

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-516439

(P2022-516439A)

(43)公表日 令和4年2月28日(2022.2.28)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	Z N A 4 B 0 6 4
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	Z 4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z 4 C 0 7 6
C 0 7 K 14/605(2006.01)	C 0 7 K 14/605	4 C 0 8 4
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	4 C 0 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全78頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2021-535930(P2021-535930)	(71)出願人	510166892
(86)(22)出願日	令和1年12月20日(2019.12.20)		ジェンス ヘンルイ メディシンカンパニ
(85)翻訳文提出日	令和3年7月26日(2021.7.26)		ー リミテッド
(86)国際出願番号	PCT/CN2019/126903		J I A N G S U H E N G R U I M E D
(87)国際公開番号	WO2020/125744		I C I N E C O . , L T D .
(87)国際公開日	令和2年6月25日(2020.6.25)		中華人民共和国 ジェンス 2 2 2 0 0 2
(31)優先権主張番号	201811573634.0		リエンユンガン エコノミック・アンド
(32)優先日	平成30年12月21日(2018.12.21)		・テクノロジカル・ディベロップメント
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)		・ゾーン クンルンシャン ロード ナン
(31)優先権主張番号	201811606887.3	(71)出願人	508209602
(32)優先日	平成30年12月27日(2018.12.27)		シャンハイ ヘンルイ ファーマスーティ
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)		カル カンパニー リミテッド
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA		S H A N G H A I H E N G R U I P H
	最終頁に続く		A R M A C E U T I C A L C O . , L
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 二特異性タンパク質

(57)【要約】

ヒトGCGR抗体、GLP-1ペプチドおよびそれらの変異体、ならびにGCGR抗体およびGLP-1ペプチドの融合によって形成される二特異性タンパク質およびそれらの調製方法を提供し、それらは体重減少および糖尿病処置のために用いることができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

次の：

a) 配列番号48、49および50においてそれぞれ表わされるHCDR1、HCDR2およびHCDR3領域が含まれる重鎖可変領域、および

配列番号51、52および53においてそれぞれ表わされるLCDR1、LCDR2およびLCDR3領域が含まれる軽鎖可変領域；または

b) 配列番号38、39および54においてそれぞれ表わされるHCDR1、HCDR2およびHCDR3領域が含まれる重鎖可変領域、および

配列番号55、56および57においてそれぞれ表わされるLCDR1、LCDR2、およびLCDR3領域が含まれる軽鎖可変領域

からなる群より選ばれる重鎖可変領域および軽鎖可変領域の組合せを包含する、抗GCGRモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

10

【請求項 2】

次の：

i) 配列番号14、15および16においてそれぞれ表わされるHCDR1、HCDR2およびHCDR3領域が含まれる重鎖可変領域、および

配列番号17、18および19においてそれぞれ表わされるLCDR1、LCDR2、およびLCDR3領域が含まれる軽鎖可変領域；

ii) 配列番号20、21および22においてそれぞれ表わされるHCDR1、HCDR2およびHCDR3領域が含まれる重鎖可変領域、および

20

配列番号23、24および25においてそれぞれ表わされるLCDR1、LCDR2、およびLCDR3領域が含まれる軽鎖可変領域；

iii) 配列番号26、27および28においてそれぞれ表わされるHCDR1、HCDR2およびHCDR3領域が含まれる重鎖可変領域、および

配列番号29、30および31においてそれぞれ表わされるLCDR1、LCDR2、およびLCDR3領域が含まれる軽鎖可変領域；

iv) 配列番号32、33および34においてそれぞれ表わされるHCDR1、HCDR2およびHCDR3領域が含まれる重鎖可変領域、および

配列番号35、36および37においてそれぞれ表わされるLCDR1、LCDR2、およびLCDR3領域が含まれる軽鎖可変領域；

30

v) 配列番号38、39および40においてそれぞれ表わされるHCDR1、HCDR2およびHCDR3領域が含まれる重鎖可変領域、および

配列番号41、42および43においてそれぞれ表わされるLCDR1、LCDR2、およびLCDR3領域が含まれる軽鎖可変領域；および

vi) 配列番号38、39および44においてそれぞれ表わされるHCDR1、HCDR2およびHCDR3領域が含まれる重鎖可変領域、および

配列番号45、46および47においてそれぞれ表わされるLCDR1、LCDR2、およびLCDR3領域が含まれる軽鎖可変領域

からなる群より選ばれる重鎖可変領域および軽鎖可変領域の組合せを包含する、請求項1に記載の抗GCGRモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

40

【請求項 3】

ネズミ抗体もしくはその抗原結合断片、キメラ抗体もしくはその抗原結合断片、またはヒト化抗体もしくはその抗原結合断片である、請求項1または2に記載の抗GCGRモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 4】

前記ヒト化抗体は、ヒト抗体から導き出されるフレームワーク領域またはそのフレームワーク領域変種を包含し、そこで：

前記フレームワーク領域変種は、前記ヒト抗体の軽鎖フレームワーク領域および/または重鎖フレームワーク領域においてそれぞれ最大で10のアミノ酸復帰変異を有し、

50

なるべくなら前記アミノ酸復帰変異は次の：

aa) 軽鎖可変領域において包含される一またはそれよりも多くの復帰変異（複数）の42 G、44 V、71 Yおよび87 F、および/または

重鎖可変領域において包含される一またはそれよりも多くの復帰変異（複数）の38 K、48 I、67 A、69 F、71 A、73 P、78 Aおよび93 S；または

ab) 軽鎖可変領域において包含される一またはそれよりも多くの38 L、44 V、59 S、70 Eおよび71 Yの復帰変異（複数）、および/または

重鎖可変領域において包含される38 K、48 I、66 K、67 A、69 L、73 R、78 Mおよび94 Sの一またはそれよりも多くの復帰変異（複数）

から選ばれる、請求項3に記載の抗GCGRモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

10

【請求項5】

次の：

c) 重鎖可変領域であり、その配列は配列番号2、61、62、63および64のいずれか一において表わされ、または配列番号2、61、62、63および64のいずれか一と少なくとも90%の配列同一性を有するもの；および

軽鎖可変領域であり、その配列は配列番号3、58、59および60のいずれか一において表わされ、または配列番号3、58、59および60のいずれか一と少なくとも90%の配列同一性を有するもの；

d) 重鎖可変領域であり、その配列は配列番号4において表わされ、または配列番号4と少なくとも90%の配列同一性を有するもの；および

20

軽鎖可変領域であり、その配列は配列番号5において表わされ、または配列番号5と少なくとも90%の配列同一性を有するもの；

e) 重鎖可変領域であり、その配列は配列番号6において表わされ、または配列番号6と少なくとも90%の配列同一性を有するもの；および

軽鎖可変領域であり、その配列は配列番号7において表わされ、または配列番号7と少なくとも90%の配列同一性を有するもの；

f) 重鎖可変領域であり、その配列は配列番号8、68、69、70および71のいずれか一において表わされ、または配列番号8、68、69、70および71のいずれか一と少なくとも90%の配列同一性を有するもの；および

軽鎖可変領域であり、その配列は配列番号9、65、66および67のいずれか一において表わされ、または配列番号9、65、66および67のいずれか一と少なくとも90%の配列同一性を有するもの；

30

g) 重鎖可変領域であり、その配列は配列番号10において表わされ、または配列番号10と少なくとも90%の配列同一性を有するもの；および

軽鎖可変領域であり、その配列は配列番号11において表わされ、または配列番号11と少なくとも90%の配列同一性を有するもの；および

h) 重鎖可変領域であり、その配列は配列番号12において表わされ、または配列番号12と少なくとも90%の配列同一性を有するもの；および

軽鎖可変領域であり、その配列は配列番号13において表わされ、または配列番号13と少なくとも90%の配列同一性を有するもの

40

からなる群より選ばれる軽鎖可変領域および重鎖可変領域の組合せを包含する、請求項3に記載の抗GCGRモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項6】

前記抗体は全長抗体であり、抗体定常領域（複数）がさらに含まれ、

なるべくなら重鎖定常領域はヒトIgG1、IgG2、IgG3およびIgG4定常領域およびそれらの慣習的な変種からなる群より選ばれ、軽鎖定常領域はヒト抗体κおよびλ鎖定常領域およびその慣習的な変種からなる群より選ばれ、

より一層なるべくなら配列番号72において表わされるヒト抗体重鎖定常領域および配列番号73において表わされるヒト抗体軽鎖定常領域が含まれる、請求項1～5のいずれか一項に記載の抗GCGRモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

50

【請求項 7】

次の：

j) 配列番号74、76または78において表わされ、またはそれらに対して少なくとも85%の配列同一性を有する重鎖、および配列番号75、77または79において表わされ、またはそれらに対して少なくとも85%の配列同一性を有する軽鎖；

k) 配列番号80において表わされ、またはそれに対して少なくとも85%の配列同一性を有する重鎖、および配列番号81において表わされ、またはそれに対して少なくとも85%の配列同一性を有する軽鎖；

l) 配列番号82において表わされ、またはそれに対して少なくとも85%の配列同一性を有する重鎖、および配列番号83において表わされ、またはそれに対して少なくとも85%の配列同一性を有する軽鎖；

m) 配列番号84において表わされ、またはそれに対して少なくとも85%の配列同一性を有する重鎖、および配列番号85において表わされ、またはそれに対して少なくとも85%の配列同一性を有する軽鎖；

n) 配列番号86において表わされ、またはそれに対して少なくとも85%の配列同一性を有する重鎖、および配列番号87において表わされ、またはそれに対して少なくとも85%の配列同一性を有する軽鎖；および

o) 配列番号88において表わされ、およびそれに対して少なくとも85%の配列同一性を有する重鎖、および配列番号89において表わされ、またはそれに対して少なくとも85%の配列同一性を有する軽鎖

からなる群のいずれか一より選ばれる重鎖および軽鎖の組合せを包含する、請求項6に記載の抗GCGRモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 8】

次の：

ac) 配列番号2において表わされる重鎖可変領域のものと同一HCDR1、HCDR2およびHCDR3領域が含まれる重鎖可変領域、および

配列番号3において表わされる軽鎖可変領域のものと同一LCDR1、LCDR2およびLCDR3領域が含まれる軽鎖可変領域；

ad) 配列番号4において表わされる重鎖可変領域のものと同一HCDR1、HCDR2およびHCDR3領域が含まれる重鎖可変領域、および

配列番号5において表わされる軽鎖可変領域のものと同一LCDR1、LCDR2およびLCDR3領域が含まれる軽鎖可変領域；

ae) 配列番号6において表わされる重鎖可変領域のものと同一HCDR1、HCDR2およびHCDR3領域が含まれる重鎖可変領域、および

配列番号7において表わされる軽鎖可変領域のものと同一LCDR1、LCDR2およびLCDR3領域が含まれる軽鎖可変領域；

af) 配列番号8において表わされる重鎖可変領域のものと同一HCDR1、HCDR2およびHCDR3領域が含まれる重鎖可変領域、および

配列番号9において表わされる軽鎖可変領域のものと同一LCDR1、LCDR2およびLCDR3領域が含まれる軽鎖可変領域；

ag) 配列番号10において表わされる重鎖可変領域のものと同一HCDR1、HCDR2およびHCDR3領域が含まれる重鎖可変領域、および

配列番号11において表わされる軽鎖可変領域のものと同一LCDR1、LCDR2およびLCDR3領域が含まれる軽鎖可変領域；および

ah) 配列番号12において表わされる重鎖可変領域のものと同一HCDR1、HCDR2およびHCDR3領域が含まれる重鎖可変領域、および

配列番号13において表わされる軽鎖可変領域のものと同一LCDR1、LCDR2およびLCDR3領域が含まれる軽鎖可変領域

からなる群より選ばれる重鎖可変領域および軽鎖可変領域の組合せを包含する、抗GCGRモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 9】

前記抗原結合断片はFab、Fab'、F(ab')₂、単鎖抗体、二量体化V領域（ダイアボディ）およびジスルフィド結合安定化V領域（dsFv）からなる群より選ばれる、請求項1～8のいずれか一項に記載の抗GCGRモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 10】

GLP-1ペプチドおよび抗GCGR抗体またはその抗原結合断片が含まれ、そこで前記GLP-1ペプチドはペプチド結合またはリンカーを介して前記抗GCGR抗体またはその抗原結合断片に共有結合的に連結する、二特異性タンパク質。

【請求項 11】

前記GLP-1ペプチドのカルボキシル末端は、前記抗GCGRモノクローナル抗体またはその抗原結合断片の重鎖可変領域のアミノ末端にペプチド結合またはリンカーを介して連結され；または

前記GLP-1ペプチドのカルボキシル末端は、前記抗GCGR抗体またはその抗原結合断片の軽鎖可変領域のアミノ末端にペプチド結合またはリンカーを介して連結される、請求項10に記載の二特異性タンパク質。

【請求項 12】

前記抗GCGR抗体またはその抗原結合断片は、請求項1～9のいずれか一項に記載の抗GCGRモノクローナル抗体またはその抗原結合断片である、請求項11に記載の二特異性タンパク質。

【請求項 13】

前記GLP-1ペプチドは、配列番号91において表わされるGLP-1ペプチドまたはその変種であり、

前記GLP-1ペプチド変種は、前記配列番号91において表わされるGLP-1ペプチドに基づくQ17E、I23V、K28RおよびG30Rの一またはそれよりも多くのアミノ酸変異（複数）を包含し、

なるべくなら前記GLP-1ペプチド変種はQ17E変異を包含し、またはQ17EおよびI23V変異を包含する、請求項10～12のいずれか一項に記載の二特異性タンパク質。

【請求項 14】

前記GLP-1ペプチド変種の配列は配列番号92、93、94、95、96、97、98または99において表わされる、請求項13に記載の二特異性タンパク質。

【請求項 15】

請求項14に記載の二特異性タンパク質であって、前記二特異性タンパク質は第一のポリペプチド鎖および第二のポリペプチド鎖を包含し、前記第一のポリペプチド鎖は請求項1～9のいずれか一項に記載の抗GCGRモノクローナル抗体の重鎖を包含し、および前記第二のポリペプチド鎖は請求項1～9のいずれか一項に記載の抗GCGRモノクローナル抗体の軽鎖を包含し、そこで：

（ai）前記第一のポリペプチド鎖は配列番号100、101、102、103、104、105、106、107、および108のいずれか一から選ばれるポリペプチドを包含し、および

前記第二のポリペプチド鎖は配列番号79において表わされるポリペプチドを包含し；

（aj）前記第一のポリペプチド鎖は配列番号109において表わされるポリペプチドを包含し、および

前記第二のポリペプチド鎖は配列番号81において表わされるポリペプチドを包含し；

（ak）前記第一のポリペプチド鎖は配列番号110において表わされるポリペプチドを包含し、および前記第二のポリペプチド鎖は配列番号83において表わされるポリペプチドを包含し；

（a1）前記第一のポリペプチド鎖は配列番号111において表わされるポリペプチドを包含し、および前記第二のポリペプチド鎖は配列番号85において表わされるポリペプチドを包含し；

（am）前記第一のポリペプチド鎖は配列番号112において表わされるポリペプチドを包含し、および前記第二のポリペプチド鎖は配列番号87において表わされるポリペプチド

10

20

30

40

50

を包含し；または

(an) 前記第一のポリペプチド鎖は配列番号113において表わされるポリペプチドを包含し、および前記第二のポリペプチド鎖は配列番号89において表わされるポリペプチドを包含する、二特異性タンパク質。

【請求項16】

配列番号91において表わされるGLP-1ペプチドに基づくQ17E、I23V、K28RおよびG30Rの一またはそれよりも多くのアミノ酸変異（複数）を包含するGLP-1ペプチド変種であり、なるべくならQ17E変異を包含し、またはQ17EおよびI23V変異を包含する、GLP-1ペプチド変種。

【請求項17】

前記GLP-1ペプチド変種の配列は配列番号92、93、94、95、96、97、98または99において表わされる、請求項16に記載のGLP-1ペプチド変種。

【請求項18】

次の：

請求項1～9のいずれか一項に記載の抗GCGRモノクローナル抗体またはその抗原結合断片、または請求項10～15のいずれか一項に記載の二特異性タンパク質、または請求項16または17に記載のGLP-1ペプチド変種の治療上有効な量、および一またはそれよりも多くの薬学的に許容可能な担体、希釈剤、緩衝剤または賦形剤を含む、薬学的組成物。

【請求項19】

請求項1～9のいずれか一項に記載の抗GCGRモノクローナル抗体またはその抗原結合断片、または請求項10～15のいずれか一項に記載の二特異性タンパク質、または請求項16または17に記載のGLP-1ペプチド変種をコードする、分離した核酸分子。

【請求項20】

請求項19の分離した核酸分子を含む、組換えベクター。

【請求項21】

請求項20に記載の組換えベクターにより形質転換された宿主細胞であって、前記宿主細胞は原核細胞および真核細胞、なるべくなら真核細胞、より一層なるべくなら哺乳動物細胞または昆虫細胞から選ばれる、宿主細胞。

【請求項22】

請求項1～9のいずれか一項に記載の抗GCGRモノクローナル抗体もしくはその抗原結合断片、または請求項10～15のいずれか一項に記載の二特異性タンパク質、または請求項16もしくは17に記載のGLP-1ペプチド変種を用意する方法であって、次の：

請求項1～9のいずれか一項に記載の抗GCGRモノクローナル抗体またはその抗原結合断片、または請求項10～15のいずれか一項に記載の二特異性タンパク質、または請求項16もしくは17に記載のGLP-1ペプチド変種を生じさせるために、請求項21に記載の宿主細胞を培養すること、および

前記モノクローナル抗体またはその抗原結合断片、または前記二特異性タンパク質、または前記GLP-1ペプチド変種を培養物から回収することを含む、方法。

【請求項23】

請求項1～9のいずれか一項に記載の抗GCGRモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を含む、サンプルにおけるヒトGCGRを検出するための試薬。

【請求項24】

対象における血糖濃度を低下させるための方法であって、次の：

治療上有効な量の請求項1～9のいずれか一項に記載の抗GCGRモノクローナル抗体またはその抗原結合断片、または請求項10～15のいずれか一項に記載の二特異性タンパク質、または請求項16もしくは17に記載のGLP-1ペプチド変種、または請求項18に記載の薬学的組成物を前記対象に施与することを含む、

10

20

30

40

50

なるべくなら前記治療上有効な量は単位用量において0.1～3000mgの請求項1～9のいずれか一項に記載の抗GCGRモノクローナル抗体またはその抗原結合断片、または請求項10～15のいずれか一項に記載の二特異性タンパク質、または請求項16もしくは17に記載のGLP-1ペプチド変種である、方法。

【請求項25】

代謝障害の処置のための方法であって、次の：

治療上有効な量の請求項1～9のいずれか一項に記載の抗GCGRモノクローナル抗体またはその抗原結合断片、または請求項10～15のいずれか一項に記載の二特異性タンパク質、または請求項16もしくは17に記載のGLP-1ペプチド変種、または請求項18に記載の薬学的組成物を対象に施与すること
を含み；

なるべくなら前記代謝障害は次の：代謝症候群、肥満、耐糖能異常、糖尿病、糖尿病性ケトアシドーシス、高血糖、高血糖高浸透圧症候群、周術期高血糖、高インスリン、インスリン抵抗性症候群、空腹時血糖異常、脂質異常、アテローム性動脈硬化および前糖尿病状態からなる群より選ばれる、方法。

【発明の詳細な説明】

【優先権主張】

【0001】

この出願は2018年12月21日付け出願の特許出願第201811573634.0号および2018年12月27日付け出願の特許出願第201811606887.3号の優先権を主張し；参照することによって双方をここに組み込む。

本発明の分野

【0002】

本開示は、ヒトGCGR抗体、GLP-1ペプチドおよびそれらの変異体、ならびにGCGR抗体およびGLP-1ペプチドの融合によって形成される二特異性タンパク質、ならびにそれらの調製方法および応用に関する。

本発明の背景

【0003】

ここでの記述は本開示について背景情報を提供するだけであり、および必ずしも先行技術を構成しない。

【0004】

糖尿病（真性糖尿病、DM）はインスリン分泌における欠損および/またはインスリン機能不全による高レベル血糖によって特徴付けられる代謝疾患である。その疾患の発症は主にインスリンおよびグルカゴンの相互関係によって生じる。

【0005】

GLP-1はインスリン分泌に影響を与える最も重要なホルモンの一種であり、および双方のGLP-1およびグルカゴンはプレプロインスリンから導き出される。プレプロインスリンは約158個のアミノ酸から構成され、異なる位置にて種々のペプチド鎖に切断され得る。ヒト体内で生物学的に活性なGLP-1はGLP-1(7-36)アミドおよびGLP-1(7-37)の二つの形態が主に含まれる。GLP-1は小腸のL細胞によって分泌され、およびそれはインスリン分泌を主にグルコース濃度依存的マナーにおいて促進すること、膵島β細胞を保護すること、グルカゴン分泌を抑制することによって有機体において血糖のレベルを下げる。同時に、GLP-1はまた胃内容排出を抑制すること、および食欲を抑制することへの影響を有する。それはII型糖尿病および肥満の処置のために臨床的に有用である。自然な活性GLP-1は非常に短い半減期（2分未満）のため有機体における酵素DPP-IVによって容易に分解され、臨床的価値はもたない。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

GLP-1薬物の研究および開発の主な方向性はいずれにしても半減期を延長させた。目下

10

20

30

40

50

、多くの市場により入手し得るGLP-1アゴニスト、例えば、デュラグルチド（Dulaglutide）およびセマグルチド（Semaglutide）などのようなものがある。GLP-1の有効性は十分に認められているが、それにもかかわらずそれは胃腸症状、低血糖、膵炎、腎障害として主に現れる多くの副作用を有する。

【0007】

グルカゴンはインスリンとは正反対の作用をもち、および主に血糖のレベルを上げることでの役割を演ずる。グルカゴンは膵島α細胞によって分泌される29アミノ酸のペプチドである。グルカゴンは肝細胞膜上の受容体GCGRに結合して後、下流のcAMP/PKA経路を活性化することおよびそれによって血糖値を上昇させることによって主にグリコーゲン分解、脂肪分解および糖新生を促進する。

10

【0008】

調査はGCGRノックアウトマウスが一連の表現型、例えば、増加したGLP-1、減少したグリコーゲン排出、増加した脂質代謝、および減少した食欲などのようなものを見せたことを知見した。GCGRは糖尿病の処置の最もポピュラーな標的の一つであるが、目下、GCGRに対する拮抗性薬物の開発における進展は遅れている。REMD-477、REMD Biot therapeutics（REMDバイオセラピューティクス）から入手可能であるものは、目下、最も最先端のGCGRモノクローナル抗体薬物であり、および臨床フェーズIIにある。

【0009】

GCGR抗体は先行技術、例えば、CN101589062A、CN101983208A、CN102482350A、CN103314011A、CN105189560A、CN107614695A、US20180273629A1およびWO2013059531A1のようなものにおいて開示されている。しかしながら、なおも糖尿病の処置のための新しくおよび高度に有効なGCGR抗体および方法を提供する必要がある。

20

本発明の概略

【0010】

本開示は抗GCGRモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を提供する。抗体またはその抗原結合断片はヒトGCGR（またはそこに含まれる抗原エピトープ）に結合する能力を有する。

【0011】

いくつかの実施態様において、抗GCGRモノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、以下のa)またはb)：

30

a) 配列番号48、49および50においてそれぞれ表わされるHCDR1、HCDR2およびHCDR3領域が含まれる重鎖可変領域、および配列番号51、52および53においてそれぞれ表わされるLCDR1、LCDR2およびLCDR3領域が含まれる軽鎖可変領域；または

b) 配列番号38、39および54においてそれぞれ表わされるHCDR1、HCDR2およびHCDR3領域が含まれる重鎖可変領域、および配列番号55、56および57においてそれぞれ表わされるLCDR1、LCDR2およびLCDR3領域が含まれる軽鎖可変領域

から選ばれる重鎖可変領域および軽鎖可変領域の組合せを包含する。

【0012】

いくつかの実施態様において、抗GCGRモノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、以下のi)～vi)：

40

i) 配列番号14、15および16においてそれぞれ表わされるHCDR1、HCDR2およびHCDR3領域が含まれる重鎖可変領域、および配列番号17、18および19においてそれぞれ表わされるLCDR1、LCDR2およびLCDR3領域が含まれる軽鎖可変領域；

ii) 配列番号20、21および22においてそれぞれ表わされるHCDR1、HCDR2およびHCDR3領域が含まれる重鎖可変領域、および配列番号23、24および25においてそれぞれ表わされるLCDR1、LCDR2およびLCDR3領域が含まれる軽鎖可変領域；

iii) 配列番号26、27および28においてそれぞれ表わされるHCDR1、HCDR2およびHCDR3領域が含まれる重鎖可変領域、および配列番号29、30および31においてそれぞれ表わされるLCDR1、LCDR2およびLCDR3領域が含まれる軽鎖可変領域；

50

iv) 配列番号32、33および34においてそれぞれ表わされるHCDR1、HCDR2およびHCDR3領域が含まれる重鎖可変領域、および配列番号35、36および37においてそれぞれ表わされるLCDR1、LCDR2およびLCDR3領域が含まれる軽鎖可変領域；

v) 配列番号38、39および40においてそれぞれ表わされるHCDR1、HCDR2およびHCDR3領域が含まれる重鎖可変領域、および配列番号41、42および43においてそれぞれ表わされるLCDR1、LCDR2およびLCDR3領域が含まれる軽鎖可変領域；または

vi) 配列番号38、39および44においてそれぞれ表わされるHCDR1、HCDR2およびHCDR3領域が含まれる重鎖可変領域、および配列番号45、46および47においてそれぞれ表わされるLCDR1、LCDR2、およびLCDR3領域が含まれる軽鎖可変領域

のいずれか一から選ばれる重鎖可変領域および軽鎖可変領域の組合せを包含する。

10

【0013】

いくらかの実施態様において、抗GCGRモノクローナル抗体またはその抗原結合断片はネズミ抗体、キメラ抗体もしくはヒト化抗体またはそれらの抗原結合断片である。

【0014】

いくらかの実施態様において、抗GCGRモノクローナル抗体またはその抗原結合断片、ヒト化抗体はヒト抗体から導き出されるフレームワーク領域（複数）またはそのフレームワーク領域変種を包含し、およびフレームワーク領域変種はヒト抗体の軽鎖フレームワーク領域に基づく最大で10の復帰変異を有し、および/またはフレームワーク領域変種はヒト抗体の重鎖フレームワーク領域に基づく最大で10の、最大で9の、最大で8の、最大で7の、最大で6の、最大で5の、最大で4の、最大で3の、最大で2の、最大で1のアミノ酸復帰変異を有する。

20

【0015】

いくらかの実施態様において、フレームワーク領域変種は次の：

aa) 軽鎖可変領域において包含される一またはそれよりも多くの42G、44V、71Yおよび87Fのアミノ酸復帰変異（複数）、および/または重鎖可変領域において包含される一またはそれよりも多くの38K、48I、67A、69F、71A、73P、78Aおよび93Sのアミノ酸復帰変異（複数）；または

ab) 軽鎖可変領域において包含される一またはそれよりも多くの38L、44V、59S、70Eおよび71Yのアミノ酸復帰変異、および/または重鎖可変領域において包含される38K、48I、66K、67A、69L、73R、78Mおよび94Sの一またはそれよりも多くのアミノ酸復帰変異を包含する。さらに、復帰変異部位の位置はKabatナンバリング規準に従い定められる。

30

【0016】

いくらかの実施態様において、抗GCGRモノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、配列番号2、61、62、63および64のいずれか一において表わされ、または配列番号2、61、62、63および64のいずれか一と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有する重鎖可変領域；および/または

配列番号3、58、59および60のいずれか一において表わされ、または配列番号3、58、59および60のいずれか一と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を包含する。

40

【0017】

いくらかの実施態様において、抗GCGRモノクローナル抗体またはその抗原結合断片は配列番号63において表わされる重鎖可変領域および配列番号58において表わされる軽鎖可変領域を包含する。

【0018】

いくらかの実施態様において、抗GCGRモノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、配列番号4において表わされ、または配列番号4と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有する重鎖可変領域；および/または

50

配列番号5において表わされ、または配列番号5と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を包含する。

【0019】

いくつかの実施態様において、抗GCGRモノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、配列番号6において表わされ、または配列番号6と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有する重鎖可変領域；および/または

配列番号7において表わされ、または配列番号7と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を包含する。

10

【0020】

いくつかの実施態様において、抗GCGRモノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、配列番号8、68、69、70および71のいずれかーにおいて表わされ、または配列番号8、68、69、70および71のいずれかーと少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有する重鎖可変領域；および/または

配列番号9、65、66および67において表わされ、または配列番号9、65、66および67と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を包含する。

20

【0021】

いくつかの実施態様において、抗GCGRモノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、配列番号71において表わされる重鎖可変領域および

配列番号67において表わされる軽鎖可変領域を包含する。

【0022】

いくつかの実施態様において、抗GCGRモノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、配列番号10において表わされ、または配列番号10と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有する重鎖可変領域；および/または

配列番号11において表わされ、または配列番号11と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を包含する。

30

【0023】

いくつかの実施態様において、抗GCGRモノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、配列番号12において表わされ、または配列番号12と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有する重鎖可変領域；および/または

配列番号13において表わされ、または配列番号13と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を包含する。

40

【0024】

抗GCGRモノクローナル抗体またはその抗原結合断片のいくつかの実施態様において、抗体は全長抗体であり、抗体定常領域（複数）がさらに含まれ、特に、抗体定常領域群の重鎖定常領域はヒトIgG1、IgG2、IgG3およびIgG4定常領域およびそれらの慣習的な変種から選ばれ、および抗体定常領域群の軽鎖定常領域はヒト抗体κおよびλ鎖定常領域およびその慣習的な変種から選ばれ、およびより一層なるべくな配列番号72において表わされるヒト抗体重鎖定常領域および配列番号73において表わされるヒト軽鎖定常領域が含まれる。

【0025】

いくつかの実施態様において、抗GCGRモノクローナル抗体またはその抗原結合断片は重

50

鎖および軽鎖を含み、そこで：

重鎖は配列番号74、76または78において表わされ、またはそれらに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有し、および軽鎖は配列番号75において表わされ、またはそれらに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有する。

【0026】

いくらかの実施態様において、抗GCGRモノクローナル抗体またはその抗原結合断片は重鎖および軽鎖を含み、そこで：

重鎖は配列番号74、76または78において表わされ、またはそれらに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有し、および軽鎖は配列番号77において表わされ、またはそれに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有する。

【0027】

いくらかの実施態様において、抗GCGRモノクローナル抗体またはその抗原結合断片は重鎖および軽鎖を含み、そこで：

重鎖は配列番号74、76または78において表わされ、またはそれらに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有し、および軽鎖は配列番号79において表わされ、またはそれに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有する。

【0028】

いくらかの実施態様において、抗GCGRモノクローナル抗体またはその抗原結合断片は重鎖および軽鎖を含み、そこで：

重鎖は配列番号80において表わされ、またはそれに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有し、および軽鎖は配列番号81において表わされ、またはそれに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有する。

【0029】

いくらかの実施態様において、抗GCGRモノクローナル抗体またはその抗原結合断片は重鎖および軽鎖を含み、そこで：

重鎖は配列番号82において表わされ、またはそれに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有し、および軽鎖は配列番号83において表わされ、またはそれに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有する。

【0030】

いくらかの実施態様において、抗GCGRモノクローナル抗体またはその抗原結合断片は重鎖および軽鎖を含み、そこで：

重鎖は配列番号84において表わされ、またはそれに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有し、および軽鎖は配列番号85において表わされ、またはそれに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有する。

【0031】

いくらかの実施態様において、抗GCGRモノクローナル抗体またはその抗原結合断片は重鎖および軽鎖を含み、そこで：

重鎖は配列番号86において表わされ、またはそれに対して少なくとも85%、86%、87

10

20

30

40

50

%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有し、および軽鎖は配列番号87において表わされ、またはそれに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有する。

【0032】

いくつかの実施態様において、抗GCGRモノクローナル抗体またはその抗原結合断片は重鎖および軽鎖を含み、そこで：

重鎖は配列番号88において表わされ、およびそれに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有し、および軽鎖は配列番号89において表わされ、またはそれに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有する。

10

【0033】

いくつかの実施態様において、抗GCGRモノクローナル抗体またはその抗原結合断片は配列番号78において表わされる重鎖および配列番号79において表わされる軽鎖を含む。

【0034】

いくつかの実施態様において、抗GCGRモノクローナル抗体またはその抗原結合断片は配列番号84において表わされる重鎖および配列番号85において表わされる軽鎖を含む。

【0035】

いくつかの実施態様において、抗GCGRモノクローナル抗体またはその抗原結合断片は以下のac)～ah)：

20

ac) 配列番号2において表わされる重鎖可変領域のものと同一HCDR1、HCDR2およびHCDR3領域が含まれる重鎖可変領域、および配列番号3において表わされる軽鎖可変領域のものと同一LCDR1、LCDR2およびLCDR3領域が含まれる軽鎖可変領域；

ad) 配列番号4において表わされる重鎖可変領域のものと同一HCDR1、HCDR2およびHCDR3領域が含まれる重鎖可変領域、および配列番号5において表わされる軽鎖可変領域のものと同一LCDR1、LCDR2およびLCDR3領域が含まれる軽鎖可変領域；

ae) 配列番号6において表わされる重鎖可変領域のものと同一HCDR1、HCDR2およびHCDR3領域が含まれる重鎖可変領域、および配列番号7において表わされる軽鎖可変領域のものと同一LCDR1、LCDR2およびLCDR3領域が含まれる軽鎖可変領域；

30

af) 配列番号8において表わされる重鎖可変領域のものと同一HCDR1、HCDR2およびHCDR3領域が含まれる重鎖可変領域、および配列番号9において表わされる軽鎖可変領域のものと同一LCDR1、LCDR2およびLCDR3領域が含まれる軽鎖可変領域；

ag) 配列番号10において表わされる重鎖可変領域のものと同一HCDR1、HCDR2およびHCDR3領域が含まれる重鎖可変領域、および配列番号11において表わされる軽鎖可変領域のものと同一LCDR1、LCDR2およびLCDR3領域が含まれる軽鎖可変領域；または

ah) 配列番号12において表わされる重鎖可変領域のものと同一HCDR1、HCDR2およびHCDR3領域が含まれる重鎖可変領域、および配列番号13において表わされる軽鎖可変領域のものと同一LCDR1、LCDR2およびLCDR3領域が含まれる軽鎖可変領域

のいずれか一から選ばれる重鎖可変領域および軽鎖可変領域の組合せを包含する。

40

【0036】

抗GCGRモノクローナル抗体またはその抗原結合断片のいくつかの実施態様において、そこで抗原結合断片はFab、Fab'、F(ab')₂、単鎖抗体、二量体化V領域（ダイアボディ）およびジスルフィド結合安定化（disulfide-stabilized）V領域（dsFv）からなる群より選ばれる。

【0037】

いくつかの実施態様において、抗GCGRモノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、それがヒトGCGR（またはそのエピトープ）に結合するための上述のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片と競合することにおいて特徴付けられる。

【0038】

50

いくつかの実施態様において、抗GCGRモノクローナル抗体またはその抗原結合断片は少なくとも一の以下の特長を有する：

- i. 500nM未満、450nM未満、400nM未満、350nM未満、または300nM未満（なるべくなら300nM未満）のIC50値にてヒトグルカゴンに結合するためにヒトGCGRをブロックする拮抗活性；
- ii. カニクイザルまたはアカゲザルのグルカゴンに結合するためにカニクイザルまたはアカゲザルのGCGRをブロックする拮抗活性；
- iii. ヒトの血糖濃度の上昇の抑制；および
- iv. マウスグルカゴンに結合するためにマウスGCGRをブロックする拮抗活性。

【0039】

抗GCGRモノクローナル抗体またはその抗原結合断片のいくつかの実施態様において、ここではモノクローナル抗体またはその抗原結合断片は上述のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片のものと同一抗原エпитープに結合する。

【0040】

別の態様において、本開示は二特異性タンパク質を提供する。いくつかの実施態様において、ここで提供する二特異性タンパク質はGLP-1ペプチドおよびGCGR抗体を包含し、およびGLP-1ペプチドはペプチド結合またはリンカーを介してGCGR抗体のポリペプチドに共有結合的に連結する。

【0041】

二特異性タンパク質のいくつかの実施態様において、そこでGLP-1ペプチドのカルボキシル末端はGCGR抗体の重鎖可変領域のアミノ末端にペプチド結合またはリンカーを介して連結され、またはGLP-1ペプチドのカルボキシル末端はGCGR抗体の軽鎖可変領域のアミノ末端にペプチド結合またはリンカーを介して連結される。

【0042】

二特異性タンパク質のいくつかの実施態様において、GLP-1ペプチドのカルボキシル末端はGCGR抗体の重鎖可変領域のアミノ末端にペプチド結合またはリンカーを介して連結される。

【0043】

二特異性タンパク質のいくつかの実施態様において、GLP-1ペプチドのカルボキシル末端はGCGR抗体の軽鎖可変領域のアミノ末端にペプチド結合またはリンカーを介して連結される。

【0044】

二特異性タンパク質のいくつかの実施態様において、GLP-1ペプチドのカルボキシル末端は全長GCGR抗体の重鎖可変領域のアミノ末端にペプチド結合またはリンカーを介して連結される。

【0045】

二特異性タンパク質のいくつかの実施態様において、GLP-1ペプチドのカルボキシル末端は全長GCGR抗体の軽鎖可変領域のアミノ末端にペプチド結合またはリンカーを介して連結される。

【0046】

二特異性タンパク質のいくつかの実施態様において、GCGR抗体は上述の抗GCGRモノクローナル抗体またはその抗原結合断片から選ばれる。

【0047】

二特異性タンパク質のいくつかの実施態様において、GLP-1ペプチドは配列番号91において表わされるGLP-1Aであり、またはGLP-1ペプチドはGLP-1Aに基づくQ17E、I23V、K28RおよびG30Rの一またはそれよりも多くのアミノ酸置換を有するGLP-1Aペプチド変種である。

【0048】

二特異性タンパク質のいくつかの実施態様において、GLP-1ペプチドは配列番号91において表わされるGLP-1Aであり、またはGLP-1ペプチドはGLP-1Aに基づくQ17Eを有す

10

20

30

40

50

る GLP-1A ペプチド変種である。

【0049】

二特異性タンパク質のいくらかの実施態様において、GLP-1 ペプチドは配列番号91において表わされる GLP-1A であり、または GLP-1 ペプチドは Q17E ならびに GLP-1A に基づく I23V、K28R および G30R の一またはそれよりも多くのアミノ酸置換を有する GLP-1A ペプチド変種である。

【0050】

二特異性タンパク質のいくらかの実施態様において、GLP-1 ペプチドは配列番号91において表わされる GLP-1A であり、または GLP-1 ペプチドは Q17E または GLP-1A に基づく双方の Q17E および I23V を有する GLP-1A ペプチド変種である。

10

【0051】

二特異性タンパク質のいくらかの実施態様において、GLP-1A ペプチド変種は配列番号92、93、94、95、96、97、98 または 99 において表わされる配列を包含し、またはそれらから構成される。

【0052】

二特異性タンパク質のいくらかの実施態様において、GCGR 抗体は上述の抗 GCGR モノクローナル抗体またはそれらの抗原結合断片のいずれかーから選ばれ、および GLP-1A ペプチドまたは GLP-1A ペプチド変種は上記のようなもののいずれかーである。

【0053】

いくらかの実施態様において、二特異性タンパク質は第一のポリペプチド鎖および第二のポリペプチド鎖を包含し、そこで第一のポリペプチド鎖は配列番号100、101、102、103、104、105、106、107 および 108 からなる群より選ばれるポリペプチドであり、および第二のポリペプチド鎖は配列番号79において表わされるポリペプチドである。

20

【0054】

いくらかの実施態様において、二特異性タンパク質は GCGR 抗体重鎖が含まれる第一のポリペプチド鎖および GCGR 抗体軽鎖が含まれる第二のポリペプチド鎖を包含し、そこで：第一のポリペプチド鎖は配列番号109において表わされるポリペプチドであり、および第二のポリペプチド鎖は配列番号81において表わされるポリペプチドであり；

【0055】

いくらかの実施態様において、二特異性タンパク質は GCGR 抗体重鎖が含まれる第一のポリペプチド鎖および GCGR 抗体軽鎖が含まれる第二のポリペプチド鎖を包含し、そこで：第一のポリペプチド鎖は配列番号110において表わされるポリペプチドであり、および第二のポリペプチド鎖は配列番号83において表わされるポリペプチドであり；

30

【0056】

いくらかの実施態様において、二特異性タンパク質は GCGR 抗体重鎖が含まれる第一のポリペプチド鎖および GCGR 抗体軽鎖が含まれる第二のポリペプチド鎖を包含し、そこで：第一のポリペプチド鎖は配列番号111において表わされるポリペプチドであり、および第二のポリペプチド鎖は配列番号85において表わされるポリペプチドであり；

【0057】

いくらかの実施態様において、二特異性タンパク質は GCGR 抗体重鎖が含まれる第一のポリペプチド鎖および GCGR 抗体軽鎖が含まれる第二のポリペプチド鎖を包含し、そこで：第一のポリペプチド鎖は配列番号112において表わされるポリペプチドであり、および第二のポリペプチド鎖は配列番号87において表わされるポリペプチドであり；または

40

【0058】

いくらかの実施態様において、二特異性タンパク質は GCGR 抗体重鎖が含まれる第一のポリペプチド鎖および GCGR 抗体軽鎖が含まれる第二のポリペプチド鎖を包含し、そこで：第一のポリペプチド鎖は配列番号113において表わされるポリペプチドであり、および第二のポリペプチド鎖は配列番号89において表わされるポリペプチドである。

【0059】

別の態様において、本開示はまた GLP-1 ペプチド変種を提供する。いくらかの実施態様

50

において、GLP-1ペプチド変種は配列番号91において表わされるGLP-1ペプチドに基づくQ17E、I23V、K28RおよびG30Rの一またはそれよりも多くのアミノ酸変異（複数）を有する変異体である。

【0060】

いくつかの実施態様において、GLP-1ペプチドは配列番号91において表わされるGLP-1Aであり、またはGLP-1ペプチドはQ17EまたはGLP-1Aに基づく双方のQ17EおよびI23Vを有するGLP-1Aペプチド変種である。

【0061】

いくつかの実施態様において、GLP-1ペプチド変種は配列番号92、93、94、95、96、97、98または99において表わされる配列を有する。

【0062】

本開示はまた薬学的組成物を提供し、それには、上記のような抗GCGRモノクローナル抗体またはその抗原結合断片、または上記のような二特異性タンパク質、または上記のようなGLP-1ペプチド変種の治療上有効な量、および一またはそれよりも多くの薬学的に許容可能な担体、希釈剤、緩衝剤または賦形剤が含まれる。

【0063】

本開示はまた分離した核酸分子を提供し、それは上記のような抗GCGRモノクローナル抗体またはその抗原結合断片、または上記のような二特異性タンパク質、または上記のようなGLP-1ペプチド変種をコードする。

【0064】

本開示は上記のような分離した核酸分子を含む組換えベクターを提供する。

【0065】

本開示は宿主細胞を上記のような組換えベクターにより形質転換したものを提供し、前記宿主細胞は原核細胞および真核細胞、なるべくなら真核細胞、より一層なるべくなら哺乳動物細胞または昆虫細胞から選ばれる。

【0066】

本開示は上記のような抗GCGRモノクローナル抗体もしくはその抗原結合断片、または上記のような二特異性タンパク質、または上記のようなGLP-1ペプチド変種を生産するための方法を提供し、方法には、上記のような抗GCGRモノクローナル抗体またはその抗原結合断片、または上記のような二特異性タンパク質、または上記のようなGLP-1ペプチド変種を生じさせおよび蓄積するために培養媒体において上記のような宿主細胞を培養すること、およびモノクローナル抗体またはその抗原結合断片、または二特異性タンパク質、またはGLP-1ペプチド変種を培養物から回収することが含まれる。

【0067】

本開示はヒトGCGRをインビトロで検出または測定するための方法を提供し、方法には上記のようなモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を用いることが含まれる。

【0068】

ヒトGCGRを検出するためのキットは上記のようなモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を含む。

【0069】

いくつかの実施態様に従い、それはまた医療デバイス（例えば、キット、アレイ、テストペーパー、マルチウェルプレート、磁性ビーズ、被覆粒子などのようなもの）の用意における上記のような抗GCGRモノクローナル抗体またはその抗原結合断片の使用も提供し、医療デバイスには、上記のようなモノクローナル抗体またはその抗原結合断片が含まれる。例として、キットは上記のような抗GCGRモノクローナル抗体またはその抗原結合断片によりコートされたマルチウェルプレートを含む。

【0070】

本開示はヒトGCGRを検出または測定するための試薬の調製における上記のようなモノクローナル抗体またはその抗原結合断片の使用を提供する。

【0071】

10

20

30

40

50

本開示は対象における血糖濃度を低下させるための方法を提供し、方法には、治療上有効な量の上記のような抗GCGRモノクローナル抗体またはその抗原結合断片、または上記のような二特異性タンパク質、または上記のようなGLP-1ペプチド変種、または上記のような薬学的組成物を対象に施与することが含まれる。

【0072】

なるべくなら治療上有効な量は組成物の単位用量において0.1～3000mgの上記のような抗GCGRモノクローナル抗体またはその抗原結合断片、または上記のような二特異性タンパク質、または上記のようなGLP-1ペプチド変種である。

【0073】

本開示は代謝障害の処置のための方法を提供し、方法には、治療上有効な量の上記のような抗GCGRモノクローナル抗体またはその抗原結合断片、または上記のような二特異性タンパク質、または上記のようなGLP-1ペプチド変種、または上記のような薬学的組成物を対象に施与することが含まれ；なるべくなら代謝障害は代謝症候群、肥満、耐糖能異常、糖尿病、糖尿病性ケトアシドーシス、高血糖、高血糖高浸透圧症候群、周術期高血糖、高インスリン、インスリン抵抗性症候群、空腹時血糖異常、脂質異常、アテローム性動脈硬化または前糖尿病状態である。

【0074】

本開示はまた対象での代謝障害の処置のためのまたは血糖濃度を低下させるための薬の調製における上記のような抗GCGRモノクローナル抗体またはその抗原結合断片、または上記のような二特異性タンパク質、または上記のようなGLP-1ペプチド変種、または上記のような薬学的組成物の使用を提供し；

なるべくなら代謝障害は代謝症候群、肥満、耐糖能異常、糖尿病、糖尿病性ケトアシドーシス、高血糖、高血糖高浸透圧症候群、周術期高血糖、高インスリン、インスリン抵抗性症候群、空腹時血糖異常、脂質異常、アテローム性動脈硬化または前糖尿病状態である。

【0075】

本開示はまた、薬としての使用のための、なるべくなら対象での代謝障害の処置のためのまたは血糖濃度を低下させるための薬としての使用のための上記のような抗GCGRモノクローナル抗体またはその抗原結合断片、または上記のような二特異性タンパク質、または上記のようなGLP-1ペプチド変種、または上記のような薬学的組成物を提供する。

【0076】

さらになるべくなら代謝障害は代謝症候群、肥満、耐糖能異常、糖尿病、糖尿病性ケトアシドーシス、高血糖、高血糖高浸透圧症候群、周術期高血糖、高インスリン、インスリン抵抗性症候群、空腹時血糖異常、脂質異常、アテローム性動脈硬化または前糖尿病状態である。

本図面の記載

【図面の簡単な説明】

【0077】

【図1】本開示の二特異性タンパク質（GLP-1/GCGR抗体）の構造の模式図である。

【図2】GCGRに対する二特異性タンパク質およびGCGR抗体の拮抗活性である。

【図3】GLP-1Rについての二特異性タンパク質およびデュラグルチドの活性化活性である。

【図4】ob/obマウスにおけるランダム血糖濃度に対する長期施与の効果であり、ビヒクル（Vehicle）（空ベクター）はリン酸緩衝化含塩物（PBS）と共に注入したコントロールモデルであり、hu1803-9D-3mpk、hu1803-9-2.84mpkおよびデュラグルチド-1.16mpkは物質の同じモル濃度に言及する。

【図5】ob/obマウスにおける空腹時血糖濃度に対する長期施与の影響である。すべての実験グループはマウスにおいて空腹時血糖濃度を著しく減少させることができ、グループの中で、hu1803-9D-3mpkおよびhu1803-9-2.84mpkは血糖濃度を下げるのに最も強力な能力を有し、およびhu1803-9D-3mpkは血糖を下げることににおいてhu1803-

10

20

30

40

50

9-2.84 mpkのものよりも優れた能力を見せる。

【発明を実施するための形態】

【0078】

本発明の詳細な記載

【0079】

用語

【0080】

本開示で使用するアミノ酸の三文字コードおよび一文字コードはJ. biol. chem (ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー) 243, p3558 (1968)に記載されているようなものである。

【0081】

用語「二特異性タンパク質」は二つの標的タンパク質または標的抗原に結合することができるタンパク質分子に言及する。本開示において用いる二特異性タンパク質はGCGRおよびGLP-1R (GLP-1受容体) に結合する能力があるタンパク質に特に言及し、およびGCGR抗体 (またはその抗原結合断片 (「断片」はフラグメントとも言う)) のポリペプチド鎖と融合するGLP-1ペプチドによって形成される。

【0082】

「GLP-1ペプチド」はGLP-1受容体に結合し、および活性化することが可能なペプチドに言及する。先行技術におけるペプチドは特許出願WO2008/071972 (国際公開2008/071972)、WO2008/101017、WO2009/155258、WO2010/096052、WO2010/096142、WO2011/075393、WO2008/152403、WO2010/070251、WO2010/070252、WO2010/070253、WO2010/070255、WO2011/160630、WO2011/006497、WO2011/117415、WO2011/117416、WO2006/134340、WO1997046584 (国際公開1997046584)、WO2007124461、WO2017100107、WO2007039140、CN1935261A (中国公開特許1935261A)、CN1935846A、WO2006036834、WO2005058958、WO2002046227、WO1999043705、WO1999043708、WO1999043341、CN102949730 (中国公開特許102949730)、CN104293834、CN104327187、WO2015067716、WO2015049651、WO2014096145、WO2014096148、WO2014096150、WO2014096149において記載され、それらの内容は参照によってここにすべて組み込まれる。いくつかの特定のGLP-1ペプチドは、GLP-1、GLP-1類似体およびGLP-1受容体ペプチドアゴニストを含め、例えば、リキシセナチド/AVE0010/ZP10/リクスミア (Lyxumia)、エクセナチド/エキセンディン-4/Byetta (バイエッタ)/Bydureon (ビデュレオン)/ITCA650/AC-2993、リラグルチド/Victoza (ビクトーザ)、セマグルチド、タスボグルチド、シンクリア/アルビグルチド (アルビグルチド)、デュラグルチド、rExendin (rエキセンディン)-4、CJC-1134-PC、PB-1023、TTP-054、ラングルナチド/HM-11260C、CM-3、GLP-1エリゲン、ORMD-0901、NN-9924、NN-9926、NN-9927、Nodexen (ノデキセン)、Viador (ビアドール)-GLP-1、CVX-096、Z YOG-1、ZYD-1、GSK-2374697、DA-3091、MAR-701、MAR709、ZP-2929、ZP-3022、TT-401、BHM-034、MOD-6030、CAM-2036、DA-15864、ARI-2651、ARI-2255、エクセナチド-XTENおよびグルカゴン-Xten、上記のGLP-1ペプチドに加えて本開示の配列番号91において表わされるGLP-1Aおよびその変異体 (配列番号92-99も含む)。

【0083】

GPCR、即ち、Gタンパク質共役受容体は細胞膜にて発現する膜貫通タンパク質のタイプである。GPCRは800を超えるメンバーで構成され、および目下、既知の哺乳類ゲノムにおいて最大の膜タンパク質ファミリーである。人体では、GPCRタンパク質は器官および組織、例えば、中枢神経系、免疫系、心臓および血管、ならびに網膜などのようなものにおいて広く分布し、および体の発達および正常な機能において関与する。

【0084】

10

20

30

40

50

GPCRタンパク質の主要本体は細胞膜貫通アルファヘリックス構造の七つのセグメントで構成される。N末端および三つのループは細胞の外側に位置し、およびタンパク質およびその受容体間の相互作用において関与し；C末端および三つのループは細胞内に位置し、それらのC末端および第三のループはGPCRタンパク質および下流のGタンパク質間の相互作用によって媒介される細胞内シグナル伝達の過程において重要な役割を果たす。

【0085】

「GCGR」はグルカゴン受容体であり、およびGPCRファミリーのメンバーである。グルカゴンはGCGRへの結合に際して下流経路を活性化することによってグリコーゲン分解、脂肪分解および/または糖新生を主に加速し、およびそれによって血糖値が上昇される。

【0086】

用語「抗体（Ab）」は特定の抗原（またはエピトープ）（例は、GCGR）に特異的に結合または相互作用する（例は、認識および/またはそれに結合する）少なくとも一の相補的決定領域抗原結合分子（または分子複合体）を含む。

【0087】

用語「抗体」は、四つのポリペプチド鎖、ジスルフィド結合（複数）（(s)、「（複数）」は複数形のこと）によって相互接続された二つの重（H）鎖および二つの軽（L）鎖が含まれる免疫グロブリン分子、およびそれらの多量体（例えば、IgM）が含まれる。各重鎖は重鎖可変領域（以下、HCVRまたはVHと略す）および重鎖定常領域（CH）を含む。この重鎖定常領域には、三つの領域（ドメイン）、CH1、CH2、およびCH3が含まれる。各軽鎖には、軽鎖可変領域（以下ではLCVRまたはVLと略す）および軽鎖定常領域（CL）が含まれる。VHおよびVL領域は相補性決定領域（CDR）と呼ばれる超可変領域にさらに細分化することができ、それらの間にフレームワーク領域と呼ばれる（FR、フレームワークスとも呼ばれる）より一層保存的な領域が散在する。各VHおよびVLは三つのCDRおよび四つのFRで構成され、アミノ末端からカルボキシ末端に向かって、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4の順序で配置される。

【0088】

本開示の様々な実施態様において、抗GCGR抗体（またはその抗原結合断片（断片はフラグメントとも言う））のFRはヒト生殖系列配列のものと同一であることができ、または自然にまたは人工的に修飾することができる。抗体は抗体の異なるサブクラスの抗体、例えば、IgG（例は、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4サブクラス）、IgA1、IgA2、IgD、IgEまたはIgM抗体であることができる。

【0089】

用語「抗体」はまた、全長抗体分子の抗原結合フラグメントをも包含する。

【0090】

ここで使用するように、抗体の「抗原結合部分」、「抗原結合ドメイン」、「抗原結合フラグメント」およびその他同種類のものなどの用語は、複合体を形成するために抗原と特異的に結合する任意の自然に発生し、酵素的に生産され、合成または遺伝子工学的に作り出されたペプチドまたは糖タンパク質を含む。抗体の抗原結合フラグメントは完全抗体分子から、例えば、任意の適切な標準技術、例えば、タンパク質分解消化または抗体の可変領域および（随意に）定常領域をコードするDNAsの操作および発現に関与する組換え遺伝子工学技術などのようなものを使用することによって導き出すことができる。DNAsは既知であり、および/または例えば、市場により入手可能な供給源、DNAデータベース（例えば、ファージ抗体データベースを含む）からわけなく取得することができ、または合成することができる。DNAsは化学的に、または分子バイオテクノロジー、例えば、一またはそれよりも多く（一以上とも言う）の可変および/または定常領域を適切な構成中に配置すること、コドンを導入すること、システイン残基を生成すること、アミノ酸を修飾すること、付加すること、欠失すること、などによって配列決定および操作することができる。

【0091】

抗原結合フラグメントの非制限的な例には、次の：(i) Fabフラグメント；(ii) F(ab'

10

20

30

40

50

)2フラグメント；(iii) Fdフラグメント；(iv) Fvフラグメント；(v) 単鎖 (single-chain) Fv (scFv) 分子；および (vi) dAbフラグメントが含まれる。他の工学的に作り出された分子、例えば、領域特異的抗体、単ドメイン抗体、領域欠失抗体、キメラ抗体、ダイアボディ、トライアボディ、テトラボディ、ミニボディ、ナノボディ（例は、一価ナノボディ、二価ナノボディ、など）、小型モジュラー免疫薬 (Small Modular Immunopharmaceuticals) (SMIP) およびシャーク可変 (Shark Variable) IgNAR領域などのようなものもここで使用されるように「抗原結合フラグメント」という用語に含まれる。

【0092】

抗原結合フラグメントは少なくとも一つの可変領域を典型的に含む。可変領域は任意のサイズまたはアミノ酸組成の領域であることができ、およびフレームワーク配列に隣接またはその内にある一以上のCDRを概して包含するであろう。

【0093】

いくらかの実施態様において、抗体の抗原結合フラグメントは可変領域および定常領域の任意の構成にあることができ、および可変領域および定常領域は互いに直接、または完全もしくは部分的にヒンジまたはリンカー領域を通して結び付けることができる。ヒンジ領域は少なくとも2（例えば、5、10、15、20、40、60またはそれよりも多く）のアミノ酸から構成することができ、それにより単一のポリペプチド分子内の隣接する可変および/または定常領域間の柔軟性なおよびセミフレキシブルな接続が可能になる。

【0094】

ここで用いるように「ネズミ抗体」は当技術における知識および熟練に従って調製されるマウスまたはラット由来のモノクローナル抗体に言及する。調製中に、試験対象は抗原により注入され、および次いで望ましい配列または機能的特徴を保有する抗体を発現するハイブリドーマを分離する。注入された試験対象がマウスであるとき、結果として得られる抗体はマウス由来の抗体であり、および注入された試験対象がラットであるとき、結果として得られる抗体はラット由来の抗体である。

【0095】

「キメラ抗体」は第一の種（例えば、マウスなどのようなもの）の抗体の可変領域（複数）を第二の種（例えば、ヒトなどのようなもの）の抗体の定常領域（複数）に融合することによって形成される抗体である。キメラ抗体を確立するには、ハイブリドーマ細胞から可変領域（複数）の遺伝子をクローン化するために第一の種（例えば、マウスなどのようなもの）のモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを確立し、および次いで必要に応じて第二の種（例えば、ヒトなどのようなもの）の抗体の定常領域遺伝子（複数）をクローン化する必要がある。キメラ遺伝子を形成するために第一の種の可変領域遺伝子（複数）の単数形（複数形）は第二の種の定常領域遺伝子（複数）に結び付けられ、それは次いで発現ベクター中に挿入され、および最終的にキメラ抗体分子は真核生物または原核生物系において発現される。

【0096】

本開示の好適例において、キメラ抗体の抗体軽鎖はヒトカップ、ラムダ鎖またはそれらの変種（バリエーションとも言う）の軽鎖定常領域をさらに含む。キメラ抗体の抗体重鎖はヒトIgG1、IgG2、IgG3、IgG4またはそれらの変種の重鎖定常領域をさらに含み、なるべくならヒトIgG1、IgG2またはIgG4の重鎖定常領域を含み、またはアミノ酸変異（複数）（例えば、YTE変異または復帰変異 (back mutation)、L234Aおよび/またはL235A変異、またはS228P変異）と共にヒトIgG1、IgG2またはIgG4の重鎖定常領域変種を含む。

【0097】

用語「ヒト化抗体」はCDR-グラフト化抗体 (grafted antibody) を含め、動物由来抗体、例は、ネズミ抗体CDR配列のヒト抗体可変領域フレームワーク（即ち、フレームワーク領域）中へのグラフティングによって生成する抗体に言及する。ヒト化抗体は大量の異種タンパク質成分を運ぶキメラ抗体によって誘発される異種応答を避けることができる

10

20

30

40

50

。そのようなフレームワーク配列は生殖細胞系列抗体遺伝子配列または発表された参考文献をカバーする公のDNAデータベースから取得することができる。例えば、ヒトの重鎖および軽鎖可変領域遺伝子の生殖細胞系列DNA配列は、「VBase (Vベース)」ヒト生殖細胞系列配列データベース (<http://www.vbase2.org/>で入手可能)、ならびに Kabat, E.A.ら、1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. (免疫学的に関心があるタンパク質の配列、第5版) において見出すことができる。

【0098】

低下した免疫原性によって引き起こされる活性の低下を避けるように、ヒト抗体可変領域におけるフレームワーク配列は活性を維持するために最小限の逆変異 (reverse mutations) または復帰変異 (back mutations) を受けさせることができる。本開示のヒト化抗体はまた、ファージディスプレイによってCDR親和性成熟 (affinity maturation) が実行されるヒト化抗体を包含する。

【0099】

抗原と接触した残基のために、CDRのグラフティングは抗原と接触したフレームワーク残基による抗体またはその抗原結合フラグメントの抗原に対する親和性の低下をもたらすことができる。そのような相互作用は体細胞変異から高度にもたらされることができる。したがって、ドナーフレームワークアミノ酸をヒト化抗体フレームワークにグラフトする必要がさらにあり得る。抗原結合に関与し、および非ヒト抗体またはその抗原結合フラグメントに由来するアミノ酸残基は、動物モノクローナル抗体可変領域の配列および構造をチェックすることによって識別することができる。生殖系統とは異なるドナーCDRフレームワークアミノ酸残基は関連すると考えることができる。最も密接に関連する生殖系列を定めることが可能でない場合、配列はサブタイプによって共有される共通の配列または高い類似性割合を有する動物抗体配列と比較することができる。まれなフレームワーク残基は体細胞における高い変異の結果であると考えられ、および結合において重要な役割を演ずる。

【0100】

本開示の一実施態様において、抗体またはその抗原結合フラグメントはヒトまたはネズミのκ、λ鎖またはその変種の軽鎖定常領域をさらに包含し得、またはヒトまたはネズミのIgG1、IgG2、IgG3、IgG4またはそれらの変種の重鎖定常領域をさらに包含し得る。

【0101】

ヒト抗体重鎖定常領域およびヒト抗体軽鎖定常領域の「慣習的な変種」は、抗体可変領域の構造および機能を変化させない先行技術において開示されたヒト重鎖または軽鎖定常領域の変種に言及する。模範的な変種には、部位特異的修飾および重鎖定常領域上のアミノ酸置換によるIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4重鎖定常領域変種が含まれる。特定の置換は、例えば、YTE変異、L234Aおよび/またはL235A変異、S228P変異、またはノブ・イントゥー・ホール (knob-into-hole) 構造をもたらす変異 (抗体重鎖を作成することはノブ-Fcおよびホール-Fcの組合せを形成する)、などである。これらの変異は抗体の可変領域の機能を変えず、抗体に新しい特性を与えることが証明された。

【0102】

「ヒト抗体」および「ヒトから導かれる抗体」は交換可能に使用することができ、およびヒト由来抗体または抗原刺激に応答して特定のヒト抗体を生産するように当技術において既知の任意の方法によって「工学的に作り出され」および生産されたトランスジェニック (形質転換とも言う) 有機体から得られる抗体であることができる。いくつかの技術では、ヒトの重鎖および軽鎖遺伝子座の要素が胚性幹細胞系に由来する有機体細胞株に導入され、そこで内因性の重鎖および軽鎖遺伝子座が破壊のために標的とされる。トランスジェニック有機体はヒト抗原について特異的なヒト抗体を合成することができ、および有機体はヒト抗体を分泌するハイブリドーマを生産するために使用することができる。ヒト抗体はまた、重鎖および軽鎖が一以上のヒトDNA供給源に由来するヌクレオチド配列によってコードされるそのような抗体であることができる。完全ヒト抗体はまた、遺伝子または染色体トランスフェクション法およびファージディスプレイ技術によって構築され、また

10

20

30

40

50

はインビトロで活性化されるB細胞から構築されることができ、それらはすべて当技術において既知である。

【0103】

「モノクローナル抗体」は実質均質な抗体の集団から得られる抗体を指し、すなわち、可能な変種抗体（例えば、自然に発生する変異またはモノクローナル抗体調製物の製造中に生産される変異を有する変種であり、および変異は通常最小量で存在する）を除き、集団を構成する個々の抗体は、同一であり、および/または同じエピトープに結合する。異なる決定基（エピトープ）に対して向けられた異なる抗体を通常含むポリクローナル抗体調製物とは似ないで、モノクローナル抗体調製物（調剤物）の各モノクローナル抗体は抗原上の単一の決定基に対して向けられる。したがって、修飾語「モノクローナル」は実質均質な抗体集団から得られる抗体の特徴を指し示し、および抗体を製造するために任意の特定の方法を必要とすると解釈されるべきではない。例えば、本開示に従って使用されるモノクローナル抗体は、様々な技術、制限されないが、ハイブリドーマ法、組換えDNA法、ファージディスプレイ法、およびヒト免疫グロブリン遺伝子座のすべてまたは一部分を有するトランスジェニック動物を使用することによる方法を含めたものによって調製することができる。そのような方法、およびモノクローナル抗体を調製するための他の模範的な方法をここに記載する。「モノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメント」という用語において含まれるモノクローナル抗体は全長抗体に言及する。

10

【0104】

用語「全長抗体」、「全抗体」、「全体抗体」および「完全抗体」は、ここでは交換可能に使用され、および以下に規定する抗原結合フラグメントとは区別されるように、実質完全な形態における抗体に言及する。用語は重鎖がアミノ末端からカルボキシ末端まで順番にVH領域、CH1領域、ヒンジ領域およびFc領域を含み、および軽鎖がアミノ末端からカルボキシ末端まで順にVL領域およびCL領域を含む抗体に具体的に言及する。

20

【0105】

加えて、FvフラグメントのVLDメインおよびVHDメインは二つの別々の遺伝子によってコードされ、しかしながらそれらは、単一のタンパク質鎖を生成するために、組換え法を使用することによる合成リンカーによって連結することができ、そこで一価分子はVLおよびVHDメインをペアリングすることによって形成される（単鎖Fv（scFv）と称され；例は、Bird（バード）ら（1988）：423-426；Science（サイエンス）242およびHuston（ヒューストン）ら（1988）Proc. Natl. Acad. Sci. USA（プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシーズ・オブ・ザ・ユナイテッド・ステーツ・オブ・アメリカ）85：5879-5883参照）。そのような単鎖抗体はまた、抗体の「抗原結合フラグメント」という用語に含まれることを意図される。そのような抗体は当分野において既知の慣習的技術を使用して得られ、および無傷な抗体についてのもと同じ方法を使用することによって機能的フラグメントについてスクリーニングされる。抗原結合部分は組換えDNA技術によって、または無傷の免疫グロブリンの酵素的または化学的分裂によって生成することができる。

30

【0106】

抗原結合フラグメントはまた、一対のタンデムFvフラグメント（VH-CH1-VH-CH1）が含まれる単鎖分子中に組み込むこともでき、および一対のタンデムFvフラグメントは相補的な軽鎖ポリペプチドと一緒に一対の抗原結合領域を形成する（Zapata（サパタ）ら、1995 Protein Eng.（プロテイン・エンジニアリング）8（10）：1057-1062；および米国特許第5641870号）。

40

【0107】

FabはIgG抗体分子をパpain（それはH鎖の位置224のアミノ酸残基を切断する）で処理することによって得られる抗体フラグメントであり、および約50,000Daの分子量を有し、および抗原結合活性を有し、そこでH鎖のN末端側のおよそ半分および全体のL鎖がジスルフィド結合を通して一緒に結合される。

【0108】

50

F(ab')₂は約100,000Daの分子量を有する抗体フラグメントであり、および抗原結合活性を持ち、および二つのFab領域を含み、それらはヒンジ位置にて結合し、それはIgGのヒンジ領域において二つのジスルフィド結合の下流の部分をペプシンにより消化することによって生産することができる。

【0109】

Fab'は約50,000Daの分子量を有する抗体フラグメントであり、および抗原結合活性を有し、それは上述のF(ab')₂のヒンジ領域にてジスルフィド結合を開裂することによって得られる。Fab'は抗原を特異的に認識し、およびそれに結合するF(ab')₂を還元剤、例えば、ジチオスレイトールなどのようなもので処理することによって生産することができる。

10

【0110】

さらに、抗体のFab'フラグメントをコードするDNAを原核生物発現ベクターまたは真核生物発現ベクターに挿入すること、およびFab'を発現させるためにベクターを原核生物または真核生物に導入することによって、Fab'を生産することができる。

【0111】

用語「単鎖抗体」、「単鎖Fv」または「scFv」は抗体軽鎖可変ドメイン（または領域；VL）にリンカーによって結び付けられた抗体重鎖可変ドメイン（または領域；VH）を含む分子に言及する。そのようなscFv分子はNH₂-VL-リンカー-VH-COOHまたはNH₂-VH-リンカー-VL-COOHの通常の構造を有する。先行技術における適切なリンカーは繰返しGGGGsアミノ酸配列またはその変種、例えば、1-4（1、2、3または4を含む）繰返しを有する変種からなる（Holliger（ホリガー）ら（1993）、Proc Natl Acad Sci USA, 90:6444-6448）。本開示において使用することができる他のリンカーはAlft han（アルフザン）ら、（1995）、Protein Eng. 8:725-731、Choi（チョウイ）ら、（2001）、Eur J Immuno.（ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・イムノロジー）31:94-106、Hu（フー）ら、（1996）、Cancer Res.（キャンサー・リサーチ）56:3055-3061、Kipriyanov（キプリアノフ）ら、（1999）、J Mol Biol.（ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー）293:41-56およびRoovers（ルーバーズ）ら、（2001）、Cancer Immunol Immunother.（キャンサー・イムノロジー・イムノセラピー）50:51-59によって記載される。

20

【0112】

「リンカー」はタンパク質ドメインを結び付けるために使用されるコネクティングペプチド（結合ペプチドとも言う）配列に言及し、通常は一定の程度の柔軟性を伴い、およびリンカーの使用はタンパク質ドメインがその元の機能を失われるようにさせない。

30

【0113】

ダイアボディ（diabody、二重特異性抗体などとも言う）はscFvが二量体化する（dimerized）抗体フラグメントであり、およびそれは二価の抗原結合活性をもつ抗体フラグメントである。二価抗原結合活性において、二つの抗原は同じまたは異なることができる。

【0114】

dsFvは各々のVHおよびVLにおける一のアミノ酸残基をシステイン残基で置き換えること、および次いで二つのシステイン残基間でジスルフィド結合を介して置換したポリペプチドを結び付けることによって得られる。システイン残基により置換されるアミノ酸残基は、既知の方法（Protein Engineering, 7:697（1994））に従って抗体の三次元構造予測に基づいて選ぶことができる。

40

【0115】

本開示のいくつかの実施態様において、抗原結合フラグメントは次のステップによって生産することができる：抗原および必要に応じて、他のドメインをコードするcDNAsを特異的に認識し、および結合する本開示のモノクローナル抗体のVHおよび/またはVLをコードするcDNAsを取得すること；抗原結合フラグメントをコードするDNAを構築すること；DNAを原核生物または真核生物発現ベクター中に挿入すること、および次いで、抗

50

原結合フラグメントを発現させるために発現ベクターを原核生物または真核生物中に導入することである。

【0116】

「Fc領域」は自然に発生する配列または変異Fc領域であることができる。免疫グロブリン重鎖のFc領域の境界は変動する可能性があり、しかしながら、ヒトIgG重鎖のFc領域は通常、位置Cys226でのアミノ酸残基から、またはPro230からそのカルボキシル末端まで伸びると規定される。Fc領域における残基の番号付けはKabatでのEUインデックスナンバリングに従う。Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、5th edition、Public Health Service（公衆衛生局）、National Institutes of Health（国立衛生研究所）、Bethesda（ベセズダ）、Md.（メリーランド州、米国）、1991。免疫グロブリンのFc領域は通常、二つの定常ドメイン、CH2およびCH3を有する。

10

【0117】

「ノブ（Knob）-Fc」は抗体のFc領域において点変異T366Wを組み込むことによって形成されるノブ様の空間構造に言及する。対応して、「ホール（hole）-Fc」は抗体のFc領域において点変異T366S、L368A、およびY407Vを組み込むことによって形成されるホール様の空間構造に言及する。ノブ-Fcおよびホール-Fcは立体障害のためにヘテロダイマーを形成することがより一層起こりそうである。ヘテロダイマーの形成をさらに促進するために、点変異S354CおよびY349Cはジスルフィド結合を介したヘテロダイマーの形成をさらに促進するようにノブ-Fcおよびホール-Fc中にそれぞれ導入することができる。その一方では、抗体Fcによって引き起こされるADCC効果を排除または軽減するために、234Aおよび235Aの置換変異はまたFc中に導入することもできる。二特異性抗体では、ノブ-Fcまたはホール-Fcを第一のポリペプチド鎖のFc領域または第二のポリペプチド鎖のFc領域のいずれとしても使用することができる。単一の二特異性抗体について、第一および第二のポリペプチド鎖のFc領域は共にノブ-Fcまたはホール-Fcであることができない。

20

【0118】

用語「アミノ酸の違い」または「アミノ酸変異」は元のタンパク質またはポリペプチドと比較してタンパク質またはポリペプチド変種におけるアミノ酸の変化または変異に言及し、元のタンパク質またはポリペプチドに基づく一以上のアミノ酸の挿入、欠失または置換が含まれる。

30

【0119】

抗体の「可変領域」は抗体軽鎖の可変領域（VL）または抗体重鎖の可変領域（VH）を単独でまたは組合せにおいて言及する。当分野において既知であるように、各々の重鎖および軽鎖の可変領域は四つのフレームワーク領域（FR）に接続された三つの相補性決定領域（CDR）（超可変領域とも呼ばれる）から構成される。各鎖におけるCDRはFRによってしっかりと一緒に保持され、および他の鎖からのCDRと一緒に抗体の抗原結合部位の形成に寄与する。CDRを決定するための少なくとも二つの技術がある：（1）異種間配列変動に基づく方法（即ち、KabatらのSequences of Proteins of Immunological Interest、（5th edition、1991、National Institutes of Health、Bethesda MD））；および（2）抗原-抗体複合体の結晶学的調査に基づく方法（Al-Lazikani（Al-ラジカニ）ら、J. Molec. Biol.（ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー）273：927-948（1997））。ここで使用するように、CDRは二つの方法のいずれかでもまたはそれらの組合せによって決定されるものに言及し得る。

40

【0120】

用語「抗体フレームワーク」または「FR領域」は可変ドメイン一部分、VLまたはVHのいずれにも言及し、それはこの可変ドメインの抗原結合ループ（CDR）の足場として役立つ。本質的に、それはCDRを伴わない可変ドメインである。

【0121】

用語「相補性決定領域」および「CDR」は抗原結合性に主に寄与する抗体の可変ドメイ

50

ンにおいて存在する六つの超可変領域のうちの一つに言及する。大抵、各重鎖可変領域において三つのCDR (HCDR1、HCDR2、HCDR3)、および各軽鎖可変領域において三つのCDR (LCDR1、LCDR2、LCDR3) がある。CDRのアミノ酸配列境界は、任意の様々なよく知られたスキーム「Kabat」ナンバリング規準 (Kabatら (1991)、「Sequences of Proteins of Immunological Interest」、5th edition、Public Health Service、National Institutes of Health、Bethesda、MD参照)、「Chothia (チョーシア)」ナンバリング規準 (Al-Lazikaniら、(1997) JMB 273: 927-948) およびImmunoGenTics (IMGT) ナンバリング規準 (Lefranc (ルフラン) MP、Immunologist (イミュノロジスト)、7、132-136 (1999) ; Lefranc, MPら、Dev. Comp. Immunol. (ディベロップメンタル・アンド・コンパラティブ・イムノロジー)、27、55-77 (2003))、およびその他同種類のものなどを含めるものによって定めることができる。例えば、古典的な形式について、Kabat規準に従って、重鎖可変ドメイン (VH) におけるCDRアミノ酸残基は31-35 (HCDR1)、50-65 (HCDR2) および95-102 (HCDR3) として番号付けられ; および軽鎖可変ドメイン (VL) におけるCDRアミノ酸残基は24-34 (LCDR1)、50-56 (LCDR2)、および89-97 (LCDR3) として番号付けられる。Chothia規準に従い、VHにおけるCDRアミノ酸残基は26-32 (HCDR1)、52-56 (HCDR2) および95-102 (HCDR3) として番号付けられ; およびVLにおけるアミノ酸残基は26-32 (LCDR1)、50-52 (LCDR2) および91-96 (LCDR3) として番号付けられる。KabatおよびChothiaの双方をCDRを定義するために組み合わせることによって、CDRはヒトVHにおいてアミノ酸残基26-35 (HCDR1)、50-65 (HCDR2) および95-102 (HCDR3)、ならびにヒトVLにおいてアミノ酸残基24-34 (LCDR1)、50-56 (LCDR2) および89-97 (LCDR3) から構成される。IMGT規準に従い、VHにおけるCDRアミノ酸残基は26-35 (CDR1)、51-57 (CDR2) および93-102 (CDR3) としておおよそ番号付けられ、およびVLにおけるCDRアミノ酸残基は27-32 (CDR1)、50-52 (CDR2) および89-97 (CDR3) としておおよそ番号付けられる。IMGT規準に従い、抗体のCDR領域はIMGT/DomainGap Align Program (IMGT/ドメインギャップ・アライン・プログラム) を使用することによって定めることができる。

10

20

30

40

50

【0122】

「HCDR1、HCDR2およびHCDR3領域またはその任意の変種」における「その任意のCDR変種」はHCDR1、HCDR2、およびHCDR3領域の任意の一、または二、または三つにアミノ酸変異を受けさせることによって得られる変種に言及する。

【0123】

「抗体定常領域ドメイン」は抗体軽鎖および重鎖定常領域から導き出されるドメインに言及し、異なるタイプの抗体から導き出されるCLならびにCH1、CH2、CH3およびCH4ドメインが含まれる。

【0124】

「エピトープ」または「抗原決定基」は免疫グロブリンまたは抗体が特異的に結合する抗原上の部位に言及する。エピトープには通常、少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15の特有の空間コンフォメーションにおける連続的または非連続的 (non-contiguous) アミノ酸が含まれる。例えば、Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology (エピトープ・マッピング・プロトコル・イン・メソツツ・イン・モレキュラー・バイオロジー)、Vol. 66 (66巻)、G.E. Morris (モリス), Ed. (編) (1996) 参照。

【0125】

用語「(複数形) に特異的に結合する」、「(複数形) に選択的に結合する」、「(単数形) に選択的に結合する」または「(単数形) に特異的に結合する」はあらかじめ定める抗原上のエピトープへの抗体の結合に言及する。典型的に、抗体は約 10^{-8} M未満、例えば、約 10^{-9} M、 10^{-10} Mもしくは 10^{-11} M未満またはなおさらそれら未満の親和性 (KD) により結合する。

【0126】

用語「競合」が同じエピトープについて競合する抗原結合タンパク質（例は、中和抗原結合タンパク質または中和抗体）との関連において使用されるとき、それは競合が抗原結合タンパク質間で起こること意味し、それはアッセイによって定められ、そこでは、試験される抗原結合タンパク質（例は、抗体またはその抗原結合フラグメント）は共通抗原に対する参照抗原結合タンパク質（例は、リガンドまたは参照抗体）の特異的結合を防止または抑制する（例は、減少させる）。非常に多くのタイプの競合結合アッセイはある抗原結合タンパク質が別の抗原結合タンパク質と競合するかどうかを定めるのに利用可能である。これらのアッセイは、例えば、固相の直接または間接ラジオイムノアッセイ（RIA）、固相の直接または間接酵素免疫測定法（EIA）、サンドイッチ競合アッセイ（例は、Stahli（シュテリ）ら、1983、Methods in Enzymology（メソツツ・イン・エンザイモロジー）9：242-253を参照）；固相直接ビオチン-アビジンEIA（例は、Kirkland（カークランド）ら、1986、J. Immunol.（ジャーナル・オブ・イムノロジー）137：3614-3619を参照）、固相直接標識アッセイ、固相直接標識サンドイッチアッセイ（例は、Harlow（ハーロー）およびLane（レーン）、1988、Antibodies, A Laboratory Manual（抗体、実験マニュアル）、Cold Spring Harbour Press（コールド・スプリング・ハーバー・プレス）を参照）；I-125ラベルによる固相直接標識RIA（例は、Morel（モレル）ら、1988、Molec. Immunol.（モレキュラー・イムノロジー）25：7-15）；固相直接ビオチン-アビジンEIA（例は、Cheung（チャン）ら、1990、Virology（バイロロジー）176：546-552を参照）；および直接標識RIA（Moldenhauer（モルデンハウアー）ら、1990、Scand. J. Immunol.（スキャンディナヴィアン・ジャーナル・オブ・イムノロジー）32：77-82）である。典型的に、アッセイは非標識試験抗原結合タンパク質および標識参照抗原結合タンパク質の双方に結合する能力がある精製抗原（抗原は固形物表面または細胞表面上に位置される）の使用を伴う。競合的抑制は試験抗原結合タンパク質の存在下で固形物表面にまたは細胞表面に結合した標識の量を測定することによって定める。通常、試験抗原結合タンパク質は過剰に存在する。競合アッセイ（抗原結合タンパク質と競合する）によって識別される抗原結合タンパク質には、次の：参照抗原結合タンパク質のものと同一エピトープに結合する抗原結合タンパク質；および参照抗原結合タンパク質が結合するエピトープに十分に近似したエピトープに結合する抗原結合タンパク質であり、そこでは二つのエピトープは結合を妨げるために互いに立体的に干渉する。競合的結合について定めるための方法に関する追加の詳細はここでの例において提供する。典型的に、競合する抗原結合タンパク質が過剰に存在するとき、それは共通抗原への参照抗原結合タンパク質の特異的結合の少なくとも40-45%、45-50%、50-55%、55-60%、60-65%、65-70%、70%-75%または75%もしくははより一層多くを抑制する（例は、減少させる）。いくつかの場合には、結合は少なくとも80-85%、85-90%、90-95%、95-97%、または97%もしくははより一層多くを抑制する。

【0127】

用語「親和性」は単一のエピトープにて抗体および抗原間の相互作用の強度に言及する。各抗原性部位内で、抗体「アーム」の可変領域は弱い非共有結合力を介して多重のアミノ酸部位にて抗原と相互作用し；相互作用が大きいほど親和性は強い。ここで用いるように、抗体またはその抗原結合フラグメント（例は、Fabフラグメント）の用語「高親和性」は概して、 $1\text{E}-9\text{M}$ またはそれよりも小さい（ $1\text{E}-9\text{M}$ 以下とも言う） K_D （例は、 $1\text{E}-10\text{M}$ 以下の K_D 、または $1\text{E}-11\text{M}$ 以下の K_D 、 $1\text{E}-12\text{M}$ 以下の K_D 、 $1\text{E}-13\text{M}$ 以下の K_D 、 $1\text{E}-14\text{M}$ 以下の K_D 、など）を有する抗体または抗原結合フラグメントに言及する。

【0128】

用語「 K_D 」または「 K_D 」は特定の抗体-抗原相互作用についての解離平衡定数に言及する。典型的に、抗体は約 $1\text{E}-8\text{M}$ 未満、例えば、約 $1\text{E}-9\text{M}$ 、 $1\text{E}-10\text{M}$ 、または $1\text{E}-11\text{M}$ もしくははより一層小さい解離平衡定数（ K_D ）を伴い、表面プラズモン共鳴（SPR）技術BIACORE装置において定められるように抗原に結合する。 K_D 値が小さいほど親和性は

高くなる。

【0129】

用語「核酸分子」はDNA分子およびRNA分子に言及する。核酸分子は一本鎖または二本鎖であることができるが、なるべくなら二本鎖DNAである。核酸が別の核酸配列と機能的な関係に置かれるとき、それは「作動可能に連結される」。例として、プロモーターまたはエンハンサーがコード配列の転写に影響を与える場合、それは配列に作動可能に連結される。

【0130】

「ベクター」という用語は一以上の標的遺伝子または配列をデリバリーすること、およびなるべくなら、それらを宿主細胞において発現することが可能な構築物を意味する。ベクターの例には、制限されないが、ウイルスベクター、ネイキッド（裸の）DNAまたはRNA発現ベクター、プラスミド、コスミドまたはファージベクター、カチオン性凝集剤に関係するDNAまたはRNA発現ベクター、リボソームにおいてカプセル化されたDNAまたはRNA発現ベクター、および一定の真核生物細胞、例えば、プロデューサー細胞などのようなものが含まれる。

【0131】

抗体および抗原結合フラグメントを生産および精製するための方法は本技術においてよく知られ、例えば、A Laboratory Manual for Antibodies、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、New York（ニューヨーク）、第5-8および15章である。例えば、マウスを抗原またはそのフラグメントにより免疫することができ、および結果として得られる抗体を次に復元、精製、およびアミノ酸配列について慣習的な方法を用いて配列決定することができる。抗原結合フラグメントはまた、慣習的な方法によって調製することができる。本開示の抗体または抗原結合フラグメントは非ヒト抗体から導き出されるCDR領域上での一以上のヒトフレームワーク領域を組み込むために工学的に作り出される。ヒトFR生殖細胞系列配列はウェブサイト<http://www.imgt.cines.fr>から、またはThe Immunoglobulin Facts Book（イムノグロブリン・ファクツ・ブック）、2001、ISBN 012441351から、IMGTヒト抗体可変生殖細胞系列遺伝子データベースおよびMOEソフトウェアに対するアライニングによって取得することができる。

【0132】

「宿主細胞」という用語は発現ベクターが導入された細胞に言及する。宿主細胞には、細菌、微生物、植物または動物の細胞が含まれ得る。形質転換に適する細菌には、腸内細菌科、例えば、エシェリキア・コリ（和名、大腸菌などとも言う）またはサルモネラ菌株などのようなもの；バシラス科、例えば、バシラス・サブティリス（和名、枯草菌）などのようなもの；ストレプトコッカス属（和名、肺炎球菌属）およびヘモフィラス属インフルエンザエのメンバー類が含まれる。適切な微生物には、サッカロマイセス・セレビシエおよびピキア・パストリスが含まれる。適切な動物宿主細胞系には、CHO（チャイニーズハムスター卵巣細胞系）、HEK293細胞（非制限的な例、例えば、HEK293E細胞などのようなもの）、およびNS0細胞が含まれる。

【0133】

工学的に作り出される抗体または抗原結合フラグメントは慣習的な方法によって調製および精製することができる。例えば、重鎖および軽鎖をコードするcDNA配列をクローン化し、およびGS発現ベクター中に組み換えることができる。組換え免疫グロブリン発現ベクターはCHO細胞中に安定的にトランスフェクションすることができる。代替の先行技術として、哺乳類の発現システムは特にFc領域の高度に保存されたN末端部位において、抗体のグリコシル化を導くことができる。安定なクローンは抗原に特異的に結合する抗体を発現させることによって取得した。陽性クローンはバイオリアクターにおいて無血清培地において抗体生産のために増やすことができる。抗体が分泌された培地は慣習的な技術によって精製することができる。例えば、精製は修飾した緩衝剤を含むプロテインAまたはプロテインGセファロースFFカラムにて実行することができる。非特異的結合成分を

10

20

30

40

50

洗い流す。結合した抗体をpH勾配によって溶出し、および抗体フラグメントをSDS-PAGEによって検出し、および次いでプールした。抗体は普通の技術を用いてる過および濃縮することができる。可溶性混合物および凝集体を普通の技術、例えば、サイズ排除またはイオン交換などのようなものによって効果的に除去することができる。得られる生産物は-70℃にてなどのようなものですぐに冷凍し、または凍結乾燥する必要がある。

【0134】

「施与」、「施す」、「投薬」および「処置」は、動物、人間、実験対象、細胞、組織、器官、または生物学的流体に対して適用するとき、外因性薬学的薬剤、治療用薬剤、診断用薬剤、組成物または人工的操作（例えば、例において用いるような「安楽死」）が動物、人間、対象、細胞、組織、器官、または生物学的流体に施されることに言及する。「施与」および「処置」は、例は、治療用物質、薬物動態、診断、研究、および実験方法に言及することができる。細胞の処理は、試薬と細胞との接触、ならびに試薬と流体との接触を包含し、そこで流体は細胞と接触している。「施与」および「処置」はまた、インビトロおよびエクスピボでの、例は、試薬、診断、結合化合物による、または別の細胞による細胞の処置を意味する。「処置」は、それがヒト、獣医学の、または研究対象に適用されるとき、治療上処置、予防的または防止手段、研究および診断への応用に言及する。

10

【0135】

「処置する」は治療上薬剤、例えば、本開示の任意の化合物を含む組成物などのようなものをその薬剤が既知の治療上活性を有する一以上の疾患の徴候をもつ対象に内的にまたは外的に施与することを意味する。典型的に、薬剤は疾患の一以上の徴候を軽減するのに有効な量において処置される対象または集団に施与され、そのような徴候（複数）の退行を誘発すること、またはその発症を臨床的に測定可能な程度にまで抑制することによる。任意の特定の疾患の徴候を軽減するのに有効な治療上薬剤の量（「治療上有効な量」とも称させる）は様々な要因、例えば、対象の病状、年齢、および重量、ならびに対象において望ましい反応を引き出す薬物の能力などのようなものに応じて変動し得る。疾患の徴候が軽減されたかどうかは、その徴候の重症度または進行状態を評価するために医師または他の熟練した医療プロバイダーによって典型的に使用される任意の臨床的測定によって評価することができる。本開示の実施態様（例は、処置方法または製造品）はあらゆる対象において標的疾患徴候（複数）を軽減するのに効果的ではないが、それは統計的に有意な数の対象において当技術において既知の任意の統計的検定、例えば、Student's t-test（スチューデントのt-検定）、カイ二乗検定、Mann（マン）およびWhitney（ホイットニー）によるU検定、Kruskal-Wallis（クラスカル-ウォリス）検定（H検定）、Jonckheere-Terpstra-test（ジョンクヒーレ-テルプストラ-検定）およびWilcoxon-test（ウィルコクソン-検定）などのようなものによって定められるように標的疾患徴候（複数）を軽減すべきである。

20

30

【0136】

「アミノ酸保存的修飾」または「アミノ酸保存的置換」はタンパク質またはポリペプチドにおけるアミノ酸を同様の特徴（例えば、電荷、側鎖サイズ、疎水性/親水性、主鎖コンフォメーションおよび剛性、などのようなもの）を有する他のアミノ酸によって、タンパク質またはポリペプチドの生物学的活性または他の必要な特徴（例えば、抗原に対する親和性および/または特異性のようなもの）を変動させることなく変化が頻繁に実行されるように置換することを意味する。本技術において熟練する者（当業者とも言う）は、大抵、ポリペプチドの非必須領域における単一のアミノ酸置換が生物学的活性を実質変動させないことを認識する（例は、Watson（ワトソン）ら、（1987）Molecular Biology of the Gene（遺伝子の分子生物学）、Benjamin/Cummings Pub. Co.（ベンジャミン/カミングス出版社）、p. 224（4th Ed.）（224ページ（第4版））参照）。加えて、構造的または機能的に類似するアミノ酸による置換は生物活性を破壊する可能性は低い。模範的なアミノ酸保存的置換は以下のようである：

40

【表 1】

元の残基	保存的置換	
Ala (A)	Gly; Ser	
Arg (R)	Lys; His	
Asn (N)	Gln; His; Asp	
Asp (D)	Glu; Asn	10
Cys (C)	Ser; Ala; Val	
Gln (Q)	Asn; Glu	
Glu (E)	Asp; Gln	
Gly (G)	Ala	
His (H)	Asn; Gln	
Ile (I)	Leu; Val	
Leu (L)	Ile; Val	20
Lys (K)	Arg; His	
Met (M)	Leu; Ile; Tyr	
Phe (F)	Tyr; Met; Leu	
Pro (P)	Ala	
Ser (S)	Thr	
Thr (T)	Ser	
Trp (W)	Tyr; Phe	30
Tyr (Y)	Trp; Phe	
Val (V)	Ile; Leu。	

【0137】

「有効量」および「有効用量」は任意の一以上の有益または望ましい結果を得るために必要な薬、化合物、または薬学的組成物の量に言及する。予防的適用について、有益または望ましい結果には、状態の生化学的、組織学的、および行動的症候 (behavioral manifestations)、その合併症、および状態の発達の間の中期の病理学的表現型 (intermediate pathological phenotypes) を含め、リスクの排除または低減、重症度の低減、または発症の遅延が含まれる。治療上の適用について、有益または望ましい結果には、臨床結果、例えば、本開示の標的抗原に関係する様々な状態の発生率の低下または状態の一以上の徴候の改善、状態を処置するのに必要な他の薬剤の投薬量の低下、別の薬剤の有効性の増強、および/または対象における本開示の標的抗原に関係する状態の進行の遅延などのようなものが含まれる。

40

【0138】

「外因性」は状況に応じて、有機体、細胞、またはヒトの外部で生産される物質に言及する。

【0139】

「内因性」は状況に応じて細胞、有機体、または人体で生産される物質に言及する。

50

【0140】

「相同性」および「同一性」はここで交換可能であり、および二つのポリヌクレオチド配列間または二つのポリペプチド配列間の配列類似性に言及する。比較される二つの配列の双方における位置が同じ塩基またはアミノ酸モノマーサブユニットによって占められるとき、例は、各々の二つのDNA分子での位置がアデニンによって占められる場合、そのとき分子はその位置にて相同である。二つの配列間の相同性の割合は二つの配列によって共有される一致するまたは相同な位置の数を比較される位置の数で割り、および次いで100を掛けた関数である。例えば、二つの配列が最適に整列されるとき、二つの配列における10個の位置のうち6個が一致または相同である場合、二つの配列は60%相同であり；二つの配列の100個の位置のうち95個が一致または相同である場合、そのときに二つの配列は95%相同である。大抵、二つの配列が整列されるとき、最大の相同性割合を与えるために比較が実行される。例えば、比較はBLASTアルゴリズムによって実行することができ、そこでは各参照配列の全長にわたって各配列間の最大の一致を与えるようにアルゴリズムのパラメーターが選ばれる。

10

【0141】

以下の参考文献は配列分析について頻繁に使用されるBLASTアルゴリズムに関する：BLASTアルゴリズム (BLAST ALGORITHMS) : Altschul (オルトシュール), S.F.ら、(1990) J. Mol. Biol. 215 : 403-410 ; Gish (ギッシュ), W.ら、(1993) Nature Genet.. (ネイチャー・ジェネティックス) 3 : 266-272 ; Madden (マッデン), T.L.ら、(1996) Meth. Enzymol. (メソツツ・イン・エンザイモロジー) 266 : 131-141 ; Altschul, S.F. (アルツシュール, S.F.) ら、(1997) Nucleic Acids Res. (ヌクレイック・アシツツ・リサーチ) 25 : 3389-3402 ; Zhang (チャン), J.ら (1997) Genome Res. (ゲノム・リサーチ) 7 : 649-656。他の慣習的なBLASTアルゴリズム、例えば、NCBI BLASTから利用可能なものなどのようなものもまた、本技術において熟練する者によく知られる。

20

【0142】

「分離された」は「その元の環境から分けられている」状態に言及し、およびこの場合、指示された分子は他の非標的生体分子が本質フリーであることを意味する。大抵、「分離された」という用語はこれらの材料の完全な欠如または水、緩衝剤または塩類の欠如を意味することを意図せず、それはそれらがここに記載するような化合物の実験的または治療的使用を著しく妨害する量で存在しない限りのことである。

30

【0143】

「随意」または「随意に」は、事象または状況が続く可能性があるが必ずしも発生するものではないことを意味し、およびその記載には、その事象または状況が発生するまたは発生しない場合が含まれる。

【0144】

「薬学的組成物」は本開示に従う一以上の化合物、またはその生理学的/薬学的に許容可能な塩またはプロドラッグおよび他の化学成分、例えば、生理学的/薬学的に許容可能な担体および賦形剤などのようなものを含む混合物に言及する。薬学的組成物は有機体への施与を促し、活性原料の吸収を促進し、およびそれによって生物学的効果を発揮させることを目的とする。

40

【0145】

「薬学的に許容可能な担体」という用語は抗体または抗原結合フラグメントのデリバリーのための調剤物における使用に適する任意の不活性物質に言及する。担体は接着防止剤、接着剤、コーティング剤、崩壊剤、充填剤または希釈剤、保存剤（例えば、抗酸化剤、抗菌剤または抗真菌剤などのようなもの）、甘味料、吸収遅延剤、湿潤剤、乳化剤、緩衝剤、およびその他同種類のものなどであることができる。適切な薬学的に許容可能な担体の例には、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、およびその他同種類のものなどのようなもの）、デキストロース、植物油（例えば、オリーブ油などのようなもの）、含塩物 (saline、セーリン)、

50

緩衝剤、緩衝化含塩物、および等張剤、例えば、糖、ポリオール、ソルビトールおよび塩化ナトリウムなどのようなものが含まれる。

【0146】

「代謝障害」という用語の具体例は、代謝症候群（メタボリックシンドロームとも言う）、肥満、耐糖能異常（impaired glucose tolerance、耐糖能障害などとも言う）、糖尿病、糖尿病性ケトアシドーシス、高血糖、高血糖高浸透圧症候群（hyperglycemic hyperosmolar syndrome）、周術期高血糖（perioperative hyperglycemia）、高インスリン（hyperinsulinemia）、インスリン抵抗性症候群、空腹時血糖異常、脂質異常（dyslipidemia）、アテローム性動脈硬化、および前糖尿病状態（prediabetic condition）である。

10

【0147】

加えて、本開示の別の態様は標的抗原の免疫検出または決定のための方法、標的抗原の免疫検出または決定のための試薬、標的抗原を発現する細胞の免疫検出または決定のための方法、および標的抗原陽性細胞に関係する疾患を診断するための診断用薬剤で、標的抗原を活性原料として特異的に認識し、およびそれに結合する本開示のモノクローナル抗体または抗体フラグメントが含まれるものに関する。

【0148】

本開示において、標的抗原の量を検出または測定するための方法は任意の既知の方法であることができる。例えば、それには、免疫測定法または免疫検出法が含まれる。

【0149】

免疫測定法（イムノアッセイとも言う）または免疫検出法は標識された抗原または抗体を用いて抗体または抗原の量を検出または測定する方法である。免疫測定法または免疫検出法の例には、放射性物質標識免疫抗体法（RIA）、酵素免疫測定法（EIAまたはELISA）、蛍光免疫測定法（FIA）、発光免疫測定法、ウエスタンブロッティング、物理化学的方法、およびその他同種類のものなどが含まれる。

20

【0150】

標的抗原陽性細胞に関連する上述の疾患は本開示の抗体または抗体フラグメントを使用して標的抗原発現細胞を検出または測定することによって診断することができる。

【0151】

ポリペプチドを発現する細胞は既知の免疫検出法によって、なるべくなら免疫沈降、蛍光細胞染色、免疫組織染色、およびその他同種類のものなどによって検出することができる。加えて、FMAT8100HTSシステム（Applied Biosystem（アプライドバイオシステムズ））による蛍光抗体染色法などのような方法も使用することができる。

30

【0152】

本開示において、標的抗原について検出または測定される生体サンプル（living samples）はそれらが標的抗原を発現する細胞を含むことが可能である限り、特に制限されず、例えば、組織細胞、血液、血しょう、血清、唾液、尿、糞便、組織流体または培養培地である。

【0153】

必要な診断方法に応じて、本開示のモノクローナル抗体またはその抗体フラグメントが含まれる診断用薬剤はまた、抗原抗体反応を実行するための試薬または反応を検出するための試薬をも包含し得る。抗原抗体反応を実行するための試薬には、緩衝剤、塩およびその他同種類のものなどが含まれる。検出のための試薬には、免疫測定法または免疫検出法において普通に使用される薬剤、例えば、モノクローナル抗体、その抗体フラグメントまたは複合物（コンジュゲートとも言う）を認識する標識二次抗体、および標識に対応する基質が含まれる。

40

【0154】

本開示の一以上の実施態様の詳細は上記の明細において記載する。ここに説明するものと類似または同一の任意の方法および物質は本開示の実践または試験において使用することができるが、好適な方法および物質を以下に説明する。本明細および請求の範囲を通して

50

、本開示の他の特長、目的および利益が明らかになるであろう。本明細および請求の範囲において、文脈が別なふうに明らかに指し示さない限り、単数形は複数の局面を含む。ここで別なふうに明示的に規定しない限り、ここで使用するすべての技術的および科学的用語はこの開示が属する技術における熟練する者によって普通に理解される意味を有する。本明細において引用するすべての特許および刊行物は参照によって組み込まれる。以下の例は本開示の好適な実施態様をさらに例証するために提示する。これらの例はいかなる仕方においても本開示の範囲を制限するものとして解釈されるべきではなく、および本開示の範囲は請求の範囲によって規定される。

【実施例】

【0155】

10

例1：GCGR抗原および抗体の調製

1. 1抗原の構築および選別

【0156】

477アミノ酸の全長グルカゴン受容体をコードするヒトGCGR cDNAを発現ベクター（例えば、pcDNA3.1などのようなもの）中にサブクローニングし、およびCHO-K1細胞にトランスフェクトした。選別（スクリーニングとも言う）および単一細胞クローニングの後、細胞表面での抗原発現および受容体ベースの発現の特徴の調査のために単一クローンを選定した。以下のGCGR抗原は特に指し示さない限りヒトGCGRを指す。

【0157】

全長GCGR：GCGR過剰発現細胞系の構築のために使用され、または免疫化のため、およびその後の検出のための抗原として使用される：

20

【化1】

MPPCQPQRPLLLLLLLLLLACQPQVPSAQVMDFLFEKWKLYGDQCHHNLSLL
PPPTELVCNRTFDKYSCWPDTPANTTANISCPWYLPWHHKVQHRFVFKRCGPD
GQWVRGPRGQPWRDASQCQMDGEEIEVQKEVAKMYSSFQVMYTVGYSLSLG
ALLLALAILGGLSKLHCTRNAIHANLFAFVLKASSVLVIDGLLRTRYSQKIGDD
LSVSTWLSDGAVAGCRVA AVFMQYGIVANYCWLLVEGLYLHNLLGLATLPER
SFFSLYLGIGWGAPMLFVVPWAVVKCLFENVQCWTSNDNMGFWWILRFPVFL
AILNFFIFVRIVQLLVAKLRARQMHTDYKFRLAKSTLTLIPLLGVHEVVFAFV
TDEHAQGTLRSAKLFFDLFLSSFQGLLVAVLYCFLNKEVQSELRRRWHRWRLG
KVLWEERNTSNHRASSSPGHGPPSKELQFGRGGGSQDSSAETPLAGGLPRLAES
PF

30

(配列番号1)

【0158】

1. 2 GCGRハイブリドーマおよび組換え抗体の精製

(1) ハイブリドーマ上清の分離および精製/プロテインGアフィニティークロマトグラフィー：

40

マウスハイブリドーマ上清の精製について、プロテインGアフィニティークロマトグラフィーの実行が好ましかった。収集したハイブリドーマ培養物を遠心分離し、および上清を採取し、および上清の量に基づいて上清のpHを調整するために10-15%容量の1M Tris（トリス）-HCl（pH8.0-8.5）を加えた。プロテインGカラムを3-5×カラム容量の6M塩酸グアニジンで洗浄し、および次いで3-5×カラム容量の純水で洗浄し；カラムを平衡緩衝剤、例えば、1×PBS（pH7.4）緩衝剤（以下バッファとも言う）システムなどのようなものの3-5×カラム容量で平衡化し；細胞上清を結合のために低流速でロードさせ、および保持時間が約1分以上になるように流速を制御し；UV吸収がベースラインに低下するまで、カラムを3-5×カラム容量の1×PBS（pH7.4）で洗浄し；サンプルを0.1

50

M酢酸/酢酸ナトリウム (pH3.0) バッファーで溶出し、UV検出に従って溶出ピークをプールした。1M Tris-HCl (pH8.0) でpHを5-6に調整した後、溶出した生成物を一時的に保存した。溶出した生成物は当技術において熟練する者によく知られる方法、例えば、限外ろ過管を用いる限外ろ過濃縮による望ましい緩衝剤システムでの溶液の置換、または分子排除、例えば、G-25脱塩などのようなものの使用による望ましい緩衝剤システムでの溶液の置換に従う溶液置換、または高分解能分子排除カラム、例えば、Superdex (スーパーデックス) 200などのようなものの使用によってサンプルの純度を向上させるために溶出した生成物からの凝集成分の除去を受けさせることができる。

【0159】

(2) プロテインAアフィニティークロマトグラフィーによるFcタグ付き二特異性タンパク質または抗体の抽出：

まず、Fc二特異性タンパク質または抗体を含む発現細胞培養上清を高速遠心分離して上清を収集した。プロテインAアフィニティークラムを3-5×カラム容量の6M塩酸グアニジンで洗浄し、および次いで3-5×カラム容量の純水で洗浄した。カラムは平衡緩衝剤として3-5×カラム容量の1×PBS (pH7.4) 緩衝剤システムで平衡化した。細胞上清を結合のため低流速でロードし、および保持時間が約1分以上になるように流速を制御し；結合が終了した後、UV吸収がベースラインに低下するまでカラムを3-5×カラム容量の1×PBS (pH7.4) で洗浄した。サンプルを0.1M酢酸/酢酸ナトリウム (pH3.0-3.5) 緩衝剤で溶出し、UV検出に従って溶出ピークをプールした。1MのTris-HCl (pH8.0) でpHを5-6に調整した後、溶出した生成物を一時的に保存した。溶出した生成物は当技術において熟練する者によく知られる方法、例えば、限外ろ過管を用いた限外ろ過濃縮による望ましい緩衝剤システムとの溶液の置換、または分子排除、例えば、G-25脱塩などのようなものを使用することによる望ましい緩衝剤システムとの溶液の置換に従う溶液置換、または高分解能分子排除カラム、例えば、Superdex 200などのようなものの使用によってサンプルの純度を向上させるために溶出した生成物からの凝集成分の除去を受けさせることができる。

【0160】

例2：抗ヒトGCGRモノクローナル抗体の調製

2.1 免疫化

【0161】

(1) マウス免疫化：抗ヒトGCGRモノクローナル抗体はマウスを免疫化することによって生産した。実験には、6-8週齢の雌性のSJLホワイトマウスを使用した (Beijing Charles River Experimental Animal Technology Co., Ltd. (北京チャールズリバー実験動物技術社)、animal production license number (動物生産ライセンス番号) : SCXK (Jing (ジン)) 2012-0001)。給餌環境：SPFレベル。マウスを購入した後、それらを20-25℃の温度；40-60%の湿度にて1週間、12/12時間の明/暗サイクルで実験室環境に適応させた。次いで、環境に適応したマウスを以下のスキームに従って免疫化した。免疫化のための抗原はGCGRで安定的にトランスフェクションしたCHO-K1細胞であった。

【0162】

免疫化スキーム：マウスをアジュバント、TiterMax(R) ((R)は米国等での登録商標表示) (タイターマックス) Gold Adjuvant (ゴールド・アジュバント) (Sigma Cat No. (シグマ・カタログ番号) T2684) で、腹腔内注射 (i.p.)、0.1ml/マウス (最初の免疫化) によって前免疫した。15分後、マウスにGCGR CHO-K1を安定的にトランスフェクトした細胞、1E7細胞をマウスあたり腹腔内注射 (i.p.) した。ワクチン接種時間は0、14、28、42、56、70、84、98および112日であった。血液サンプルは35、63および91日目に収集し、マウス血清における抗体価はELISA法によって決定した。6〜9回の免疫化の後、プラトーの傾向があった高い血清抗体力価を有するマウスを脾細胞融合のために選定した。脾細胞融合の三日前に、GCGR CHO-K1の安定的にトランスフェクトした細胞を追加免疫のためにマウスあたり1E7細胞にて腹腔内 (i.p.) 注射した。

【0163】

(2) ラット免疫化：6-8週齢のSDラットをDNA（全長hGCGRをコードし、コード配列はGenbank accession number（ジェンバンク・アクセッション・ナンバー）：NM_000160に見出すことができ）で免疫し、およびラット血清における抗体価をFACS法によって決定した。3~4回の免疫化の後、プラトーの傾向があった高い血清抗体力価を有するラットを脾細胞融合のために選定した。脾細胞融合の3日前に追加免疫を実行した。

【0164】

2.2 脾細胞融合

【0165】

ハイブリドーマ細胞は最適化されたPEG媒介融合手順を使用することにより、脾臓リンパ球を骨髓腫Sp2/0細胞（ATCC(R)（(R)は米国等での登録商標表示）CRL-8287™（™は米国等でのトレードマーク表示））と融合することによって取得した。融合したハイブリドーマ細胞は0.5-1E6/mlの密度で完全培地（20%FBS、1×HAT、1×OPIを含むMEM培地）において再懸濁し、100μl/ウェルを伴う96ウェルプレートにおいて播種し、37℃および5%CO₂で3-4日間インキュベーションし、100μl/ウェルのHAT完全培地により補充し、およびクローンが形成されるまで3-4日間培養を続けた。上清を除去し、200μl/ウェルのHT完全培地（20%FBS、1×HTおよび1×OPIを含むIMDM培地）を各ウェルに加え、37℃、5%CO₂にて3日間インキュベートし、および次いでELISA検出を受けさせた。

【0166】

2.3 ハイブリドーマ細胞のスクリーニング

【0167】

ハイブリドーマ細胞の増殖密度に従い、ハイブリドーマ培養上清を細胞結合ELISA法によって検出した。陽性を伴う試験したウェルにおける細胞はタイムリーに増やし、低温保存し、および単一の細胞クローンが得られるまで2ないし3回サブクローン化した。

【0168】

各サブクローニング後の細胞もまたGCGR細胞結合ELISAによって試験した。ハイブリドーマクローンをアッセイによってスクリーニングした。抗体は無血清細胞培養法によってさらに調製した。テスト例において記載の精製の例に従って抗体を精製した。

【0169】

2.4 陽性ハイブリドーマクローンの配列決定

【0170】

陽性ハイブリドーマからの配列をクローニングする手順は以下のようであった。対数増殖期におけるハイブリドーマ細胞を収集した。RNAsをキットの指示に従ってTrizol（トリゾール）（Invitrogen（インビトロゲン）、Cat No.（カタログ番号）15596-018）により抽出し、およびPrimeScript™（™は米国等でのトレードマーク表示）（プライムスクリプト）Reverse Transcription（逆転写）キット（Takara（タカラ）、Cat No. 2680A）により逆転写させた。逆転写から得られるcDNAsはマウスIg-Primer Set（Ig-プライマー・セット）（Novagen（ノバゲン）、TB326 Rev. B 0503）を使用するPCRによって増幅し、およびPCR増幅後に配列決定した。

【0171】

結果として生じるDNA配列から陽性クローンを取得し、および無血清細胞培養法によって抗体を調製した。抗体は精製例に従い精製し、および細胞ベースのGCGR結合ブロッキングアッセイを使用することによって数ラウンドのスクリーニングを受けさせ、それによってネズミハイブリドーマクローン1803、1805、1808、および1810、ならびにラットハイブリドーマクローン1817および1822を取得した。

【0172】

10

20

30

40

50

【表 2】

表 1. GCGR抗体の軽鎖および重鎖可変領域配列

抗体名称	重鎖可変領域（配列番号）	軽鎖可変領域（配列番号）
m1803	QFQLHQSGAELVKPGASVKLSCKAT GYTFTDYWIEWVKQRPGLGLEWIG EILPGSTYTNYNKFKGRATFTAEP SSAYMQLSGLTTEDSAIYYCSRGLS TLMAVDYFDYWGGGTTTLTVSS (配列番号 2)	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTIN CRASQDISNYLNWYQQKPDGT VKLLIYSSSTLHSGVPSRFSGSG SGTDYSLTISHLEQEDIATYFCQ QTNIFPWTFGGGTKLEI (配列番号 3)
m1805	EVQLQQSGPELVKPGASVKIPCKTSG YTFTDYNMDWVKQSHGRSLEWIGSI DPDNGGTIYNQKFKGKATLTVDKSS STAYMELRSLTSEDVAVYYCTRDYY GSSSWFAYWGQGTTLTVSA (配列番号 4)	DVVMQTQSPATLSVTPGDRVSLS CRASQDISNYLNWYQQKSHESP RLLIKYASQSIGIPSRFSGSGSG SDFTLSINSVEPEDVGVYYCQN GHSFPYTFGGGTKLEIK (配列番号 5)
m1808	QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKAS GDTFTNGISWVKQRIGQGLEWIGEI YPRSGNTYYNENFKGKATLTADKSS TTAYMELRRLTSEDSAVYFCARSITS VIGADYFDYWGGGTTTLTVSS (配列番号 6)	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISC RASQDISNYLNWYQQKPDGTV KLLIYSSSTLHSGVPSRFSGSGS GTDYSLTISNLEQEDIATYFCQ QGNTFPWTFGGGTKLEIK (配列番号 7)
m1810	QVQLQQSGTELARPGTSVTLCKAS GYTFTNYAISWVKQRTGQGLEWIGE IYPTSGNTYYNEKFKGKATLTADRS SKTMYMELRSLTSVDSAVYFCASGV ITTVVSTDYFDYWGGGSPLTVSS (配列番号 8)	DIQMTQIPSSLSVSLGDRVTISC RASLDISNYLNWYQLKPDGTV KLLIYYTSTLHSGVSSRFSGSGS GTEYSLTISNLEQEDIATYFCQQ GNMVPYTFGGGTKLEIK (配列番号 9)
rat1817	EVQLVESGGDLVQPGRSMKLSAAS GFTFSNYYMAWVRQAPTKGLEWVA SISTGGVNTYYRDSVKGRFTISRDN KNNLYLQMDSLRSEETATYYCARH TTADYFYGIYFALDAWGQGTSTVTS S (配列番号 10)	QFTLTQPKSVSGSLRSTITIPCE SSGDIGDSYVNWYQQHLGRPP LNVIYADVQRPSEVSDRFSGSI DSSSNSASLTITNLQMDDEADY FCQSYDTNIDIIFGGGTKLTVL (配列番号 11)
rat1822	EVRLVESGGDFVQPGRSVKLSCAAS GFTFSNYYMAWVRQAPTKGLEWVG SISTGGVNTYYRDSVKGRFTISRDN ESTLYLQMDSLRSEETATYYCARHT TPDYHYGIYFAMDAWGQGTSTVTS S (配列番号 12)	QVTLTQPKSVSGSLRSTITIPCE RSSGDIGESYVNWYQQHLGRP PINVIYADDQRPSEVSDRFSGSI DSSSNSASLTITNLQVDDEADY FCQSYDSSIDIFFGGGTKLTVL (配列番号 13)

10

20

30

40

【0173】

50

【表 3】

表 2. Kabatナンバリング (Kabat Numbering) によるCDR領域配列

抗体名称	重鎖CDR		軽鎖CDR	
m1803	HCDR1	<u>DYWIE</u> (配列番号 1 4)	LCDR1	<u>RASQDISNYLN</u> (配列番号 1 7)
	HCDR2	<u>EILPGSTYTNYNEKFKG</u> (配列番号 1 5)	LCDR2	<u>YSSTLHS</u> (配列番号 1 8)
	HCDR3	<u>GLSTLMAVDYFDY</u> (配列番号 1 6)	LCDR3	<u>QQTNIIFPWT</u> (配列番号 1 9)
m1805	HCDR1	<u>DYNMD</u> (配列番号 2 0)	LCDR1	<u>RASQSISDYLH</u> (配列番号 2 3)
	HCDR2	<u>SIDPDNGGTIYNQKFKG</u> (配列番号 2 1)	LCDR2	<u>YASQIS</u> (配列番号 2 4)
	HCDR3	<u>DYYGSSSWFAY</u> (配列番号 2 2)	LCDR3	<u>QNGHSFPYT</u> (配列番号 2 5)
m1808	HCDR1	<u>TNGIS</u> (配列番号 2 6)	LCDR1	<u>RASQDISNYLN</u> (配列番号 2 9)
	HCDR2	<u>EIYPRSGNTYYNENFKG</u> (配列番号 2 7)	LCDR2	<u>YSSTLHS</u> (配列番号 3 0)
	HCDR3	<u>SITSVIGADYFDY</u> (配列番号 2 8)	LCDR3	<u>QQGNTFPWT</u> (配列番号 3 1)
m1810	HCDR1	<u>NYAIS</u> (配列番号 3 2)	LCDR1	<u>RASLDISNYLN</u> (配列番号 3 5)
	HCDR2	<u>EIYPTSGNTYYNEKFKG</u> (配列番号 3 3)	LCDR2	<u>YTSTLHS</u> (配列番号 3 6)
	HCDR3	<u>GVITTVVSTDYFDY</u> (配列番号 3 4)	LCDR3	<u>QQGNMVPYT</u> (配列番号 3 7)
rat1817	HCDR1	<u>NYYMA</u> (配列番号 3 8)	LCDR1	<u>ERSSGDIGDSYVN</u> (配列番号 4 1)
	HCDR2	<u>SISTGGVNTYYRDSVKG</u> (配列番号 3 9)	LCDR2	<u>ADVQRPS</u> (配列番号 4 2)
	HCDR3	<u>HTTADYFYGIYFALDA</u> (配列番号 4 0)	LCDR3	<u>QSYDTNIDII</u> (配列番号 4 3)
rat1822	HCDR1	<u>NYYMA</u> (配列番号 3 8)	LCDR1	<u>ERSSGDIGESYVN</u> (配列番号 4 5)
	HCDR2	<u>SISTGGVNTYYRDSVKG</u> (配列番号 3 9)	LCDR2	<u>ADDQRPS</u> (配列番号 4 6)
	HCDR3	<u>HTTPDYHYGIYFAMDA</u> (配列番号 4 4)	LCDR3	<u>QSYDSSIDIF</u> (配列番号 4 7)

10

20

30

40

【0174】

配列アラインメントおよびコンピューターシミュレーションによってネズミ抗体m1803、m1805、m1808、およびm1810の軽鎖および重鎖のCDR配列はより一層高い相同性を有し、およびラット抗体rat1817およびrat1822の軽鎖および重鎖のCDR配列はより一層高い相同性を有することが見出された。コンセンサス配列を次の表に示す：

50

【表 4】

表 3. 重鎖および軽鎖CDR領域のコンセンサス配列

	重鎖CDR		軽鎖CDR	
ネズミ抗体	HCDR1	$X_1X_2X_3IX_4$ 、ここで $X_1X_2X_3$ はDYW、TNGまたはNYAから選ばれ、および X_4 はE/Sから選ばれる(配列番号48)	LCDR1	RASX ₁₇ DISNYLN、ここで X_{17} はL/Qから選ばれ、(配列番号51)
	HCDR2	EIX ₅ PX ₆ SX ₇ X ₈ TX ₉ YNEX ₃₁ FKG、ここで X_5 はL/Yから選ばれ、 X_6 はG/R/Tから選ばれ、 X_7 はT/Gから選ばれ、 X_8 はN/Yから選ばれ、 X_9 はN/Y、 X_{31} はKまたはNから選ばれる(配列番号49)	LCDR2	YX ₁₈ STLHS、ここで X_{18} はS/Tから選ばれる(配列番号52)
	HCDR3	$X_{31}X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}X_{16}$ DYFDY、ここで X_{10} はI/L/VIから選ばれ、 X_{11} はS/Tから選ばれ、 X_{12} はS/Tから選ばれ、および X_{13} はL/Vから選ばれ、 X_{14} はM/V/Iから選ばれ、 X_{15} はS/G/Aから選ばれ、 X_{16} はT/A/Vから選ばれ、および X_{31} はGまたはSから選ばれる。(配列番号50)	LCDR3	QQX ₁₉ NX ₂₀ X ₂₁ PX ₂₂ T、ここで X_{19} はT/Gから選ばれ、 X_{20} はM/T/Iから選ばれ、 X_{21} はF/Vから選ばれ、および X_{22} はW/Yから選ばれる(配列番号53)
ラット抗体	HCDR1	NYYMA (配列番号38)	LCDR1	ERSSGDIGX ₂₆ SYVN、ここで X_{26} はE/Dから選ばれる(配列番号55)
	HCDR2	SISTGGVNTYYRDSVKG (配列番号39)	LCDR2	ADX ₂₇ QRPS、ここで X_{27} はD/Vから選ばれる(配列番号56)
	HCDR3	HTTX ₂₃ DYX ₂₄ YGIYFAX ₂₅ DA、ここで X_{23} はP/Aから選ばれ、 X_{24} はF/Hから選ばれ、および X_{25} はL/Mから選ばれる(配列番号54)	LCDR3	QSYDX ₂₈ X ₂₉ IDIX ₃₀ 、ここで X_{28} はS/Tから選ばれ、 X_{29} はS/Nから選ばれ、および X_{30} はF/Iから選ばれる(配列番号57)

10

20

30

【0175】

例3. ネズミ抗ヒトGCGR抗体のヒト化

【0176】

ネズミ抗体と高い相同性を有する重鎖および軽鎖可変領域生殖系列遺伝子はMOEソフトウェア分析によってIMGTヒト抗体重鎖および軽鎖可変領域生殖系列遺伝子データベースに対してアラインメントすること(整列させること)によってテンプレートとして選定した。ネズミ抗体のCDRは、FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4の順序で可変領域配列を形成するために対応するヒトテンプレートにグラフト化した。必要に応じて、フレームワーク配列におけるいくつかのアミノ酸はヒト化抗GCGRモノクローナル抗体を取得するためにネズミ抗体に対応するアミノ酸に復帰変異させた。CDR領域におけるアミノ酸残基はKabatナンバリングシステムによって定め、およびアノテートした。

40

【0177】

上記のネズミ軽鎖および重鎖可変領域はキメラ抗体を形成するためにそれぞれヒト軽鎖および重鎖定常領域に接続した。クローン1803に対応するキメラ抗体はch1803と名付け

50

、および他の抗体も同様の仕方で命名した。

【0178】

3.1 ハイブリドーマクローン1803のヒト化

【0179】

(1) ハイブリドーマクローン1803をヒト化するためのフレームワークの選定：
ネズミ抗体m1803について、ヒト化軽鎖テンプレートはIGKV1-39*01およびhjk4.1であり、およびヒト化重鎖テンプレートはIGHV1-3*01およびhjh6.1であった。ヒト化可変領域配列は次のようである：

【化2】

hu1803VH-CDR グラフティング：（配列番号61）

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYWIEWVRQAPGQGLEWMGEIL
PGSTYTNYNKEFKGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARGLSTLMAVDY
FDYWGQGTTVTVSS;

hu1803VL-CDR グラフティング：（配列番号58）

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYSTL
HSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQTNIETPWTFGGGTKVEIK;

10

20

注：FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4の順序で配置され、イタリック体の配列はFRを表し、および下線付きの配列はCDRを表す。

【0180】

(2) ハイブリドーマクローン1803についてのヒト化テンプレートの選定および復帰変異の設計を以下の表に示す：

【表5】

表4. テンプレート選定および復帰変異

hu1803_VL		hu1803_VH	
hu1803_VL.1	グラフティング	hu1803_VH.1	グラフティング
hu1803_VL.1A	K42G、 P44V、 F71Y、 Y87F	hu1803_VH.1A	M69F、 R71A、 V78A
hu1803_VL.1B	P44V、 F71Y	hu1803_VH.1B	M48I、 V67A、 M69F、 R71A、 V78A、 A93S
		hu1803_VH.1C	R38K、 M48I、 V67A、 M69F、 R71A、 T73P、 V78A、 A93S

注：例えば、P44VはKabatナンバリングシステムによる位置44でのPがVに復帰変異することを指し示す。グラフティングはネズミ抗体CDRがヒト生殖細胞系FR領域配列に直接インプラントされることを示す。

30

40

【0181】

(3) ハイブリドーマクローン1803の特定のヒト化配列は以下のようである：

50

【化 3】

> hu1803_VL.1 (同 Hu1803VL-CDR グラフティング) : (配列番号 5 8)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYSSSTL
HSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQTNIIPWTFGGGTKVEIK

> hu1803_VL.1A: (配列番号 5 9)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGGAVKLLIYSSSTL
HSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYFCQQTNIIPWTFGGGTKVEIK

10

> hu1803_VL.1B: (配列番号 6 0)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAVKLLIYSSSTL
HSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYCQQTNIIPWTFGGGTKVEIK

> hu1803_VH.1 (同 Hu1803VH-CDR グラフティング) : (配列番号 6 1)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYWIEWVRQAPGQGLEWMGEIL
PGSTYTNYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARGLSTLMAVDY
FDYWGQGTTVTVSS

> hu1803_VH.1A: (配列番号 6 2)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYWIEWVRQAPGQGLEWMGEIL
PGSTYTNYNEKFKGRVTFTADTSTSTAYMESSLRSEDTAVYYCARGLSTLMAVDY
FDYWGQGTTVTVSS

20

> hu1803_VH.1B: (配列番号 6 3)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYWIEWVRQAPGQGLEWIGEILP
GSTYTNYNEKFKGRATFTADTSTSTAYMESSLRSEDTAVYYCSRGLSTLMAVDYF
DYWGQGTTVTVSS

> hu1803_VH.1C: (配列番号 6 4)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYWIEWVKQAPGQGLEWIGEILP
GSTYTNYNEKFKGRATFTADPSTSTAYMESSLRSEDTAVYYCSRGLSTLMAVDYF
DYWGQGTTVTVSS。

30

【0182】

(4) ハイブリドーマクローン1803に由来する抗体のヒト化抗体軽鎖可変領域および重鎖可変領域の配列の組合せは以下のようである：

40

【表 6】

表 5. 様々なヒト化抗体の軽鎖および重鎖可変領域の組合せ

	hu1803_VL.1	hu1803_VL.1A	hu1803_VL.1B
hu1803_VH.1	hu1803-1	hu1803-5	hu1803-9
hu1803_VH.1A	hu1803-2	hu1803-6	hu1803-10
hu1803_VH.1B	hu1803-3	hu1803-7	hu1803-11
hu1803_VH.1C	hu1803-4	hu1803-8	hu1803-12

10

【0183】

上記の表に指し示す抗体の軽鎖および重鎖可変領域は全長抗体を形成するために対応する抗体の軽鎖および重鎖定常領域に接続することができる。本開示において別なふうに明示しない限り、全長抗体について、抗体軽鎖は配列番号73に示されるカッパ鎖定常領域に接続された軽鎖可変領域によって形成され、および抗体重鎖が配列番号72に示されるようにIgG4-AAに接続された重鎖可変領域によって形成される。

【0184】

20

3.2 ハイブリドーマクローン1810のヒト化

(1) ハイブリドーマクローン1810をヒト化するためのフレームワークの選定：

ネズミ抗体m1810について、ヒト化軽鎖テンプレートはIGKV1-39*01およびhJK4.1であり、およびヒト化重鎖テンプレートはIGHV1-69*02およびhJH4.1であった。ヒト化可変領域配列は次のようである：

【化4】

Hu1810VH-CDR グラフティング：（配列番号68）

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSNYAISWVRQAPGQGLEWMGEIY
PTSGNTYYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGVITTVVSTDY
FDYWGQGTLVTVSS

30

Hu1810VL-CDR グラフティング：（配列番号65）

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASLDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSTL
HSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQOQGNMVPYTFGGGTKVEIK

注：FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4の順序で配置され、イタリック体の配列は、FRを表し、および下線付きの配列はCDRを表す。

40

【0185】

(2) ハイブリドーマクローン1810についてのヒト化テンプレートの選定および復帰変異の設計を以下の表に示す：

50

【表 7】

表 6. テンプレートの選定および復帰変異

hu1810_VL		hu1810_VH	
hu1810_VL.1	グラフィティング	hu1810_VH.1	グラフィティング
hu1810_VL.1A	P44V, P59S, F71Y	hu1810_VH.1A	K73R, A78M, R94S
hu1810_VL.1B	Q38L, P44V, P59S, D70E, F71Y	hu1810_VH.1B	M48I, V67A, I69L, K73R, A78M, R94S
		hu1810_VH.1C	R38K, M48I, R66K, V67A, I69L, K73R, A78M, R94S

注：例えば、P44VはKabatナンバリングシステムによる位置44でのPがVに変異することを示す。グラフィティングはネズミ抗体CDRがヒト生殖細胞系FR領域配列に直接インプラントされることを示す。

10

【0186】

20

(3) ハイブリドーマクローン1810の特定のヒト化配列は以下のようである：

30

40

50

【化 5】

> hu1810_VL.1 (同 Hu1810VL-CDR グラフティング) : (配列番号 6 5)
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASLDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSTL
HSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGNMVPYTFGGGTKVEIK

> hu1810_VL.1A: (配列番号 6 6)
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASLDISNYLNWYQQKPGKAVKLLIYYTSTL
HSGVSSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNMVPYTFGGGTKVEIK

> hu1810_VL.1B: (配列番号 6 7)
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASLDISNYLNWYQLKPGKAVKLLIYYTSTL
HSGVSSRFSGSGSGTGYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNMVPYTFGGGTKVEIK

> hu1810_VH.1 (同 Hu1810VH-CDR グラフティング) : (配列番号 6 8)
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSNYAISWVRQAPGQGLEWMGEIY
PTSGNTYYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGVITTVVSTDY
FDYWGQGTLVTVSS

> hu1810_VH.1A: (配列番号 6 9)
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSNYAISWVRQAPGQGLEWMGEIY
PTSGNTYYNEKFKGRVTITADRSTSTMELSSLRSEDVAVYYCASGVITTVVSTDY
FDYWGQGTLVTVSS

> hu1810_VH.1B: (配列番号 7 0)
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSNYAISWVRQAPGQGLEWIGEIYP
TSGNTYYNEKFKGRATLTADRSTSTMELSSLRSEDVAVYYCASGVITTVVSTDYF
DYWGQGTLVTVSS

> hu1810_VH.1C: (配列番号 7 1)
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSNYAISWVKQAPGQGLEWIGEIYP
TSGNTYYNEKFKGKATLTADRSTSTMELSSLRSEDVAVYYCASGVITTVVSTDYF
DYWGQGTLVTVSS。

10

20

30

【0187】

(4) ハイブリドーマクローン1810のヒト化抗体軽鎖および重鎖可変領域の配列組合せは以下のようである：

【表 8】

40

表 7. 様々なヒト化抗体の軽鎖および重鎖可変領域の組合せ

	hu1810_VL.1	hu1810_VL.1A	hu1810_VL.1B
hu1810_VH.1	hu1810-1	hu1810-5	hu1810-9
hu1810_VH.1A	hu1810-2	hu1810-6	hu1810-10
hu1810_VH.1B	hu1810-3	hu1810-7	hu1810-11
hu1810_VH.1C	hu1810-4	hu1810-8	hu1810-12

50

【0188】

上記の表において指し示す抗体の軽鎖および重鎖可変領域は、全長抗体を形成するために対応する抗体の軽鎖および重鎖定常領域に接続することができる。本開示において別なふうに明示しない限り、全長抗体について、抗体軽鎖は配列番号73に示されるカップ鎖定常領域に接続された軽鎖可変領域によって形成され、および抗体重鎖は配列番号72に示されるようにIgG4-AAに接続された重鎖可変領域によって形成される。

【0189】

例4：GCGRキメラ/ヒト化抗体のIgG4-AAフォーマットの構築および発現

プライマーを設計し、各キメラ/ヒト化抗体のVH/VK遺伝子フラグメントをPCRによって増幅し、および次いで全長抗体VH-CH1-FC-pHr/VK-CL-pHrについて発現ベクターを構築するために、相同組換えを介して発現ベクターpHr（シグナルペプチドおよび定常領域遺伝子（CH1-FC/CL）フラグメントを有する）中に挿入した。IgG4-AA抗体フォーマットは単純な点変異によってIgG4抗体フォーマットから取得することができる。IgG4-AAは変異F234A、L235AおよびS228Pを表す。F234AおよびL235Aの変異はIgG4-FcのFcγRへの結合能力を低下させ、およびADCC/CDCをさらに低下させることができる。S228Pは野生型IgG4のヒンジ領域において位置228でのアミノ酸SがPに変異していることを指し示す。この位置での変異はインビボで生じるFab交換によって引き起こされるミスマッチからの自然なIgG4抗体を防ぐことができる。

【0190】

ch1803、ch1805、ch1808、ch1810、ch1817およびch1822は、動物由来の軽鎖および重鎖可変領域をヒト抗体カップ鎖およびヒト抗体IgG4-AA重鎖定常領域とそれぞれ接続することによって形成されるキメラ抗体である。

【0191】

10

20

30

40

50

【化 6 - 1】

IgG4-AA の重鎖定常領域配列は以下のようである：（配列番号 7 2）

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPP
CPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSLGK;

10

抗体の軽鎖（カッパ鎖）定常領域配列は以下のようである：（配列番号 7 3）

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC;

構築された抗体の模範的な配列は以下のようである：

ch1803: 抗体フォーマット IgG4AA

20

ch1803 重鎖配列：（配列番号 7 4）

QFQLHQSGAELVKPGASVKLSCKATGYTFTDYWIEWVKQRPGHGLEWIG
EILPGSTYTNNEKFKGRATFTAEPSSSSAYMQLSGLTTEDSAIYYCSRGLSTLM
AVDYFDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPS
NTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK;

30

ch1803 軽鎖配列：（配列番号 7 5）

DIQMTQTSSLSASLGDRVTINCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYS
STLHSGVPSRFGSGSGTDYSLTISHLEQEDIATYFCQQTNIFPWTFGGGTKLEIRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV
TEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC;

hu1803-1: 抗体フォーマット IgG4AA

40

【化 6 - 2】

hu1803-1 重鎖配列：（配列番号 7 6）

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYWIEWVRQAPGQGLEWM
GEILPGSTYITNYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARGLST
LMAVDYFDYWGGQTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKP
SNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK;

10

hu1803-1 軽鎖配列：（配列番号 7 7）

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYSS
TLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTITSLQPEDFATYYCQQTNIPTWTFGGGKTKVEIKR
TVAAPSVEFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC;

20

hu1803-9 重鎖配列：（配列番号 7 8）

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYWIEWVRQAPGQGLEWM
GEILPGSTYITNYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARGLST
LMAVDYFDYWGGQTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF
PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDH
KPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTC
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK;

30

hu1803-9 軽鎖配列：（配列番号 7 9）

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAVKLLIYYSS
STLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTITSLQPEDFATYYCQQTNIPTWTFGGGKTKVEI
KRTVAAPSVEFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
C;

40

50

【化 6 - 3】

ch1805 重鎖配列：（配列番号 8 0）

EVQLQQSGPELVKPGASVKIPCKTSGYTFTDYNMDWVKQSHGRSLEWIGS
IDPDNGGTIYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSED¹⁰TA¹⁰VYYCTR¹⁰DYYGSS¹⁰
SWFAYWGQGLVTVSAASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNT
KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSL¹⁰SLGK;

ch1805 軽鎖配列：（配列番号 8 1）

DVVM²⁰TQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQ²⁰SISDYLHWYQ²⁰QKSHESPRLLIKYA²⁰
SQSISGIPSRFSGSGSGSDFTL²⁰SINSE²⁰VEDVG²⁰VYYCQ²⁰NGHSF²⁰PYTFGGG²⁰TKLEIK²⁰
RTVAAPS²⁰VFIFPPSDEQLKSGTASV²⁰VCLLN²⁰FYPRE²⁰AKVQW²⁰KVDNALQSGNSQ²⁰E
SVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC;

ch1808 重鎖配列：（配列番号 8 2）

QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGDTFTTNGISWVKQRIGQGLEWIGE³⁰I
YPRSGNTYYNENFKGKATLTADKSSSTAYMELRRLTSEDSAVYFCARSITSVIG³⁰
ADYFDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV³⁰
TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSN³⁰
TKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD³⁰
VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG³⁰
KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK³⁰
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS³⁰
CSVMHEALHNHYTQKSLSL³⁰SLGK;

ch1808 軽鎖配列：（配列番号 8 3）

DIQMTQTSSLSASLGDRV⁴⁰TISCRASQDISNYLNWYQK⁴⁰KPDGTVKLLIY⁴⁰SSSTLH⁴⁰
SGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTFPWTFGGG⁴⁰TKLEIKRTV⁴⁰
AAPS⁴⁰VFIFPPSDEQLKSGTASV⁴⁰VCLLN⁴⁰FYPRE⁴⁰AKVQW⁴⁰KVDNALQSGNSQESVT⁴⁰
EQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC;

10

20

30

40

50

【化 6 - 4】

hu1810-12 重鎖配列：（配列番号 8 4）

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSNYAISWVKQAPGQGLEWIGEIYP
TSGNTYYNEKFKGKATLTADRSTSTMMELSSLRSEDTAVYYCASGVITTVVSTDYF
DYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
 SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNV¹⁰VDHKPSNTKVDK
 RVESKYGPPCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDP
 EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
 VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
 AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE
 ALHNHYTQKSLSLGLGK;

hu1810-12 軽鎖配列：（配列番号 8 5）

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASLDISNYLNWYQLKPGKAVKLLIYYTSTL
HSGVSSRFSGSGSTEYTLTISSLPEDFATYYCQQGNMVPYTFGGGTKVEIKRTVA
 APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
 QDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC;

ch1817 重鎖配列：（配列番号 8 6）

EVQLVESGGDLVQPGRSMKLSCAASGFTFSSNYYMAWVRQAPTKGLEWV
ASISTGGVNTYYRDSVKGRFTISRDNAKNNLYLQMDSLRSEETATYYCARHTT
ADYFYGIYFALDAWQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK
 DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCN
 VDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
 TCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL
 TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE
 GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK;

ch1817 軽鎖配列：（配列番号 8 7）

QFTLTQPKSVSGSLRSTITIPCERSSGDIGDSYVNWYQQHLGRPPLNVIYAD
VQRPSEVSDRFSGSIDSSNSASLTITNLQMDDEADYFCQSYDTNIDIIFGGGTKL
 TVLRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
 SQESVTEQDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
 EC;

10

20

30

40

50

【化 6 - 5】

ch1822 重鎖配列：（配列番号 8 8）

EVRLVESGGDFVQGRSVKLSCAASGFTFSSNYYMAWVRQAPTKGLEWVG
SISTGGVNTYYRDSVKGRFTISRDNAESTLYLQMDSLRSEETATYYCARHTTPD
YHYGIYFAMDAWGQGSVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD
 YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTKTYTCNV
 DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
 CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD
 WLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT
 CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE
 GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG;

10

ch1822 軽鎖配列：（配列番号 8 9）

QVTLTQPKSVSGSLRSTITIPCERSSGDIGESYVNWYQQHLGRPPINVIYAD
DQRPSEVSDRFSGSIDSSNSASLTITNLQVDDEADYFCQSYDSSIDIFFGGGTKL
 TVLRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
 SQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
 EC;

20

陽性コントロール：デュラグルチドは二本鎖型であり、
 および単鎖はGLP-1/hIgG4 Fcである（配列番号 9 0）

HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGGSGGGGSGGGGSAES
 KYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
 GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
 ESGQEPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN
 HYTQKSLSLGLG。

30

【0 1 9 2】

例 5：抗体二特異性タンパク質のクローニングおよび発現

【0 1 9 3】

ヒト GLP-1 ペプチドを二特異性タンパク質の GLP-1 受容体 アゴニスト 部分として使用し、
 および GLP-1/GCGR 抗体二特異性タンパク質を形成するために、GCGR 抗体を二特異
 性タンパク質の GCGR アンタゴニスト 部分として使用した。

40

【0 1 9 4】

調査は、GLP-1 の特定の位置（複数）（例えば、Q17E、I23V、K28R または G30R な
 のようなもの）にてアミノ酸変異（複数）を有する新しい GLP-1/GCGR 抗体二特異性
 タンパク質が増加したインビトロ安定性を有していることを見出し、そこで安定性は、G
 LP-1A の位置 17 での Q が E に変異し、および GLP-1A の位置 23 での I が V（GLP-1C）に
 変異するとき、最高である。本開示の GLP-1 およびその変異形態の非制限的な模範的配
 列は以下のようである：

50

【表 9】

表 8. GLP-1Aポリペプチドおよびその変種配列

GLP-1ペプチド名 (GLP-1Aの変異部位 と比較して)	配列	配列番号
GLP-1A	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGG	91
GLP-1B (Q17E)	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFIAWLVKGGG	92
GLP-1C (Q17E G30R)	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFIAWLVKGRG	93
GLP-1D (Q17E I23V)	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFVAWLVKGGG	94
GLP-1E (Q17E I23V G30R)	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFVAWLVKGRG	95
GLP-1F (Q17E K28R)	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFIAWLVRGGG	96
GLP-1G (Q17E I23V K28R)	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFVAWLVRGGG	97
GLP-1H (Q17E K28R G30R)	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFIAWLVRGRG	98
GLP-1J (Q17E I23V K28R G30R)	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFVAWLVRGRG	99

10

20

30

【0195】

本開示のGLP-1ペプチドのC末端アミノ酸は、相同組換え技術を使用することによってペプチド結合またはリンカーを通してGCGR抗体重鎖のN末端アミノ酸に接続した。293発現システムを使用して発現を行い、および表9において示されるような二特異性タンパク質の構造モデルを取得した：

40

50

【表 10】

表 9. GLP-1/GCGR二特異性タンパク質の構造モデル

二特異性タンパク質の 構造モデルの名称	構造モデルGLP-1-リンカー-Ab*
二特異性タンパク質 1	GLP-1A -リンカー-Ab
二特異性タンパク質 2	GLP-1B -リンカー-Ab
二特異性タンパク質 3	GLP-1C -リンカー-Ab
二特異性タンパク質 4	GLP-1D -リンカー-Ab
二特異性タンパク質 5	GLP-1E -リンカー-Ab
二特異性タンパク質 6	GLP-1F -リンカー-Ab
二特異性タンパク質 7	GLP-1G -リンカー-Ab
二特異性タンパク質 8	GLP-1H -リンカー-Ab
二特異性タンパク質 9	GLP-1I -リンカー-Ab

*注：Abは本開示において説明するようなGCGR抗体である。
 GLP-1ペプチドはGCGR抗体の重鎖可変領域のアミノ末端に、
 またはGCGR抗体の軽鎖可変領域のアミノ末端に連結することができる。
 GLP-1ペプチドがGCGR抗体軽鎖可変領域のアミノ末端ではなく、
 GCGR抗体重鎖可変領域のアミノ末端に連結するとき、二特異性タンパク質が
 より一層好ましい安定性を有することが実験によって確認された。
 本開示のGLP-1ペプチドがGCGR全長抗体の重鎖可変領域に連結されている
 いくつかの実施態様における二特異性タンパク質構造の概略図を図1において示す。

【0196】

以下のタンパク質はリンカー（例は、(GGGGS)₃）を介して異なるGLP-1ペプチドを異なる抗体の重鎖アミノ酸に接続することによって形成される：

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 1】

表 1 0 . 二特異性タンパク質配列

二特異性 タンパク質 の名称	第一の鎖（重鎖部分（配列番号）を含む）： GLP-1ペプチド-リンカー-抗体重鎖（NからCまで）	第二の鎖 （軽鎖部分）
hu1803-9A	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGG GSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTDYWIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGST YTNYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED AVYYCARGLSTLMAVDYFDYWGGQTTTVTVSSAS TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESEKYGPPCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVSFCSVMHEALHNHY TQKSLSLSLGK（配列番号 1 0 0）	DIQMTQSP SSLASVG DRVITICR ASQDISNY LNWYQQK PGKAVKLL IYYSSTLHS GVPSRFSG SGSGTDYT LTISSLQPE DFATYYC QQTNIFPW TFGGGTKV EIKRTVAA PSVFIFFPS
hu1803-9B	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFIAWLVKGGGGGG GSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTDYWIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGST YTNYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED AVYYCARGLSTLMAVDYFDYWGGQTTTVTVSSAS TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESEKYGPPCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVSFCSVMHEALHNHY TQKSLSLSLGK（配列番号 1 0 1）	DEQLKSGT ASVVCLLN NFYPREAK VQWKVDN ALQSGNSQ ESVTEQDS KDSTYSLS STLTLSKA DYEKHKV YACEVTH QGLSSPVT KSFNRGEC （配列番号 7 9）
hu1803-9C	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFIAWLVKGRGGGG	

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 2】

	GGSGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTDYWIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGS TYTNYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGLSTLMAVDYFDYWGGQTTVTVSSA STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVP SSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCP PCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNH YTQKSLSLSLGK (配列番号 1 0 2)	
hu1803-9D	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFVAWLVKGGGGGG GSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTDYWIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGST YTNYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED AVYYCARGLSTLMAVDYFDYWGGQTTVTVSSAS TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCP CPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHY TQKSLSLSLGK (配列番号 1 0 3)	
hu1803-9E	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFVAWLVKGRGGGG GGSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTDYWIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGS TYTNYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGLSTLMAVDYFDYWGGQTTVTVSSA STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVP SSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCP PCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS	

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 3】

	SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSLGK (配列番号 1 0 4)	
hu1803-9F	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFIAWLVRGGGGGG GSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTDYWIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGST YTNYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGLSTLMAVDYFDYWGGQTTTVTVSSAS TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSLGK (配列番号 1 0 5)	10
hu1803-9G	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFIAWLVRGGGGGG GSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTDYWIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGST YTNYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGLSTLMAVDYFDYWGGQTTTVTVSSAS TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSLGK (配列番号 1 0 6)	20
hu1803-9H	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFIAWLVRGRGGGGG SGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTDYWIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGST YTNYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGLSTLMAVDYFDYWGGQTTTVTVSSAS TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT	30

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 4】

	SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLGLGK (配列番号 1 0 7)	
hu1803-9J	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFVAWLVRGRGGGG GSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTDYWIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGST YTNYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED AVYYCARGLSTLMAVDYFDYWGGGTTTVTVSSAS TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSLGTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLGLGK (配列番号 1 0 8)	
ch1805-D	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFVAWLKGGGGGG GSGGGGSGGGGSEVQLQQSGPELVKPGASVKIPCK TSGYTFTDYNMDWVKQSHGRSLEWIGSIDPDNGG <u>TIYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDTA</u> <u>VYYCTRDIYGGSSWFAYWGQGLVTVSAASTKG</u> PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAP EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLGLGK (配列番号 1 0 9)	ch1805 輕鎖配列: (配列番号 81)
ch1808-D	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFVAWLKGGGGGG	ch1808

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 5】

	GSGGGGSGGGGSQVQLQQSGAELARPGASVKLSC KASGDTFTTNGISWVKQRIGQGLEWIGEIYPRSGN TYYNENFKGKATLTADKSSTTAYMELRRLTSEDS AVYFCAR <u>SITSVIGADYFDY</u> WGQGTTTLTVSSASTK GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTKITYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCP <u>PP</u> CP APEA <u>A</u> GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYT QKSLSLSLGK (配列番号 1 1 0)	軽鎖配列: (配列番号 83)
hu1810-12D	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFVAWLKGGGGGG GSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGGTFSTNYAISWVKQAPGQGLEWIGEIYPTSGNTYY NEKFKGKATLTADRSTSTMYMELSSLRSEDTAVYYCAS GVITTVVSTDYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPL APCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKITYT CNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCP <u>PP</u> CPAPEA <u>A</u> G GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRL TVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLS LGK (配列番号 1 1 1)	hu1810-12 軽鎖配列: (配列番号 85)
ch1817-D	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFVAWLKGGGGGG GSGGGGSGGGGSEVQLVESGGDLVQPGRSMKLSC AASGFTFSNYMAWVRQAPTKGLEWVASISTGGV NTYYRDSVKGRFTISRDNANKNNLYLQMDSLRSEET ATYYCARHTTADYFYGIYFALDAWGQGSVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGKITYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPC P <u>PP</u> CPAPEA <u>A</u> GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP	ch1817 軽鎖配列: (配列番号 87)

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 6】

	SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSLGK (配列番号 1 1 2)	
ch1822-D	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFVAWLVKGGGGGG GSGGGGSGGGGSEVRLVESGGDFVQPGRSVKLSC AASGFTFSNYYMAWVRQAPTKGLEWVGSISTGGV NTYYRDSVKGRFTISRDNAAESTLYLQMDSLRSEET ATYYCARHTTPDYHYGIYFAMDAWGQGTSTVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGKTKYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESKYGPPC PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSEQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSLGK (配列番号 1 1 3)	ch1822 軽鎖 配列: (配列 番号89)

10

20

【0197】

ここで、なるべくならリンカー(GGGGS)₃は二特異性タンパク質におけるリンカーとして使用することができる。他の実施態様では、ポリペプチドの接続について慣習的に用いられるペプチド結合または他のリンカーも使用することができる。本開示の二特異性タンパク質についてのリンカーは(GGGGS)₃の使用に制限されない。GLP-1、GCGR抗体、およびリンカータンパク質フラグメント((GGGGS)₃)をコードするヌクレオチド配列は当技術における慣習的な技術的手段によって得られた。GLP-1のC末端ヌクレオチドは相同組換え技術によってリンカータンパク質を介してGCGR抗体のN末端ヌクレオチドに連結し、およびPhr-BsmBIベクター中にクローン化した。組換えGLP-1/GCGR抗体二特異性タンパク質を293細胞において発現させ、および例6の方法によって精製した。精製したタンパク質は以下の各々の例において使用することができる。

30

【0198】

例6：抗体二特異性タンパク質の精製

40

【0199】

細胞培養培地を高速にて遠心分離し、上清を収集し、および精製の第一のステップとしてアフィニティークロマトグラフィーを受けさせた。クロマトグラフィー媒体はFcまたは誘導体フィラー、例えば、Mabselect, GE (マブセレクト, GE) などのようなものと相互作用するプロテインAであった。平衡化緩衝剤は1×PBS (137mmol (137ミリモル) /L NaCl、2.7mmol/L KCl、10mmol/L Na₂HPO₄、2mmol/L KH₂PO₄、pH7.4) であった。カラムを5×カラム容量で平衡化した後、細胞培養上清を結合のためにロードし、およびカラム上のサンプルの保持時間が≥1分であるように流速を制御した。サンプルをロードした後、A280 UV吸収がベースラインに低下するまで、カラムを1×PBS (pH7.4) で洗浄した。次いで、カラムを0.1Mグリシン (pH3.0) 溶出緩衝剤により

50

洗浄し、A280 UV吸収ピークに基づいて溶出ピークを収集し、および収集した溶出サンプルを1M Tris (pH8.5) により中和した。

【0200】

中和した溶出サンプルを限外ろ過し、および濃縮し、および次いでサイズ排除クロマトグラフィーを受けさせ、そこで緩衝剤は1×PBSであり、クロマトグラフィーカラムはXK26/60 Superdex200 (GE) であり、流速は4ml/分に制御し、およびローディング容量は5ml未満であった。標的タンパク質のピークはA280 UV吸収に基づいてプールした。収集したタンパク質はSEC-HPLCによって識別し、および純度は95%を超えた。LC-MS識別の後、望ましいタンパク質を使用のために分注した。GLP-1/GCGR抗体二特異性タンパク質を取得した。

10

【0201】

テスト例

テスト例1：GCGRキメラ抗体のヒト、マウスおよびカニクイザルGCGRへの結合のELISAアッセイ

【0202】

抗GCGR抗体の結合能力はGCGRを過剰発現するCHO細胞への抗体の結合アッセイによって試験した。ヒト、マウス、およびカニクイザルのGCGR全長プラスミドはトランスフェクション法によってそれぞれCHO細胞に移入した。二週間のプレッシャースクリーニング (pressure screening) 後にGCGRの発現レベルを検出した。GCGR過剰発現細胞を96ウェルプレートの底部に固定した後、抗体を添加し、および抗体のGCGR過剰発現CHO細胞への結合活性を測定するためにシグナル強度を使用した。三種のGCGRsに対する抗体の結合能力は同じ結合アッセイにより検出した。一例として、ヒトGCGRへのGCGR抗体の結合は以下のように具体的に説明するアッセイによって検出した：

20

【0203】

細胞を96ウェルプレートにおいて $0.9-1.0 \times 10^6$ /ml、100 μ l/ウェルの密度にて播種し、および夜通し培養した。上清を処分し、プレートをPBSにより三回洗浄し、100 μ l/ウェルの細胞免疫固定溶液 (Beyotime (ビヨタイム)、Cat No. P0098) を加え、および室温で1時間固定し、およびPBSにより4回洗浄した。液体を処分し、200 μ l/ウェルのブロッキング溶液 (5%スキムミルク (BDスキムミルク、Cat No. 232100) をPBSにより希釈) を加え、および37°Cにてインキュベーターにおいてブロッキングのために3時間インキュベーションした。ブロッキングが終了した後、ブロッキング溶液を処分し、プレートをPBST緩衝剤 (0.05% tween W-20、pH7.4を含むPBS) により3回洗浄し、サンプル希釈溶液により希釈した50 μ l/ウェルの様々な濃度の各々の試験抗体 (ハイブリドーマから精製された抗体、キメラ抗体またはヒト化抗体) を加え、およびインキュベーターにおいて37°Cにて2時間インキュベーションした。インキュベーションを終了した後、プレートをPBST、50 μ l/ウェルのHRP標識ヤギ抗マウス二次抗体 (Jackson Immuno Research、Cat No. 115-035-003) またはサンプル希釈溶液で希釈したヤギ抗ヒト二次抗体 (Jackson Immuno Research、Cat No. 109-035-003) を添加し、および37°Cで1時間インキュベーションした。プレートをPBSTで3回洗浄し、50 μ l/ウェルのTMB発色基質 (KPL、Cat No. 52-00-03) を添加し、室温で10分間インキュベートし、および反応を停止させるために50 μ l/ウェルの1M H_2SO_4 を添加した。マイクロプレートリーダー (Thermo Scientific Multiskan (サーモ・サイエンティフィック・マルチスキャン) MK3) によって450nmの波長にて吸光度値を読み取り、およびGraphPad Prism 5 (グラフパッド・プリズム5) によりデータを分析した。GCGRキメラ抗体のGCGR過剰発現CHO細胞への結合をEC50値として算出した。

30

40

【0204】

50

【表 1 2】

表 1 1. キメラ抗体の結合活性

抗体 EC50 (nM)	ch1803	ch1805	ch1808	ch1810	ch1817	ch1822
ヒト GCGR	0.1167	0.2969	0.6769	0.1168	0.1926	0.3834
マウス GCGR	0.7183	0.3428	1.019	0.4415	0.1638	0.5681
カニクイザル GCGR	0.2128	0.3585	0.5356	0.2480	0.2968	0.4280

10

【0 2 0 5】

結果はキメラ抗体ch1803、ch1805、ch1808、ch1810、ch1817およびch1822がすべて細胞表面上のヒトGCGRに対して好ましい結合活性を有し、およびまたマウスおよびカニクイザルGCGRによる好ましい交差親和性活性を有することを示す。

【0 2 0 6】

テスト例2：GCGRリガンドのGCGRへの結合をブロックするGCGRキメラ抗体のアッセイ
1. 目的：

GCGRキメラ抗体の拮抗活性は、GCGRリガンド（グルカゴン）のGCGRへの結合をブロックするGCGRキメラ抗体のアッセイによって評価した。

20

【0 2 0 7】

2. テスト原理：

CREの下流のルシフェラーゼ遺伝子（ルシフェラーゼ）の発現はcAMPがCREに結合することによって誘導することができる。ルシフェラーゼのその基質への結合によって放出される蛍光シグナルでの変化は抑制効率を反映することができる。CREはルシフェラーゼ遺伝子上流にクローン化され、およびGCGR遺伝子を含むプラスミドによりCHO-K1細胞中にコトランスフェクションされた。CREおよびGCGRの双方を発現するモノクローナル細胞を選定した。GLP-1/GCGR抗体二特異性タンパク質はGCGRに結合するためにグルカゴンと競合し、GCGRの下流のシグナル伝達をブロックし、および下流のcAMPの発現に影響を与えることができる。GCGRに対するGLP-1/GCGR抗体二特異性タンパク質の拮抗活性は蛍光シグナルにおける変化を測定することによって評価することができる。

30

【0 2 0 8】

3. テストサンプル：

キメラ抗体ch1803、ch1805、ch1808、ch1810、ch1817およびch1822。

【0 2 0 9】

4. 実験手順

a. 細胞懸濁物を新鮮な細胞培養培地により調製し、および80 µl培養システムの96ウェル細胞培養プレート中に20,000細胞/ウェルに加え、および5%CO₂、37℃にて16時間インキュベーションした。

40

b. 試験される準備した各々のタンパク質10 µlを各ウェルに加え、次に用意したグルカゴン10 µlを加え、および5%CO₂、37℃にて5時間インキュベーションした。

c. 100 µlの検出溶液ONE Glo（ONEグロー）（Promega（プロメガ））を各ウェルに加え、および室温にて7分間暗所に置いた。

d. マイクロプレートリーダーVictor3（ビクター3）にて蛍光を検出し、およびIC50値と、GCGRリガンド（グルカゴン）のヒト、マウスおよびカニクイザルのGCGRsへの結合をブロックするGCGRキメラ抗体融合体のブロック効率I_{max}とを算出した。

【0 2 1 0】

50

【表 1 3】

表 1 2. キメラ抗体の拮抗活性

抗体	ヒト GCGR		マウス GCGR	
	IC50 (nM)	Imax	IC50 (nM)	Imax (%)
ch1803	79.3	100%	24.7	93%
ch1805	95.03	91%	18	100%
ch1808	105.2	98%	26.6	100%
ch1810	72.46	100%	検出されず	検出されず
ch1817	59.8	83%	12.8	96%
ch1822	62.48	59%	15.96	87%

10

【0 2 1 1】

テスト例3：GCGRリガンドのGCGRへの結合に対するGCGRヒト化抗体のブロッキングアッセイ

GCGR抗体の拮抗活性はGCGRリガンド（グルカゴン）のGCGRへの結合をブロックする抗GCGR抗体のアッセイによって評価した。実験の原理およびステップはテスト例2と同じであり、および結果を次の表において示す：

20

【表 1 4】

表 1 3. ヒト化抗体の拮抗活性

抗体	ヒト GCGR		抗体	ヒト GCGR	
	IC50 (nM)	Imax		IC50 (nM)	Imax
hu1803-1	191.1	91.8%	hu1810-1	189.1	83.2%
hu1803-2	137.12	98.5%	hu1810-2	105.9	100%
hu1803-3	109.55	96.7%	hu1810-3	192.2	95.42%
hu1803-4	139.75	100%	hu1810-4	137.5	99.1%
hu1803-5	79.03	100%	hu1810-5	216.4	86.39%
hu1803-6	77.48	100%	hu1810-6	156.8	100%
hu1803-7	73.04	100%	hu1810-7	119.3	100%
hu1803-8	85.92	100%	hu1810-8	132.9	100%
hu1803-9	78.39	100%	hu1810-9	124.7	90.4%
hu1803-10	76.67	100%	hu1810-10	95.56	97.42%
hu1803-11	88.72	100%	hu1810-11	91.32	99.61%
hu1803-12	86.92	100%	hu1810-12	75.91	99.65%

30

40

【0 2 1 2】

インビトロ生物学的評価

テスト例4：PBSにおけるGLP-1/GCGR抗体二特異性タンパク質の安定性

50

試験する抗体二特異性タンパク質200 µgを1mlの1×PBS (pH7.4) において溶解し、および37℃のインキュベーターにおいて貯蔵し；サンプルは0日目および14日目にそれぞれ採取し、および無傷の重鎖の維持はAgilent (アジレント) 6530 Q-TOFを用いるLC-MSによって検出した。結果を以下の表14に示す。変異を有する各々のGLP-1ペプチド二特異性タンパク質は、GLP-1A (配列番号91) を含む二特異性タンパク質と比較して大幅に増加した安定性を有し、およびhu1803-9B、hu1803-9Dおよびhu1803-9Gはより一層良好な安定性を示す。

【表 1 5】

表 1 4. GLP-1/GCGR抗体二特異性タンパク質の安定性の検出

タンパク質	日数14
hu1803-9A	70.12%
hu1803-9B	≥97%
hu1803-9C	93.98%
hu1803-9D	≥97%
hu1803-9E	94.15%
hu1803-9F	94.65%
hu1803-9G	≥97%

10

20

【0 2 1 3】

テスト例5：細胞ベースのGCGR結合のブロッキングアッセイ
実験の原理およびステップはテスト例2と同じである。

テストサンプル：

- 1) GCGR抗体 (hu1803-9、hu1810-12)
- 2) 二特異性タンパク質：hu1803-9Bおよびhu1803-9D。

30

【表 1 6】

表 1 5. GCGRに対する二特異性タンパク質の拮抗活性

タンパク質	ヒトGCGRに対する拮抗活性	
	IC50 (nM)	Imax (%)
hu1803-9	54	100
hu1803-9B	67	100
hu1803-9D	79	100

40

50

【表 17】

表 16. マウスおよびカニクイザルGCGRに対するヒト化抗体の拮抗活性

抗体	マウス GCGR		カニクイザル GCGR	
	IC 50(nM)	Imax (%)	IC 50(nM)	Imax (%)
hu1803-9	11.22	100%	220	100%
hu1810-12	17.54	97%	886	99%

10

【0214】

図2および表15はhu1803-9Bおよびhu1803-9Dの双方がGCGRの拮抗活性を完全に抑制することができ、およびGCGRモノクローナル抗体と同等の効力およびIC50（最大活性の50%を抑制するのに必要な濃度）を有することを示し、hu1803-9Bおよびhu1803-9Dの双方はGCGR抗体部分の完全な生物学的活性を保持することが指し示される。hu1803-9の検証された拮抗活性およびヒトGCGRを抑制することにおけるhu1803-9を含む二特異性タンパク質に加えて、hu1803-9およびhu1810-12の双方がマウスおよびカニクイザルGCGRを抑制するために拮抗活性を有することがさらに証明された（表16を参照）。

20

【0215】

テスト例6：細胞ベースのGLP-1R結合の活性化アッセイ

1. 目的：

目的はGLP-1RでのGLP-1/GCGR抗体二特異性タンパク質のGLP-1部分の活性化活性を評価することである。

2. テスト原理：

CREの下流にあるルシフェラーゼ遺伝子の発現はcAMPのCREへの結合によって誘導することができる。ルシフェラーゼのその基質への結合によって放出される蛍光シグナルでの変化は抑制効率を反映することができる。CREはルシフェラーゼ遺伝子上流にクローン化され、およびGLP-1R遺伝子を含むプラスミドによりCHO-K1細胞中にコトランスフェクションした。CREおよびGLP-1Rの双方を高度に発現するモノクローナル細胞を選定した。GLP-1/GCGR抗体二特異性タンパク質およびデュラグルチド（陽性コントロール）の双方がGLP-1Rに結合し、GLP-1Rの下流のシグナル伝達を活性化し、および下流のcAMPの発現を刺激することができる。GLP-1RについてのGLP-1/GCGR抗体二特異性タンパク質の不可知論的（agnostic）活性は蛍光シグナルでの変化を測定することによって評価することができる。

30

3. テストサンプル：

1) 陽性コントロール：デュラグルチド

2) hu1803-9B、hu1803-9D。

4. 実験手順

a. 細胞懸濁物を新鮮な細胞培養培地により調製し、および90 μ l培養システムの96ウェル細胞培養プレート中に25000細胞/ウェルで添加し、および5%CO₂、37℃にて16時間インキュベーションした。

b. 試験される準備した各々のタンパク質10 μ lを各ウェル中に加え、および5%CO₂、37℃にて5時間インキュベーションした。

c. 100 μ lの検出溶液ONE Glo（Promega）を各ウェルに加え、および室温にて7分間暗所に置いた。

d. マイクロプレートリーダーVictor3での蛍光を検出し、および結合によってGLP-1Rを活性化するためのGLP-1/GCGR抗体二特異性タンパク質のEC50値を算出した。

40

【0216】

50

【表 18】

表 17. GLP-1Rでの二特異性タンパク質の活性化活性

タンパク質	EC50 (nM)	Emax (%)
デュラグルチド	0.21	100
hu1803-9B	0.22	100
hu1803-9D	0.32	100

10

図3および表17は、hu1803-9Bおよびhu1803-9Dの双方がGLP-1Rを完全に活性化し、および陽性コントロール（デュラグルチド）のものと同等の有効性およびEC50（最大活性の50%を活性化するのに必要な濃度）を有することができることを示し、hu1803-9Bおよびhu1803-9Dの双方はGLP-1部分の完全な生物学的活性を保持することが指し示される。

【0217】

【表 19】

表 18. ヒトGLP-1Rでの二特異性タンパク質の活性化活性

サンプル	EC50(nM)	Emax%
ch1805-D	0.11	108
ch1808-D	0.14	107
ch1817-D	0.30	106

20

表18はGLP1ペプチドに連結したすべてのキメラ抗体ch1805-D、ch1808-Dおよびch1817-DがGLP-1Rを完全に活性化することができ、および陽性コントロール（デュラグルチド）のものと同等の有効性およびEC50（最大活性の50%を活性化するために必要な濃度）を有することを示し、ここに開示するようなマナーにおいて様々なGCGR抗体をGLP1ペプチドに連結することによって形成される二特異性タンパク質がGLP1ペプチドの生物学的活性に影響を及ぼさないことが指し示される。

30

【0218】

薬物動態評価

テスト例7：C57マウスにおけるインビボ薬物動態検出

雌性の4匹の実験用C57マウスは12/12時間の明暗サイクル調節、 $24 \pm 3^\circ\text{C}$ の一定温度、湿度50-60%、および水と食餌への自由なアクセスにて維持した。マウスはJiesijie Laboratory Animal Co., Ltd.（チエシジエ・ラボラトリー・アニマル社）から購入した。試験の当日、等モルのhu1803-9Dおよび陽性コントロール薬物のデュラグルチドをC57マウスの尾静脈中にそれぞれ6mg/kgおよび2.35mg/kgの用量にて、および10ml/kgの注入容量にて注入した。

40

【0219】

本開示のGLP-1/GCGR抗体二特異性タンパク質および陽性コントロールデュラグルチドの双方がマウスとの交差活性を有するので、マウスにおける薬物代謝の時間はより一層短い。採血のために選定した時点は次の：投与後1日目の0時間、1時間、24時間（2日目）、および3日目であった。血液はマウスの網膜静脈から毎回150μlを収集した（1.5μlのDPP-4インヒビターを血液収集前に採血管に加えた）。収集した血液サンプルを凝固

50

するまで4℃にて30分間置き、および次いで14000×gにて5分間4℃にて遠心分離した。上清（約80μl）を収集し、およびすぐに-80℃にて貯蔵した。

【0220】

検出プロセスは以下のように説明される：

a. 1μg/mLの抗GLP1（Novus（ノーバス）、NBP1-05180）抗体を4℃で夜通しプレートに置いた。

b. 250μlの1×PBSTで4回洗浄し、5%ミルクを含む200μlのPBSを加え、および37℃にて3時間ブロックした。

c. 250μlの1×PBSTで4回洗浄し、マウスブランク血清により勾配希釈した100μlの試験薬物を加え、および37℃にて2時間インキュベーションした。

d. 250μlの1×PBSTで3回洗浄した。

e. 100μlの西洋ワサビペルオキシダーゼ標識二次抗体抗ヒトIgG Fcを各ウェルに加え、および37℃にて1時間インキュベーションした。

f. 250μlの1×PBSTで3回洗浄した。

g. 100μlのTMBを各ウェルに加え、室温にて10分間インキュベーションし、および次いで反応を停止させるために100μlの1M H₂SO₄を加えた。

h. マイクロプレートリーダーでの450nmにて吸光度を測定し、Graphpad Prism 5によりデータを分析した。

【表20】

表19. マウスにおける二特異性タンパク質のT1/2

試験薬物	施与のモード	T1/2 (h)
hu1803-9D	IV (6 mg/kg)	23.4
デュラグルチド	IV (2.35 mg/kg)	10

PK分析の結果はマウスにおける本開示の二特異性タンパク質分子hu1803-9Dの半減期が約23.4時間であり、それは陽性コントロール薬物の半減期の2倍ほどであることを示す。

【0221】

インビボ生物学的活性の評価

テスト例8：ob/obマウスにおけるインビボ薬効テスト

1. この試験で使用したマウス系統は糖尿病のob/obマウスおよび同じ齢の野生型マウスであった（(Institute of Model Animals, Nanjing University（モデル動物研究所、南京大学））。目的はob/obマウスにおいて連続施与した後の糖尿病関連指標、例えば、血糖、糖化ヘモグロビン、体重および食物摂取などのようなものに対するGLP-1/GCGR抗体二特異性タンパク質の処置効果を観察することである。

【0222】

試験の前に、動物モデルは試験日にてランダムおよび空腹時重量、ランダムおよび空腹時血糖に従って、それぞれ6つのグループに分けた：

モデルコントロールグループ、2.84mg/kgおよび1.42mg/kg GCGRモノクローナル抗体グループ（hu1803-9）、1.16mg/kg陽性コントロールグループ（デュラグルチド）ならびに3mg/kgおよび1.5mg/kg hu1803-9D。コントロールグループにおけるマウスはリン酸緩衝剤を皮下注射し（S.C.）、および各グループでのマウスは週に一回（午前9時）、合計4回皮下注射した（表20）。

10

20

30

40

50

【表 2 1】

表 2 0. 試験グループおよび投薬状況

グループ	処置	用量	投薬頻度	施与のモード
1	ob/ob マウスモデルコントロールグループ	PBS	週一回×4週	S.C.
2	GCGR モノクローナル抗体, 低用量グループ	1.42mpk	週一回×4週	S.C.
3	GCGR モノクローナル抗体, 高用量グループ	2.84mpk	週一回×4週	S.C.
4	陽性コントロール, 高用量グループ	1.16mpk	週一回×4週	S.C.
4	hu1803-9D 低用量グループ	1.5mpk	週一回×4週	S.C.
5	hu1803-9D 高用量グループ	3mpk	週一回×4週	S.C.

10

20

【0 2 2 3】

2. 実験手順

- a. 空腹時およびランダム体重は週一回測定し、ならびに食物および水の摂取は日に一回測定した。
- b. 血糖は最初の施与前および施与後1、2、3、および7日目にランダムに測定し、および次いでその後週一回測定した。6時間の絶食後の血糖は最初の施与前および施与後3および7日目に測定し、および次いで空腹時血糖は週一回測定した。
- c. 施与の26日目に、動物を6時間絶食させた後（8：00-14：00）、2g/kgのグルコース溶液の単一用量を腹腔内投与し、およびグルコース投与時間を0として記録した。グルコース投与の前0分、およびグルコース投与の後15、30、60、90、および120分に血糖について試験した。時間に対する血糖データに基づいて耐糖能曲線を描き、および曲線下面積（AUC）を算出した。
- d. 実験後、マウスを6時間絶食させ（8：00-14：00）、および次いで安楽死させた。血液サンプルを心臓から採取し、全血を二つの部分に分け、約30μlの一部分は抗凝固剤を事前に加えた遠心分離管中に加え、および糖化ヘモグロビンの測定のために貯蔵し、および他の部分はベンチ上に置いておき、および次いでTG、FFA、CHOL、HDLおよびLDLレベルの測定について血清を取得するために遠心分離した。
- e. データはgraphpad Prism 6ソフトウェアによって分析し、およびStudent-t検定をデータの統計分析のために使用した。

30

40

【0 2 2 4】

3. 実験結果：

1) ob/obマウスにおけるランダム血糖濃度に対する長期投与の影響：

図4に示すように、実験全体の間、ランダム血糖はob/obマウスのモデルコントロールグループにおいて高レベルに維持される。各々の投与グループにおけるランダム血糖値は各薬剤を異なる用量にて週一回皮下注射した後、様々な程度に減少し、モデルコントロールグループにおけるものよりも有意に低い好ましい用量効率が示される。2.84mg/kgのhu1803-9および3mg/kgのhu1803-9Dの投与は他の試験グループと比較して血糖値を下げることで大幅に改善された効果を見せるが、その一方3、6、14および30日目に投与した3mg/kgのhu1803-9Dはランダム血糖を低下させることに対してより一層良

50

好な効果を示す。

【0225】

2) ob/obマウスにおける空腹時血糖に対する長期投与の効果：

図5に示すように、実験全体の間、ob/obマウスのモデルコントロールグループにおいてランダム血糖が高レベルに維持された。各々の投与グループにおける空腹時血糖値は各薬剤を異なる用量で週一回皮下注射した後、様々な程度に減少し、モデルコントロールグループよりも有意に低い好ましい用量効率が見られる。ランダムな血糖濃度の試験と同様に、2.84 mg/kgのhu1803-9および3 mg/kgのhu1803-9Dの投与は他の試験グループと比較して血糖値を下げることで大幅に向上した効果を見せるが、3、6、13および30日目に投与した3 mg/kgのhu1803-9Dは空腹時血糖の低下に対してより一層良好な効果を示す。

10

【0226】

3) ob/obマウスにおけるグリコシル化ヘモグロビン（HbA1c）に対する長期投与の効果：

結果を表21に示す。各投与グループにおける糖化ヘモグロビンレベルは各薬剤を異なる用量で週一回皮下注射してから30日後に様々な程度に減少し、およびモデルコントロールグループのものよりも有意に低い（ $P < 0.05$ ）。3 mg/kgおよび1.5 mg/kgのhu1803-9Dグループにおける糖化ヘモグロビンレベルはそれぞれ $5.5 \pm 0.2\%$ および $4.7 \pm 0.1\%$ であり、有意な用量-効力関係が見られ；中でも、3 mg/kgのhu1803-9Dグループは等モルの1.16 mg/kg陽性コントロールのデュラグルチドおよび2.84 mg/kg GCGRモノクローナル抗体hu1803-9よりも低いレベルを有する（ $P < 0.05$ ）。

20

【表22】

表21. ob/obマウスにおけるHbA1c%に対する長期投与の効果

グループ	HbA1c (%)	増加率%
ob/ob モデルコントロールグループ	6.3 ± 0.3	-
hu1803-9-1.42mpk	5.2 ± 0.1	17.46%
hu1803-9-2.84mpk	5.2 ± 0.1	17.46%
デュラグルチド-1.16mpk	5.6 ± 0.1	11.1%
hu1803-9D-1.5mpk	5.5 ± 0.2	12.7%
hu1803-9D-3mpk	4.7 ± 0.1	25.4%

30

【0227】

テスト例9：GCGR抗体の競合ELISAアッセイ

40

GCGR抗体によって結合されたGCGRエピトープはELISAアッセイによって分類され、ここではGCGR過剰発現CHO細胞に対する異なる濃度の標準抗体を有するビオチン標識抗体の競合的結合が検出された。細胞プレートの準備のための方法はテスト例1のものと同一である。次に続く具体的な手順は以下のようである：

抗体はビオチン標識キットの指示（Dojindo Molecular Technologies, Inc.（ドウジンドウ・モレキュラー・テクノロジーズ社、同人化学株式会社）LK03）に従って標識した。非標識試験抗体は96ウェルセルプレートにおいてサンプル希釈溶液を用いて50 μl/ウェルで様々な濃度に希釈し、および37℃にて2時間インキュベーションした。インキュベーション終了後、プレートをPBSTで3回洗浄し、サンプル希釈溶液で希釈した50 μl/ウェルのビオチン標識抗体を0.1 μg/mlの濃度にて加え、37℃で2時間インキュベ

50

ーションし、プレートにPBSTで3回洗浄し、およびHRP標識ヤギ抗ヒト二次抗体（JacksoW ImmuWo Research、Cat Wo. 109-035-003）を加え、および37℃にて1時間インキュベーションした。プレートにPBSTで3回洗浄し、50 μl/ウェルのTMB発色基質（KPL、Cat No. 52-00-03）を加え、室温で10分間インキュベーションし、および50 μl/ウェルの1MのH₂SO₄を反応停止のために加えた。マイクロプレートリーダー（Thermo Scientific Multiskan MK3）によって450nmの波長にて吸光度値を読み取り、およびGraphPad Prism 5によりデータを分析した。

【0228】

競合のために細胞プレートに結合したビオチン標識抗体の濃度が低いほど、OD値は低くなり、および逆もまた同様である。競合効率は次の式に従って算出した：

$IC\% = (\text{試験抗体最高OD}_{450nm} - \text{試験抗体最小OD}_{450nm}) / (\text{試験抗体最高OD}_{450nm} - \text{標識抗体最小OD}_{450nm})$ 、結果を以下の表22に示す。

【表23】

表22. 抗体の中での競合的結合関係

抗体	競合的抗体				
	ch1808	hu1803-9	hu1810-12	ch1817	ch1822
ch1805	100%	100%	100%	-	-
ch1808	100%	46.60%	54.30%	-	-
hu1803-9	100%	100%	100%	-	-
hu1810-12	100%	100%	100%	-	-
ch1817	-	-	-	100%	100%
ch1822	-	-	-	75.40%	100%

【0229】

結果はch1817およびch1822が非常に近いエピトープを有し；ch1808、hu1803-9およびhu1810-12が非常に近いエピトープを有し；その一方、ch1808、hu1803-9およびhu1810-12によって結合するエピトープがch1805によって結合するエピトープの範囲内にあると考えられることを示す。

【図面】

【図1】

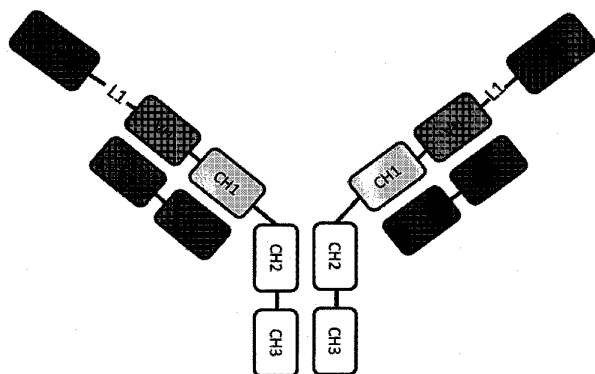
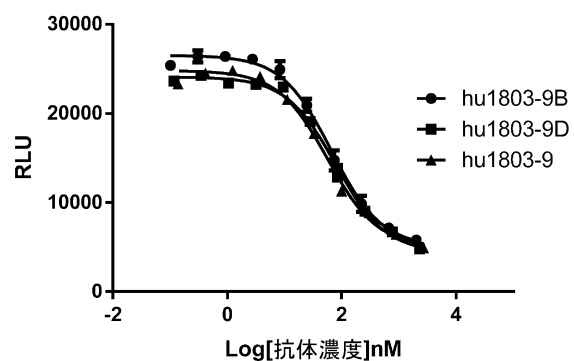


图1

【図2】



10

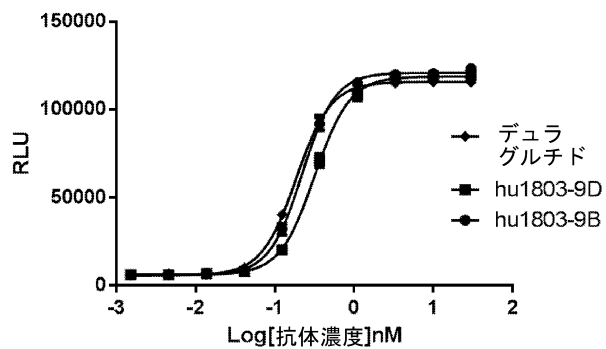
20

30

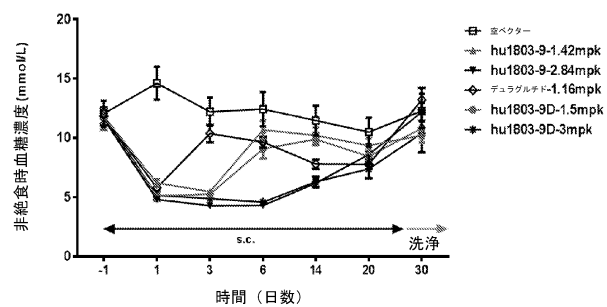
40

50

【図 3】

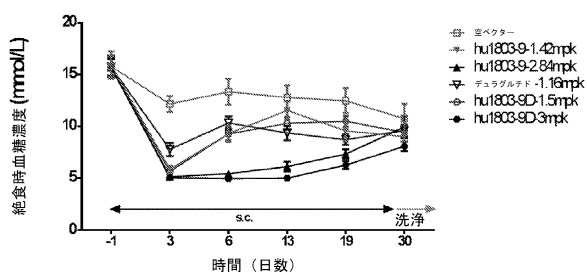


【図 4】



10

【図 5】



20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2019/126903
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K 16/28(2006.01)i; C07K 16/00(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 3/10(2006.01)i; C12N 1/15(2006.01)i; C12N 15/09(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K C12N A61K A61P Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS, CNKI, CNTXT, DWPI, SIPOABS, EPTXT, USTXT, WOTXT, JPTXT, NCBI, 中国专利生物序列检索系统, Genbank, EMBL, STN和检索项: 胰高血糖素受体, GCGR, 抗体, 人源化, GLP-1肽, 双特异性, SEQ ID Nos: 2, 3, 58-64, 79, 100-108		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 103314011 A (REGENERON PHARMACEUTICALS INC.) 18 September 2013 (2013-09-18) claims 1-22	1-23 (in part)
A	CN 108025060 A (BEIJING COSCI REMD BIO MED TECH COMPANY LTD) 11 May 2018 (2018-05-11) claims 1-32	1-23 (in part)
A	WO 2018140729 A1 (NGM BIOPHARMACEUTICALS INC.) 02 August 2018 (2018-08-02) claims 1-65	1-23 (in part)
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 24 February 2020		Date of mailing of the international search report 16 March 2020
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088 China		Authorized officer Telephone No.
Facsimile No. (86-10)62019451		

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/126903

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

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

1. ☒ Claims Nos.: **24, 25**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] PCT Rule 39.1(iv) – methods for treatment of the human or animal body by surgery or therapy.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

- [1] Invention 1: an anti-GCGR monoclonal antibody m1803, the amino acid sequences of the heavy chain and light chain variable regions of the antibody respectively being SEQ ID NOs: 2 and 3; 12 humanised antibodies thereof (the amino acid sequences of the heavy chain and light chain variable regions thereof respectively being SEQ ID NOs: 61 and 58, 61 and 59, 61 and 60, 62 and 58, 62 and 59, 62 and 60, 63 and 58, 63 and 59, 63 and 60, 64 and 58, 64 and 59, and 64 and 60); 9 dual-specificity proteins containing GLP-1 peptide and the anti-GCGR antibody (the amino acid sequences of the first peptide chain and the second peptide chain respectively being SEQ ID NOs: 100 and 79, 101 and 79, 102 and 79, 103 and 79, 104 and 79, 105 and 79, 106 and 79, 107 and 79, and 108 and 79); a corresponding pharmaceutical composition, nucleic acid, carrier, preparation method and reagent for detecting human GCGR in a sample.
- [2] Invention 2: an anti-GCGR monoclonal antibody m1805, the amino acid sequences of the heavy chain and light chain variable regions of the antibody respectively being SEQ ID NOs: 4 and 5; a dual-specificity protein containing GLP-1 peptide and the anti-GCGR antibody (the amino acid sequences of the first peptide chain and the second peptide chain respectively being SEQ ID NOs: 109 and 81); a corresponding pharmaceutical composition, nucleic acid, carrier, preparation method and reagent for detecting human GCGR in a sample.
- [3] Invention 3: an anti-GCGR monoclonal antibody m1808, the amino acid sequences of the heavy chain and light chain variable regions of the antibody respectively being SEQ ID NOs: 6 and 7; a dual-specificity protein containing GLP-1 peptide and the anti-GCGR antibody (the amino acid sequences of the first peptide chain and the second peptide chain respectively being SEQ ID NOs: 110 and 83); a corresponding pharmaceutical composition, nucleic acid, carrier, preparation method and reagent for detecting human GCGR in a sample.
- [4] Invention 4: an anti-GCGR monoclonal antibody m1810, the amino acid sequences of the heavy chain and light chain variable regions of the antibody respectively being SEQ ID NOs: 8 and 9; 12 humanised antibodies thereof (the amino acid sequences of the heavy chain and light chain variable regions thereof respectively being SEQ ID NOs: 68 and 65, 68 and 66, 68 and 67, 69 and 65, 69 and 66, 69 and 67, 70 and 65, 70 and 66, 70 and 67, 71 and 65, 71 and 66, and 71 and 67); a dual-specificity protein containing GLP-1 peptide and the anti-GCGR antibody (the amino acid sequences of the first peptide chain and the second peptide chain respectively being SEQ ID NOs: 111 and 85); a corresponding pharmaceutical composition, nucleic acid, carrier, preparation method and reagent for detecting human GCGR in a sample.
- [5] Invention 5: an anti-GCGR monoclonal antibody m1817, the amino acid sequences of the heavy chain and light chain variable regions of the antibody respectively being SEQ ID NOs: 10 and 11; a dual-specificity protein containing GLP-1 peptide and the anti-GCGR antibody (the amino acid sequences of the first peptide chain and the second peptide chain respectively being SEQ ID NOs: 112 and 87); a corresponding pharmaceutical composition, nucleic acid, carrier, preparation method and reagent for detecting human GCGR in a sample.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/126903

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

[6] Invention 6: an anti-GCGR monoclonal antibody m1822, the amino acid sequences of the heavy chain and light chain variable regions of the antibody respectively being SEQ ID NOs: 12 and 13; a dual-specificity protein containing GLP-1 peptide and the anti-GCGR antibody (the amino acid sequences of the first peptide chain and the second peptide chain respectively being SEQ ID NOs: 113 and 89); a corresponding pharmaceutical composition, nucleic acid, carrier, preparation method and reagent for detecting human GCGR in a sample.

10

[7] The corresponding technical feature shared by inventions 1-6, "an anti-GCGR monoclonal antibody", is disclosed by document 1 (CN 103314011 A, 18 September 2013, see claims 1-8). Therefore, the technical solutions set forth in claims 1-23 do not belong to a single general inventive concept, do not have a technical relationship, do not have a same or corresponding special technical feature, lack unity, and thus do not satisfy the criteria of PCT Rules 13.1 and 13.2.

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

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

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

20

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: **Claims 1-23 (in part, i.e. the anti-GCGR monoclonal antibody m1803 and the humanised antibodies thereof, and the dual-specificity protein composed of GLP-1, i.e. SEQ ID NOs: 2, 3, 58-64, 79 and 100-108).**

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

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

30

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/126903

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	103314011	A	18 September 2013	US	10233250	B2	19 March 2019
				SG	10201500198T	A	30 March 2015
				BR	112013012782	A2	13 September 2016
				CA	2818426	A1	31 May 2012
				KR	20190023110	A	07 March 2019
				KR	101952786	B1	04 March 2019
				KR	102048666	B1	26 November 2019
				CN	103314011	B	25 November 2015
				MX	2013005757	A	05 July 2013
				NZ	610734	A	29 May 2015
				AR	083972	A1	10 April 2013
				US	2015337045	A1	26 November 2015
				EP	2643355	A2	02 October 2013
				TW	201305209	A	01 February 2013
				AU	2011331998	B2	21 July 2016
				WO	2012071372	A3	03 January 2013
				EA	029669	B1	30 April 2018
				US	9127068	B2	08 September 2015
				IL	226399	D0	31 July 2013
				WO	2012071372	A2	31 May 2012
				JP	6100697	B2	22 March 2017
				US	2012128679	A1	24 May 2012
				JP	2014501512	A	23 January 2014
				US	2019144552	A1	16 May 2019
				US	2017129960	A1	11 May 2017
				IL	226399	A	29 February 2016
				US	2013344538	A1	26 December 2013
				SG	10201906478V	A	27 August 2019
				EP	2643355	B1	23 October 2019
				EA	201370126	A1	30 December 2013
				MX	336943	B	08 February 2016
				TW	1586686	B	11 June 2017
				US	8545847	B2	01 October 2013
				US	9587029	B2	07 March 2017
				CL	2013001468	A1	21 March 2014
				KR	20140009264	A	22 January 2014
				UY	33748	A	31 May 2012
				SG	190398	A1	28 June 2013
				AU	2011331998	A1	09 May 2013
CN	108025060	A	11 May 2018	EP	3151855	A2	12 April 2017
				BR	112016028726	A2	07 November 2017
				AU	2015273199	A1	19 January 2017
				EP	3151855	A4	15 November 2017
				CA	2950695	A1	17 December 2015
				MX	2016016210	A	20 July 2017
				WO	2015189698	A2	17 December 2015
				WO	2015189698	A3	10 March 2016
				KR	20170023066	A	02 March 2017
				US	2017240641	A1	24 August 2017
				JP	2017522368	A	10 August 2017

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2015)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/126903

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2018140729	A1	02 August 2018	CA	3048913	A1	02 August 2018
				IL	267638	D0	29 August 2019
				PE	20191404	A1	04 October 2019
				CL	2019002081	A1	20 December 2019
				SG	11201906682 Y	A	27 August 2019
				EP	3573651	A1	04 December 2019
				US	2018273629	A1	27 September 2018
				KR	20190113815	A	08 October 2019
				CN	110520151	A	29 November 2019
				AU	2018213374	A1	11 July 2019

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/126903

A. 主题的分类 C07K 16/28(2006.01)i; C07K 16/00(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 3/10(2006.01)i; C12N 1/15(2006.01)i; C12N 15/09(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C07K C12N A61K A61P 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNABS, CNKI, CNTXT, DWPI, SIPOABS, EPTXT, USTXT, WOTXT, JPTXT, NCBI, 中国专利生物序列检索系统, Genbank, EMBL, STN和检索项: 胰高血糖素受体, GCGR, 抗体, 人源化, GLP-1肽, 双特异性, SEQ ID Nos: 2、3、58-64、79、100-108		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 103314011 A (瑞泽恩制药有限公司) 2013年 9月 18日 (2013 - 09 - 18) 权利要求1-22	1-23 (部分)
A	CN 108025060 A (瑞美德生物医药科技有限公司) 2018年 5月 11日 (2018 - 05 - 11) 权利要求1-32	1-23 (部分)
A	WO 2018140729 A1 (NGM BIOPHARMACEUTICALS INC) 2018年 8月 2日 (2018 - 08 - 02) 权利要求1-65	1-23 (部分)
☐ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 2020年 2月 24日		国际检索报告邮寄日期 2020年 3月 16日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		受权官员 王翔宇 电话号码 62411992

PCT/ISA/210 表(第2页) (2015年1月)

10

20

30

40

50

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/126903

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求： 24、25
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] PCT细则39.1(iv) — 处置人体或者动物体的外科手术方法或治疗方法
2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：
3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

10

20

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：

- [1] 发明1：抗GCGR单克隆抗体m1803，所述抗体的重链和轻链可变区的氨基酸序列分别是SEQ ID No：2和3；其12种人源化抗体（其重链和轻链可变区的氨基酸序列分别是SEQ ID Nos：61、58、61、59、61、60、62、58、62、59、62、60、63、58、63、59、63、60、64、58、64、59、64、60）；包含GLP-1肽和抗GCGR抗体的双特异性蛋白9种（第一肽链和第二肽链的氨基酸序列分别是：SEQ ID Nos：100、79、101、79、102、79、103、79、104、79、105、79、106、79、107、79、108、79）；相应的药物组合物、核酸、载体、制备方法以及检测样本中人GCGR的试剂。
- [2] 发明2：抗GCGR单克隆抗体m1805，所述抗体的重链和轻链可变区的氨基酸序列分别是SEQ ID No：4和5；包含GLP-1肽和抗GCGR抗体的双特异性蛋白（第一肽链和第二肽链的氨基酸序列分别是：SEQ ID Nos：109、81）；相应的药物组合物、核酸、载体、制备方法以及检测样本中人GCGR的试剂。
- [3] 发明3：抗GCGR单克隆抗体m1808，所述抗体的重链和轻链可变区的氨基酸序列分别是SEQ ID No：6和7；包含GLP-1肽和抗GCGR抗体的双特异性蛋白（第一肽链和第二肽链的氨基酸序列分别是：SEQ ID No：110、83）；相应的药物组合物、核酸、载体、制备方法以及检测样本中人GCGR的试剂。
- [4] 发明4：抗GCGR单克隆抗体m1810，所述抗体的重链和轻链可变区的氨基酸序列分别是SEQ ID No：8和9；其12种人源化抗体（其重链和轻链可变区的氨基酸序列分别是SEQ ID Nos：68、65、68、66、68、67、69、65、69、66、69、67、70、65、70、66、70、67、71、65、71、66、71、67）；包含GLP-1肽和抗GCGR抗体的双特异性蛋白（第一肽链和第二肽链的氨基酸序列分别是：SEQ ID Nos：111、85）；相应的药物组合物、核酸、载体、制备方法以及检测样本中人GCGR的试剂。
- [5] 发明5：抗GCGR单克隆抗体m1817，所述抗体的重链和轻链可变区的氨基酸序列分别是SEQ ID No：10和11；包含GLP-1肽和抗GCGR抗体的双特异性蛋白（第一肽链和第二肽链的氨基酸序列分别是：SEQ ID Nos：112、87）；相应的药物组合物、核酸、载体、制备方法以及检测样本中人GCGR的试剂。
- [6] 发明6：抗GCGR单克隆抗体m1822，所述抗体的重链和轻链可变区的氨基酸序列分别是SEQ ID No：12和13；包含GLP-1肽和抗GCGR抗体的双特异性蛋白（第一肽链和第二肽链的氨基酸序列分别是：SEQ ID Nos：113、89）；相应的药物组合物、核酸、载体、制备方法以及检测样本中人GCGR的试剂。
- [7] 由于发明1-6之间相应的技术特征“抗GCGR单克隆抗体”已经被文献1所公开（CN103314011 A 20130918，参见权利要求1-8）。因此，权利要求1-23之间所要求保护的技术方案不属于一个总的发明构思，技术上无相互关联，没有相同或者相应的特定技术特征，不具备单一性，因此不符合PCT细则13.1和13.2的规定。

30

40

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2019/126903
第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第I页第3项)		
1. ☐ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。 2. ☐ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何加费。 3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求，具体地说，是权利要求； 4. ☒ 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是： 权利要求1-23(部分, 即抗GCGR单克隆抗体m1803及其人源化抗体、和GLP-1组成的双特异性蛋白，即SEQ ID Nos: 2、3、58-64、79、100-108)		10
对异议的意见	☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。 ☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。 ☐ 缴纳附加检索费时未提交异议书。	20
		30
		40

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/126903

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN 103314011 A	2013年 9月 18日	US 10233250 B2	2019年 3月 19日
		SG 10201500198T A	2015年 3月 30日
		BR 112013012782 A2	2016年 9月 13日
		CA 2818426 A1	2012年 5月 31日
		KR 20190023110 A	2019年 3月 7日
		KR 101952786 B1	2019年 3月 4日
		KR 102048666 B1	2019年 11月 26日
		CN 103314011 B	2015年 11月 25日
		MX 2013005757 A	2013年 7月 5日
		NZ 610734 A	2015年 5月 29日
		AR 083972 A1	2013年 4月 10日
		US 2015337045 A1	2015年 11月 26日
		EP 2643355 A2	2013年 10月 2日
		TW 201305209 A	2013年 2月 1日
		AU 2011331998 B2	2016年 7月 21日
		WO 2012071372 A3	2013年 1月 3日
		EA 029669 B1	2018年 4月 30日
		US 9127068 B2	2015年 9月 8日
		IL 226399 D0	2013年 7月 31日
		WO 2012071372 A2	2012年 5月 31日
		JP 6100697 B2	2017年 3月 22日
		US 2012128679 A1	2012年 5月 24日
		JP 2014501512 A	2014年 1月 23日
		US 2019144552 A1	2019年 5月 16日
		US 2017129960 A1	2017年 5月 11日
		IL 226399 A	2016年 2月 29日
		US 2013344538 A1	2013年 12月 26日
		SG 10201906478V A	2019年 8月 27日
		EP 2643355 B1	2019年 10月 23日
		EA 201370126 A1	2013年 12月 30日
		MX 336943 B	2016年 2月 8日
		TW 1586686 B	2017年 6月 11日
		US 8545847 B2	2013年 10月 1日
		US 9587029 B2	2017年 3月 7日
		CL 2013001468 A1	2014年 3月 21日
		KR 20140009264 A	2014年 1月 22日
		UY 33748 A	2012年 5月 31日
		SG 190398 A1	2013年 6月 28日
		AU 2011331998 A1	2013年 5月 9日
CN 108025060 A	2018年 5月 11日	EP 3151855 A2	2017年 4月 12日
		BR 112016028726 A2	2017年 11月 7日
		AU 2015273199 A1	2017年 1月 19日
		EP 3151855 A4	2017年 11月 15日
		CA 2950695 A1	2015年 12月 17日
		MX 2016016210 A	2017年 7月 20日
		WO 2015189698 A2	2015年 12月 17日
		WO 2015189698 A3	2016年 3月 10日
		KR 20170023066 A	2017年 3月 2日
		US 2017240641 A1	2017年 8月 24日
		JP 2017522368 A	2017年 8月 10日

PCT/ISA/210 表(同族专利附件) (2015年1月)

10

20

30

40

50

国际申请号

PCT/CN2019/126903

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
W0	2018140729	A1	2018年 8月 2日	CA	3048913	A1	2018年 8月 2日
				IL	267638	D0	2019年 8月 29日
				PE	20191404	A1	2019年 10月 4日
				CL	2019002081	A1	2019年 12月 20日
				SG	11201906682Y	A	2019年 8月 27日
				EP	3573651	A1	2019年 12月 4日
				US	2018273629	A1	2018年 9月 27日
				KR	20190113815	A	2019年 10月 8日
				CN	110520151	A	2019年 11月 29日
				AU	2018213374	A1	2019年 7月 11日

PCT/ISA/210 表(同族专利附件) (2015年1月)

10

20

30

40

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

4 H 0 4 5

C 0 7 K 16/28 (2006.01)
 C 1 2 N 1/15 (2006.01)
 C 1 2 N 1/19 (2006.01)
 C 1 2 N 1/21 (2006.01)
 C 1 2 N 5/10 (2006.01)
 C 1 2 P 21/08 (2006.01)
 C 1 2 P 21/02 (2006.01)
 A 6 1 K 39/395 (2006.01)
 A 6 1 K 47/68 (2017.01)
 A 6 1 K 38/22 (2006.01)
 A 6 1 P 3/00 (2006.01)
 A 6 1 P 3/04 (2006.01)
 A 6 1 P 3/10 (2006.01)
 A 6 1 P 5/50 (2006.01)
 A 6 1 P 9/10 (2006.01)
 A 6 1 P 3/06 (2006.01)

C 0 7 K 16/28
 C 1 2 N 1/15
 C 1 2 N 1/19
 C 1 2 N 1/21
 C 1 2 N 5/10
 C 1 2 P 21/08
 C 1 2 P 21/02 C
 A 6 1 K 39/395 N
 A 6 1 K 47/68
 A 6 1 K 39/395 L
 A 6 1 K 38/22
 A 6 1 P 3/00
 A 6 1 P 3/04
 A 6 1 P 3/10
 A 6 1 P 5/50
 A 6 1 P 9/10 1 0 1
 A 6 1 P 3/06

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

中華人民共和国 シャンハイ, ミンシン・ディストリクト, ウェンジン・ロード No. 279

(74)代理人

100147485

弁理士 杉村 憲司

(74)代理人

230118913

弁理士 杉村 光嗣

(74)代理人

100175477

弁理士 高橋 林太郎

(72)発明者

カオ チュオシャオ

中華人民共和国 200245 シャンハイ ミンハン ディストリクト ウェンジン ロード ナンバ
 ー 279

(72)発明者

ルオ シャオ

中華人民共和国 200245 シャンハイ ミンハン ディストリクト ウェンジン ロード ナンバ
 ー 279

(72)発明者

ホー ニン

中華人民共和国 200245 シャンハイ ミンハン ディストリクト ウェンジン ロード ナンバ
 ー 279

(72)発明者

フ キユウ

中華人民共和国 200245 シャンハイ ミンハン ディストリクト ウェンジン ロード ナンバ
 ー 279

(72)発明者

チャン リアンシャン

中華人民共和国 200245 シャンハイ ミンハン ディストリクト ウェンジン ロード ナンバ
 ー 279

(72)発明者

タオ ウェイカン

中華人民共和国 200245 シャンハイ ミンハン ディストリクト ウェンジン ロード ナンバ
 ー 279

F ターム (参考)	4B064	AG15 AG27 CA02 CA05 CA06 CA10 CA19 CC24 DA01
	4B065	AA01X AA57X AA72X AA87X AB01 BA02 CA44
	4C076	AA95 BB03 CC11 CC16 CC21 EE41 EE59 FF67 FF68
	4C084	AA02 AA07 BA01 BA08 BA44 DB37 MA02 MA05 NA05 NA13 NA14 ZA45 ZA70 ZC21 ZC33 ZC35
	4C085	AA14 AA25 BB07 CC21 DD62 EE01 EE05 GG01
	4H045	AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 DA30 DA76 EA27 FA74