(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7231539号
(P7231539)

(45)発行日　令和5年3月1日(2023.3.1)

(24)登録日　令和5年2月20日(2023.2.20)

(51)国際特許分類		FI		
C12N 15/13 (2006.01)		C12N	15/13	ZNA
C07K 16/18 (2006.01)		C07K	16/18	
C12N 15/63 (2006.01)		C12N	15/63	Z
C12P 21/08 (2006.01)		C12P	21/08	
C12N 1/15 (2006.01)		C12N	1/15	

請求項の数　18　（全64頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2019-522246(P2019-522246)
(86)(22)出願日　平成29年10月26日(2017.10.26)
(65)公表番号　特表2019-534281(P2019-534281A)
(43)公表日　令和1年11月28日(2019.11.28)
(86)国際出願番号　PCT/US2017/058462
(87)国際公開番号　WO2018/081375
(87)国際公開日　平成30年5月3日(2018.5.3)
審査請求日　令和2年10月19日(2020.10.19)
(31)優先権主張番号　62/413,586
(32)優先日　平成28年10月27日(2016.10.27)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　62/413,613
(32)優先日　平成28年10月27日(2016.10.27)
最終頁に続く

(73)特許権者　397060175
ヤンセン ファーマシューティカ エヌ．ベー．
ベルギー国 ベー．－２３４０ ベルセトルンハウッサーヴェヒ ３０
(74)代理人　100092783
弁理士　小林 浩
(74)代理人　100095360
弁理士　片山 英二
(74)代理人　100093676
弁理士　小林 純子
(74)代理人　100120134
弁理士　大森 規雄
(74)代理人　100153693
弁理士　岩田 耕一
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　免疫グロブリン及びその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

配列番号１３のポリペプチド配列を有する重鎖（ＨＣ）と、配列番号１５のポリペプチド配列を有する軽鎖（ＬＣ）とを含む、単離されたモノクローナル抗体。

【請求項２】

請求項１に記載のモノクローナル抗体をコードする、単離された核酸。

【請求項３】

請求項２に記載の前記単離された核酸を含む、ベクター。

【請求項４】

請求項３に記載の前記ベクターを含む、宿主細胞。

【請求項５】

単離されたモノクローナル抗体を産生する方法であって、該方法は、請求項４に記載の前記宿主細胞を、該モノクローナル抗体を産生する条件下で培養することと、該モノクローナル抗体を該細胞又は培養物から回収することとを含む、前記方法。

【請求項６】

請求項１に記載のモノクローナル抗体と、それにコンジュゲートされた少なくとも１つの薬理学的活性部分とを含む、コンジュゲート。

【請求項７】

前記薬理学的活性部分が治療用ペプチドである、請求項６に記載のコンジュゲート。

【請求項８】

前記治療用ペプチドが、配列番号１８のシステイン残基において、前記モノクローナル抗体にコンジュゲートされる、請求項７に記載のコンジュゲート。
【請求項９】
前記治療用ペプチドが、リンカーを介して前記モノクローナル抗体にコンジュゲートされる、請求項７又は８に記載のコンジュゲート。
【請求項１０】
前記リンカーが、ペプチドリンカー、炭化水素リンカー、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）リンカー、ポリプロピレングリコール（ＰＰＧ）リンカー、多糖類リンカー、ポリエステルリンカー、又はＰＥＧと該ＰＥＧに組み込まれている複素環とからなるハイブリッドリンカーを含む、請求項９に記載のコンジュゲート。
【請求項１１】
前記治療用ペプチドが、オキシントモジュリン、グルカゴン様ペプチド１（ＧＬＰ１）、エキセンジン、アミリン、α－メラノサイト刺激ホルモン（ＭＳＨ）、コカイン及びアンフェタミン調節転写物（ＣＡＲＴ）、神経ペプチドＹ受容体Ｙ１（ＮＰＹ１）拮抗薬、神経ペプチドＹ受容体Ｙ５（ＮＰＹ５）拮抗薬、ニューロテンシンＳ、神経ペプチドＢ、神経ペプチドW、グレリン、ボンベシン様受容体３（ＢＲＳ３）、ガラニン、コレシストキニン（ＣＣＫ）、オレキシン、メラニン濃縮ホルモン（ＭＣＨ）、オキシトシン、並びにストレスコピンからなる群から選択される、請求項７～１０のいずれか一つに記載のコンジュゲート。
【請求項１２】
前記治療用ペプチドが、配列番号２４のポリペプチド配列を含むオキシントモジュリンである、請求項１１に記載のコンジュゲート。
【請求項１３】
前記治療用ペプチドの側鎖上に導入された求電子物質を、該モノクローナル抗体の配列番号１８のシステイン残基のスルフヒドリル基と反応させ、これにより、該治療用ペプチドと、該モノクローナル抗体との間に共有結合を形成することを含む、請求項７～１２のいずれか一つに記載の前記コンジュゲートを製造する方法。
【請求項１４】
請求項６～１２のいずれか一つに記載の前記コンジュゲートと、薬学的に許容可能な担体とを含む、医薬組成物。
【請求項１５】
請求項６～１２のいずれか一つに記載の前記コンジュゲートを含む医薬組成物の製造方法であって、前記モノクローナル抗体を、薬学的に許容可能な担体と組み合わせることで、前記医薬組成物を得ることを含む、前記方法。
【請求項１６】
対象における治療用ペプチドの半減期を延長するための薬剤の製造における請求項７に記載のコンジュゲートの使用であって、該コンジュゲートは、該治療用ペプチドと、それぞれ配列番号１６、１７、１８、１９、２０、及び２１のポリペプチド配列を有する、重鎖相補性決定領域１（ＨＣＤＲ１）、ＨＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３、及び軽鎖相補性決定領域１（ＬＣＤＲ１）、ＬＣＤＲ２、及びＬＣＤＲ３を含む、単離モノクローナル抗体とを含み、該治療用ペプチドは、配列番号１８のＣｙｓ残基で、該モノクローナル抗体にコンジュゲートされている、前記使用。
【請求項１７】
前記治療用ペプチドが、オキシントモジュリン、グルカゴン様ペプチド１（ＧＬＰ１）、エキセンジン、アミリン、α－メラノサイト刺激ホルモン（ＭＳＨ）、コカイン及びアンフェタミン調節転写物（ＣＡＲＴ）、神経ペプチドＹ受容体Ｙ１（ＮＰＹ１）拮抗薬、神経ペプチドＹ受容体Ｙ５（ＮＰＹ５）拮抗薬、ニューロテンシンＳ、神経ペプチドＢ、神経ペプチドW、グレリン、ボンベシン様受容体３（ＢＲＳ３）、ガラニン、コレシストキニン（ＣＣＫ）、オレキシン、メラニン濃縮ホルモン（ＭＣＨ）、オキシトシン、並びにストレスコピンからなる群から選択される、請求項１６に記載の使用。

【請求項１８】
前記求電子物質がブロモアセトアミド又はマレイミドである、請求項１３に記載の方法。
【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、２０１６年１０月２７日出願の米国仮特許出願第６２／４１３，６１３号、及び２０１６年１０月２７日出願の米国仮特許出願第６２／４１３，５８６号に基づく優先権を主張するものである。これらの開示はそれぞれその全体が参照により本明細書に組み込まれる。
【０００２】
（発明の分野）
本発明は、一般に、新規抗体又はそのフラグメント、及び、インビボでの治療用ペプチドの半減期を増加させるために治療用ペプチドに結合される担体としてのその使用を目的とする。本発明は更に、医薬組成物及びその使用方法に関する。
【０００３】
（電子的に提出された配列表の参照）
本出願は、ファイル名「ＰＲＤ３４５９　Ｓｅｑｕｅｎｃｅ　Ｌｉｓｔｉｎｇ」及び作成日２０１７年１０月２３日、ファイルサイズ２０ｋｂのＡＳＣＩＩフォーマット配列表として、ＥＦＳ－Ｗｅｂを介して電子的に提出された配列表を含む。ＥＦＳ－Ｗｅｂを介して提出された配列表は、本明細書の一部であり、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。本明細書に記載される情報と、ファイル名「ＰＲＤ３４５９　Ｓｅｑｕｅｎｃｅ　Ｌｉｓｔｉｎｇ」でＥＦＳ－Ｗｅｂを介して電子的に提出された配列表との間で、配列番号１～２７の構造に関して不一致がある場合は、本明細書の情報が優先される。
【背景技術】
【０００４】
ペプチド系治療薬はしばしば、多くの承認されたペプチド系治療によって証明されているように、特異性及び選択性を提供することができるよう研究開発されているが、それらを使用することができる方法は、それらの比較的短いインビボ半減期によって制限され得る。ペプチド系治療薬で評価及び利用されてきた数多くの半減期延長戦略が存在している。薬理学的活性部分の半減期延長部分として抗体又は抗体フラグメントを使用することによって、薬理学的活性部分の急速なインビボ排出を防止又は軽減することが行われている。
【０００５】
薬理学的活性部分、好ましくはペプチド系治療薬のために、薬理学的に不活性な半減期延長部分として使用することができる改善された免疫グロブリンの必要が存在する。
【０００６】
前述の議論は、単に、当該技術分野が直面する問題の性質のより良い理解を提供するために提示されているものであり、いかなる意味でも先行技術の容認として解釈されるべきではなく、本明細書における任意の参考文献の引用は、そのような参照が本出願の「先行技術」を構成することを容認するものとして解釈されるべきではない。
【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【０００７】
一般的な一態様では、本発明は、それぞれ配列番号１６、１７、１８、１９、２０、及び２１のポリペプチド配列を有する、重鎖相補性決定領域１（ＨＣＤＲ１）、ＨＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３、及び軽鎖相補性決定領域１（ＬＣＤＲ１）、ＬＣＤＲ２、及びＬＣＤＲ３を含む、単離モノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントに関する。
【０００８】
好ましい実施形態では、本発明の単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントは、配列番号１２のポリペプチド配列を有する重鎖可変ドメイン（ＶＨ）、及び

配列番号１４のポリペプチド配列を有する軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）を含む。より好ましくは、本発明の単離されたモノクローナル抗体は、配列番号１３のポリペプチド配列を有する重鎖（ＨＣ）と、配列番号１５のポリペプチド配列を有する軽鎖（ＬＣ）とを含む。

【０００９】

本発明は更に、本発明のモノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメント、ベクター（好ましくは核酸を含む発現ベクター）、及びそのベクターを含む宿主細胞をコードする、単離された核酸に関する。更に、本発明の単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントを産生する方法も提供され、この方法は、本発明の宿主細胞を、そのモノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントを産生する条件下で培養する工程と、その抗体又はその抗原結合フラグメントを細胞又は培養物から回収する工程と、を含む。

【００１０】

本発明の実施形態は、少なくとも１つの薬理学的活性部分、好ましくは治療用ペプチドに直接又はリンカーを介してコンジュゲートされた、本発明のモノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントを含む。本発明のモノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントは、任意の治療用ペプチドにコンジュゲートされ得る。治療用ペプチドの例としては、オキシントモジュリン、グルカゴン様ペプチド１（ＧＬＰ１）、ペプチドチロシンチロシン（ＰＹＹ）、エキセンジン（エキセナチド）、アミリン（プラムリンタイド）、α－メラノサイト刺激ホルモン（ＭＳＨ）、コカイン及びアンフェタミン調節転写物（ＣＡＲＴ）、神経ペプチドＹ受容体Ｙ１（ＮＰＹ１）拮抗薬（antagnoists）、神経ペプチドＹ受容体Ｙ５（ＮＰＹ５）拮抗薬、ニューロテンシンＳ、神経ペプチドＢ、神経ペプチドＷ、グレリン、ボンベシン様受容体３（ＢＲＳ３）、ガラニン、コレシストキニン（ＣＣＫ）、オレキシン、メラニン濃縮ホルモン（ＭＣＨ）、オキシトシン、並びにストレスコピンが挙げられるがこれらに限定されない。

【００１１】

更に、治療用ペプチドにコンジュゲートされた本発明のモノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントを生成する方法が提供され、この方法は、治療用ペプチドの側鎖上に導入された求電子物質（好ましくはブロモアセトアミド又はマレイミド）を、スルフヒドリル基（好ましくは、モノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントの配列番号１８のシステイン残基のスルフヒドリル基）と反応させ、これにより、治療用ペプチドと、そのモノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントとの間に共有結合を形成することを含む。

【００１２】

本発明は更に、少なくとも１つの薬理学的活性部分、好ましくは治療用ペプチドに、直接又はリンカーを介してコンジュゲートされた、本発明のモノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントと、薬学的に許容可能な担体とを含む、医薬組成物に関する。

【００１３】

本発明の別の一般的態様は、対象における治療用ペプチドの半減期を延長する方法に関し、この方法は、治療用ペプチドを、それぞれ配列番号１６、１７、１８、１９、２０、及び２１のポリペプチド配列を有する、重鎖相補性決定領域１（ＨＣＤＲ１）、ＨＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３、及び軽鎖相補性決定領域１（ＬＣＤＲ１）、ＬＣＤＲ２、及びＬＣＤＲ３を含む、単離モノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントとコンジュゲートさせることを含み、この治療用ペプチドは、スルフヒドリル基、好ましくは配列番号１８のＣｙｓ残基のスルフヒドリル基で、そのモノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントにコンジュゲートされる。

【００１４】

本発明の更なる態様、特徴、及び利点は、以下の「発明の詳細な説明」及び「特許請求の範囲」を読むことにより、より良く理解されるであろう。

【図面の簡単な説明】

【００１５】

上記の概要、及び本出願の好ましい実施形態の以下の詳細な説明は、添付の図面と併せ

て読むことでより理解が深まるであろう。ただし、本出願は、図面に示される実施形態そのものに限定されないことを理解されたい。
【図１】本発明の一実施形態による一般的なペプチド－ｍＡｂコンジュゲート戦略を示す。Ｘは、治療用ペプチド（例えばブロモアセトアミド又はマレイミドなど）の側鎖上に導入された求電子物質を表し、これは、半減期延長ｍＡｂのＣＤＲに組み込まれたＣｙｓ残基のスルフヒドリル基と特異的に反応し、治療用ペプチドとｍＡｂとの間に共有結合を生成する。
【図２】ＰＨ９Ｈ５＿ＶＨ（配列番号４）及びＰＨ９Ｌ３＿ＶＬ（配列番号３）における置換のために選択されるＣＤＲ残基の概要。Ｃｙｓで置換された残基は、太字で下線が引かれている。
【図３】化合物１（配列番号２）の構造を示す。
【図４】ＤＩＯマウスにおける化合物１の薬物動態。
【図５】カニクイザルにおける化合物１の薬物動態。
【図６】化合物１：急性投与で処置したＤＩＯマウスにおける食物摂取。
【図７】化合物１：急性投与で処理したＤＩＯマウスにおける体重減少。
【図８】化合物１：慢性投与で処置したＤＩＯマウスにおける食物摂取。
【図９】化合物１：慢性投与で処置したＤＩＯマウスにおける体重減少。
【図１０】本発明の一実施形態によるモノクローナル抗体オキシントモジュリン（ｍＡｂ－ＯＸＭ）化合物を生成するための反応スキームを示す。上の反応は、ｍＡｂ（例えば、ＭＳＣＢ９７）のＣｙｓ１０２におけるジスルフィドの還元である。下の反応は、還元ｍＡｂとＯＸＭペプチド変異体とのコンジュゲートである。Ｒは、システイン又はグルタチオンである。ＭＳＣＢ９７の重鎖上のＣｙｓ１０２は、それらの単一の文字コードとして、フランキングアミノ酸と共に示されている。ＯＸＭは、ペプチド変異体のアミノ酸部分を指す。Ａｉｂ２、Ｌｙｓ３０、及びブロモアセチル化分散ポリエチレングリコール（ｄＰＥＧ）１２スペーサーが示されている。ｍＡｂのＨｉｓ１は、単一の文字コードとして示されている。
【図１１】化合物２（配列番号２７）の構造を示す。
【図１２】１６８時間にわたるヒト血漿中の化合物２の機能的安定性を示すグラフを示す。ＯＸＭペプチドアナログｍＡｂコンジュゲート化合物２▲、対照１（ヒト血漿エクスビボにおいて安定であることが予め実証されたもの）◆、対照２（ヒト血漿エクスビボにおいて不安定であることが予め実証されたもの）●及び〇、並びに、追加のＯＸＭペプチドアナログｍＡｂコンジュゲート化合物３（ｍＡｂと、Ｈ－Ａｉｂ－ＱＧＴＦＴＳＤＹＳＫＹＬＤＥＲＲＡＲＤＦＶＥＷＬＬＮＫ－（ＣＯＣＨ$_2$（ＯＣＨ$_2$ＣＨ$_2$）$_{12}$ＮＨＣＯＣＨ$_2$Ｂｒ）－ＮＨ$_2$とのコンジュゲート（配列番号２５））
【００１６】

及び化合物４（ｍＡｂと、Ｈ－Ａｉｂ－ＱＧＴＦＴＳＤＹＳＫＹＬＤＥＲＲＡＲＤＦＶＥＷＬＬＮＴＫ－（ＣＯＣＨ$_2$ＣＨ$_2$（ＯＣＨ$_2$ＣＨ$_2$）$_{12}$ＮＨＣＯＣＨ$_2$Ｂｒ）－ＮＨ$_2$（配列番号２６））とのコンジュゲート）▼を、Ｘ軸上の時間（ｈｒ）にわたって、時間ゼロ（ｔ＝０）に対して正規化された残りパーセント。
【図１３】１６８時間にわたるサル血漿中の化合物２の機能的安定性を示すグラフを示す。化合物２▲、対照１（ヒト血漿エクスビボにおいて安定であることが予め実証されたもの）◆、対照２（ヒト血漿エクスビボにおいて不安定であることが予め実証されたもの）●及び〇、並びに、追加のＯＸＭペプチドアナログｍＡｂコンジュゲート化合物３
【００１７】

及び化合物４▼を、Ｘ軸上の時間（ｈｒ）にわたって、時間ゼロ（ｔ＝０）に対して正規化された残りパーセント。

【図１４】化合物２で処理したカニクイザルにおける食物摂取の％変化を示すグラフを示す。
【図１５】化合物２で処理したカニクイザルにおける体重の％変化を示すグラフを示す。
【発明を実施するための形態】
【００１８】
発明の背景において、また、明細書全体を通じて各種刊行物、論文及び特許を引用又は記載する。これら参照文献のそれぞれをその全容において参照により本明細書に援用するものである。本明細書に含まれる文書、操作、材料、装置、物品などの考察は、本発明のコンテキストを与えるためのものである。かかる考察は、これらの事物のいずれか又は全てが、開示又は特許請求されるいずれかの発明に対する先行技術の一部を構成することを容認するものではない。
【００１９】
特に規定のない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する分野の当業者に一般的に理解されるのと同じ意味を有する。そうでない場合、本明細書で使用される特定の用語は、本明細書に示される意味を有するものである。
【００２０】
本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される単数形「ａ」、「ａｎ」及び「ｔｈｅ」は、特に文脈上明らかでない限り、複数の指示対象物を含むことに留意しなければならない。
【００２１】
特に断らない限り、本明細書に記載される濃度又は濃度範囲などのあらゆる数値は、全ての場合において、「約」なる語によって修飾されているものとして理解されるべきである。したがって、数値は一般的に、記載される値の±１０％を含む。例えば、１ｍｇ／ｍＬの濃度は０．９ｍｇ／ｍＬ～１．１ｍｇ／ｍＬを含む。同様に、１％～１０％（ｗ／ｖ）の濃度範囲は０．９％（ｗ／ｖ）～１１％（ｗ／ｖ）を含む。本明細書で使用する場合、数値範囲の使用は、文脈上そうでない旨が明確に示されない限り、その範囲内の整数及び値の分数を含む、全ての可能な部分範囲、その範囲内の全ての個々の数値を明示的に含む。
【００２２】
特に指示がない限り、一連の要素に先行する「少なくとも」という用語は、一連の全ての要素を指すと理解されるべきである。当業者であれば、単なる通常の実験手順を使用するだけで、本明細書に記載した本発明の特定の手順に対して多くの同等物を認識するか、又は確認することができよう。このような同等物は、本発明に包含されることが意図される。
【００２３】
本明細書で使用されるとき、用語「備える（comprises）、「備える（comprising）」、「含む（includes）」、「含む（including）」、「有する（has）」、「有する（having}」、「含有する（contains）」、又は「含有する（containing）」あるいはこれらの任意の他の変形形態は、述べられている整数又は整数群を含むことが意図されるが、これら以外の他の整数又は整数群を除外するものではなく、非排他的又は非制限的であることが意図されることが理解されよう。例えば、要素のリストを備える組成物、混合物、プロセス、方法、物品、又は装置は、必ずしもそれらの要素のみに限定されるものではなく、明示的に列挙されない他の要素、あるいは、そのような組成物、混合物、プロセス、方法、物品、又は装置に本来存在しない他の要素を含んでもよい。更に、明示的に反対に明記されない限り、「又は」は包括的な「又は」を指すものであり、排他的な「又は」を指すものではない。例えば、条件Ａ又はＢは、Ａが真であり（又は存在し）及びＢが偽である（又は存在しない）場合、Ａが偽であり（又は存在せず）かつＢが真である（又は存在する）場合、並びにＡ及びＢの両方が真である（又は存在する）場合、のいずれか一つによって充足される。
【００２４】

好ましい発明の構成要素の寸法又は特性に言及するときに本明細書で使用される「約」、「およそ」、「概ね」、「実質的に」などの用語は、記載された寸法／特性が厳密な境界又はパラメータではなく、当業者には理解されるように、機能的に同じ又は類似の、それらからのわずかな変化を除外しないことを示すことが理解されよう。最低限、数値パラメータを含むそのような参照は、当該技術分野で認められた数学的原理及び工業的原理（例えば、四捨五入、測定誤差又は他の系統的誤差、製造公差など）を使用して、最小有効桁を変化させない変形形態を含む。

【００２５】

「同一の」又は「同一性」という用語は、２つ以上の核酸又はポリペプチド配列（例えば、環状ＰＹＹ$_{3\sim36}$ポリペプチド配列、オキシントモジュリンポリペプチド配列、抗体軽鎖又は重鎖配列）の文脈において、本開示の見地から当該技術分野において既知の方法を使用して、配列比較アルゴリズムのうちの１つを使用して測定したとき、又は、目視検査によって、最大限対応するよう比較及び整列させたときに、同一であるか、又は同一であるアミノ酸残基又はヌクレオチドの指定された割合を有する、２つ以上の配列又は部分配列を指す。

【００２６】

配列比較のために、典型的には、１つの配列は、試験配列を比較する参照配列として機能する。配列比較アルゴリズムを使用するとき、試験及び参照配列がコンピュータに入力されると、必要に応じて、部分配列座標が指定され、配列アルゴリズムプログラムパラメータが指定される。次いで、配列比較アルゴリズムは、指定されたプログラムパラメータに基づいて、参照配列に対する試験配列の配列同一性パーセントを計算する。

【００２７】

比較のための配列の最適なアライメントは、例えば、Ｓｍｉｔｈ ＆ Ｗａｔｅｒｍａｎ，Ａｄｖ．Ａｐｐｌ．Ｍａｔｈ．２：４８２（１９８１）の局所的相同性アルゴリズム、Ｎｅｅｄｌｅｍａｎ ＆ Ｗｕｎｓｃｈ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４８：４４３（１９７０）の相同性アライメントアルゴリズム、Ｐｅａｒｓｏｎ ＆ Ｌｉｐｍａｎ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８５：２４４４（１９８８）の類似性検索方法、これらのアルゴリズムのコンピュータ化実装（Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｓｏｆｔｗａｒｅ Ｐａｃｋａｇｅ（Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ，５７５ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｄｒ．，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）中のＧＡＰ、ＢＥＳＴＦＩＴ、ＦＡＳＴＡ、及びＴＦＡＳＴＡ）、視覚的検査（一般に、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｆ．Ｍ．Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．，ｅｄｓ．，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ（Ｇｒｅｅｎｅ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ，Ｉｎｃ．とＪｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．のジョイントベンチャー（１９９５ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ）（Ａｕｓｕｂｅｌ）を参照）によって、実施することができる。

【００２８】

配列同一性パーセント及び配列類似性を決定するのに好適なアルゴリズムの例は、ＢＬＡＳＴ及びＢＬＡＳＴ ２．０アルゴリズムであり、これらはそれぞれ、Ａｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ．（１９９０）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２１５：４０３～４１０及びＡｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ．（１９９７）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２５：３３８９～３４０２に記載されている。ＢＬＡＳＴ分析を行うソフトウェアは、国立バイオテクノロジー情報センターを介して公的に入手可能である。

【００２９】

２つの核酸配列又はポリペプチドが実質的に同一であることの更なる指標は、以下に記載されるように、第１の核酸によりコードされるポリペプチドが、第２の核酸によりコードされるポリペプチドと免疫学的に交差反応することである。したがって、ポリペプチドは典型的には、例えば、第２のポリペプチドと実質的に同一であり、このとき、２つのペプチドが保存的置換のみで異なっている。２つの核酸配列が実質的に同一である別の指標は、以下に記載されるように、厳密な条件下で２つの分子が互いにハイブリダイズするこ

とである。
【００３０】
本明細書で使用されるとき、「対象」は、任意の動物、好ましくは哺乳動物、最も好ましくはヒトを意味する。本明細書で使用するところの「哺乳動物」なる用語は、あらゆる哺乳動物を包含する。哺乳動物の例としては、これらに限定されるものではないが、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ネコ、イヌ、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、サル、ヒトが挙げられ、より好ましくはヒトが挙げられる。
【００３１】
本発明の方法に関する用語「投与」は、本発明のコンジュゲート、又はその形成物、組成物若しくは薬剤を使用することにより、本明細書に記載しているような症候群、障害又は疾患を、治療学的又は予防学的に予防、処置又は軽減するための方法を意味する。このような方法は、有効量の当該コンジュゲート、コンジュゲートの形成物、組成物若しくは薬剤を、治療過程中の異なる時点で、又は併用形式で同時に、投与することを含む。本発明の方法は、既知の治療的処置レジメンを全て包含するものとして理解されるものである。
【００３２】
用語「有効量」は、研究者、獣医、医師、又はその他の臨床医が探求している、組織系、動物又はヒトにおいて生物学的又は医学的反応（治療される症候群、障害又は疾患、あるいは、治療される症候群、障害又は疾患の症状を、予防する、治療する又は寛解させることを含む）を引き出す活性コンジュゲート又は薬剤の量を意味する。
【００３３】
本明細書で使用されるとき、用語「組成物」は、特定の成分を特定の量で含む生成物、並びに、直接的又は間接的に特定の成分の特定の量の組み合わせから生じる任意の生成物を包含するものとする。
【００３４】
本明細書で使用されるとき、用語「結合された」は、２つ以上の物体を合わせて接合又は接続することを指す。化学化合物又は生物学的化合物を指す場合、結合とは、２つ以上の化学化合物又は生物学的化合物間の共有結合を指すことができる。非限定的な例として、本発明の抗体は、所望のペプチドと結合して、抗体結合ペプチドを形成することができる。抗体結合ペプチドは、抗体をペプチドにコンジュゲートするように設計された特定の化学反応によって形成することができる。特定の実施形態では、本発明の抗体は、リンカーを介して本発明のペプチドと共有結合することができる。リンカーは、例えば、最初に抗体又はペプチドに共有結合され、次いでペプチド又は抗体に共有結合され得る。
【００３５】
本明細書で使用されるとき、用語「リンカー」は、ペプチドを抗体に共有結合させる共有結合鎖又は原子鎖を含む化学モジュールを指す。リンカーとしては、例えば、ペプチドリンカー、炭化水素リンカー、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）リンカー、ポリプロピレングリコール（ＰＰＧ）リンカー、多糖類リンカー、ポリエステルリンカー、ＰＥＧ及び組み込み複素環からなるハイブリッドリンカー、及び炭化水素鎖を挙げることができるが、これらに限定されない。ＰＥＧリンカーは、例えば、２～２４個のＰＥＧ単位を含むことができる。
【００３６】
本明細書で使用されるとき、用語「コンジュゲート」は、薬学的活性部分に共有結合した抗体又はそのフラグメントを指す。「コンジュゲートされた」という用語は、本発明の抗体又はそのフラグメントが、直接的に又はリンカーを介して間接的に、薬学的活性部分（好ましくは治療用ペプチド）に共有結合で連結されている又は共有結合で接続されていることを指す。非限定的な例として、この抗体は、本発明のモノクローナル抗体であってもよく、この薬学的活性部分は、環状ＰＹＹ、オキシントモジュリンペプチド、又は目的の任意の他の治療用ペプチドなどの、治療用ペプチドであり得る。また、この薬学的活性部分は、非ペプチド有機部分（すなわち、「小分子」）であってもよい。本開示では、本発明の一実施形態による抗体又はその抗原結合フラグメントに関して、語句「抗体又はそ

の抗原結合フラグメントと、それにコンジュゲートされた薬学的活性部分（又は治療用ペプチド）とを含むコンジュゲート」は、薬学的活性部分（又は治療用ペプチド）にコンジュゲートされた「抗体又はその抗原結合フラグメント」と互換的に使用される。

【００３７】

本明細書に記載されるペプチド配列は、通常の慣習に従って記載され、ペプチドのＮ末端領域は左にあり、Ｃ末端領域は右にある。アミノ酸の異性体形態は既知であるが、別途明示的に示されていない限り、Ｌ型アミノ酸である。

【００３８】

抗体

一般的な一態様において、本発明は、非標的化されるように操作されており、かつ薬学的活性部分（例えば治療用ペプチド（例えば、環状ＰＹＹペプチド、オキシントモジュリン又は変異体ペプチドなど））を、部位特異的な方法で、化学的にコンジュゲート（すなわち結合）するために使用することができるシステイン残基を含有する新規抗体に関し、これによりこの抗体結合ペプチドは、ペプチド単独と比較して延長／増加した半減期を有する。本明細書で使用されるとき、抗体の文脈における「非標的化」という用語は、インビボで何らかの標的に特異的に結合しない抗体を指す。本明細書で使用されるとき、「標的に特異的に結合する」抗体とは、標的抗原に対し、ＫＤが1×10^{-7}Ｍ以下、好ましくは1×10^{-8}Ｍ以下、より好ましくは5×10^{-9}Ｍ以下、1×10^{-9}Ｍ以下、5×10^{-10}Ｍ以下、又は1×10^{-10}Ｍ以下で結合する抗体を指す。用語「ＫＤ」は、解離定数を指し、これはＫｄ対Ｋａの比（すなわち、Ｋｄ／Ｋａ）から得られ、モル濃度（Ｍ）として表される。抗体のＫＤ値は、本開示を考慮して当該技術分野における方法を用いて測定することができる。例えば、抗体のＫＤは、例えばＢｉａｃｏｒｅ（登録商標）システムなどのバイオセンサーシステムを使用することによって、又はＯｃｔｅｔ　ＲＥＤ９６システムなどのバイオレイヤー干渉法を使用することなどによって、表面プラズモン共鳴を使用することによって測定することができる。抗体のＫＤの値が小さいほど、抗体が標的抗原に結合する親和性が高い。

【００３９】

モノクローナル抗体（完全又はそのフラグメント）は、半減期延長部分として使用することができる。モノクローナル抗体は、インビボでの使用に利用され、特徴付けが行われている、十分に研究されているタンパク質であり、したがって、インビボでの長期化した半減期を実現するメカニズムと、インビボでの除去のためのメカニズムは、よく理解されている。更に、モノクローナル抗体の２つの「アーム」の空間的分離及び提示は、治療部分（すなわち、治療用ペプチド）の有効な二価性提供に有利であり得る。毒素又は他の小分子薬物がモノクローナル抗体に化学的に連結されている治療薬が開発されているが、典型的には、特定の抗原に結合し、抗体－薬物コンジュゲートを対象の組織／細胞（これは抗原を優先的に発現している）に標的化するモノクローナル抗体を利用し、典型的には、この薬物／小分子は、抗体の抗原結合に影響を及ぼさない様式で抗体に結合される。

【００４０】

治療用ペプチド－ｍＡｂコンジュゲートについては、半減期延長モノクローナル抗体による抗原特異的結合は望ましくない。このため、何らかの標的に特異的に結合することが期待されない重鎖（ＨＣ）及び軽鎖（ＬＣ）可変（Ｖ）ドメイン対が、本発明の結合可能な非標的化モノクローナル抗体を調製するために使用される。結合可能な非標的化モノクローナル抗体を得るためには、選択された非標的化抗体の相補性決定領域（ＣＤＲ）のうちの１つに、システイン残基を操作して組み入れる。薬学的活性部分（例えば、治療用ペプチド／化合物）は、適切な化学的部分を含有し、これにより、薬学的活性部分と、非標的化モノクローナル抗体の操作されたシステイン残基とのコンジュゲートを可能にすることができる。本発明の一実施形態によるペプチド－モノクローナル抗体の一般的なコンジュゲート戦略を図１に示す。

【００４１】

本明細書で使用されるとき、用語「抗体」は、広義の意味を有し、非ヒト（例えばマウ

ス、ラット）モノクローナル抗体、ヒトモノクローナル抗体、ヒト適合化されたモノクローナル抗体、ヒト化モノクローナル抗体、及びキメラモノクローナル抗体、抗体フラグメント、二重特異性又は多重特異性抗体、二量体抗体、四量体抗体、又は多量体抗体、並びに一本鎖抗体を包含する。

【００４２】

いずれの脊椎動物種の抗体軽鎖も、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて２つの明確に異なるタイプ、すなわちカッパ（κ）及びラムダ（λ）のうちの一方に割り当てることができる。したがって、本発明の抗体は、κ又はλ軽鎖定常ドメインを含有することができる。特定の実施形態によれば、本発明の抗体は、例えば、マウス又はヒト抗体由来の重鎖及び／又は軽鎖定常領域を含む。重鎖及び軽鎖定常ドメインに加えて、抗体は、軽鎖可変領域及び重鎖可変領域からなる抗原結合領域を含み、これらの領域のそれぞれは３つのドメイン（すなわち、相補性決定領域１～３（ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３））を含む。軽鎖可変領域ドメインは、代替的にＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、及びＬＣＤＲ３と称され、重鎖可変領域ドメインは、代替的にＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、及びＨＣＤＲ３と称される。

【００４３】

免疫グロブリンは、重鎖定常ドメインのアミノ酸配列に応じて５つの主なクラス、即ち、ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ及びＩｇＭに分類することができる。ＩｇＧは、５種類の免疫グロブリンの中で最も安定であり、ヒトにおいて約２３日間の血清半減期を有する。ＩｇＡ及びＩｇＧは、アイソタイプＩｇＡ$_1$、ＩｇＡ$_2$、ＩｇＧ$_1$、ＩｇＧ$_2$、ＩｇＧ$_3$、及びＩｇＧ$_4$に更に下位分類される。４つのＩｇＧ下位分類のそれぞれは、エフェクター機能として知られる異なる生物学的機能を有する。これらのエフェクター機能は、一般に、Ｆｃ受容体（ＦｃγＲ）との相互作用によって、又はＣ１ｑの結合及び補体の固定によって、媒介される。ＦｃγＲへの結合は、抗体依存性細胞媒介性細胞溶解をもたらし得る一方、補体因子への結合は、補体媒介性細胞溶解をもたらし得る。治療用ペプチドの半減期を延長する能力に利用される本発明の抗体は、エフェクター機能を有さないか又は最小限のエフェクター機能を有するが、ＦｃＲｎに結合する能力を保持し、この結合は、抗体がインビボ半減期の延長を有する主要な手段であり得る。

【００４４】

一実施形態では、本発明は、完全ヒトＩｇ生殖系列Ｖ遺伝子配列を有する軽鎖可変領域と、配列番号１８のアミノ酸配列を有するＨＣＤＲ３を除く完全ヒトＩｇ生殖系列Ｖ遺伝子配列を有する重鎖可変領域とを含む、単離された抗体又はその抗原結合フラグメントに関し、この抗体又はその抗原結合フラグメントは、インビボで任意のヒト抗原に特異的に結合しない。特定の実施形態では、本発明は、完全ヒトＩｇ生殖系列Ｖ遺伝子配列を有する軽鎖可変領域と、配列番号１８のアミノ酸配列を有するＨＣＤＲ３を除く完全ヒトＩｇ生殖系列Ｖ遺伝子配列を有する重鎖可変領域とを含む、単離された抗体又はその抗原結合フラグメントに関し、この抗体又はその抗原結合フラグメントは、インビボで任意のヒト抗原に特異的に結合せず、この単離された抗体又はその抗原結合フラグメントは、薬学的活性部分（例えば、環状ＰＹＹペプチド、オキシントモジュリンペプチド、及び／又は本発明の治療用ペプチド）に結合される。

【００４５】

本明細書で使用されるとき、用語「抗原結合フラグメント」は、例えば、二重特異性抗体、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆｖフラグメント、ジスルフィド安定化Ｆｖフラグメント（ｄｓＦｖ）、（ｄｓＦｖ）$_2$、二重特異性ｄｓＦｖ（ｄｓＦｖ－ｄｓＦｖ’）、ジスルフィド安定化二重特異性抗体（ｄｓ二重特異性抗体）、単鎖抗体分子（ｓｃＦｖ）、単一ドメイン抗体（ｓｄａｂ）、ｓｃＦｖ二量体（二価二重特異性抗体）、１つ又は２つ以上のＣＤＲを含む抗体の一部から形成される多重特異性抗体、ラクダ化（camelized）単一ドメイン抗体、ナノボディ、ドメイン抗体、二価ドメイン抗体、あるいは、抗原に結合するが完全な抗体構造を含まない任意の他の抗体フラグメントなどの、抗体フラグメントを指す。抗原結合フラグメントは、親抗体又は親抗体フラグメントが結合する同じ抗原に結合

することができる。特定の実施形態によれば、抗原結合フラグメントは、軽鎖可変領域、軽鎖定常領域、及びＦｄセグメント（すなわち、ＦａｂフラグメントにＦａｂ含まれる重鎖の部分）を含む。他の特定の実施形態によれば、抗原結合フラグメントは、Ｆａｂ及びＦ（ａｂ’）を含む。

【００４６】

本明細書で使用されるとき、用語「単鎖抗体」は、約１５～約２０個のアミノ酸の短いペプチドで結合された重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む、この分野における従来の単鎖抗体を指す。本明細書で使用されるとき、用語「単一ドメイン抗体」は、重鎖可変領域及び重鎖定常領域を含む、又は重鎖可変領域のみを含む、この分野における従来の単一ドメイン抗体を指す。

【００４７】

「単離された抗体又は抗体フラグメント」というフレーズは、異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含まない抗体又は抗体フラグメントを指す（例えば、ある標的抗原に特異的に結合する単離された抗体は、その標的抗原に特異的に結合しない抗体を実質的に含まない）。更に、単離された抗体又は抗体フラグメントは、他の細胞物質及び／又は化学物質を実質的に含まない場合がある。

【００４８】

抗体可変領域は、３つの「抗原結合部位」で隔てられた「フレームワーク」領域からなる。抗原結合部位は、様々な用語を用いて定義されている。（ｉ）相補性決定領域（ＣＤＲ）、これは、配列特異性に基づいてＶＨ内に３個（ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３）及びＶＬ内に３個（ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、ＬＣＤＲ３）が存在する（Ｗｕ ａｎｄ Ｋａｂａｔ，Ｊ Ｅｘｐ Ｍｅｄ １３２：２１１～５０，１９７０、Ｋａｂａｔら、Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ、第５版、Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，Ｍｄ．，１９９１）。（ｉｉ）「超可変領域」、「ＨＶＲ」、又は「ＨＶ」、ＶＨ内の３つ（Ｈ１、Ｈ２、Ｈ３）及びＶＬ内の３つ（Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３）は、Ｃｈｏｔｈｉａ ａｎｄ Ｌｅｓｋ（Ｃｈｏｔｈｉａ ａｎｄ Ｌｅｓｋ，Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ １９６：９０１～１７，１９８７）により定義される構造において超可変性である、抗体可変ドメインの領域を指す。他の用語には、「ＩＭＧＴ－ＣＤＲ」（Ｌｅｆｒａｎｃ ｅｔ ａｌ．，Ｄｅｖ Ｃｏｍｐａｒａｔ Ｉｍｍｕｎｏｌ ２７：５５～７７，２００３）及び「特異性決定残基使用」（ＳＤＲＵ）（Ａｌｍａｇｒｏ Ｍｏｌ Ｒｅｃｏｇｎｉｔ １７：１３２～４３，２００４）が含まれる。Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ ＩｍＭｕｎｏＧｅｎｅＴｉｃｓ（ＩＭＧＴ）データベース（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ＿ｍｇｔ＿ｏｒｇ）は、抗原結合部位についての標準的番号及び定義を提供する。ＣＤＲ、ＨＶ及びＩＭＧＴの記述間の対応については、Ｌｅｆｒａｎｃ ｅｔ ａｌ．，Ｄｅｖ．Ｃｏｍｐａｒａｔ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２７：５５～７７，２００３に記述されている。

【００４９】

「フレームワーク」又は「フレームワーク配列」は、抗原結合部位として定義されたものを除く、可変領域の残りの配列である。抗原結合部位は上記のような様々な用語によって定義され得るため、フレームワークの正確なアミノ酸配列は抗原結合部位がどのように定義されたかによって決まる。

【００５０】

本発明の一実施形態では、単離された抗体又はその抗原結合フラグメントは、それぞれ配列番号１９、配列番号２０及び配列番号２１のアミノ酸配列のＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、及びＬＣＤＲ３を有する軽鎖可変領域と、それぞれ配列番号１６、配列番号１７及び配列番号１８のアミノ酸配列のＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、及びＨＣＤＲ３を有する重鎖可変領域とを含む。

【００５１】

別の実施形態では、単離された抗体は、ヒトＩｇＧ４　Ｆｃ領域由来のＦｃ領域を更に

含む。ヒトＩｇＧ４　Ｆｃ領域は、他のＩｇＧサブタイプと比較して、ＦｃγＲ及び補体因子に結合する能力が低下している。好ましくは、Ｆｃ領域は、エフェクター機能を排除する置換を有するヒトＩｇＧ４　Ｆｃ領域を含む。したがって、単離された抗体は、残基２３３におけるグルタミン酸のプロリンでの置換、残基２３４におけるフェニルアラニンのアラニン又はバリンでの置換、並びに残基２３５におけるロイシンのアラニン又はグルタミン酸での置換のうち、１つ又は２つ以上を含む改変ヒトＩｇＧ４　Ｆｃ領域を有するＦｃ領域を更に含む（ＥＵ　ｎｕｍｂｅｒｉｎｇ、Ｋａｂａｔ、Ｅ．Ａ．ｅｔ　ａｌ．（１９９１）Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｔｅｒｅｓｔ、５ｔｈ　Ｅｄ．Ｕ．Ｓ．Ｄｅｐｔ．ｏｆ　Ｈｅａｌｔｈ　ａｎｄ　Ｈｕｍａｎ　Ｓｅｒｖｉｃｅｓ、Ｂｅｔｈｅｓｄａ、Ｍｄ．、ＮＩＨ　Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ　ｎｏ．９１－３２４２）。残基２９７におけるＡｓｎをＡｌａで置換することによって、ＩｇＧ４　Ｆｃ領域内のＮ結合型グリコシル化部位を除去することは、残留エフェクター活性が排除されることを確実にするもう一つの方法である。

【００５２】

好ましくは、本発明の抗体は、ジスルフィド結合及び様々な非共有相互作用によって一緒に結合された二量体として存在する。したがって、本発明の抗体に有用なＦｃ部分は、位置２２８（ＥＵ番号）におけるセリンからプロリンへなどの置換を含有するヒトＩｇＧ４　Ｆｃ領域であり得、これは重鎖二量体形成を安定させ、半ＩｇＧ４　Ｆｃ鎖の形成を防止する。

【００５３】

別の一実施形態では、重鎖のＣ末端Ｌｙｓ残基は、組み換えにより産生されたモノクローナル抗体に一般的に見られるように、除去される。

【００５４】

「ヒト抗体」とは、フレームワーク及び抗原結合部位の両方がヒト起源の配列に由来する重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を有する抗体を指す。抗体が定常領域を含む場合、定常領域もヒト起源の配列に由来する。

【００５５】

ヒト抗体は、抗体の可変領域がヒト生殖系列免疫グロブリン又は再編成された免疫グロブリン遺伝子を使用する系から得られた場合のヒト起源の配列に「由来する」重鎖可変領域又は軽鎖可変領域を含む。そのような系は、ファージ上に提示されたヒト免疫グロブリン遺伝子ライブラリ、及び本明細書に記載されるヒト免疫グロブリン遺伝子座を保有するマウスなど、トランスジェニックの非ヒト動物を含む。「ヒト抗体」は、例えば天然に存在する体細胞突然変異、又はフレームワーク若しくは抗原結合部位への意図的な置換の導入により、ヒト生殖系列又は再編成された免疫グロブリン配列と比較した場合に、アミノ酸の相違を含み得る。典型的には、ヒト抗体は、アミノ酸配列において、ヒト生殖系列又は再編成された免疫グロブリン遺伝子によってコードされるアミノ酸配列と少なくとも約８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％同一である。一部の場合では、「ヒト抗体」は、例えばＫｎａｐｐｉｋら（Ｊ　Ｍｏｌ　Ｂｉｏｌ　２９６：５７～８６、２０００年）に記載されるヒトフレームワーク配列分析から得られたコンセンサスフレームワーク配列、又は例えばＳｈｉら（Ｊ　Ｍｏｌ　Ｂｉｏｌ　３９７：３８５～９６、２０１０年及び国際公開第２００９／０８５４６２号）に記載される、ファージ上に提示されたヒト免疫グロブリン遺伝子ライブラリに組み込まれた合成ＨＣＤＲ３を含有し得る。抗原結合部位が非ヒト種に由来する抗体は、「ヒト抗体」の定義には含まれない。

【００５６】

本発明の実施形態による単離された抗体は、合成であり得る。この抗体は、ヒト免疫グロブリン配列に由来するが、ファージ提示組み込み合成ＣＤＲ及び／若しくは合成フレームワークなどの系を用いて生成されることができ、又は抗体特性を改善するためにインビトロ突然変異誘発を受けることができ、インビボのヒト抗体生殖系列レパートリー内に天

然に存在しない抗体をもたらす。

【００５７】

本明細書で使用されるとき、用語「組換え抗体」は、ヒト免疫グロブリン遺伝子のトランスジェニック若しくは染色体導入動物（例えばマウス）又はそれから調製されたハイブリドーマから単離された抗体、抗体を発現するように形質転換された宿主細胞から単離された抗体、組換えコンビナトリアル抗体ライブラリから単離された抗体、並びにヒト免疫グロブリン遺伝子配列を他のＤＮＡ配列にスプライスすることを伴う任意の他の手段により調製、発現、作製、又は単離された抗体、あるいはＦａｂアーム交換を用いてインビトロで生成される抗体など、組換え手段により調製、発現、作製、又は単離される全ての抗体を含む。

【００５８】

本明細書で使用されるとき、用語「モノクローナル抗体」は、単一分子組成物の抗体分子の調製物を指す。モノクローナル抗体組成物は、特定のエピトープに対する単一の結合特異性及び親和性を示し、又は二重特異性モノクローナル抗体の場合には、２つの別個のエピトープに対する二重結合特異性を示す。本発明のモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法、ファージディスプレイ技術、単一リンパ球遺伝子クローニング技術、又は組換えＤＮＡ法によって作製することができる。例えば、モノクローナル抗体は、ヒト重鎖導入遺伝子及び軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有する、トランスジェニック非ヒト動物（例えば、トランスジェニックマウス又はラット）から得られたＢ細胞を含む、ハイブリドーマによって産生することができる。

【００５９】

特定の実施形態では、用語「ｍＡｂ」は、モノクローナル抗体を指す。一実施形態では、ｍＡｂは、配列番号１２を含む重鎖可変領域（ＶＨ）配列と、配列番号１４を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）配列とを有する。特定の実施形態では、ｍＡｂは、配列番号１３を含む重鎖（ＨＣ）配列と、配列番号１５を含む軽鎖（ＬＣ）配列とを有する完全ヒトモノクローナル抗体である。特定の実施形態では、配列番号１３の位置４４６におけるリジン残基は、任意選択的に欠落している。

【００６０】

本明細書で使用されるとき、用語「キメラ抗体」は、免疫グロブリン分子のアミノ酸配列が２つ以上の種に由来する抗体を指す。軽鎖及び重鎖の両方の可変領域は、多くの場合、所望の特異性、親和性、及び能力を有する哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギなど）の１種に由来する抗体の可変領域に相当し、その種における免疫反応の誘発を避けるために、その定常領域は、別の種の哺乳動物（例えば、ヒト）に由来する抗体の配列に対応している。

【００６１】

本明細書で使用されるとき、用語「多重特異性抗体」は、複数の免疫グロブリン可変ドメイン配列を含む抗体を指し、この複数のうち第１の免疫グロブリン可変ドメイン配列は、第１のエピトープに対する結合特異性を有するか、又は任意の既知の結合特異性を欠く生殖細胞系列配列を含み、この複数のうち第２の免疫グロブリン可変ドメイン配列は、第２のエピトープに対する結合特異性を有するか、又は任意の既知の結合特異性を欠く生殖系列配列を含み、この第１及び／又は第２の免疫グロブリン可変ドメインは、任意選択的に、コンジュゲートされた薬学的活性部分（例えば、治療用ペプチド）を含む。一実施形態では、第１及び第２のエピトープは、同じ抗原上、例えば、同じタンパク質（又は多量体タンパク質のサブユニット）上にある。一実施形態では、第１及び第２のエピトープは、重複しているか、又は実質的に重複している。一実施形態では、第１及び第２のエピトープは、重複していないか、又は実質的に重複していない。一実施形態では、第１及び第２のエピトープは、異なる抗原上、例えば、異なるタンパク質（又は多量体タンパク質の異なるサブユニット）上にある。一実施形態では、第１及び第２の免疫グロブリン可変ドメインは、同一のコンジュゲートされた薬学的活性部分を含む。一実施形態では、第１及び第２の免疫グロブリン可変ドメインは、異なる薬学的活性部分を含む。一実施形態では

、第１の免疫グロブリン可変ドメインのみが、コンジュゲートされた薬学的活性部分を含む。一実施形態では、第２の免疫グロブリン可変ドメインのみが、コンジュゲートされた薬学的活性部分を含む。一実施形態では、多重特異性抗体は、第３、第４、又は第５の免疫グロブリン可変ドメインを含む。一実施形態では、多重特異性抗体は、二重特異性抗体分子、三重特異性抗体、又は四重特異性抗体分子である。

【００６２】

本明細書で使用されるとき、用語「二重特異性抗体」は、２つ以下のエピトープ若しくは２つ以下の抗原に結合する、及び／又は２つのコンジュゲートされた薬学的活性部分（例えば、同じ又は異なる薬学的活性部分）を含む、多重特異性抗体を指す。二重特異性抗体は、第１のエピトープに対する結合特異性を有するか、又は任意の既知の結合特異性を欠く生殖細胞系列配列を含む、第１の免疫グロブリン可変ドメイン配列と、第２のエピトープに対する結合特異性を有するか、又は任意の既知の結合特異性を欠く生殖系列配列を含む、第２の免疫グロブリン可変ドメイン配列とによって特徴付けられ、この第１及び／又は第２の免疫グロブリン可変ドメインは、任意選択的に、コンジュゲートされた薬学的活性部分を含む。一実施形態では、第１及び第２のエピトープは、同じ抗原上、例えば、同じタンパク質（又は多量体タンパク質のサブユニット）上にある。一実施形態では、第１及び第２のエピトープは、重複しているか、又は実質的に重複している。一実施形態では、第１及び第２のエピトープは、異なる抗原上、例えば、異なるタンパク質（又は多量体タンパク質の異なるサブユニット）上にある。一実施形態では、第１及び第２の免疫グロブリン可変ドメインは、同一のコンジュゲートされた薬学的活性部分を含む。一実施形態では、第１及び第２の免疫グロブリン可変ドメインは、異なる薬学的活性部分を含む。一実施形態では、第１の免疫グロブリン可変ドメインのみが、コンジュゲートされた薬学的活性部分を含む。一実施形態では、第２の免疫グロブリン可変ドメインのみが、コンジュゲートされた薬学的活性部分を含む。一実施形態では、二重特異性抗体は、第１の重鎖可変ドメイン配列及び軽鎖可変ドメイン配列（これらは第１のエピトープに対する結合特異性を有するか、又は任意の既知の結合特異性を欠く生殖細胞系列配列を含む）と、第２の重鎖可変ドメイン配列及び軽鎖可変ドメイン配列（これらは第２のエピトープに対する結合特異性を有するか、又は任意の既知の結合特異性を欠く生殖細胞系列配列を含む）とを含み、この第１及び／又は第２の重鎖可変ドメインは、任意選択的に、コンジュゲートされた薬学的活性部分を含む。一実施形態では、第１及び第２の重鎖可変ドメインは、同一のコンジュゲートされた薬学的活性部分を含む。一実施形態では、第１及び第２の重鎖可変ドメインは、異なるコンジュゲートされた薬学的活性部分を含む。一実施形態では、第１の重鎖可変ドメインのみが、コンジュゲートされた薬学的活性部分を含む。一実施形態では、第２の重鎖可変ドメインのみが、コンジュゲートされた薬学的活性部分を含む。

【００６３】

本明細書で使用されるとき、「完全長の抗体」は、２本の完全長の抗体重鎖と２本の完全長の抗体軽鎖とを有する抗体を指す。完全長の抗体重鎖（ＨＣ）は、重鎖可変領域（ＶＨ）及び定常ドメイン（ＣＨ１、ＣＨ２、及びＣＨ３）からなる。完全長の抗体軽鎖（ＬＣ）は、軽鎖可変領域（ＶＬ）及び定常ドメイン（ＣＬ）からなる。完全長の抗体は、一方又は両方の重鎖のいずれかにおいて、Ｃ末端リジン（Ｋ）を欠いていてもよい。

【００６４】

「Ｆａｂアーム」又は「半分子」という用語は、一対の重鎖－軽鎖を意味する。

【００６５】

完全長二重特異性抗体は、例えば、インビトロでの無細胞環境において又は共発現を使用して、異なる特異性を有する２つの抗体半分子のヘテロ二量体形成に好都合になるように各半分子における重鎖ＣＨ３界面に置換を導入することによって、２つの一特異性二価抗体間でのＦａｂアーム交換（又は半分子交換）を使用して生成され得る。Ｆａｂアーム交換反応は、ジスルフィド結合異性化反応及びＣＨ３ドメインの解離－会合の結果である。親単一特異性抗体のヒンジ領域における重鎖ジスルフィド結合は減少する。親単一特異性抗体のうち１つについて生じる遊離システインは、第２の親単一特異性抗体分子のシス

テイン残基と重鎖内ジスルフィド結合を形成し、同時に、親抗体のＣＨ３ドメインは、解離－会合により開放及び再形成する。ＦａｂアームのＣＨ３ドメインは、ホモ二量体形成より好ましいヘテロ二量体形成をするよう操作されてもよい。得られた生成物は、それぞれ異なるエピトープに結合し得る、２つのＦａｂアーム又は半分子を有する二重特異性抗体である。

【００６６】

本明細書で抗体に関して使用されるとき、「ホモ二量体形成」は、同一のＣＨ３アミノ酸配列を有する２本の重鎖の相互作用を指す。本明細書で抗体に関して使用されるとき、「ホモ二量体」は、同一のＣＨ３アミノ酸配列を有する２本の重鎖を有する抗体を指す。

【００６７】

本明細書で抗体に関して使用されるとき、「ヘテロ二量体形成」は、同一でないＣＨ３アミノ酸配列を有する２本の重鎖の相互作用を指す。本明細書で抗体に関して使用されるとき、「ヘテロ二量体」は、同一でないＣＨ３アミノ酸配列を有する２本の重鎖を有する抗体を指す。

【００６８】

「ノブインホール（knob-in-hole）」戦略（例えば、国際公開第２００６／０２８９３６号を参照のこと）を使用して、完全長の二重特異性抗体を生成することができる。簡潔に、ヒトＩｇＧにおけるＣＨ３ドメインの界面を形成する選択されたアミノ酸は、ヘテロ二量体形成を促進するために、ＣＨ３ドメイン相互作用に影響を及ぼす位置において変異され得る。小さな側鎖を有するアミノ酸（ホール）が、第１の抗原に特異的に結合する抗体の重鎖内に導入され、大きな側鎖を有するアミノ酸（ノブ）が、第２の抗原に特異的に結合する抗体の重鎖内に導入される。２つの抗体の共発現後に、ヘテロ二量体が、「ホール」を有する重鎖と「ノブ」を有する重鎖との優先的な相互作用の結果として形成される。ノブ及びホールを形成する例示的なＣＨ３置換の対は、Ｔ３６６Ｙ／Ｆ４０５Ａ、Ｔ３６６Ｗ／Ｆ４０５Ｗ、Ｆ４０５Ｗ／Ｙ４０７Ａ、Ｔ３９４Ｗ／Ｙ４０７Ｔ、Ｔ３９４Ｓ／Ｙ４０７Ａ、Ｔ３６６Ｗ／Ｔ３９４Ｓ、Ｆ４０５Ｗ／Ｔ３９４Ｓ、及びＴ３６６Ｗ／Ｔ３６６Ｓ＿Ｌ３６８Ａ＿Ｙ４０７Ｖである（第１の重鎖の第１のＣＨ３ドメインにおける改変位置／第２の重鎖の第２のＣＨ３ドメインにおける改変位置として表現）。

【００６９】

他の戦略、例えば、あるＣＨ３表面における正に荷電した残基及び第２のＣＨ３表面における負に荷電した残基を置換することによる静電的相互作用を使用する重鎖ヘテロ二量体化の促進が、米国特許出願公開第２０１０／００１５１３３号、同第２００９／０１８２１２７号、同第２０１０／０２８６３７号、又は同第２０１１／０１２３５３２号に記載されたように使用されてもよい。他の戦略では、ヘテロ二量体化は、米国特許出願公開第２０１２／０１４９８７６号又は同第２０１３／０１９５８４９号に記載されているように、以下の置換：Ｌ３５１Ｙ＿Ｆ４０５Ａ＿Ｙ４０７Ｖ／Ｔ３９４Ｗ、Ｔ３６６Ｉ＿Ｋ３９２Ｍ＿Ｔ３９４Ｗ／Ｆ４０５Ａ＿Ｙ４０７Ｖ、Ｔ３６６Ｌ＿Ｋ３９２Ｍ＿Ｔ３９４Ｗ／Ｆ４０５Ａ＿Ｙ４０７Ｖ、Ｌ３５１Ｙ＿Ｙ４０７Ａ／Ｔ３６６Ａ＿Ｋ４０９Ｆ、Ｌ３５１Ｙ＿Ｙ４０７Ａ／Ｔ３６６Ｖ＿Ｋ４０９Ｆ、Ｙ４０７Ａ／Ｔ３６６Ａ＿Ｋ４０９Ｆ、又はＴ３５０Ｖ＿Ｌ３５１Ｙ＿Ｆ４０５Ａ＿Ｙ４０７Ｖ／Ｔ３５０Ｖ＿Ｔ３６６Ｌ＿Ｋ３９２Ｌ＿Ｔ３９４Ｗ（第１の重鎖の第１のＣＨ３ドメインにおける改変位置／第２の重鎖の第２のＣＨ３ドメインにおける改変位置として表す）により促進することができる。

【００７０】

上記された方法に加えて、二重特異性抗体は、国際公開第２０１１／１３１７４６号に記載された方法に従って、インビトロにおいて、無細胞環境下で、２つの単一特異性ホモ二量体抗体のＣＨ３領域中に非対称な変異を導入し、ジスルフィド結合を異性化させる還元条件下において、２つの親単一特異性ホモ二量体抗体から二重特異性ヘテロ二量体抗体を形成することにより生成されてもよい。この方法においては、第１の単一特異性二価抗体及び第２の単一特異性二価抗体は、ヘテロ二量体の安定性を促進する特定の置換をＣＨ３ドメインに有するように遺伝子操作され、これらの抗体は、ヒンジ領域におけるシステ

インがジスルフィド結合を異性化させるのに十分な還元条件下において共にインキュベートされ、それにより、Ｆａｂアーム交換により二重特異性抗体が生成される。インキュベート条件は、最適には、非還元条件に戻され得る。使用され得る例示的な還元剤は、２－メルカプトエチルアミン（２－ＭＥＡ）、ジチオスレイトール（ＤＴＴ）、ジチオエリスリトール（ＤＴＥ）、グルタチオン、トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）、Ｌ－システイン、及びβ－メルカプトエタノールであり、好ましくは、２－メルカプトエチルアミン、ジチオスレイトール、及びトリス（２－カルボキシエチル）ホスフィンからなる群から選択される還元剤である。例えば、少なくとも２０℃の温度において、少なくとも２５ｍＭの２－ＭＥＡの存在下又は少なくとも０．５ｍＭのジチオスレイトールの存在下で、ｐＨ５～８、例えば、ｐＨ７．０又はｐＨ７．４において、少なくとも９０分のインキュベートが使用されてもよい。

【００７１】

本明細書全体を通して、抗体の定常領域におけるアミノ酸残基の番号付けは、特に明示的に指定しない限り、Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，５ｔｈ Ｅｄ．Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，Ｍｄ．（１９９１）に記載されるＥＵインデックスに従って実施される。

【００７２】

コンジュゲート

別の一般的な一態様において、本発明は、薬学的活性部分（例えば合成治療用ペプチド（例えば、環状ＰＹＹペプチド、又はオキシントモジュリン変異体ペプチド））に、部位特異的な方法で、共有結合でコンジュゲートした本発明の抗体を含むコンジュゲートに関し、これによりこの抗体結合ペプチドは、ペプチド単独と比較して延長／増加した半減期を有する。このコンジュゲートは、本明細書に開示される疾患又は障害を予防、治療、又は寛解させるために有用である。本発明は更に、医薬組成物、その調製方法、及びその使用方法に関する。

【００７３】

特定の実施形態では、本発明の抗体は、薬学的活性部分にコンジュゲートされることができる少なくとも１つのシステイン残基置換を含むように修飾され、これにより、薬学的活性部分の半減期を延長／増加させることができる。特定の実施形態では、この少なくとも１つのシステイン残基置換は、抗体の相補性決定領域に含まれる。特定の実施形態では、この少なくとも１つのシステイン残基置換は、重鎖相補性決定領域（ＨＣＤＲ）にある。特定の実施形態では、この少なくとも１つのシステイン残基置換は、ＨＣＤＲ３にあり、このＨＣＤＲ３は、配列番号１８のアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、配列番号１８のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ３を含む抗体は、薬学的活性部分にコンジュゲートされることができる少なくとも１つの追加のシステイン置換を有する。

【００７４】

特定の実施形態では、この薬学的活性部分は、リンカーを含み得る。リンカーは、薬学的活性部分への抗体のコンジュゲートを可能にするように化学的に修飾され得る。リンカーとしては、例えば、ペプチドリンカー、炭化水素リンカー、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）リンカー、ポリプロピレングリコール（ＰＰＧ）リンカー、多糖類リンカー、ポリエステルリンカー、ＰＥＧ及び組み込み複素環からなるハイブリッドリンカー、及び炭化水素鎖を挙げることができるが、これらに限定されない。ＰＥＧリンカーは、例えば、２～２４個のＰＥＧ単位を含むことができる。

【００７５】

特定の実施形態では、本発明のモノクローナル抗体は、対象とする１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、又は６つの薬学的活性部分（例えば、治療用ペプチド）にコンジュゲートされる。好ましい実施形態では、非標的化モノクローナル抗体は、対象とする２つの薬学的活性部分にコンジュゲートされる。対象とする少なくとも２つの薬学的活性部分にモノク

ローナル抗体がコンジュゲートされる特定の実施形態では、この対象とする薬学的活性部分は、同じ薬学的活性部分であってもよく、又は異なる薬学的活性部分であってもよい。

【００７６】

本発明の抗体を本発明の薬学的活性部分とコンジュゲートさせる方法は、当該技術分野において既知である。簡潔に述べると、本発明の抗体を、還元剤（例えば、ＴＣＥＰ（トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン）を用いて還元し、精製し（例えば、タンパク質Ａ吸着又はゲル濾過によって）、薬学的活性部分とコンジュゲートさせることができる（例えば、コンジュゲートを可能にする条件下で凍結乾燥ペプチドを還元抗体に提供することによって）。コンジュゲート反応後、このコンジュゲートは、イオン交換クロマトグラフィー又は疎水性相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）によって、タンパク質Ａ吸着の最終精製工程により精製することができる。特定の実施形態では、本発明の抗体は、精製してから、ＨＩＣ法を利用して還元することができる。コンジュゲート方法のより詳細な説明については、例えば、実施例３及び７、並びにＤｅｎｎｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ　４：１９７～２２４（２０１５）を参照されたい。

【００７７】

本明細書でコンジュゲートに関して使用されるとき、「ホモ二量体形成」は、２つの同一の薬学的活性部分と抗体との相互作用を指す。本明細書でコンジュゲートに関して使用されるとき、「ホモ二量体」は、２つの同一の薬学的活性部分に結合された抗体を指す。

【００７８】

本明細書でコンジュゲートに関して使用されるとき、「ヘテロ二量体形成」は、２つの異なる薬学的活性部分と抗体との相互作用を指す。本明細書でコンジュゲートに関して使用されるとき、「ヘテロ二量体」は、２つの異なる薬学的活性部分に結合された抗体を指す。

【００７９】

環状ＰＹＹペプチド

ＰＹＹ$_{3～36}$は、Ｙ２受容体のアゴニストとして作用し食物摂取を阻害する、遠位腸内のＬ細胞によって分泌される内因性ホルモンである。食欲及び食物摂取の制御における役割、並びに哺乳動物の胃腸管におけるその抗分泌性及び吸収促進効果の役割を考慮すると、ＰＹＹ$_{3～36}$は、肥満及び関連する病態、並びに数多くの胃腸障害において有効であり得る。しかしながら、治療剤としてのＰＹＹ$_{3～36}$自体の治療的有用性は、その迅速な代謝及び短い循環半減期によって制限される。したがって、本発明の抗体は、ＰＹＹ$_{3～36}$、好ましくは修飾ＰＹＹ$_{3～36}$の担体として使用することができ、ＰＹＹ$_{3～36}$ペプチドの半減期を延長し、インビボでのペプチドの代謝を低減する。

【００８０】

本発明の特定の実施形態では、修飾されたＰＹＹ$_{3～36}$ペプチドは、環状ＰＹＹペプチドである。用語「環状ＰＹＹペプチド」、「環状ＰＹＹ$_{3～36}$類似体」、及び「環状ＰＹＹ$_{3～36}$ペプチド類似体」は、互換的に使用することができる。コンジュゲートに使用することができる環状ＰＹＹペプチドの例は、米国特許仮出願第６２／４１３，６１３号（２０１６年１０月２７日出願）、及び米国特許出願第＿＿＿＿＿＿号「Ｃｙｃｌｉｃ　ｐｅｐｔｉｄｅ　ｔｙｒｏｓｉｎｅ　ｔｙｒｏｓｉｎｅ　ｃｏｍｐｏｕｎｄｓ　ａｓ　ｍｏｄｕｌａｔｏｒｓ　ｏｆ　ｎｅｕｒｏｐｅｐｔｉｄｅ　ｒｅｃｅｐｔｏｒｓ」（本出願と同日に出願、代理人整理番号ＰＲＤ３４１１）に記載されており、これら両方の出願の内容はその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【００８１】

本発明の抗体と環状ＰＹＹペプチドとを含むコンジュゲートの例は、米国特許仮出願第６２／４１３，５８６号（２０１６年１０月２７日出願）、及び米国特許出願第＿＿＿＿＿＿号「Ａｎｔｉｂｏｄｙ　ｃｏｕｐｌｅｄ　ｃｙｃｌｉｃ　ｐｅｐｔｉｄｅ　ｔｙｒｏｓｉｎｅ　ｔｙｒｏｓｉｎｅ　ｃｏｍｐｏｕｎｄｓ　ａｓ　ｍｏｄｕｌａｔｏｒｓ　ｏｆ　ｎｅｕｒｏｐｅｐｔｉｄｅ　Ｙ　ｒｅｃｅｐｔｏｒｓ」（本出願と同日に出願、代理人整理番号ＰＲＤ３４３６）に記載されており、これら両方の出願の内容はその全体が参照により本

明細書に組み込まれる。例えば、環状ＰＹＹペプチドでは、環のＮ末端アミノ酸残基が、そのα－アミノ官能基を介して連結基に結合し、これが更に、ＮＴＳＣ－ＰＹＹペプチドの位置３１におけるアミノ酸の側鎖残基に結合する。リジン残基は、更なる誘導体化のための従来の官能基ハンドルを提供するために、ｈＰＹＹ$_{3\sim36}$配列の様々な位置に組み込むことができる。リジン残基は、直接的又は間接的に、モノクローナル抗体に結合されるように修飾され得る。モノクローナル抗体への間接的結合において、リジン残基は、環状ＰＹＹペプチドがモノクローナル抗体に結合することを可能にするリンカーを含むように修飾され得る。当業者には、関連するオルソロガスもそのように効果的に使用することができ、これが本明細書において想到されることが理解されよう。

【００８２】

オキシントモジュリンペプチド

オキシントモジュリン（ＯＸＭ）は、腸内の腸内分泌Ｌ細胞から分泌される３７アミノ酸長ペプチドである。ＧＬＰ－１受容体（ＧＬＰ１Ｒ）及びグルカゴン受容体（ＧＣＧＲ）におけるアゴニスト活性を介して、ＯＸＭは、β－細胞機能を強化し、食物摂取を低減し、エネルギー消費を強化する。これらの相補的機構を介して、ＯＸＭ媒介型の体重減量は、現在市販されているＧＬＰ１Ｒアゴニストと比較して優れている可能性がある。ＯＸＭは、血漿中のコレステロール及びトリグリセリドも低減することができる。ヒトにおけるＯＸＭの半減期は、非常に短く、数分の単位である（Ｓｃｈｊｏｌｄａｇｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．１８（５）：４９９～５０３（１９８８））。したがって、本発明の一実施形態は、オキシントモジュリンに共有結合した本発明の抗体を含むコンジュゲートに関し、これによって、オキシントモジュリンの二重アゴニスト特性と、１週間に１回の投与を達成するのに十分な延長された半減期とを提供する。

【００８３】

ペプチド半減期を延長することは、タンパク質分解に対する感受性に対するＯＸＭペプチドの安定化、及び、血漿クリアランスの低減によって達成される。例えば、ＤＰＰ４によるタンパク質分解は、位置２のセリンをアミノイソ酪酸（Ａｉｂ）に置き換えることによって軽減された。ペプチドの螺旋状トポロジーは、Ｑ２０Ｒ～Ｓ１６Ｅ及びＱ２４Ｅの分岐塩架橋を導入することによって安定化され、メチオニン２７をロイシンに置換することにより、潜在的な酸化性が軽減された。ペプチドの循環寿命は、モノクローナル抗体（ｍＡｂ）の共有結合によって増加した。このような抗体－薬物コンジュゲートは、それらの大きさのおかげで（糸球体濾過を低減し得る）、及び、胎児性Ｆｃ受容体を介した再利用によって、延長された血漿半減期を呈することができる。短いオリゴエチレングリコールスペーサーをｍＡｂとペプチドとの間に介在させて、ペプチドがＧＣＧＲ及びＧＬＰ１Ｒへと、妨げられずにアクセスできるよう確保した。

【００８４】

本発明の実施形態によると、本発明のオキシントモジュリンコンジュゲートは、４つの特性を備える。（Ａ）二重アゴニスト作用：このオキシントモジュリンコンジュゲートは、ＧＬＰ－１及びグルカゴン受容体において二重アゴニスト作用を有する。（Ｂ）受容体バランス：ＧＬＰ１Ｒへの過剰なバイアスは、ＧＣＧＲ標的係合前に、曝露増大時にＧＬＰ－１媒介胃腸有害事象が発生するコンジュゲート体をもたらす可能性があり、ＧＣＧＲへの過剰なバイアスは、血糖効果を軽減する可能性があるが、このオキシントモジュリンコンジュゲートは、ＧＬＰ１Ｒ又はＧＣＧＲのいずれにも過剰な効力バイアスを有さない。（Ｃ）生体分布：このオキシントモジュリンコンジュゲートは、同様の曝露での、末梢ＧＣＧＲと、中心のエネルギー摂取調節ＧＬＰ１Ｒの、標的係合を達成する目的で、ＧＬＰ－１受容体効力（オキシントモジュリン単独と比較して）に対する適度なバイアスを有する。（Ｄ）週１回の投与：このオキシントモジュリンコンジュゲートは、毎週１回、それを必要とする対象に投与可能であることによって、競争力を有する。

【００８５】

他の治療用ペプチド

本明細書では、本明細書に記載されるモノクローナル抗体プラットフォームにコンジュ

ゲートすることができる他のペプチドを含むコンジュゲートも提供される。このペプチドは、例えば、グルカゴン様ペプチド１（ＧＬＰ１）、エキセンジン（エキセナチド）、アミリン（プラムリンタイド）、α－メラノサイト刺激ホルモン（ＭＳＨ）、コカイン及びアンフェタミン調節転写物（ＣＡＲＴ）、神経ペプチドＹ受容体Ｙ１（ＮＰＹ１）拮抗薬、神経ペプチドＹ受容体Ｙ５（ＮＰＹ５）拮抗薬、ニューロテンシンＳ、神経ペプチドＢ、神経ペプチドW、グレリン、ボンベシン様受容体３（ＢＲＳ３）、ガラニン、コレシストキニン（ＣＣＫ）、オレキシン、メラニン濃縮ホルモン（ＭＣＨ）、オキシトシン、並びにストレスコピンからなる群から選択することができる。

【００８６】

グルカゴン様ペプチド－１（ＧＬＰ－１）は、プログルカゴン遺伝子の組織特異的翻訳後プロセシングに由来する３０アミノ酸長ペプチドホルモンである。ＧＬＰ－１は、食物摂取時に腸内分泌Ｌ細胞及び特定のニューロンによって産生及び分泌される。初期生成物ＧＬＰ－１（１～３７）は、アミド化及びタンパク質分解開裂を受けやすく、これにより、２つの切頭された等効力の生物学的活性形態ＧＬＰ－１（７～３６）アミド及びＧＬＰ－１（７～３７）を生じる。内因性ＧＬＰ－１は、主にジペプチジルペプチダーゼ－４（ＤＰＰ－４又はＤＰＰ－ＩＶ）によって、また中性エンドペプチダーゼ２４．１１（ＮＥＰ　２４．１１）及び腎クリアランスを介して、複数の経路で急速に分解され、その結果、半減期は約２分間である。ＧＬＰ－１ベースの治療は、体重減少及び低血糖リスク低下に関連しており、これらは２型糖尿病の治療において重要である。

【００８７】

エキセンジン（エキセナチド）は、２型真性糖尿病（Ｔ２ＤＭ）の治療のために承認されている、インクレチン模倣薬群に属するＧＬＰ－１アゴニストである。エキセナチドは、エキセンジン－４の合成バージョンである３９アミノ酸長ペプチドホルモンであり、グルコース調節効果を有するインスリン分泌促進物質である。エキセンジン－４は、広範囲の相同性と機能を哺乳類ＧＬＰ－１と共有するが、ＤＰＰ－４（ＤＰＰ－ＩＶ）による分解に抵抗することにより、より長い薬理学的半減期を可能にするため、治療的利点を有している。エキセンジン－４のこの生物学的特性が、Ｔ２ＤＭの治療に使用するための検討につながった。

【００８８】

アミリン（膵島アミロイドポリペプチド（ＩＡＰＰ））は、膵臓β細胞からインスリンと共分泌される３７アミノ酸長ペプチドホルモンである。アミリンは、胃内容物排出を緩徐化し、満腹感を促進することによって、血糖調節の役割を果たす。アミリン（ＩＡＰＰ）は、８９アミノ酸長ペプチドからプロセシングされる。膵島アミロイドポリペプチド前駆体（ｐｒｏＩＡＰＰ）は、膵臓β細胞中で、８９アミノ酸長ペプチドから、２２アミノ酸長シグナルペプチドが切断された後、６７アミノ酸長ペプチドとして産生される。ｐｒｏＩＡＰＰのプロセシングに障害があると、アミリン（ＩＡＰＰ）の産生の欠如が血糖制御の欠如をもたらし得るため、２型糖尿病をもたらす条件につながり得ると考えられる。プラムリンタイドは、アミリン模倣薬であり、少なくともヒトアミリンと同程度の効力を有する。これは、３７アミノ酸長ポリペプチドであり、位置２５（アラニン）、位置２８（セリン）、及び位置２９（セリン）でアミノ酸をプロリンに置換することによって、ヒトアミリンとはアミノ酸配列が異なっている。このプロリンは、ラットのアミリンに見られる自然発生的な変動である。これらの置換の結果として、プラムリンタイドは、可溶性、非接着性、及び非凝集性となり、これによって、天然のヒトアミリンの数多くの物理化学的な欠点を克服する（Ｊａｎｅｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｄｉａｂｅｔｅｓ　４５（Ｓｕｐｐｌ２）：２３５Ａ　（１９９６）；Ｙｏｕｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｄｒｕｇ　Ｄｅｖ．Ｒｅｓ．３７：２３１～４８（１９９６ｂ））。

【００８９】

α－メラニン細胞刺激ホルモン（α－ＭＳＨ）は、メラノコルチン類の内因性ペプチドホルモン及び神経ペプチドである。α－ＭＳＨは、哺乳動物において毛髪及び皮膚の色素沈着に関与するプロセスであるメラニン形成刺激において最も重要なメラニン細胞刺激ホ

ルモン（ＭＳＨ）である。α－ＭＳＨはまた、摂食行動、エネルギーホメオスタシス、性的活動、並びに虚血及び再灌流障害からの保護においても役割を果たす。

【００９０】

コカイン及びアンフェタミン調節転写産物（ＣＡＲＴ）は、ヒトにおけるＣＡＲＴＰＴ遺伝子によりコードされる神経ペプチドタンパク質である。ＣＡＲＴペプチド、特にＣＡＲＴ（５５～１０２）は、ＣＡＲＴペプチドがいくつかの視床下部食欲回路と相互作用するため、エネルギーホメオスタシスの調節において重要な機能を有すると思われる。ＣＡＲＴ発現は、レプチン、コレシストキニン、及びグレリンを含む、食欲調節に関与する末梢ペプチドホルモンによって調節される。ＣＡＲＴ及びコレシストキニンは、食欲調節に対する相乗効果を有する。ＣＡＲＴペプチドは、エタノール離脱によって誘発される不安様挙動の一因となり；自発運動、条件付け場所嗜好性、及び精神刺激薬のコカイン自己投与効果を調節し；食物摂取を抑制し；恐怖及び刺激行動に関与すると考えられている。視床下部におけるＣＡＲＴ低活性は、過食症及び体重増加に関連し、ＣＡＲＴは、自然な報酬プロセスを調節するオピオイドの中脳辺縁系ドーパミン回路において役割を果たすと考えられる。

【００９１】

神経ペプチドＹ（ＮＰＹ）は、例えば、摂食行動、大脳皮質神経活動、心臓活動、及び情動調節の制御を含む、身体における多数の役割を有する。ＮＰＹはまた、肥満、アルコール依存症、及びうつ病を含むいくつかのヒト疾患にも関与している。更に、抗ＮＰＹ抗体（ＮＰＹ及びＮＰＹ受容体拮抗薬に対するアンチセンス・オリゴデオキシリヌクレオチド）を用いたＮＰＹの中枢作用の遮断は、エネルギー欠乏動物において、食物摂取の減少をもたらす。具体的には、神経ペプチドＹ受容体Ｙ５（ＮＰＹ５）及び神経ペプチドＹ受容体Ｙ１（ＮＰＹ１）は、異なる摂食相を刺激することが示されている（Ｂｒ　Ｊ　Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．２００３　Ａｕｇ；１３９（８）：１４３３～４０）。したがって、ＮＰＹ５及びＮＰＹ１拮抗薬は、肥満及び他の関連する代謝疾患の治療において有効であり得る。

【００９２】

ニューロテンシンは、黄体形成ホルモン及びプロラクチン放出の調節に関与し、ドーパミン作動系との顕著な相互作用を有する、１３アミノ酸長神経ペプチドである。ニューロテンシンは、中枢神経系全体に分布し、最も高いレベルは視床下部、扁桃体、及び側坐核にある。ニューロテンシンは、鎮痛、低体温、増加した運動活動を含む様々な効果を誘発することができ、ドーパミン経路の調節に関与する。

【００９３】

神経ペプチドＢ（ＮＰＢ）は、短い生物学的活性ペプチドであり、その前駆体はＮＢＰ遺伝子によりコードされる。ＮＰＢは、神経ペプチドＢ／Ｗ受容体１及び２（ＮＰＢＷＲ１及びＮＰＢＷＲ２）と呼ばれる２つのＧタンパク質結合受容体を介して作用することができる。神経ペプチドＢは、摂食、神経内分泌系、記憶、学習、及び求心性疼痛経路の調節に関連すると考えられている。

【００９４】

神経ペプチドＷ（ＮＰＷ）は、２３個（ＮＰＷ２３）又は３０個（ＮＰＷ３０）のアミノ酸からなる２つの形態で存在する。これらの神経ペプチドは、２つのＧタンパク質結合受容体であるＮＰＢＷＲ１（別名ＧＰＲ７）及びＮＰＢＷＲ２（別名ＧＰＲ８）に結合し、これらを介して作用し得る。ＮＰＷは、食物摂取及び体重を抑制し、熱産生及び体温の両方を増加させることが示されており、このことは、ＮＰＷが内因性異化作用信号伝達分子として機能することを示唆している。

【００９５】

グレリン（別名イエノモレリン（ＩＮＮ））は、胃腸管内のグレリン作動性細胞によって産生されるペプチドホルモンであり、中枢神経系における神経ペプチドとして機能する。グレリンは、食欲の調節、エネルギーの分配及び使用速度の調節、ドーパミンニューロンにおける報酬知覚の調節において役割を果たす。グレリンは、ＧＨＲＬ遺伝子によりコ

ードされ、プログレリン前駆体の開裂により産生されると考えられ、このプログレリン前駆体が開裂してプログレリンを生成し、これが更に開裂して２８アミノ酸長のグレリンが産生される。他の内因性ペプチドとは異なり、グレリンは、血液脳関門を横断することができ、このことは、グレリンを外因的に投与する、臨床面でのユニークな可能性をもたらす。

【００９６】

ボンベシン様受容体３（ＢＲＳ３）は、既知の天然起源のボンベシン関連ペプチドとのみ低い親和性で相互作用するＧタンパク質結合受容体であり、高親和性リガンドを有さないため、ＢＲＳ３はオーファン受容体として分類される。

【００９７】

ガラニンは、ＧＡＬ遺伝子によりコードされる神経ペプチドである。ガラニンは、ヒト並びに他の動物の脳、脊髄、及び腸において広く発現されている。ガラニンの機能は、まだ完全に分類されていない。しかしながら、ガラニンは、ニューロンにおける作用電位の調節及び阻害に主に関与している。ガラニンは、侵害受容、覚醒及び睡眠調節、認知、摂食、気分調節、及び血圧の調節が挙げられるがこれらに限定されない、数多くの生物学的に多様な機能に関与している。ガラニンは、多くの場合、アセチルコリン、セロトニン、及びノルエピネフリンなどの古典的な神経伝達物質と共局在し、また神経ペプチドＹ、物質Ｐ、及び血管活性腸ペプチドなどの神経調節物質と共局在する。

【００９８】

コレシストキニン（ＣＣＫ）は、脂肪及びタンパク質の消化を刺激する役目をする胃腸系のペプチドホルモンである。ＣＣＫは、小腸内の腸内分泌細胞によって合成及び分泌され、その存在により、消化酵素及び胆汁を膵臓及び胆嚢から放出させる。ＣＣＫは、消化、満腹感、及び不安において役割を果たす。

【００９９】

オレキシン（別名ヒポクレチン）は、覚醒、目覚め、及び食欲を調節する神経ペプチドである。オレキシンＡ及びＢ（ヒポクレチン－１及び－２）の２種類が存在し、それぞれ長さが３３アミノ酸長及び２８アミノ酸長である。オレキシン系は、主に食物摂取の刺激に関与すると考えられ、上記の役割に加えて、オレキシンは、エネルギー消費の調節と内臓機能の調節を行う。

【０１００】

メラニン濃縮ホルモン（ＭＣＨ）は、環状１９アミノ酸長の食欲促進視床下部ペプチドであり、これは、摂食行動、気分、睡眠覚醒サイクル、及びエネルギーバランスの調節に関与すると考えられている。ＭＣＨ発現ニューロンは、視床下部外側野及び不確帯内に位置し、このような制限された分布にもかかわらず、ＭＣＨニューロンは脳全体に広く広がっている。

【０１０１】

オキシトシンは、通常は視床下部の室傍核によって産生され、下垂体後葉によって放出されるペプチドホルモン及び神経ペプチドである。オキシトシンは、社会的結合、性的生殖、並びに出産時及び出産後に役割を果たすと考えられている。オキシトシン受容体は、マグネシウム及びコレステロールを必要とするＧタンパク質結合受容体であり、Ｇタンパク質結合受容体のロドプシン型（クラスＩ）群に属する。

【０１０２】

４０アミノ酸長ペプチドであるヒトストレスコピン（ｈ－ＳＣＰ）は、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン（ＣＲＨ）ペプチド群に属する。ＣＲＨペプチド群の生物学的作用は、２つの７回膜貫通型Ｇタンパク質結合受容体、ＣＲＨ受容体１型（ＣＲＨＲ１）及びＣＲＨ受容体２型（ＣＲＨＲ２）によって顕現される。これらの受容体は高い配列相同性を有するが、ＣＲＨペプチド群の中の異なる要素は、相対的な結合親和力、受容体活性化の度合、及びこれら２つの受容体の選択性において顕著な違いを示す。ＣＲＨ群の多くのものとは異なり、ｈ－ＳＣＰはＣＲＨＲ２に対してより高い選択性を発現し、生理学的ストレスの開始及び維持を減弱させるプロセスを補助するメディエーターとして機能する。生

理学的ストレスにおける明らかな役割に加え、ｈ－ＳＣＰは他の数多くの生理学的作用を顕現させることが報告されている。これは、内分泌系、中枢神経系、心臓血管系、肺系、胃腸系、腎臓系、骨格筋系、及び炎症系に影響を及ぼす。ＣＲＨＲ２活性は更に、サルコペニアなどの骨格筋消耗疾患、運動活動、及び食物摂取に関与しており、心臓保護的役割に関与し、気管支弛緩及び抗炎症活性を発現する。更に、ストレスコピン模倣薬は、コルチコトロピン放出ホルモン受容体２活性によって媒介される医学的適応症の治療に有用であることが特定されている（例えば、米国特許出願第２０１００１３０４２４号を参照されたい）。

【０１０３】

半減期延長部分

本発明の抗体又はその抗原結合フラグメントに加えて、本発明のコンジュゲートは、例えば共有結合相互作用を介して、薬学的活性部分の半減期を延長するための１つ又は２つ以上の他の部分を組み込むことができる。代表的な他の半減期延長部分としては、アルブミン、アルブミン変異体、アルブミン結合タンパク質及び／又はドメイン、トランスフェリン、並びにそのフラグメント及び類似体が挙げられるがこれらに限定されない。本発明のコンジュゲートに組み込むことができる追加の半減期延長部分には、例えば、所望の特性を得るための、ＰＥＧ５０００又はＰＥＧ２０，０００などのポリエチレングリコール（ＰＥＧ）分子、例えばラウリン酸エステル、ミリスチン酸エステル、ステアリン酸エステル、アラキジン酸エステル、ベヘン酸エステル、オレイン酸エステル、アラキドン酸エステル、オクタン二酸、テトラデカン二酸、オクタデカン二酸、ドコサン二酸などの異なる鎖長の脂肪酸及び脂肪酸エステル、ポリリジン、オクタン、炭水化物（デキストラン、セルロース、オリゴ糖又は多糖）が挙げられる。これらの部分は、タンパク質足場コード配列との直接融合体であってもよく、標準的なクローニング及び発現技術によって作製してもよい。あるいは、周知の化学カップリング方法を用いて、組換え技術により及び化学的に産生された本発明のコンジュゲートにその部分を結合させることができる。

【０１０４】

周知の方法を用いて、システイン残基を分子のＣ末端に組み入れて、ＰＥＧ化した基をシステインに結合させることによって、ＰＥＧ化部分を、例えば、本発明のペプチド分子に付加することができる。

【０１０５】

更なる部分を組み込んだ本発明のペプチド分子を、いくつかの公知のアッセイによって、官能性について比較することができる。例えば、単独での又は本発明によるコンジュゲート中の、対象とする治療用ペプチドの生物学的又は薬物動態活性を、既知のインビトロ又はインビボアッセイを用いてアッセイし、比較することができる。

【０１０６】

医薬組成物

別の一般的な態様において、本発明は、本発明のコンジュゲートと、薬学的に許容可能な担体とを含む医薬組成物に関する。本明細書で使用されるとき、用語「医薬組成物」は、薬学的に許容可能な担体と共に本発明のコンジュゲートを含む生成物を意味する。本発明のコンジュゲート及びそれらを含む組成物は、本明細書で言及される治療用途のための薬剤の製造にも有用である。

【０１０７】

本明細書で使用されるとき、用語「担体」は、あらゆる賦形剤、希釈剤、充填剤、塩、バッファー、安定剤、可溶化剤、油、脂質、脂質含有小胞、ミクロスフェア、リポソーム封入体、又は医薬製剤で使用するための当該技術分野では周知の他の材料を指す。担体、賦形剤又は希釈剤の特性は、特定の用途の投与経路によって決まる点は理解されよう。本明細書で使用されるとき、用語「薬学的に許容可能な担体」は、本発明に基づく組成物の効果又は本発明に基づく組成物の生物活性を妨げない無毒性材料を指す。特定の実施形態によると、本開示を考慮すると、抗体医薬組成物での使用に適した任意の薬学的に許容可能な担体を、本発明で使用することができる。

【０１０８】
本発明に使用するための薬学的に許容可能な酸性／アニオン性の塩としては、酢酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、安息香酸塩、重炭酸塩、酒石酸水素塩、臭化物、エデト酸カルシウム、カンシル酸塩、炭酸塩、塩化物、クエン酸塩、二塩酸塩、エデト酸塩、エジシル酸塩、エストル酸塩、エシル酸塩、フマル酸塩、グルセプト酸塩、グルコン酸塩、グルタミン酸塩、グリコリルアルサニル酸塩、ヘキシルレソルシン酸塩、ヒドラバミン、臭化水素酸塩、塩酸塩、ヒドロキシナフトエ酸塩、ヨウ化物、イセチオン酸塩、乳酸塩、ラクトビオン酸塩、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、マンデル酸塩、メシル酸塩、メチル臭化物、メチル硝酸塩、メチル硫酸塩、ムコ酸塩、ナプシル酸塩、硝酸塩、パモ酸塩、パントテン酸塩、リン酸塩／二リン酸塩、ポリガラクツロン酸塩、サリチル酸塩、ステアリン酸塩、塩基性酢酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、タンニン酸塩、酒石酸塩、テオクル酸塩、トシル酸塩及びトリエチオジドが挙げられるが、これらに限定されない。また、有機酸又は無機酸としては、ヨウ化水素酸、過塩素酸、硫酸、リン酸、プロピオン酸、グリコール酸、メタンスルホン酸、ヒドロキシエタンスルホン酸、シュウ酸、２－ナフタレンスルホン酸、ｐ－トルエンスルホン酸、シクロヘキサンスルファミン酸、サッカリン酸又はトリフルオロ酢酸が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１０９】
薬学的に許容可能な塩基性／カチオン性の塩としては、アルミニウム、２－アミノ－２－ヒドロキシメチル－プロパン－１，３－ジオール（トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン、トロメタン又は「ＴＲＩＳ」としても知られる）、アンモニア、ベンザチン、ｔ－ブチルアミン、カルシウム、クロロプロカイン、コリン、シクロヘキシルアミン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、リチウム、Ｌ－リジン、マグネシウム、メグルミン、Ｎ－メチル－Ｄ－グルカミン、ピペリジン、カリウム、プロカイン、キニーネ、ナトリウム、トリエタノールアミン、又は亜鉛が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１１０】
本発明のいくつかの実施形態では、約０．００１ｍｇ／ｍＬ～約１００ｍｇ／ｍＬ、約０．０１ｍｇ／ｍＬ～約５０ｍｇ／ｍＬ、又は約０．１ｍｇ／ｍＬ～約２５ｍｇ／ｍＬの量で本発明のコンジュゲートを含む医薬製剤が提供される。この医薬製剤は、約３．０～約１０、例えば約３～約７、又は約５～約９のｐＨを有し得る。この製剤は更に、緩衝系、防腐剤（複数可）、等張剤（複数可）、キレート剤（複数可）、安定剤（複数可）及び／又は界面活性剤（複数可）からなる群から選択される少なくとも１つの成分を含み得る。

【０１１１】
薬学的に許容可能な担体を有する薬学的活性成分の製剤は、例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅ　ａｎｄ　Ｐｒａｃｔｉｃｅ　ｏｆ　Ｐｈａｒｍａｃｙ（例えば２１ｓｔ　ｅｄｉｔｉｏｎ（２００５）及びそれ以降の任意の改訂版）にあるように、当該技術分野において既知である。追加成分の非限定的な例としては、緩衝剤、希釈剤、溶媒、張度調節剤、防腐剤、安定剤、及びキレート剤が挙げられる。１つ又は２つ以上の薬学的に許容可能な担体は、本発明の医薬組成物を配合する際に使用され得る。

【０１１２】
本発明の一実施形態では、医薬組成物は液体製剤である。液体製剤の好ましい例は、水性製剤、すなわち、水を含む製剤である。液体製剤は、溶液、懸濁液、エマルション、マイクロエマルション、ゲルなどを含み得る。水性製剤は、典型的には、少なくとも５０％ｗ／ｗの水、又は少なくとも６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、又は少なくとも９５％　ｗ／ｗの水を含む。

【０１１３】
一実施形態では、医薬組成物は、注射器又は輸液ポンプを介して注入することができる注射用製剤として製剤化され得る。注入は、例えば、皮下、筋肉内、腹腔内、又は静脈内に送達され得る。

【０１１４】
別の一実施形態では、医薬組成物は、固体製剤、例えば、凍結乾燥又は噴霧乾燥組成物

であり、これはそのまま使用してもよく、又は、医師若しくは患者が使用前に溶媒及び／若しくは希釈剤を添加する。固体剤形としては、圧縮錠剤などの錠剤、及び／又はコーティングされた錠剤、並びにカプセル（例えば、ハード又はソフトゼラチンカプセル）を挙げることができる。薬学的組成物はまた、例えば、サッシェ、糖衣錠、粉末、顆粒、トローチ剤、又は再構成用の粉末の形態であってもよい。

【０１１５】

剤形は、即時放出（この場合、水溶性若しくは分散性担体を含み得る）であってよく、又は、遅延放出、持続放出、又は変性放出（これらの場合は、胃腸管における剤形の溶解速度を調節する非水溶性ポリマーを含み得る）であってもよい。

【０１１６】

他の実施形態では、医薬組成物は、経鼻投与、頬内、又は舌下送達され得る。

【０１１７】

水性製剤のｐＨは、ｐＨ３～ｐＨ１０の間であり得る。本発明の一実施形態では、製剤のｐＨは約７．０～約９．５である。本発明の別の一実施形態では、製剤のｐＨは約３．０～約７．０である。

【０１１８】

本発明の別の一実施形態では、医薬組成物は緩衝剤を含む。緩衝剤の非限定的な例としては、アルギニン、アスパラギン酸、ビシン、クエン酸塩、リン酸水素二ナトリウム、フマル酸、グリシン、グリシルグリシン、ヒスチジン、リジン、マレイン酸、リンゴ酸、酢酸ナトリウム、炭酸ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム、リン酸ナトリウム、コハク酸塩、酒石酸、トリシン、及びトリス（ヒドロキシメチル）－アミノメタン、並びにこれらの混合物が挙げられる。緩衝剤は、個々に又は合計で、約０．０１ｍｇ／ｍＬ～約５０ｍｇ／ｍＬ、例えば約０．１ｍｇ／ｍＬ～約２０ｍｇ／ｍＬの濃度で存在してもよい。これらの具体的な緩衝剤の各々を含む医薬組成物は、本発明の代替の実施形態を構成する。

【０１１９】

本発明の別の一実施形態では、医薬組成物は防腐剤を含む。緩衝剤の非限定的な例としては、塩化ベンゼトニウム、安息香酸、ベンジルアルコール、ブロノポール、ブチル４－ヒドロキシベンゾエート、クロロブタノール、クロロクレゾール、クロロヘキシジン、クロルフェネシン、ｏ－クレゾール、ｍ－クレゾール、ｐ－クレゾール、エチル４－ヒドロキシベンゾエート、イミド尿素、メチル４－ヒドロキシベンゾエート、フェノール、２－フェノキシエタノール、２－フェニルエタノール、プロピル４－ヒドロキシベンゾエート、デヒドロ酢酸ナトリウム、チメロサール、及びこれらの混合物が挙げられる。防腐剤は、個々に又は合計で、約０．０１ｍｇ／ｍＬ～約５０ｍｇ／ｍＬ、例えば約０．１ｍｇ／ｍＬ～約２０ｍｇ／ｍＬの濃度で存在してもよい。これらの具体的な防腐剤の各々を含む医薬組成物は、本発明の代替の実施形態を構成する。

【０１２０】

本発明の別の一実施形態では、医薬組成物は等張剤を含む。本実施形態の非限定的な例としては、塩（塩化ナトリウムなど）、アミノ酸（グリシン、ヒスチジン、アルギニン、リジン、イソロイシン、アスパラギン酸、トリプトファン、及びスレオニンなど）、アルジトール（グリセロール、１，２－プロパンジオールプロピレングリコール、１，３－プロパンジオール、及び１，３－ブタンジオールなど）、ポリエチレングリコール（例えば、ＰＥＧ４００）、並びにこれらの混合物が挙げられる。等張剤の別の例としては、糖が挙げられる。糖の非限定的な例は、単糖類、二糖類、若しくは多糖類、又は水溶性グルカンであり得、例えばフルクトース、グルコース、マンノース、ソルボース、キシロース、マルトース、ラクトース、ショ糖、トレハロース、デキストラン、プルラン、デキストリン、シクロデキストリン、α－及びβ－ＨＰＣＤ、可溶性デンプン、ヒドロキシエチルデンプン、及びカルボキシメチルセルロースナトリウムが挙げられる。等張剤の別の例は糖アルコールであり、用語「糖アルコール」は、少なくとも１つの－ＯＨ基を有するＣ（４～８）炭化水素として定義される。糖アルコールの非限定的な例としては、マンニトール、ソルビトール、イノシトール、ガラクチトール、ズルシトール、キシリトール、及びア

ラビトールが挙げられる。本段落に列挙される各等張剤を含む医薬組成物は、本発明の代替実施形態を構成する。等張剤は、個々に又は合計で、約０．０１ｍｇ／ｍＬ～約５０ｍｇ／ｍＬ、例えば約０．１ｍｇ／ｍＬ～約２０ｍｇ／ｍＬの濃度で存在してもよい。これらの具体的な等張剤の各々を含む医薬組成物は、本発明の代替の実施形態を構成する。

【０１２１】

本発明の別の一実施形態では、医薬組成物はキレート剤を含む。キレート剤の非限定的な例としては、クエン酸、アスパラギン酸、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）の塩、及びこれらの混合物が挙げられる。キレート剤は、個々に又は合計で、約０．０１ｍｇ／ｍＬ～約５０ｍｇ／ｍＬ、例えば約０．１ｍｇ／ｍＬ～約２０ｍｇ／ｍＬの濃度で存在してもよい。これらの具体的なキレート剤の各々を含む医薬組成物は、本発明の代替の実施形態を構成する。

【０１２２】

本発明の別の一実施形態では、医薬組成物は安定剤を含む。安定剤の非限定的な例としては、１つ又は２つ以上の凝集阻害剤、１つ又は２つ以上の酸化阻害剤、１つ又は２つ以上の界面活性剤、及び／又は１つ又は２つ以上のプロテアーゼ阻害剤が挙げられる。

【０１２３】

本発明の別の一実施形態では、医薬組成物は安定剤を含み、当該安定剤は、カルボキシ／ヒドロキシセルロース及びその誘導体（ＨＰＣ、ＨＰＣ－ＳＬ、ＨＰＣ－Ｌ及びＨＰＭＣ）、シクロデキストリン、２－メチルチオエタノール、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ　３３５０など）、ポリビニルアルコール（ＰＶＡ）、ポリビニルピロリドン、塩（塩化ナトリウムなど）、硫黄含有物質（モノチオグリセロールなど）、又はチオグリコール酸である。安定剤は、個々に又は合計で、約０．０１ｍｇ／ｍＬ～約５０ｍｇ／ｍＬ、例えば約０．１ｍｇ／ｍＬ～約２０ｍｇ／ｍＬの濃度で存在してもよい。これらの具体的な安定剤の各々を含む医薬組成物は、本発明の代替の実施形態を構成する。

【０１２４】

本発明の更なる実施形態では、医薬組成物は、１つ又は２つ以上の界面活性剤、好ましくは１つの界面活性剤、少なくとも１つの界面活性剤、又は２つの異なる界面活性剤を含む。用語「界面活性剤」は、水溶性（親水性）部分と脂溶性（親油性）部分とからなる任意の分子又はイオンを指す。界面活性剤は、例えば、アニオン性界面活性剤、カチオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤、及び／又は双極性イオン界面活性剤からなる群から選択することができる。界面活性剤は、個々に又は合計で、約０．１ｍｇ／ｍＬ～約２０ｍｇ／ｍＬの濃度で存在してもよい。これらの具体的な界面活性剤の各々を含む医薬組成物は、本発明の代替の実施形態を構成する。

【０１２５】

本発明の更なる実施形態では、医薬組成物は、例えば、ＥＤＴＡ（エチレンジアミン四酢酸）、及び／又はベンズアミジン塩酸（ＨＣｌ）などの１つ又は２つ以上のプロテアーゼ阻害剤を含む。プロテアーゼ阻害剤は、個々に又は合計で、約０．１ｍｇ／ｍＬ～約２０ｍｇ／ｍＬの濃度で存在してもよい。これらの具体的なプロテアーゼ阻害剤の各々を含む医薬組成物は、本発明の代替の実施形態を構成する。

【０１２６】

本発明の医薬組成物は、組成物の保管中にポリペプチドの凝集体形成を減少させるのに十分な量のアミノ酸塩基を含み得る。用語「アミノ酸塩基」は、１つ又は２つ以上のアミノ酸（メチオニン、ヒスチジン、イミダゾール、アルギニン、リジン、イソロイシン、アスパラギン酸、トリプトファン、スレオニンなど）、又はこれらの類似体を指す。任意のアミノ酸は、その遊離塩基形態又はその塩形態のいずれで存在してもよい。アミノ酸塩基の任意の立体異性体（すなわち、Ｌ、Ｄ、又はこれらの混合物）が存在してもよい。アミノ酸塩基は、個々に又は他のアミノ酸塩基と組み合わせて、約０．０１ｍｇ／ｍＬ～約５０ｍｇ／ｍＬ、例えば約０．１ｍｇ／ｍＬ～約２０ｍｇ／ｍＬの濃度で存在してもよい。これらの具体的なアミノ酸塩基の各々を含む医薬組成物は、本発明の代替の実施形態を構成する。

【０１２７】
また、本発明のコンジュゲート又はその医薬組成物の治療的有効量が、所望の効果に応じて変動することも当業者に自明である。したがって、最適投与量は、当業者が容易に決定することができ、使用される具体的なコンジュゲート、投与方法、調製物の力価、及び病状の進行度に応じて変動する。加えて、対象の年齢、体重、食事、及び投与時間を含む、治療される具体的な対象に関連する要因は、投与量を適切な治療的濃度に調節する必要性を生じさせるものである。
【０１２８】
全ての適応に関して、本発明のコンジュゲートは、好ましくは、１日当たり単回又は分割用量で、約１μｇ～約５ｍｇの用量で、末梢投与される（例えば、単回用量を２、３、４、５、６、７、８、９、又は１０回の小用量に分割することができる）、あるいは投与当たり約０．０１μｇ／ｋｇ～約５００μｇ／ｋｇ、より好ましくは約０．０５μｇ／ｋｇ～約２５０μｇ／ｋｇ、最も好ましくは約５０μｇ／ｋｇ未満の用量で末梢投与される。これらの範囲内の用量は、当然ながら各アゴニストの効力によって変化し、当業者によって容易に決定される。したがって、上記の投与量は平均的な場合の例である。当然ながら、これよりも多いか又は少ない投与量範囲が有効である個々の例もあり得、かかる例も本発明の範囲内である。
【０１２９】
特定の実施形態では、本発明のコンジュゲートは、約１μｇ～約５ｍｇの用量、又は約０．０１μｇ／ｋｇ～約５００μｇ／ｋｇの用量、より好ましくは約０．０５μｇ／ｋｇ～約２５０μｇ／ｋｇの用量、最も好ましくは約５０μｇ／ｋｇ未満の用量で投与され、これに伴う第２の治療薬（例えばリラグルチド）の用量は、約１μｇ～約５ｍｇの用量、又は約０．０１μｇ／ｋｇ～約５００μｇ／ｋｇの用量、より好ましくは約０．０５μｇ／ｋｇ～約２５０μｇ／ｋｇの用量、最も好ましくは約５０μｇ／ｋｇ未満の用量である。
【０１３０】
本発明のコンジュゲートの薬学的に許容可能な塩としては、無機又は有機の酸類又は塩基類から形成される、従来の非毒性塩類又は四級アンモニウム塩類が挙げられる。かかる酸付加塩の例としては、酢酸塩、アジピン酸塩、安息香酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、クエン酸塩、樟脳酸塩、ドデシル硫酸塩、塩酸塩、臭化水素酸塩、乳酸塩、マレイン酸塩、メタンスルホン酸塩、硝酸塩、シュウ酸塩、ピバル酸塩、プロピオン酸塩、コハク酸塩、硫酸塩及び酒石酸塩が挙げられる。塩基性塩としては、アンモニウム塩、ナトリウム塩及びカリウム塩などのアルカリ金属塩、カルシウム塩及びマグネシウム塩などのアルカリ土類金属塩、ジシクロヘキシルアミノ塩などの有機塩基との塩、並びにアルギニンなどのアミノ酸との塩が挙げられる。更に、塩基性の窒素含有基は、例えばハロゲン化アルキルによって四級化してもよい。
【０１３１】
本発明の医薬組成物は、それらの使用目的を実現する任意の手段によって投与することができる。例としては、非経口、皮下、静脈内、筋肉内、腹腔内、経皮的、口内又は眼内投与が挙げられる。経口経路により投与してもよい。非経口投与に適する製剤としては、例えば、水溶性の塩、酸性溶液、アルカリ性溶液、デキストロース水溶液、等張炭水化物溶液、及びシクロデキストリン包接錯体などの水溶性形態の活性コンジュゲートの水溶液が挙げられる。
【０１３２】
本発明はまた、薬学的に許容可能な担体を本発明のコンジュゲートのいずれかと混合することを含む、医薬組成物の製造方法も包含する。加えて、本発明は、１つ又は２つ以上の薬学的に許容可能な担体を本発明のコンジュゲートのいずれかと混合することによって製造される医薬組成物を包含する。
【０１３３】
更に、本発明のコンジュゲートは、１つ又は２つ以上の結晶多形又は非晶質結晶形を有してよく、したがって、これらの形態も本発明の範囲に包含されるものとする。加えて、

このコンジュゲートは、例えば水（すなわち、水和物等）又は一般的な有機溶媒と溶媒和物を形成してよい。本明細書で使用されるとき、用語「溶媒和物」は、本発明のコンジュゲートと１つ又は２つ以上の溶媒分子との物理的会合を意味する。この物理的会合は、水素結合など、イオン結合及び共有結合の度合いの変化を伴う。特定の場合において、例えば１つ又は２つ以上の溶媒分子が結晶質固体の結晶格子に組み込まれているとき、この溶媒和物は分離することができるようになる。用語「溶媒和物」は、溶液相溶媒和物と、分離可能な溶媒和物の両方を包含するものとする。適切な溶媒和物の非限定的な例としては、エタノラート、メタノラートなどが挙げられる。

【０１３４】

本発明の範囲には、本発明のコンジュゲートの結晶多形及び溶媒和物が含まれるものとする。ゆえに、本発明の治療方法における用語「投与」には、本発明のコンジュゲート、あるいは具体的に開示されていなくとも、明らかに本発明の範囲内に含まれるであろう多形体又はその溶媒和物を用いて、本明細書に記載の症候群、障害又は疾患を治療、寛解又は予防する手段が含まれる。

【０１３５】

別の一実施形態では、本発明は、医薬品として使用するための本発明のコンジュゲートに関する。

【０１３６】

本発明の範囲内には、本発明のコンジュゲートのプロドラッグが含まれる。一般に、かかるプロドラッグは、インビボで目的のコンジュゲートに容易に変換可能な、当該コンジュゲートの機能的誘導体である。したがって、本発明の治療方法における用語「投与」には、本明細書に記載される様々な障害の、具体的に開示されたコンジュゲートによる治療か、又は具体的に開示されていなくとも、患者への投与後にインビボで特定のコンジュゲートに変換される、コンジュゲートによる治療が含まれるものとする。好適なプロドラッグ誘導体の選択及び調製に関する従来の手順は、例えば、「Ｄｅｓｉｇｎ　ｏｆ　Ｐｒｏｄｒｕｇｓ」（Ｅｄ．Ｈ．Ｂｕｎｄｇａａｒｄ、Ｅｌｓｅｖｉｅｒ，１９８５）に記載されている。

【０１３７】

更に、本発明の範囲内で、いずれかの元素、特に、本発明のコンジュゲートに関して述べるときのいずれかの元素は、天然に存在する、又は合成生産された、天然の存在度を有する、又は同位体濃縮形態での、当該元素の全ての同位体及び同位体混合物を含むことになることを意図している。例えば、水素に関しては、その範囲内に^{1}Ｈ、^{2}Ｈ（Ｄ）、及び^{3}Ｈ（Ｔ）が含まれる。同様に、炭素及び酸素に関しては、それらの範囲内に１２Ｃ、^{13}Ｃ及び^{14}Ｃ、並びに^{16}Ｏ及び^{18}Ｏがそれぞれ含まれる。かかる同位体は、放射性同位体であってもよく、又は非放射性同位体であってもよい。本発明の放射性標識コンジュゲートは、^{3}Ｈ、^{11}Ｃ、^{18}Ｆ、^{122}Ｉ、^{123}Ｉ、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、^{75}Ｂｒ、^{76}Ｂｒ、^{77}Ｂｒ、及び^{82}Ｂｒからなる群から選択される放射性同位体を含んでよい。好ましくは、放射性同位元素は、^{3}Ｈ、^{11}Ｃ、及び^{18}Ｆからなる群から選択される。

【０１３８】

本発明のいくつかのコンジュゲートは、アトロプ異性体として存在してもよい。アトロプ異性体は、一重結合周りの回転が障害されることにより生じる立体異性体であり、回転に対する立体歪みによる干渉が、配座異性体の単離を可能にする程度に十分高いものである。かかる配座異性体及びその混合物は全て、本発明の範囲内に包含されると理解される。

【０１３９】

本発明によるコンジュゲートが少なくとも１つの立体中心を有する場合、結果としてそれらはエナンチオマー又はジアステレオマーとして存在し得る。かかる異性体及びその混合物は全て、本発明の範囲内に包含されると理解される。

【０１４０】

本発明によるコンジュゲートの調製プロセスにより立体異性体混合物が生じる場合、これらの異性体は、分取クロマトグラフィーなどの従来法により分離することができる。コ

ンジュゲートはラセミ体として調製されてもよく、又は個々のエナンチオマーをエナンチオ選択的な合成、又は分割のいずれかにより調製することもできる。コンジュゲートは、例えば（－）－ジ－ｐ－トルオイル－Ｄ－酒石酸及び／又は（＋）－ジ－ｐ－トルオイル－Ｌ－酒石酸のような光学的に活性な酸と共に塩を形成させることでジアステレオマー対を形成した後、分別結晶化させる及び遊離塩基を再生せるなどの標準的方法により、その成分であるエナンチオマーに分割することができる。コンジュゲートはまた、ジアステレオマーのエステル又はアミドを形成した後、クロマトグラフィー分離を行い、キラル補助基を除去することにより、分割することもできる。あるいは、コンジュゲートは、高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）又はＳＦＣを介してキラルカラムを使用して分割されてもよい。場合によっては、１Ｈ　ＮＭＲスペクトルにおいて、複雑なマルチプレット及びピークの一体化をもたらす、１Ｈ　ＮＭＲにより観察可能な、コンジュゲートの回転異性体が存在し得る。

【０１４１】

本発明のコンジュゲートを調製するための任意のプロセスにおいて、関連する分子のいずれかにおける感受性基又は反応性基を保護することが必要及び／又は望ましい場合がある。これは、Ｐｒｏｔｅｃｔｉｖｅ　Ｇｒｏｕｐｓ　ｉｎ　Ｏｒｇａｎｉｃ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，ｅｄ．Ｊ．Ｆ．Ｗ．ＭｃＯｍｉｅ，Ｐｌｅｎｕｍ　Ｐｒｅｓｓ，１９７３及びＴ．Ｗ．Ｇｒｅｅｎｅ　＆　Ｐ．Ｇ．Ｍ．Ｗｕｔｓ，Ｐｒｏｔｅｃｔｉｖｅ　Ｇｒｏｕｐｓ　ｉｎ　Ｏｒｇａｎｉｃ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　＆　Ｓｏｎｓ，１９９１（これらはそれぞれその全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記述されているような、従来型の保護基によって達成することができる。保護基は、その後の便利な段階において、当該技術分野で周知の方法を用いて除去することができる。

【０１４２】

使用方法

本発明はまた、障害、疾患、若しくは病態を、あるいは当該障害、疾患、若しくは病態の１つ若しくは２つ以上の症状を、必要とする対象において、予防、治療、発症遅延、又は寛解させるための方法を提供し、この方法は、有効量の本発明のコンジュゲート又は医薬組成物を、それを必要とする対象に投与することを含む。

【０１４３】

特定の実施形態では、この障害、疾患、又は病態は、本発明のモノクローナル抗体プラットフォームに結合することができるペプチド又は化合物で治療され得る任意の障害、疾患、又は病態であり得る。特定の実施形態では、この障害、疾患、又は病態は、肥満、１型又は２型糖尿病、メタボリックシンドローム（すなわち、シンドロームＸ）、インスリン抵抗性、耐糖能異常（例えば、グルコース不耐性）、高血糖症、高インスリン血症、高トリグリセリド血症、先天性高インスリン症（ＣＨＩ）による低血糖、脂質異常症、アテローム性動脈硬化症、糖尿病性ネフロパシー、及びその他の心臓血管危険因子（高血圧など）、及び管理されていないコレステロール及び／又は脂質レベルに関連する心臓血管危険因子、骨粗鬆症、炎症、非アルコール性脂肪肝疾患（ＮＡＦＬＤ）、非アルコール性脂肪性肝炎（ＮＡＳＨ）、腎疾患、及び／又は湿疹からなる群から選択される。

【０１４４】

特定の実施形態によれば、治療有効量は、以下の効果のうちの１つ、２つ、３つ、４つ、又はそれ以上を達成するのに十分な治療の量を指す：（ｉ）治療される疾患、障害若しくは病態又はそれに関連する症状の重症度を低減又は改善すること、（ｉｉ）治療される疾患、障害若しくは病態、又はそれに関連する症状の期間を短縮すること、（ｉｉｉ）治療される疾患、障害若しくは病態、又はそれに関連する症状の進行を防止すること、（ｉｖ）治療される疾患、障害若しくは病態、又はそれに関連する症状の退縮を生じること、（ｖ）治療される疾患、障害又は病態、又はそれに関連する症状の進展又は発症を予防すること、（ｖｉ）治療される疾患、障害又は病態、又はそれに関連する症状の再発を防止すること、（ｖｉｉ）治療される疾患、障害、若しくは病態、又はそれに関連する症状を有する対象の入院を減少させること、（ｖｉｉｉ）治療される疾患、障害若しくは病態、

又はそれに関連する症状を有する対象の入院期間を短縮させること、（ｉｘ）治療される疾患、障害又は病態、又はそれに関連する症状を有する対象の生存率を高めること、（ｘｉ）治療される対象の疾患、障害若しくは病態、又はそれに関連する症状を阻害又は軽減すること、及び／又は（ｘｉｉ）別の治療の予防又は治療効果を強化又は改善すること。

【０１４５】

治療有効量又は用量は、治療される疾患、障害又は病態、投与手段、標的部位、対象の生理学的状態（例えば、年齢、体重、健康状態を含む）、対象がヒトであるか動物であるか、投与される他の薬剤、及び、治療が予防的なものであるか治療的なものであるか、などの様々な因子によって異なり得る。治療用量は、安全性及び有効性を最適化するために最適に滴定される。

【０１４６】

本明細書で使用されるとき、用語「治療する（treat）」、「治療する（treating）」、及び「治療（treatment）」はいずれも、疾患、障害又は病態に関連した少なくとも１つの測定可能な物理的パラメータの改善又は逆転を指すものであり、これは対象において必ずしも認識されるとは限らないが、対象において認識可能な場合もある。用語「治療する（treat）」、「治療する（treating）」、及び「治療（treatment）」はまた、疾患、障害、又は病態の退縮を生じる、その進行を防止する、又は少なくともその進行を遅らせることを指す場合もある。特定の実施形態では、「治療する（treat）」、「治療する（treating）」、及び「治療（treatment）」は、疾患、障害、若しくは病態に関連する１つ又は２つ以上の症状の緩和、進展若しくは発症の予防、又はその期間の短縮を指す。特定の実施形態では、「治療する（treat）」、「治療する（treating）」、及び「治療（treatment）」は、疾患、障害、又は病態の再発の防止を指す。特定の実施形態では、「治療する（treat）」、「治療する（treating）」、及び「治療（treatment）」は、疾患、障害、又は病態を有する対象の生存率の向上を指す。特定の実施形態では、「治療する（treat）」、「治療する（treating）」、及び「治療（treatment）」は、対象における疾患、障害、又は病態の消失を指す。

【０１４７】

一実施形態では、本発明は、必要とする対象において、肥満、又は肥満の任意の１つ若しくは２つ以上の症状を、予防、治療、発症遅延、若しくは寛解させるための方法を提供し、この方法は、有効量の本発明のコンジュゲート又は医薬組成物を、それを必要とする対象に投与することを含む。いくつかの実施形態では、対象の体重は、本明細書に記載される本発明のコンジュゲート、医薬組成物、剤形、又は薬剤のうち任意のものを投与する前の対象の体重に比べて、あるいは、本明細書に記載される本発明のコンジュゲート、医薬組成物、剤形、又は薬剤のうち任意のものの投与を受けていない対照対象と比べて、例えば、約０．０１％～約０．１％、約０．１％～約０．５％、約０．５％～約１％、約１％～約５％、約２％～約３％、約５％～約１０％、約１０％～約１５％、約１５％～約２０％、約２０％～約２５％、約２５％～約３０％、約３０％～約３５％、約３５％～約４０％、約４０％～約４５％、又は約４５％～約５０％、減少する。

【０１４８】

いくつかの実施形態では、この体重の減少は、例えば、約１週間、約２週間、約３週間、約１か月間、約２か月間、約３か月間、約４か月間、約５か月間、約６か月間、約７か月間、約８か月間、約９か月間、約１０か月間、約１１か月間、約１年間、約１．５年間、約２年間、約２．５年間、約３年間、約３．５年間、約４年間、約４．５年間、約５年間、約６年間、約７年間、約８年間、約９年間、約１０年間、約１５年間、又は約２０年間、維持される。

【０１４９】

本発明は、必要とする対象において、症候群、障害若しくは疾患、あるいは当該症候群、障害若しくは疾患の１つ若しくは２つ以上の症状を、予防、治療、発症遅延、若しくは寛解させるための方法を提供し、当該症候群、障害若しくは疾患は、肥満、１型又は２型糖尿病、メタボリックシンドローム（すなわち、シンドロームＸ）、インスリン抵抗性、

耐糖能異常（例えば、グルコース不耐性）、高血糖症、高インスリン血症、高トリグリセリド血症、脂質異常症、アテローム性動脈硬化症、糖尿病性ネフロパシー、及びその他の心臓血管危険因子（高血圧など）、及び管理されていないコレステロール及び／又は脂質レベルに関連する心臓血管危険因子、骨粗鬆症、炎症、非アルコール性脂肪性肝炎（ＮＡＳＨ）、腎疾患、並びに湿疹からなる群から選択され、この方法は、有効量の本発明のコンジュゲート又は医薬組成物を、それを必要とする対象に投与することを含む。

【０１５０】

本明細書で使用されるとき、メタボリックシンドロームは、高血糖（例えば、空腹時高血糖）、高血圧、コレステロール値異常（例えば、ＨＤＬ濃度が低い）、トリグリセリド値異常（例えば、トリグリセリドが高い）、胴囲が大きい（すなわち、胴回りが大きい）、腹部領域の脂肪増加、インスリン抵抗性、グルコース不耐性、Ｃ反応性タンパク質値が高い（すなわち、炎症誘発状態）、及び血漿プラスミノーゲン活性化抑制因子－１及びフィブリノーゲン濃度が高い（すなわち、血栓促進状態）のうち１つ又は２つ以上を有する対象を指す。

【０１５１】

本発明は、必要とする対象において、食物摂取を低減する方法を提供し、この方法は、有効量の本発明のコンジュゲート又は医薬組成物を、それを必要とする対象に投与することを含む。いくつかの実施形態では、対象の食物摂取は、本明細書に記載される本発明のコンジュゲート、組成物、剤形、薬剤、又はこれらの組み合わせのうち任意のものを投与する前の対象の食物摂取に比べて、あるいは、本明細書に記載される本発明のコンジュゲート、組成物、剤形、薬剤、又はこれらの組み合わせのうち任意のものの投与を受けていない対照対象と比べて、例えば、約０．０１％～約０．１％、約０．１％～約０．５％、約０．５％～約１％、約１％～約５％、約２％～約３％、約５％～約１０％、約１０％～約１５％、約１５％～約２０％、約２０％～約２５％、約２５％～約３０％、約３０％～約３５％、約３５％～約４０％、約４０％～約４５％、又は約４５％～約５０％、減少する。

【０１５２】

いくつかの実施形態では、この食物摂取の減少は、例えば、約１週間、約２週間、約３週間、約１か月間、約２か月間、約３か月間、約４か月間、約５か月間、約６か月間、約７か月間、約８か月間、約９か月間、約１０か月間、約１１か月間、約１年間、約１．５年間、約２年間、約２．５年間、約３年間、約３．５年間、約４年間、約４．５年間、約５年間、約６年間、約７年間、約８年間、約９年間、約１０年間、約１５年間、又は約２０年間、維持される。

【０１５３】

本発明は、必要とする対象において、グリコヘモグロビン（Ａ１Ｃ）を低減する方法を提供し、この方法は、有効量の本発明のコンジュゲート又は医薬組成物を、それを必要とする対象に投与することを含む。いくつかの実施形態では、対象のＡ１Ｃは、本明細書に記載される本発明のコンジュゲート、組成物、剤形、薬剤、又はこれらの組み合わせのうち任意のものを投与する前の対象のＡ１Ｃに比べて、あるいは、本明細書に記載される本発明のコンジュゲート、組成物、剤形、薬剤、又はこれらの組み合わせのうち任意のものの投与を受けていない対照対象と比べて、例えば、約０．００１％～約０．０１％、約０．０１％～約０．１％、約０．１％～約０．２％、約０．２％～約０．３％、約０．３％～約０．４％、約０．４％～約０．５％、約０．５％～約１％、約１％～約１．５％、約１．５％～約２％、約２％～約２．５％、約２．５％～約３％、約３％～約４％、約４％～約５％、約５％～約６％、約６％～約７％、約７％～約８％、約８％～約９％、又は約９％～約１０％、減少する。

【０１５４】

他の実施形態では、必要とする対象において、空腹時血糖値を低減するための方法が提供され、この方法は、有効量の本発明のコンジュゲート又は医薬組成物を、それを必要とする対象に投与することを含む。空腹時血糖値は、本明細書に記載される本発明のコンジ

ュゲート、組成物、剤形、薬剤、又はこれらの組み合わせのうち任意のものを投与する前の対象の空腹時血糖値に比べて、あるいは、本明細書に記載される本発明のコンジュゲート、組成物、剤形、薬剤、又はこれらの組み合わせのうち任意のものの投与を受けていない対照対象と比べて、例えば、約１４０～約１５０ｍｇ／ｄＬ未満、約１４０～約１３０ｍｇ／ｄＬ未満、約１３０～約１２０ｍｇ／ｄＬ未満、約１２０～約１１０ｍｇ／ｄＬ未満、約１１０～約１００ｍｇ／ｄＬ未満、約１００～約９０ｍｇ／ｄＬ未満、又は約９０～約８０ｍｇ／ｄＬ未満、低減され得る。

【０１５５】

本発明は、必要とする対象において、Ｙ２受容体活性を調節する方法を提供し、この方法は、有効量の本発明のコンジュゲート又は医薬組成物を、それを必要とする対象に投与することを含む。本明細書で使用されるとき、「調節する」とは、受容体活性を増加又は減少させることを指す。

【０１５６】

いくつかの実施形態では、有効量の本発明のコンジュゲート又はその剤形、組成物若しくは薬剤は、それを必要とする対象に、１日１回、１日２回、１日３回、１日４回、１日５回、１日６回、１日７回、又は１日８回投与される。他の実施形態では、有効量の本発明のコンジュゲート又はその剤形、組成物若しくは薬剤は、それを必要とする対象に、１日おきに１回、週に１回、週に２回、週に３回、週に４回、週に５回、週に６回、月に２回、月に３回、又は月に４回投与される。

【０１５７】

本発明の別の実施形態は、必要とする対象において、疾患、障害若しくは症候群、あるいは当該疾患、障害若しくは症候群の１つ若しくは２つ以上の症状を、予防、治療、発症遅延、若しくは寛解させるための方法を含み、この方法は、必要とする対象に、有効量の本発明のコンジュゲート又は医薬組成物を、併用療法で投与することを含む。特定の実施形態では、この併用療法は、第２の治療薬である。特定の実施形態では、この併用療法は、外科的療法である。

【０１５８】

本明細書で使用されるとき、用語「併用される」は、対象への２種以上の治療薬の投与との関連において、複数の治療の使用を指す。

【０１５９】

本明細書で使用されるとき、併用療法は、必要とする対象に、有効量の本発明のコンジュゲート又はその剤形、組成物若しくは薬剤と同時に、１つ若しくは２つ以上の追加の治療薬を投与、又は１つ若しくは２つ以上の外科療法を適用することを指す。いくつかの実施形態では、１つ又は２つ以上の追加の治療薬又は外科療法は、有効量の本発明のコンジュゲートと同じ日に投与することができ、他の実施形態では、１つ又は２つ以上の追加の治療薬又は外科療法は、有効量の本発明のコンジュゲートと同じ週又は同じ月に投与することができる。

【０１６０】

特定の実施形態では、疾患又は障害は、肥満、２型糖尿病、メタボリックシンドローム、インスリン抵抗性、及び脂質異常症からなる群から選択され、第２の治療薬は抗糖尿病薬であり得る。特定の実施形態では、この抗糖尿病薬は、グルカゴン様ペプチド－１（ＧＬＰ－１）受容体調節因子であり得る。

【０１６１】

本発明は更に、必要とする対象における、本明細書に記述される疾患、障害、症候群、又は症状のうちいずれかを、併用治療で予防、治療、発症遅延、若しくは寛解させることを想到し、この併用治療は、必要とする対象に対し、本発明のコンジュゲート又は医薬組成物の有効量を、以下の治療薬のうち１つ又は２つ以上と組み合わせて投与することを含む：ジペプチジルペプチダーゼ－４（ＤＰＰ－４）阻害剤（例えば、シタグリプチン、サクサグリプチン、リナグリプチン、アログリプチンなど）；ＧＬＰ－１受容体アゴニスト（例えば、エキセナチド及びリキシセナチドなどの短時間作用型ＧＬＰ－１受容体アゴニ

スト；リラグルチドなどの中間作用型ＧＬＰ－１受容体アゴニスト；エキセナチド延長放出、アルビグルチド、デュラグルチドなどの長時間作用型ＧＬＰ－１受容体アゴニスト）；ナトリウム－グルコース共輸送体－２（ＳＧＬＴ－２）阻害剤（例えば、カナグリフロジン（canaglifozin）、ダパグリフロジン（dapaglifozin）、エンパグリフロジン（empaglifozin）など）；胆汁酸隔離剤（例えば、コレセベラムなど）；ドーパミン受容体アゴニスト（例えば、ブロモクリプチン急速放出）；ビグアニド（例えば、メトホルミンなど）；インスリン；オキシントモジュリン；スルホニル尿素（例えば、クロルプロパミド、グリメピリド、グリピジド、グリブリド、グリベンクラミド、グリボルヌリド、グリソキセピド、グリクロピラミド、トラザミド、トルブタミド、アセトヘキサミド、カルブタミドなど）；及びチアゾリジンジオン（例えば、ピオグリタゾン、ロシグリタゾン、ロベグリタゾン、シグリタゾン、ダルグリタゾン、エングリタゾン、ネトグリタゾン、リボグリタゾン、トログリタゾンなど）。いくつかの実施形態では、追加の治療薬（複数可）の用量は、本発明のコンジュゲートと組み合わせて与えられる場合に低減される。いくつかの実施形態では、本発明のコンジュゲートと組み合わせて使用される場合、追加の治療薬は、それぞれが単独で使用される場合よりも低用量で使用されてもよい。

【０１６２】

特定の実施形態では、この疾患又は障害は、肥満、１型又は２型糖尿病、メタボリックシンドローム（すなわち、シンドロームＸ）、インスリン抵抗性、耐糖能異常（例えば、グルコース不耐性）、高血糖症、高インスリン血症、高トリグリセリド血症、先天性高インスリン症（ＣＨＩ）による低血糖、脂質異常症、アテローム性動脈硬化症、糖尿病性ネフロパシー、及びその他の心臓血管危険因子（高血圧など）、及び管理されていないコレステロール及び／又は脂質レベルに関連する心臓血管危険因子、骨粗鬆症、炎症、非アルコール性脂肪肝疾患（ＮＡＦＬＤ）、非アルコール性脂肪性肝炎（ＮＡＳＨ）、腎疾患、及び湿疹からなる群から選択され、第２の治療薬はリラグルチドであり得る。

【０１６３】

本発明は、それを必要とする対象における、本明細書に記述される疾患、障害、症候群、又は症状のうちいずれかを、併用治療で予防、治療、発症遅延、若しくは寛解させることを想到し、この併用治療は、それを必要とする対象に対し、本発明のコンジュゲート又は医薬組成物の有効量を、外科治療と組み合わせて投与することを含む。特定の実施形態では、この外科治療は、肥満手術（例えば、Ｒｏｕｘ－ｅｎ－Ｙ胃バイパス手術などの胃バイパス手術；スリーブ胃切除術；調節可能胃バンド手術；十二指腸スイッチによる胆膵路変更術；胃内バルーン；胃縫縮術、及びこれらの組み合わせ）であり得る。

【０１６４】

１つ又は２つ以上の追加の治療薬が、有効量の本発明のコンジュゲートと同じ日に投与される実施形態では、本発明のコンジュゲートは、追加の治療薬の前、後、又は同時に投与され得る。「併用される」という用語の使用は、治療が対象に投与される順序を限定しない。例えば、第１の治療（例えば、本明細書に記載される組成物）を、対象への第２の治療の投与前に（例えば、５分、１５分、３０分、４５分、１時間、２時間、４時間、６時間、１２時間、１６時間、２４時間、４８時間、７２時間、９６時間、１週間、２週間、３週間、４週間、５週間、６週間、８週間、又は１２週間前）、投与と同時に、又は投与後に（例えば、５分、１５分、３０分、４５分、１時間、２時間、４時間、６時間、１２時間、１６時間、２４時間、４８時間、７２時間、９６時間、１週間、２週間、３週間、４週間、５週間、６週間、８週間、又は１２週間後）投与することができる。

【０１６５】

実施形態

本発明は以下の非限定的な実施形態を更に提供する。

【０１６６】

実施形態１は、完全ヒトＩｇ生殖系列Ｖ遺伝子配列を有する軽鎖可変領域と、配列番号１８のアミノ酸配列を有するＨＣＤＲ３を除く完全ヒトＩｇ生殖系列Ｖ遺伝子配列を有する重鎖可変領域とを含む、単離された抗体又はその抗原結合フラグメントであり、抗体又

はその抗原結合フラグメントは、インビボで任意のヒト抗原に特異的に結合しない。
【０１６７】
実施形態２は、単離された抗体又はその抗原結合フラグメントが、それぞれ配列番号１６、１７、１８、１９、２０、及び２１のポリペプチド配列を有する、重鎖相補性決定領域１（ＨＣＤＲ１）、ＨＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３、及び軽鎖相補性決定領域１（ＬＣＤＲ１）、ＬＣＤＲ２、及びＬＣＤＲ３を含む、実施形態１に記載の単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントである。
【０１６８】
実施形態３は、単離されたモノクローナル抗体が、配列番号１２のポリペプチド配列を有する重鎖可変ドメイン（ＶＨ）、及び配列番号１４のポリペプチド配列を有する軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）を含む、実施形態３は、実施形態２に記載の単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントである。
【０１６９】
実施形態４は、Ｆｃ部分を更に含む、実施形態１～３のいずれか一つに記載の単離されたモノクローナル抗体である。
【０１７０】
実施形態５は、Ｆｃ部分が、ヒトＩｇＧ４　Ｆｃ領域に由来するＦｃ領域を更に含む、実施形態４に記載の単離されたモノクローナル抗体である。
【０１７１】
実施形態６は、ヒトＩｇＧ４　Ｆｃ領域が、エフェクター機能を排除する置換を有する、実施形態５に記載の単離されたモノクローナル抗体である。
【０１７２】
実施形態７は、モノクローナル抗体が、残基２３３におけるグルタミン酸のプロリンでの置換、残基２３４におけるフェニルアラニンのアラニン又はバリンでの置換、残基２３５におけるロイシンのアラニン又はグルタミン酸での置換、並びに残基２９７におけるアスパラギンのアラニンでの置換からなる群から選択される少なくとも１つの置換を含む、修飾ヒトＩｇＧ４　Ｆｃ領域を更に含む、実施形態６に記載の単離されたモノクローナル抗体である。
【０１７３】
実施形態８は、ヒトＩｇＧ４　Ｆｃ領域が、位置２２８におけるセリンのプロリンへの置換を含む、実施形態６又は７に記載の単離されたモノクローナル抗体である。
【０１７４】
実施形態９は、配列番号１３のポリペプチド配列を有する重鎖（ＨＣ）と、配列番号１５のポリペプチド配列を有する軽鎖（ＬＣ）とを含む、実施形態４～８のいずれか一つに記載の単離されたモノクローナル抗体である。
【０１７５】
実施形態１０は、実施形態１～９のいずれか一つに記載のモノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントをコードする、単離された核酸である。
【０１７６】
実施形態１１は、実施形態１０に記載の単離された核酸を含むベクターである。
【０１７７】
実施形態１２は、実施形態１１に記載のベクターを含む宿主細胞である。
【０１７８】
実施形態１３は、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントを産生する方法であって、方法は、実施形態１２に記載の宿主細胞を、モノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントを産生する条件下で培養することと、抗体又はその抗原結合フラグメントを細胞又は培養物から回収することと、を含む。
【０１７９】
実施形態１４は、それにコンジュゲートされた少なくとも１つの薬理学的活性部分を更に含む、実施形態１～９のいずれか一つに記載の単離されたモノクローナル抗体又はその

抗原結合フラグメントである。

【０１８０】

実施形態１５は、薬理学的活性部分が治療用ペプチドである、実施形態１４に記載の単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントである。

【０１８１】

実施形態１６は、治療用ペプチドが配列番号１８のシステイン残基にコンジュゲートしている、実施形態１５に記載の単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントである。

【０１８２】

実施形態１７は、治療用ペプチドが、リンカーを介して抗体又はその抗原結合フラグメントにコンジュゲートしている、実施形態１５又は１６に記載の単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントである。

【０１８３】

実施形態１８は、リンカーが、ペプチドリンカー、炭化水素リンカー、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）リンカー、ポリプロピレングリコール（ＰＰＧ）リンカー、多糖類リンカー、ポリエステルリンカー、又はＰＥＧ及び組み込み複素環からなるハイブリッドリンカーを含む、実施形態１７に記載の単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントである。

【０１８４】

実施形態１９は、治療用ペプチドが、オキシントモジュリン、グルカゴン様ペプチド１（ＧＬＰ１）、ペプチドチロシンチロシン（ＰＹＹ）、エキセンジン（エキセナチド）、アミリン（プラムリンタイド）、α－メラノサイト刺激ホルモン（ＭＳＨ）、コカイン及びアンフェタミン調節転写物（ＣＡＲＴ）、神経ペプチドＹ受容体Ｙ１（ＮＰＹ１）拮抗薬、神経ペプチドＹ受容体Ｙ５（ＮＰＹ５）拮抗薬、ニューロテンシンＳ、神経ペプチドＢ、神経ペプチドW、グレリン、ボンベシン様受容体３（ＢＲＳ３）、ガラニン、コレシストキニン（ＣＣＫ）、オレキシン、メラニン濃縮ホルモン（ＭＣＨ）、オキシトシン、並びにストレスコピンからなる群から選択される、実施形態１５～１８のいずれか一つに記載の単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントである。

【０１８５】

実施形態２０は、治療用ペプチドが、配列番号２４のポリペプチド配列を含むオキシントモジュリンである、実施形態１９に記載の単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントである。

【０１８６】

実施形態２１は、オキシントモジュリン治療用ペプチドに結合されたモノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントを含むコンジュゲートであり、コンジュゲートは、図１１に示される配列番号２７の構造を有し、図中、ｍＡｂは、実施形態１～９のいずれか一つに記載のモノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントを表し、$]_2$は、オキシントモジュリン治療用ペプチドがｍＡｂに共有結合でコンジュゲートしていることを表す。

【０１８７】

実施形態２２は、実施形態１５～２１のいずれか一つに記載の単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントを生成する方法であり、方法は、治療用ペプチドの側鎖上に導入された求電子物質（好ましくはブロモアセトアミド又はマレイミド）を、モノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントの配列番号１８のシステイン残基のスルフヒドリル基と反応させ、これにより、治療用ペプチドと、モノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントとの間に共有結合を形成することを含む。

【０１８８】

実施形態２３は、実施形態１４～２１のいずれか一つに記載の単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントと、薬学的に許容可能な担体とを含む、医薬組成物である。

【０１８９】

実施形態２４は、実施形態１４～２１のいずれか一つに記載のモノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントを含む医薬組成物を製造する方法であって、方法は、モノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントを、薬学的に許容可能な担体と組み合わせて、医薬組成物を得ることを含む。

【０１９０】

実施形態２５は、実施形態１～９及び１４～２１のいずれか一つに記載のモノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントを含むキットである。

【０１９１】

実施形態２６は、対象における治療用ペプチドの半減期を延長する方法であって、方法は、治療用ペプチドを、それぞれ配列番号１６、１７、１８、１９、２０、及び２１のポリペプチド配列を有する、重鎖相補性決定領域１（ＨＣＤＲ１）、ＨＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３、及び軽鎖相補性決定領域１（ＬＣＤＲ１）、ＬＣＤＲ２、及びＬＣＤＲ３を含む、単離モノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントとコンジュゲートさせることを含み、治療用ペプチドは、配列番号１８のＣｙｓ残基で、モノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントにコンジュゲートされる。

【０１９２】

実施形態２７は、治療用ペプチドが、オキシントモジュリン、グルカゴン様ペプチド１（ＧＬＰ１）、ペプチドチロシンチロシン（ＰＹＹ）、エキセンジン（エキセナチド）、アミリン（プラムリンタイド）、α－メラノサイト刺激ホルモン（ＭＳＨ）、コカイン及びアンフェタミン調節転写物（ＣＡＲＴ）、神経ペプチドＹ受容体Ｙ１（ＮＰＹ１）拮抗薬（antagnoists）、神経ペプチドＹ受容体Ｙ５（ＮＰＹ５）拮抗薬、ニューロテンシンＳ、神経ペプチドＢ、神経ペプチドW、グレリン、ボンベシン様受容体３（ＢＲＳ３）、ガラニン、コレシストキニン（ＣＣＫ）、オレキシン、メラニン濃縮ホルモン（ＭＣＨ）、オキシトシン、並びにストレスコピンからなる群から選択される、実施形態２６に記載の方法である。

【０１９３】

実施形態２８は、治療用ペプチドがオキシントモジュリンである、実施形態２７に記載の方法である。

【０１９４】

実施形態２９は、オキシントモジュリンが、配列番号２４のポリペプチド配列を有する、実施形態２８に記載の方法である。

【０１９５】

実施形態３０は、モノクローナル抗体が、配列番号１２のポリペプチド配列を有する重鎖可変ドメイン（ＶＨ）を含む、実施形態２５～２９のいずれか一つに記載の方法である。

【０１９６】

実施形態３１は、モノクローナル抗体が、配列番号１３のポリペプチド配列を有する重鎖（ＨＣ）を含む、実施形態２５～３０のいずれか一つに記載の方法である。

【０１９７】

実施形態３２は、モノクローナル抗体が、配列番号１４のポリペプチド配列を有する軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）を含む、実施形態２５～３１のいずれか一つに記載の方法である。

【０１９８】

実施形態３３は、モノクローナル抗体が、配列番号１５のポリペプチド配列を有する軽鎖（ＬＣ）を含む、実施形態２５～３２のいずれか一つに記載の方法である。

【０１９９】

実施形態３４は、配列番号１８を含む重鎖相補性決定領域３を含む、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントであり、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントは、治療用ペプチドに結合することができる。

【実施例】

【０２００】

実施例１：ｍＡｂ　ＭＳＣＢ９７の同定及び産生

操作のための出発Ｖ領域としてＰＨ９Ｌ３　ＶＬ及びＰＨ９Ｈ５　ＶＨを選択
ＰＨ９Ｌ３と命名された抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）（配列番号３）（Ｔｅｐｌｙａｋｏｖ ｅｔ ａｌ．，「Ｓｔｒｕｃｔｕｒａｌ ｄｉｖｅｒｓｉｔｙ ｉｎ ａ ｈｕｍａｎ ａｎｔｉｂｏｄｙ ｇｅｒｍｌｉｎｅ ｌｉｂｒａｒｙ，」ｍＡｂｓ Ａｕｇ－Ｓｅｐ ８（６）：１０４５～６３（２０１６））、及びＰＨ９Ｈ５と命名された抗体重鎖可変領域（ＶＨ）（配列番号４）（Ｔｅｐｌｙａｋｏｖ ｅｔ ａｌ．，「Ｓｔｒｕｃｔｕｒａｌ ｄｉｖｅｒｓｉｔｙ ｉｎ ａ ｈｕｍａｎ ａｎｔｉｂｏｄｙ ｇｅｒｍｌｉｎｅ ｌｉｂｒａｒｙ，」ｍＡｂｓ Ａｕｇ－Ｓｅｐ ８（６）：１０４５～６３（２０１６））が、ペプチドコンジュゲートを可能にするｍＡｂを操作する出発可変領域として選択された。ＰＨ９Ｌ３は、ヒトＩｇ生殖系列Ｖ遺伝子配列を完全に含み、これにより、高い親和性の抗原特異的結合をもたらし得るインビボ親和性成熟プロセスによる配列突然変異は含有しない。ＰＨ９Ｈ５のＣＤＲ３は、そのＶＨにヒト生殖系列Ｖ遺伝子配列を含まない唯一のセグメントである。ＰＨ９Ｈ５のＣＤＲ３（配列番号５）は、抗ヒトＣＣＬ２抗体、ＣＮＴＯ　８８８、中和ＣＣＬ２抗体のＣＤＲ３と同一であり、例えば、米国特許出願公開第２０１０００７４８８６（Ａ１）号を参照されたい（ＣＮＴＯ　８８８についての関連開示は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。ＰＨ９Ｈ５／ＰＨ９Ｌ３　ＶＨ／ＶＬ対を含むＦａｂが生成された。

【０２０１】

ＰＨ９Ｌ３、ＰＨ９Ｈ５と、これらが最も類似するヒトＩｇ生殖系列Ｖ領域及びＪ領域配列を整列させて、生殖系列配列に対する配列同一性又は類似性を決定した。ＰＨ９Ｈ５は、ヒトＩｇ生殖系列遺伝子ＩＧＨＶ３－２３＊０１（ＰｕｂＭｅｄ　ＩＤ：Ｍ９９６６０）（配列番号７）及びヒトＩＧＨＪ１＊０１（ＰｕｂＭｅｄ　ＩＤ：Ｊ００２５６）（配列番号８）の連結（配列番号６）に整列させ、ＰＨ９Ｈ５アミノ酸配列と、連結されたヒトＩＧＨＶ３－２３＊０１－ＩＧＨＪ１＊０１配列との間の差異のみがＶＨ　ＣＤＲ３であり、これがＰＨ９Ｈ５の配列番号５となった。

【０２０２】

ＰＨ９Ｌ３は、ヒトＩｇ生殖系列遺伝子ＩＧＫＶ３－１１＊０１（ＰｕｂＭｅｄ　ＩＤ：Ｘ０１６６８）（配列番号１０）及びＩＧＫＪ１＊０１（ＰｕｂＭｅｄ　ＩＤ：Ｊ００２４２）（配列番号１１）の連結（配列番号９）に整列させ、その差異のみが、Ｖ遺伝子／Ｊ遺伝子結合における唯一の偏差となった。

【０２０３】

ＰＨ９Ｈ５及びＰＨ９Ｌ３のＣｙｓ置換変異体の設計及び生成
Ｖ領域の３つ全てのＣＤＲにわたって選択されたＣＤＲ残基に単一のＣｙｓ置換を含有するＰＨ９Ｈ５　ＶＨの変異体を設計し、生成し、ヒトＩｇＧ１定常領域を有する完全な重鎖として哺乳類宿主発現ベクターにクローニングした。ＰＨ９Ｈ５／ＰＨ９Ｌ３　Ｆａｂ構造を利用して、コンジュゲートのためによりアクセスしやすくなるよう、置換のためのＣＤＲ残基の選択を補助した。またいくつかの変異体において、追加のグリシン（Ｇｌｙ）残基を、導入されたＣｙｓ残基のいずれかの側に挿入して、コンジュゲートのためのＣｙｓのアクセスしやすさを潜在的に高めた。ＰＨ９Ｌ３　ＶＬの同様の変異体を設計し、生成した。ただしこれらは、ヒトκ定常領域を有する完全軽鎖として発現ベクターにクローニングされた。ＰＨ９Ｈ５の単一Ｃｙｓ変異体の２４の発現構築物及びＰＨ９Ｌ３の単一Ｃｙｓ変異体の２２の発現構築物が生成された。ＰＨ９Ｈ５＿ＶＨ（配列番号４）内及びＰＨ９Ｌ３＿ＶＬ（配列番号３）内の置換のために選択された残基を図２にまとめる。

【０２０４】

生成された発現構築物を使用して、野生型ＰＨ９Ｌ３　ＬＣ構築物を有する各ＰＨ９Ｈ５ベースのＨＣ　Ｃｙｓ変異体構築物を一過性共トランスフェクションすることにより、又は、野生型ＰＨ９Ｈ５　ＨＣ構築物を有する各ＰＨ９Ｌ３ベースのＬＣ　Ｃｙｓ変異体構築物を共トランスフェクションすることによって、Ｃｙｓ変異体を発現させた。初期試験トランスフェクションは、ＨＥＫ由来のＥｘｐｉ２９３を発現宿主として使用し、２０ｍＬのスケールで行った。ＨＣ及びＬＣ　Ｃｙｓの両方の変異体の大部分は、培養上清から

の変異タンパク質定量に基づき、良好に発現した。

【０２０５】

５つの初期ＨＣ　Ｃｙｓ変異体、ＭＳＣＢ３３－ＭＳＣＢ３７を、７５０ｍＬのスケールでＥｘｐｉ２９３で発現させ、変異体タンパク質を精製した。精製された変異体の精製収率及び品質特性は非常に類似しており、初期ペプチドコンジュゲート反応において精製タンパク質を使用するのに十分であった。

【０２０６】

ＰＨ９Ｈ５ベースのＨＣ　Ｃｙｓ変異体に対するペプチドコンジュゲートの評価

ＭＳＣＢ３３タンパク質及び他の変異体タンパク質の分析質量決定は、ｍＡｂ当たり２つの、コンジュゲートのために操作されたＣｙｓにおけるシステイン付加物の存在を示し、並びに、組み換えにより産生されたｍＡｂに一般的に見られるＨＣ　Ｃ末端Ｌｙｓ残基の除去を示した。コンジュゲートのための変異体ｍＡｂを調製するために、ｍＡｂ内の天然ジスルフィド結合を維持するために開発された還元プロセスによって付加物を除去した（実施例３を参照）。ヒトオキシントモジュリン（ＯＸＭ）ペプチド類似体（ＧＣＧ　Ａｉｂ２、Ｇｌｙ１６，２４、Ａｒｇ２０、Ｌｅｕ２７、Ｌｙｓ３０（ＰＥＧ$_{12}$）－ＮＨ$_2$）との初期試験コンジュゲートは、５つ全てのＨＣ　Ｃｙｓ変異体ｍＡｂ上でマレイミド化学を利用して行った。コンジュゲート効率はｍＡｂ変異体の間で異なっており、これは、コンジュゲート反応生成物及びそれぞれの相対的パーセンテージによって定性的に推定された。最も高い効率は（ホモ二量体生成物の最大割合によって測定）、フランキングＧｌｙ残基を含有する他のＩ１０２Ｃ変異体に比べ、ＭＳＣＢ３３で観察された。Ｙ１０３Ｃ変異体ＭＳＣＢ３５又はＭＳＣＢ３７では、コンジュゲートはほとんど又は全く観察されなかった。

【０２０７】

様々なＣＤＲ（ＰＨ９Ｈ５＿ＶＨ（配列番号１２９）におけるＴ２８Ｃ、Ｓ３０Ｃ，及びＳ５４Ｃ置換、並びにＰＨｐＬ３＿ＶＬ（配列番号１２８）におけるＳ３０Ｃ及びＳ９２Ｃ置換）における改変システイン置換を有する、他のいくつかのＨＣ及びＬＣ　Ｃｙｓ変異体を、Ｅｘｐｉ２９３において大きなスケールで発現させた。還元によるこれらの精製タンパク質からのＣｙｓ付加物の除去は困難であり、これらの変異体はこれ以上追求されなかった。最も多くのＣｙｓ変異体で観察された課題と、Ｉ１０２Ｃ　ＰＨ９Ｈ５変異体ｍＡｂ、ＭＳＣＢ３３で観察された良好なコンジュゲート初期効率により、この特定の変異体に焦点を合わせたプロセス開発、及び更なる操作努力が行われた。

【０２０８】

ＭＳＣＢ３３のＦｃ操作

ＭＳＣＢ３３は、インビボでのＦｃ機能を低減するために、サイレントのヒトＩｇＧ４＿ＰＡＡ　Ｆｃを含有するように再操作した。ヒトＩｇＧ４＿ＰＡＡは、ヒトＩｇＧ４アロタイプｎＧ４ｍ（ａ）上に突然変異Ｓ２２８Ｐ／Ｆ２３４Ａ／Ｌ２３５Ａを有する（ＩＭＧＴに定義されるＩＧＨＧ４＊０１対立遺伝子に基づく）。ＩｇＧ４＿ＰＡＡ　Ｆｃに融合したＭＳＣＢ３３のＶＨを有する発現構築物を生成し、ＭＳＣＢ３３発現に使用した同じＬＣ発現構築物と共に使用して、ＭＳＣＢ３３のＩｇＧ４＿ＰＡＡ変異体を産生した。これをＭＳＣＢ９７と命名する。ＭＳＣＢ９７　ＶＨ、ＨＣ、ＶＬ、及びＬＣのアミノ酸配列は、それぞれ配列番号１２、１３、１４、及び１５により提供される。

【０２０９】

ＭＳＣＢ９７の試験発現は、Ｅｘｐｉ２９３細胞において２０ｍＬのスケールで一過性に行われ、このｍＡｂ変異体は良好に発現した。ＭＳＣＢ９７を大きなスケールのＥｘｐｉ２９３発現実験から精製した。ＭＳＣＢ９７の精製収率は２６４．５３ｍｇ／Ｌであり、品質はモノマー種８５％と測定された。その後のより大きなスケールの発現実験及び精製は、収率及び品質が同様又はより良好であり、このｍＡｂが産生され得る一貫性を示した。

【０２１０】

ＭＳＣＢ９７に対するペプチドコンジュゲートの評価とコンジュゲート反応のスケーラ

ビリティ
　ＬＣ－ＨＣジスルフィド結合は、ＩｇＧ１とＩｇＧ４のアイソタイプとの間で異なるため、還元及びマレイミドコンジュゲートを試験し、上記のＯＸＭ－マレイミド試験ペプチドのＴＣＥＰ還元及びコンジュゲートを使用して、ＩｇＧ１　ｍＡｂ　ＭＳＣＢ３３からＩｇＧ４＿ＰＡＡ　ｍＡｂ　ＭＳＣＢ９７へ移動可能であることが確認された。マレイミドコンジュゲートから生じる結合は、潜在的に可逆性であることが知られており、したがって、より安定した結合をもたらすブロモアセトアミドコンジュゲート化学を採用し、出発ＭＳＣＢ９７に基づいて１０ｍｇスケールで成功裏に実施された。
【０２１１】
　ブロモアセトアミド化学により生成されたＯＸＭ類似体ＧＣＧ　Ａｉｂ２、Ｇｌｕ１６、２４、Ａｒｇ２０、Ｌｅｕ２７、Ｌｙｓ３０－ε－（ＰＥＧ$_{12}$）－ＮＨ$_2$のＭＳＣＢ９７コンジュゲート（化合物２－「化合物２」及び「コンジュゲート２」は、本明細書では互換的に使用することができる）（ＭＳＣＢ９７は、Ｈ－Ａｉｂ－ＱＧＴＦＴＳＤＹＳＫＹＬＤＥＲＲＡＲＤＦＶＥＷＬＬＮＴＫ－（ＣＯＣＨ$_2$ＣＨ$_2$（ＯＣＨ$_2$ＣＨ$_2$）$_{12}$ＮＨＣＯＣＨ$_2$Ｂｒ）－ＮＨ$_2$（配列番号２４）とコンジュゲートして化合物２（図１１、配列番号２７）を形成する）をアッセイして、インビトロのＧＬＰ－１Ｒ及びＧＣＧＲの効力を決定した。参照ペプチド及び参照非構造化ペプチドコンジュゲートと比較した効力は妥当であり、ＭＳＣＢ３３（ＩｇＧ１）と同じペプチドで生成されたコンジュゲートのものと同様であった。このことによって、アイソタイプであるＭＳＣＢ９７（ＩｇＧ４＿ＰＡＡ）とＭＳＣＢ３３（ＩｇＧ１）との間の単一の差は、同じペプチドを含有するコンジュゲートの効力に影響を与えないことが実証された。加えて、これらのデータは、望ましいインビトロ効力が、インビボで安定である結合を生成するブロモアセトアミド化学により生成されたペプチド－ｍＡｂコンジュゲートに保持され得ることを示した。他のＯＸＭ類似体もＭＳＣＢ９７にコンジュゲートし、これらのコンジュゲートのインビトロ効力のアッセイを行った。これらのコンジュゲートは、ペプチド効力を保持しながら、様々なペプチドをＭＳＣＢ９７にコンジュゲートさせる能力を備え、化合物２と同様のＧＬＰ－１Ｒ及びＧＣＧＲの効力を有した。
【０２１２】
　ヒトＣＣＬ２に結合するペプチド－ＭＳＣＢ９７コンジュゲートの評価
　ＭＳＣＢ９７は、特定の抗原結合の欠如のために選択及び操作されたが、このｍＡｂが結合する可能性が最も高い抗原は、もしあれば、ＶＨ　ＣＤＲ３の起源に基づきヒトＣＣＬ２である。２つのペプチド－ＭＳＣＢ９７コンジュゲート体を、ＯＸＭペプチド類似体（化合物２）、又はＰＹＹペプチド類似体（化合物１－「化合物１」及び「コンジュゲート体１」は、本明細書では互換的に使用することができる）と共に用いて、ＭＳＣＢ９７が任意の特定のＣＣＬ２結合を示すかどうかを評価した。
【０２１３】
　潜在的なＣＣＬ２結合は、表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）によって直接測定され、この表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）では、抗Ｆｃ捕捉法を用いてコンジュゲートが表面固定化された。市販の抗ＣＣＬ２マウスｍＡｂを陽性対照とし、２つの非特異的ヒト抗体ＣＮＴＯ　９４１２及びＨＨ３Ｂ３３を陰性対照とした。全ての対照は同様に表面固定化され、組換えヒトＣＣＬ２を固定化コンジュゲート上に流し、最大４００ｎＭの濃度で制御した。事前確立されたアッセイ基準に基づいて、特定の抗原結合を示すＣＣＬ２蓄積は、陽性対照では観察されたが陰性対照では観察されず、いずれのペプチド－ＭＳＣＢ９７コンジュゲート（化合物１又は２）にも観察されなかった。これにより、ペプチド－ｍＡｂコンジュゲートの関連する治療形態において、ＭＳＣＢ９７がヒトＣＣＬ２結合を欠くことが確認された。
【０２１４】
　ＳＰＲ結合法：ＰｒｏｔｅＯｎ　ＸＰＲ３６システム（ＢｉｏＲａｄ）を使用して、表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）を用いた結合測定を実施した。アミンカップリング化学反応についての製造元の使用説明書を使用し、抗ヒトＩｇＧ　Ｆｃ（Ｊａｃｋｓｏｎカタログ

番号１０９－００５－０９８）と抗マウスＩｇＧ　Ｆｃ（Ｊａｃｋｓｏｎカタログ番号３１５－００５－０４６）との混合物を、ＧＬＣチップ（ＢｉｏＲａｄ，カタログ番号１７６－５０１１）の加工アルギン酸ポリマー層にカップリングさせて、バイオセンサ表面を調製した。約５７００ＲＵ（応答単位）のｍＡｂを固定化した。結合実験を、ランニング緩衝液中、２５℃で実施した（ＤＰＢＳ；０．０１％Ｐ２０；１００μｇ／ｍＬ　ＢＳＡ）。結合動態実験を実施するために、サンプル（化合物２、化合物１、及び対照ｍＡｂ陽性及び陰性）を捕捉し、続いて、５つの濃度（４倍連続希釈）で、組換えヒトＣＣＬ２（Ｔｈｅｒｍｏ、カタログ番号ＲＭＣＰ１２０）を注入した。５０μＬ／分で３分間会合段階をモニターした後、５分間緩衝液を流した（解離段階）。１００μＬ／分で１００ｍＭH_3PO_4（Ｓｉｇｍａ、カタログ番号７９６１）を１８秒間ずつ２回流してチップ表面を再生した。

【０２１５】

回収したデータをＰｒｏｔｅＯｎ　Ｍａｎａｇｅｒソフトウェアを用いて処理した。まず、インタースポットを用いてバックグラウンドについてデータを補正した。次いで、分析物注入用の緩衝液注入を使用して、データのダブルリファレンスサブトラクション（double reference subtraction）を行った。化合物２、化合物１、及び陽性対照の、ＣＣＬ２に対する特定の検出可能結合を決定するための事前確立されたアッセイ基準には、最高濃度での＞１０　ＲＵ信号での用量比例応答、及び陰性対照応答信号＜１０　ＲＵを必要とした。アッセイ基準に基づいて、各サンプルについての結果を、ヒトＣＣＬ２への用量応答結合について「あり」又は「なし」として報告した。

【０２１６】

実施例２：ｍＡｂの発現及び精製

完全ヒトモノクローナル抗体（ｍＡｂ）は、哺乳類発現宿主において組換え的に発現され、当該技術分野において既知の標準的な方法を用いて細胞培養上清から精製することができる。例えば、ｍＡｂの軽鎖（ＬＣ）及び重鎖（ＨＣ）（分泌を可能にする適切なシグナルペプチドをそれぞれ含む）をコードするｃＤＮＡ配列を、標準的な分子生物学的方法を使用して、別個の哺乳類発現ベクター又は単一の発現ベクターにクローニングすることができる。使用される発現ベクターは、ｐＥＥ１２．４、ｐｃＤＮＡ（商標）３．１（＋）、又はｐＩＲＥＳｐｕｒｏ３などの市販のもの、又は類似の機能を有する任意のカスタム発現ベクターであり得る。かかるベクターでは、ｍＡｂの重鎖及び軽鎖の転写はそれぞれ、ｈＣＭＶ－ＭＩＥプロモーターなどの既知の有効プロモーターのいずれかによって駆動される。トランスフェクション等級のプラスミドＤＮＡは、ＱｉａｇｅｎプラスミドＭｉｄｉ　Ｋｉｔなどの標準的な方法を用いて、別個のＬＣ及びＨＣ発現構築物、又はＬＣ及びＨＣの両方を発現する単一の構築物のために調製される。

【０２１７】

精製プラスミドＤＮＡは、Ｆｒｅｅｓｔｙｌｅ（商標）Ｍａｘトランスフェクション試薬などの脂質ベースのトランスフェクション試薬でのトランスフェクションのために調製され（製造業者の指示に従う）、次いで、ＣＨＯ－Ｓ又はＨＥＫ　２９３－Ｆなどの標準的な哺乳類発現宿主細胞株にトランスフェクトする。ｍＡｂ　ＬＣ及びＨＣが別個の発現構築物によってコードされる場合、２つの構築物は同時にトランスフェクトされる。トランスフェクションの前及び後に、哺乳類細胞を、維持のために、又はｍＡｂ発現のために、標準的な細胞培養法に従って培養し、それにより、細胞密度は維持のための範囲であり、使用する培養培地、及びその後の他の細胞培養条件は、利用される具体的な哺乳類宿主細胞株によって決定される。これらのパラメータは、典型的には、細胞株を入手した業者により文書化され、又は科学文献に記載されている。例えば、ＣＨＯ－Ｓ細胞は、懸濁液中ＣＨＯ　Ｆｒｅｅｓｔｙｌｅ（商標）培地に維持し、３７℃及び８％CO_2に設定された加湿インキュベータ内で１２５ＲＰＭで振盪し、細胞濃度が１．５～２．０×10^6個／ｍＬであるときに分割する。

【０２１８】

ｍＡｂを発現する一過性トランスフェクションされた哺乳類細胞からの細胞培養上清を

、トランスフェクションの数日後に採取し、遠心分離により清澄化し、濾過する。ＣＨＯ－Ｓ細胞の発現持続時間は、典型的には４日間であるが、調節することができ、異なる哺乳類宿主細胞株に関して異なり得る。大きなスケールのトランスフェクション（＞１０リットル）は、Ｃｅｎｔｒａｍａｔｅなどの濃縮装置を使用して１０倍濃縮される。ｍＡｂは、タンパク質Ａ親和性カラム（ＨｉＴｒａｐ　ＭａｂＳｅｌｅｃｔ　Ｓｕｒｅなど）を用い、ｍＡｂをタンパク質Ａ樹脂に結合させ、樹脂を洗浄し、低ｐＨ緩衝液を使用してタンパク質を溶出させる標準的な方法を利用して、清澄化された上清から精製される。タンパク質画分は、ｐＨ７緩衝液を含有する試験管に溶出させることによって直ちに中和され、ピーク画分をプールし、濾過し、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）、ｐＨ７．２で一晩、４℃で透析する。透析後、ｍＡｂを再度濾過し（０．２μｍフィルター）、タンパク質濃度を２８０ｎｍでの吸光度によって測定する。精製されたｍＡｂタンパク質の品質は、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ（ポリアクリルアミドゲル電気泳動）及び分析用サイズ排除ＨＰＬＣによって評価され、エンドトキシン濃度は、リムルスアメーバサイトライセート（ＬＡＬ）アッセイを使用して測定される。精製したｍＡｂを４℃で保存する。

【０２１９】

一過性トランスフェクションされたＣＨＯ細胞からのＭＳＣＢ９７の発現及び精製

ＭＳＣＢ９７は、ＥｘｐｉＣＨＯ－Ｓ（商標）細胞（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ（Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ）、カタログ番号Ａ２９１２７）中で、ＭＳＣＢ９７発現構築物の精製プラスミドＤＮＡを用い、製造者の推奨に従って、一過性トランスフェクションにより、発現させた。簡潔に述べると、ＥｘｐｉＣＨＯ－Ｓ（商標）細胞を、３７℃、８％CO_2及び１２５ＲＰＭに設定した振盪インキュベータ内で、ＥｘｐｉＣＨＯ（商標）発現培地（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号Ａ２９１００）中の懸濁液中に維持した。細胞を継代し、これによりトランスフェクションの日に、１ｍＬ当たり6.0×10^6個に希釈することができ、細胞生存率を９８％以上に維持することができた。一過性トランスフェクションは、ＥｘｐｉＦｅｃｔａｍｉｎｅ（商標）ＣＨＯトランスフェクションキット（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃカタログ番号Ａ２９１３１）を使用して行った。トランスフェクトされる希釈細胞の１ｍＬごとに、１マイクログラムのプラスミドＤＮＡを使用し、ＯｐｔｉＰＲＯ（商標）ＳＦＭ錯体化培地に希釈する。ＥｘｐｉＦｅｃｔａｍｉｎｅ（商標）ＣＨＯ試薬は、１：３の比（ｖ／ｖ、ＤＮＡ：試薬）で使用され、これもＯｐｔｉＰＲＯ（商標）に希釈される。希釈したＤＮＡ及びトランスフェクション試薬を合わせて１分間おき、ＤＮＡ／脂質錯体形成を行わせ、次いで細胞に添加した。一晩インキュベートした後、ＥｘｐｉＣＨＯ（商標）フィード及びＥｘｐｉＦｅｃｔａｍｉｎｅ（商標）ＣＨＯエンハンサを細胞に添加した。細胞を３２℃で５日間振盪しながら培養し、培養上清を回収した。

【０２２０】

一過性トランスフェクションされたＥｘｐｉＣＨＯ－Ｓ（商標）細胞からの培養上清を、遠心分離（３０分間、６０００ｒｐｍ）によって清澄化した後、濾過（０．２μｍ　ＰＥＳ膜、Ｃｏｒｎｉｎｇ）を行って採取した。最初に、Ｐａｌｌ　Ｃｅｎｔｒａｍａｔｅ　Ｔａｎｇｅｎｔｉａｌ　Ｆｌｏｗ　Ｆｉｌｔｒａｔｉｏｎシステムを使用して、大きなスケールのトランスフェクション（５～２０リットル）を１０倍濃縮した。１０ｘダルベッコリン酸緩衝生理食塩水（ＤＰＢＳ、ｐＨ７．２）をこの上清に加えて１ｘ最終濃度にしてから、ＡＫＴＡ　ＦＰＬＣクロマトグラフィーシステムを使用して、樹脂１ｍＬ当たり約２０ｍｇのタンパク質の相対濃度で、平衡化した（ＤＰＢＳ、ｐＨ７．２）ＨｉＴｒａｐ　ＭａｂＳｅｌｅｃｔ　Ｓｕｒｅタンパク質Ａカラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ；Ｌｉｔｔｌｅ　Ｃｈａｌｆｏｎｔ，Ｕｎｉｔｅｄ　Ｋｉｎｇｄｏｍ）に通した。カラムに通した後、カラムをカラム体積の１０倍のＤＰＢＳ（ｐＨ７．２）で洗浄した。タンパク質を、カラム体積の１０倍の０．１Ｍ酢酸ナトリウム（ｐＨ３．５）で溶出させた。タンパク質画分は、画分体積の２０％で、２．０Ｍトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（ＴＲＩＳ）（ｐＨ７）を入れた試験管に溶出させることにより、直ちに中和した。ピーク画分をプールし、必要に応じて、追加のＴＲＩＳを用いてｐＨを約５．５に調整した。精製した

タンパク質を濾過し（０．２μｍ）、その濃度を、ＢｉｏＴｅｋ　ＳｙｎｅｒｇｙＨＴ（商標）分光光度計で、２８０ｎｍでの吸光度によって測定した。精製したタンパク質の量を、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ、及び分析用サイズ排除ＨＰＬＣ（Ｄｉｏｎｅｘ　ＨＰＬＣシステム）によって評価した。エンドトキシンレベルは、ＬＡＬアッセイ（Ｐｙｒｏｔｅｌｌ（登録商標）－Ｔ、Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ　ｏｆ　Ｃａｐｅ　Ｃｏｄ）を用いて測定した。

【０２２１】

実施例３：ｍＡｂ及び環状ＰＹＹペプチドのコンジュゲート

方法Ａ：ＴＣＥＰによるｍＡｂの部分的還元

ＴＲＩＳ酢酸塩緩衝液（２０ｍＬ、ＥＤＴＡ中１ｍＭ）中の１０ｍｇ／ｍＬのｍＡｂ溶液を、３当量のＴＣＥＰで処理した。溶液をｐＨ６に調整し、室温（室温）で１時間置いた後、質量分析計付き高圧液体クロマトグラフィー（ＬＣＭＳ）により、位置Ｃ１０２のジスルフィド付加物が完全に還元されていることが示された。還元されたｍＡｂを、タンパク質Ａ吸着及び溶出（４　ＣＶ　１００ｍＭ酢酸）により精製し、１８０ｍｇの還元ｍＡｂを得た。

【０２２２】

還元ｍＡｂと環状ＰＹＹペプチドのコンジュゲート

凍結乾燥したペプチド（ｍＡｂに対して５当量）を上記の還元ｍＡｂに添加した。ＥＤＴＡを加えて最終濃度１ｍＭとし、ｐＨを７に調整した。濃度を８ｍｇ／ｍＬに調整し、穏やかに振盪しながら室温で１６時間反応を進行させた。ＴＣＥＰ（ｍＡｂに対して０．５当量）を加え、穏やかに振盪しながら室温で４時間反応を更に進行させ、この時間の経過後、高分子量（ＭＷ）種が３％未満に低下した。

【０２２３】

反応混合物をｐＨ５．５に調整し、ＣａｐｔｏＳＰ樹脂のイオン交換クロマトグラフィーにより精製した（勾配：１００％　Ａ（１００ｍＭ　ＴＲＩＳ酢酸塩、ｐＨ５．５）～１００％　Ｂ（１００ｍＭ　ＴＲＩＳ酢酸塩、ｐＨ５．５、０．５Ｍ　ＮａＣｌ）、２０ＣＶ）。所望のコンジュゲートを含有する画分をプールし、少量の未反応ペプチドと共に溶出された１４０ｍｇのコンジュゲートを回収した。最終精製は、タンパク質Ａ吸着及び溶出（４ＣＶ　１００ｍＭ酢酸）によって行った。生成物のｐＨを６に調整して、１２０ｍｇのコンジュゲート（収率６０％）を、純度＞９０％、高ＭＷ種＜３％で得た。

【０２２４】

方法Ｂ：

ｍＡｂの疎水性相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）精製

ＴＲＩＳ酢酸塩緩衝液中の２０ｍｇ／ｍＬのｍＡｂ溶液を、疎水性相互作用カラム（ＴＯＳＯＨ　ＴＳＫｇｅｌフェニル７．５×２１ｃｍ）に充填し、線形勾配で溶出させた（０～７０％Ｂ／Ａ、溶媒Ａ：５％　ｉＰｒＯＨ、１Ｍ（NH_4）$_2SO_4$、１００ｍＭリン酸緩衝液、ｐＨ６．０；溶媒Ｂ：２０％　ｉＰｒＯＨ、１００ｍＭリン酸緩衝液）。ｍＡｂモノマーピークをプールし、濃縮し（５～１０ｍｇ／ｍＬ）、３－（Ｎ－モルホリノ）プロパンスルホン酸（ＭＯＰＳ）緩衝液（１００ｍＭ、ｐＨ５．５）に対して透析した。

【０２２５】

ＴＣＥＰによる部分的還元と、還元ｍＡｂとペプチド類似体とのコンジュゲート

精製したｍＡｂ（２７ｍＬ、９．２８ｍｇ／ｍＬ）に４当量のＴＣＥＰ、続いてＥＤＴＡ（１ｍＭ）を添加した。室温で２時間後、ＬＣＭＳは、位置Ｃ１０２のジスルフィド付加物が完全に還元されたことを示した。還元されたｍＡｂを、Ｚｅｂｒａ脱塩スピンカラム（７×１０ｍＬ、７Ｋ　ＭＷＣＯ、ＭＯＰＳ　１００ｍＭ　ｐＨ５．５で予備平衡）で処理し、遊離システイン／ＧＳＨを除去した。還元したｍＡｂの合わせた画分（２８ｍＬ）に、Ｍｉｌｌｉ　Ｑグレードの水中の環状ＰＹＹペプチド溶液（ｍＡｂに対して６．５当量、１５～２０ｍｇ／ｍＬ）、続いてＥＤＴＡ（１ｍＭ）を添加した。１Ｎ　ＮａＯＨを滴下で添加して、反応物のｐＨを７．２～７．４に調整した。反応物を、穏やかに振盪しながら室温で１８時間反応を進行させた。更に０．５当量のＴＣＥＰを添加した後、更に１２時間反応を継続させて、反応の過程中に形成されたｍＡｂ－ｍＡｂ二量体を減少させ

、所望のｍＡｂホモ二量体へ変換させた。２Ｍ酢酸を添加することにより、反応物のｐＨをｐＨ５．５に下げ、コンジュゲート粗生成物を、疎水性相互作用クロマトグラフィーにより精製し、線形勾配で溶出させた（０～１００％　Ｂ／Ａ、溶媒Ａ：５％　ｉＰｒＯＨ、１Ｍ（ＮＨ４）２ＳＯ４、１００ｍＭリン酸緩衝液、ｐＨ６．０；溶媒Ｂ：２０％　ｉＰｒＯＨ、１００ｍＭリン酸緩衝液）。最終精製は、タンパク質Ａ吸着（ＰＢＳ）及び溶出（ＮａＯＡｃ、ｐＨ３．５）によって行った。生成物のｐＨを６に調整し、ＰＢＳに対して透析して最終サンプルを得た（５６％）。

【０２２６】

あるいは、ｍＡｂをＧＳＨ及び／又はＣｙｓで還元した。タンジェンシャルフロー濾過（ＴＦＦ）による還元剤の除去後、任意選択的に０．２～０．５当量のＴＣＥＰの存在下で、過剰量のペプチドを、還元されたｍＡｂに添加した。

【０２２７】

実施例４：インビトロ試験

化合物１（配列番号２）の、環状ＰＹＹペプチドに結合するモノクローナル抗体（図３）を、ヒト、ラット、マウス、及びアカゲザルのＹ２受容体、並びにヒトＹ１、Ｙ４及びＹ５受容体を発現するクローン細胞（ＨＥＫ又はＣＨＯ）において、インビトロで、ＮＰＹ受容体を活性化する能力について評価した。ＰＹＹ３～３６、ＮＰＹ、及びＰＰが、試験対照としてこれらのアッセイに含まれた。

【０２２８】

細胞株

ｃＡＭＰアッセイで使用するために、ＮＰＹ受容体を発現している安定なトランスフェクトされたクローン細胞株を開発した。簡潔に言えば、ＨＥＫ２９３細胞株を、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００キット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いて、そのプロトコルに従って、ヒトＹ２受容体（アクセッション番号：ＮＭ＿０００９１０．２）、ヒトＹ５受容体（アクセッション番号：ＮＭ＿００６１７４．２）、マウスＹ２受容体（アクセッション番号：ＮＭ＿００８７３１）、及びアカゲザルＹ２受容体（アクセッション番号：ＮＭ＿００１０３２８３２）のコーディング配列を有する発現プラスミドを用いて、トランスフェクトした。トランスフェクションの４８時間後に、細胞を選択培地（ＤＭＥＭ高グルコースに、１０％ウシ胎児血清（ＦＢＳ）、５０Ｉ．Ｕ．ペニシリン、５０μｇ／ｍＬストレプトマイシン、２ｍＭ　Ｌ－グルタミン、１ｍＭピルビン酸ナトリウム、及び６００μｇ／ｍＬ　Ｇ４１８を添加）で再播種した。細胞を選択培地に２週間保持した後、限定希釈法を用いて単一のクローンを採取した。続いて、トランスフェクトした細胞を、１０％ウシ胎児血清、１％Ｌ－グルタミン、１％ピルビン酸ナトリウム、１％ペニシリン／ストレプトマイシン及び６００μｇ／ｍＬ　Ｇ４１８を添加したＤＭＥＭ高グルコース培地（Ｃｅｌｌｇｒｏ）で培養することによって維持した。

【０２２９】

加えて、ヒトＹ１受容体（カタログ番号９３－０３９７Ｃ２）及びヒトＹ４受容体（カタログ番号９５－００８７Ｃ２）を発現しているＣＨＯ－Ｋ１細胞株が、ＤｉｓｃｏｖｅｒＸ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎから得られた。ＤｉｓｃｏｖｅｒＸ細胞は、１０％　ＦＢＳを添加したＦ１２培地（Ｇｉｂｃｏ）中で、Ｇ４１８選択下（８００μｇ／ｍＬ）で培養した。ラットＹ２受容体は、Ｐｒｏｍｅｇａ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎから入手したＧｌｏ－Ｓｅｎｓｏｒ　ＣＨＯ－Ｋ１細胞株で発現させた。これらの細胞を、発光系ｃＡＭＰアッセイのためにｐＧｌｏＳｅｎｓｏｒ（商標）－２３Ｆ　ｃＡＭＰプラスミドでトランスフェクトしたが、Ｐｅｒｋｉｎ－Ｅｌｍｅｒ　ＬＡＮＣＥ　ｃＡＭＰアッセイでの使用について試験及び検証した。ラットＹ２細胞を、１０％　ＦＢＳ及び８００μｇ／ｍＬ　Ｇ４１８を添加したＦ１２培地（Ｇｉｂｃｏ）中で培養した。

【０２３０】

全ての細胞株をバイアル（細胞４×１０^{6}個／バイアル）に保管し、使用するまで液体窒素中に保存した。アッセイの前の日に、バイアルを解凍し、１５ｍＬの適切な培地に添加した。細胞を４５０×ｇで５分間遠心分離し、上清を吸引し、細胞を、０．２×１０^{6}

個／ｍＬの密度で、Ｇ４１８なしの培地に再懸濁させた。細胞を、Ｂｉｏｃｏａｔコラーゲンコーティングされた白色３８４ウェルプレートに分配し（２５μＬ／ウェル）、最終密度は細胞５０００個／ウェルとした。細胞プレートを、５％CO_2／９０％O_2雰囲気下で３７℃加湿組織培養インキュベータ内で一晩インキュベートした。

【０２３１】

実験プロトコル

ｃＡＭＰアッセイは、様々な受容体アッセイと同じであった。ＬＡＮＣＥ　ｃＡＭＰキット（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ；Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ）を全ての実験で使用して、細胞内ｃＡＭＰレベルを定量した。アッセイの日に、細胞培地を細胞からデカントし、６μＬのペプチド（２倍濃度）をウェルに添加した。ペプチドは、刺激緩衝液中の１１ポイント用量反応（１：３連続希釈を用いて１００ｎＭ又は１０μＭから開始）として作製した。刺激緩衝液は、ＨＢＳＳ（ハンクス平衡塩溶液）中に、５ｍＭ　ＨＥＰＥＳ（４－（２－ヒドロキシエチル）－１－ピペラジンエタンスルホン酸）、５００μＭ　ＩＢＭＸ、及び０．１％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）からなる。次に、フォルスコリン（２倍、５μＭ最終濃度）及びＬＡＮＣＥ　ｃＡＭＰ抗体（１：１００）を含有する刺激緩衝液６μＬを細胞に添加した。室温で２５分間インキュベートした後、１２μＬのアッセイ検出混合物を各ウェルに添加した。検出混合物は、ＬＡＮＣＥ　ｃＡＭＰキットで提供されるように、ビオチン－ｃＡＭＰ（１：７５０）及びユーロピウム－Ｗ８０４４（１：２２５０）を検出緩衝液で希釈することによって調製した。プレートを室温で２時間インキュベートした後、Ｅｎｖｉｓｉｏｎプレートリーダー（励起３２０ｎｍ、発光６１５ｎｍ及び６６５ｎｍ）でＴＲ－ＦＲＥＴアッセイとして読み取った。チャネル１蛍光（６１５ｎｍでの相対蛍光単位）及びチャネル２蛍光（６６５ｎｍでの相対蛍光単位）を、それらの比と共に、Ｅｘｃｅｌファイルにエクスポートした。

【０２３２】

データ解析

Ｅｎｖｉｓｉｏｎプレートリーダーからのデータは、（６１５ｎｍ／６６５ｎｍ）×１０，０００として計算された相対蛍光単位（ＲＦＵ）として表した。全てのサンプルに対して３回測定した。Ｅｕｄｅａｎ　Ｓｈａｗによって設計された、内製のＣｒｕｃａｂｌｅデータ分析ソフトウェアを使用してデータを分析した。各ウェル内の未知のｃＡＭＰ濃度は、各プレート内に含まれる既知のｃＡＭＰ濃度の参照標準から内挿された。EC_{50}、Ｌｏｇ（EC_{50}）、ＨｉｌｌＳｌｏｐｅ（ｎＨ）、最大値、最小値などのパラメータは、Ｊａｎｓｓｅｎ　Ｒ＆ＤのＮｏｎ－Ｃｌｉｎｉｃａｌ　Ｓｔａｔｉｓｔｉｃｓ　＆　Ｃｏｍｐｕｔｉｎｇ部門によって実施された、Ｒ環境内の非線形加重最小二乗法適用を使用して、４－Ｐモデルでフィットさせたｌｏｇ化合物濃度に対するｃＡＭＰ濃度値をプロットすることによって得られた（オープンソースｈｔｔｐ：／／ｃｒａｎ．ｕｓ．ｒ－ｐｒｏｊｅｃｔ．ｏｒｇ／）。

【０２３３】

【表１】

表１：インビトロデータ

	ヒトアイソフォーム効力（EC_{50}nM）				異種間効力（EC_{50}nM）		
化合物	hY2	hY1	hY4	hY5	マウスY2	ラットY2	アカゲザルY2
化合物1	0．006	＞2910	＞2910	345．7	0．004	0．04	0．004
PYY3～36	0．08	66．4	136．7	12．3	0．03	0．50	0．06

【０２３４】

実施例５：薬物動態（ＰＫ）

ＤＩＯマウスＰＫ

オスＤＩＯ　Ｃ５７ＢＬ／６Ｎマウス（２０週齢、高脂肪食で１４週）をＴａｃｏｎｉｃ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙから得た。マウスは、ＡｌｐｈａＤｒｉベッディングを備えたケージ当たり１匹を収容し、１２時間の明暗サイクルを有する温度制御された部屋に入れた。

マウスは、水への自由なアクセスを可能にし、高脂肪食（Ｄ１２４９２、Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｄｉｅｔ）で維持した。

【０２３５】

マウスに、１ｍｇ／ｋｇの化合物１を皮下（ｓ．ｃ．）投与し、３匹を各時点で　殺し、ｔ＝４、８、２４、４８、７２、１２０、及び１６８時間で血液を採取した。無投与の動物３匹の血液も採取した。７０％ CO_2及び３０％ O_2の混合物により誘導されたガス麻酔下で断頭した後、それぞれの動物から約３００μＬの血液を頸静脈から採取した。血液サンプル（約３００μＬ）は、１２μＬ（比率４％）の全プロテアーゼ阻害剤溶液と３μＬ（比率１％）のＤＰＰ－ＩＶ阻害剤を含有する、Ｋ３Ｅ（ＥＤＴＡ）コーティングされたＳａｒｓｔｅｄｔ　Ｍｉｃｒｏｖｅｔｔｅ（登録商標）試験管に採取した。血液サンプルは氷水上に置き、各時点で採取してから３０分以内に細胞を除去するために、冷蔵条件下（約５℃）で約４分間、１０，０００ｒｐｍで遠心分離し、利用可能な全ての血漿を９６ウェルプレートに移した。このウェルプレートを－８０℃の冷凍庫に入れるまでの間、ドライアイス上に保管した。データを表２及び図４に示す。

【０２３６】

ラットＰＫ

化合物１を、オスのＳｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラット（Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｗｉｌｍｉｎｇｔｏｎ，ＭＡ）に、ＰＢＳ中１．０ｍｇ／ｋｇ（ｐＨ７．０～７．６）の用量レベルで、皮下及び静脈内投与した。約５００μＬの血液を、１回の時点当たり３匹の動物から、伏在静脈から採取した（投与後ｔ＝１、４、２４、４８、７２、９６、１６８、及び２４０時間）。投与から３３６時間後の血液サンプルは、７０％ CO_2及び３０％ O_2の混合物により誘導されたガス麻酔下で断頭した後、頸静脈から採取した。血液サンプルは、２０μＬ（比率４％）の全プロテアーゼ阻害剤溶液と５μＬ（比率１％）のＤＰＰＩＶ阻害剤を含有する、Ｋ３Ｅ（ＥＤＴＡ）コーティングされたＳａｒｓｔｅｄｔ　Ｍｉｃｒｏｖｅｔｔｅ（登録商標）試験管に採取した。血液サンプルは氷水上に置き、各時点で採取してから６０分以内に細胞を除去するために、冷蔵条件下（約５℃）で約４分間、１０，０００ｒｐｍで遠心分離し、利用可能な全ての血漿を９６ウェルプレートに移した。化合物１の濃度は、以下に記載のＬＣＭＳ法を用いて測定した。データを表３に示す。

【０２３７】

カニクイザル（Ｃｙｎｏ）ＰＫ

全ての動物を、投与前に少なくとも８時間絶食させ、最初の４時間の血液サンプル採取を行った。３匹の動物が１ｍｇ／ｋｇの化合物１の単回ＩＶ投与を受け、３匹の動物が１ｍｇ／ｋｇの化合物１の単回ＳＣ用量を受けた。投与前及び投与後１、６、１０、２４、３６、４８、７２、１２０、１６８、２４０、３３６、４３２、及び５０４時間後に血液を採取した。追加のサンプルを、ＩＶ群の投与後０．５時間で採取した。各動物から約１ｍＬの血液を、比率４％の全プロテアーゼ阻害剤溶液と比率１％のＤＰＰＩＶ阻害剤を含有する、Ｋ３Ｅ（ＥＤＴＡ）コーティングされたＳａｒｓｔｅｄｔ　Ｍｉｃｒｏｖｅｔｔｅ（登録商標）試験管に採取した。血液サンプルは氷水上に置き、各時点で採取してから３０分以内に遠心分離し、得られた血漿を３分割し、９６ウェルプレートに３つ組複製で移した。このウェルプレートを－８０℃の冷凍庫に入れるまでの間、ドライアイス上に保管した。データを表４及び図５に示す。

【０２３８】

血漿レベルの測定のための完全物質量分析アッセイ

血漿サンプルは、抗ヒトＦｃ抗体を使用した免疫親和性捕捉によって処理した後、三重ＴＯＦ（飛行時間）質量分析計で逆相ＬＣ高分解能フルスキャンＭＳ分析を行った。生のＭＳスペクトルをデコンボリューションして、注入サンプル中の成分の分子量を解明した。完全物コンジュゲートの分子イオンのピークを定量に使用した。標準曲線及び品質管理サンプルは、血漿中の参照標準のスパイクにより調製され、適用したサンプルと同時に同じ手順を使用して処理した。ＤＩＯマウス、ラット、及びカニクイザルのＰＫデータをそ

れぞれ表２～４に示す。ＤＩＯマウス及びカニクイザルのＰＫデータは、それぞれ図４及び５にも示されている。

【０２３９】

【表２】

表２：ＤＩＯマウスにおけるＰＫ

アッセイ	用量（mg／Kg）	$T_{1/2}$時間	T_{max}時間	C_{max}ng／mL	AUC_{last}hr*ng／mL
完全物	１．０	８１．０５	４８	８７５０	９９５４６０

【０２４０】

【表３】

表３：ラットにおけるＰＫ

経路	用量（mg／Kg）	$T_{1/2}$時間	T_{max}時間	C_{max}ng／mL	AUC_{last}hr*ng／mL
IV	１．０	９３．０	１	１９．５	８０９．２
SC	１．０	８８．７	４８	４．２	６０２．０

【０２４１】

【表４】

表４：カニクイザルにおけるＰＫ

経路	用量（mg／Kg）	$T_{1/2}$時間	T_{max}時間	C_{max}ng／mL	AUC_{last}hr*ng／mL
IV	１．０	１７８．３９	０．６７	３０２９０	１２０７．３９
SC	１．０	１０４．３２	１０	５５９０	７１２．１９

【０２４２】

実施例６：インビボでの効能試験

食事性肥満（ＤＩＯ）マウスにおける体重減少：急性投与

化合物１を、単回投与後にオスＤＩＯ　Ｃ５７Ｂ１／６マウスの食物摂取量と体重を低下させる能力について評価した。オスＤＩＯ　Ｃ５７ＢＬ／６Ｎマウス（２０週齢、高脂肪食で１４週）をＴａｃｏｎｉｃ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙから得た。マウスは、ＡｌｐｈａＤｒｉベッディングを備えたケージ当たり１匹を収容し、１２時間の明暗サイクルを有する温度制御された部屋に入れた。マウスは、水への自由なアクセスを可能にし、高脂肪食（Ｄ１２４９２、Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｄｉｅｔ）で維持した。実験開始前に、動物を施設に少なくとも１週間順応させた。

【０２４３】

投与の前日、マウスを、個々の体重に基づいて８匹の動物のコホートにグループ化した。翌日３：００～４：００ｐｍに、動物を秤量し、皮下（ｓ．ｃ．）投与を介して、溶媒（ｄＰＢＳ、ｐＨ７．２）で処理し、０．１、０．３、１．０、３．０、又は７．５ｎｍｏｌ／ｋｇの用量の化合物１、又は０．３ｎｍｏｌ／ｋｇの用量のデュラグルチドで処理した。体重及び食物摂取量を、投与から２４時間後、４８時間後及び７２時間後に測定し、体重減少率及び食物摂取量の減少を計算した。統計分析は、Ｐｒｉｓｍにおけるテューキーの事後検定を用いて、二元配置反復測定分散分析を使用して実施した。全てのデータを平均±ＳＥＭとして示す（図６及び図７）。

【０２４４】

食事性肥満マウスにおける体重減少：慢性投与

化合物１を、８日間にわたってオスＤＩＯ　Ｃ５７Ｂ１／６マウスに反復投与し、食物摂取量及び体重を低下させ、グルコースホメオスタシスを改善する能力について評価した。オスＤＩＯ　Ｃ５７ＢＬ／６Ｎマウス（２０週齢、高脂肪食で１４週）をＴａｃｏｎｉｃ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙから得た。マウスは、ＡｌｐｈａＤｒｉベッディングを備えたケージ当たり１匹を収容し、１２時間の明暗サイクルを有する温度制御された部屋に入れた。マウスは、水への自由なアクセスを可能にし、高脂肪食（Ｄ１２４９２、Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｄｉｅｔ）で維持した。実験開始前に、動物を施設に少なくとも１週間順応させた。

【０２４５】

投与の前日、マウスを、個々の体重に基づいてグループ化した。次の８日間、それぞれについて３：００－４：００ｐｍに、動物及び食物摂取量を計量した。動物は、毎日皮下投与により０．３ｎｍｏｌ／ｋｇで溶媒（ｄＰＢＳ、ｐＨ７．２）又はデュラグルチドで、又は３日ごとに皮下投与により０．１、０．３、１．０、３．０ｎｍｏｌ／ｋｇの用量の化合物１で処理した。８日後、マウスを５時間絶食させ、次いで、ｔ＝０に２ｇ／ｋｇのグルコースボーラスを経口投与する。グルコース負荷後、ｔ＝０、３０、６０、９０、及び１２０分後に血糖を測定し、ｔ＝０、３０、及び９０分後の血液では血漿インスリンを測定するために採血される。統計分析は、Ｐｒｉｓｍにおけるテューキーの事後検定を用いて、一元配置分散分析又は二元配置反復測定分散分析を使用して実施した。全てのデータを平均±ＳＥＭとして示す（図８及び９、並びに表５～８）。

【０２４６】

【表５】

表５：８日間の処理における体重（ｇ）に対する化合物１の効果

処理	溶媒	化合物1（nmol／kg）				デュラグルチド（nmol／kg）
日	n／a	０．１	０．３	１．０	３．０	０．３
－１	46．3±0．6	46．3±0．6	46．7±0．8	46．3±0．6	46．3±0．6	46．3±0．6
０	46．1±0．7	46．0±0．6	46．8±0．7	46．3±0．6	46．3±0．6	45．9±0．6
１	45．8±0．7	45．0±0．6	45．2±0．7	43．9±0．5	43．9±0．6	44．1±0．6
２	45．2±0．7	43．9±0．6	43．6±0．7	42．4±0．7*	41．8±0．7*	42．2±0．6*
３	45．1±0．7	43．9±0．6	42．8±0．6	41．0±0．6*	40．1±0．6*	40．6±0．6*
４	44．7±0．7	43．4±0．6	42．0±0．6	39．9±0．6*	38．5±0．6*	39．3±0．6*
５	44．5±0．7	43．0±0．6	41．5±0．5*	39．1±0．6*	36．8±0．7*	38．1±0．7*
６	44．5±0．7	43．1±0．6	41．4±0．5*	38．6±0．6*	35．5±0．8*	37．1±0．8*
７	44．3±0．7	43．1±0．7	41．3±0．5*	38．2±0．6*	34．8±0．9*	36．4±1．0*
８	45．2±0．6	46．3±0．7	41．9±0．5*	38．8±0．6	34．7±1．0*	36．5±1．1*

各値は、８匹の動物からのデータについて各時点、群当たりの平均±ＳＥＭを表す。
＊溶媒に対してｐ＜０．０５；二元配置分散分析反復測定、テューキーの多重比較検定

【０２４７】

【表６】

表６：８日間の処理後のＯＧＴＴの間の血糖値（ｍｇ／ｄＬ）に対する化合物１の効果

		グルコース負荷後の時間（分）						
処理	用量（nmol／kg）	0	30	60	90	120	全AUC（mg／dL／120分）	ΔAUC（mg／dL／120分）
溶媒	NA	148±6	227±15	272±12	206±9	209±13	26492±1232	8702±1082
化合物1	０．１	151±4	213±9	249±10	186±11	194±15	24598±849	6433±677
	０．３	137±6	191±11	208±10*	146±8*	160±8*	20786±728*	4379±364*
	１．０	117±5	146±9*	203±10*	135±8*	136±5*	18285±769*	4319±522*
	３．０	73±11*	129±5*	149±10*	93±9*	101±9*	13703±913*	5004±585
デュラグルチド	０．３	76±9*	151±14*	174±17*	104±10*	119±9*	15758±1054*	6668±1846

各値は、８匹の動物からのデータについて各時点、群当たりの平均±ＳＥＭを表す。
＊溶媒に対してｐ＜０．０５；血糖値については、二元配置分散分析反復測定、テューキーの多重比較検定；ＡＵＣについては、一元配置分散分析、テューキーの多重比較検定

【０２４８】

【表７】

表７：８日間の処理後のＯＧＴＴの間のインスリン値（ｎｇ／ｍＬ）に対する化合物１の効果

		グルコース負荷後の時間（分）			
処理	用量（nmol／kg）	0	30	90	全AUC（mg／dL／120分）
溶媒	NA	5．6±1．4	11．3±3．0	4．0±0．6	711．4±164．1
化合物1	0．1	3．0±0．4	6．6±0．8*	2．4±0．2	415．6±44．2
	0．3	2．3±0．2	4．0±0．6*	1．7±0．2	264．3±33．0*
	1．0	1．3±0．2*	2．2±0．1*	1．1±0．2	151．6±12．5*
	3．0	0．4±0．1*	1．2±0．1*	0．4±0．1*	73．9±9．0*
デュラグルチド	0．3	0．6±0．1*	1．7±0．2*	0．7±0．2	108．8±12．3*

各値は、８匹の動物からのデータについて各時点、群当たりの平均±ＳＥＭを表す。
＊溶媒に対してｐ＜０．０５；血糖値については、二元配置分散分析反復測定、テューキーの多重比較検定；ＡＵＣについては、一元配置分散分析、テューキーの多重比較検定

【０２４９】

【表８】

表８：８日間の処理後の、摂食血糖値（ｍｇ／ｄＬ）に対する化合物１の効果

処理	用量（nmol／kg）	血糖（mg／dL）
溶媒	NA	180±5
化合物1	0．1	164±6
	0．3	160±5
	1．0	149±6
	3．0	105±12*
デュラグルチド	0．3	114±13*

各値は、８匹の動物からのデータについて各時点、群当たりの平均±ＳＥＭを表す。
＊溶媒に対してｐ＜０．０５；一元配置分散分析、テューキーの多重比較検定

【０２５０】

実施例７：ｍＡｂ－オキシントモジュリン（ｍＡｂ－ＯＸＭ）化合物の調製の合成戦略

ヒトオキシントモジュリン（ＯＸＭ）は、２型真性糖尿病患者において有益な薬理学を有することが示されている３７アミノ酸長の内因性ペプチド（配列番号２３）である。薬理作用は、ＧＬＰ１Ｒ及びＧＣＧＲの両方におけるアゴニスト作用の結果である。ＯＸＭ類似体の研究により、げっ歯類モデルにおいて良好な血糖制御及び体重減少を実証したペプチド変異体が明らかになった。インビボでのＯＸＭの半減期は、ヒトにおいて数分の単位である。したがって、ＯＸＭの更なる設計は、週１回の投与に相応した半減期を付与するために行われた。半減期の増加は、タンパク質分解に対するＯＸＭペプチドの安定性を増加させることによって、及びモノクローナル抗体（ｍＡｂ）の共有結合によるペプチドの循環半減期を増加させることによって、達成された。ＤＰＰ４によるペプチド搭載のタンパク質分解は、位置２のセリンをアミノイソ酪酸（Ａｉｂ）で置換することによって軽減された。ペプチドの螺旋状トポロジーは、Ｑ２０Ｒ～Ｓ１６Ｅ及びＱ２４Ｅの分岐塩架橋を導入することによって安定化され、Ｍ２７Ｌ変異により、潜在的な酸化性が軽減された。親ｍＡｂのＭＳＣＢ９７（上記）は、低い内因性抗原結合性を有するよう、及び、重鎖（Ｉ１０２Ｃ）のＨＣＤＲ３（配列番号１８）領域におけるイソロイシンからシステインへの点変異（合成ペプチド搭載のための結合点として作用する）を有するように、選択された。エフェクター機能は、ＩｇＧ４　ＰＡＡアイソタイプを使用することによってサイレンシングされた。短いオリゴエチレングリコールスペーサーをｍＡｂとペプチドとの間に組み込んで、ペプチドがＧＬＰ１Ｒ及びＧＣＧＲへと、妨げられずにアクセスできるよう確保した。このスペーサーは更に、コンジュゲート化学を促進する良好な水溶性を付与する。ペプチドスペーサーのｍＡｂへの結合は、グリコールスペーサーの遠位端に反応性ブロモアセトアミド基を導入することによって達成された。スペーサーの近位端は、Ｋ３０の側鎖を介してＯＸＭ変異体に取り付けられた。グルカゴン及びＯＸＭペプチド変異

体のアミノ酸配列は、それぞれ配列番号２２及び２４により提供される。コンジュゲートは、ｍＡｂ重鎖におけるシステイン点変異のチオール官能基との反応によって達成された。ｍＡｂ重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列は、それぞれ配列番号１３及び１５により提供される。

【０２５１】

ｍＡｂ－ＯＸＭ化合物の化学合成

ｍＡｂ－ＯＸＭ化合物の産生のための全体的な合成スキーム全体を図１０に示す。

【０２５２】

オキシントモジュリン（ＯＸＭ）ペプチド変異体の調製：樹脂結合保護ペプチドを、標準的な９－フルオレニルメチルオキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）アミノ酸（Ｎ末端Ｈｉｓ、Ｎα－Ｂｏｃ－Ｈｉｓ（Ｂｏｃ）－ＯＨ及びＬｙｓ３０、Ｎα－Ｆｍｏｃ　Ｌｙｓ（ｉｖＤＤＥ）－ＯＨを除く）を用いて、ＰＡＬ－ＰＥＧ－ポリスチレン樹脂上で、合成した。標準的なアミノ酸活性化及びＦｍｏｃ脱保護戦略を全体にわたって使用した。配列が完了した後、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）中の希無水ヒドラジンで処理することにより、Ｃ末端リジンの側鎖を選択的に脱保護した。Ｆｍｏｃ－ｄＰＥＧ$_{12}$－ＣＯ$_2$Ｈは、ジイソプロピルカルボジイミド（ＤＩＣ）／エチル（ヒドロキシイミノ）－シアノアセテート活性化を使用して、遊離アミンに結合させた。Ｆｍｏｃ基を除去し、得られたアミンをブロモ酢酸無水物のＤＭＦ溶液を用いてブロモアセチル化した。

【０２５３】

フェノール、水、及びトリイソプロピルシランをスカベンジャーとして含有するトリフルオロ酢酸（ＴＦＡ）による処理によって、全ての保護基を同時に脱保護することで、ペプチドを樹脂から除去した。粗ペプチドを、エーテルでの冷却沈殿によって単離し、溶離液としてアセトニトリル／水を０．１％　ｖ／ｖ　ＴＦＡで使用して、逆相高速液体クロマトグラフィー（ＲＰ－ＨＰＬＣ）により精製した。凍結乾燥後に、純粋なペプチドが、毛羽立った白色固体として回収された。これを－８０℃で保存した。

【０２５４】

モノクローナル抗体ＭＳＣＢ９７の還元：モノクローナル抗体は、細胞質基質又は増殖培地のいずれかから回収された偶発的なシステイン又はグルタチオン残基にジスルフィド結合した、操作されたＣｙｓ１０２残基で単離される。したがって、これらのジスルフィドの予備的還元と、それに続く望ましくないシステインの除去が、ＯＸＭペプチド変異体のコンジュゲートの前に必要とされる。還元は、タンパク質Ａ樹脂ビーズ上に固定化されたｍＡｂにより達成された。還元剤（トリカルボキシエチルホスフィン、ＴＣＥＰ）を、還元が完了するまでｐＨ５でカラムを通して循環させた（１時間）。これらの条件下での還元剤としてのＴＣＥＰの利点は、還元が有効である一方で、低ｐＨでのジスルフィド結合の再形成は無視できることである。副生成物を洗い流した後、酸性緩衝液（ｐＨ３．５の酢酸ナトリウム）を用いて吸着タンパク質をカラムから溶出させた。還元されたｍＡｂを、ｐＨ５．５で５０ｍＭ　３－（Ｎ－モルホリノ）プロパンスルホン酸（ＭＯＰＳ）に対して２回透析した。

【０２５５】

ｍＡｂに対して２．５当量のＴＣＥＰを用いて、ｐＨ５の溶液中で還元することによって、より小さな探索試験バッチを調製した。室温で２時間、還元反応を行わせた。ゲル濾過（ＰＤ１０カラム）によって小分子副生成物を除去し、還元されたＭＳＣＢ９７を１０ｍＭ　ＭＯＰＳ、ｐＨ５．５で溶出させた。

【０２５６】

ｍＡｂ－ＯＸＭ化合物の調製：還元ＭＳＣＢ９７の溶液を、凍結乾燥ＯＸＭペプチド変異体の７．６倍過剰量に添加した。１ｍＭのＥＤＴＡ溶液を添加して反応性チオールを金属触媒酸化から保護し、ＭＯＰＳ緩衝液（１Ｍ、ｐＨ８．１）を添加することにより、反応溶液のｐＨを７．３に上昇させた。反応物を、穏やかに振盪しながら室温で１８時間反応を進行させた。２Ｍ酢酸の添加でｐＨ５．５に調節することにより、反応をクエンチし、粗コンジュゲートを、タンパク質Ａ上に吸着させ、過剰なペプチド、折り畳まれていな

い生成物及び副生成物を洗浄により除去して、精製した。生成物を溶出させ（酢酸ナトリウム、ｐＨ３．６）、続いて酢酸緩衝液ｐＨ５で透析した。

【０２５７】

２５０ｍｇ、５００ｍｇ及び５００ｍｇのＭＳＣＢ９７から出発して３つの独立した合成を行い、生成物を単一バッチに合わせた。

【０２５８】

ｍＡｂ－ＯＸＭ化合物の分析

調製したｍＡｂ－ＯＸＭ化合物の特性を、（ｉ）分析用疎水性相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）、（ｉｉ）液体クロマトグラフィーエレクトロスプレーイオン化質量分析法（ＬＣ－ＥＳＩＭＳ）によるインタクト質量測定、（ｉｉｉ）分析用サイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）、及び（ｉｖ）ＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動、を用いて分析した。

【０２５９】

ヒト及びサル血漿における安定性

ＯＸＭは、血漿ペプチダーゼにより急速に代謝される。ヒト及びサル血漿中の酵素分解に対するｍＡｂ－ＯＸＭ化合物（「化合物２」）（図１１）の抵抗性を決定するために、化合物２のエクスビボ安定性を評価した。化合物２を、２０ｍＭで、新鮮な（凍結していない）ヘパリン化血漿と共に、３７℃で最長１６８時間インキュベートした。生物学的分析は、ヒトＧＬＰ－１受容体トランスフェクトされたＨＥＫ細胞におけるｃＡＭＰ産生を測定する機能性細胞系バイオアッセイを用いて行った。生成されたｃＡＭＰの量は、活性ＯＸＭ類似体の濃度に正比例し、安定性サンプル中の活性ＯＸＭ類似体の濃度を、既知の濃度の参照標準から内挿することによって決定した。このアッセイを、以前に決定したより安定した対照（対照１）、及び以前に決定したより安定していない対照（対照２）のランク付けに使用した。データを使用して相対的安定性をランク付けし、これを図１２及び１３に示す。

【０２６０】

実施例８：インビトロ試験：ヒト、マウス、ラット、及びカニクイザルのＧＬＰ１及びグルカゴン受容体における化合物２のインビトロ効力。

化合物２を含む対象化合物の効力及び種特異性は、ヒト、カニクイザル、ラット又はマウスのＧＬＰ１又はＧＣＧ受容体のいずれかを安定的に発現するようにトランスフェクトされたＨＥＫ２９３細胞を用いたアッセイにおいて特徴付けられた。各受容体アッセイでは、クローン細胞を、細胞２０００～５０００個／ウェルの適切な密度で、３８４ウェルプレートに播種した。５ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、０．１％　ＢＳＡ及び０．５ｍＭ　ＩＢＭＸを添加したＨＢＳＳで化合物を希釈し、細胞に添加した。細胞プレートを、細胞クローンに応じて５分又は１０分間室温でインキュベートし、次いでｃＡＭＰ測定のために溶解させた。ｃＡＭＰ濃度は、ＥｎＶｉｓｉｏｎプレートリーダーを備えたＬＡＮＣＥ　ｃＡＭＰキットを使用して定量した。標準曲線は、ｃＡＭＰ濃度の逆算のために各アッセイプレートに含まれた。用量反応曲線を分析し、化合物ＥＣ$_{50}$値をＧｒａｐｈｐａｄ　Ｐｒｉｓｍ又はＣｒｕｃｉｂｌｅで計算した。ＥＣ$_{50}$データを表９～１０にまとめる。

【０２６１】

【表９】

表９：ヒトＧＬＰ１及びグルカゴン受容体ｃＡＭＰアッセイからのＥＣ$_{50}$値（ｎＭ）の要約

	ヒト	
	GCGR	GLP1R
グルカゴン	０．０５±０．０１	０．９６±０．２１
Ser－８ GLP1	＞１００	０．０７±０．０１
OXM	３．０１±０．３５	２．４０±０．５９
化合物2	３．３１±０．２２	０．４３±０．０２
デュラグルチド	＞１００	０．１７±０．０４

値は、３～７回の実験の平均±ＳＥＭを表す。

【０２６２】

【表１０】

表１０：マウス、ラット、及びカニクイザルのＧＬＰ１及びグルカゴン受容体ｃＡＭＰアッセイからのＥＣ$_{50}$値（ｎＭ）の要約

	マウス		ラット		カニクイザル	
	GCGR	GLP1R	GCGR	GLP1R	GCGR	GLP1R
グルカゴン	0.09 ±0.01	2.13 ±0.42	1.57 ±0.33	4.73 ±0.20	0.03 ±0.002	1.96 ±0.38
Ser－8 GLP1	＞100	0.06 ±0.005	＞100	0.14 ±0.03	＞100	0.08 ±0.002
OXM	6.31 ±2.58	1.90 ±0.31	12.74 ±3.54	0.98 ±0.16	0.49 ±0.08	0.80 ±0.07
化合物2	0.82 ±0.38	0.11 ±0.02	5.90 ±1.46	0.97 ±0.13	2.03 ±0.14	0.40 ±0.03
デュラグルチド	＞100	0.035 ±0.002	＞100	0.13 ±0.03	＞100	0.18 ±0.01

値は、３～８回の実験の平均±ＳＥＭを表す。

【０２６３】

実施例９：他の関連ＧＰＣＲの効力

いくつかのクラスＢ　ＧＰＣＲを発現する細胞を使用したアッセイで、化合物２の効力を評価した。化合物２を、ＣＡＬＣＲ、ＰＴＨＲ１、ＰＴＨＲ２、ＣＲＨＲ１、ＣＲＨＲ２、及びＶＩＰＲ１を発現する細胞を使用して、６つのインビトロｃＡＭＰアッセイのパネルで試験した。このアッセイは、試験した各受容体に含まれる陽性対照と共に、業者の標準操作手順に従って実施した。

【０２６４】

加えて、ヒトＧＩＰ受容体を発現する安定した細胞株で化合物２を試験した。細胞を３８４ウェルプレートに播種し、２４時間処理した後、室温で５分間化合物で処理した。ｃＡＭＰ濃度をＣｉｓＢｉｏ　ＨＴＲＦ　ｃＡＭＰキットを使用して測定し、結果をＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍを用いて分析した。結果を表１１～１２に示す。

【０２６５】

【表１１】

表１１：ｃＡＭＰアッセイにおける化合物２の効力の要約

化合物	標的	RC$_{50}$（μＭ）	Hill	曲線最小値	曲線最大値	最大応答
カルシトニン	CALCR	0.0007764259	1.5254	－6.2187	105	101.04
PTH（1－34）	PTHR1	0.001080165	1.8672	－5.9767	101	93.574
ソーバジン	CRHR1	0.0003082264	1.8133	－3.2011	102.19	106.16
ソーバジン	CRHR2	0.003395158	1.3095	－1.175	102.76	107.04
TIP－39	PTHR2	0.0003934505	1.1032	－3.7746	100.33	100.71
VIP	VIPR1	0.0003567715	1.9827	－0.96244	105	104.01
化合物2	CALCR	＞0.1				0.070838
化合物2	CRHR1	＞0.1				1.5625
化合物2	CRHR2	＞0.1				0.928
化合物2	PTHR1	＞0.1				0.86197
化合物2	PThR2	＞0.1				2.2789
化合物2	VIPR1	＞0.1				0.60373

【０２６６】

【表１２】

表１２：ヒトＧＩＰ受容体アッセイにおける化合物２の効力

	アッセイ1		アッセイ2	
	EC_{50}（nM）	R二乗	EC_{50}（nM）	R二乗
GIP	2．31	1．00	1．28	0．99
化合物2	≧100	≧100	≧100	≧100
オキシントモジュリン	≧100	≧100	≧100	≧100

【０２６７】

実施例１０：インビボ試験：ＤＩＯマウスにおける単回用量有効性

食物摂取、体重、耐糖能、及び血漿ＦＧＦ２１レベルを、ＤＩＯマウスにおいて、単一用量の化合物２、又はＧＬＰ１Ｒアゴニストであるデュラグルチドの投与の後、評価した。投与の１日前に動物の体重を測定し、ＢＷ別にグループ分けした。指示に従い、皮下注射によりマウスに投与した。翌朝、食物を除去し、６時間の絶食を開始した。ＢＷ及び食物重量（ＦＷ）を記録した。空腹時血糖を測定し、１２：００ｐｍにインスリン測定のために血液を採取した。１時間後、マウスにグルコース（１ｇ／ｋｇ、２０％グルコース、５ｍＬ／ｋｇ）を腹腔内投与した。血漿インスリンについて、１０分後時点の尾部採血により、追加の２０μＬの血液を採取した。グルコース負荷の１０、３０、６０及び９０分後に、血糖計により用い血糖値を測定した。次にマウスをCO_2で安楽死させ、最終血液試料を心臓穿刺により採取した。データを表１３～１９に示す。

【０２６８】

【表１３】

表１３：処理後１８時間にわたるＤＩＯマウスにおける化合物２及びデュラグルチドの食物摂取（グラム）に対する効果

処理	投与の24時間前	投与の18時間後
溶媒	3．1±0．1	2．9±0．1
デュラグルチド(0．3nmol／kg)	3．1±0．1	1．5±0．1*^
化合物2(1．0nmol／kg)	3．2±0．1	2．5±0．1^#
化合物2(2．0nmol／kg)	3．4±0．1	2．2±0．1*^#
化合物2(4．0nmol／kg)	3．2±0．1	1．7±0．1*^
化合物2(8．0nmol／kg)	3．4±0．1	1．4±0．2*^

＊溶媒に対してｐ＜０．０１（投与の１８時間後）；＾それぞれの投与の２４時間前に対してｐ＜０．００１；＃投与の１８時間後のデュラグルチド（０．３ｎｍｏｌ／ｋｇ）に対してｐ＜０．０００１

二元配置分散分析、シダックの多重比較検定

値は、溶媒の投与２４時間前（ｎ＝７）を除き、各時点で１群あたり８匹の動物からのデータの平均±ＳＥＭを表す

【０２６９】

【表１４】

表１４：処理の１８時間後のＤＩＯマウスにおける体重変化率（％）に対する化合物２及びデュラグルチドの効果

処理	体重変化率(%)
溶媒	－0．7±0．3
デュラグルチド(0．3nmol／kg)	－4．1±0．3*
化合物2(1．0nmol／kg)	－1．9±0．3*^
化合物2(2．0nmol／kg)	－2．8±0．4*^
化合物2(4．0nmol／kg)	－4．4±0．3*
化合物2(8．0nmol／kg)	－5．2±0．3*^

＊溶媒に対してｐ＜０．０１；＾デュラグルチド（０．３ｎｍｏｌ／ｋｇ）に対してｐ＜０．０５

二元配置分散分析反復測定、テューキーの多重比較検定。１８時間後の時点のデータの

みを示す
体重変化率は、０日目（投与前）の体重に対して計算される。
各値は、８匹の動物からのデータについて、群当たりの平均±ＳＥＭを表す。
【０２７０】
【表１５】
表１５：処理の２４時間後のＩＰＧＴＴ中のＤＩＯマウスにおける、化合物２及びデュラグルチドの血糖（ｍｇ／ｄＬ）に対する効果

処理	時間（分）				
	0	10	30	60	90
溶媒	215±9	353±20	436±19	424±25	391±25
デュラグルチド（0.3nmol／kg）	140±7	264±18	267±22	228±12	193±9
化合物2（1.0nmol／kg）	169±6	349±17	411±30	411±19	384±18
化合物2（2.0nmol／kg）	138±11	288±19	349±27	303±29	229±20
化合物2（4.0nmol／kg）	114±8	235±23	237±34	239±30	195±25
化合物2（8.0nmol／kg）	96±7	206±13	168±22	166±19	131±12

各値は、８匹の動物からのデータについて各時点、群当たりの平均±ＳＥＭを表す。
【０２７１】
【表１６】
表１６：処理の２４時間後のＤＩＯマウスにおけるＩＰＧＴＴ中の血糖実質ＡＵＣ

処理	血糖実質AUC
溶媒	16539±1400
デュラグルチド（0.3nmol／kg）	8471±1204*
化合物2（1.0nmol／kg）	19214±1596^
化合物2（2.0nmol／kg）	13805±1840
化合物2（4.0nmol／kg）	9827±1046*
化合物2（8.0nmol／kg）	6035±742*

＊溶媒に対してｐ＜０．０５；＾デュラグルチド（０．３ｎｍｏｌ／ｋｇ）及びＪＮＪ－６４１５１７８９（４．０及び８．０ｎｍｏｌ／ｋｇ）に対してｐ＜０．０５
一元配置分散分析、テューキーの多重比較検定
各値は、８匹の動物からのデータについて、群当たりの平均±ＳＥＭを表す。
【０２７２】
【表１７】
表１７：処理の２４時間後のＤＩＯマウスにおける６時間空腹時グルコース（ｍｇ／ｄＬ）に対する化合物２及びデュラグルチドの効果

処理	血糖（mg／dL）
溶媒	215±9
デュラグルチド（0.3nmol／kg）	140±7*
化合物2（1.0nmol／kg）	169±6*
化合物2（2.0nmol／kg）	138±11*
化合物2（4.0nmol／kg）	114±8*
化合物2（8.0nmol／kg）	96±7*^

＊溶媒に対してｐ＜０．０５；＾デュラグルチド（０．３ｎｍｏｌ／ｋｇ）に対してｐ＜０．０５
一元配置分散分析、テューキーの多重比較検定
各値は、８匹の動物からのデータについて、群当たりの平均±ＳＥＭを表す。
【０２７３】

【表１８】

表１８：ＤＩＯマウスにおける、グルコース負荷前（処理の２４時間後）及びＩＰＧＴＴ中のグルコース負荷から１０分後の、血漿インスリン濃度（ｎｇ／ｍＬ）に対する化合物２及びデュラグルチドの効果

処理	血漿インスリン（ng／mL）	
	グルコース負荷前	グルコース負荷から10分後
溶媒	２．７±０．４	２．０±０．３
デュラグルチド（０．3nmol／kg）	１．６±０．２	１．７±０．２
化合物2（１．０nmol／kg）	２．８±０．４	１．８±０．２
化合物2（２．０nmol／kg）	２．３±０．５	２．９±０．４
化合物2（４．０nmol／kg）	２．１±０．２	２．５±０．５
化合物2（８．０nmol／kg）	１．５±０．４	２．７±０．３

各値は、８匹の動物からのデータについて、群当たりの平均±ＳＥＭを表す。

【０２７４】

【表１９】

表１９：処理の２６時間後のＤＩＯマウスにおける、血漿中ＦＧＦ２１（ｎｇ／ｍＬ）に対する化合物２及びデュラグルチドの効果

処理	血漿中FGF21（ng／mL）
溶媒	０．４±０．１
デュラグルチド（０．3nmol／kg）	０．８±０．２
化合物2（１．０nmol／kg）	０．７±０．１
化合物2（２．０nmol／kg）	１．５±０．３
化合物2（４．０nmol／kg）	２．１±０．４^
化合物2（８．０nmol／kg）	３．５±０．３*

＊全ての群に対してｐ＜０．０００１；^化合物２（２．０ｎｍｏｌ／ｋｇ）を除く全ての群に対してｐ＜０．０５

一元配置分散分析、テューキーの多重比較検定

各値は、８匹の動物からのデータについて、群当たりの平均±ＳＥＭを表す。

【０２７５】

実施例１１：インビボ試験：ＤＩＯマウスにおける繰り返し投与

ＧＬＰ１Ｒ／ＧＣＧＲ二重アゴニスト（化合物２）、及びＧＬＰ１Ｒアゴニスト（デュラグルチド）の、ＤＩＯマウスにおける効果を、９日間にわたる繰り返し投与中にモニターした。投与頻度を制御するために、全ての動物に毎日投与した。投与頻度は、化合物２及びデュラグルチドのＤＩＯマウスＰＫデータに基づいて決定した。デュラグルチド群の動物には、この薬物を毎日投与した。溶媒処理動物には、溶媒を毎日投与した。化合物２を１．０、２．０又は４．０ｎｍｏｌ／ｋｇで与える動物には、この化合物を３日ごとに投与し、化合物を注射しなかった日には溶媒を投与した。投与開始の１日前に動物の体重を測定し、体重別にグループ分けした。１～３ｐｍの間に、指示に従い、皮下注射によって全てのマウスに投与した。これらの処理群において、１～３ｐｍの間に、食物摂取及び体重を毎日モニターした。

【０２７６】

最初の投与から２４時間後を初回として、３群のマウスを、１．０、２．０，又は４．０ｎｍｏｌ／ｋｇの化合物２処理動物とペアフィード（ＰＦ）した。ペアフィードマウスのホッパー中の食物の量は、マッチされている化合物処理群のマウスによってそれまでの２４時間で消費された平均食物と一致するように調整した。全てのＰＦ群は、溶媒と共に毎日投与された。９日目（又は、ペアフィード群については１０日目）に、動物を６時間絶食させ、体重及び空腹時血糖を測定した。インスリン、ＦＧＦ２１、及び血漿脂質の測定のために血液を採取した。食物摂取、体重、身体組成、空腹時血糖、空腹時インスリン、空腹時ＦＧＦ２１、及び空腹時血漿脂質データを表２０～２６に示す。

【０２７７】

【表２０】

表２０：処理後９日間にわたるＤＩＯマウスにおける毎日の食物摂取（グラム）に対する化合物２及びデュラグルチドの効果

	時間（日）									
処理	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
溶媒	2．7±0．1	2．9±0．0	3．1±0．1	2．9±0．1	2．9±0．1	3．0±0．1	2．9±0．1	3．0±0．1	3．0±0．1	2．9±0．1
デュラグルチド（0．3nmol／kg）	3．1±0．2	1．5±0．2*	1．3±0．2*	1．7±0．3*	1．9±0．2*	2．1±0．2*	2．2±0．2*	2．3±0．2	2．9±0．4	2．5±0．2
化合物2（1．0nmol／kg）	3．1±0．1	2．3±0．1*#	2．5±0．1*#	2．6±0．2	2．4±0．1#	2．7±0．2#	2．6±0．1#	2．9±0．2#	2．8±0．1#	2．7±0．1
化合物2（2．0nmol／kg）	3．1±0．1	2．0±0．1*	2．0±0．1*^	2．7±0．1^	2．5±0．2^	2．3±0．1	2．5±0．2	2．7±0．1	2．8±0．3	2．7±0．1
化合物2（4．0nmol／kg）	2．9±0．2	1．5±0．1*	1．5±0．2*	2．1±0．2*	1．7±0．1*	1．6±0．1*	1．6±0．1*	1．8±0．2*	2．2±0．3*^	2．1±0．1*

＊溶媒に対してｐ＜０．０５；^デュラグルチド（０．３ｎｍｏｌ／ｋｇ）に対してｐ＜０．０５；＃化合物２（４．０ｎｍｏｌ／ｋｇ）に対してｐ＜０．０５

二元配置分散分析反復測定、テューキーの多重比較検定

全てのＰＦ群は、それぞれの処理群からの平均食物摂取量（データは図示せず）を与えられた。

各値は、６～１０匹の動物からのデータについて各時点、群当たりの平均±ＳＥＭを表す。

【０２７８】

【表２１】

表２１：処理９日間にわたるＤＩＯマウスにおける体重変化率に対する化合物２及びデュラグルチドの効果

	時間（日）									
T	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
V	0．0	−0．1±0．2	−0．1±0．2*	−0．2±0．2*	−0．7±0．3*	−0．5±0．3*	0．2±0．5*	0．1±0．6*	0．0±0．5*	−1．7±0．6*
1	0．0	−3．7±0．3	−6．2±0．6	−7．8±0．8	−9．2±0．8	−10．1±0．8	−10．2±0．8	−10．7±1．0	−11．1±0．9	−13．1±1．1
2	0．0	−1．9±0．4	−2．9±0．5^	−3．2±0．4^	−4．4±0．7^&	−4．7±0．8^&	−4．5±0．8^&	−5．3±1．0^&	−5．2±1．1^&	−6．6±1．1^&
3	0．0	−1．6±0．3	−2．7±0．4^	−3．5±0．4^	−3．8±0．3^	−3．8±0．4^	−3．9±0．5^	−3．5±0．5^	−3．4±0．5^	−4．5±0．5^
4	0．0	−2．8±0．4	−4．7±0．5	−4．9±0．6^	−7．1±0．7	−8．0±0．8	−8．0±0．8	−9．1±0．8#	−10．0±0．9#	−11．5±0．9#
5	0．0	−3．0±0．4	−4．5±0．4	−5．1±0．5^	−5．3±0．5^	−5．8±0．5^	−6．1±0．5^	−5．8±0．5^	−6．2±0．4^	−6．9±0．4^
6	0．0	−3．7±0．3	−6．8±0．3	−8．8±0．5$	−11．6±0．6#$	−14．2±0．7^#$	−15．6±0．9^#$	−18．4±1．2^#$	−20．4±1．5^#$	−21．9±1．6^#$
7	0．0	−3．6±0．1	−5．6±0．1	−6．9±0．1	−7．9±0．2	−9．1±0．2	−10．5±0．3	−11．4±0．3	−12．3±0．3	−13．3±0．3

Ｔ：処理；Ｖ：溶媒；１：デュラグルチド（０．３ｎｍｏｌ／ｋｇ）；２～３：化合物２（１．０ｎｍｏｌ／ｋｇ）；４～５：化合物２（２．０ｎｍｏｌ／ｋｇ）；６～７：化合物２（４．０ｎｍｏｌ／ｋｇ）

＊全ての他の処理に対してｐ＜０．０１；^デュラグルチド（０．３ｎｍｏｌ／ｋｇ）に対してｐ＜０．０５；＃それぞれのＰＦ群に対してｐ＜０．０５；＄ＪＮＪ－６４１５１７８９（１．０及び２．０ｎｍｏｌ／ｋｇ）に対してｐ＜０．０５；＆ＪＮＪ－６４１５１７８９（２．０ｎｍｏｌ／ｋｇ）に対してｐ＜０．０５

二元配置分散分析反復測定、テューキーの多重比較検定。

体重変化％は、０日目（投与前）の体重に対して計算される。

各値は、１０匹の動物からのデータについて各時点、群当たりの平均±ＳＥＭを表す。

【０２７９】

【表２２】

表２２：繰り返し投与後のＤＩＯマウスにおける化合物２及びデュラグルチドの身体組成（体重及び体重パーセント）に対する効果

	時間（日）			
	体重（g）		体重％	
処理	痩せ	肥満	痩せ	肥満
溶媒	24．0±0．2	10．6±0．5	57．5±0．8	25．4±0．8
デュラグルチド（0．3nmol／kg）	22．1±0．3*	7．6±1．1	61．0±1．7	22．8±1．2
化合物2（1．0nmol／kg）	23．1±0．5	9．5±1．3	57．4±2．5	23．1±2．5
化合物2（1．0nmol／kg）PF	23．9±0．3	10．6±0．3	57．7±0．7	25．5±0．5
化合物2（2．0nmol／kg）	22．2±0．4*	8．2±0．7	59．7±1．1	22．0±1．6
化合物2（2．0nmol／kg）PF	23．4±0．1	9．8±0．4	58．5±0．8	24．4±0．8
化合物2（4．0nmol／kg）	20．9±0．3*	7．4±0．7	61．9±2．4	21．6±1．1
化合物2（4．0nmol／kg）PF	21．4±0．6	9．3±0．5	56．8±1．4	24．7±1．0

＊溶媒に対してｐ＜０．０５
一元配置分散分析、テューキーの多重比較検定
各値は、５匹の動物からのデータについて、群当たりの平均±ＳＥＭを表す。

【０２８０】

【表２３】

表２３：繰り返し投与後のＤＩＯマウスにおける６時間空腹時血糖（ｍｇ／ｄＬ）に対する化合物２及びデュラグルチドの効果

処理	血糖（mg／dL）
溶媒	170±5
デュラグルチド（0．3nmol／kg）	123±5*
化合物2（1．0nmol／kg）	164±5^
化合物2（1．0nmol／kg）PF	168±7^
化合物2（2．0nmol／kg）	140±7*
化合物2（2．0nmol／kg）PF	155±6^
化合物2（4．0nmol／kg）	98±4*#
化合物2（4．0nmol／kg）PF	133±6*

＊溶媒に対してｐ＜０．０５；＾デュラグルチド（０．３ｎｍｏｌ／ｋｇ）に対してｐ＜０．０５；＃ＪＮＪ－６４１５１７８９（４．０ｎｍｏｌ／ｋｇ）ＰＦに対してｐ＜０．０５
一元配置分散分析、テューキーの多重比較検定
各値は、１０匹の動物からのデータについて、群当たりの平均±ＳＥＭを表す。

【０２８１】

【表２４】

表２４：繰り返し投与後のＤＩＯマウスにおける６時間空腹時血漿インスリン（ｎｇ／ｍＬ）に対する化合物２及びデュラグルチドの効果

処理	血漿インスリン（ng／mL）
溶媒	3．0±0．4
デュラグルチド（0．3nmol／kg）	1．4±0．2*
化合物2（1．0nmol／kg）	2．0±0．3
化合物2（1．0nmol／kg）PF	2．0±0．1*
化合物2（2．0nmol／kg）	1．1±0．1*^
化合物2（2．0nmol／kg）PF	2．3±0．3
化合物2（4．0nmol／kg）	0．5±0．1*
化合物2（4．0nmol／kg）PF	1．2±0．1*

＊溶媒に対してｐ＜０．０５；＾化合物２（２．０ｎｍｏｌ／ｋｇ）ＰＦに対してｐ＜０．０５
一元配置分散分析、テューキーの多重比較検定

各値は、１０匹の動物からのデータについて、群当たりの平均±ＳＥＭを表す。

【０２８２】

【表２５】

表２５：繰り返し投与後のＤＩＯマウスにおける６時間空腹時血漿ＦＧＦ２１（ｎｇ／ｍＬ）に対する化合物２及びデュラグルチドの効果

処理	FGF21(ng／ml)
溶媒	０．７±０．１
デュラグルチド(０．3nmol／kg)	０．５±０．１
化合物2(１．０nmol／kg)	０．７±０．２
化合物2(１．０nmol／kg)PF	０．４±０．１
化合物2(２．０nmol／kg)	０．６±０．１
化合物2(２．０nmol／kg)PF	０．２±０．１
化合物2(４．０nmol／kg)	１．５±０．３*^
化合物2(４．０nmol／kg)PF	０．３±０．１

＊全ての群に対してｐ＜０．０５；^化合物２（４．０ｎｍｏｌ／ｋｇ）ＰＦに対してｐ＜０．０５

一元配置分散分析、テューキーの多重比較検定

値は、群当たり１０匹の動物からのデータの平均±ＳＥＭを表す。ただし化合物２（１．０ｎｍｏｌ／ｋｇ）及び化合物２（４．０ｎｍｏｌ／ｋｇ）ＰＦは、Ｎ＝９である

【０２８３】

【表２６】

表２６：繰り返し投与後のＤＩＯマウスにおける血漿脂質に対する化合物２及びデュラグルチドの効果

	時間（日）			
処理	遊離脂肪酸（μmol／L）	遊離グリセロール（mmol／L）	トリグリセリド（mg／dL）	総コレステロール（mg／dL）
溶媒	６６．２±３．９	０．６±０．０	３０．１±２．８	１４２．１±５．２
デュラグルチド(０．3nmol／kg)	７３．２±１２．０	０．５±０．１	２４．１±２．３	１４６．１±３．３
化合物2(１．０nmol／kg)	７１．８±５．４	０．５±０．０*	３２．５±４．５	１４９．１±２．３
化合物2(１．０nmol／kg)PF	５８．８±６．１	０．６±０．１	３３．７±４．１	１６１．４±２．０
化合物2(２．０nmol／kg)	７３．８±４．６	０．５±０．０*	３０．４±３．４	１２８．０±６．６#
化合物2(２．０nmol／kg)PF	８４．８±２５．３	０．６±０．０*	３４．５±３．３	１４９．９±４．４
化合物2(４．０nmol／kg)	７１．２±６．４	０．４±０．０*	１６．１±２．０$	８５．７±４．９^
化合物2(４．０nmol／kg)PF	１０２．６±１４．５	０．７±０．０	３１．８±１．１	１３７．８±５．７

＊化合物２（４．０ｎｍｏｌ／ｋｇ）ＰＦに対してｐ＜０．０５；^全ての群に対してｐ＜０．０５；#化合物２（１．０ｎｍｏｌ／ｋｇ）及び化合物２（２．０ｎｍｏｌ／ｋｇ）ＰＦに対してｐ＜０．０５；$ジュラグルチド（０．３ｎｍｏｌ／ｋｇ）を除く全ての群に対してｐ＜０．０５

一元配置分散分析、テューキーの多重比較検定

値は、遊離脂肪酸については群当たり１０匹の動物からのデータ、遊離グリセロールについては群当たり８～１０匹の動物からのデータ、トリグリセリド及び総コレステロールについては群当たり９～１０匹の動物からのデータの平均±ＳＥＭを表す

【０２８４】

実施例１２：インビトロ試験：カニクイザルにおける単回用量の有効性

生物学的に無処置のカニクイザルを、処理前３週間の間に食物摂取に関して毎日モニターした。処理の開始時に、動物を４つの群に分け、同様の平均体重（ｎ＝８～９、各群平均体重７．４～７．９ｋｇ）を得た。各群の動物は、１、３、５，又は７．５ｎｍｏｌ／ｋｇの化合物２に対応する単回皮下投与を受けた。食物消費量を、更に１４日間毎日モニターした。体重を投与日に測定し、投与後４、７、１０、１４日及び２１日後に測定した。食物摂取の割合変化は、その日の食物摂取量を、投与前の７日間の平均の１日食物摂取量と比較することによって、毎日決定した。結果を図１４及び図１５に示す。

【０２８５】
実施例１３：薬物動態（ＰＫ）、薬物動態（ＰＫ）／薬力学（ＰＤ）分析
ＤＩＯマウスＰＫ
化合物２の時間経過をＤＩＯマウスで評価した（表２７）。動物（各時点でｎ＝３）に１０ｎｍｏｌ／ｋｇを皮下投与した。
【０２８６】
【表２７】
表２７：バイオアッセイ及びイムノアッセイによって測定された化合物２の血漿曝露（ｎＭ）の時間経過

時間（時）	血漿曝露（nM）	
	バイオアッセイ	イムノアッセイ
0	該当なし	該当なし
7	6．9±2．0	16．7±6．7
24	32．6±3．5	71．0±8．9
48	55．5±2．4	111．9±16．4
72	45．3±4．0	95．7±9．7
96	42．3±14．5	86．8±6．8
120	26．5±6．9	58．1±14．2

各値は、３匹の動物からのデータについて各時点、群当たりの平均±ＳＥＭを表す。
【０２８７】
ラットＰＫ
化合物２の薬物動態パラメータを、Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットで評価した。薬物動態パラメータ（表２８）の決定のために、投与から０、２４、４８、７２、１４４、２１６、３１２、４０８、及び５０４時間後に採取したサンプルから、バイオアッセイ測定曝露を使用した。
【０２８８】
【表２８】
表２８：Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットにおける化合物２の薬物動態パラメータ

パラメータ	皮下	静脈内
C_{max}（nM）	5．7±2．1	該当なし
T_{max}（時間）	64．0±13．9	該当なし
$AUC_{0-\infty}$（nM*時間）	456±154	865±185
$t_{1/2}$（時間）	38．5±12．8	26．2±6．2

データは平均＋／－標準偏差、曝露バイオアッセイ
【０２８９】
カニクイザルＰＫ
化合物２の薬物動態パラメータを、カニクイザルで評価した。動物に６．４５ｎｍｏｌ／ｋｇで静脈内投与又は皮下投与した。薬物動態パラメータ（表２９）の決定のために、投与から０、１、６、２４、４８、７２、１２０、２４０、３３６、４３２、及び５２８時間後に採取したサンプルから、バイオアッセイ測定曝露を使用した。
【０２９０】
【表２９】
表２９：カニクイザルにおける化合物２の薬物動態パラメータ

パラメータ	皮下	静脈内
C_{max}（nM）	89．1±8．7	該当なし
T_{max}（時間）	56．0±13．9	該当なし
$AUC_{0-\infty}$（nM*時間）	11，700±1380	14，700±5260
$t_{1/2}$（時間）	51．9±6．2	55．9±41．7

値は平均±標準偏差を表す
【０２９１】

当業者は、広い発明概念から逸脱することなく前述の実施形態に変更を行うことができることを理解されたい。したがって、本発明は、開示された特定の実施形態に制限されず、本明細書によって定義されるような本発明の趣旨及び範囲内の修正をも包含することを意図するものと理解される。

【０２９２】

引用した全ての文献は、参照により本明細書に援用される。

以下に、当初の特許請求の範囲に記載の発明を列挙する。

［発明１］

配列番号１６、１７、１８、１９、２０、及び２１のポリペプチド配列をそれぞれ有する、重鎖相補性決定領域１（ＨＣＤＲ１）、ＨＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３、及び軽鎖相補性決定領域１（ＬＣＤＲ１）、ＬＣＤＲ２、及びＬＣＤＲ３を含む、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメント。

［発明２］

前記単離されたモノクローナル抗体が、配列番号１２のポリペプチド配列を有する重鎖可変ドメイン（ＶＨ）、及び配列番号１４のポリペプチド配列を有する軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）を含む、発明１に記載の単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメント。

［発明３］

Ｆｃ部分を更に含む、発明１又は２に記載の単離されたモノクローナル抗体。

［発明４］

配列番号１３のポリペプチド配列を有する重鎖（ＨＣ）と、配列番号１５のポリペプチド配列を有する軽鎖（ＬＣ）とを含む、発明３に記載の単離されたモノクローナル抗体。

［発明５］

発明１～４のいずれか一つに記載の前記モノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントをコードする、単離された核酸。

［発明６］

発明５に記載の前記単離された核酸を含む、ベクター。

［発明７］

発明６に記載の前記ベクターを含む、宿主細胞。

［発明８］

単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントを産生する方法であって、該方法は、発明７に記載の前記宿主細胞を、該モノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントを産生する条件下で培養することと、該抗体又はその抗原結合フラグメントを該細胞又は培養物から回収することとを含む、前記方法。

［発明９］

発明１～４のいずれか一つに記載のモノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントと、それにコンジュゲートされた少なくとも１つの薬理学的活性部分とを含む、コンジュゲート。

［発明１０］

前記薬理学的活性部分が治療用ペプチドである、発明９に記載のコンジュゲート。

［発明１１］

前記治療用ペプチドが、配列番号１８のシステイン残基において、前記モノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントにコンジュゲートされる、発明１０に記載のコンジュゲート。

［発明１２］

前記治療用ペプチドが、リンカーを介して前記モノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントにコンジュゲートされる、発明１０又は１１に記載のコンジュゲート。

［発明１３］

前記リンカーが、ペプチドリンカー、炭化水素リンカー、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）リンカー、ポリプロピレングリコール（ＰＰＧ）リンカー、多糖類リンカー、ポリ

エステルリンカー、又はＰＥＧ及び組み込み複素環からなるハイブリッドリンカーを含む、発明１２に記載のコンジュゲート。

［発明１４］

前記治療用ペプチドが、オキシントモジュリン、グルカゴン様ペプチド１（ＧＬＰ１）、エキセンジン（エキセナチド）、アミリン（プラムリンタイド）、α－メラノサイト刺激ホルモン（ＭＳＨ）、コカイン及びアンフェタミン調節転写物（ＣＡＲＴ）、神経ペプチドＹ受容体Ｙ１（ＮＰＹ１）拮抗薬（antagonists）、神経ペプチドＹ受容体Ｙ５（ＮＰＹ５）拮抗薬、ニューロテンシンＳ、神経ペプチドＢ、神経ペプチドW、グレリン、ボンベシン様受容体３（ＢＲＳ３）、ガラニン、コレシストキニン（ＣＣＫ）、オレキシン、メラニン濃縮ホルモン（ＭＣＨ）、オキシトシン、並びにストレスコピンからなる群から選択される、発明１０～１３のいずれか一つに記載のコンジュゲート。

［発明１５］

前記治療用ペプチドが、配列番号２４のポリペプチド配列を含むオキシントモジュリンである、発明１４に記載のコンジュゲート。

［発明１６］

前記治療用ペプチドの側鎖上に導入された求電子物質（好ましくはブロモアセトアミド又はマレイミド）を、該モノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントの配列番号１８のシステイン残基のスルフヒドリル基と反応させ、これにより、該治療用ペプチドと、該モノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントとの間に共有結合を形成することを含む、発明１０～１５のいずれか一つに記載の前記コンジュゲートを製造する方法。

［発明１７］

発明９～１５のいずれか一つに記載の前記コンジュゲートと、薬学的に許容可能な担体とを含む、医薬組成物。

［発明１８］

発明９～１５のいずれか一つに記載の前記コンジュゲートを含む医薬組成物の製造方法であって、前記モノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントを、薬学的に許容可能な担体と組み合わせることで、前記医薬組成物を得ることを含む、前記方法。

［発明１９］

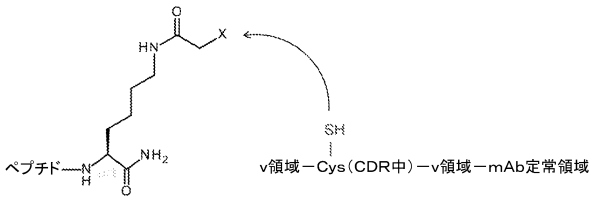
対象における治療用ペプチドの半減期を延長する方法であって、該方法は、該治療用ペプチドを、それぞれ配列番号１６、１７、１８、１９、２０、及び２１のポリペプチド配列を有する、重鎖相補性決定領域１（ＨＣＤＲ１）、ＨＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３、及び軽鎖相補性決定領域１（ＬＣＤＲ１）、ＬＣＤＲ２、及びＬＣＤＲ３を含む、単離モノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントとコンジュゲートさせることを含み、該治療用ペプチドは、配列番号１８のＣｙｓ残基で、該モノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントにコンジュゲートされる、前記方法。

［発明２０］

前記治療用ペプチドが、オキシントモジュリン、グルカゴン様ペプチド１（ＧＬＰ１）、エキセンジン（エキセナチド）、アミリン（プラムリンタイド）、α－メラノサイト刺激ホルモン（ＭＳＨ）、コカイン及びアンフェタミン調節転写物（ＣＡＲＴ）、神経ペプチドＹ受容体Ｙ１（ＮＰＹ１）拮抗薬（antagonists）、神経ペプチドＹ受容体Ｙ５（ＮＰＹ５）拮抗薬、ニューロテンシンＳ、神経ペプチドＢ、神経ペプチドW、グレリン、ボンベシン様受容体３（ＢＲＳ３）、ガラニン、コレシストキニン（ＣＣＫ）、オレキシン、メラニン濃縮ホルモン（ＭＣＨ）、オキシトシン、並びにストレスコピンからなる群から選択される、発明１９に記載の方法。

【図面】

【図１】

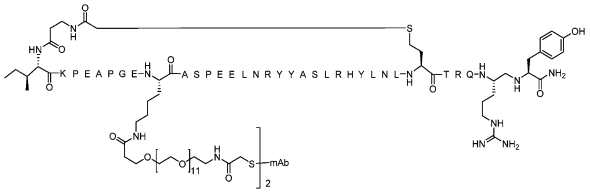


【図２】

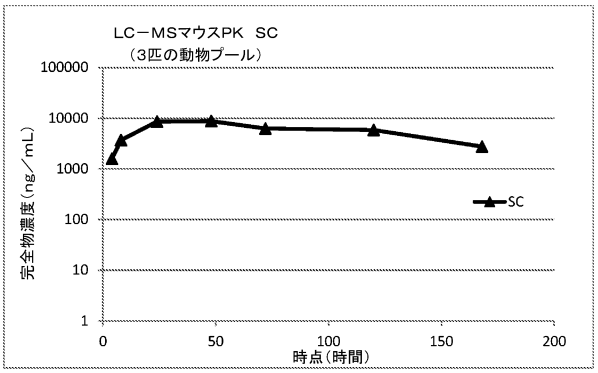
PH9H5 VH（配列番号4）
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSV
KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYDGIYGELDFWGQGTLVTVSS

PH9L3 VL（配列番号3）
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSG
SGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGQGTKVEIK

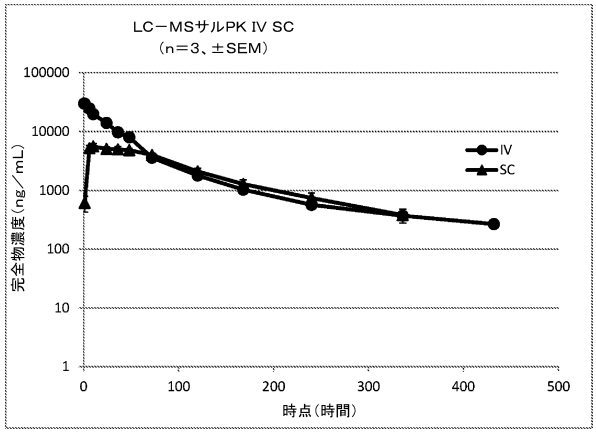
【図３】



【図４】

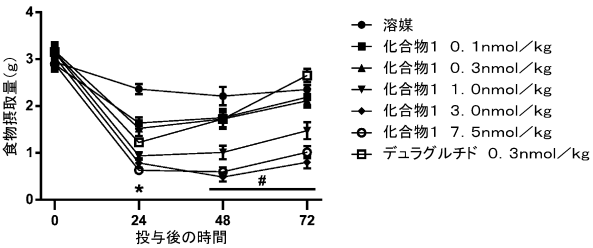


【図５】



【図６】

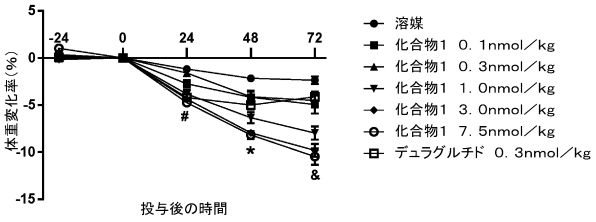
化合物1投与後のDIOマウスにおける食物摂取



二元配置分散分析反復測定、テューキーの
*p＜0．05溶媒対全ての群
#p＜0．05溶媒対化合物1
1．0、3．0、及び7．5nmol／kg

【図７】

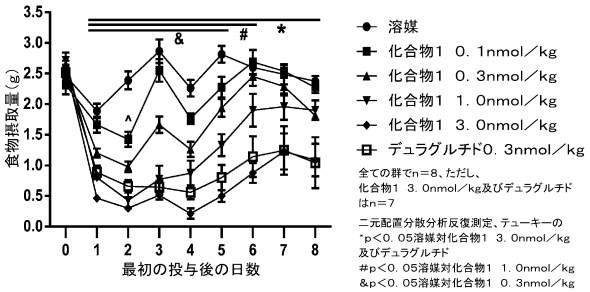
化合物1投与後のDIOマウスにおけるBW変化



二元配置分散分析反復測定、テューキーの
*p＜0. 05溶媒対全ての群
#p＜0. 05溶媒対化合物1 1. 0、3. 0、
7. 5nmol／kg及びデュラグルチド
& p＜0. 05溶媒対全ての化合物1群

【図８】

化合物1投与後のDIOマウスにおける食物摂取

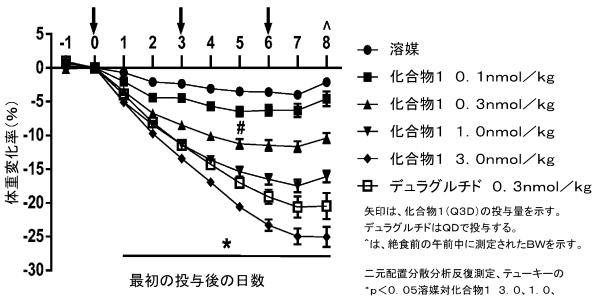


全ての群でn＝8、ただし、
化合物1 3. 0nmol／kg及びデュラグルチド
はn＝7

二元配置分散分析反復測定、テューキーの
*p＜0. 05溶媒対化合物1 3. 0nmol／kg
及びデュラグルチド
#p＜0. 05溶媒対化合物1 1. 0nmol／kg
&p＜0. 05溶媒対化合物1 0. 3nmol／kg
^p＜0. 05溶媒対化合物1 0. 1nmol／kg

【図９】

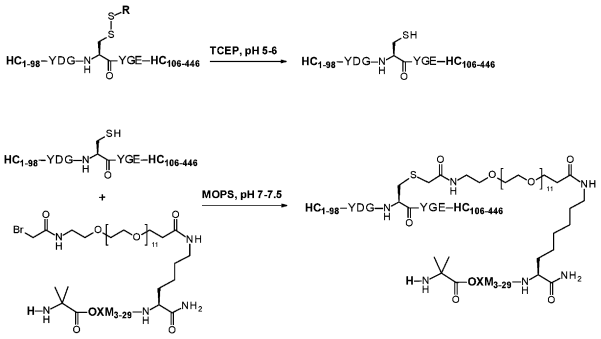
化合物1投与後のDIOマウスにおけるBW変化



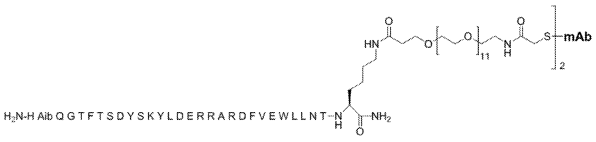
矢印は、化合物1（Q3D）の投与量を示す。
デュラグルチドはQDで投与する。
^は、絶食前の午前中に測定されたBWを示す。

二元配置分散分析反復測定、テューキーの
*p＜0. 05溶媒対化合物1 3. 0、1. 0、
3. 0nmol／kg及びデュラグルチド
#p＜0. 05溶媒対化合物1 0. 1nmol／kg

【図１０】

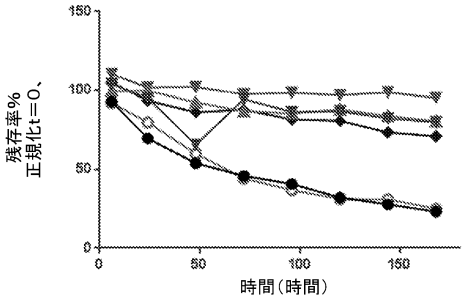


【図１１】

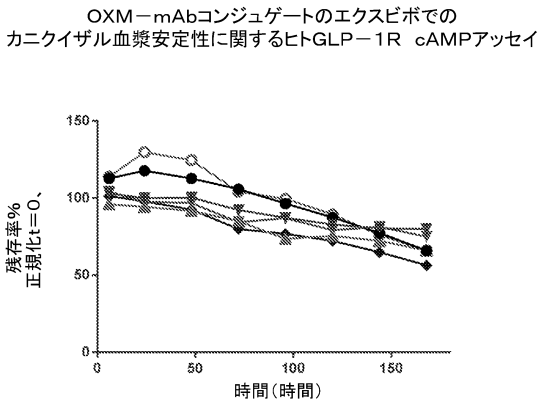


【図１２】

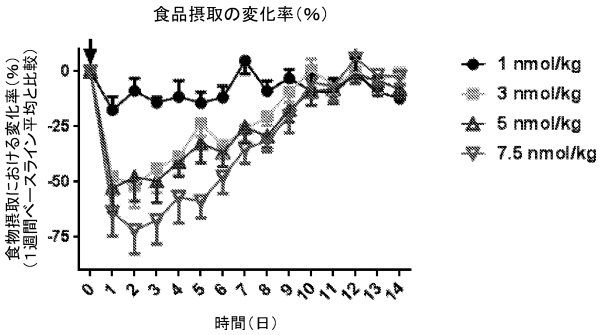
OXM－mAbコンジュゲートのエクスビボでの
ヒト血漿安定性に関するヒトGLP－1R cAMPアッセイ



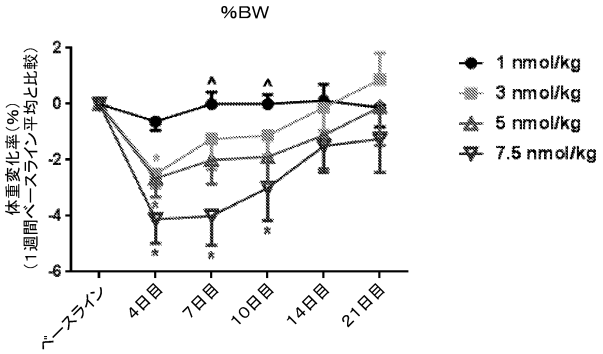
【図１３】



【図１４】



【図１５】



*それぞれのベースラインに対してp＜0．05
^7．5nmol／kgに対してp＜0．05
二元配置分散分析反復測定、テューキーの

【配列表】

0007231539000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		
C12N 1/19 (2006.01)		C12N	1/19	
C12N 1/21 (2006.01)		C12N	1/21	
C12N 5/10 (2006.01)		C12N	5/10	
A61K 47/68 (2017.01)		A61K	47/68	
A61K 38/26 (2006.01)		A61K	38/26	
A61K 38/22 (2006.01)		A61K	38/22	
A61K 38/17 (2006.01)		A61K	38/17	
A61K 38/34 (2006.01)		A61K	38/34	
A61K 39/395 (2006.01)		A61K	39/395	M
A61P 43/00 (2006.01)		A61P	43/00	111
A61K 38/00 (2006.01)		A61K	38/00	
A61K 45/00 (2006.01)		A61K	45/00	

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

前置審査

(72)発明者 マシーラグ，マーク
アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 １９４７７，スプリング ハウス，マッキーン ロード １４００
(72)発明者 パッチ，レイモンド，ジェイ．
アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 １９４７７，スプリング ハウス，マッキーン ロード １４００
(72)発明者 ジャン，ルイ
アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 １９４７７，スプリング ハウス，マッキーン ロード １４００
(72)発明者 ケース，マーティン，エー．
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ９２１２１，サン ディエゴ，メリーフィールド ロウ ３２１０
(72)発明者 ウォール，マーク
アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 １９４７７，スプリング ハウス，マッキーン ロード １４００
(72)発明者 ジャン，ユエ－メイ
アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 １９４７７，スプリング ハウス，マッキーン ロード １４００
(72)発明者 ランワラ，シャミナ
アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 １９４７７，スプリング ハウス，マッキーン ロード １４００
(72)発明者 レオナルド，ジェームズ エヌ．
アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 １９４７７，スプリング ハウス，マッキーン ロード １４００
(72)発明者 カマチョ，ラウル シー．
アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 １９４７７，スプリング ハウス，マッキーン ロード １４００
(72)発明者 ハンター，マイケル，ジェイ．
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ９２１２１，サン ディエゴ，メリーフィールド ロウ ３２１０
(72)発明者 ダクイノ，キャサリン，イー．
アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 １９４７７，スプリング ハウス，マッキーン ロード １４００
(72)発明者 エドワーズ，ウィルソン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ９２１２１，サン ディエゴ，メリーフィールド ロウ ３２１０
(72)発明者 スワンソン，ロナルド ブイ．
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ９２１２１，サン ディエゴ，メリーフィールド ロウ ３２１０
(72)発明者 ジアン，ウェニング
アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 １９４７７，スプリング ハウス，マッキーン ロード １４００
(72)発明者 チ，エレン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ９２１２１，サン ディエゴ，メリーフィールド ロウ ３２１０

審査官 山内 達人

(56)参考文献 国際公開第２０１５／１５７５９５（WO，A１）
米国特許出願公開第２０１４／０２２０６３４（ＵＳ，Ａ１）
BioDrugs，2015年，29，p. 215-239

MABS，2016年06月，VOL. 8, NO. 6，p. 1045-1063

(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)

Ｃ０７Ｋ
Ｃ１２Ｎ
Ｃ１２Ｐ
Ａ６１Ｋ
Ａ６１Ｐ
ＣＡｐｌｕｓ／ＲＥＧＩＳＴＲＹ（ＳＴＮ）