有する。これらのCDRは、軽鎖の可変ドメインにおいて同定された。CDRは、これらのアミノ酸配列に対して100%の同一性を有することがより望ましい。

20

【0091】

他の特定の実施形態では、分子アンタゴニストは、配列番号20のアミノ酸配列に対して少なくとも80%の同一性を有する第1のCDRと、配列番号21のアミノ酸配列に対して少なくとも80%の同一性を有する第2のCDRと、配列番号22のアミノ酸配列に対して少なくとも85%の同一性を有する第3のCDRとを有する軽鎖可変ドメインを含む。これらの3つのCDRの組合せを含有する可変ドメインを、GIPに対する非常に高い結合親和性を有するものとして同定した。3つのCDRは、少なくとも85%、または少なくとも90%、または少なくとも95%の同一性を有すること、あるいはこれらのアミノ酸配列に対して100%の同一性を有することがより望ましい。

【0092】

追加的な実施形態では、分子アンタゴニストは、配列番号31のアミノ酸配列に対して少なくとも80%の同一性を有する第1のCDRと、配列番号32のアミノ酸配列に対して少なくとも80%の同一性を有する第2のCDRと、配列番号33のアミノ酸配列に対して少なくとも80%の同一性を有する第3のCDRとを有する重鎖可変ドメインとを含む。これらの3つのCDRの組合せを含有する可変ドメインを、GIPに対する非常に高い結合親和性を有するものとして同定した。3つのCDRは、少なくとも85%、または少なくとも90%、または少なくとも95%の同一性を有すること、あるいはこれらのアミノ酸配列に対して100%の同一性を有することがより望ましい。

30

【0093】

これらの可変ドメインは、上に明記されているCDRを2つまたは3つ含有し、CDRは連結基によって互いに接合していることが一般に意図されている。連結基は、一般に、CDRがGIPに結合することを可能にする任意の基であってよい。例えば、連結基は、抗体の天然の可変ドメインに存在するように、アミノ酸の鎖であってよい。アミノ酸は任意の所望の長さであってよい。

40

【0094】

特定の実施形態では、分子アンタゴニストは、配列番号16、配列番号17、配列番号18、および配列番号19からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも80%の同一性を有する軽鎖可変ドメインを含む。軽鎖可変ドメインは、これらのアミノ酸配列のうちの1つに対して少なくとも85%、または少なくとも90%、または少なくとも95%の同一性を有する、あるいは100%の同一性を有することがより望ましい。これらの可変ドメインは、アミノ酸と一緒に連結した、配列番号20、配列番号21、配列

50

番号 2 2、配列番号 2 3、および配列番号 2 4 の軽鎖 C D R の種々の組合せを含有する。

【0095】

他の実施形態では、分子アンタゴニストは、配列番号 2 7、配列番号 2 8、配列番号 2 9、および配列番号 3 0 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 8 0 % の同一性を有する重鎖可変ドメインを含む。重鎖可変ドメインは、これらのアミノ酸配列のうちの 1 つに対して少なくとも 8 5 %、または少なくとも 9 0 %、または少なくとも 9 5 % の同一性を有すること、あるいは 1 0 0 % の同一性を有することがより望ましい。これらの可変ドメインは、アミノ酸で連結した、配列番号 3 1、配列番号 3 2、配列番号 3 3、および配列番号 3 4 の重鎖 C D R の種々の組合せを含有する。

【0096】

上に開示されている軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインの任意の組合せを有する分子アンタゴニストも意図されている。より詳細には、いくつかの分子アンタゴニストは、軽鎖可変ドメインをただ 1 つと重鎖可変ドメインをただ 1 つ含有する。その他は、複数の軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインを含有し、これらの実施形態では、通常、複数の軽鎖可変ドメインは同じものであり、複数の重鎖可変ドメインは同じものである。

【0097】

一部の特定の実施形態では、分子アンタゴニストは、軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインとを含む。軽鎖可変ドメインは、第 1 の C D R と第 2 の C D R とを含み、各 C D R は、配列番号 2 0、配列番号 2 1、配列番号 2 2、配列番号 2 3、および配列番号 2 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の同一性を有し、重鎖可変ドメインは、配列番号 3 1 のアミノ酸配列に対して少なくとも 8 0 % の同一性を有する第 1 の C D R と、配列番号 3 2 のアミノ酸配列に対して少なくとも 8 0 % の同一性を有する第 2 の C D R と、配列番号 3 3 のアミノ酸配列に対して少なくとも 8 0 % の同一性を有する第 3 の C D R とを含む。軽鎖可変ドメインは、列挙されているアミノ酸配列のうちの 1 つに対して 1 0 0 % の同一性を有し得る。より詳細には、重鎖可変ドメインは、列挙されているアミノ酸配列のうちの 1 つに対して少なくとも 8 5 %、または少なくとも 9 0 %、または少なくとも 9 5 % の同一性を有する、あるいは 1 0 0 % の同一性を有する。

【0098】

他の特定の実施形態では、分子アンタゴニストは、軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインとを含む。軽鎖可変ドメインは、配列番号 1 6、配列番号 1 7、配列番号 1 8、および配列番号 1 9 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 8 0 % の同一性を有し、重鎖可変ドメインは、配列番号 2 7、配列番号 2 8、配列番号 2 9、および配列番号 3 0 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 8 0 % の同一性を有する。より詳細には、軽鎖可変ドメインおよび／または重鎖可変ドメインは、それらの列挙されているアミノ酸配列のうちの 1 つに対して少なくとも 8 5 %、または少なくとも 9 0 %、または少なくとも 9 5 % の同一性を有する、あるいは 1 0 0 % の同一性を有する。

【0099】

さらなる特定の実施形態では、分子アンタゴニストは、配列番号 1 8 に対して少なくとも 8 0 % の同一性を有する軽鎖可変ドメインと、配列番号 2 8、配列番号 2 9、および配列番号 3 0 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 8 0 % の同一性を有する重鎖可変ドメインとを有する。重ねて、これらのドメインは、それらの列挙されているアミノ酸配列のうちの 1 つに対して少なくとも 8 5 %、または少なくとも 9 0 %、または少なくとも 9 5 %、または 1 0 0 % の同一性を有し得る。

【0100】

特に望ましい実施形態では、分子アンタゴニストは、配列番号 1 8 に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有する軽鎖可変ドメイン、および配列番号 2 9 に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有する重鎖可変ドメインを有する。さらなる特定の実施形態では、これらのドメインは、それらの列挙されているアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の同一性を有し得る、または 1 0 0 % の同一性を有し得る。

【0101】

本開示の分子アンタゴニストは、いくつかの異なる実施形態では、上記の通り軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインとを有する。分子アンタゴニストは、単鎖可変断片（s c F v）、F（a b'）₂断片、F a bもしくはF a b'断片、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、またはこれらの可変ドメインを一部とするモノクローナル抗体であり得ることが特に意図されている。

【0102】

単鎖可変断片（s c F v）は、通常約10～約25アミノ酸（しかし、この範囲内である必要はない）の長さの連結基で接合した軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインとを含む。一方の可変ドメインのN末端と他方の可変ドメインのC末端が接続している。所望であれば、セルトリズマブペゴルのように、s c F vをペグ化して（ポリエチレングリコールを用いて）、そのサイズを増大させることができる。2つのs c F vを別の連結基で接合して、タンデムなs c F vを作製することができる。

10

【0103】

軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインが短い連結基で接合してs c F vを形成している場合、この2つの可変ドメインは一緒にフォールディングすることはできず、s c F vは二量体化してダイアボディを形成する。さらに短い連結基では三量体（すなわち、トリアボディ）および四量体（すなわち、テトラボディ）の形成がもたらされ得る。

【0104】

モノクローナル抗体全体は、2つの重鎖と2つの軽鎖とから形成される。重ねて、各軽鎖および各重鎖は、可変ドメインを含有する。各軽鎖は重鎖と結合している。2つの重鎖はヒンジ領域において接合している。重鎖の定常領域をヒンジ領域の下で取り除くと、合計4つの可変ドメインを含有するF（a b'）₂断片が生じる。次いで、F（a b'）₂断片を2つのF a b'断片に分けることができる。F a b'断片は、ヒンジ領域由来のスルフヒドリル基を含有する。重鎖の定常領域をヒンジ領域の上で取り除くとF a b断片が形成され、スルフヒドリル基はヒンジ領域に由来しない。しかし、これらの断片は全て、軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインとを含有する。

20

【0105】

下記の実験において探究される望ましい実施形態では、分子アンタゴニストは、上に開示されている可変領域／ドメインとヒト定常領域との組合せを有する軽鎖および重鎖から形成されたモノクローナル抗体全体である。重鎖の定常領域は、I g A 1、I g A 2、I g D、I g E、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、またはI g Mを含めた任意のヒトアイソタイプのものであってよい。軽鎖のヒト定常領域は、カッパまたはラムダアイソタイプであってよい。特定の実施形態では、重鎖定常領域はI g G 1アイソタイプであり、軽鎖定常領域はカッパアイソタイプである。

30

【0106】

特定の実施形態では、分子アンタゴニストは、配列番号18に対して少なくとも80%の同一性を有する軽鎖可変ドメインと、配列番号28、配列番号29、および配列番号30からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも80%の同一性を有する重鎖可変ドメインとを有するモノクローナル抗体である。これらのドメインは、それらの列挙されているアミノ酸配列のうちの1つに対して少なくとも85%、または少なくとも90%、または少なくとも95%、または100%の同一性を有し得る。

40

【0107】

他の特定の実施形態では、分子アンタゴニストは、配列番号18に対して少なくとも90%の同一性を有する軽鎖可変ドメインと、配列番号29に対して少なくとも90%の同一性を有する重鎖可変ドメインとを有するモノクローナル抗体全体である。これらのドメインは、それらの列挙されているアミノ酸配列に対して少なくとも95%の同一性を有し得る、または100%の同一性を有し得る。

【0108】

特定の形態がモノクローナル抗体であるG I Pの分子アンタゴニストは、次いで、人間に投与することができる組成物に使用することができる。組成物は、薬学的有効量のG I

50

Pの分子アンタゴニストを含有する。特定の実施形態では、組成物は、組成物1ミリリットル当たり約0.1～約1000ミリグラム(w/v)の量の分子アンタゴニストを含有する。

【0109】

GIPの分子アンタゴニストを含有する医薬組成物は、一般に、薬物の選択および疾患による必要に応じて、非経口（すなわち、皮下、筋肉内、静脈内、腹腔内、胸膜内、小胞内またはくも膜下腔内）経路によって投与する。特定の製剤または適用において使用する用量は、疾患の特定の状態の必要量および担体材料の能力の特徴により課される制約によって決定される。最も望ましい形態では、組成物を静脈内、腹腔内、または皮下に投与することが意図されている。

10

【0110】

医薬組成物は、薬学的に許容される担体を含んでよい。担体は、分子アンタゴニストを送達するためのビヒクルとして作用する。薬学的に許容される担体の例としては、分子アンタゴニストを溶解または懸濁させることができる、水、油、およびアルコールのような液体担体が挙げられる。

【0111】

医薬組成物は、賦形剤も含んでよい。特定の賦形剤としては、緩衝剤、界面活性剤、保存剤、増量剤、ポリマー、および安定化剤が挙げられ、これらは、これらの分子アンタゴニストに有用である。緩衝剤は、組成物のpHを制御するために使用する。界面活性剤は、タンパク質を安定化するため、タンパク質の凝集を阻害するため、表面へのタンパク質の吸着を阻害するために使用し、タンパク質のリフォールディングに役立つ。例示的な界面活性剤としては、Tween 80、Tween 20、Brij 35、Triton X-10、Pluronic F127、およびドデシル硫酸ナトリウムが挙げられる。保存剤は、微生物の成長を防止するために使用する。保存剤の例としては、ベンジルアルコール、m-クレゾール、およびフェノールが挙げられる。増量剤は、かさを増すために凍結乾燥の間に使用する。デキストラン、ヒドロキシルエチルデンプン、ポリエチレングリコール、およびゼラチンなどの親水性ポリマーを、タンパク質を安定化するために使用することができる。ポリエチレングリコールなどの非極性部分を有するポリマーも界面活性剤としても使用することができる。タンパク質安定化剤としては、ポリオール、糖、アミノ酸、アミン、および塩を挙げることができる。適切な糖としては、スクロースおよびトレハロースが挙げられる。アミノ酸としては、ヒスチジン、アルギニン、グリシン、メチオニン、プロリン、リシン、グルタミン酸、ならびにそれらの混合物が挙げられる。ヒト血清アルブミンのようなタンパク質を表面に競合的に吸着させ、タンパク質様分子アンタゴニストの凝集を減少させることもできる。特定の分子が多数の目的に役立ち得ることに留意するべきである。例えば、ヒスチジンは、緩衝剤および抗酸化剤としての機能を果たし得る。グリシンは、緩衝剤として、かつ増量剤として使用することができる。

20

30

【0112】

医薬組成物は、散剤、注射剤、液剤、懸濁剤、または乳剤の形態であってよい。組成物を注射によって送達することが意図されている。時には、GIPの分子アンタゴニストを、当業者に公知の標準の技法を使用して凍結乾燥させることができる。次いで、凍結乾燥させたアンタゴニストを、例えば、適切な希釈剤、例えば、通常の生理食塩水、滅菌水、氷酢酸、酢酸ナトリウム、これらの組合せなどを用いて再構成することができる。

40

【0113】

用量は、薬物の治療指数、疾患の型、患者の年齢、患者の体重、および耐容性を含めた種々の因子に左右される。用量は、一般に、患者において約0.1 μg/mlから約100 μg/mlまでの血清中濃度が実現されるように選択する。特定の患者の用量は、熟練臨床医が、上記の因子を考慮して、標準の薬理学的手法を使用して決定することができる。治療に対する応答は、血中または体液中のグルコースレベルまたはインスリンレベルを分析することによって、または、患者における脂肪レベルをモニターすることによってモニターすることができる。熟練臨床医は、これらの測定によって明らかになった治療に対

50

する応答に基づいて用量を調整する。通常、治療効果をもたらすためには単回投与で十分であり得るが、実質的な期間にわたって継続した応答を保証するために多数回投与を使用することが意図されている。本明細書に開示されている分子アンタゴニストのタンパク質様の性質に起因して、アンタゴニストの体内半減期は長く、したがって、組成物は、月に1回もしくは2回、または場合によって週に1回投与するだけでよいと考えられている。分子アンタゴニストの循環濃度は、食事中または食事後に生成するG I Pを中和するために十分なものであるはずである。

【0114】

本開示のG I P分子アンタゴニストを含有する医薬組成物は、脂肪肝疾患または組織内での脂肪の蓄積を伴う他の疾患を治療するために使用することができる。「治療する(treat)」という用語は、疾患の進行の低減、疾患の後退、および／または疾患の発現の確率を低下させるための予防的使用を指すために使用される。これは、肝臓内脂肪フラクシオン、網内脂肪フラクシオン、または皮下脂肪フラクシオンを介するものなどの、いくつかの異なるやり方で測定することができる。

10

【0115】

肥満の個体に関しては、G I P分子アンタゴニストにより、腸細胞におけるG I Pのその受容体との結合が阻害され、それにより、細胞質から管腔膜へのG I Pに誘導されるナトリウム／グルコース輸送(SGLT1)の移行が阻害されることによって食後のグルコースの吸収が減少すると考えられている。G I Pに誘導される膵ベータ細胞からのインスリン分泌も弱まり、それにより、インスリン応答の上昇に伴う栄養分の貯蔵が減少する。脂肪細胞におけるG I Pのその受容体への結合を阻害することにより、脂肪細胞(fat cell)へのG I Pに誘導されるグルコースの取り込みも減少し、G I Pによる脂肪分解の阻害が防止されるはずである。全体的に、これにより、栄養分の取り込みおよび貯蔵の効率が低下し、体重減少が促進される。これらの効果は、メタボリックシンドロームまたは高脂血症の患者にも有益である。

20

【0116】

I I型糖尿病の患者に関しては、腸細胞におけるG I Pのその受容体への結合を阻害することにより、食後のグルコースの吸収および血糖が減少する。過食の患者にも、G I Pを中和することによる体重減少効果が有益である。

【0117】

脂肪肝疾患にかかりやすいまたは罹患している患者に関しては、ベータ細胞におけるG I Pのその受容体への結合を阻害することにより、食後のインスリン分泌が減少し、したがって、肝臓におけるインスリンに誘導される脂肪の蓄積が減少する。

30

【0118】

食物誘導性クッシング症候群に罹患している患者に関しては、副腎細胞におけるG I Pのその受容体への結合を阻害することにより、食物摂取後のG I Pに誘導されるコルチゾール分泌が減少するまたはその増加が防止される。

【0119】

以下の非限定的な実施例の3つのセットにおいて本開示をさらに例示し、これらの実施例は、単に例示的なものであること、および本開示は、本明細書において列挙されている材料、条件、プロセスパラメータなどに限定されるものではないことを意図していることが理解される。別段の指定のない限り割合は全て重量によるものである。

40

【実施例】

【0120】

(実施例1)

上記の通りモノクローナル抗体を生成し、ハイブリドーマを使用してスクリーニングして、懸濁液中の胃抑制ペプチド(G I P)に対する高い結合親和性を有するモノクローナル抗体を同定した。このようにして、10 g 10モノクローナル抗体が同定された。

【0121】

10 g 10軽鎖可変ドメインは、配列番号16のアミノ酸配列を有する。軽鎖可変ドメ

50

インの第1のCDRは、配列番号25のアミノ酸配列を有する。軽鎖可変ドメインの第2のCDRは、配列番号26のアミノ酸配列を有する。軽鎖可変ドメインの第3のCDRは、配列番号22のアミノ酸配列を有する。10g10軽鎖可変ドメインをコードするcDNAは、配列番号35のヌクレオチド配列を有する。

【0122】

10g10重鎖可変ドメインは、配列番号27のアミノ酸配列を有する。重鎖可変ドメインの第1のCDRは、配列番号31のアミノ酸配列を有する。重鎖可変ドメインの第2のCDRは、配列番号34のアミノ酸配列を有する。重鎖可変ドメインの第3のCDRは、配列番号33のアミノ酸配列を有する。10g10重鎖可変ドメインをコードするcDNAは、配列番号39のヌクレオチド配列を有する。

10

【0123】

比較のために、GIPに対する結合親和性を有さないものとして14B9抗体を同定した。14B9軽鎖可変ドメインは、配列番号7のアミノ酸配列を有する。軽鎖可変ドメインの第1のCDRは、配列番号9のアミノ酸配列を有する。軽鎖可変ドメインの第2のCDRは、配列番号26のアミノ酸配列を有する。軽鎖可変ドメインの第3のCDRは、配列番号10のアミノ酸配列を有する。14B9軽鎖可変ドメインをコードするcDNAは、配列番号8のヌクレオチド配列を有する。

【0124】

14B9重鎖可変ドメインは、配列番号11のアミノ酸配列を有する。重鎖可変ドメインの第1のCDRは、配列番号13のアミノ酸配列を有する。重鎖可変ドメインの第2のCDRは、配列番号14のアミノ酸配列を有する。重鎖可変ドメインの第3のCDRは、配列番号15のアミノ酸配列を有する。14B9重鎖可変ドメインをコードするcDNAは、配列番号12のヌクレオチド配列を有する。

20

【0125】

(実施例2)

材料および方法

【0126】

9週齢の雄C57BL/6マウス30匹をJackson Laboratories (Bar Harbor, ME) から購入した。試験の1日目に、各マウスの体重を計り、19グラムから25グラムの間であった。次いで、マウスをその後ランダムにそれぞれマウス10匹の3つの群に分けた。

30

【0127】

全てのマウスが試験全体を通して食物および水を自由に摂ることができた。全てのマウスを動物設備に収容し、 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、12時間の明/12時間の暗のサイクルで維持した。マウスをケージ当たり5匹の群で、それぞれが体重25グラムに達するまで収容した。次いで、マウスをその後ケージ当たり動物2~3匹で収容した。

【0128】

高脂肪食(HFD)(カタログ番号TD. 06414)および低脂肪等カロリー食(カタログ番号TD. 08806)をHarlan-Teklad (Indianapolis, IN) から購入した。HFDは、重量で、およそ23.5%のタンパク質、27.3%の炭水化物および34.3%の脂肪からなった。HFDは、総カロリーをタンパク質から18.4%、炭水化物から21.3%、および脂肪から60.3%をもたらすものであり、5.1kcal/グラムであった。等カロリー食は、重量で、およそ18.6%のタンパク質、62.6%の炭水化物および4.2%の脂肪からなった。等カロリー食は、総カロリーをタンパク質から20.5%、炭水化物から69.1%、および脂肪から10.4%をもたらすものであり、3.6kcal/グラムであった。

40

【0129】

マウス10匹の1つの群(HFD-対照群)にはHFDを17週間与え、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)0.1mLを1週間当たり5回、腹腔内(i.p.)注射によって投与した。

50

【0130】

マウス10匹の第2群（HFD-mAb群）にはHFDを17週間与え、PBS中10g 10 GIP mAbを1週間当たり5回投与した。月曜日から木曜日までは、PBS中0.2mg/mLのmAbからなる溶液0.1mLをi.p.注射によって投与した。各金曜日には、PBS中0.4mg/mLのmAbからなる溶液0.1mLをi.p.注射によって投与した。これにより、試験の各週について、10mg/kg BWのGIP mAbの投与が週4日、および20mg/kg BWのGIP mAbの投与が週1日もたらされた。この投薬レジメンを試験の過程にわたって継続した。

【0131】

マウス10匹の第3群（Iso食群）には等カロリー食を17週間与えた。この群には注射を行わなかった。

【0132】

試験期間中の各月曜の夕方に各マウスの体重を測定し、記録した。さらに、各群について消費された食物の量も試験の過程全体を通して測定し、記録した。

【0133】

結果

【0134】

HFD-対照群はHFD-mAb群またはIso食群のほぼ2倍の速度で体重が増加した。

【0135】

時間に対する全体重が図1Aに例示されている。各週についての体重増加の百分率が図1Bに例示されている。特別食を1週間与えた後、どちらの高脂肪食（HFD）群（GIP mAbを用いたものと用いなかったもの）も体重がおよそ10%増加した。両方のHFD群の体重増加は、第4週までほぼ同等のままであり、この時、HFD-mAb群の体重増加は減速し始めたが、HFD-対照群の体重は着実に増加した。体重増加の差異は7週までに非常に有意なものになった（ $p < 0.001$ ）。Iso食群は、試験期間を通じてより遅い速度で体重が増加した。HFD-mAb群とIso食群の体重増加は17週間後にほぼ同じ量であった。GIP mAbアンタゴニストの投与には、マウスの体重増加に対する明白な効果があった。

【0136】

図1Bに基づいて、GIP mAbの効果は即時的なものではなく、ある期間にわたって一貫した投薬が必要であると思われる。実験の第1週～第4週では、HFDを与えた両群のマウスの体重増加はほぼ同一であった。第5週目から初めて、HFD-mAb群の体重増加がHFD-対照群と比較して遅い速度で増加し始めた。

【0137】

MRI

材料および方法

【0138】

特別食を17週間与えた後、HFD-対照群から6匹のマウスおよびHFD-mAb群から6匹のマウスを磁気共鳴画像法（MRI）のためにランダムに選択した。全てのマウスを麻酔した後、Case Western Reserve UniversityのImaging Research Core Facilityにおいて画像化を行った。

【0139】

2D T1強調非対称エコー、Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement (aRARE) シーケンスをBruker Biospec 7T small animal MRI scanner (Bruker Biospin, Billerica, MA) (TR=1087ms、TE=9.1ms、FOV=100×50mm、512×256マトリックス、平均4、エコートレイン数=4、スライス厚=1mm) で実施した。aRAREシーケンスにより、脂肪と水

10

20

30

40

50

の間の $\pi/6$ 、 $5\pi/6$ 、および $3\pi/2$ 放射シフト（7 T でエコーシフト 79、396、および $714\ \mu\text{s}$ ）を実現するためのユーザーが選択可能なエコー遅延がもたらされる。

【0140】

a RARE 取得から得た MR 画像を使用して、7 T について改変 IDEAL 画像再構成技法によって別々の脂肪および水画像を生成し、マウスにおける脂質の体内分布の決定を可能にした。この点について、肥満症、メタボリックシンドロームおよび NAFLD は全体重に関する結果だけではなく、どこに過剰な脂肪が貯蔵されているかにも左右される。

【0141】

結果

10

【0142】

図 3 は、HFD-対照マウスからの代表的な磁気共鳴画像（左側）および HFD-mAb マウスからの代表的な磁気共鳴画像（右側）を示す。画像はマウスの側面画像を示すものであり、マウスの前側が画像の上になっており、マウスの後側が画像の下になっている。白色または明るいエリアは、脂肪含量が多いエリアを表す。HFD-対照マウスの脂肪は HFD-mAb と比較してはるかに多かった。

【0143】

図 4 は、緩和補正脂肪フラクション（RCFF）MRI から導き出された肝臓内脂肪フラクションを示す。HFD-対照群の肝臓内に蓄積した脂肪堆積は、HFD-mAb 群のマウスの 2 倍であった。

20

【0144】

図 5 は、緩和補正脂肪フラクション（RCFF）MRI から導き出された網内脂肪フラクションを示す。HFD-対照群において蓄積した網内脂肪体積は、HFD-mAb 群のマウスのほぼ 3.5 倍であった。

【0145】

図 6 は、緩和補正脂肪フラクション（RCFF）MRI によって導き出された皮下脂肪フラクションを示す。HFD-対照の動物において蓄積した皮下脂肪体積は、HFD-mAb 群のマウスのおよそ 2 倍であった。

【0146】

図 7 は、屠殺したマウスから取得した肝臓の染色した組織断面の代表的な写真を示す。肝臓を取り出し、ホルマリン中に固定した。次いで、固定した組織を切片作製し、中性トリグリセリドおよび脂質を染色するために使用されるリゾクロムジアゾ色素であるオイルレッド O を用いて染色した。HFD-対照肝臓が左側に示されており、HFD-mAb 肝臓が右側に示されている。HFD-対照肝臓では、HFD-mAb 肝臓よりも肝臓内の赤色に染色された（暗い）脂肪滴が多い。また、脂肪滴のサイズが HFD-対照肝臓では HFD-mAb 肝臓よりも大きい。これにより、GIP-mAb を投与すると肝臓に蓄積する脂肪が減少することが例示される。これらの結果は、図 4 の肝臓内脂肪フラクションの体積と一致する。

30

【0147】

図 8 は、HFD-対照マウスにおいて見いだされた網内脂肪（左側）と HFD-mAb マウスにおいて見いだされた網内脂肪（右側）を比較する 2 枚の写真のセットである。脂肪は、白色であり、HFD-対照マウスでは、はるかに多くの脂肪が見える。

40

【0148】

総合すると、データから、GIP に結合するモノクローナル抗体アンタゴニストの投与により、高脂肪食を与えたマウスによって貯蔵される脂肪の量が有意に減少することが示された。これは、肝臓内に貯蔵される脂肪、網内に貯蔵される脂肪、および皮下に貯蔵される脂肪を含むものであった。

【0149】

グルコース負荷試験

材料および方法

50

【0150】

特別食を17週間与えた後、腹腔内グルコース負荷試験（IPGTT）のために各食事群から6匹のマウスをランダムに選択した。全ての動物を最初に6時間にわたって絶食させた後、各動物の尾静脈から血液およそ2 μ Lを収集した。これらの第1の試料は、ベスライン血中グルコースレベルまたはIPGTT曲線上のゼロ時間を表すものであった。Truetest（商標）glucometer（NIPRO Diagnostics、Fort Lauderdale、FL）を使用して血中グルコースを測定した。

【0151】

次いで、各マウスに体重1kg当たりおよそ2ミリグラムのグルコースを腹腔内注射によって投与した。グルコースは、水中20%溶液として送達した。投与後、10分、30分、60分、および120分の時点で各マウスの尾静脈から血液およそ2 μ Lを収集した。血中グルコース濃度レベルを測定し、記録した。

10

【0152】

結果

【0153】

結果が図2に示されている。HFD-対照マウスにおける血清グルコースレベルは、HFD-mAbマウスおよびIso食マウスと比較してはるかに高い濃度まで上昇した。さらに、HFD-mAbマウスにおける血清グルコースレベルおよびIso食マウスにおける血清グルコースレベルは、より早い時点で減少し始めた。これは、HFD-対照マウスでは耐糖能障害が発生したが、HFD-mAbマウスまたはIso食マウスでは耐糖能障害が発生しなかったことと一致する。

20

【0154】

血清測定

材料および方法

【0155】

特別食を17週間与えた後、3つの群のマウスを屠殺した。全血を採取し、血清を調製し、多くの異なる構成成分のレベルを測定した。

【0156】

結果

【0157】

図9は、各群のマウスの血清において測定されたトリグリセリド（TG）レベルを示す。HFD-対照マウスにおけるTGレベルは、HFD-mAbマウスにおけるTGレベルの1.44倍であった。TGレベルが高いことは、肥満症およびメタボリックシンドロームに関連する。

30

【0158】

図10は、各群のマウスの血清において測定された平均総コレステロール（TC）レベルを示す。HFD-対照マウスにおけるTCレベルは、HFD-mAbマウスにおけるTCレベルの1.55倍であった。TCレベルが高いことは、肥満症およびメタボリックシンドロームに関連する。

【0159】

図11は、各群のマウスの血清において測定された総コレステロール（TC）に対する高密度リポタンパク質（HDL）の平均比を示す。HFD-対照マウスにおける総コレステロールに対するHDLの比は、HFD-mAbマウスにおける総コレステロールレベルに対するHDLの比よりも20%低かった。総コレステロールレベルに対するHDLの比がより低いことは、肥満症およびメタボリックシンドロームに関連する。

40

【0160】

図12は、各群のマウスの血清において測定された平均低密度リポタンパク質（LDL）レベルを示す。HFD-対照マウスにおけるLDLレベルは、HFD-mAbマウスにおけるLDLレベルの1.95倍であった。LDL（「悪玉」コレステロール）レベルが高いことは、肥満症およびメタボリックシンドロームに関連する。

50

【0161】

図13は、各群のマウスの血清において測定された平均インスリンレベルを示す。HFD-対照マウスにおけるインスリンレベルは、HFD-mAbマウスにおけるインスリンレベルの2.6倍であった。インスリンレベルが高いことは、肥満症、インスリン抵抗性、およびメタボリックシンドロームに関連する。

【0162】

図14は、各群のマウスの血清において測定された平均アディポネクチンレベルを示す。HFD-対照マウスにおけるアディポネクチンレベルは、HFD-mAbマウスにおけるアディポネクチンレベルの1.35倍であった。アディポネクチンレベルが高いことは、総体脂肪の増加に関連する。

10

【0163】

図15は、各群のマウスの血清において測定された平均レプチンレベルを示す。HFD-対照マウスにおけるレプチンレベルは、HFD-mAbマウスにおけるレプチンレベルの5.73倍であった。レプチンレベルが高いことは、総体脂肪の増加に関連する。

【0164】

図16は、各群のマウスの血清において測定された平均グルカゴンレベルを示す。群間で血清グルカゴンのレベルに有意差はなかった。

【0165】

図17は、各群のマウスの血清において測定された平均グルカゴン様ペプチド1 (GLP-1) レベルを示す。群間で血清GLP-1のレベルに有意差はなかった。

20

【0166】

総合すると、このデータから、GIPに結合するモノクローナル抗体アンタゴニストの投与により、肥満症およびメタボリックシンドロームに関連するマーカーの全てが有意に改善されることが示された。このデータから、mAbの投与により、肥満症およびメタボリックシンドロームに伴う合併症を減少させることができることが示唆される。血清グルカゴンまたはGLP-1のレベルに変化がなかったという事実から、mAbがGIPに特異的であることが示され、また、GIPといくつかの共通の生物学的経路を共有するが、GIPと共通して共有されない他の生物学的効果も有するグルカゴンまたはGLP-1を阻害することによる副作用はわずかである（あったとしても）はずであることが示唆される。

30

【0167】

考察

これらの実験の結果から、腹腔内に送達された、GIPに結合するモノクローナル抗体が肝臓内での脂肪組織の蓄積および脂肪の蓄積を有意に減少させ得ることが示された。高脂肪食 (HFD) を与え、GIP mAbを与えたマウスでは、HFD-対照マウスよりも脂肪含量が著しく少なかった。肝臓内、網内、および皮下内の脂肪フラクションに関して脂肪含量の減少が見られた。これにより、中程度の量のGIP mAbアンタゴニストにより、GIPが阻害されることによって組織内での脂肪の蓄積が減少し得るまたは防止され得ることが示される。GIPの阻害により、腸でのグルコースの取り込みが減少し、腸でのペプチドの取り込みが減少し、食後のインスリン分泌が減少し、脂肪細胞におけるグルコースの取り込みが減少し、脂肪分解が増大し、栄養分の取り込みが阻害される。肥満症およびメタボリックシンドロームに関連するマーカーの血清中レベルの変化によっても、GIP mAbアンタゴニストがこれらの状態の健康上の影響に対して有用であり得ることが示される。

40

【0168】

(実施例3)

抗体の改変

10g10 mAbの軽鎖可変領域を、マウス抗体において保存されている特定のアミノ酸をヒト抗体において保存されている特定のアミノ酸で置換することによってさらに改変した。これは、軽鎖可変領域を「ヒト化」してヒト可変領域により類似させるため、お

50

よびヒト免疫系が「ヒト化」mAbを外来物質として認識しない見込みを増大させるために行った。軽鎖可変領域をヒト化するために、オリゴヌクレオチドを化学的に合成した。オリゴヌクレオチドの配列は、特定の塩基を変化させた以外は、10g10 mAb軽鎖可変領域の配列と同様であった。塩基対の変化により、配列がタンパク質に翻訳された際に軽鎖可変領域の特定のアミノ酸が変化することが予測された。DNA合成反応を使用して二本鎖(ds)DNAを作製した。3つの異なるds-オリゴヌクレオチドを合成し、次いで、制限エンドヌクレアーゼHindIIIおよびNotIを用いて消化した後、哺乳動物発現ベクターにライゲーションした。哺乳動物発現ベクターは、シグナル配列およびヒト軽鎖の定常領域を含有するものであった。ds-オリゴヌクレオチドを、ベクターに、可変領域と定常領域が、mRNAとして発現され、次いでタンパク質に翻訳された際に、抗体軽鎖を生成するようにライゲーションした。

10

【0169】

得られたヒト化軽鎖3種は、本明細書ではLC1、LC2、およびLC3と称される。LC1のアミノ酸配列は配列番号17であり、LC1のcDNA配列は配列番号36である。LC2のアミノ酸配列は配列番号18であり、LC1のcDNA配列は配列番号37である。LC3のアミノ酸配列は配列番号19であり、LC1のcDNA配列は配列番号38である。

【0170】

10g10 mAbの重鎖可変領域も同じ様式でさらに改変した。重ねて、塩基対の変化により、配列がタンパク質に翻訳された際に重鎖可変領域の特定のアミノ酸が変化することが予測された。鎖に対して3つの異なるds-オリゴヌクレオチドを合成し、次いで、哺乳動物発現ベクターにライゲーションした。哺乳動物発現ベクターは、シグナル配列およびヒト重鎖の定常領域を含有するものであった。ds-オリゴヌクレオチドを、ベクターに、可変領域と定常領域が、mRNAとして発現され、次いでタンパク質に翻訳された際に、抗体重鎖が生成するようにライゲーションした。

20

【0171】

得られたヒト化重鎖3種は、本明細書ではHC1、HC2、およびHC3と称される。HC1のアミノ酸配列は配列番号28であり、HC1のcDNA配列は配列番号40である。HC2のアミノ酸配列は配列番号29であり、HC1のcDNA配列は配列番号41である。HC3のアミノ酸配列は配列番号30であり、HC1のcDNA配列は配列番号42である。

30

【0172】

ヒト化軽鎖可変領域および重鎖可変領域を含有するモノクローナル抗体(mAb)をCHO細胞において産生させた。抗体軽鎖のコード配列を有する哺乳動物ベクターを、抗体重鎖のコード配列を有する哺乳動物ベクターと同時にトランスフェクトした。全部で9種の独特の組合せをCHO細胞にトランスフェクトした：LC1/HC1、LC1/HC2、LC1/HC3、LC2/HC1、LC2/HC2、LC2/HC3、LC3/HC1、LC3/HC2、およびLC3/HC3。これらの組合せに由来するモノクローナル抗体を10g10 mAbと比較した。

【0173】

40

哺乳動物の発現ベクターを同時にトランスフェクトしたCHO細胞を、培養物中で成長させ、上清を収集した。上清をGIP-結合性mAbの存在について、直接結合ELISAによって評価した。ヒトGIPを96ウェルプレートのウェルの底部に固定した。上清の段階希釈物を96ウェルプレートの異なるウェルに添加した。1時間インキュベートした後、ウェルをPBSで2回洗浄し、その後、ヒトIgGに特異的に結合する二次抗体を各ウェルに添加した。ヒトIgGに特異的に結合する抗体を酵素西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)とコンジュゲートした。1時間インキュベートした後、ウェルをPBSで洗浄し、その後、HRP基質を添加した。HRPがウェルに存在すると、基質が変換されて呈色した化合物になる。呈色強度の量を、分光光度計を使用して読み取った。生じる呈色の量は、各ウェル内に残ったHRP-抗体コンジュゲートの量に比例する。生じる呈色の

50

量はまた、各ウェル内のhGIPに結合したmAbの量にも比例する。

【0174】

この評価の結果から、軽鎖／重鎖ペクターの種々の組合せが、ヒトGIPに以下の順序（最も高い結合親和性～最も低い結合親和性）で結合したことが示された：LC2／HC1、LC2／HC2、LC3／HC2、LC1／HC2、LC2／HC3、LC3／HC1、LC1／HC1、10g10、LC1／HC3、およびLC3／HC3。

【0175】

発現ペクターの組合せ、LC2／HC1を同時トランスフェクトしたCHO細胞、LC2／HC2を同時トランスフェクトしたCHO細胞、およびLC2／HC3を同時トランスフェクトしたCHO細胞の浮遊培養物100ml中で産生された抗体を、プロテインA

10

【0176】

次に、これらの精製されたmAb3種の、hGIPを中和し、リガンド－受容体相互作用、受容体の活性化および受容体依存性シグナル伝達を妨げる能力を、細胞培養系を使用して試験した。この系では、環状アデノシンリン酸（cAMP）－応答性プロモーターの制御下でlacZ遺伝子を有し、細胞表面上にラットGIPRを発現するレポーター細胞（LGIPR3a細胞）を使用した。これらの細胞へのGIPの添加により、GIPRの活性化、cAMPの蓄積を導くシグナル伝達カスケードの誘導、lacZ遺伝子の誘導およびβ－ガラクトシダーゼの合成が導かれる。試験試料を添加し、4時間インキュベートした後、比色定量アッセイを用いて細胞溶解物中のβ－ガラクトシダーゼ含量を測定した。色の変化の程度は、β－ガラクトシダーゼ活性のレベルに比例した。β－ガラクトシダーゼ活性のレベルは、試験試料中の遊離の生物活性GIPの量に左右された。

20

【0177】

mAbを、DMEM培地中ヒトGIP（hGIP）の溶液と、mAbの最終濃度25g／mlおよびhGIPの最終濃度0.1nMで混合した。次いで、混合物をLGIPR3a細胞に添加し、インキュベートした後、洗浄し、β－ガラクトシダーゼについてアッセイした。結果が図18に示されている。10g10は、元のマウスmAbを表す。GIPは陽性対照として機能した。Fcは、精製されたヒトFc断片を表し、これは陰性対照として機能した。

【0178】

結果から、ヒト化抗体が、hGIPをin vitroにおいて10g10マウスmAbと同様に中和することが示された。LC2／HC2ヒト化抗体が3種のヒト化mAbの中で最も有効であった。LC2／HC2ヒト化抗体はまた、元のマウスmAbよりも有効であった。ここでは相対的な活性が低いことが望まれ、LC2／HC2の相対的な活性は0.0035であり、それに対して10g10マウスmAbの相対的な活性は0.0055であった。

30

【0179】

6つのヒト化軽鎖（LC1、LC2、LC3）および重鎖（HC1、HC2、HC3）の可変領域の相補性決定領域（CDR）も決定した。LC1は、配列番号20、配列番号23、および配列番号22のCDRを有した。LC2は、配列番号20、配列番号21、および配列番号22のCDRを有した。LC3は、配列番号20、配列番号24、および配列番号22のCDRを有した。HC1、HC2、およびHC3は全て同じCDRを有し、これは、配列番号31、配列番号32、および配列番号33であった。

40

【0180】

特定の実施形態が記載されているが、現在は予測されていないまたは予測されていない可能性がある代替物、改変、変形、改善、および実質的な等価物が出願人らまたは他の当業者に生じ得る。したがって、出願されたおよび補正され得る添付の特許請求の範囲は、そのような代替物、改変、変形、改善、および実質的な等価物の全てを包含することを意図している。

【図 1 A】

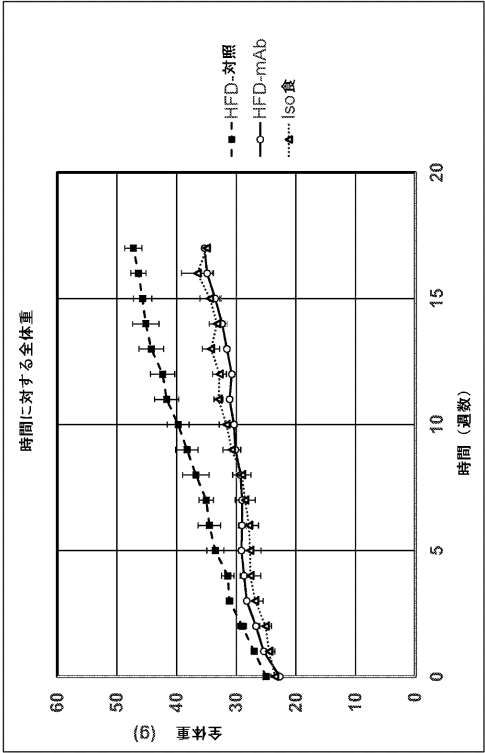


Figure 1A

【図 1 B】

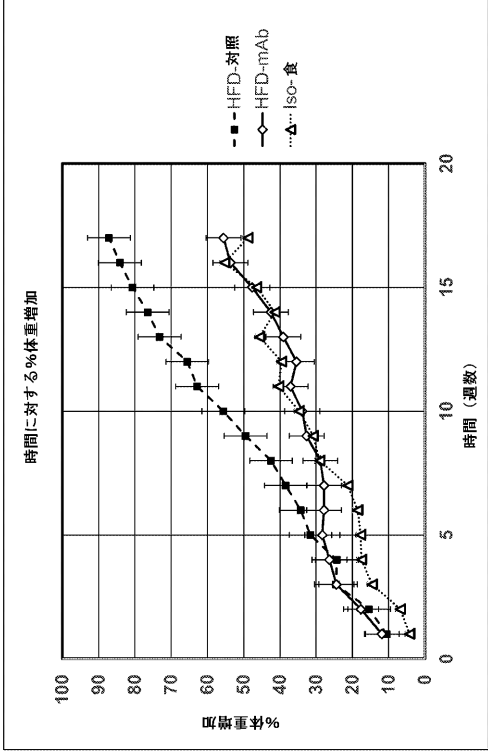


Figure 1B

【図 2】

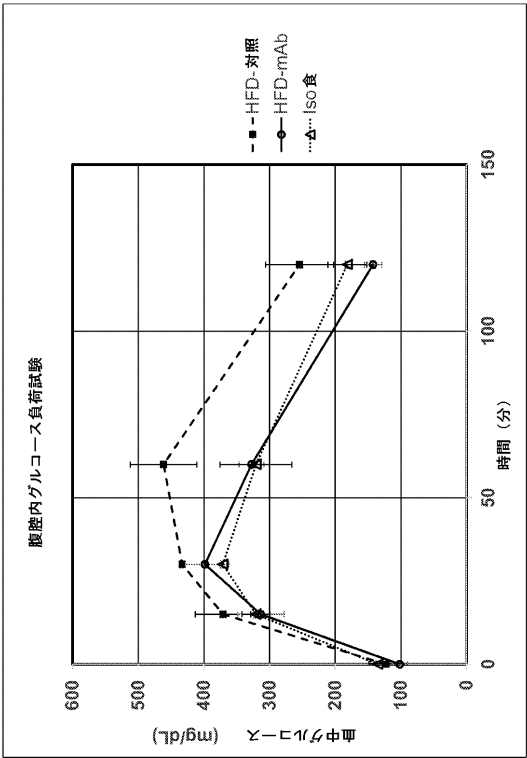


Figure 2

【図 3】

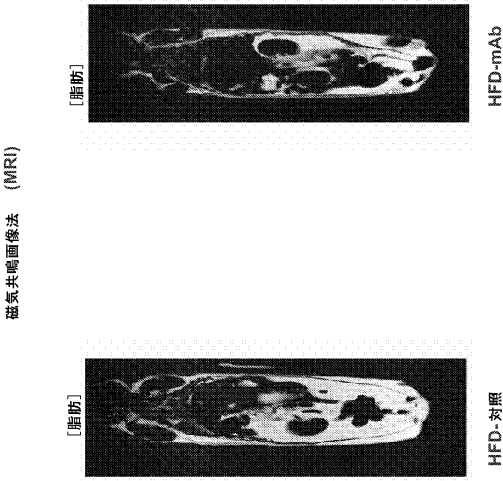


Figure 3

【図 4】

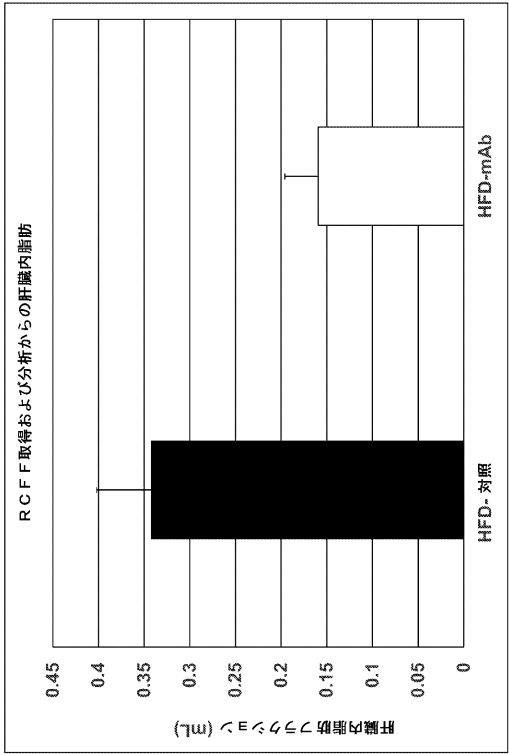


Figure 4

【図 5】

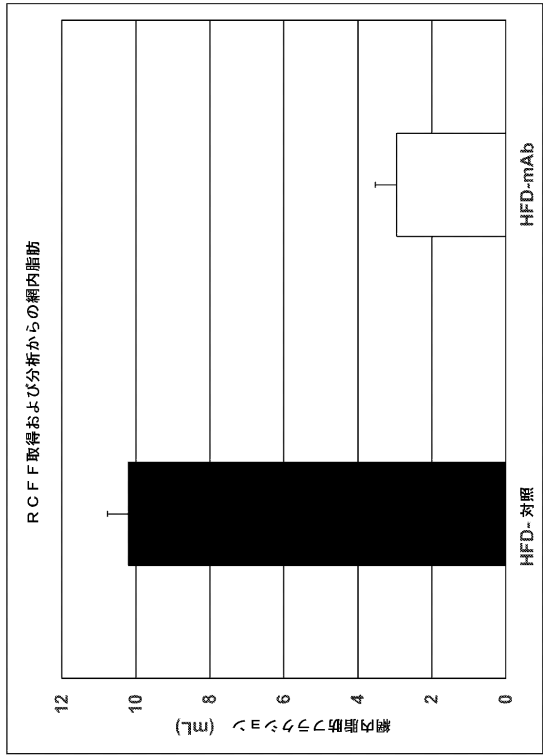


Figure 5

【図 6】

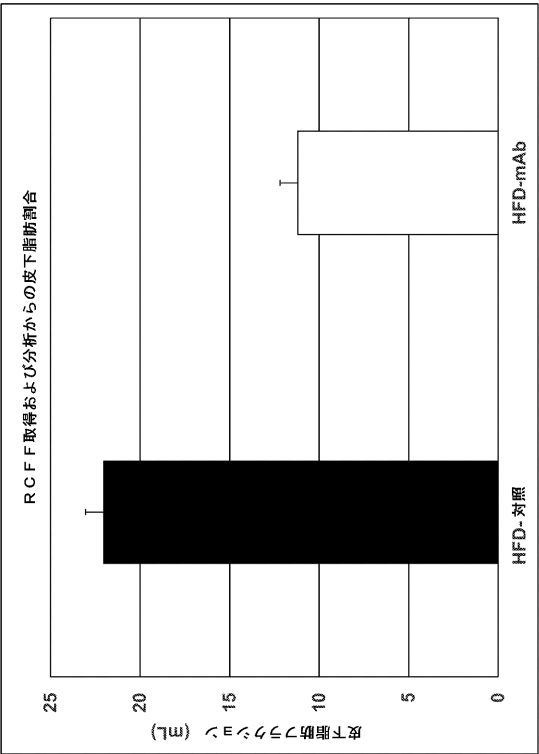


Figure 6

【図 7】

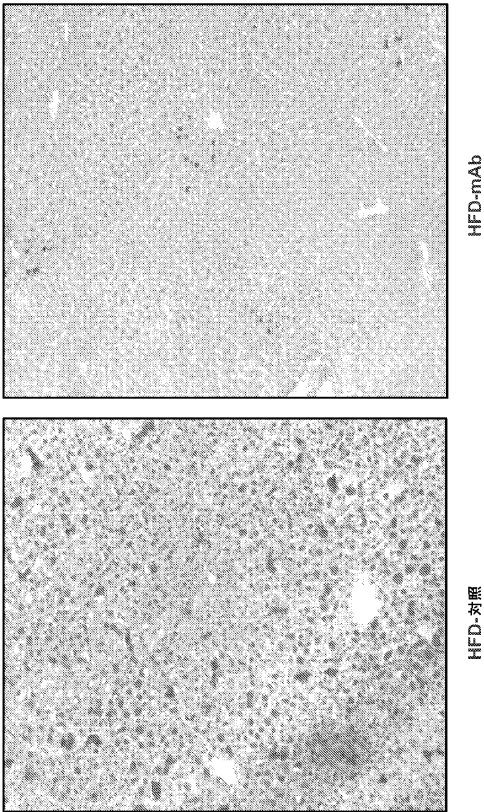
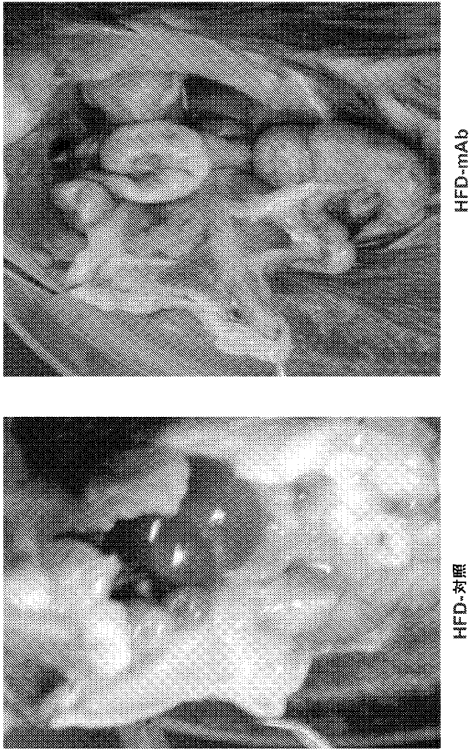


Figure 7

【図 8】



【図 9】

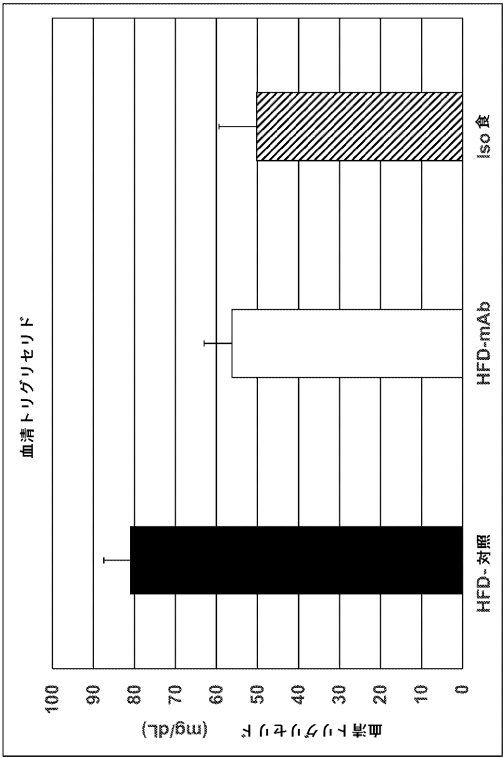


Figure 8

Figure 9

【図 10】

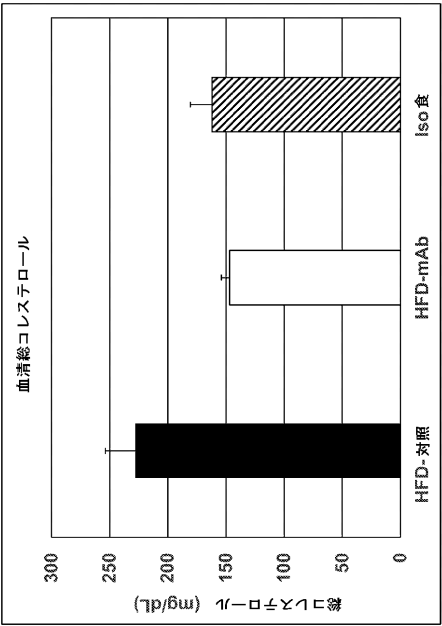


Figure 10

【図 11】

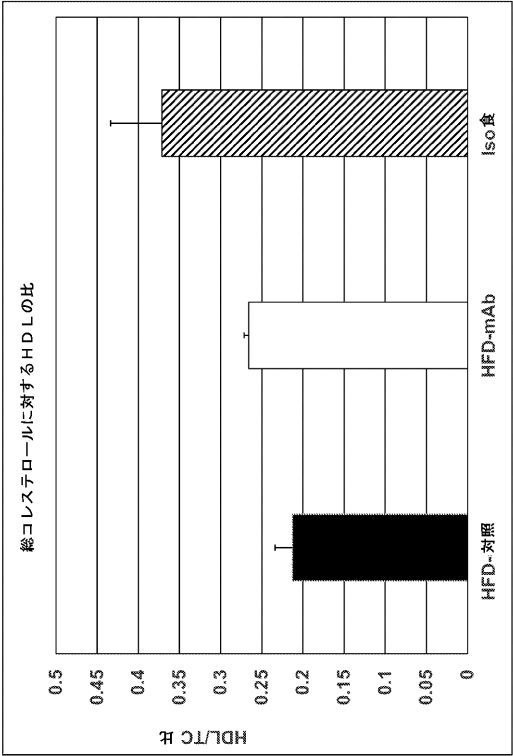


Figure 11

【図 1 2】

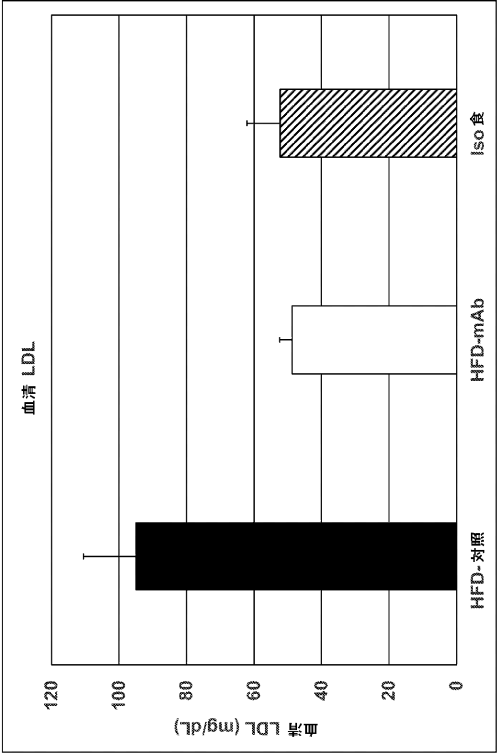


Figure 12

【図 1 3】

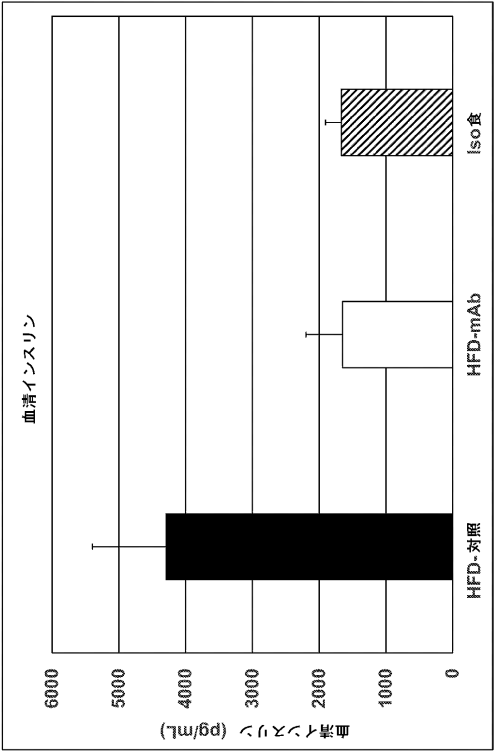


Figure 13

【図 1 4】

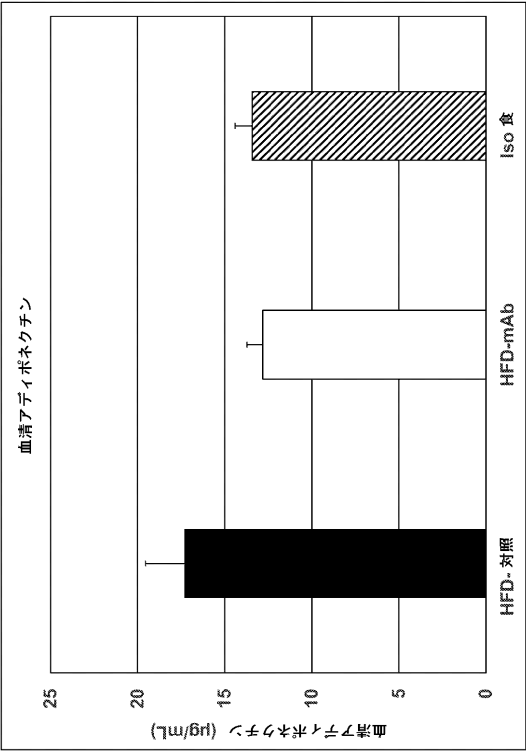


Figure 14

【図 1 5】

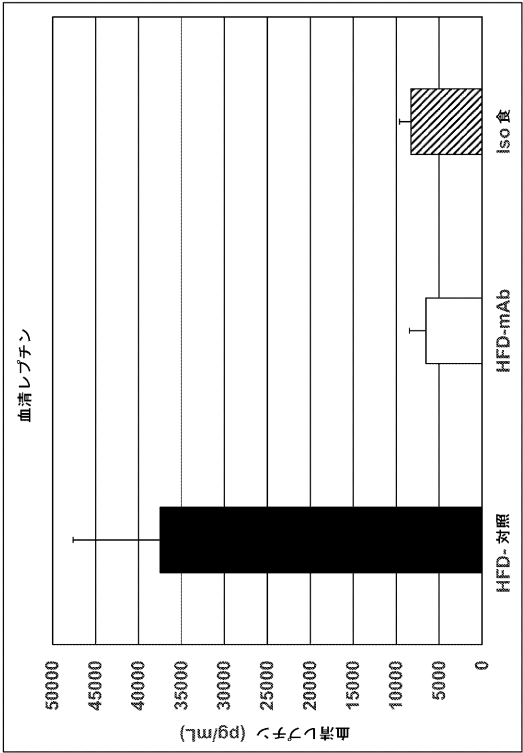


Figure 15

【図 1 6】

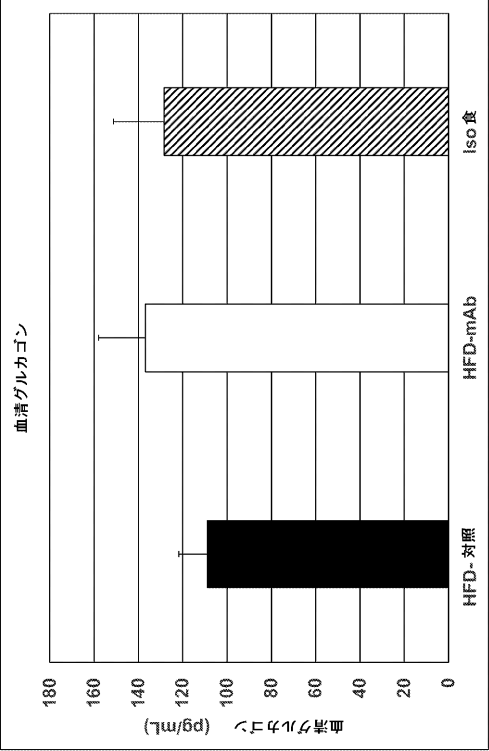


Figure 16

【図 1 7】

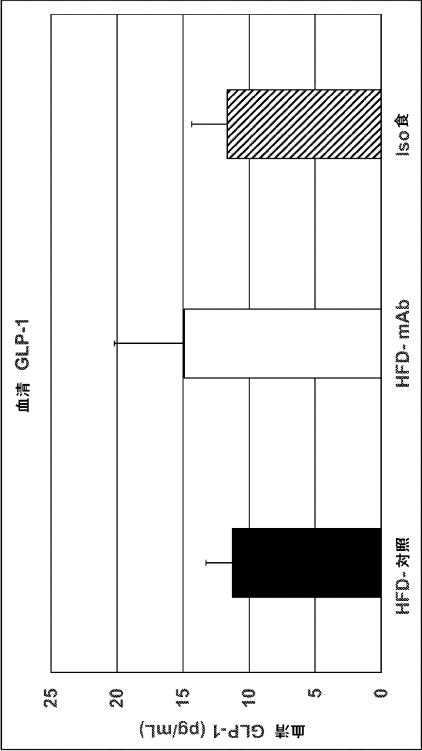


Figure 17

【図 1 8】

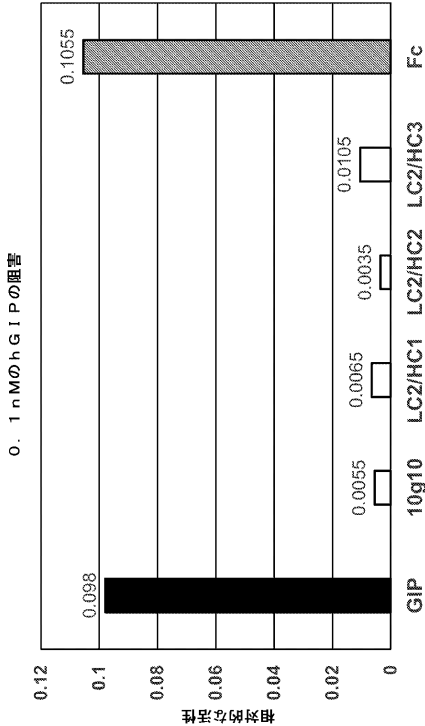


Figure 18

【配列表】

0006328769000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
A 6 1 P	3/06	(2006.01)	A 6 1 P	3/06	
A 6 1 P	5/46	(2006.01)	A 6 1 P	5/46	
C 0 7 K	16/26	(2006.01)	C 0 7 K	16/26	Z N A
C 1 2 N	15/02	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	C
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	A
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/08	

- (31)優先権主張番号 62/007,255
 (32)優先日 平成26年6月3日(2014.6.3)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 62/045,189
 (32)優先日 平成26年9月3日(2014.9.3)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 62/074,225
 (32)優先日 平成26年11月3日(2014.11.3)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 62/074,227
 (32)優先日 平成26年11月3日(2014.11.3)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 62/074,234
 (32)優先日 平成26年11月3日(2014.11.3)
 (33)優先権主張国 米国(US)

前置審査

- (74)代理人 230113332
 弁護士 山本 健策
 (72)発明者 ウォルフ, エム. マイケル
 アメリカ合衆国 オハイオ 44109, クリーブランド, メトロヘルス ドライブ 2500, ザ メトロヘルス システム
 (72)発明者 ボイラン, マイケル オー.
 アメリカ合衆国 オハイオ 44109, クリーブランド, メトロヘルス ドライブ 2500, ザ メトロヘルス システム

審査官 菊池 美香

- (56)参考文献 特表2008-517975(JP, A)
 PLoS ONE, 2008, Vol.3, Issue 9, e3163
 胃と腸、1993年、第28巻、第1号、第14頁

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 A 6 1 K 39/395
 A 6 1 P 1/16
 A 6 1 P 3/00
 A 6 1 P 3/04
 A 6 1 P 3/06
 A 6 1 P 3/10

A 6 1 P 5 / 4 6

C 0 7 K 1 6 / 2 6

C 1 2 N 1 5 / 0 2

C 1 2 N 1 5 / 0 9

C 1 2 P 2 1 / 0 8

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq