

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6877357号
(P6877357)

(45) 発行日 令和3年5月26日(2021.5.26)

(24) 登録日 令和3年4月30日(2021.4.30)

(51) Int.Cl.

F 1

A 6 1 K 39/395	(2006.01)	A 6 1 K 39/395	Z N A N
A 6 1 P 3/00	(2006.01)	A 6 1 P 3/00	
A 6 1 P 21/00	(2006.01)	A 6 1 P 21/00	
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 2 3 L 33/18	(2016.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1

請求項の数 15 (全 43 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-553974 (P2017-553974)
(86) (22) 出願日	平成28年4月15日 (2016.4.15)
(65) 公表番号	特表2018-512435 (P2018-512435A)
(43) 公表日	平成30年5月17日 (2018.5.17)
(86) 國際出願番号	PCT/US2016/027774
(87) 國際公開番号	W02016/168613
(87) 國際公開日	平成28年10月20日 (2016.10.20)
審査請求日	平成31年3月28日 (2019.3.28)
(31) 優先権主張番号	62/147,853
(32) 優先日	平成27年4月15日 (2015.4.15)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)
(31) 優先権主張番号	62/261,528
(32) 優先日	平成27年12月1日 (2015.12.1)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)

(73) 特許権者	597160510 リジエネロン・ファーマシューティカルズ ・インコーポレイテッド REGENERON PHARMACEUTICALS, INC. アメリカ合衆国 10591-6707 ニューヨーク州タリータウン、オールド・ソーミル・リバー・ロード 777番
(74) 代理人	100127926 弁理士 結田 純次
(74) 代理人	100140132 弁理士 竹林 則幸

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 GDF-8阻害剤を用いて、強度及び機能を増加させる方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象の除脂肪体重を増加させるための非医学的方法で使用するための、有効量のGDF-8阻害剤を含む組成物であって、

該GDF-8阻害剤は、GDF-8に特異的に結合する抗体又はその抗原結合断片であって、配列番号362のアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域(HCDR)1(HCDR1)、配列番号364のアミノ酸配列を含むHCDR2及び配列番号366のアミノ酸配列を含むHCDR3を有する重鎖相補性決定領域(HCDRs)と、配列番号370のアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域(LCDR)1(LCDR1)、配列番号372のアミノ酸配列を含むLCDR2及び配列番号374のアミノ酸配列を含むLCDR3を有する軽鎖相補性決定領域(LCDRs)とを含む抗体又はその抗原結合断片であり、

該方法は以下の：

10

- 運動レジメンを対象に提供する工程であって、該レジメンはレジスタンストレーニングを含む、前記工程と、
- 有効量のGDF-8阻害剤を含む組成物を投与する工程とを含む、上記組成物。

【請求項 2】

対象の除脂肪体重を増加させることにより改善できる疾患、障害又は状態の治療のための方法で使用するための、有効量のGDF-8阻害剤を含む組成物であって、

該GDF-8阻害剤は、GDF-8に特異的に結合する抗体又はその抗原結合断片であって、配列番号362のアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域(HCDR)1(HCDR1)、配列番号364のアミノ酸

20

配列を含むHCDR2及び配列番号366のアミノ酸配列を含むHCDR3を有する重鎖相補性決定領域 (HCDRs) と、配列番号370のアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域(LCDR)1(LCDR1)、配列番号372のアミノ酸配列を含むLCDR2及び配列番号374のアミノ酸配列を含むLCDR3を有する軽鎖相補性決定領域 (LCDRs) とを含む抗体又はその抗原結合断片であり、該方法は以下の：

- a) 運動レジメンを対象に提供する工程であって、該運動レジメンはレジスタンストレーニングを含む、前記工程と、
- b) 有効量のGDF-8阻害剤を含む組成物を投与する工程とを含む、上記組成物。

【請求項3】

10

GDF-8活性に関連する、疾患又は障害を治療する方法で使用するための、有効量のGDF-8阻害剤を含む組成物であって、

該GDF-8阻害剤は、GDF-8に特異的に結合する抗体又はその抗原結合断片であって、配列番号362のアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域(HCDR)1(HCDR1)、配列番号364のアミノ酸配列を含むHCDR2及び配列番号366のアミノ酸配列を含むHCDR3を有する重鎖相補性決定領域 (HCDRs) と、配列番号370のアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域(LCDR)1(LCDR1)、配列番号372のアミノ酸配列を含むLCDR2及び配列番号374のアミノ酸配列を含むLCDR3を有する軽鎖相補性決定領域 (LCDRs) とを含む抗体又はその抗原結合断片であり、該方法は以下の：

- a) 有効量のGDF-8阻害剤を含む組成物を投与する工程と、

20

- b) レジスタンストレーニングを含む運動レジメンを提供する工程とを含み、

該疾患又は障害は、サルコペニア、悪液質、筋傷害、筋消耗、筋肉萎縮及び孤発性封入筋炎(sIBM)からなる群から選択される、上記組成物。

【請求項4】

悪液質が、特発性の、又は、癌、慢性腎不全及び慢性閉塞性肺疾患からなる群から選択される他の状態に対する続発性のものである、請求項3に記載の使用のための組成物。

【請求項5】

筋委縮又は筋消耗が、廃用、固定化、床上安静、損傷、医学的処置若しくは外科的介入が引き起こす、又はそれらと関連する、請求項3に記載の使用のための組成物。

30

【請求項6】

レジスタンストレーニングが、利き手、非利き手、脚、腕、胸及びそれらの組み合わせからなる群から選択される筋肉のトレーニングのための運動のセットを含む、請求項1～5のいずれか1項に記載の使用のための組成物。

【請求項7】

有効量のGDF-8阻害剤が、少なくとも400mgである、請求項1～6のいずれか1項に記載の使用のための組成物。

【請求項8】

有効量のGDF-8阻害剤が、約0.01～約20mg/kg体重、約0.1～約10mg/kg体重、又は約0.1～約5mg/kg体重の単回用量からなる群から選択される投与レジメンを含む、請求項1～7のいずれか1項に記載の使用のための組成物。

40

【請求項9】

GDF-8阻害剤の投与が、心筋及び/又は心機能に有害な副作用を与えることなく除脂肪体重を増加させるために有効な量である、請求項1～8のいずれか1項に記載の使用のための組成物。

【請求項10】

組成物が、少なくとも、6週毎に1回、5週毎に1回、4週毎に1回、2週毎に1回、週1回、週2回、週3回、週4回又は週5回投与される、請求項1～9のいずれか1項に記載の使用のための組成物。

【請求項11】

50

組成物が、静脈内、皮下又は経口投与のために製剤化される、請求項1～10のいずれか1項に記載の使用のための組成物。

【請求項12】

抗体又は抗原結合性断片が、配列番号360からなるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域(HCVR)と配列番号368からなるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域(LCVR)を含む、請求項1～11のいずれか1項に記載の使用のための組成物。

【請求項13】

抗体又はその抗原結合性断片が、配列番号340のアミノ酸配列を含むヒトGDF-8のアミノ酸残基48～72を含むエピトープ内に結合する、請求項1～12のいずれか1項に記載の使用のための組成物。

10

【請求項14】

対象が60歳以上である、請求項1～13のいずれか1項に記載の使用のための組成物。

【請求項15】

請求項1～14のいずれか1項に記載の組成物の、GDF-8活性を阻害することにより治療可能な疾患または障害に罹患した、その診断を受けた、又はそれに罹患しているリスクのある、患者の治療に使用するための医薬の製造のための、使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

20

関連出願の相互参照

本出願は、2016年4月15日にPCT国際特許出願として出願されており、2015年4月15日に出願の米国仮特許出願第62/147,853号、2015年9月30日に出願の米国仮特許出願第62/234,899号、及び2015年12月1日に出願の米国仮特許出願第62/261,528号に対する優先権を主張する。それらの開示は、全体が本明細書に組み込まれている。

【0002】

配列表

本出願は、表題「40848-0055W0U1_SeqList-text」のtxtファイルとしての電子フォーマットでの配列表を含み、これは、2016年4月15日に作成され、160キロバイト(KB)のサイズを有する。txtファイル「40848-0055W0U1_SeqList-text」の内容は、参照により本明細書に組み込まれている。

30

【背景技術】

【0003】

骨格筋量の減少は、加齢、虚弱及び特定の代謝状態と関連がある多種多様な障害の進行において重要な病理学的役割を果たすものと思われる。高齢者においては、サルコペニア等の状態及び股関節骨折等の特定の事象が、全筋量の顕著な損失に直接つながる場合がある。より高齢の集団においても、より若年の集団においても、固定化及び整形外科手術からの回復は、術式により生じた筋肉の廃用及び萎縮の両方に伴う急性の筋肉の損失の程度に関連がある場合がある。更に、骨格筋量の増加又は維持により、肥満の予防及び代謝の改善を得ることもできる。

40

【0004】

ミオスタチン又は増殖分化因子8(GDF8)は、可溶性TGF- β スーパーファミリーリガンドである。GDF8は、主に骨格筋中で発現する、筋肉の増殖の負の制御因子であるが、心臓及び脂肪等の他の組織における低い発現が報告されており、その発現は、骨格筋中で認められるレベルのおよそ100分の1のレベルである(McPherron、Nature、387:83頁、1997;Sharma、J. Cell. Phys.、180:1頁、1999;Lee、Annrev. Cell Dev. Biol.、20:61頁、2004;Allen、Pysiol. Rev.、88:257頁、2008;Heineke、Cir.、121:419頁、2010)。成熟ミオスタチンは、種間で高度に保存されており、マウス、ウシ、イヌ及びヒトを含めた、複数の種において、ミオスタチン遺伝子の不活性化突然変異により、過剰筋肉量の表現型が生じる。反対に、マウスにおけるミオスタチンの過剰発現(胸腺欠損マウスの大腿中へのトランス

50

フェクトしたCHO細胞の注射又は横紋筋遺伝子導入マウスの生成による)により、筋肉線維サイズの減少に起因する体重の顕著な減少が引き起こされた(McPherron、1997、上記で引用;Grobet、*Nat. Genet.*、17:71頁、1997;Mosher、*PLOS Genet.*、3:e79、2007;Schuelke、*NEJM*、350:2682頁、2004)。ミオスタチン欠損マウスの表現型により、発育の間の筋肉サイズの制御におけるミオスタチンの重要性が実証されており、一方、成体の筋肉においてはまた、中和抗体、デコイの受容体又はその他のアンタゴニストによるミオスタチンの阻害によって、肥大を惹起する恐れもある。しかし、サルコペニアのような状態及び代謝状態を治療するためにこれらの阻害剤を使用する場合、ミオスタチン阻害剤の心臓組織に対する機能上の作用は、望ましくない副作用プロファイルをもたらす恐れがある。

【先行技術文献】

10

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】米国特許第5,500,362号

【特許文献2】米国特許第5,821,337号

【特許文献3】米国特許第8,840,894号

【特許文献4】米国特許第7,807,159号

【特許文献5】米国特許第8,999,343号

【特許文献6】米国公開第2013/0209489号

【特許文献7】米国公開第2013/0142788号

【特許文献8】米国特許第8,940,874号

20

【特許文献9】米国特許第8,415,459号

【特許文献10】米国特許第7,731,961号

【特許文献11】米国特許第8,496,934号

【特許文献12】米国特許第8,992,913号

【特許文献13】欧州特許第1773041B1号

【特許文献14】米国特許第7,632,499号

【特許文献15】米国特許第7,635,760号

【特許文献16】米国特許第8,063,188号

【特許文献17】WO05/103081

【非特許文献】

30

【0006】

【非特許文献1】McPherron、*Nature*、387:83頁、1997

【非特許文献2】Sharma、*J. Cell. Phys.*、180:1頁、1999;

【非特許文献3】Lee、*Annrev. Cell Dev. Biol.*、20:61頁、2004

【非特許文献4】Allen、*Pysiol. Rev.*、88:257頁、2008

【非特許文献5】Heineke、*Cir.*、121:419頁、2010

【非特許文献6】Grobet、*Nat. Genet.*、17:71頁、1997

【非特許文献7】Mosher、*PLOS Genet.*、3:e79、2007

【非特許文献8】Schuelke、*NEJM*、350:2682頁、2004

【非特許文献9】Clynesら、*Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*、95:652～656頁(1998)

40

【非特許文献10】*Proteins, Structures and Molecular Principles*(Creighton、1984、W. H. Freeman and Company、New York)

【非特許文献11】*Introduction to Protein Structure*(Branden & Tooze編、1991、Garland Publishing、NY)

【非特許文献12】Thorntonら、1991、*Nature*、354:105頁

【非特許文献13】Fauchere(1986)*J. Adv. Drug Res.*、15:29頁

【非特許文献14】Evansら(1987)*J. Med. Chem.*、30:1229頁

【非特許文献15】Rizoら(1992)*Ann. Rev. Biochem.*、61:387頁

【非特許文献16】Pearson(1994)*Methods Mol. Biol.*、24:307～331頁

【非特許文献17】Gonnetら(1992)*Science*、256:1443～45頁

50

- 【非特許文献 18】Altschulら (1990) *J. Mol. Biol.*、215:403 ~ 410 頁
- 【非特許文献 19】Altschulら (1997) *Nucleic Acids Res.*、25:3389 ~ 402 頁
- 【非特許文献 20】Junghansら、*Cancer Res.*、1990;50:1495 ~ 1502 頁
- 【非特許文献 21】Reddyら (2000) *J. Immunol.*、164:1925 ~ 1933 頁
- 【非特許文献 22】Kabat、「Sequences of Proteins of Immunological Interest」、National Institutes of Health、Bethesda、Md.(1991)
- 【非特許文献 23】Al-Lazikaniら、*J. Mol. Biol.*、273:927 ~ 948 頁 (1997)
- 【非特許文献 24】Martinら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*、86:9268 ~ 9272 頁 (1989)
- 【非特許文献 25】Shieldら (2002) *JBC*、277:26733 頁
- 【非特許文献 26】Tuttら、1991、*J. Immunol.*、147:60 ~ 69 頁 10
- 【非特許文献 27】Kuferら、2004、*Trends Biotechnol.*、22:238 ~ 244 頁
- 【非特許文献 28】Remington's Pharmaceutical Sciences、Mack Publishing Company、Easton、PA
- 【非特許文献 29】Powellら、「Compendium of excipients for parenteral formulations」、PDA(1998) *J Pharm Sci Technol*、52:238 ~ 311 頁
- 【非特許文献 30】Wuら (1987) *J. Biol. Chem.*、262:4429 ~ 4432 頁
- 【非特許文献 31】Langer (1990) *Science*、249:1527 ~ 1533 頁
- 【発明の概要】
- 【発明が解決しようとする課題】
- 【0007】 20
- GDF8阻害剤を用いて、強度及び機能を増加させる方法
- 本開示は、本明細書で記載する方法において使用するための方法及び製剤を提供する。GDF8阻害剤は、例えば、運動と組み合わせて、対象の除脂肪筋量を増強するのに有用である。いくつかの実施形態では、対象は、対象のレジスタンストレーニングに参加する能力を顕著に制限する疾患も障害も有さない対象である。実施形態では、こうした疾患又は障害は、コントロール不良の糖尿病、亜急性心筋梗塞、不安定な心臓状態、急性心不全、重度の心筋炎、コントロール不良の高血圧、手術を必要とする心臓弁膜疾患及び重度の大動脈狭窄等の、医師が身体活動の制限を対象に推奨しているか又は運動が禁忌である疾患又は障害である。
- 【課題を解決するための手段】 30
- 【0008】
- 実施形態では、対象の除脂肪体重を増加させるための方法は、運動レジメンを対象に提供する工程と、有効量のGDF-8阻害剤を含む組成物を投与する工程とを含み、有効量は少なくとも400mgである。実施形態では、運動レジメンには、非限定的に、レジスタンストレーニング、ウエイトトレーニング、ヨガ、有酸素運動及びピラティスが含まれる。実施形態では、GDF8阻害剤は、GDF8に特異的に結合する抗体又は抗原結合性断片である。実施形態では、抗体又は抗原結合性断片は、配列番号2、配列番号18、配列番号34、配列番号50、配列番号66、配列番号82、配列番号98、配列番号114、配列番号130、配列番号146、配列番号162、配列番号178、配列番号194、配列番号210、配列番号226、配列番号242、配列番号258、配列番号274、配列番号290、配列番号306、配列番号360、及び配列番号376からなる群から選択される重鎖可変領域内に含有される重鎖CDRを含む。実施形態では、方法は、配列番号10、配列番号26、配列番号42、配列番号58、配列番号74、配列番号90、配列番号106、配列番号122、配列番号138、配列番号154、配列番号170、配列番号186、配列番号202、配列番号218、配列番号234、配列番号250、配列番号266、配列番号282、配列番号298、配列番号314、配列番号322、配列番号368、及び配列番号384からなる群から選択される軽鎖可変領域内に含有される軽鎖CDRを含む抗体又は抗原結合性断片を更に含む。 40
- 【0009】
- 実施形態では、組成物を、除脂肪筋量を増加させるのに有効な量のGDF8阻害剤を含有するように製剤化する。実施形態では、有効量は、少なくとも0.1mg/kg ~ 約10gm/kg、1mg/kg ~ 約1gm/kg、又は10mg/kg ~ 100mg/kgである。実施形態では、組成物を、少なくとも週1 50

回、週2回、週3回、週4回又は週5回投与する。実施形態では、運動レジメンを、少なくとも12週間続ける。実施形態では、組成物を、静脈内、皮下又は経口投与のために製剤化する。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1A】年齢60歳以上の健常ボランティアにおいて、皮下(SC)投与したREGN1033(抗GDF8抗体)の安全性、忍容性、薬物動態(PK)、免疫原性及び薬力学的(PD)作用を評価するよう10に設計したMAD研究の結果を示すグラフである。全部で5つのコホートについて研究し、各コホートに12人の対象が登録された。対象に、REGN1033(n=9)又はプラセボ(n=14)を皮下投与した。計画されたREGN1033投与レジメンは、対象1人当たり、100、200又は400mgを、2週間に1回(Q2W)、全部で6用量、及び対象1人当たり、200mg又は400mgを、4週間に1回(Q4W)、全部で3用量であった。%除脂肪体重を、二重エネルギーX線吸収測定法(DEXA)を使用して決定した。

【図1B】プラセボ単独(上から3番目の線):プラセボとレジスタンストレーニング(RT)(一番下の線);REGN1033、皮下400mg単独、研究期間にわたり全部で6用量(上から2番目の線):及びREGN1033、皮下400mgとRT、研究期間にわたり全部で6用量(一番上の線):を投与した対象からなるそれぞれの群について、研究のための来診時の除脂肪筋量のパーセント変化を示すグラフである。

【図2】プラセボ単独(上から3番目の線);プラセボとレジスタンストレーニング(RT)(一番下の線);REGN1033、皮下400mg単独、研究期間にわたり全部で6用量(上から2番目の線):及びREGN1033、皮下400mgとRT、研究期間にわたり全部で6用量(一番上の線):を投与した対象からなるそれぞれの群について、研究のための各来診時の体肢脂肪量の%変化を示すグラフである。プラセボ単独の線とREGN1033、皮下400mg単独の線とが、相互にオーバーラップしている。

【図3A】プラセボ単独(上から3番目の線):プラセボとレジスタンストレーニング(RT)(一番下の線);REGN1033、皮下400mg単独、研究期間にわたり全部で6用量(上から2番目の線):及びREGN1033、皮下400mgとRT、研究期間にわたり全部で6用量(一番上の線):を投与した対象からなるそれぞれの群について、研究のための各来診時の筋肉内脂肪を含む大腿筋量のパーセント変化を示すグラフである。

【図3B】プラセボ単独(上から3番目の線);プラセボとレジスタンストレーニング(RT)(一番下の線);REGN1033、皮下400mg単独、研究期間にわたり全部で6用量(上から2番目の線):及びREGN1033、皮下400mgとRT、研究期間にわたり全部で6用量(一番上の線):を投与した対象からなるそれぞれの群について、研究のための各来診時の筋肉内脂肪を除く大腿筋量のパーセント変化を示すグラフである。プラセボ単独の線と、プラセボとRTの線とが、相互にオーバーラップしている。

【図4】プラセボ単独(一番上の線);プラセボとレジスタンストレーニング(RT)(上から2番目の線);REGN1033、皮下400mg単独、研究期間にわたり全部で6用量(上から3番目の線):及びREGN1033、皮下400mgとRT、研究期間にわたり全部で6用量(一番下の線):を投与した対象からなるそれぞれの群について、研究のための各来診時のガイノイド脂肪のパーセント変化を示すグラフである。プラセボとRTの線と、REGN1033、400mg皮下単独の線とが、相互にオーバーラップしている。

【図5】プラセボ単独(一番下の線);プラセボとレジスタンストレーニング(RT)(上から3番目の線);REGN1033、皮下400mg単独、研究期間にわたり全部で6用量(上から2番目の線):及びREGN1033、皮下400mgとRT、研究期間にわたり全部で6用量(一番上の線):を投与した対象からなるそれぞれの群について、研究のための各来診時のチェストプレスのパーセント変化を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0011】

本方法を記載する前に、本開示は特定の方法及び記載する実験条件に限定されず、したがって、そのような方法及び条件は変化させることができることを理解されたい。また、

10

20

30

40

50

本発明の範囲は添付の特許請求の範囲によってのみ制限されることから、本明細書で使用する用語法は特定の実施形態を記載するためだけのものであり、それらに制限する意図はないことも理解されたい。

【0012】

単数形「ある(a)」、「ある(an)」及び「その(the)」は、本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用する場合、そうでないことが文脈から明らかに示されない限り、複数への言及を含む。したがって、例えば、「ある方法」への言及は、1つ若しくは複数の方法、並びに/又は本明細書に記載するタイプ及び/若しくは本開示を読めば当業者に明らかになるタイプの1つ若しくは複数の工程を含む。

【0013】

別段の定義がない限り、本明細書で使用する全ての科学技術用語は、本発明が属する分野の当業者が一般に理解するのと同じ意味を有する。

【0014】

本明細書で使用する場合、特定の列挙する数値に関して使用する場合の用語「約」は、列挙する値から値が1%以下だけ変化し得ることを意味する。例えば、本明細書で使用する場合、表現「約100」は、99及び101並びに間にある全ての値(例えば、99.1、99.2、99.3、99.4等)を含む。

【0015】

本明細書に記載する方法及び材料に類似する又はそれらと均等な任意の方法及び材料を使用して、本発明を実行又は試験することができるが、好ましい方法及び材料をここに記載する。本明細書で言及する特許、出願及び特許以外の刊行物は全て、それらの全体が参考により本明細書に組み込まれている。

【0016】

定義

「ヒト増殖分化因子-8」、「GDF8」及び「ミオスタチン」を交換可能に使用して、配列番号338の核酸配列がコードするタンパク質、並びに配列番号339(プロペプチド)及び配列番号340(成熟タンパク質)からなるアミノ酸配列を有するタンパク質を指す。

【0017】

用語「抗体」は、本明細書で使用する場合、4つのポリペプチド鎖、すなわち、ジスルフィド結合により相互接続している2つの重(H)鎖及び2つの軽(L)鎖、並びにそれらの多量体(例えば、IgM)を含む免疫グロブリン分子を指すものとする。それぞれの重鎖が、重鎖可変領域(本明細書では、HCVR又はV_Hと略す)及び重鎖定常領域を含む。重鎖定常領域は、3つのドメイン、C_H1、C_H2及びC_H3を含む。それぞれの軽鎖が、軽鎖可変領域(本明細書では、LCVR又はV_Lと略す)及び軽鎖定常領域を含む。軽鎖定常領域は、1つのドメイン(C_L1)を含む。V_H領域及びV_L領域は、フレームワーク領域(FR)と呼ばれるより保存されている領域の間に介在する相補性決定領域(CDR)と呼ばれる超可変性の領域に更に細分することができる。V_H及びV_Lはそれぞれ、3つのCDR及び4つのFRで構成され、それらは、アミノ末端からカルボキシ末端に、以下の順番:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4で並ぶ。本発明の異なる実施形態では、抗GDF8抗体(又はその抗原結合性部分)のFRは、ヒト生殖系列配列と同一であってもよく、又は天然若しくは人工的に改変されていてもよい。アミノ酸のコンセンサス配列を、2つ以上のCDRを並べて分析した結果に基づいて定義することができる。

【0018】

用語「抗体」はまた、本明細書で使用する場合、完全な抗体分子の抗原結合性断片も含む。抗体の「抗原結合性部分」、抗体の「抗原結合性断片」等という用語は、本明細書で使用する場合、天然に存在する、酵素的に入手可能な、合成の、又は遺伝子工学的に操作した任意のポリペプチド又は糖タンパク質であって、抗原に特異的に結合して、複合体を形成するポリペプチド又は糖タンパク質を含む。抗体の抗原結合性断片は、例えば、完全な抗体分子から、任意の適切な標準的な技法、例えば、タンパク質分解性の消化、又は抗体の可変ドメイン、及び任意選択で、定常ドメインをコードするDNAの操作及び発現が関

10

20

30

40

50

与する組換え遺伝子工学の技法を使用して誘導することができる。そのようなDNAは、公知であり、かつ/若しくは、例えば、商業的供給元から、(例えば、ファージ-抗体のライブラリーを含めた)DNAライブラリーから容易に入手可能であり、又は合成することができる。DNAは、配列決定し、化学的に、又は分子生物学の技法を使用することによって操作して、例えば、1つ若しくは複数の可変ドメイン及び/若しくは定常ドメインを適切な配置に並べること、又はコドンを導入すること、システイン残基を作り出すこと、アミノ酸の改変、付加若しくは欠失を行うこと等ができる。

【0019】

抗原結合性断片の非限定的な例として、(i)Fab断片；(ii) $F(ab')$ ₂断片；(iii)Fd断片；(iv)Fv断片；(v)单鎖Fv(scFv)分子；(vi)dAb断片；及び(vii)抗体の超可変領域を模倣するアミノ酸残基からなる最小認識単位(例えば、単離された相補性決定領域(CDR))が挙げられる。本明細書で使用する場合、その他の工学的に操作された分子、例えば、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ及びミニボディもまた、表現「抗原結合性断片」内に含まれる。

【0020】

抗体の抗原結合性断片は典型的には、少なくとも1つの可変ドメインを含む。可変ドメインは、任意のサイズ又はアミノ酸組成であってよく、一般に、少なくとも1つのCDRを含み、このCDRは、1つ若しくは複数のフレームワーク配列に隣接するか、又は1つ若しくは複数のフレームワーク配列と共にインフレームの状態をとる。 V_L ドメインを伴うVHドメインを有する抗原結合性断片においては、 V_H ドメイン及び V_L ドメインは、任意の適切な並べ方に相互に位置付けることができる。例えば、可変領域は、二量体であり得、 V_H-V_H 、 V_H-V_L 又は V_L-V_L の二量体を含有することができる。代わって、抗体の抗原結合性断片は、単量体の V_H ドメイン又は V_L ドメインを含有することもできる。

【0021】

特定の実施形態では、抗体の抗原結合性断片は、少なくとも1つの定常ドメインに共有結合的に連結している少なくとも1つの可変ドメインを含有することができる。本発明の抗体の抗原結合性断片内に見出すことができる可変ドメイン及び定常ドメインの非限定的な例示的な配置として、(i) V_H-C_H1 ；(ii) V_H-C_H2 ；(iii) V_H-C_H3 ；(iv) $V_H-C_H1-C_H2$ ；(v) $V_H-C_H1-C_H2-C_H3$ ；(vi) $V_H-C_H2-C_H3$ ；(vii) V_H-C_L ；(viii) V_L-C_H1 ；(ix) V_L-C_H2 ；(x) V_L-C_H3 ；(xi) $V_L-C_H1-C_H2$ ；(xii) $V_L-C_H1-C_H2-C_H3$ ；(xiii) $V_L-C_H2-C_H3$ ；及び(xiv) V_L-C_L が挙げられる。可変ドメイン及び定常ドメインのいずれの配置においても、上記で列挙したいずれの例示的な配置を含めて、可変ドメイン及び定常ドメインは、相互に直接連結することができ、又は完全若しくは部分的なヒンジ若しくはリンカーの領域により連結することができる。ヒンジ領域は、少なくとも2つ(例えば、5、10、15、20、40又は60個以上)のアミノ酸からなり得、その結果、单一のポリペプチド分子中に、隣接する可変ドメイン及び/又は定常ドメイン間の柔軟性又はやや柔軟性の連結が生じる。更に、本発明の抗体の抗原結合性断片は、上記で列挙した可変ドメイン及び定常ドメインの配置のうちのいずれかのホモ二量体又はヘテロ二量体(又はその他の多量体)も含むことができ、これらは、相互に、及び/又は(例えば、ジスルフィド結合により)1つ若しくは複数の単量体のVHドメイン若しくはVLドメインと、非共有結合的に会合している。

【0022】

完全な抗体分子と同様に、抗原結合性断片も、单一特異性又は多重特異性(例えば、二特異性)であり得る。抗体の多重特異性の抗原結合性断片は典型的には、少なくとも2つの異なる可変ドメインを含み、ここで、それぞれの可変ドメインが、別個の抗原又は同じ抗原上の異なるエピトープに特異的に結合することができる。当技術分野で利用可能な日常的な技法を使用して、本明細書に開示する例示的な二重特異性抗体のフォーマットを含めた、任意の多重特異性抗体のフォーマットを、本発明の抗体の抗原結合性断片の状況で使用するように適応させることができる。

【0023】

本発明の抗体は、補体依存性細胞傷害性(CDC)又は抗体依存性細胞媒介細胞傷害性(ADCC)

10

20

30

40

50

)により機能することができる。「補体依存性細胞傷害性」(CDC)は、補体の存在下における本発明の抗体による抗原を発現している細胞の溶解を指す。「抗体依存性細胞媒介細胞傷害性」(ADCC)は、細胞媒介反応を指し、ここで、Fc受容体(FcR)を発現する非特異的な細胞傷害性細胞(例えば、ナチュラルキラー(NK)細胞、好中球及びマクロファージ)が、標的細胞に結合している抗体を認識し、それにより、標的細胞の溶解が生じる。CDC及びADCCは、当技術分野で周知かつ利用可能なアッセイを使用して測定することができる。(例えば、米国特許第5,500,362号及び米国特許第5,821,337号、並びにClynesら、Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)、95:652～656頁(1998)を参照されたい)。

【0024】

「特異的に結合する」等の用語は、抗体又はその抗原結合性断片が生理学的条件下で比較的安定である、抗原との複合体を形成することを意味する。特異的な結合は、 $1 \times 10^{-6} M$ 以下の解離定数により特徴付けることができる。2つの分子が特異的に結合するかどうかを決定するための方法は、当技術分野で周知であり、それらとして、例えば、平衡透析、表面プラズモン共鳴等が挙げられる。本発明の状況で使用する場合、例えば、ヒトGDF8に「特異的に結合する」抗体は、ヒトGDF8に結合する抗体又はそれらの部分(例えば、配列番号340のうちの少なくとも6つの近接するアミノ酸を含むペプチド)であって、表面プラズモン共鳴アッセイにおいて測定する場合に、約1000nM未満、約500nM未満、約300nM未満、約200nM未満、約100nM未満、約90nM未満、約80nM未満、約70nM未満、約60nM未満、約50nM未満、約40nM未満、約30nM未満、約20nM未満、約10nM未満、約5nM未満、約4nM未満、約3nM未満、約2nM未満、約1nM未満又は約0.5nM未満のK_Dを有する抗体又はそれらの部分を含む。(例えば、本明細書の実施例3を参照されたい)。しかし、ヒトGDF8に特異的に結合する単離された抗体は、その他の抗原、例えば、その他の種に由来するGDF8分子に対して交差反応性を示す場合がある。

【0025】

用語「高い親和性」の抗体は、表面プラズモン共鳴、例えば、BIACORE(商標)、又は溶液親和性ELISAにより測定する場合に、GDF8に、約 $10^{-8} M$ 以下、約 $10^{-9} M$ 以下、約 $10^{-10} M$ 以下、約 $10^{-11} M$ 以下又は約 $10^{-12} M$ 以下の解離定数(K_D)で結合することが可能な抗体を指す。

【0026】

「緩慢なオフ速度」又は「Koff」という用語により、表面プラズモン共鳴、例えば、BIACORE(商標)により決定する場合に、GDF8から、 $1 \times 10^{-3} s^{-1}$ 以下、好ましくは、 $1 \times 10^{-4} s^{-1}$ 以下の速度定数で解離する抗体を意味する。

【0027】

抗体を「中和する」又は「遮断する」は、GDF8に結合することによって、GDF8の生物学的活性の阻害をもたらす抗体を指すことを意図する。こうしたGDF8の生物学的活性の阻害は、GDF8の生物学的活性の1つ又は複数の指標を測定することによって評価することができる。GDF8の生物学的活性のこれらの指標は、当技術分野で公知のいくつかの標準的なin vitro又はin vivoでのアッセイのうちの1つ又は複数により評価することができる。

【0028】

また、表現「抗GDF8抗体」は、本明細書で使用する場合、多重特異性の抗原結合性分子(例えば、二重特異性抗体)も含み、ここで、多重特異性の抗原結合性分子の少なくとも1つの結合性ドメイン(例えば、「結合性のアーム」)が、GDF8に特異的に結合する。

【0029】

本発明の状況で使用することができる例示的な抗GDF8抗体として、例えば、完全ヒト抗GDF8抗体H4H1657N2(Regeneron社/Sanofi社)が挙げられる(例えば、米国特許第8,840,894号に記述する、配列番号360及び配列番号368のアミノ酸配列をそれぞれ有する重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む抗GDF8抗体)。本発明の方法の状況で使用することができるその他のGDF8アンタゴニストには、米国特許第7,807,159号に記述する抗GDF8抗体(例えば、2_112_1という名の抗体(ATCC寄託呼称PTA-6574))、米国特許第8,999,343号及び米国公開第2013/0209489号に記述する抗GDF8抗体(例えば、12A5-5)、米国公開第2013/0142788号に記述する抗GDF8抗体(例えば、10B3H8L5及び10B3H8L5-Fc無効化)、例えば、米国特許第8,9

10

20

30

40

50

40,874号に記述する抗GDF8抗体スタムルマブ/MY0-29、米国特許第8,415,459号に記述する抗GDF8抗体(例えば、RK22/PF-0625616)、米国特許第7,731,961号に記述する抗GDF8抗体(例えば、JA-16)、米国特許第8,496,934号に記述する抗GDF8抗体(例えば、RK35)、米国特許第8,992,913号に記述する抗GDF8抗体(例えば、OGD1.0.0)、欧州特許第1773041B1号に記述する抗GDF8Fab分子、米国特許第7,632,499号に記述する抗GDF8抗体(例えば、41C1E4)、並びに例えば、米国特許第7,635,760号及び米国特許第8,063,188号に記述する抗GDF8抗体(例えば、C12、C12-N93H及び/又は510C2)が含まれる。上記の特許及び特許出願公開の開示は全て、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれている。

【 0 0 3 0 】

本明細書に開示する完全ヒト抗GDF8抗体は、対応する生殖系列配列と比較して、重鎖及び軽鎖の可変ドメインのフレームワーク領域及び/又はCDR領域中に、1つ又は複数のアミノ酸の置換、挿入及び/又は欠失を含むことができる。そのような突然変異は、本明細書に開示するアミノ酸配列を、例えば、公共の抗体の配列データベースから入手可能な生殖系列配列と比較することによって容易に確認することができる。本発明は、本明細書に開示するアミノ酸配列のうちのいずれかから誘導される抗体及びそれらの抗原結合性断片を含み、ここで、1つ又は複数のフレームワーク領域及び/又はCDR領域内の1つ又は複数のアミノ酸を、対応する生殖系列残基に逆突然変異させるか、又は対応する生殖系列残基の(天然若しくは非天然の)保存的アミノ酸置換に逆突然変異させる(そのような配列変化を、本明細書では「生殖系列逆突然変異」と呼ぶ)。当業者は、本明細書に開示する重鎖及び軽鎖の可変領域配列から始めて、1つ若しくは複数の個別の生殖系列逆突然変異又はそれらの組合せを含む多数の抗体及び抗原結合性断片を容易に生成することができる。特定の実施形態では、 V_H ドメイン及び/又は V_L ドメイン内のフレームワーク残基及び/又はCDR残基の全てを、突然変異させて、生殖系列配列に戻す。その他の実施形態では、特定の残基のみ、例えば、FR1の最初の8つのアミノ酸内若しくはFR4の最後の8つのアミノ酸内に見出される突然変異している残基のみ、又はCDR1、CDR2若しくはCDR3内に見出される突然変異している残基のみを突然変異させて、生殖系列配列に戻す。更に、本発明の抗体は、フレームワーク領域及び/又はCDR領域内に、2つ以上の生殖系列逆突然変異の任意の組合せを含有することもでき、すなわち、ここで、特定の個別の残基は、突然変異させて、生殖系列配列に戻し、一方、生殖系列配列とは異なる特定の他の残基は維持する。1つ又は複数の生殖系列逆突然変異を含有する抗体及び抗原結合性断片を得たら、1つ又は複数の所望の特性、例えば、結合特異性の改善、結合親和性の増加、(場合によっては)アンタゴニスト又はアゴニストの生物学的特性の改善又は増強、免疫原性の低下等について、これらを容易に試験することができる。こうした一般的な様式で得られる抗体及び抗原結合性断片は、本発明内に包含される。

【 0 0 3 1 】

本発明はまた、本明細書に開示するHCVR、LCVR及び/又はCDRのアミノ酸配列のうちのいずれかのバリエントであって、1つ又は複数の保存的置換を有するバリエントを含む抗GDF8抗体も含む。例えば、本発明は、本明細書に開示するHCVR、LCVR及び/又はCDRのアミノ酸配列のうちのいずれかと比べて、例えば、10個以下、8つ以下、6つ以下、4つ以下等の保存的アミノ酸置換を有するHCVR、LCVR及び/又はCDRのアミノ酸配列を有する抗GDF8抗体を含む。一実施形態では、抗体は、8つ以下の保存的アミノ酸置換を有する、配列番号360及び376から選択されるアミノ酸配列を有するHCVRを含む。別の実施形態では、抗体は、6つ以下の保存的アミノ酸置換を有する、配列番号360及び376から選択されるアミノ酸配列を有するHCVRを含む。別の実施形態では、抗体は、4つ以下の保存的アミノ酸置換を有する、配列番号360及び376から選択されるアミノ酸配列を有するHCVRを含む。別の実施形態では、抗体は、2つ以下の保存的アミノ酸置換を有する、配列番号360及び376から選択されるアミノ酸配列を有するHCVRを含む。一実施形態では、抗体は、8つ以下の保存的アミノ酸置換を有する、配列番号368及び384から選択されるアミノ酸配列を有するLCVRを含む。別の実施形態では、抗体は、6つ以下の保存的アミノ酸置換を有する、配列番号368及び384から選択されるアミノ酸配列を有するLCVRを含む。別の実施形態では、抗体は、4つ以

10

20

30

40

50

下の保存的アミノ酸置換を有する、配列番号368及び384から選択されるアミノ酸配列を有するLCVRを含む。別の実施形態では、抗体は、2つ以下の保存的アミノ酸置換を有する、配列番号368及び384から選択されるアミノ酸配列を有するLCVRを含む。

【 0 0 3 2 】

特定の実施形態では、本発明の抗体又は抗体断片は、治療用の部分、例えば、細胞毒、化学療法薬及び免疫抑制剤、又は放射性同位体にコンジュゲートさせることができる(「イムノコンジュゲート」)。

【 0 0 3 3 】

「単離された抗体」は、本明細書で使用する場合、同定され、抗体の天然の環境の少なくとも1つの成分から分離及び/又は回収されている抗体を意味する。例えば、その中で抗体が天然に存在するか又は天然に生成される生物、組織又は細胞の少なくとも1つの成分から分離又は取り出されている抗体は、本発明の目的のための「単離された抗体」である。単離された抗体はまた、組換え細胞内の *in situ* の抗体及び少なくとも1つの精製又は単離の工程に付されている抗体も含む。特定の実施形態によれば、単離された抗体は、その他の細胞材料及び/又は化学物質を実質的に含有しない場合がある。

10

【 0 0 3 4 】

用語「表面プラズモン共鳴」は、本明細書で使用する場合、バイオセンサーマトリックス内のタンパク質濃度の変化を、例えば、BIACORE(商標)システム(Pharmacia Biosensor AB社、Uppsala、スウェーデン及びPiscataway、N.J.)を使用して検出することによって、リアルタイムの、生体分子に特異的な相互作用を分析することを可能にする光学的な現象を指す。

20

【 0 0 3 5 】

用語「 K_D 」は、本明細書で使用する場合、抗体-抗原の間の特定の相互作用の平衡解離定数を指すことを意図する。

【 0 0 3 6 】

用語「エピトープ」は、免疫グロブリン又はT細胞受容体に特異的に結合することが可能な任意の決定基、好ましくは、ポリペプチド決定基を含む。エピトープの決定基は、特定の実施形態では、化学的に活性な表面分子群、例えば、アミノ酸、糖側鎖、ホスホリル基又はスルホニル基を含み、特定の実施形態では、特異的な三次元の構造的特徴及び/又は特異的な電荷的特徴を示す場合がある。エピトープは、抗体が結合する、抗原の領域である。特定の実施形態では、抗体が、タンパク質及び/又は高分子の複合混合物中のそれが標的とする抗原を優先的に認識する場合に、抗体は、抗原に特異的に結合するという。例えば、 K_D が、 $10^{-8}M$ 以下、 $10^{-9}M$ 以下又は $10^{-10}M$ 以下である場合に、抗体は、抗原に特異的に結合するという。

30

【 0 0 3 7 】

試料の少なくとも約60~75%がポリペプチドの単一の種を示す場合に、タンパク質又はポリペプチドは、「実質的に純粋である」、「実質的に均一である」か又は「実質的に精製されている」。ポリペプチド又はタンパク質は、単量体であっても又は多量体であってもよい。実質的に純粋なポリペプチド又はタンパク質は、典型的には、タンパク質試料を約50重量%、60重量%、70重量%、80重量%又は90重量%含み、通常、約95%、好ましくは、99%超純粋である。当技術分野で周知のいくつかの手段、例えば、タンパク質試料のポリアクリルアミドゲル電気泳動、それに続く、当技術分野で周知の染色剤でゲルを染色する際の、単一のポリペプチドバンドの可視化により、タンパク質の純度又は均一性を示すことができる。特定の目的では、HPLC又は精製のための当技術分野で周知のその他の手段を使用することによって、より高い分解能を得ることができる。

40

【 0 0 3 8 】

用語「ポリペプチドの類似体又はバリエント」は、本明細書で使用する場合、少なくとも25個のアミノ酸のセグメントから構成されるポリペプチドであって、あるアミノ酸配列の一部に対して実質的な同一性を示し、以下の特性:(1)適切な結合条件下におけるGDF8に対する特異的な結合、又は(2)GDF8の生物学的活性を遮断する能力のうちの少なくとも1つ

50

を有するポリペプチドを指す。典型的には、ポリペプチドの類似体又はバリエントは、天然に存在する配列に対して、保存的アミノ酸の置換(又は挿入若しくは欠失)を含む。類似体は典型的には、少なくとも20アミノ酸長、少なくとも50、60、70、80、90、100、150又は200アミノ酸長以上であり、しばしば、完全長の天然に存在するポリペプチドと同じ長さであり得る。

【0039】

好みしいアミノ酸置換は、(1)タンパク質分解に対する感受性を低下させ、(2)酸化に対する感受性を低下させ、(3)結合親和性を変化させて、タンパク質複合体を形成させ、(4)結合親和性を変化させ、(4)そのような類似体のその他の物理化学的又は機能的な特性を付与又は改変させるアミノ酸置換である。類似体は、天然に存在するペプチド配列以外の、配列の種々の突然変異を含むことができる。例えば、單一又は複数のアミノ酸置換(好みしくは、保存的アミノ酸置換)を、天然に存在する配列(好みしくは、分子間接觸を形成するドメイン以外のポリペプチド部分)中に作製することができる。保存的アミノ酸置換により、親配列の構造的特徴は実質的に変化しないはずである(例えば、アミノ酸の交換により、親配列中に存在するヘリックスを切断する傾向も親配列を特徴付けるその他のタイプの二次構造を混乱させる傾向も生じてないはずである)。当該技術分野において認識されている、ポリペプチドの二次及び三次構造の例が、Proteins, Structures and Molecular Principles(Creighton、1984、W. H. Freeman and Company、New York); Introduction to Protein Structure(Branden & Tooze編、1991、Garland Publishing、NY); 及びThornntonら、1991、Nature、354:105頁に記載されており、これらはそれぞれ、参照により本明細書に組み込まれている。

10

【0040】

医薬品業界では、非ペプチド性の類似体が、錫型のペプチドの特性に類似する特性を示す薬物として一般に使用されている。これらのタイプの非ペプチド性化合物は、「ペプチド模倣物質」又は「ペプチド模倣薬」と呼ばれている(例えば、Fauchere(1986)J. Adv. Drug Res.、15:29頁; 及びEvansら(1987)J. Med. Chem.、30:1229頁を参照されたい; これらは、参照により本明細書に組み込まれている。また、コンセンサス配列の1つ又は複数のアミノ酸の、同じタイプのD-アミノ酸(例えば、L-リジンの代わりのD-リジン)による系統的な置換を使用して、より安定なペプチドを生成することもできる。更に、コンセンサス配列又は実質的に同一なコンセンサス配列の変異形を含む規制ペプチドを、当技術分野で公知の方法により生成することもでき(Rizoら(1992)Ann. Rev. Biochem.、61:387頁; これは、参照により本明細書に組み込まれている)、そうした規制ペプチドは、例えば、ペプチドを環化させる分子内ジスルフィド架橋を形成することが可能な内部システイン残基を付加することによって生成することができる。

20

【0041】

用語「実質的な同一性」又は「実質的に同一」は、ポリペプチドに適用する場合、2つのペプチド配列を、GAP又はBESTFIT等のプログラムにより、デフォルトのギャップ加重を使用して最適に整列させる場合に、それらの配列が、少なくとも約80%の配列同一性、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%又は少なくとも約99%の配列同一性を共有することを意味する。好みしくは、同一でない残基の位置は、保存的アミノ酸置換により異なる。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が、類似の化学的特性(例えば、電荷又は疎水性)を示す側鎖(R基)を有する別のアミノ酸残基により置換される置換である。一般に、保存的アミノ酸置換は、タンパク質の機能的特性を実質的に変化させない。2つ以上のアミノ酸配列が、保存的置換により相互に異なる場合には、パーセント配列同一性又は類似性の程度を、置換の保存的性質について上方に調整して、補正することができる。こうした調整を行うための手段は、当業者に周知である。例えば、Pearson(1994)Methods Mol. Biol.、24:307 ~ 331頁を参照されたい; これは、参照により本明細書に組み込まれている。類似の化学的特性を示す側鎖を有するアミノ酸群の例として、1)脂肪族側鎖:グリシン、アラニン、バリン、ロイシン及びイソロイシン;2)脂肪族性ヒドロキシル側鎖:セリン及びスレオニン;3)アミド含有側鎖:アスパラギン及びグルタミン;4)芳香族側鎖:

30

40

50

フェニルアラニン、チロシン及びトリプトファン;5)塩基性側鎖:リジン、アルギニン及びヒスチジンが挙げられ;6)硫黄含有側鎖は、システイン及びメチオニンである。好ましい保存的アミノ酸置換群は、バリン-ロイシン-イソロイシン、フェニルアラニン-チロシン、リジン-アルギニン、アラニン-バリン、グルタミン酸-アスパラギン酸、及びアスパラギン-グルタミンである。代わって、保存的交換は、参照により本明細書に組み込まれているGonnetら(1992)Science、256:1443～45頁に開示されているPAM250対数尤度マトリックスにおいて正の値を示す任意の変化である。「中等度の保存的」交換は、PAM250対数尤度マトリックスにおいて負でない値を示す任意の変化である。

【0042】

ポリペプチドについての配列類似性は、また、配列同一性とも呼ばれ、典型的には、配列分析ソフトウェアを使用して測定する。タンパク質分析ソフトウェアは、保存的アミノ酸置換を含めた、種々の置換、欠失及びその他の改変に割り当てられる類似性の尺度を使用して、類似する配列をマッチさせる。例えば、GCGは、「Gap」及び「Best fit」等のプログラムを含有し、これらを使用して、デフォルトパラメータを用いて、近縁のポリペプチド、例えば、異なる種の生物に属する相同ポリペプチド間又は野生型タンパク質とそのムテインとの間の配列相同性又は配列同一性を決定することができる。例えば、GCGバージョン6.1を参照されたい。また、GCGバージョン6.1中のプログラムであるFASTAを使用して、ポリペプチド配列を、デフォルトの又は推奨されているパラメータを使用して比較することもできる。FASTA(例えば、FASTA2及びFASTA3)は、クエリー配列と検索配列との間で、最良にオーバーラップする領域を整列させ、パーセント配列同一性を示す(Pearson(2000)、上記)。本発明の配列を、異なる生物に属する多数の配列を含有するデータベースと比較する場合の別の好ましいアルゴリズムは、デフォルトパラメータを使用するコンピュータプログラムBLAST、とりわけ、blastp又はtblastnである。例えば、Altschulら(1990)J. Mol. Biol.、215:403～410頁及びAltschulら(1997)Nucleic Acids Res.、25:3389 402頁を参照されたい;これらはそれぞれ、参照により本明細書に組み込まれている。

【0043】

相同性について比較するポリペプチド配列の長さは一般に、少なくとも約16個のアミノ酸残基、少なくとも約20個の残基、少なくとも約24個の残基、少なくとも約28個の残基、又は少なくとも約35個の残基である。多数の異なる生物に属する配列を含有するデータベースを検索する場合には、アミノ酸配列を比較するのが好ましい。

【0044】

用語「有効量」は、特定の表明されている目的の達成をもたらす、抗体又は抗体の抗原結合性断片の濃度又は量である。抗GDF8抗体又はその抗体の抗原結合性断片の「有効量」は、実験的に決定することができる。更に、「治療有効量」は、表明されている治療効果を達成するのに有効である、抗GDF8抗体又はその抗原結合性断片の濃度又は量である。この量もまた、実験的に決定することができる。

【0045】

「健常な対象」は、本明細書で使用する場合、対象のレジスタンストレーニングに参加する能力を顕著に制限する疾患も障害も有さない対象を指す。実施形態では、こうした疾患又は障害は、コントロール不良の糖尿病、亜急性心筋梗塞、不安定な心臓状態、急性心不全、重度の心筋炎、コントロール不良の高血圧、手術を必要とする心臓弁膜疾患及び重度の大動脈狭窄等の、医師が身体活動の制限を対象に推奨しているか又は運動が禁忌である疾患又は障害である。

【0046】

「レジスタンストレーニング」は、本明細書で使用する場合、外部の抵抗に対して筋肉を収縮させる運動のセットを指す。外部の抵抗として、例えば、ウエイト、バンド、ケトルベル、又は対象の体重が挙げられる。

【0047】

「運動レジメン」は、本明細書で使用する場合、運動の計画を指す。実施形態では、運動レジメンは、レジスタンストレーニング、ウエイトトレーニング、有酸素トレーニング

10

20

30

40

50

、歩行、インターバルトレーニング、ヨガ及びそれらの組合せ等の運動を含む。

【0048】

本開示の態様

本開示は、GDF-8阻害剤を使用して、除脂肪体重を増加させる組成物、キット及び方法を提供する。実施形態では、GDF-8阻害剤は、GDF-8に特異的に結合する抗体又はその抗原結合性断片である。

【0049】

ヒト抗体の調製

完全ヒトモノクローナル抗体を含めた、モノクローナル抗体を生成するための方法は、当技術分野で公知である。任意のそのような公知の方法を、本発明の状況で使用して、GDF-8に特異的に結合するヒト抗体を作製することができる。

【0050】

VELOCIMMUNE(商標)技術又はモノクローナル抗体を生成するための任意のその他の公知の方法を使用して、ヒト可変領域及びマウス定常領域を有する、GDF8に対する高い親和性のキメラ抗体を、最初に単離する。下記の実験のセクションで示すように、親和性、選択性、エピトープ等を含めた、望ましい特徴について、抗体を特徴付け、選択する。マウス定常領域を所望のヒト定常領域で交換して、本発明の完全ヒト抗体、例えば、野生型の又は改変したIgG1又はIgG4を生成する。選択される定常領域は、特定の用途に従って変化し得るが、高い親和性の抗原結合性及び標的特異性の特徴は、可変領域中に存在する。

【0051】

一般に、本発明の抗体は、非常に高い親和性を保有し、典型的には、固相上に固定化した抗原又は溶液相中の抗原に対する結合により測定する場合に、約 10^{-12} ~ 約 10^{-9} Mの K_D を保有する。マウス定常領域を所望のヒト定常領域で交換して、本発明の完全ヒト抗体、例えば、野生型IgG1(配列番号335)若しくはIgG4(配列番号336)、又は改変したIgG1若しくはIgG4(例えば、配列番号337)を生成する。選択される定常領域は、特定の用途に従って変化し得るが、高い親和性の抗原結合性及び標的特異性の特徴は、可変領域中に存在する。

【0052】

GDF-8に特異的な抗体又は抗原結合性断片

本発明は、ヒトGDF8(配列番号340)の特定のエピトープに結合し、GDF8の生物学的活性を遮断することが可能である抗GDF8抗体及び抗体の抗原結合性断片を含む。一実施形態では、抗体又はその抗原結合性断片が、アミノ酸残基1 ~ 109; 1 ~ 54; 1 ~ 44; 1 ~ 34; 1 ~ 24; 及び1 ~ 14を含むエピトープ内に結合する。別の実施形態では、抗体又はその抗原結合性断片が、アミノ酸残基65 ~ 72; 35 ~ 109; 45 ~ 109; 55 ~ 109; 65 ~ 109; 75 ~ 109; 85 ~ 109; 92 ~ 109; 又は95 ~ 109を含むエピトープ内に結合する。別の実施形態では、抗体又はその抗原結合性断片が、アミノ酸残基48 ~ 72; 48 ~ 69; 48 ~ 65; 52 ~ 72; 52 ~ 65; 又は56 ~ 65を含むエピトープ内に結合する。特定の実施形態では、抗体又はその抗原結合性断片が、2つ以上のエピトープ内に結合することができる。

【0053】

本発明はまた、野生型の成熟GDF8(配列番号340)に結合するが、配列番号340の完全なアミノ酸配列より短い単離されたペプチドには結合しない抗体及びそれらの抗原結合性断片も含む。例えば、本発明は、野生型の成熟GDF8(配列番号340)に結合するが、配列番号340のうちの10 ~ 40個の近接するアミノ酸からなる単離されたペプチドには結合しない抗GDF8抗体を含む。本発明はまた、野生型の成熟GDF8内の直線エピトープのいずれにも結合しない抗GDF8抗体も含む。本発明の特定の実施形態では、抗GDF8抗体は、配列番号340を含む野生型の成熟ヒトGDF8に結合するが、配列番号340のアミノ酸1 ~ 14、1 ~ 18、17 ~ 42、48 ~ 65、48 ~ 69、48 ~ 72、52 ~ 65、52 ~ 72、56 ~ 65、56 ~ 72、65 ~ 72、73 ~ 90、75 ~ 105及び91 ~ 105からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する、1つ又は複数の単離されたGDF8ペプチドには結合しない。特定の実施形態では、抗GDF8抗体は、上記のGDF8ペプチドのうちのいずれにも結合しない。所与の抗体が特定のGDF8ペプチドに結合することが可能であるかどうかを決定するための方法は、当業者に公知である。

10

20

30

40

50

【0054】

本発明はまた、野生型の成熟ヒトGDF8(例えば、配列番号340を含むタンパク質又はポリペプチド)に特異的に結合するが、GDF8の特定のアミノ酸が、同一ではないが関連のあるタンパク質、例えば、TGF-1に由来する対応するアミノ酸配列で交換されているGDF8のキメラのコンストラクトには結合しない単離されたヒト抗体、又はそれらの抗原結合性断片も含む。1つの例では、キメラのコンストラクトは、成熟GDF8のアミノ酸48~72が、TGF-1の対応するアミノ酸配列(例えば、TGF-1のアミノ酸49~76)で交換されているGDF8/TGF-1のキメラである。1つのそのようなキメラの例が、配列番号352により示される。したがって、特定の実施形態では、本発明の抗体は、野生型の成熟ヒトGDF8(配列番号340)に特異的に結合するが、配列番号352のGDF8/TGF-1のキメラのコンストラクトには結合せず、このことは、そのような抗体が結合するエピトープは、配列番号340の残基48~72内に位置するアミノ酸を含むか又は包含することを示している。また、遮断バイオアッセイを使用して、抗体が、野生型の成熟ヒトGDF8(配列番号340)に結合し、GDF8/TGF-1のキメラのコンストラクト、例えば、配列番号352のコンストラクトには結合しないかどうかを間接的に確認することもできる。例えば、野生型の成熟ヒトGDF8の生物活性を遮断するが、キメラGDF8/TGF-1の生物活性は遮断しない抗体は、キメラのコンストラクト中では対応するTGF-1配列により交換されている、GDF8の部分に結合すると考えられる。

【0055】

同様にまた、本発明は、バイオアッセイにおいて、野生型の成熟GDF8が媒介する活性を遮断するが、GDF8のキメラのコンストラクト(例えば、成熟GDF8のアミノ酸48~72が、TGF-1の対応するアミノ酸配列(例えば、TGF-1のアミノ酸49~76)で交換されているGDF8/TGF-1のキメラ)の活性は遮断しない単離されたヒト抗体、又はそれらの抗原結合性断片も含む。

【0056】

本発明は、本明細書に記載する例示的な特異的な抗体のうちのいずれかと同じエピトープに結合する抗GDF8抗体を含む。同様にまた、本発明は、GDF8又はGDF8断片に対する結合について、本明細書に記載する例示的な特異的な抗体のうちのいずれかと交差競合する抗GDF8抗体も含む。

【0057】

抗体が、参照抗GDF8抗体と同じエピトープと結合するか、又は結合について参照抗GDF8抗体と競合するかどうかは、当技術分野で公知の日常的な方法を使用することによって容易に決定することができる。例えば、試験抗体が、本発明の参照抗GDF8抗体と同じエピトープに結合するかどうかを決定するために、参照抗体を、GDF8タンパク質又はペプチドに、飽和させる条件下で結合させる。次に、試験抗体のGDF8分子に結合する能力を評価する。参照抗GDF8抗体との飽和結合の後に、試験抗体がGDF8に結合することが可能であるならば、試験抗体は、参照抗GDF8抗体とは異なるエピトープに結合すると結論付けることができる。他方、参照抗GDF8抗体との飽和結合の後に、試験抗体がGDF8分子に結合することができないならば、試験抗体は、本発明の参照抗GDF8抗体が結合するエピトープと同じエピトープに結合することができる。次いで、追加の日常的な実験(例えば、ペプチド突然変異及び結合分析)を実施して、試験抗体の結合が観察されないことが実際に、参照抗体と同じエピトープに結合することに起因するかどうか、又は立体的な遮断(若しくは別の現象)が、結合が観察されないことに関与するかどうかを確認することができる。この種の実験は、ELISA、RIA、Biacore、フローサイトメトリー、又は当技術分野で利用可能な任意のその他の定量的若しくは定性的な抗体結合アッセイを使用して実施することができる。本発明の特定の実施形態によれば、例えば、競合的結合アッセイにおいて測定する場合に、1、5、10、20又は100倍過剰量の一方の抗体が、他方の抗体の結合を、少なくとも50%、しかし、好ましくは、75%、90%又は更に99%だけ阻害するならば、2つの抗体は、同じ(又はオーバーラップする)エピトープに結合する(例えば、Junghansら、Cancer Res.、1990:50:1495~1502頁を参照されたい)。代わって、一方の抗体の結合性を低下させるか又は排除する、抗原中の本質的に全てのアミノ酸の突然変異が、他方の抗体の結合性を低下

10

20

30

40

50

させるか又は排除するならば、2つの抗体は同じエピトープに結合すると考えられる。一方の抗体の結合性を低下させるか又は排除するアミノ酸の突然変異のサブセットのみが、他方の抗体の結合性を低下させるか又は排除するならば、2つの抗体は「オーバーラップするエピトープ」を有すると考えられる。

【0058】

抗体が結合について参照抗GDF8抗体と競合するかどうかを決定するために、上記に記載した結合の方法論を二方向で実施する。第1の方向では、参照抗体を、GDF8分子に、飽和させる条件下で結合させ、続いて、試験抗体のGDF8分子に対する結合を評価する。第2の方向では、試験抗体を、GDF8分子に、飽和させる条件下で結合させ、続いて、参照抗体のGDF8分子に対する結合を評価する。両方の方向において、第1の(飽和)抗体のみが、GDF8分子に結合することが可能であるならば、GDF8に対する結合について、試験抗体と参照抗体とが競合すると結論付けられる。当業者であれば理解するように、結合について参照抗体と競合する抗体が、参照抗体と同じエピトープに必ずしも結合しなくてもよく、オーバーラップ又は隣接するエピトープに結合することによって、参照抗体の結合を立体的に遮断する場合もある。

10

【0059】

本発明は、ヒト抗体又はヒト化抗体及びヒト抗体又はヒト化抗体の抗原結合性断片であって、ヒト増殖分化因子8(GDF8)に特異的に結合する抗体又は抗原結合性断片を提供する。これらの抗体は、高い親和性を有する、GDF8に対する結合、及びGDF8活性を中和する能力により特徴付けられる。抗体は、完全長(例えば、IgG1抗体若しくはIgG4抗体)であることができ、又は抗原結合性部分(例えば、Fab、F(ab')₂若しくはscFv断片)のみを含む場合があり、改変して、機能に影響を及ぼす、例えば、残余のエフェクター機能を排除することができる(Reddyら(2000)J. Immunol.、164:1925～1933頁)。

20

【0060】

一実施形態では、本発明の抗体は、配列番号2、配列番号18、配列番号34、配列番号50、配列番号66、配列番号82、配列番号98、配列番号114、配列番号130、配列番号146、配列番号162、配列番号178、配列番号194、配列番号210、配列番号226、配列番号242、配列番号258、配列番号274、配列番号290、配列番号306、配列番号360、及び配列番号376、又はそれらに実質的に同一な配列からなる群から選択される重鎖可変領域(HCVR)のアミノ酸配列を含む。

30

【0061】

一実施形態では、本発明の抗体は、配列番号10、配列番号26、配列番号42、配列番号58、配列番号74、配列番号90、配列番号106、配列番号122、配列番号138、配列番号154、配列番号170、配列番号186、配列番号202、配列番号218、配列番号234、配列番号250、配列番号266、配列番号282、配列番号298、配列番号314、配列番号322、配列番号368、及び配列番号384又はそれらに実質的に同一な配列からなる群から選択される軽鎖可変領域(LCVR)のアミノ酸配列を含む。

【0062】

一実施形態では、本発明の抗体は、HCVRアミノ酸配列及びLCVRアミノ酸配列を含み、ここで、HCVR/LCVRの対配列は、配列番号2/10、配列番号18/26、配列番号34/42、配列番号50/58、配列番号66/74、配列番号82/90、配列番号98/106、配列番号114/122、配列番号130/138、配列番号146/154、配列番号162/170、配列番号178/186、配列番号194/202、配列番号210/218、配列番号226/234、配列番号242/250、配列番号258/266、配列番号274/282、配列番号290/298、配列番号306/314、配列番号114/322、配列番号360/368、及び配列番号376/384からなる群から選択される。

40

【0063】

本発明はまた、重鎖相補性決定領域3(HCDR3)アミノ酸配列及び軽鎖CDR3アミノ酸配列(LCDR3)を含むヒト若しくはヒト化抗体又は抗体の抗原結合性断片を特色とし、ここで、HCDR3アミノ酸配列は、配列番号8、配列番号24、配列番号40、配列番号56、配列番号72、配列番号88、配列番号104、配列番号120、配列番号136、配列番号152、配列番号168、配列

50

番号184、配列番号200、配列番号216、配列番号232、配列番号248、配列番号264、配列番号280、配列番号296、配列番号312、配列番号366、及び配列番号382、又はそれらに実質的に同一な配列からなる群から選択され、LCDR3アミノ酸配列は、配列番号16、配列番号32、配列番号48、配列番号64、配列番号80、配列番号96、配列番号112、配列番号128、配列番号144、配列番号160、配列番号176、配列番号192、配列番号208、配列番号224、配列番号240、配列番号256、配列番号272、配列番号288、配列番号304、配列番号320、配列番号328、配列番号374、及び配列番号390、又はそれらに実質的に同一な配列からなる群から選択される。別の実施形態では、抗体又はその断片は、配列番号8/16、配列番号24/32、配列番号40/48、配列番号56/64、配列番号72/80、配列番号88/96、配列番号104/112、配列番号120/128、配列番号136/144、配列番号152/160、配列番号168/176、配列番号184/192、配列番号200/208、配列番号216/224、配列番号232/240、配列番号248/256、配列番号264/272、配列番号280/288、配列番号296/304、配列番号312/320、配列番号120/328、配列番号366/374、及び配列番号382/390からなる群から選択されるHCDR3/LCDR3のアミノ酸配列対を含む。
【0064】

関連のある実施形態では、抗体又はその断片は、重鎖CDR1(HCDR1)及びCDR2(HCDR2)のアミノ酸配列並びに軽鎖CDR1(LCDR1)及びCDR2(LCDR2)のアミノ酸配列を更に含み、ここで、HCDR1アミノ酸配列は、配列番号4、配列番号20、配列番号36、配列番号52、配列番号68、配列番号84、配列番号100、配列番号116、配列番号132、配列番号148、配列番号164、配列番号180、配列番号196、配列番号212、配列番号228、配列番号244、配列番号260、配列番号276、配列番号292、配列番号308、配列番号362、及び配列番号378、又はそれらに実質的に同一な配列からなる群から選択され;HCDR2アミノ酸配列は、配列番号6、配列番号22、配列番号38、配列番号54、配列番号70、配列番号86、配列番号102、配列番号118、配列番号134、配列番号150、配列番号166、配列番号182、配列番号198、配列番号214、配列番号230、配列番号246、配列番号262、配列番号278、配列番号294、配列番号310、配列番号364、及び配列番号380、又はそれらに実質的に同一な配列からなる群から選択され;LCDR1アミノ酸配列は、配列番号12、配列番号28、配列番号44、配列番号60、配列番号76、配列番号92、配列番号108、配列番号124、配列番号140、配列番号156、配列番号172、配列番号188、配列番号204、配列番号220、配列番号236、配列番号252、配列番号268、配列番号284、配列番号300、配列番号316、配列番号324、配列番号370、及び配列番号386又はそれらに実質的に同一な配列からなる群から選択され;LCDR2アミノ酸配列は、配列番号14、配列番号30、配列番号46、配列番号62、配列番号78、配列番号94、配列番号110、配列番号126、配列番号142、配列番号158、配列番号174、配列番号190、配列番号206、配列番号222、配列番号238、配列番号254、配列番号270、配列番号286、配列番号302、配列番号318、配列番号326、配列番号372、及び配列番号388又はそれらに実質的に同一な配列からなる群から選択される。別の実施形態では、HCDR1、HCDR2及びHCDR3は、配列番号36/38/40、配列番号116/118/120、配列番号228/230/232、配列番号362/364/366、及び配列番号378/380/382からなる群から選択され;LCDR1、LCDR2及びLCDR3は、配列番号44/46/48、配列番号124/126/128、配列番号236/238/240、配列番号370/372/374、及び配列番号386/388/390からなる群から選択される。更に別の実施形態では、重鎖及び軽鎖のCDRは、配列番号36/38/40/44/46/48(例えば、21-E5)、配列番号116/118/120/124/126/128(例えば、8D12)、配列番号228/230/232/236/238/240(例えば、1A2)、配列番号362/364/366/370/372/374(例えば、H4H1657N2)、及び配列番号378/380/382/386/388/390(例えば、H4H1669P)からなる群から選択される。
【0065】

関連のある実施形態では、本発明は、GDF8に特異的に結合する抗体又は抗体の抗原結合性断片を含み、ここで、抗体又は断片は、配列番号2/10、配列番号18/26、配列番号34/42、配列番号50/58、配列番号66/74、配列番号82/90、配列番号98/106、配列番号114/122、配列番号130/138、配列番号146/154、配列番号162/170、配列番号178/186、配列番号194/202、配列番号210/218、配列番号226/234、配列番号242/250、配列番号258/266、配列番

10

20

30

40

50

号274/282、配列番号290/298、配列番号306/314、配列番号114/322、配列番号360/368、及び配列番号376/384からなる群から選択される重鎖及び軽鎖の可変ドメインの配列内に含有される重鎖及び軽鎖のCDRドメインを含む。

【0066】

HCVRアミノ酸配列及びLCVRアミノ酸配列内のCDRを同定するための方法及び技法は、当技術分野で周知であり、それらを使用して、本明細書に開示する特定のHCVRアミノ酸配列及び/又はLCVRアミノ酸配列内のCDRを同定することができる。CDRの境界を同定するため 10 に使用することができる例示的な慣例として、例えば、Kabatの定義、Chothiaの定義及びAbMの定義が挙げられる。一般論として、Kabatの定義は、配列の変動に基づき、Chothiaの定義は、構造上のループ領域の場所に基づき、AbMの定義は、KabatのアプローチとChothiaのアプローチとの間の妥協案である。例えば、Kabat、「Sequences of Proteins of Immunological Interest」、National Institutes of Health、Bethesda、Md.(1991); Al-Lazikaniら、J. Mol. Biol.、273:927～948頁(1997); 及びMartinら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、86:9268～9272頁(1989)を参照されたい。また、抗体内のCDR配列を同定するための公共データベースも利用可能である。

【0067】

本発明はまた、本発明の抗体又は抗原結合性断片をコードする核酸分子も提供する。また、組換え発現ベクターであって、本発明の、抗体をコードする核酸を担持する組換え発現ベクター、及びそのようなベクターが導入されている宿主細胞も、本発明の宿主細胞を培養することによって、本発明の抗体を作製する方法も、本発明により包含される。 20

【0068】

一実施形態では、本発明の抗体は、配列番号1、配列番号17、配列番号33、配列番号49、配列番号65、配列番号81、配列番号97、配列番号113、配列番号129、配列番号145、配列番号161、配列番号177、配列番号193、配列番号209、配列番号225、配列番号241、配列番号257、配列番号273、配列番号289、配列番号305、配列番号359、及び配列番号375、若しくは少なくとも95%の相同性を有するそれらに実質的に類似する配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列によりコードされるHCVR内に含有されるCDRを含む。

【0069】

一実施形態では、本発明の抗体は、配列番号9、配列番号25、配列番号41、配列番号57、配列番号73、配列番号89、配列番号105、配列番号121、配列番号137、配列番号153、配列番号169、配列番号185、配列番号201、配列番号217、配列番号233、配列番号249、配列番号265、配列番号281、配列番号297、配列番号313、配列番号321、配列番号367、及び配列番号383、若しくは少なくとも95%の相同性を有するそれらに実質的に類似する配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列によりコードされるLCVR内に含有されるCDRを含む。 30

【0070】

本発明はまた、表面プラズモン共鳴アッセイ(例えば、BIACORE(商標))により測定する場合に、約1nM以下の(解離定数「 K_D 」として表現する)親和性でGDF8に結合する完全ヒト若しくはヒト化の抗体又は抗体断片を特色とする。特定の実施形態では、本発明の抗体は、約700pM以下; 約500pM以下; 約320pM以下; 約160pM以下; 約100pM以下; 約50pM以下; 約10pM以下; 又は約5pM以下の K_D を示す。 40

【0071】

一実施形態では、本発明は、ヒトGDF8に特異的に結合し、ヒトGDF8を阻害し、GDF8誘導ルシフェラーゼアッセイにより測定する場合に、約10nM以下; 約5nM以下; 約3nM以下; 約2nM以下; 約1nM以下; 約500pM以下; 又は約200pM以下の IC_{50} を示す完全ヒト又はヒト化のモノクローナル抗体(mAb)を提供する。下記の実験のセクションで示すように、本発明の抗GDF8抗体のうちのいくつかは、近縁タンパク質、例えば、GDF11の活性を遮断し、ルシフェラーゼバイオアッセイにおいて、GDF8よりも更に高い IC_{50} を示す。一実施形態では、本発明は、GDF11活性の遮断について、GDF8と比べて、少なくとも約10倍、少なくとも約50倍、少なくとも約100倍、少なくとも約200倍、少なくとも約500倍、少なくとも約1000倍又は 50

少なくとも約1500倍高いIC₅₀を示す抗体又は抗体の抗原結合性断片を提供する。

【0072】

本発明は、改変されたグリコシル化パターンを有する抗GDF8抗体を包含する。いくつかの適用例では、望ましくないグリコシル化部位を除去するための改変が有用である場合があり、又はオリゴ糖鎖上に存在するフコース部分を欠く抗体が、例えば、抗体依存性細胞傷害性(ADCC)の機能を増加させるのに有用である場合がある(Shieldら(2002)JBC、277:26733頁を参照されたい)。その他の適用例では、補体依存性細胞傷害性(CDC)を改変するために、ガラクトシル化の改変を作製する場合がある。

【0073】

本発明は、GDF8の特定のエピトープに結合し、GDF8の生物学的活性を遮断することが可能である抗GDF8抗体を含む。第1の実施形態では、本発明の抗体は、成熟GDF8タンパク質(配列番号340)のアミノ酸約1～約109;約1～約54;約1～約44;約1～約34;約1～約24;及び約1～約14内のエピトープに結合する。第2の実施形態では、本発明の抗体は、成熟GDF8タンパク質(配列番号340)のアミノ酸約35～約109;約45～約109;約55～約109;約65～約109;約75～約109;約85～約109;約92～約109;又は約95～約109内のエピトープのうちの1つ又は複数に結合する。第3の実施形態では、抗体又は抗体の抗原結合性断片は、成熟ヒトGDF8タンパク質のアミノ酸残基約48～約72;約48～約69;約48～約65;約52～約72;約52～約65;又は約56～約65のエピトープ内に結合する。

【0074】

本発明の特定の実施形態によれば、抗GDF8抗体は、ヒトGDF8に結合するが、その他の種に属するGDF8には結合しない。代わって、本発明の抗GDF8抗体は、特定の実施形態では、ヒトGDF8及び1つ又は複数の非ヒト種に属するGDF8に結合する。例えば、本発明の抗GDF8抗体は、ヒトGDF8に結合することができ、場合によっては、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、スナネズミ、ブタ、ネコ、イヌ、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ウシ、ウマ、ラクダ、カニクイザル、マーモセット、アカゲザル又はチンパンジーのGDF8うちの1つ又は複数に結合しても又は結合しなくてもよい。

【0075】

本発明は、治療用の部分、例えば、細胞毒、化学療法薬、免疫抑制剤又は放射性同位体にコンジュゲートさせたヒト又はヒト化の抗GDF8モノクローナル抗体(「イムノコンジュゲート」)を包含する。細胞毒性の薬剤は、細胞にとって有害である任意の薬剤を含む。イムノコンジュゲートを形成するのに適切な細胞毒性の薬剤及び化学療法剤の例が、当技術分野で公知であり、例えば、参照により本明細書に具体的に組み込まれているW005/103081を参照されたい。

【0076】

本発明の抗体は、単一特異性、二重特異性又は多重特異性であり得る。多重特異性抗体は、1つの標的ポリペプチドの異なるエピトープに特異的である場合、又は2つ以上の標的ポリペプチドに特異的な抗原結合性ドメインを含有する場合がある。例えば、Tuttら、1991、J. Immunol.、147:60～69頁；Kuferら、2004、Trends Biotechnol.、22:238～244頁を参照されたい。本発明の抗GDF8抗体は、別の機能性分子、例えば、別のペプチド又はタンパク質に連結させること、又はそれと同時発現させることができる。例えば、抗体又はその断片を、1つ又は複数のその他の分子実体、例えば、別の抗体又は抗体断片に、(例えば、化学的カップリング、遺伝子融合、非共有結合的会合又はその他により)機能的に連結して、第2の結合特異性を有する二重特異性又は多重特異性抗体を生成することができる。例えば、本発明は、二重特異性抗体を含み、ここで、免疫グロブリンの一方のアームは、ヒトGDF8又はその断片に特異的であり、免疫グロブリンの他方のアームは、第2の治療標的に特異的であるか又は治療用の部分にコンジュゲートしている。

【0077】

本発明の状況で使用することができる例示的な二重特異性抗体のフォーマットには、第1の免疫グロブリン(Ig)のCH3ドメイン及び第2のIgのCH3ドメインの使用が関与し、ここで、第1のIgのCH3ドメインと第2のIgのCH3ドメインとが、少なくとも1つのアミノ酸により

10

20

30

40

50

相互に異なり、少なくとも1つのアミノ酸の差が、このアミノ酸の差を欠く二重特異性抗体と比較して、当該の二重特異性抗体のプロテインAに対する結合性を低下させる。一実施形態では、第1のIgのCH3ドメインは、プロテインAに結合し、第2のIgのCH3ドメインは、プロテインAに対する結合性を低下又は消滅させる突然変異、例えば、H95Rの改変(IMGTのエクソンの番号付けによる; EUの番号付けによれば、H435R)を含有する。第2のCH3は、Y96Fの改変(IMGTによる; EUによれば、Y436F)を更に含む場合もある。第2のCH3内に見出すことができるさらなる改変は、IgG1抗体の場合には、D16E、L18M、N44S、K52N、V57M及びV82I(IMGTによる; EUによれば、D356E、L358M、N384S、K392N、V397M及びV422I)を含み; IgG2抗体の場合には、N44S、K52N及びV82I(IMGT; EUによれば、N384S、K392N及びV422I)を含み; IgG4の抗体の場合には、Q15R、N44S、K52N、V57M、R69K、E79Q及びV82I(IMGTによる; EUによれば、Q355R、N384S、K392N、V397M、R409K、E419Q及びV422I)を含む。上記に記載した二重特異性抗体のフォーマットに対する変異形は、本発明の範囲内であることが企図される。

【0078】

本発明の抗GDF8抗体及び抗体断片は、記載する抗体のアミノ酸配列から変化しているが、ヒトGDF8に結合する能力は保持するアミノ酸配列を有するタンパク質を包含する。そのようなバリエントの抗体及び抗体断片は、親配列と比較する場合に、アミノ酸の1つ又は複数の付加、欠失又は置換を含むが、記載する抗体の生物学的活性と本質的に同等である生物学的活性を示す。同様に、本発明の、抗GDF8抗体をコードするDNA配列も、開示する配列と比較する場合に、ヌクレオチドの1つ又は複数の付加、欠失又は置換を含むが、本発明の抗GDF8抗体又は抗体断片と本質的に生物学的に同等である抗GDF8抗体又は抗体断片をコードする配列を包含する。アミノ酸及びDNA配列のそのようなバリエントの例を、上記で論じている。

【0079】

2つの抗原結合性タンパク質又は抗体が、例えば、単回用量又は多回用量のいずれであっても、類似の実験条件下において、同じモル用量で投与する場合に、吸収の速度及び程度が顕著な差を示さない薬学的均等物又は薬学的代替物であるならば、それらは生物学的に同等と考えられる。いくつかの抗体は、吸収の程度が同等であるが、吸収の速度は同等でなく、にもかかわらず、吸収の速度のそのような差が、意図的であり、医薬品表示中に反映されており、例えば、長期継続的な使用に際して、有効な体内薬物濃度を達成するのに必須でなく、研究された特定の医薬品にとって医学的に重要でないと考えられるという理由で、生物学的に同等と考えることができるならば、それらは均等物又は薬学的代替物と考えられる。

【0080】

一実施形態では、2つの抗原結合性タンパク質が、安全性、純度及び効力において、臨床的に意味のある差がないならば、それらは生物学的に同等である。

【0081】

一実施形態では、参照品と生物由来品との1回又は複数の切換えを行うことなく療法を続ける場合と比較して、免疫原性の臨床的に重要な変化又は有効性の減少を含めた、有害作用のリスクの予測される増加を示すことなく、患者がそのような切換えを行うことができるならば、2つの抗原結合性タンパク質は生物学的に同等である。

【0082】

一実施形態では、作用の共通の機構が分かっている限りにおいて、2つの抗原結合性タンパク質の両方が、1つ又は複数の使用条件において、1つ又は複数のそのような共通の機構により作用するならば、それらは生物学的に同等である。

【0083】

生物学的同等性は、in vivo及びin vitroでの方法により実証することができる。生物学的同等性の測定法として、例えば、(a)抗体又はその代謝産物の濃度を、血液、血漿、血清又はその他の生物学的液体中で、時間の関数として測定する、ヒト又はその他の哺乳動物におけるin vivoでの試験;(b)ヒトのin vivoでの生物学的利用率のデータと相關して

おり、こうしたデータを合理的に予期する、*in vitro*での試験;(c)抗体(又はその標的)の適切な急性薬理学的作用を時間の関数として測定する、ヒト又はその他の哺乳動物における*in vivo*での試験;及び(d)抗体の安全性、効能、又は生物学的利用率若しくは生物学的同等性を確立する、十分にコントロールされた臨床治験が挙げられる。

【0084】

本発明の抗GDF8抗体の生物学的に同等なバリアントは、例えば、残基若しくは配列の種々の置換を作製すること、又は生物学的活性には必要でない末端若しくは内部の残基若しくは配列を欠失させることによって構築することができる。例えば、生物学的活性には必須でないシステイン残基を欠失させるか又はその他のアミノ酸で交換して、復元時の不必要的又は誤った分子内ジスルフィド架橋の形成を阻止することができる。その他の状況では、生物学的に同等な抗体は、抗体のグリコシル化の特徴を改変するアミノ酸変化、例えば、グリコシル化を排除又は除去する突然変異を含む抗GDF8抗体のバリアントを含むことができる。

10

【0085】

治療のための投与及び製剤

本発明は、本発明の抗体又はそれらの抗原結合性断片を含む治療用組成物を提供する。治療用組成物は、本発明によれば、製剤中に組み込まれて、移行、送達、忍容性等を改善する適切な担体、賦形剤及びその他の薬剤と共に投与する。

【0086】

多数の適切な製剤を、いずれの医薬品の化学者にも公知の処方集であるRemington's Pharmaceutical Sciences、Mack Publishing Company、Easton、PAに見出すことができる。これらの製剤として、例えば、散剤、ペースト剤、軟膏剤、ゼリー剤、ロウ、油、脂質、(カチオン性又はアニオン性の)脂質を含有するベシクル(例えば、LIPOFECTIN(商標))、DNAコンジュゲート、無水の吸収性ペースト剤、水中油型及び油中水型の乳剤、carbowax(種々の分子量のポリエチレングリコールの)乳剤、半固体のジェル剤、並びにcarbowaxを含有する半固体の混合物が挙げられる。上記の混合物はいずれも、本発明に従う治療及び療法に適切であり得るが、ただし、製剤中の活性成分は、製剤により不活性化されず、製剤は、投与経路に対して生物学的に適合性及び忍容性を示す。また、Powellら、「Compendium of excipients for parenteral formulations」、PDA(1998)J Pharm Sci Technol、52:238~311頁も参照されたい。

20

【0087】

投与しようとする対象の年齢及びサイズ、標的にする疾患、状態、投与経路等に応じて、用量は変化させることができる。本発明の抗体を、成体において、GDF8と関連がある種々の状態及び疾患を治療するために使用する場合は、通例、本発明の抗体を、約0.01~約20mg/kg体重、約0.1~約10mg/kg体重、又は約0.1~約5mg/kg体重の単回用量で投与するのが好都合である。代わって、抗体又はその抗原結合性断片を、運動レジメンと組み合わせて、健常な対象に投与することもできる。実施形態では、健常な対象は、除脂肪筋量の年齢に関連する損失及び/又は手術後の筋消耗を経験している。実施形態では、対象に有効な量は、少なくとも400mg、又は(成人ヒトの平均が、70kgであると仮定すれば)約36mg/kgである。

30

【0088】

状態の重症度に応じて、治療の頻度及び持続期間を調整することができる。経口投与及びその他の非経口投与において、抗体は、上記で示した用量に対応する用量で投与することができる。状態がとりわけ重度である場合には、副作用が、もし生じるのであれば、顕著になる量まで、用量を状態に従って増加させることができる。実施形態では、対象の皮下に少なくとも2回以上投与する。実施形態では、複数回用量を断続的に、例えば、1週間に1回、2週間に1回、3週間に1回、4週間に1回、5週間に1回、及び6週間に1回対象に投与する。

40

【0089】

種々の送達系、例えば、リポソーム中への封入、微小粒子、マイクロカプセル、突然変

50

異ウイルスを発現することが可能な組換え細胞、受容体が媒介するエンドサイトーシスが公知であり、それらを使用して、本発明の医薬組成物を投与することができる(例えば、Wuら(1987)J. Biol. Chem.、262:4429～4432頁を参照されたい)。導入の方法として、これらに限定されないが、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻腔内、硬膜外及び経口の経路が挙げられる。組成物は、任意の好都合な経路から、例えば、注入又はボーラス注射;上皮又は皮膚粘膜の内壁(例えば、口腔粘膜、直腸及び腸の粘膜等)を通しての吸収により投与することができ、その他の生物学的に活性な薬剤と一緒に投与することができる。投与は、全身性であっても、又は局所性であってもよい。

【0090】

また、医薬組成物は、ベシクル、特に、リポソーム中で送達することもできる(Langer(1990)Science、249:1527～1533頁を参照されたい)。

【0091】

本発明の医薬組成物は、標準的な針及びシリンジを用いて、皮下又は静脈内から送達することができる。更に、皮下送達に対して、ペン型送達デバイスは、本発明の医薬組成物の送達に容易に適用される。そのようなペン型送達デバイスは、再利用可能であっても、又は使い捨てであってもよい。再利用可能なペン型送達デバイスは一般に、医薬組成物を含有する交換可能なカートリッジを利用する。カートリッジ内の医薬組成物を全て投与してしまい、カートリッジが空になったら、空のカートリッジは容易に、廃棄し、医薬組成物を含有する新しいカートリッジと交換することができる。次いで、ペン型送達デバイスを再度使用することができる。使い捨てのペン型送達デバイスには、交換可能なカートリッジはない。それどころか、使い捨てのペン型送達デバイスは、医薬組成物があらかじめ充填されて提供され、医薬組成物は、デバイス内のリザーバ中に保持されている。リザーバの医薬組成物が空になったら、デバイス全体が廃棄される。

【0092】

多数の再利用可能なペン型及び自己注射器の送達デバイスが、本発明の医薬組成物の皮下送達に適用される。数例として、これらに限定されないが、AUTOPEN(商標)(Owen Mumford, Inc.社、Woodstock、UK)、DISETRONIC(商標)ペン(Disetronic Medical Systems社、Bergdorf、スイス)、HUMALOG MIX 75/25(商標)ペン、HUMALOG(商標)ペン、HUMALIN 70/30(商標)ペン(Eli Lilly and Co.社、Indianapolis、IN)、NOVOPEN(商標)I、II及びIII(Novo Nordisk社、Copenhagen、デンマーク)、NOVOPEN JUNIOR(商標)(Novo Nordisk社、Copenhagen、デンマーク)、BD(商標)ペン(Becton Dickinson社、Franklin Lakes、NJ)、OPTIPEN(商標)、OPTIPEN PRO(商標)、OPTIPEN STARLET(商標)及びOPTICLIK(商標)(sanofi-aventis社、Frankfurt、ドイツ)が挙げられる。本発明の医薬組成物の皮下送達に適用される使い捨てのペン型送達デバイスの数例として、これらに限定されないが、SOLOSTAR(商標)ペン(Sanofi-aventis社)、FLEXPEN(商標)(Novo Nordisk社)、及びKWIKPEN(商標)(Eli Lilly社)、SURECLICK(商標)自己注射器(Amgen社、Thousand Oaks、CA)、PENLET(商標)(Haselmeier社、Stuttgart、ドイツ)、EPIPEN(Dey, L.P.社)、及びHUMIRA(商標)ペン(Abbott Labs社、Abbott Park、IL)が挙げられる。

【0093】

特定の状況では、医薬組成物を、制御放出系において、例えば、ポンプ又は高分子材料を使用して送達することができる。別の実施形態では、制御放出系を、組成物の標的に近接させて配置することができ、したがって、全身投与量のほんの一部のみを必要とする。

【0094】

経口投与のための組成物の例として、固体又は液体の剤形、具体的には、(糖衣錠剤及びフィルム被覆錠剤を含めた)錠剤、丸剤、顆粒剤、粉末調製物、(軟質カプセル剤を含めた)カプセル剤、シロップ剤、乳剤、懸濁剤等が挙げられる。そのような組成物は、広く公知の方法により製造され、医薬調製物の分野で従来から使用されているビヒクル、希釈剤又は賦形剤を含有する。錠剤のためのビヒクル又は賦形剤の例が、ラクトース、デンプン、スクロース、ステアリン酸マグネシウム等である。

【0095】

10

20

30

50

40

50

注射用調製物は、静脈内、皮下、皮内及び筋肉内への注射、点滴注入等のための剤形を含むことができる。これらの注射用調製物は、広く公知の方法により調製することができる。例を挙げると、注射用調製物を、例えば、注射のために従来から使用されている無菌の水性媒体又は油性媒体中に、上記に記載した抗体又はその塩を溶解、懸濁又は乳化させることによって調製することができる。注射のための水性媒体として、例えば、生理食塩水；グルコース及びその他の補助剤等を含有する等張溶液があり、これらは、適切な可溶化剤、例えば、アルコール(例えば、エタノール)、ポリアルコール(例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール)、非イオン性界面活性剤[例えば、ポリソルベート80、HCO-50(水素添加ヒマシ油のポリオキシエチレン(50モル)付加物)]等と組み合わせて使用することができる。油性媒体として、例えば、ゴマ油、大豆油等が用いられており、これらは、可溶化剤、例えば、安息香酸ベンジル、ベンジルアルコール等と組み合わせて使用することができる。こうして調製された注射剤は、好ましくは、適切なアンプル中に充填される。

【0096】

好都合には、上記に記載した、経口又は非経口で使用するための医薬組成物を、活性成分の用量に適合する適切な単位用量の剤形に調製する。単位用量のそのような剤形として、例えば、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤(アンプル)、坐剤等が挙げられる。上記抗体の含有量は一般に、単位用量の剤形1つ当たり約5～500mgであり；とりわけ、注射剤の形態の場合は、上記抗体を、約5～500mg、その他の剤形の場合は約10～400mg含有させるのが好ましい。

【0097】

抗体の治療のための使用

本発明の抗体は、とりわけ、対象の除脂肪筋量を増加させるのに有用である。いくつかの実施形態では、除脂肪筋量を増加させる方法は、運動レジメンを対象に提供する工程と、有効量のGDF-8阻害剤を含む組成物を投与する工程とを含む。実施形態では、対象は、医師により運動制限が課されていない、並びに/又は運動が禁忌である状態及び障害を有さない対象である。実施形態では、対象には、除脂肪筋量の損失が生じている。その他の実施形態では、対象の年齢は、少なくとも50歳、55歳又は60歳以上である。

【0098】

実施形態では、本発明の抗体は、とりわけ、GDF8活性と関連がある任意の疾患又は障害の治療、予防及び/又は寛解に有用である。より具体的には、本発明の抗体は、個体の筋肉の強度/出力及び/若しくは筋量及び/若しくは筋肉の機能を増加させること、又はGDF8活性を遮断することにより、好ましい代謝(炭水化物、脂質及びタンパク質の処理)に変化させることによって改善することができる任意の状態又は疾病を治療するのに有用である。本発明の抗GDF8抗体を用いて治療することができる例示的な疾患、障害及び状態として、これらに限定されないが、サルコペニア；(特発性の、又はその他の状態、例えば、癌、慢性腎不全若しくは慢性閉塞性肺疾患に続発する)悪液質；筋傷害；筋消耗及び筋肉萎縮、例えば、廃用、固定化、床上安静、損傷、医学的処置若しくは外科的介入(例えば、股関節骨折、人工股関節置換、人工膝関節置換等)が引き起こす若しくはそれらと関連があるか又は人工呼吸の必要性が引き起こす、筋肉萎縮又は筋消耗が挙げられる。本発明の抗GDF8抗体を用いて治療することができる追加の障害として、これに限定されないが、sIBM(孤発性封入体筋炎)も挙げられる。

【0099】

本発明は、本発明の抗GDF8抗体を、治療活性がある少なくとも1つの追加の成分と組み合わせて投与する工程を含む治療のための投与レジメンを含む。治療活性があるそのような追加の成分の非限定的な例として、その他のGDF8アンタゴニスト(例えば、GDF8の低分子阻害剤、又はその他のGDF8抗体若しくはGDF8結合性分子)、増殖因子阻害剤、免疫抑制剤、抗炎症剤、代謝阻害剤、酵素阻害剤、及び細胞傷害剤/細胞増殖抑制剤が挙げられる。治療活性がある追加の成分は、本発明の抗GDF8抗体の投与の前、それと同時、又はその後に投与することができる。

10

20

30

40

50

【0100】

関連のある実施形態では、方法は、運動、例えば、体重負荷運動を定期的に行っている対象に、抗体又はその抗原結合性断片の投与を組み合わせる工程を含む。実施形態では、方法は、運動レジメン、例えば、除脂肪筋量の増加を促進するレジメンを提供する工程を含む。実施形態では、運動レジメンは、レジスタンストレーニング、強度トレーニング、ピラティス、有酸素運動、ウエイトトレーニング及びヨガうちの1つ又は複数を含む。特定の実施形態では、運動レジメンは、レジスタンストレーニング及び/又はウエイトトレーニングを含む。実施形態では、運動レジメンは、コンピュータ可読媒体上で、動画により、又は運動施設において、文字で及び/又はイラストレーションにより提供される。

【0101】

10

実施形態では、レジスタンストレーニングは、非限定的に、非利き手、利き手、脚、腕、背中の筋肉、腹筋、四頭筋、腓腹筋、二頭筋、三頭筋、肩の筋肉、殿筋及び/又は胸筋を含めた、身体の任意の筋肉のトレーニングを含む。レジスタンストレーニングは、ウエイト、レジスタンスバンド、運動器具及び/又は対象自身の体重の使用を含むことができる。運動は、チェストプレス、レッグプレス、アームカール、レッグカール、ハンドグリップ、腹筋クランチ、腓腹筋プレス、二頭筋カール、三頭筋カール、プランク、サイドプランク及び/又は階段昇降を含むことができる。

【0102】

実施形態では、運動レジメンでは、1つの筋肉群当たり、少なくとも1回のセットの運動を、特定の実施形態では、2回以上、2回又は3回のセットの運動を行う。実施形態では、1回のセットの運動は、少なくとも8回以上の反復を含む。

20

【0103】

対象は、提供される運動レジメンを、少なくとも週1回、週2回、週3回、週4回又は週5回続ける。実施形態では、運動レジメンを、少なくとも12週間続ける。

【0104】

30

実施形態では、対象は、1回のセットの運動を、最低レベルの強度、例えば、その運動の場合に持ち上げることができる最大のウエイト(1RM)の50%以下で続ける。実施形態では、運動レジメンの間に、強度を漸進的に増加させる。実施形態では、それぞれの運動(チェストプレス、レッグプレス、レッグカール及びアームカール)についての1-RMを、運動施設において、運動トレーニングのために使用する機器上で、種々の時間間隔で、例えば、ベースライン、第4週及び第8週に測定することができる。実施形態では、強度を、1週間当たり、1RMの約10%増加させる。実施形態では、強度は、最大の少なくとも50%であり、約65~90%で維持する。

【0105】

実施形態では、方法は、対象のレジスタンストレーニングをモニターする工程を更に含み、この工程は、トレーニングを測定するデバイスを提供すること、及び/又はレジスタンストレーニングの反復、持続時間、強度及び頻度を追跡するための日誌若しくはコンピュータプログラムを提供することを含む。実施形態では、デバイスは、加速度計、動力計、直線位置決めデバイス及びアクティグラフを含む。

【0106】

40

実施形態では、方法は、GDF-8阻害剤を、心臓の筋肉及び/又は機能に対して有害な副作用をもたらすことなく、除脂肪筋量を増加させるのに有効な量で投与する工程を含む。以前に論じられたように、GDF-8阻害剤は、心臓の肥大と関連がある場合がある。しかし、実施形態では、心臓の筋肉及び/又は機能に対するいずれの作用も最小限に留めるよう、用量及び投与レジメンが選択される。実施形態では、治療の間、マーカー、例えば、クレアチニンキナーゼ、トロポニン等をモニターする。実施形態では、心臓の肥大が観察される場合、及び/又は心臓の損傷を指し示す心臓マーカーが少なくとも20%上昇する場合には、治療を中断する。

【実施例】

【0107】

50

以下の実施例を、本発明の組成物の作製の仕方並びに本発明の方法及び組成物の使用の仕方の完全な開示及び説明を当業者に提供する目的で提示するのであって、これらの実施例には、発明者らが彼らの発明であるとみなすものの範囲を制限する意図はない。使用する数(例えば、量、温度等)に関しては、正確性を確保するように努めてきたが、何らかの実験の誤差及び偏差はあると考えるべきである。別段の記載がない限り、割合は質量部であり、分子量は平均分子量であり、温度は摂氏で示し、圧力は大気圧又は大気圧付近である。

【 0 1 0 8 】

(実施例1)

ヒトGDF-8に対するヒト抗体の生成

10

ヒト抗GDF8抗体を、米国特許第8,840,894号の記載に従って生成した。以下の実施例で使用した例示的なGDF8阻害剤は、「H4H1657N2」という名の(また、REGN1033とも呼ぶ)ヒト抗GDF-8抗体である。H4H1657N2は、以下のアミノ酸配列の特徴を有する:重鎖可変領域(HCVR)は配列番号360を含み;軽鎖可変ドメイン(LCVR)は配列番号368を含む。REGN1033のCDRは、配列番号362を含む重鎖相補性決定領域1(HCDR1);配列番号364を含むHCDR2;配列番号366を含むHCDR3;配列番号370を含む軽鎖相補性決定領域1(LCDR1);配列番号372を含むLCDR2;及び配列番号374を含むLCDR3を含む。

【 0 1 0 9 】

(実施例2)

運動を行う場合及び行わない場合の、抗GDF-8の安全性及び生物学的効果についての臨床治験

20

運動が不足しがちなライフスタイルを有し、年齢60歳以上である男性及び女性の健常対象120人において、REGN1033の皮下からの反復投与による治療の安全性に対する作用について;身体組成及び筋体積、筋肉の強度;並びに階段昇降機能に対する効果について、無作為、二重盲検、プラセボ対照、多施設、平行群間研究を実施した。2×2の要因配置計画を使用し;120人に達した対象を1:1:1:1の比で、(それぞれ30人の対象からなる4アームの)プラセボ単独;REGN1033(400mg、皮下、2週間に1回、6回投与)単独;プラセボ+レジスタンス運動トレーニング(RT);又はREGN1033+RTに無作為化した。無作為化を、性別及び研究サイトにより層別化した。RTは、施設で行う、低い強度のレジスタンス運動トレーニングからなり、これを、1-反復最大値(1-RM)の50%において、週2回全部で12週間実施し、研究の間に、運動の加重の漸進的な調整を少なくとも1回行った。

30

【 0 1 1 0 】

研究の主要な目的は、運動を行う場合及び行わない場合における、二重エネルギーX線吸収測定法(DEXA)により測定する場合の総除脂肪体重に対するREGN1033の効果を評価することであった。副次的な目的は、安全性及び忍容性に対する作用、DEXAによる体肢除脂肪量及び体脂肪量に対する効果、MRIにより測定する大腿筋体積、1-反復最大値法による上半身及び下半身の強度、ハンドグリップの最大強度並びに階段昇降力に対する効果の評価を含む。

【 0 1 1 1 】

患者の選択

40

この研究が標的とする集団は、運動が不足しがちなライフスタイルを有し、年齢60歳以上である男性及び女性の健常対象120人であった。

【 0 1 1 2 】

組入れ基準は、以下に従う:1.健康上、顕著な健康問題及び健康状態を有さない、年齢が60歳以上の男性及び女性;2.研究の間及び研究の後の4カ月にわたり、避妊薬を使用する意志があり、精子を供与する意志がない、性的に活発な男性;3.女性には、閉経後の状況を呈していることの臨床的な確認が要求される(最後の月経から少なくとも12カ月が経過しているか、FSHが閉経後のレベルの>20mIU/mlであることが確認されるか、又は外科的に生殖不能である);4.19~35kg/m²(両端を含む)の間の肥満度指数(BMI);5.PAR-Qに基づき、管理下のレジスタンストレーニング運動への参加を制限する恐れがある状態を有さない;6

50

.CHAMPS-18身体活動質問書上、125のスコアにより定義される、運動が不足しがちなライフスタイルを最近の3カ月間有する;7.現在の食餌を維持し、研究のために記載されている運動プログラムに忠実に従う意志があり、いずれの新しい食餌/体重管理プログラムも開始する意志がない;8.毎回欠かさず外来に戻って受診し、研究に関連する手順を全て完了する意志がある、及びそうすることが可能である;9.研究に関連する質問書の全てに答える;10.インフォームドコンセントフォーム(ICF)を提供する。

【0113】

研究のための除外基準は、入院したか又は大きな手術を受けたことがある対象、骨関節炎、リウマチ性疾患、又は関節可動域若しくは運動能力を制限する整形外科的障害を有する対象、胃腸障害、慢性腎疾患、癌、肺疾患、心疾患、喘息、残余の不全麻痺を有する脳卒中、麻痺、多発性硬化症、パーキンソン病、認知障害、短期又は長期の治療介入を正当化する精神医学的状態(例えば、大うつ病性障害、双極性障害、パニック障害、統合失調症)を有する対象、筋量又は筋肉の性能に影響することが公知の任意の薬物を現在使用しているか又は過去6カ月以内に使用した対象、及び大腿のMRIを受けるのが不可能である対象を含む。

10

【0114】

薬物の投与

この研究では、REGN1033を、凍結乾燥医薬品として供給し、皮下に投与した。凍結乾燥REGN1033の各バイアルを、無菌条件下で100mg/mLの最終濃度に再構成した。REGN1033にマッチするプラセボを、REGN1033を添加せずに、REGN1033と同じ製剤として調製した。それぞれの投与レベルで、プラセボの体積は同じであった。400mgのREGN1033又はプラセボを、2週間に1回、全部で6回にわたり、対象の腹部に皮下投与した(群3及び4中の対象については、レジスタンストレーニングRTと組み合わせた)。腹部の特定の四半部を記録した。

20

【0115】

研究計画

この研究は、28日間のスクリーニング期間(第-28日～第-1日、スクリーニング/前治療)、薬物治療期間(第1日～第71日)、及び最後の用量を投与した後の10週間のフォローアップ期間を有した。体重、強度測定及び階段昇降機能並びに心エコーについてのベースラインの測定値を、スクリーニング期間(第-14日～第-1日)の間に得た。DEXA及びMRIについてのベースラインの測定値を、第-7±3日～第-1日の間に得た。全てのその他のパラメータについては、ベースラインの測定値は第1日(ベースライン)に得た。最初の用量の投与からの研究の総持続期間は、およそ20週間であった。

30

【0116】

第-28日～第-1日に、対象をスクリーニングし、第1日に、適格な対象を、4群、すなわち、プラセボ;プラセボとRT;REGN1033;REGN1033とRTのうちの1つに無作為化した。標準的なスクリーニングの手順、並びにMini-Mental State Examination(MMSE)質問書を使用する認知障害についてのスクリーニング及びCommunity Health Activities Model Program for Seniors(CHAMPS)18身体活動質問書を使用する運動が不足しがちなライフスタイルについてのスクリーニングにより、対象の適格性を決定した。

【0117】

40

投与を開始するまでの2週間の間(第-14日～第-1日)に、全ての対象を、運動並びに筋肉の強度及び機能の測定、すなわち、レッグプレス、チェストプレス、レッグカール、アームカール、ハンドグリップの強度並びに加重なし及び加重ありの階段昇降(8工程)に熟知させた。投与を開始するまでの2週間の間(第-14日～第-1日)に、ベースラインとして、上半身及び下半身の強度(、チェストプレス及びレッグプレスについては、1-反復最大値[1-RM]により決定した)、ハンドグリップの最大強度、並びに加重なし及び加重ありの階段昇降力を、全ての対象について決定した。研究薬物の最初の用量を投与するまでの2週間の間の2回の別個の来診において、強度/機能の測定のそれぞれについて、4つの治療群全てにおいて、対象に対して2回の試験を実施して、試験の手順の熟知及び学習に対応した。これら2回の試験セッションの間のこれら2回の測定の平均値を、ベースラインの値として

50

使用する。

【0118】

ベースライン、第4週及び第8週に、各RT運動(チェストプレス、レッグプレス、レッグカール及びアームカール)についての1-RMを、運動施設において、運動トレーニングのために使用する機器上で測定し、この1-RMを使用して、第1~4週、第5~8週及び第9~12週の間のRTトレーニングのための加重を計算した。12週間の治療期間にわたり、運動トレーニングを週2回実施した。それぞれの運動のセッション間に少なくとも1日の間隔を置いた。投与を開始するまでの10日間の間(第-7日±3日)に、全ての対象に全身のDEXAを行って、総体脂肪量及び局部的な体脂肪量並びに体肢除脂肪量を決定した。また、対象に両方の大脳のMRIを行って、筋体積、並びに皮下及び筋肉内脂肪の量も決定した。得られた値を、これらのパラメータについてのベースラインとして用いた。 10

【0119】

第1日に及びその後は2週間に1回、全部で6回にわたり、研究薬物(400mgのREGN1033又はプラセボ)を、対象の腹部に1つの注射部位当たり2mlの2つの注射剤として皮下投与した。対象をバイタルサインについて30分間観察し、注射部位の反応の発生を含めた、有害事象(AE)の収集を行った。研究の間、加速度測定法を使用して、対象の身体活動をモニターした。

【0120】

群3及び4中の対象は、サイトに週2回12週間戻って、レジスタンストレーニング機器を使用する、上肢及び下肢の主要な筋肉群の、管理下の低い強度のレジスタンストレーニングを行った。トレーニング運動は全て、それぞれの運動について、1-RMの50%の比較的低い強度で実施した。 20

【0121】

研究を完了する過程にある全ての対象が、第2、4、6、8及び10週時の臨床検査評価及び安全性評価のために、第15、29、43、57及び71日に来診し(全て、来診ウィンドウは±3日であった)、この際、研究薬物の次回用量を投与した。対象は、最後の用量を投与した(第71日)後10週間追跡し、臨床検査評価及び安全性評価のために、第12、14、16及び20週時に(85 ± 3 、 99 ± 3 、 113 ± 3 及び 141 ± 3 日に[研究のための最後の来診が終了するまで])来診した。スクリーニング時及び第12週時(85 ± 3 日)に、効能の測定(DEXA、MRI、筋肉の強度及び身体的機能)を行った。第6週及び第20週時に、DEXA並びに筋肉の強度(ダブルレッグプレス、チェストプレス及び最大ハンドグリップ)並びに身体的機能(階段昇降力)を決定した。第1日、第4週時、第8週時、第12週時及び研究の終わりに、心電図を得た。第12週時(85 日±3日)に、心エコー図を得た。 30

【0122】

(施設におけるレジスタンストレーニング運動の間及び睡眠中を除いて)第1日から第15日の来診までの研究の最初の2週間及び第71日から第85日までの間の別の14日の期間、(30Hzのサンプリングレートに設定した)GT3Xアクティグラフデバイスを腰に装用することを、全ての対象に指示した。データをダウンロードするために、対象は、デバイスを研究サイトに返還した(第15日及び第85日)。あらかじめ定義したカットオフを使用する活動の閾値の分析に基づいて、種々の活動レベルで過ごした時間を決定した。代謝速度及びエネルギー消費量の推定値を、あらかじめ定義されたアルゴリズム(Actigraph Corp社)により決定した。 40

【0123】

試料の分析及び統計結果

主要効能変数、すなわち、ベースラインから第12週までの、二重エネルギーX線吸収測定法(DEXA)による総除脂肪量のパーセント変化を、混合効果モデル反復測定(MMRM)のアプローチを使用して分析した。副次的効能変数も、類似の形式で分析した。モデルは、(R1033+RT、RTを行わない場合のR1033、プラセボ+RT、及びRTを行わない場合のプラセボの4つのレベルを用いる)治療についての要因(固定効果)、共変数としてのベースラインの階層(性別)、サイトでの運動、ベースラインの値、及び治療とサイトでの運動との相互作用を 50

含んだ。主要エンドポイントを、RTを行わない場合のREGN1033とRTを行わない場合のプラセボとの間で比較した。同じ比較を、RTを行う場合のREGN1033とRTを行う場合のプラセボとの間で行った。また、運動効果も探索した。

【0124】

結果

4つの治療群全体では、無作為化した対象の93.8～96.6%が、第12週の来診を完了した。プラセボ単独治療群中の1人の対象のみが、有害事象に起因して、研究を中断した。プラセボ(PLC)群、プラセボ+RT(PLC+RT)群、REGN1033(R1033)群、及びREGN1033+RT(R1033+RT)群のうちのそれぞれにおいて、研究薬物を全6回投与された対象の%はそれぞれ、87.5%、93.1%、84.4%、及び90.6%であった。治療についてもRTについても、コンプライアンスにおける群間の不均衡はなかった。人口動態は、4群間で均衡がとれていたが、ただし、黒人対象のパーセントが、プラセボ群ではより高く(18.8%)；65歳超の対象の年齢のパーセントが、プラセボ+RT群ではより高く(75.9%)、REGN1033群ではより低かった(56.3%)。それぞれの群のDEXA、MRI、筋肉の強度及び身体的機能についてのベースラインの値が相互に、顕著に異なることはなかった。(データ示さず)

【0125】

研究の主要な目的は、運動を行う場合及び行わない場合における、二重エネルギーX線吸収測定法(DEXA)により測定する場合の総除脂肪体重に対するREGN1033の効果を評価することであった。副次的な目的は、安全性及び忍容性に対する作用、DEXAによる体肢除脂肪量及び体脂肪量に対する効果、MRIにより測定する大腿筋体積、1-反復最大値法による上半身及び下半身の強度、ハンドグリップの最大強度並びに階段昇降力に対する効果の評価を含む。更に、HbA1C及びHOMA-IRに対するREGN1033の潜在的な代謝作用も調べた。

【0126】

主要効能変数、すなわち、ベースラインから第12週までの、二重エネルギーX線吸収測定法(DEXA)による総除脂肪量のパーセント変化を、混合効果モデル反復測定(MMRM)のアプローチを使用して分析した。モデルは、(R1033+RT、RTを行わない場合のR1033、プラセボ+RT、及びRTを行わない場合のプラセボの4つのレベルを用いる)治療についての要因(固定効果)、共変数としてのベースラインの階層(性別)、サイトでの運動、ベースラインの値、及び治療とサイトでの運動との相互作用を含んだ。主要エンドポイントを、RTを行わない場合のREGN1033とRTを行わない場合のプラセボとの間で比較した。同じ比較を、RTを行う場合のREGN1033とRTを行う場合のプラセボとの間で行った。また、運動効果も探索した。継続的な転帰に関する、副次的な効能のエンドポイントを、効能の主要エンドポイントの場合に類似する方法により分析した。

【0127】

この研究のための用量及び投与レジメンは、その他の研究から得られた結果に基づいて選択した。

【0128】

完了したSAD研究では、76人の健常ボランティアに、REGN1033を、最高10mg/kgの用量で静脈内(IV)投与し、最高400mgの用量で皮下投与した。これらのうち、年齢65～85歳の8人の健常ボランティアの高齢者コホートに、6mg/kgの研究薬物を静脈内投与した。全ての用量が十分に忍容され；臨床的に重要な安全性のシグナルは観察されなかった。(データ示さず)

【0129】

別の研究は、年齢60歳以上の健常ボランティアにおいて、皮下投与したREGN1033の安全性、忍容性、薬物動態(PK)、免疫原性及び薬力学的(PD)作用を評価するように設計された。全部で5つのコホートについて研究し、各コホートに12人の対象が登録された。REGN1033(n=9)又はプラセボ(n=3)の用量を、対象に皮下投与した。計画されたREGN1033投与レジメンは、対象1人当たり、100、200又は400mgを、2週間に1回、全部で6用量投与すること、及び対象1人当たり、200mg又は400mgを、4週間に1回、全部で3用量投与することであった。図1Aに示す、この研究から得られた結果から、REGN1033のこれらの用量は、十分に忍

10

20

30

40

50

容され、DEXAにより検出される除脂肪量の増加と関連があることが示唆されている。

【0130】

これらの研究から、PKデータ及び総合的なGDF8のPDデータは、REGN1033が、400mg、4週間に1回、及び400mg、2週間に1回の投与レベルについては、標的結合(target engagement)の飽和と関連がある濃度を、投与期間全体を通して達成することができる事を示唆している。100mg、4週間に1回の投与レベルにおいては、REGN1033の曝露が、より高い用量において達成される曝露よりも明らかに少ないことが予測される。フェーズ1研究から得られたPKデータ及びPDデータは、このより低い用量は、全ての個体において、投与間隔全体にわたり、標的の結合(engagement)と関連がある濃度は達成しないことを示唆している。

10

【0131】

主要効能変数の転帰の結果を、Table 1(表1)及び図1Bに示す。

【0132】

【表1】

主要な効能の概要	第12週、 REGN単独対 PBO単独	第12週、 REGN+RT対 PBO+RT	第12週、 組み合わせたRE GN対組み合わせ たPBO	第12週、 REGN+RT対 REGN	MMRMモデルによる、REG N*と運動との 相互作用
	MMRMモデル によるRE GNの効果	MMRMモ デルによるRE GNの効果	MMRMモ デルによるRE GNの効果	MMRMモ デルによるRE GNの効果	MMRMモ デルによるRE GNの効果
二重エネルギー X線吸収測定法(DEXA)による、ベースラインから の総除脂肪量の ペーセント変化	1.66%対1.79% (p=0.8640)	3.10%対-0.25% (p<0.0001)	2.39%対0.79% (p=0.0048)	-0.25%対1.79% (p=0.0088)	3.10%対1.66% (p=0.0639)
				(p=0.0008)	(p=0.6333) (p=0.0124)

Table 1

【0133】

運動を行わない場合には、DEXAにより測定した総除脂肪体重を、REGN1033(REGN)治療は、プラセボ(PBO)治療と比較して増加させなかつた(ベースラインから第12週までのプラセボ調整変化:-0.13%、p=0.8640)。運動を行つた場合には、ベースラインから第12週までの、DEXAにより測定した総除脂肪体重を、REGN1033(REGN+RT)治療は、プラセボ(PBO+RT)治

10

20

30

40

50

療と比較して有意に増加させた(プラセボ調整増加:3.34%、 $p<0.0001$)。Table 1(表1)及び図1Bを参照されたい。パーセント変化は、「プラセボ+RT」群が、「プラセボ単独」群よりも有意に小さい(-0.25%対1.79%($p=0.0088$))が、数値的には、「REGN1033+RT」群が、「REGN1033単独」群よりも大きい(3.10%対1.66%($p=0.0609$))。

【0134】

要因MMRMモデルもまた、ベースラインから第12週までの、DEXAによる総除脂肪体重のパーセント変化に対するREGN1033の有意な治療効果を示しており($P=0.0008$)、この効果は、第20週時まで持続する($P=0.0004$)。更に、MMRMはまた、運動と治療との間の相互作用の効果も示している($p=0.0124$)。

【0135】

10

無作為化されて、漸進的なレジスタンストレーニング運動を行った対象において、ベースラインから第12週までの、DEXAにより測定した体肢除脂肪体重を、REGN1033(REGN+RT)治療は、プラセボ(PBO+RT)治療と比較して有意に増加させた(プラセボに対する最小二乗平均差:4.34%、 $P=0.001$)。総除脂肪体重の分析において観察されたように、体肢除脂肪量のパーセント変化は、プラセボ+RT群が、プラセボ単独群よりも有意に小さい(0.08%対2.25%($p=0.0200$))が、REGN1033+RT群が、REGN1033単独群よりも有意に大きかった(4.42%対2.30%($p=0.0217$))。要因MMRMモデルもまた、有意な治療効果(0.0008)及び第12週時における治療と運動との間の相互作用($p=0.0040$)を示しており、これらは、第20週時まで持続する。Table 2(表2)及び図2を参照されたい。

【0136】

20

【表2】

	第12週、 REGN単独対 PBO単独	第12週、 REGN+RT対 PBO+RT	第12週、 組み合わせたREG N対組み合わせたP BO	第12週、 REGN+RT対 PBO+RT対PBO	MMRMモ デルによるRE GNの効果	MMRMモ デルによるRE GNの効果	MMRMモ デルによるRE GNの効果
DXAによる体 肢除脂肪量(g) のバー セント 変化	2.30%対2.25% d=0.04%(p=0.9617)	4.42%対0.08% d=4.34%(p<0.0001)	3.37%対1.19% d=2.18%(p=0.0015)	0.08%対2.25% (p=0.0200)	4.42%対2.30% (p=0.0217)	(p=0.0008)	(p=0.9728) (p=0.0040)

Table 2

【0137】

REGN1033治療により、運動の有無にかかわらず、MRIによる大腿筋体積の統計学的に有意な増加が得られた。図3を参照されたい。第12週時の、MRIによる(筋肉内脂肪及び血管を除く)大腿筋体積に対するプラセボ調整効果は、運動を行わない場合(REGN単独):+3.7%

10

20

30

40

50

、p=0.0006、及び運動を行った場合(REGN+RT):+4.5%、p<0.0001であった。REGN1033単独群において、プラセボ単独群と比較して、筋肉内脂肪及び血管を含む大腿筋体積が増加し、REGN1033+RT群において、プラセボ+RT群と比較して、筋肉内脂肪及び血管を含む大腿筋体積が増加する傾向がある。第12週時の、筋肉内脂肪及び血管を含む大腿筋体積(元々のスケール)のベースラインからの最小二乗平均パーセント(%)変化は、プラセボ単独群、プラセボ+RT群、REGN1033単独群、及びREGN1033+RT群においてそれぞれ、-0.03%、-0.434%、2.076%、及び3.405%である。無作為化されて、運動を行わなかった対象において、ベースラインから第12週までの、MRIにより測定した筋肉内脂肪及び血管を含む大腿筋体積を、REGN1033治療は、プラセボ治療と比較して有意に増加させた(プラセボに対する最小二乗平均差:2.11%、P=0.0139)。無作為化されて、漸進的なレジスタンストレーニング運動を行った対象において、ベースラインから第12週までの、MRIにより測定した筋肉内脂肪及び血管を含む大腿筋体積を、REGN1033治療は、プラセボ治療と比較して有意に増加させた(プラセボに対する最小二乗平均差:3.84%、P<0.0001)。

【0138】

要因MMRMモデルもまた、有意な治療効果(<0.0001)を示しているが、運動効果は示していない(p=0.4453)。第12週時の、治療と運動との間の相互作用は、有意でない(p=0.1651)。DEXA測定による除脂肪体重が、プラセボ群において増加し、これには、MRI測定による筋体積の増加は伴わなかった。この相違についての理由は不明である。

【0139】

第12週時に、プラセボ単独群においてガイノイド体脂肪量が増加し、REGN1033+RT群においてガイノイド体脂肪量が減少する傾向が、その他の治療群と比較する場合に存在する。第12週時の、ベースラインからの最小二乗平均パーセント(%)変化は、プラセボ単独群、プラセボ+RT群、REGN1033単独群、及びREGN1033+RT群においてそれぞれ、2.42%、-0.49%、-0.27%、及び-2.17%である。図4を参照されたい。要因MMRMモデルは、ガイノイド体脂肪量に対する治療(p=0.0824)及び運動(0.0531)の有意な効果がある傾向を示しているが、運動と治療との間の相互作用は示していない(p=0.8774)。

【0140】

また、筋肉4種の強度測定からのデータも得た。チェストプレス及びレッグプレスの1-RM測定のためには、機器を全ての研究サイトにわたり標準化するが、アームカール及びレッグカールの測定のためには、標準化しなかった。更に、サブセットの対象についてのみ、アームカール及びレッグカールの測定を行った。

【0141】

全ての群において、レッグプレスの強度が増加する傾向があった。第12週時の、ベースラインからの最小二乗平均パーセント(%)変化は、プラセボ単独群、プラセボ+RT群、REGN1033単独群、及びREGN1033+RT群においてそれぞれ、4.7%、8.9%、6.7%、及び9.7%である。要因MMRMモデルは、レッグプレスに対する有意な治療効果は示さない(p=0.8389)が、ボーダーラインの運動効果を示した(p=0.0541)。運動と治療との間の相互作用の効果は有意でない(p=0.8029)。

【0142】

全ての群において、チェストプレスの強度が増加する傾向があった。REGN1033単独群では、プラセボ単独群と比較して、より増加し、また、REGN1033+RT群でも、プラセボ+RTと比較して、より増加した。図5を参照されたい。第12週時の、ベースラインからの最小二乗平均パーセント(%)変化は、プラセボ単独群、プラセボ+RT群、REGN1033単独群、及びREGN1033+RT群においてそれぞれ、2.2%、10.5%、10.4%、及び15.3%である。無作為化されて、漸進的なレジスタンストレーニング運動を行わなかった対象において、ベースラインから第12週までの、チェストプレスの強度を、REGN1033治療は、プラセボ治療と比較して増加させた(プラセボに対する最小二乗平均差:8.2%、P=0.0524)。無作為化されて、漸進的なレジスタンストレーニング運動を行った対象において、ベースラインから第12週までの、チェストプレスの強度を、数値的には、REGN1033治療は、プラセボ治療と比較して増加させたが、これは有意でなかった(プラセボに対する最小二乗平均差:5.3%、P=0.2316)。

10

20

30

40

50

要因MMRMモデルは、有意な治療効果($p=0.0525$)及びチェストプレスに対する統計学的に有意な運動効果(0.0272)を示し、運動と治療との間の相互作用の効果は示さなかった($p=0.5089$)。

【 0 1 4 3 】

第12週に至るまで、全ての群において、レッグカールの強度が増加する傾向があった。第12週時の、ベースラインからの最小二乗平均パーセント(%)変化は、プラセボ単独群、プラセボ+RT群、REGN1033単独群、及びREGN1033+RT群においてそれぞれ、5.3%、16.3%、10.4%、及び9.7%であった。レッグカールの強度の変化は、REGN1033単独が、プラセボ単独よりも5.1%大きく、しかし、REGN1033+RTが、プラセボ+RTよりも6.6%小さかった。パーセント変化は、プラセボ+RT群が、「プラセボ単独」群よりも有意に大きく(16.3%対5.30%($p=0.0050$))、しかし、REGN1033+RT群が、REGN1033単独群よりも大きいということはなかった(9.7%対10.4%($p=0.8388$))。要因MMRMモデルは、運動と治療との間の相互作用の有意な効果は示さなかった($p=0.0229$)。

【 0 1 4 4 】

全ての群において、アームカールが増加する傾向があった(データ示さず)。第12週時の、ベースラインからの最小二乗平均パーセント(%)変化は、プラセボ単独群、プラセボ+RT群、REGN1033単独群、及びREGN1033+RT群においてそれぞれ、8.1%、21.7%、12.4%、及び15.7%である。無作為化されて、漸進的なレジスタンストレーニング運動を行わなかった対象において、ベースラインから第12週までの、アームカールの強度を、REGN1033治療は、プラセボと比較して増加させるが、この差は、統計学的に有意でなかった(プラセボに対する最小二乗平均差:4.3%、 $P=0.4589$)。

【 0 1 4 5 】

無作為化されて、漸進的なレジスタンストレーニング運動を行った対象において、ベースラインから第12週までの、アームカールの強度の増加が、REGN1033治療は、プラセボと比較してより低いが、有意でなかった(プラセボに対する最小二乗平均差:-6.0%、 $P=0.3121$)。要因MMRMモデルは、REGN1033の有意な治療効果は示さず($p=0.8958$)、ボーダーラインの運動効果を示し($p=0.053$)、運動と治療との間の相互作用の有意な効果は示さなかった($p=0.1318$)。

【 0 1 4 6 】

REGN1033群において、利き手のハンドグリップ強度が増加する傾向があった(データ示さず)。第12週時の、ベースラインからの最小二乗平均パーセント(%)変化は、プラセボ単独群、プラセボ+RT群、REGN1033単独群、及びREGN1033+RT群においてそれぞれ、1.8%、1.2%、4.8%、及び5.0%であった。無作為化されて、漸進的なレジスタンストレーニング運動を行わなかった対象において、ベースラインから第12週までの、利き手のハンドグリップ強度を、REGN1033治療は、プラセボと比較して増加させるが、これは有意でなかった(プラセボに対する最小二乗平均差:3.0%、 $P=0.4180$)。無作為化されて、漸進的なレジスタンストレーニング運動を行った対象において、ベースラインから第12週までの、利き手のハンドグリップ強度を、REGN1033治療は、プラセボと比較してより増加させるが、これは有意でなかった(プラセボに対する最小二乗平均差:3.8%、 $P=0.3198$)。要因MMRMモデルは、REGN1033の統計学的に有意な治療効果を示している($p=0.0407$)が、運動効果($p=0.7033$)及び運動と治療との間の相互作用($p=0.8283$)は示していない。

【 0 1 4 7 】

非利き手のハンドグリップ強度は、REGN1033群において増加するが、プラセボ群においては増加しない傾向があった(データ示さず)。第12週時の、ベースラインからの最小二乗平均パーセント(%)変化は、プラセボ単独群、プラセボ+RT群、REGN1033単独群、及びREGN1033+RT群においてそれぞれ、1.8%、-0.8%、7.0%、及び4.2%であった。無作為化されて、漸進的なレジスタンストレーニング運動を行わなかった対象において、ベースラインから第12週までの、非利き手のハンドグリップ強度を、REGN1033治療は、プラセボと比較してより増加させるが、これは有意でなかった(プラセボに対する最小二乗平均差:5.1%、 $P=0.1432$)。無作為化されて、漸進的なレジスタンストレーニング運動を行った対象において

10

20

30

40

50

、ベースラインから第12週までの、非利き手のハンドグリップ強度を、REGN1033治療は、プラセボと比較してより増加させるが、これは有意でなかった(プラセボに対する最小二乗平均差:5.0%、P=0.1708)。要因MMRMモデルは、非利き手のハンドグリップ強度に対するREGN1033の統計学的に有意な治療効果(p=0.0039)及びボーダーラインの有意性の運動効果(p=0.0581)を示した。運動と治療との間の相互作用の効果はなかった(p=0.6224)。

【 0 1 4 8 】

全ての群において、加重ありの階段昇降力が増加する傾向があった(データ示さず)。第12週時の、ベースラインからの最小二乗平均パーセント(%)変化は、プラセボ単独群、プラセボ+RT群、REGN1033単独群、及びREGN1033+RT群においてそれぞれ、5.6%、12.9%、12.2%、及び15.0%であった。無作為化されて、漸進的なレジスタンストレーニング運動を行わなかった対象において、ベースラインから第12週までの、加重ありの階段昇降力を、REGN1033治療は、プラセボと比較してより増加させるが、これは有意でなかった(プラセボに対する最小二乗平均差:6.6%、P=0.1303)。無作為化されて、漸進的なレジスタンストレーニング運動を行った対象において、ベースラインから第12週までの、加重ありの階段昇降力を、REGN1033治療は、プラセボと比較してより増加させるが、これは有意でなかった(プラセボに対する最小二乗平均差:2.2%、P=0.6368)。要因MMRMモデルは、加重ありの階段昇降において、統計学的に有意な治療効果(p=0.3612)及び運動と治療との間の相互作用(p=0.8043)を示さず、しかし、統計学的に有意な運動効果は示した(p=0.0151)。

【 0 1 4 9 】

全ての群において、加重なしの階段昇降力が増加する傾向があった。第12週時の、ベースラインからの最小二乗平均パーセント(%)変化は、プラセボ単独群、プラセボ+RT群、REGN1033単独群、及びREGN1033+RT群においてそれぞれ、6.1%、12.5%、5.4%、及び9.8%であった。REGN1033群とプラセボ群との間に差はなかった。要因MMRMモデルは、統計学的に有意な治療効果(p=0.4670)及び治療と運動との間の相互作用(p=0.4180)を示さず、しかし、統計学的に有意性の運動効果は示した(p=0.0295)。パーセント変化は、プラセボ+RT群が、プラセボ単独群よりも大きく(12.5%対6.1%(p=0.0900))、REGN1033+RT群が、「REGN1033単独」群よりも大きく(9.8%対5.4%(p=0.2253))、しかし、これらの差は、統計学的に有意でない。

【 0 1 5 0 】

この研究では、REGN1033治療及びレジスタンストレーニング(RT)運動は一般に、十分に容忍された。治療の有害事象(TEAE)についての結果を、Table 3(表3)に示す。

【 0 1 5 1 】

10

20

30

【表3】

Table 3

	プラセボ	REGN1033	
	単独	RT	400 mg 400 mg + RT
TEAEの数	(N=32)	(N=29)	(N=32)
重大なTEAEの数	151	103	129
少なくとも1つのTEAEが生じた対象	26 (81.3%)	27 (93.1%)	27 (84.4%)
少なくとも1つの薬物関連TEAEが生じた対象	10 (31.3%)	6 (20.7%)	14 (43.8%)
少なくとも1つの重大なTEAEが生じた対象	1 (3.1%)	1 (3.4%)	2 (6.3%)
研究薬物の中止をもたらすTEAEが生じた対象	3 (9.4%)	1 (3.4%)	1 (3.1%)
死亡に至るTEAEが生じた対象	0	0	0

【0152】

この研究では、死亡の報告はなく、4人の対象において、全部で5例の重大なTEAEが生じ、それらは、プラセボ単独群の1人の対象における足の骨折；プラセボ+RT群の1人の対象における胆のう炎；REGN1033群の1人の対象におけるストレス心筋症；並びにREGN1033群の1人の対象における低カリウム血症及び低血圧症を含んだ。REGN1033+RT群における重大なTEAEの報告はなかった。プラセボ単独群の対象から、その他の群と比較して、より多くのTEAE及び治療関連TEAEが報告された。全ての治療群にわたり、少なくとも1つのTEAEを経験した対象の数及びパーセントは類似し、すなわち、それぞれ、プラセボ単独群で26例(81.3%)、プラセボ+RT群:27例(93.1%)、REGN1033群:27例(84.4%)、及びREGN1033+RT群で28例(87.5%)であった。全部で5人の対象(それぞれ、プラセボ群及びプラセボ+RT群における3人の対象及び1人の対象、一方、REGN1033群及びREGN1033+RT群における1人の対象及び0人の対象)が、TEAEに起因して薬物治療を中断した。

【0153】

REGN1033治療群において、バイタルサイン、ECG及び血液学的検査の臨床的に重要な可能性のある値(PCSV)のカテゴリーにわたり、PCSVのより高い頻度を示す不均衡の所見はなかった。数値的には、REGN1033組み合わせ群において、プラセボ組み合わせ群においてよりも多くの対象が化学的PCSVを示した。>3×ULNのクレアチニナーゼ値の上昇が、プラセボ単独群、プラセボ+RT群、REGN1033群、及びREGN1033+RT群においてそれぞれ、2

人(6.3%)、1人(3.4%)、2人(6.3%)、及び4人(12.5%)の対象に生じた。>10×ULNのクレアチンキナーゼ値は生じなかった(Table 14(表14).3.4.2.3)。REGN1033で治療した群(7人[10.9%])において、プラセボ群(3人[4.9%])においてよりも多くの対象が、>5%の体重の増加を示した(Table 14(表14).3.5.1.2)。

【0154】

心臓の構造及び機能に関連する心エコー図パラメータの精査からは、心臓の肥大又は心臓の機能に対するいずれかのその他の有害な作用のシグナルは全く明らかにされなかった。REGN1033治療は、左心室駆出率、左室(LV)壁の厚さ及び心室中隔の厚さに対して作用を示さなかった。REGN1033治療群及びプラセボ治療群にいずれにおいても、左室体積及び左室重量係数の増加の報告はなかった(データ示さず)。

10

【0155】

結論

運動を行った場合には、健常な対象において、ベースラインから第12週までの、DEXAにより測定した総除脂肪体重を、REGN1033治療は、プラセボ治療と比較して有意に増加させた(3.1%対-0.2%、<0.0001)。運動を行わない場合には、DEXAにより測定した総除脂肪体重を、REGN1033治療は、プラセボ治療と比較して有意には増加させなかった。

【0156】

副次的な効能のエンドポイントについては、DEXAによる体肢除脂肪量についての結果は、DEXAによる総除脂肪体重において観察された結果と一貫性がある。プラセボ治療と比較して、REGN1033治療により、運動の有無にかかわらず、第12週の、MRIによる筋肉内脂肪及び血管を除く大腿筋体積の統計学的に有意な増加が得られた(プラセボ調整増加:運動を行わない場合:3.7%、P=0.0006、及び運動を行った場合:4.5%、P<0.0001)。

20

【0157】

この研究のレジスタンストレーニング(RT)運動は、この高齢者集団において十分に忍容された。MMRMモデルにより、有意な運動効果が、大半の強度/機能の測定値において示された。このレベルのRT運動からは、DEXAにより測定した除脂肪量及びMRIにより測定した筋体積の有意な増加は得られなかった。REGN1033治療はまた、この研究で調べたいつかの強度及び機能のエンドポイントに対して、プラス効果を示す傾向もあった。プラス効果は、チェストプレスの強度、ハンドグリップの強度及び加重ありの階段昇降機能において認められた。

30

【0158】

概して、この治験においては、REGN1033、皮下、400mg、2週間に1回は一般に、十分に忍容された。治療群にわたり、TEAEを報告した患者の数は同等であった。TEAEの精査からは、重要な安全性シグナルは明らかにされなかった。心エコー図の検査からは、心臓の構造及び機能に対する有害な作用は明らかにされなかった。

【0159】

(実施例3)

運動を行う場合及び行わない場合の、サルコペニアを有する対象の抗GDF-8治療の臨床治験プロトコール

サルコペニアを有する患者において、3ヶ月間の皮下REGN1033治療の安全性及び効能について、無作為化、二重盲検、プラセボ対照、多施設、フェーズ2研究を実施した。250人の患者を登録し、4つの治療群に分けた。適格な患者は、サルコペニア及び関連する運動機能障害を有する男性及び女性であり、年齢は70歳以上であり、平均年齢は78歳であった。患者を、1:1:1:1の比で無作為化して、プラセボを、皮下、2週間に1回投与し、全部で6回の治療を行う群;REGN1033、300mgを、皮下、2週間に1回(Q2W)投与し、全部で6回の治療を行う群;REGN1033、300mgを、皮下、4週間に1回(Q4W)投与し、全部で3回の治療を行う(プラセボを隔週に投与する)群;及びREGN1033、100mgを、皮下、4週間に1回投与し、全部で3回の治療を行う(プラセボを隔週に投与する)群に分けた。この研究は、スクリーニング/前治療の期間(第-28日～第-1日)、12週間の治療期間(第1日～第85日)、及び8週間のフォローアップ期間(第141日まで)を有した。

40

50

【0160】

スクリーニング及び前治療の手順(第-28日～第-1日)

3回の来診にわたり、連続的なスクリーニングのプロセスを実施し、来診1において、最初の適格性を決定し、来診2及び来診3において、前治療の手順を実施した。サイトで実行可能であるならば、来診1及び来診2を同時に実施し；その場合には、来診2の手順を、研究薬物の最初の投与までの21日間に実施した。来診1において、最初の適格性を、標準的なスクリーニングの手順、並びに4メートル[4M]歩行運動のスピード及びMini-Mental State Examination(MMSE)のスコアにより決定した。来診2及び来診3において、最初の適格性の基準を満たした患者は、前治療のベースラインの手順及び測定のために外来に戻った。

【0161】

10

手順は、標準的な安全性評価及び臨床検査評価、DEXAスキャン、心エコー図、強度測定(レッグプレス、チェストプレス及びハンドグリップの強度)、並びに機能測定(階段昇降、Short Physical Performance Battery[SPPB]、4M歩行運動のスピード、及び6分間の歩行試験[6MWT])を含んだ。

【0162】

治療期間及び研究薬物の投与(第1日～第85日)

第1日に開始し、患者を無作為化して、REGN1033又はマッチするプラセボのいずれかを投与した。用量を、以下に示す：

300mg皮下、2週間に1回の、全部で6回の治療、

300mg皮下、4週間に1回の、全部で3回の治療(プラセボを隔週に投与して、盲検法を維持する)、

100mg皮下、4週間に1回の、全部で3回の治療(プラセボを隔週に投与して、盲検法を維持する)、

マッチするプラセボ皮下、2週間に1回の、全部で6回の治療。

【0163】

20

注射剤を腹部に投与した。患者をバイタルサインについて30分間観察し、注射部位の反応の発生を含めた、有害事象(AE)の収集を行った。効能及び安全性の手順を実施し、患者報告転帰(PRO)を得た。薬物動態(PK)、抗薬物抗体(ADA)、及び調査研究のために、血液試料を収集した。血液試料は全て、一晩絶食した後かつ投与する前に収集した。

【0164】

30

フォローアップ(第86日～第141日)

フォローアップの来診は、第141日、すなわち、第85日の治療のための来診が終わった8週間後であった。

【0165】

エンドポイント

この研究の主要エンドポイントは、ベースラインから第12週までの、DEXAにより測定した総除脂肪体重のパーセント変化であった。副次エンドポイントは、ベースラインから研究の終わりまでのTEAE;DEXAによる体肢除脂肪量、レッグプレスの最大強度、1-反復最大値(1-RM)、チェストプレスの最大強度(1-RM)、4M歩行運動のスピード、SPPB及びSPPBサブスコア、6MWTにおける歩行距離、DEXAによる局部的な体脂肪量及び総体脂肪量、並びに手持ち式動力計によるハンドグリップの強度のベースラインからの変化であった。

40

【0166】

手順及び評価

バイタルサイン、心電図(ECG)、心エコー図、有害事象(AE)及び臨床検査結果を評価することによって、REGN1033の安全性及び忍容性を評価した。インフォームドコンセントへのサイン時から研究のための来診が終わるまでに経験する全てのAEについてモニターし、それらを報告することを、患者に依頼した。

【0167】

DEXA、強度測定(レッグプレス、チェストプレス及びハンドグリップの強度)、並びに機能測定(階段昇降、SPPB、4M歩行運動のスピード及び6MWT)により、効能を評価した。その

50

他の尺度、すなわち、加速度測定法、並びにPRO(10-item Physical Function Form [PF-10]、Functional Assessment of Chronic Illness Therapy [FACIT] Fatigue Scale、Health Assessment Questionnaire Disability Index [HAQ-DI]、Mini-Nutritional Assessment short form [MNA-SF]、及びRapid Assessment of Physical Activity [RAPA]質問書)を使用した。

【0168】

結果

無作為化した患者の95%が、研究を完了した。下記のTable 4(表4)に示すように、試験した3つの投与レジメンのそれぞれにおいて、ベースラインから第12週までの、総除脂肪体重を、REGN1033治療は、プラセボと比較して有意に増加させ;REGN1033の、100mg、4週間に1回;300mg、4週間に1回;及び300mg、2週間に1回の皮下投与についての、プラセボとの平均差はそれぞれ、1.7%(p=0.008)、1.8%(p=0.004)、及び2.3%(p<0.001)であり、これらは、0.7kg、0.8kg、及び1.0kgの除脂肪量の増加に対応した。REGN1033を用いて治療した患者において、体肢除脂肪量もまた、有意に増加した:プラセボ調整変化は、2.3~2.8%の範囲に及んだ。REGN1033治療により、DEXAにより測定した総体脂肪量、男性型体脂肪量及びガイノイド体脂肪量は全て、数値的な減少を示した。REGN1033治療は、プラセボと比べて、強度及び機能の種々の測定値において、より大きな、ベースラインからの平均変化を指向的にもたらした。

【0169】

【表4】

Table 4

	REGN100mg、4週間に1回(n=62)対PBO(n=65)	REGN300mg、4週間に1回(n=64)対PBO(n=65)	REGN300mg、2週間に1回(n=59)対PBO(n=65)
効能の主要エンドポイント:DEXA-ベースラインから第12週までの、パーセント変化			
ベースラインからの、二重エネルギーX線吸収測定法(DEXA)による総除脂肪量のパーセント変化	1.191% 対 -0.474% d=1.664% (p=0.0077)	1.308% 対 -0.474% d=1.781% (p=0.0043)	1.816% 対 -0.474% d=2.289% (p=0.0004)
副次的効能の要約:DEXA-ベースラインから第12週までの、パーセント変化			
DEXAによる体肢除脂肪量(g)のパーセント変化 by DEXA	2.162% 対 -0.249% d=2.412% (p=0.0026)	2.033% 対 -0.249% d=2.282% (p=0.0043)	2.502% 対 -0.249% d=2.751% (p=0.0008)
DEXAにより決定した総体脂肪量(g)のパーセント変化	-0.077% 対 -0.076% d=-0.001% (p=0.9993)	-2.666% 対 -0.076% d=-2.590% (p=0.0099)	-0.947% 対 -0.076% d=-0.871% (p=0.3945)
DEXAによる男性型体脂肪量(g)のパーセント変化	-0.496% 対 2.501% d=-2.998% (p=0.0587)	-3.164% 対 2.501% d=-5.665% (p=0.0004)	-2.209% 対 2.501% d=-4.710% (p=0.0038)
ベースラインからの、DEXAによるガイノイド体脂肪量(g)のパーセント変化	0.022% 対 0.156% d=-0.135% (p=0.9050)	-2.608% 対 0.156% d=-2.751% (p=0.0152)	-2.185% 対 0.156% d=-2.341% (p=0.0434)

【0170】

REGN1033は一般に、安全であり、十分に忍容された。治療群にわたり、有害事象の頻度は類似した。また、全ての治療群にわたり、少なくとも1つのSAEを経験した対象のパーセントも類似した(プラセボ群における7.7%対REGN1033で治療した群における7.4%)。SAEの分布に対する識別可能なパターンはなかった。臨床検査試験、バイタルサイン、ECG及び心エコー図について、臨床的に重要な傾向は観察されなかった。

10

20

30

40

50

【0171】

結論

サルコペニアを有する患者において、REGN1033治療は、総除脂肪量及び体肢除脂肪量を有意に増加させ、十分に忍容された。

【0172】

本発明の範囲は、本明細書に記載した特定の実施形態により制限されない。実際に、本明細書に記載するものに加えて、上記の説明及び付随する図から、本発明の種々の改変形態が当業者に明らかになるであろう。そのような改変形態は、添付の特許請求の範囲に属することが意図されている。本明細書で言及した刊行物は全て、参照により本明細書に組み込まれている。

【図1A】

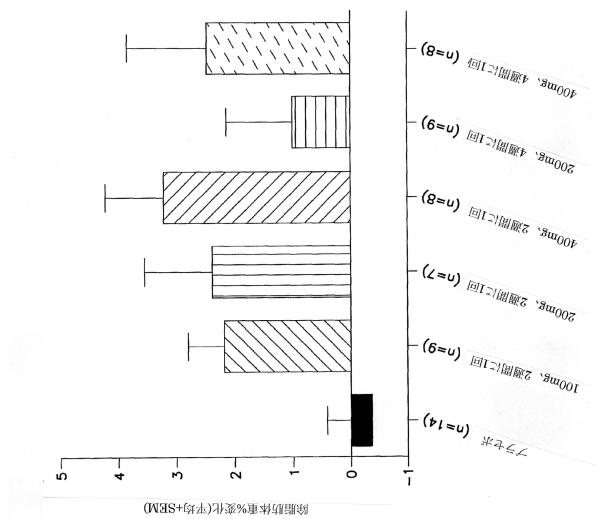


FIG. 1A

【図1B】

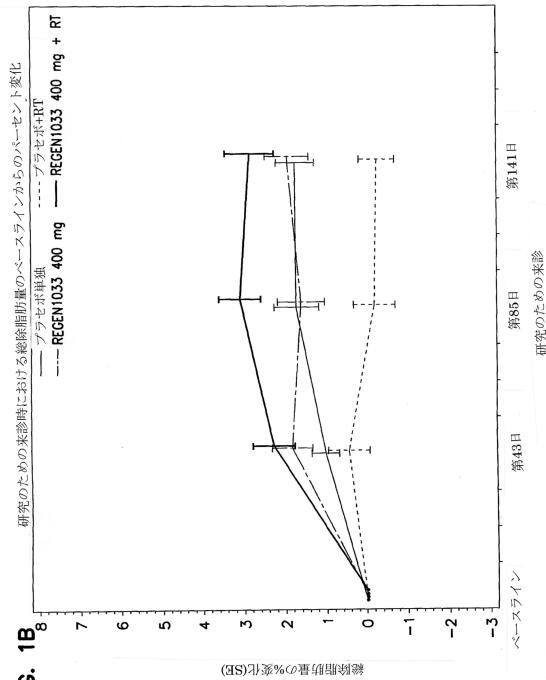


FIG. 1B

【図2】

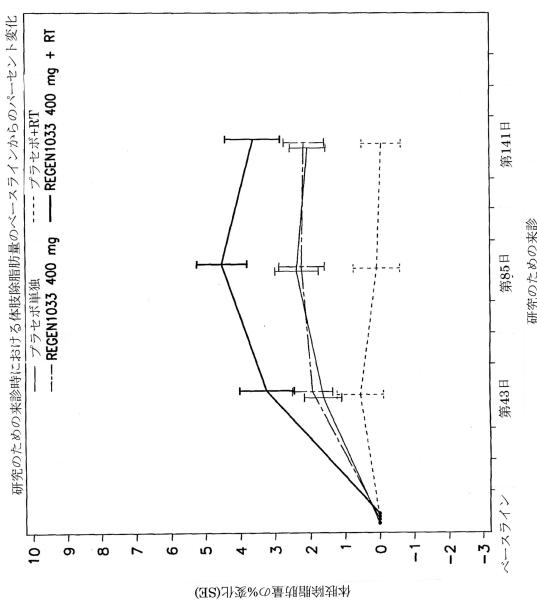


FIG. 2

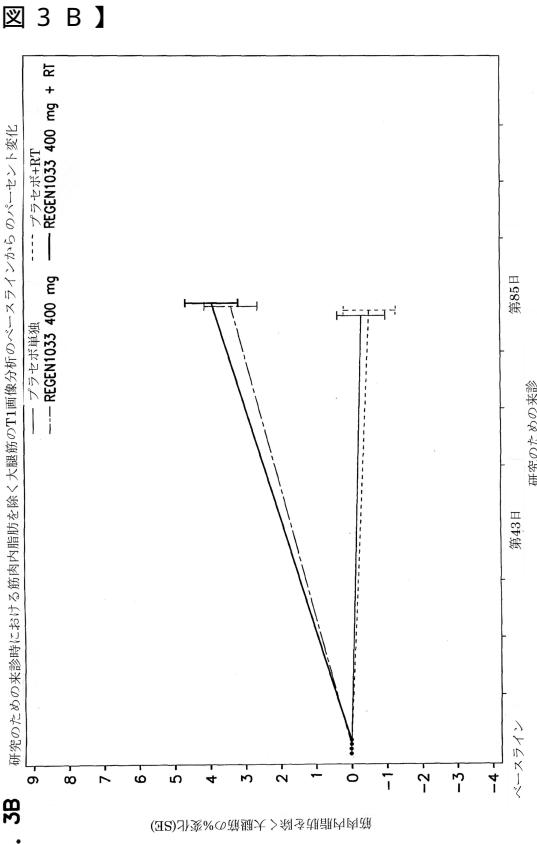


FIG. 3B 研究のための来診時における筋肉内脂肪を除く大腿筋のT1画像分析のベースラインからのパーセント変化

【図3A】

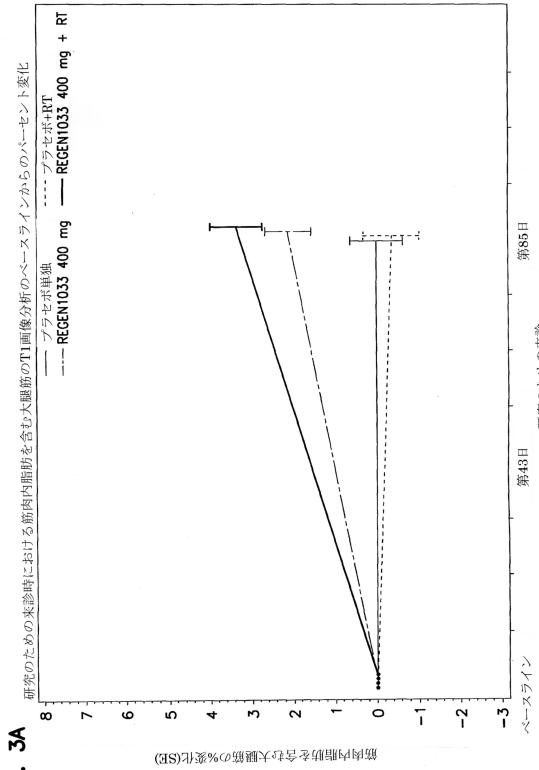


FIG. 3A

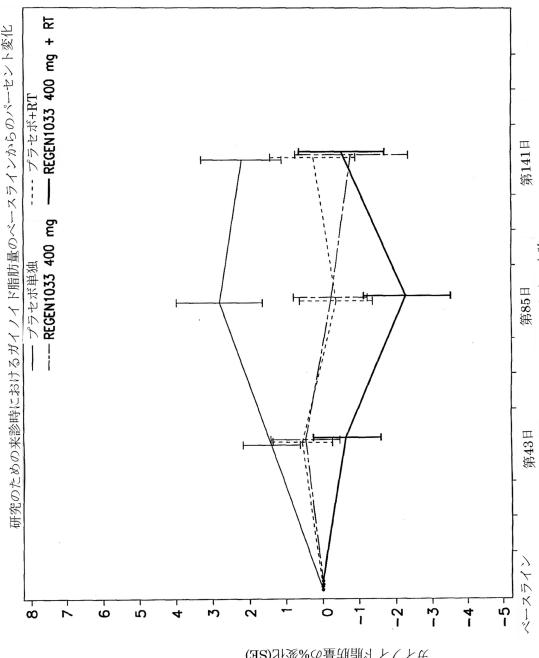
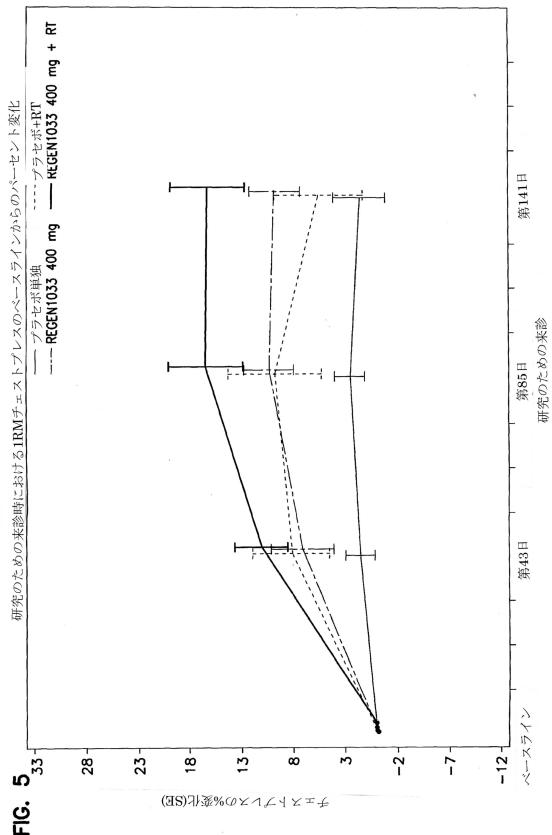


FIG. 4

【図4】

【図5】



【配列表】

0006877357000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 0 7 K 16/22 (2006.01) A 2 3 L 33/18
C 0 7 K 16/22

(31)優先権主張番号 62/234,899

(32)優先日 平成27年9月30日(2015.9.30)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(72)発明者 ロバート・シー・ポーディ

アメリカ合衆国・ニューヨーク・10591・タリータウン・オールド・ソー・ミル・リバー・ロード・777・リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド内

(72)発明者 シャオビン・チエン

アメリカ合衆国・ニューヨーク・10591・タリータウン・オールド・ソー・ミル・リバー・ロード・777・リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド内

(72)発明者 スティーヴン・ドナヒュー

アメリカ合衆国・ニューヨーク・10591・タリータウン・オールド・ソー・ミル・リバー・ロード・777・リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド内

審査官 佐々木 大輔

(56)参考文献 特表2013-528608 (JP, A)

国際公開第2013/186719 (WO, A1)

特表2014-534239 (JP, A)

特表2012-512641 (JP, A)

国際公開第2015/022658 (WO, A1)

Int. J. Diabetes & Metab., 2011, Vol.19, pp.63-68

Molecular and Cellular Endocrinology, 2010, Vol.317, pp.25-30

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 3 9 / 0 0 - 3 9 / 4 4

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S (S T N)