

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6033229号  
(P6033229)

(45) 発行日 平成28年11月30日 (2016.11.30)

(24) 登録日 平成28年11月4日 (2016.11.4)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C O 7 K 16/40 (2006.01)

C O 7 K 16/40

C O 7 K 16/46 (2006.01)

C O 7 K 16/46

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/19

請求項の数 28 (全 88 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-541012 (P2013-541012)  
 (86) (22) 出願日 平成23年11月22日 (2011.11.22)  
 (65) 公表番号 特表2014-501513 (P2014-501513A)  
 (43) 公表日 平成26年1月23日 (2014.1.23)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2011/061785  
 (87) 国際公開番号 W02012/071381  
 (87) 国際公開日 平成24年5月31日 (2012.5.31)  
 審査請求日 平成26年11月6日 (2014.11.6)  
 (31) 優先権主張番号 61/416,927  
 (32) 優先日 平成22年11月24日 (2010.11.24)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 508192566  
 レクシコン ファーマシューティカルズ  
 インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国 77381 テキサス州  
 ザ ウッドランズ テクノロジー フォ  
 レスト プレイス 8800  
 (74) 代理人 110000796  
 特許業務法人三枝国際特許事務所  
 (72) 発明者 ブロメイジ ロバート ジョセフ ジュニ  
 ア  
 アメリカ合衆国 77381-1160  
 テキサス州 ザ ウッドランズ テクノ  
 ジー フォレスト プレイス 8800

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 NOTUMペクチンアセチルエステラーゼと結合する抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒトNotumペクチンアセチルエステラーゼ (NOTUM) と結合し；

NOTUMの少なくとも1つの活性を中和し；

in vitroの8 - オクタノイルオキシピレン - 1, 3, 6 - トリシルホン酸三ナ  
 トリウム (OPTS) アッセイにおいてNOTUM活性を減少させ、かつin vitr  
 oのWntシグナル伝達アッセイにおいてNOTUM活性を減少させ；かつ

a) 配列番号94のアミノ酸配列を有するポリペプチドに対する抗体の結合親和性より  
 も少なくとも5倍強力な結合親和性で、配列番号1のアミノ酸配列を有するポリペプチド  
 と結合する、及び/又は

b) 配列番号99のアミノ酸配列を有するポリペプチドに対する抗体の結合親和性より  
 も少なくとも5倍強力な結合親和性で、配列番号1のアミノ酸配列を有するポリペプチド  
 と結合する；

モノクローナル抗体。

【請求項 2】

マウスNOTUM、モルモットNOTUM、カニクイザルNOTUM、およびアカゲザ  
 ルNOTUMから選択されるNOTUMと結合する、請求項1に記載の抗体。

【請求項 3】

対象に投与された際、in vivoで血清PINPレベルを増加させ、in viv  
 oで骨塩密度を増加させ、in vivoで大腿骨骨幹中央部の皮質厚を増加させ、in

*v i v o*で大腿骨骨幹中央部の骨領域を増加させ、*i n v i v o*で上腕骨骨幹中央部の皮質厚を増加させ、*i n v i v o*で皮質内骨形成を増加させ、*i n v i v o*でL V 5椎体における皮質骨体積の比率を増加させ、および/または*i n v i v o*で大腿骨頸部総体積に対する大腿骨頸部骨体積の比率を増加させる、請求項1～2のいずれか1項に記載の抗体。

【請求項4】

配列番号1のアミノ酸配列を有するポリペプチドと、50nM未満の $K_D$ で結合する、請求項1～3のいずれか1項に記載の抗体。

【請求項5】

前記 $K_D$ が20nM未満である、請求項4に記載の抗体。

10

【請求項6】

前記 $K_D$ が10nM未満の $K_D$ である、請求項5に記載の抗体。

【請求項7】

以下から選択される、少なくとも1つの結合特性を有する、請求項1～6のいずれか1項に記載の抗体：

a) 配列番号84のアミノ酸配列を有するポリペプチドに対する抗体の結合親和性よりも少なくとも5倍強力な結合親和性で、配列番号83のアミノ酸配列を有するポリペプチドと結合する；

b) 配列番号86のアミノ酸配列を有するポリペプチドに対する抗体の結合親和性よりも少なくとも5倍強力な結合親和性で、配列番号85のアミノ酸配列を有するポリペプチドと結合する；

20

c) 配列番号2のアミノ酸配列を有するポリペプチドに対する抗体の結合親和性よりも少なくとも5倍強力な結合親和性で、配列番号95のアミノ酸配列を有するポリペプチドと結合する；

d) NOTUMに対する結合において、配列番号15のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域および配列番号16のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む抗体と競合する；

e) NOTUMに対する結合において、配列番号23のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域および配列番号24のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む抗体と競合する；

f) NOTUMに対する結合において、配列番号31のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域および配列番号32のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む抗体と競合する；

30

g) NOTUMに対する結合において、配列番号39のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域および配列番号40のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む抗体と競合する；ならびに

h) NOTUMに対する結合において、配列番号55のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域および配列番号56のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む抗体と競合する。

【請求項8】

マウス抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、およびヒト抗体から選択される、請求項1～7のいずれか1項に記載の抗体。

【請求項9】

重鎖および軽鎖を含み、前記重鎖が、以下から選択される少なくとも1つのCDRを含む、請求項1～8のいずれか1項に記載の抗体：

40

a) 配列番号17、25、33、41、および90から選択されるアミノ酸配列を含むCDR1；

b) 配列番号18、26、34、及び42から選択されるアミノ酸配列を含むCDR2；ならびに

c) 配列番号19、27、35、43、および91から選択されるアミノ酸配列を含むCDR3。

【請求項10】

前記重鎖が、CDR1、CDR2、およびCDR3を含むセットを含み、前記セットが以下から選択される、請求項9に記載の抗体：

50

- a) 配列番号 90 のアミノ酸配列を有する C D R 1、配列番号 18 のアミノ酸配列を有する C D R 2、および配列番号 91 のアミノ酸配列を有する C D R 3 を含むセット；
- b) 配列番号 17 のアミノ酸配列を有する C D R 1、配列番号 18 のアミノ酸配列を有する C D R 2、および配列番号 19 のアミノ酸配列を有する C D R 3 を含むセット；
- c) 配列番号 90 のアミノ酸配列を有する C D R 1、配列番号 26 のアミノ酸配列を有する C D R 2、および配列番号 27 のアミノ酸配列を有する C D R 3 を含むセット；
- d) 配列番号 25 のアミノ酸配列を有する C D R 1、配列番号 26 のアミノ酸配列を有する C D R 2、および配列番号 27 のアミノ酸配列を有する C D R 3 を含むセット；
- e) 配列番号 90 のアミノ酸配列を有する C D R 1、配列番号 34 のアミノ酸配列を有する C D R 2、および配列番号 91 のアミノ酸配列を有する C D R 3 を含むセット；
- f) 配列番号 33 のアミノ酸配列を有する C D R 1、配列番号 34 のアミノ酸配列を有する C D R 2、および配列番号 35 のアミノ酸配列を有する C D R 3 を含むセット；
- g) 配列番号 41 のアミノ酸配列を有する C D R 1、配列番号 42 のアミノ酸配列を有する C D R 2、および配列番号 43 のアミノ酸配列を有する C D R 3 を含むセット；ならびに
- h) 配列番号 57 のアミノ酸配列を有する C D R 1、配列番号 58 のアミノ酸配列を有する C D R 2、および配列番号 59 のアミノ酸配列を有する C D R 3 を含むセット。

10

【請求項 11】

前記重鎖が、配列番号 15、23、31、39、63、67、71、75、および 79 から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、請求項 10 に記載の抗体。

20

【請求項 12】

重鎖および軽鎖を含み、前記軽鎖が以下から選択される少なくとも 1 つの C D R を含む、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の抗体：

- a) 配列番号 20、28、36、44、60、および 92 から選択されるアミノ酸配列を含む C D R 1；
- b) 配列番号 21、29、37、45、61、および 93 から選択されるアミノ酸配列を含む C D R 2；ならびに
- c) 配列番号 22、30、38、46、および 62 から選択されるアミノ酸配列を含む C D R 3。

【請求項 13】

前記軽鎖が C D R 1、C D R 2、および C D R 3 を含むセットを含み、前記セットが以下から選択される、請求項 12 に記載の抗体：

- a) 配列番号 92 のアミノ酸配列を有する C D R 1、配列番号 93 のアミノ酸配列を有する C D R 2、および配列番号 22 のアミノ酸配列を有する C D R 3 を含むセット；
- b) 配列番号 20 のアミノ酸配列を有する C D R 1、配列番号 21 のアミノ酸配列を有する C D R 2、および配列番号 22 のアミノ酸配列を有する C D R 3 を含むセット；
- c) 配列番号 92 のアミノ酸配列を有する C D R 1、配列番号 93 のアミノ酸配列を有する C D R 2、および配列番号 30 のアミノ酸配列を有する C D R 3 を含むセット；
- d) 配列番号 28 のアミノ酸配列を有する C D R 1、配列番号 29 のアミノ酸配列を有する C D R 2、および配列番号 30 のアミノ酸配列を有する C D R 3 を含むセット；
- e) 配列番号 92 のアミノ酸配列を有する C D R 1、配列番号 93 のアミノ酸配列を有する C D R 2、および配列番号 38 のアミノ酸配列を有する C D R 3 を含むセット；
- f) 配列番号 36 のアミノ酸配列を有する C D R 1、配列番号 37 のアミノ酸配列を有する C D R 2、および配列番号 38 のアミノ酸配列を有する C D R 3 を含むセット；
- g) 配列番号 44 のアミノ酸配列を有する C D R 1、配列番号 45 のアミノ酸配列を有する C D R 2、および配列番号 46 のアミノ酸配列を有する C D R 3 を含むセット；ならびに
- h) 配列番号 60 のアミノ酸配列を有する C D R 1、配列番号 61 のアミノ酸配列を有する C D R 2、および配列番号 62 のアミノ酸配列を有する C D R 3 を含むセット。

30

40

【請求項 14】

50

前記軽鎖が、配列番号 16、24、32、40、56、65、69、73、77、および 81 から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、請求項 13 に記載の抗体。

【請求項 15】

重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含み、ここで：

a) 前記重鎖可変領域が、配列番号 90 のアミノ酸配列を有する C D R 1、配列番号 18 のアミノ酸配列を有する C D R 2、および配列番号 91 のアミノ酸配列を有する C D R 3 を含み、ならびに前記軽鎖可変領域が、配列番号 92 のアミノ酸配列を有する C D R 1、配列番号 93 のアミノ酸配列を有する C D R 2、および配列番号 22 のアミノ酸配列を有する C D R 3 を含むか；または

10

b) 前記重鎖可変領域が、配列番号 17 のアミノ酸配列を有する C D R 1、配列番号 18 のアミノ酸配列を有する C D R 2、および配列番号 19 のアミノ酸配列を有する C D R 3 を含み、ならびに前記軽鎖可変領域が、配列番号 20 のアミノ酸配列を有する C D R 1、配列番号 21 のアミノ酸配列を有する C D R 2、および配列番号 22 のアミノ酸配列を有する C D R 3 を含むか；または

c) 前記重鎖可変領域が、配列番号 90 のアミノ酸配列を有する C D R 1、配列番号 26 のアミノ酸配列を有する C D R 2、および配列番号 27 のアミノ酸配列を有する C D R 3 を含み、ならびに前記軽鎖可変領域が、配列番号 92 のアミノ酸配列を有する C D R 1、配列番号 93 のアミノ酸配列を有する C D R 2、および配列番号 30 のアミノ酸配列を有する C D R 3 を含むか；または

20

d) 前記重鎖可変領域が、配列番号 25 のアミノ酸配列を有する C D R 1、配列番号 26 のアミノ酸配列を有する C D R 2、および配列番号 27 のアミノ酸配列を有する C D R 3 を含み、ならびに前記軽鎖可変領域が、配列番号 28 のアミノ酸配列を有する C D R 1、配列番号 29 のアミノ酸配列を有する C D R 2、および配列番号 30 のアミノ酸配列を有する C D R 3 を含むか；または

e) 前記重鎖可変領域が、配列番号 90 のアミノ酸配列を有する C D R 1、配列番号 34 のアミノ酸配列を有する C D R 2、および配列番号 91 のアミノ酸配列を有する C D R 3 を含み、ならびに前記軽鎖可変領域が、配列番号 92 のアミノ酸配列を有する C D R 1、配列番号 93 のアミノ酸配列を有する C D R 2、および配列番号 38 のアミノ酸配列を有する C D R 3 を含むか；または

30

f) 前記重鎖可変領域が、配列番号 33 のアミノ酸配列を有する C D R 1、配列番号 34 のアミノ酸配列を有する C D R 2、および配列番号 35 のアミノ酸配列を有する C D R 3 を含み、ならびに前記軽鎖可変領域が、配列番号 36 のアミノ酸配列を有する C D R 1、配列番号 37 のアミノ酸配列を有する C D R 2、および配列番号 38 のアミノ酸配列を有する C D R 3 か；または

g) 前記重鎖可変領域が、配列番号 41 のアミノ酸配列を有する C D R 1、配列番号 42 のアミノ酸配列を有する C D R 2、および配列番号 43 のアミノ酸配列を有する C D R 3 を含み、ならびに前記軽鎖可変領域が、配列番号 44 のアミノ酸配列を有する C D R 1、配列番号 45 のアミノ酸配列を有する C D R 2、および配列番号 46 のアミノ酸配列を有する C D R 3 を含むか；または

40

h) 前記重鎖可変領域が、配列番号 57 のアミノ酸配列を有する C D R 1、配列番号 58 のアミノ酸配列を有する C D R 2、および配列番号 59 のアミノ酸配列を有する C D R 3 を含み、ならびに前記軽鎖可変領域が、配列番号 60 のアミノ酸配列を有する C D R 1、配列番号 61 のアミノ酸配列を有する C D R 2、および配列番号 62 のアミノ酸配列を有する C D R 3 を含む；

請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 16】

a) 前記重鎖可変領域が配列番号 15 のアミノ酸配列を含み、および前記軽鎖可変領域が配列番号 16 のアミノ酸配列を含むか；または

b) 前記重鎖可変領域が配列番号 71 のアミノ酸配列を含み、および前記軽鎖可変領域が配列

50

番号 73 のアミノ酸配列を含むか；または

c) 前記重鎖が配列番号 72 のアミノ酸配列を含み、および前記軽鎖が配列番号 74 のアミノ酸配列を含むか；または

d) 前記重鎖可変領域が配列番号 23 のアミノ酸配列を含み、および前記軽鎖可変領域が配列番号 24 のアミノ酸配列を含むか；または

e) 前記重鎖可変領域が配列番号 75 のアミノ酸配列を含み、および前記軽鎖可変領域が配列番号 77 のアミノ酸配列を含むか；または

f) 前記重鎖が配列番号 76 のアミノ酸配列を含み、および前記軽鎖が配列番号 78 のアミノ酸配列を含むか；または

g) 前記重鎖可変領域が配列番号 31 のアミノ酸配列を含み、および前記軽鎖可変領域が配列番号 32 のアミノ酸配列を含むか；または 10

h) 前記重鎖可変領域が配列番号 79 のアミノ酸配列を含み、および前記軽鎖可変領域が配列番号 81 のアミノ酸配列を含むか；または

i) 前記重鎖が配列番号 80 のアミノ酸配列を含み、および前記軽鎖が配列番号 82 のアミノ酸配列を含むか；または

j) 前記重鎖可変領域が配列番号 39 のアミノ酸配列を含み、および前記軽鎖可変領域が配列番号 40 のアミノ酸配列を含むか；または

k) 前記重鎖可変領域が配列番号 67 のアミノ酸配列を含み、および前記軽鎖可変領域が配列番号 69 のアミノ酸配列を含むか；または

l) 前記重鎖が配列番号 68 のアミノ酸配列を含み、および前記軽鎖が配列番号 70 のアミノ酸配列を含むか；または 20

m) 前記重鎖可変領域が配列番号 55 のアミノ酸配列を含み、および前記軽鎖可変領域が配列番号 56 のアミノ酸配列を含むか；または

n) 前記重鎖可変領域が配列番号 63 のアミノ酸配列を含み、および前記軽鎖可変領域が配列番号 65 のアミノ酸配列を含むか；または

o) 前記重鎖が配列番号 64 のアミノ酸配列を含み、および前記軽鎖が配列番号 66 のアミノ酸配列を含む；

請求項 15 に記載の抗体。

【請求項 17】

請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の抗体を含む、医薬組成物。 30

【請求項 18】

請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の抗体の重鎖または軽鎖をコードするポリヌクレオチド配列を含む、核酸分子。

【請求項 19】

前記重鎖をコードする第 1 のポリヌクレオチド配列および前記軽鎖をコードする第 2 のポリヌクレオチド配列を含む、請求項 18 に記載の核酸分子。

【請求項 20】

核酸分子がベクターである、請求項 18 または請求項 19 に記載の核酸分子。

【請求項 21】

請求項 18 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の核酸分子を含む、宿主細胞。 40

【請求項 22】

重鎖をコードするポリヌクレオチド配列を含む第 1 の核酸分子および軽鎖をコードするポリヌクレオチド配列を含む第 2 の核酸分子を含む、請求項 21 に記載の宿主細胞。

【請求項 23】

前記核酸分子が、前記重鎖をコードする第 1 のポリヌクレオチド配列および前記軽鎖をコードする第 2 のポリヌクレオチド配列を含む、請求項 21 に記載の宿主細胞。

【請求項 24】

請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の抗体の作製方法であって、前記抗体を発現させるのに十分な条件下で、請求項 22 または請求項 23 に記載の宿主細胞をインキュベートすることを含む、前記方法。 50

## 【請求項 2 5】

患者における皮質内骨形成促進用である、請求項 1 7 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 2 6】

患者における骨損傷を特徴とする疾患または障害の治療、管理、または予防用である、請求項 1 7 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 2 7】

前記疾患または障害が骨粗鬆症である、請求項 1 7 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 2 8】

請求項 1 7 に記載の医薬組成物を含む、単一の単位剤形。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本出願は、2010年、11月24日に出願された、米国特許仮出願第61/416,927号の利益を主張するものであり、その全体がすべての目的のために、参照により本明細書に組み込まれるものとする。

## 【0002】

本発明は、Notumベクチンアセチルエステラーゼの抗体阻害剤、それらを含む組成物、およびそれらの使用方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0003】

骨の健康は、骨を形成する骨芽細胞と骨を再吸収する破骨細胞の、強調した活動に依存する。「骨代謝は、これらの同化および異化の細胞機能間のバランスを反映し、成熟した骨格が、損傷した際、それ自体を修復することができ、かつその内分泌機能を、ミネラル類、例えばカルシウムおよび亜リン酸の血液循環中への放出により維持できることを確実にする。」Allen, J.G. et al., *J. Med. Chem.*, 53 (June 10, 2010), pp. 4332 - 4353, 4332。多くの疾患状態はこのバランスを変化させ、結果として、骨質量の増加もしくは減少、または骨質の変化を引き起こす。骨塩密度の段階的な損失は骨減少症として知られ、重篤な骨の損失は骨粗鬆症として知られている。同文献。

## 【0004】

骨粗鬆症の治療および予防のための現在の標準治療においては、ビスホスホネートクラスの、経口、低分子の再吸収阻害薬が使用される。同文献、4333頁。ゾレドロン酸、ラロキシフェン、カルシウム、およびビタミンDサプリメントもまた、骨粗鬆症治療において、一般的に使用される。同文献。再吸収阻害薬は、骨量減少の予防に寄与し得るが、同化剤「は、骨質量をより大幅に増加させることができ、...および骨質を改善し、骨強度を増加する能力をも有する」Guo, H., et al., *J. Med. Chem.*, 53 (February 25, 2010), pp. 1819 - 1829, 1819。米国においては、ヒトPTHが、FDAに認可された唯一の同化剤である。同文献；Allen、4333頁。「骨粗鬆症治療のために利用可能な同化剤が不足しているため、この疾患を治療するための、非毒性で費用対効果が高く、かつ容易に投与できる低分子化合物を、至急開発する必要がある。」Guo、1819頁。

## 【0005】

「骨形成を促進する薬剤の開発は、再吸収抑制治療と比較して進歩が遅れているが、いくつかの経路が骨芽細胞の機能を促進することが知られている。」Allen、4338頁。これらの経路としては、骨形態形成タンパク質、形質転換増殖因子、副甲状腺ホルモン、インスリン様成長因子、線維芽細胞増殖因子、および無翅型MMTV統合部位(WNT)のシグナル伝達が挙げられる。同文献。Guoおよび共同研究者らは、最近、これら経路の最初のものに関する研究結果を報告した。Guo、上述の通り。より詳細には、彼らは、ある特定の置換ベンゾチオフェンおよびベンゾフラン化合物が、マウスおよびラットにおいて、骨形態形成タンパク質2の発現を促進することを報告した。報告によれば、該化合物のうちの2つは、in vivoにおける骨形成および小柱結合性の修復を促進するということである。同文献、1819頁。

10

20

30

40

50

## 【0006】

これらの経路のもう1つはWNT経路であり、これは多様な発達および再生プロセスに関わっている。Allen、4340頁。しかしながら、この経路は複雑であり、その詳細およびその成分がどのように骨に影響を及ぼすかに関しては、不明のままである。例えば、LRP-5（その変異がヒトにおける骨質量の増加と関連している）および-カテニン（これを介して基準のWNTシグナル伝達が発生する）が、骨質量の制御に、WNTシグナル伝達を介して直接関連してはいない可能性がある」ということが、示唆されている。同文献。

## 【0007】

遺伝子発現データの最近の分析により、WNTシグナル伝達の新たな標的の特定に至っている。例えば、Torisu, Y., et al., Cancer Sci., 99(6):1139-1146, 1143 (2008)を参照のこと。1つのそのような標的は、NOTUMおよびLOC174111として知られる、Notumペクチンアセチルエステラーゼである。

## 【発明の概要】

## 【0008】

いくつかの実施形態において、ヒトNotumペクチンアセチルエステラーゼ（NOTUM）と結合し、少なくとも1つのNOTUMの活性を中和するモノクローナル抗体が提供される。いくつかの実施形態において、抗体は、マウスNOTUM、モルモットNOTUM、カニクイザルNOTUM、およびアカゲザルNOTUMから選択される、NOTUMと結合する。いくつかの実施形態において、抗体は、以下から選択される、少なくとも1つの活性を有する：*in vitro*の8-オクタノイルオキシピレン-1,3,6-トリスルホン酸三ナトリウム（OPTS）アッセイにおけるNOTUM活性を減少させること；および*in vitro*のWntシグナル伝達アッセイにおけるNOTUM活性を減少させること。いくつかの実施形態において、抗体は、以下から選択される、少なくとも1つの活性を有する：*in vivo*で血清PINPレベルを増加させること；*in vivo*で骨塩密度を増加させること；*in vivo*で大腿骨骨幹中央部の皮質厚を増加させること、*in vivo*で大腿骨骨幹中央部の骨領域を増加させること；*in vivo*で上腕骨骨幹中央部の皮質厚を増加させること；*in vivo*で皮質内骨形成を増加させること；*in vivo*でLV5椎体における皮質骨体積の比率を増加させること；および*in vivo*で大腿骨頸部総体積に対する、大腿骨頸部の骨体積の比率を増加させること。いくつかの実施形態において、NOTUMと結合する抗体は、50 nM未満、20 nM未満、または10 nM未満の $K_D$ で、配列番号1のアミノ酸配列を有するポリペプチドと結合する。

## 【0009】

いくつかの実施形態において、抗体は、以下から選択される、少なくとも1つの結合特性を有する：a) 配列番号84のアミノ酸配列を有するポリペプチドに対する抗体の結合親和性よりも少なくとも5倍強力な結合親和性で、配列番号83のアミノ酸配列を有するポリペプチドと結合する；b) 配列番号86のアミノ酸配列を有するポリペプチドに対する抗体の結合親和性よりも少なくとも5倍強力な結合親和性で、配列番号85のアミノ酸配列を有するポリペプチドと結合する；c) 配列番号94のアミノ酸配列を有するポリペプチドに対する抗体の結合親和性よりも少なくとも5倍強力な結合親和性で、配列番号1のアミノ酸配列を有するポリペプチドと結合する；d) 配列番号99のアミノ酸配列を有するポリペプチドに対する抗体の結合親和性よりも少なくとも5倍強力な結合親和性で、配列番号1のアミノ酸配列を有するポリペプチドと結合する；e) 配列番号2のアミノ酸配列を有するポリペプチドに対する抗体の結合親和性よりも少なくとも5倍強力な結合親和性で、配列番号95のアミノ酸配列を有するポリペプチドと結合する；f) NOTUMに対する結合において、配列番号7のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域および配列番号8のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む抗体と競合する；g) NOTUMに対する結合において、配列番号15のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域および配列番号16のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む抗体と競合する；h) NOTUMに対する結合

において、配列番号 23 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域および配列番号 24 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む抗体と競合する； i ) NOTUM に対する結合において、配列番号 31 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域および配列番号 32 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む抗体と競合する； j ) NOTUM に対する結合において、配列番号 39 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域および配列番号 40 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む抗体と競合する； k ) NOTUM に対する結合において、配列番号 47 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域および配列番号 48 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む抗体と競合する； ならびに l ) NOTUM に対する結合において、配列番号 55 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域および配列番号 56 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む抗体と競合する。

10

**【 0 0 1 0 】**

いくつかの実施形態において、抗体は、マウス抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、およびヒト抗体から選択される。

**【 0 0 1 1 】**

いくつかの実施形態において、NOTUM と結合する抗体は、重鎖および軽鎖を含み、前記重鎖は、以下から選択される少なくとも 1 つの CDR を含む： a ) 配列番号 9、17、25、33、41、49、および 90 から選択されるアミノ酸配列を含む CDR 1； b ) 配列番号 10、18、26、34、42、および 50 から選択されるアミノ酸配列を含む CDR 2； ならびに c ) 配列番号 11、19、27、35、43、51、および 91 から選択されるアミノ酸配列を含む CDR 3。いくつかの実施形態において、重鎖は CDR 1、CDR 2、および CDR 3 を含むセットを含み、前記セットは以下から選択される： a ) 配列番号 9 のアミノ酸配列を有する CDR 1、配列番号 10 のアミノ酸配列を有する CDR 2、および配列番号 11 のアミノ酸配列を有する CDR 3 を含むセット； b ) 配列番号 90 のアミノ酸配列を有する CDR 1、配列番号 18 のアミノ酸配列を有する CDR 2、および配列番号 91 のアミノ酸配列を有する CDR 3 を含むセット； c ) 配列番号 17 のアミノ酸配列を有する CDR 1、配列番号 18 のアミノ酸配列を有する CDR 2、および配列番号 19 のアミノ酸配列を有する CDR 3 を含むセット； d ) 配列番号 90 のアミノ酸配列を有する CDR 1、配列番号 26 のアミノ酸配列を有する CDR 2、および配列番号 27 のアミノ酸配列を有する CDR 3 を含むセット； e ) 配列番号 25 のアミノ酸配列を有する CDR 1、配列番号 26 のアミノ酸配列を有する CDR 2、および配列番号 27 のアミノ酸配列を有する CDR 3 を含むセット； f ) 配列番号 90 のアミノ酸配列を有する CDR 1、配列番号 34 のアミノ酸配列を有する CDR 2、および配列番号 91 のアミノ酸配列を有する CDR 3 を含むセット； g ) 配列番号 33 のアミノ酸配列を有する CDR 1、配列番号 34 のアミノ酸配列を有する CDR 2、および配列番号 35 のアミノ酸配列を有する CDR 3 を含むセット； h ) 配列番号 41 のアミノ酸配列を有する CDR 1、配列番号 42 のアミノ酸配列を有する CDR 2、および配列番号 43 のアミノ酸配列を有する CDR 3 を含むセット； i ) 配列番号 49 のアミノ酸配列を有する CDR 1、配列番号 50 のアミノ酸配列を有する CDR 2、および配列番号 51 のアミノ酸配列を有する CDR 3 を含むセット； ならびに j ) 配列番号 57 のアミノ酸配列を有する CDR 1、配列番号 58 のアミノ酸配列を有する CDR 2、および配列番号 59 のアミノ酸配列を有する CDR 3 を含むセット。いくつかの実施形態において、重鎖は、配列番号 7、15、23、31、39、47、63、67、71、75、および 79 から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。

20

30

40

**【 0 0 1 2 】**

いくつかの実施形態において、NOTUM と結合する抗体は、重鎖および軽鎖を含み、前記軽鎖は、以下から選択される少なくとも 1 つの CDR を含む： a ) 配列番号 12、20、28、36、44、52、および 92 から選択されるアミノ酸配列を含む CDR 1； b ) 配列番号 13、21、29、37、45、53、61、および 93 から選択されるアミノ酸配列を含む CDR 2； ならびに c ) 配列番号 14、22、30、38、46、54、および 62 から選択されるアミノ酸配列を含む CDR 3。いくつかの実施形態において

50



、軽鎖はCDR1、CDR2、およびCDR3を含むセットを含み、ここで前記セットは、以下から選択される：a) 配列番号12のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号13のアミノ酸配列を有するCDR2、および配列番号14のアミノ酸配列を有するCDR3を含むセット；b) 配列番号92のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号93のアミノ酸配列を有するCDR2、および配列番号22のアミノ酸配列を有するCDR3を含むセット；c) 配列番号20のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号21のアミノ酸配列を有するCDR2、および配列番号22のアミノ酸配列を有するCDR3を含むセット；d) 配列番号92のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号93のアミノ酸配列を有するCDR2、および配列番号30のアミノ酸配列を有するCDR3を含むセット；e) 配列番号28のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号29のアミノ酸配列を有するCDR2、および配列番号30のアミノ酸配列を有するCDR3を含むセット；f) 配列番号92のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号93のアミノ酸配列を有するCDR2、および配列番号38のアミノ酸配列を有するCDR3を含むセット；g) 配列番号36のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号37のアミノ酸配列を有するCDR2、および配列番号38のアミノ酸配列を有するCDR3を含むセット；h) 配列番号44のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号45のアミノ酸配列を有するCDR2、および配列番号46のアミノ酸配列を有するCDR3を含むセット；i) 配列番号52のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号53のアミノ酸配列を有するCDR2、および配列番号54のアミノ酸配列を有するCDR3を含むセット；ならびにj) 配列番号60のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号61のアミノ酸配列を有するCDR2、および配列番号62のアミノ酸配列を有するCDR3を含むセット。いくつかの実施形態において、軽鎖は、配列番号8、16、24、32、40、48、56、65、69、73、77、および81から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

#### 【0013】

いくつかの実施形態において、NOTUMと結合する抗体は、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含み、ここで：a) 前記重鎖可変領域は、配列番号9のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号10のアミノ酸配列を有するCDR2、および配列番号11のアミノ酸配列を有するCDR3を含み、ならびに前記軽鎖可変領域は、配列番号12のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号13のアミノ酸配列を有するCDR2、および配列番号14のアミノ酸配列を有するCDR3を含むか；またはb) 前記重鎖可変領域は、配列番号90のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号18のアミノ酸配列を有するCDR2、および配列番号91のアミノ酸配列を有するCDR3を含み、ならびに前記軽鎖可変領域は、配列番号92のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号93のアミノ酸配列を有するCDR2、および配列番号22のアミノ酸配列を有するCDR3を含むか；またはc) 前記重鎖可変領域は、配列番号17のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号18のアミノ酸配列を有するCDR2、および配列番号19のアミノ酸配列を有するCDR3を含み、ならびに前記軽鎖可変領域は、配列番号20のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号22のアミノ酸配列を有するCDR3を含むか；またはd) 前記重鎖可変領域は、配列番号90のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号26のアミノ酸配列を有するCDR2、および配列番号27のアミノ酸配列を有するCDR3を含み、ならびに前記軽鎖可変領域は、配列番号92のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号93のアミノ酸配列を有するCDR2、および配列番号30のアミノ酸配列を有するCDR3を含むか；またはe) 前記重鎖可変領域は、配列番号25のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号26のアミノ酸配列を有するCDR2、および配列番号27のアミノ酸配列を有するCDR3を含み、ならびに前記軽鎖可変領域は、配列番号28のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号29のアミノ酸配列を有するCDR2、および配列番号30のアミノ酸配列を有するCDR3を含むか；またはf) 前記重鎖可変領域は、配列番号90のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号34のアミノ酸配列を有するCDR2、および配列番号91のアミノ酸配列を有するCDR3を含み、ならびに前記軽鎖可変領域は、配列番号92のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号93のアミノ酸配列を有するCD

10

20

30

40

50

R 2、および配列番号 3 8 のアミノ酸配列を有する C D R 3 を含むか；または g ) 前記重鎖可変領域は、配列番号 3 3 のアミノ酸配列を有する C D R 1、配列番号 3 4 のアミノ酸配列を有する C D R 2、および配列番号 3 5 のアミノ酸配列を有する C D R 3 を含み、ならびに前記軽鎖可変領域は、配列番号 3 6 のアミノ酸配列を有する C D R 1、配列番号 3 7 のアミノ酸配列を有する C D R 2、および配列番号 3 8 のアミノ酸配列を有する C D R 3 を含むか；または h ) 前記重鎖可変領域は、配列番号 4 1 のアミノ酸配列を有する C D R 1、配列番号 4 2 のアミノ酸配列を有する C D R 2、および配列番号 4 3 のアミノ酸配列を有する C D R 3 を含み、ならびに前記軽鎖可変領域は、配列番号 4 4 のアミノ酸配列を有する C D R 1、配列番号 4 5 のアミノ酸配列を有する C D R 2、および配列番号 4 6 のアミノ酸配列を有する C D R 3 を含むか；または i ) 前記重鎖可変領域は、配列番号 4 9 のアミノ酸配列を有する C D R 1、配列番号 5 0 のアミノ酸配列を有する C D R 2、および配列番号 5 1 のアミノ酸配列を有する C D R 3 を含み、ならびに前記軽鎖可変領域は、配列番号 5 2 のアミノ酸配列を有する C D R 1、配列番号 5 3 のアミノ酸配列を有する C D R 2、および配列番号 5 4 のアミノ酸配列を有する C D R 3 を含むか；または j ) 前記重鎖可変領域は、配列番号 5 7 のアミノ酸配列を有する C D R 1、配列番号 5 8 のアミノ酸配列を有する C D R 2、および配列番号 5 9 のアミノ酸配列を有する C D R 3 を含み、ならびに前記軽鎖可変領域は、配列番号 6 0 のアミノ酸配列を有する C D R 1、配列番号 6 1 のアミノ酸配列を有する C D R 2、および配列番号 6 2 のアミノ酸配列を有する C D R 3 を含む。

10

**【 0 0 1 4 】**

20

いくつかの実施形態において、N O T U M と結合する抗体は、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含み、ここで：a ) 前記重鎖可変領域は配列番号 7 のアミノ酸配列を含み、および前記軽鎖可変領域は配列番号 8 のアミノ酸配列を含むか；または b ) 前記重鎖可変領域は配列番号 1 5 のアミノ酸配列を含み、および前記軽鎖可変領域は配列番号 1 6 のアミノ酸配列を含むか；または c ) 前記重鎖可変領域は配列番号 7 1 のアミノ酸配列を含み、および前記軽鎖可変領域は配列番号 7 3 のアミノ酸配列を含むか；または d ) 前記重鎖は配列番号 7 2 のアミノ酸配列を含み、および前記軽鎖は配列番号 7 4 のアミノ酸配列を含むか；または e ) 前記重鎖可変領域は配列番号 2 3 のアミノ酸配列を含み、および前記軽鎖可変領域は配列番号 2 4 のアミノ酸配列を含むか；または f ) 前記重鎖可変領域は配列番号 7 5 のアミノ酸配列を含み、および前記軽鎖可変領域は配列番号 7 7 のアミノ酸配列を含むか；または g ) 前記重鎖は配列番号 7 6 のアミノ酸配列を含み、および軽鎖は配列番号 7 8 のアミノ酸配列を含むか；または h ) 前記重鎖可変領域は配列番号 3 1 のアミノ酸配列を含み、および前記軽鎖可変領域は配列番号 3 2 のアミノ酸配列を含むか；または i ) 前記重鎖可変領域は配列番号 7 9 のアミノ酸配列を含み、および前記軽鎖可変領域は配列番号 8 1 のアミノ酸配列を含むか；または j ) 前記重鎖は配列番号 8 0 のアミノ酸配列を含み、および前記軽鎖は配列番号 8 2 のアミノ酸配列を含むか；または k ) 前記重鎖可変領域は配列番号 3 9 のアミノ酸配列を含み、および前記軽鎖可変領域は配列番号 4 0 のアミノ酸配列を含むか；または l ) 前記重鎖可変領域は配列番号 6 7 のアミノ酸配列を含み、および前記軽鎖可変領域は配列番号 6 9 のアミノ酸配列を含むか；または m ) 前記重鎖は配列番号 6 8 のアミノ酸配列を含み、および前記軽鎖は配列番号 7 0 のアミノ酸配列を含むか；または n ) 前記重鎖可変領域は配列番号 4 7 のアミノ酸配列を含み、および前記軽鎖可変領域は配列番号 4 8 のアミノ酸配列を含むか；または o ) 前記重鎖可変領域は配列番号 5 5 のアミノ酸配列を含み、および前記軽鎖可変領域は配列番号 5 6 のアミノ酸配列を含むか；または p ) 前記重鎖可変領域は配列番号 6 3 のアミノ酸配列を含み、および前記軽鎖可変領域は配列番号 6 5 のアミノ酸配列を含むか；または q ) 前記重鎖は配列番号 6 4 のアミノ酸配列を含み、および前記軽鎖は配列番号 6 6 のアミノ酸配列を含む。

30

40

**【 0 0 1 5 】**

いくつかの実施形態において、N O T U M と結合し、かつ N O T U M の少なくとも 1 つの活性を中和する抗体の重鎖または軽鎖をコードするポリヌクレオチド配列を含む、核酸分子が提供される。いくつかの実施形態において、核酸分子は、重鎖をコードする第 1 の

50

ポリヌクレオチド配列、および軽鎖をコードする第2のポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、核酸分子はベクターである。いくつかの実施形態において、NOTUMと結合し、かつNOTUMの少なくとも1つの活性を中和する抗体の重鎖または軽鎖をコードするポリヌクレオチド配列を含む、核酸分子を含む、宿主細胞が提供される。いくつかの実施形態において、重鎖をコードする第1のポリヌクレオチド配列、および軽鎖をコードする第2のポリヌクレオチド配列を含む核酸分子を含む、宿主細胞が提供される。いくつかの実施形態において、宿主細胞は、重鎖をコードするポリヌクレオチド配列を含む第1の核酸分子、および軽鎖をコードするポリヌクレオチド配列を含む第2の核酸分子を含む。いくつかの実施形態において、NOTUMと結合し、かつNOTUMの少なくとも1つの活性を中和する抗体の作製方法が提供され、前記方法には、抗体を発現するために十分な条件下で宿主細胞をインキュベートすることが含まれる。

10

#### 【0016】

いくつかの実施形態において、NOTUMと結合し、かつNOTUMの少なくとも1つの活性を中和する抗体を含む、医薬組成物が提供される。いくつかの実施形態において、患者における皮質内骨形成を促進する方法が提供され、前記方法には、有効量の医薬組成物を投与することが含まれる。いくつかの実施形態において、患者における骨損失を特徴とする疾患または障害を治療、管理、または予防する方法が提供され、前記方法には、有効量の医薬組成物を投与することが含まれる。いくつかの実施形態において、疾患または障害は骨粗鬆症である。いくつかの実施形態において、医薬組成物を含む、単一の単位剤形が提供される。

20

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0017】

【図1】図1は、NOTUMホモ接合型ノックアウトマウス（「HOM」）およびそれらの野生型同腹子（「WT」）における種々の骨部位の皮質厚間の差異をグラフで表示した図である。

【図2】図2は、NOTUMホモ接合型およびヘテロ接合型（「HET」）ノックアウトマウス両方において観察された皮質骨厚の増加を、それらの野生型同腹子と比較して、グラフで表示した図である。

【図3】図3は、雄性のNOTUMホモ接合型およびヘテロ接合型ノックアウトマウスならびにそれらの野生型同腹子の骨で実施された、大腿骨破壊強度および脊椎圧迫試験から得た結果を、グラフで表示した図である。

30

【図4】図4は、雌性のNOTUMホモ接合型およびヘテロ接合型ノックアウトマウスならびにそれらの野生型同腹子の骨で実施された、大腿骨破壊強度および脊椎圧迫試験から得た結果を、グラフで表示した図である。

【図5】図5は、実施例6.7に記載されるとおり、ある特定のヒト/マウスのキメラタンパク質をグラフで表示した図であり、Bin1において、NOTUM中和抗体の結合に関与すると思われる領域を示す。

【図6】図6は、実施例6.9.1に記載されるとおり、モノクローナル抗体2.1029またはモノクローナル抗体2.78を8週間投与した後のマウスにおいて得られた、大腿骨骨幹中央部の皮質厚の測定値を、グラフで表示した図である。

40

【図7】図7は、実施例6.9.2に記載されるとおり、種々の投与量によるモノクローナル抗体2.1029を4週間投与した後のマウスにおいて得られた、大腿骨骨幹中央部の皮質厚の測定値を、グラフで表示した図である。

【図8A】図8は、実施例6.9.3に記載されるとおり、種々の投与量によるモノクローナル抗体2.78bを4週間投与した後のマウスにおいて得られた、大腿骨骨幹中央部の皮質厚の測定値を、グラフで表示した図である。図8Aは、3mg/kg、10mg/kg、および30mg/kgの、モノクローナル抗体2.78bの投与量を示す。

【図8B】図8Bは、0.3mg/kg、1mg/kg、and 3mg/kgの、モノクローナル抗体2.78bの投与量を示す図である。

【図9A】図9は、実施例6.9.4に記載されるとおり、ゾレドロン酸による前処置を

50

した場合およびしない場合の、モノクローナル抗体 2 . 7 8 b を 4 週間投与した後のマウスにおいて得られた、大腿骨骨幹中央部の皮質厚の測定値 ( A ) および血清 P I N P レベル ( B ) を、グラフで表示した図である。

【図 9 B】同上。

【図 1 0】図 1 0 は、実施例 6 . 9 . 5 に記載されるとおり、モノクローナル抗体 2 . 7 8 a を 4 週間投与した後のマウスにおいて得られた、大腿骨骨幹中央部の皮質厚の測定値を、グラフで表示した図である。

【図 1 1 A】図 1 1 は、実施例 6 . 9 . 6 に記載されるとおり、モノクローナル抗体 2 . 7 8 a を 1 2 週間投与した後マウスにおいて得られた、大腿骨骨幹中央部の皮質厚の測定値 ( A ) および上腕骨骨幹中央部の皮質厚の測定値 ( B ) を、グラフで表示した図である。

10

【図 1 1 B】同上。

【図 1 2 A】図 1 2 は、実施例 6 . 9 . 6 に記載されるとおり、モノクローナル抗体 2 . 7 8 a を 2 4 週間投与した後のマウスにおいて得られた、大腿骨骨幹中央部の皮質厚の測定値 ( A )、上腕骨骨幹中央部の皮質厚の測定値 ( B )、および第 9 肋骨の皮質厚 ( C ) を、グラフで表示した図である。

【図 1 2 B】同上。

【図 1 2 C】同上。

【図 1 3 A】図 1 3 は、実施例 6 . 1 0 . 3 に記載されるとおり、NOTUM 中和抗体 2 . 7 8 b または対照抗体を投与した、偽手術および卵巣切除マウスにおける、大腿骨骨幹中央部の皮質厚 ( A ) および大腿骨骨幹中央部の石灰化骨領域 ( B ) を、グラフで表示した図である。

20

【図 1 3 B】同上。

【図 1 4 A】図 1 4 は、実施例 6 . 1 0 . 3 に記載されるとおり、NOTUM 中和抗体 2 . 7 8 b または対照抗体を投与した、偽手術および卵巣切除マウスにおける、L V 5 椎体の総体積に対する骨体積の比率 ( A )、L V 5 椎体の総体積に対する皮質骨体積の比率 ( B )、および L V 5 椎体の総体積に対する海綿骨体積の比率 ( C ) を、グラフで表示した図である。

【図 1 4 B】同上。

【図 1 4 C】同上。

30

【図 1 5】図 1 5 は、実施例 6 . 1 0 . 3 に記載されるとおり、NOTUM 中和抗体 2 . 7 8 b または対照抗体を投与した、偽手術および卵巣切除マウスにおける、大腿骨頸部の総体積に対する骨体積の比率を、グラフで表示した図である。

【図 1 6】図 1 6 は、実施例 6 . 1 0 . 4 に記載されるとおり、NOTUM 中和抗体 2 . 7 8 b または対照抗体を投与した、偽手術および卵巣切除マウスにおける、カルセイン、アリザリン、およびテトラサイクリンで標識された大腿骨骨幹中央部横断面の皮質内表面の割合 ( % ) を、グラフで表示した図である。

【図 1 7 A】図 1 7 は、実施例 6 . 1 0 . 4 に記載されるとおり、NOTUM 中和抗体 2 . 7 8 b または対照抗体を投与した、偽手術および卵巣切除マウスにおける、骨石灰化速度 ( A ) および体積を参照対象とする骨形成速度 ( B ) を、グラフで表示した図である。

40

【図 1 7 B】同上。

【発明を実施するための形態】

【0 0 1 8】

本発明は、1 つには、NOTUM の阻害が皮質内骨形成に影響を及ぼす可能性があるという発見に基づく。本発明の特定の態様は、機能的 NOTUM 遺伝子のないマウス (「ノックアウトマウス」) の研究、NOTUM を阻害する抗体の開発、およびそのような抗体を用いてマウスおよびラットにおける皮質骨形成を刺激することができるという発見に基づく。

【0 0 1 9】

本明細書中で用いられるセクションの見出しは、統合の目的のためだけであって、記載

50

される対象物を制限するものと見なされるべきではない。特許、特許出願、論文、書籍、および条約をはじめとする、本出願中で言及される全ての文書、または文書の一部は、任意の目的のために全体として参照することによって本明細書中に明確に組み込まれる。1以上の組み込まれた文献および類似の資料がある用語を本出願中のその用語の定義と矛盾するように定義する場合、本出願が支配する。

#### 【0020】

##### 5.1. 定義

「抗体」という用語は、本明細書中で用いられる場合、インタクト抗体または抗原結合についてインタクト抗体と競合する抗体の断片を指す。抗体断片としては、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、scFv、Fd、二重特異性抗体、およびインタクト抗体の可変領域の少なくとも一部を保持する他の抗体断片が挙げられるが、これらに限定されるものではない。例えば、Hudson et al. (2003) *Nat. Med.* 9:129-134を参照のこと。いくつかの実施形態において、抗体断片は、インタクト抗体の酵素的または化学的切断によって産生される。いくつかの実施形態において、抗体断片は、組換えDNA技術によって産生される。

#### 【0021】

「抗原結合部位」という用語は、抗原と特異的に結合することができる抗体の部分指す。いくつかの実施形態において、抗原結合部位は、1以上の抗体可変領域によって提供される。

#### 【0022】

「結合親和性」という用語は、抗体が抗原と結合する強度の定性的または定量的決定を指す。いくつかの実施形態において、結合親和性は、抗原に対する抗体の解離定数(K<sub>D</sub>)である。いくつかの実施形態において、抗原に対する抗体の結合親和性は、抗原に対する異なる抗体の結合親和性に対して、または異なる抗原(例えば、そのアミノ酸配列において1以上の変更を有する抗原)に対する同じ抗体の結合親和性に対してなど、定性的に決定される。第1抗原に対する抗体の結合親和性は、例えば、第1抗原に対する抗体のK<sub>D</sub>が第2抗原に対する抗体のK<sub>D</sub>よりも低い場合に、第2抗原に対するその親和性よりも「強力」と見なされる。いくつかの実施形態において、第1抗原に対する抗体の結合親和性は、第1抗原に対する抗体のK<sub>D</sub>が、第2抗原に対する抗体のK<sub>D</sub>よりも少なくとも1.5倍、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも5倍、または少なくとも10倍低い場合に、「より強力である」と見なされる。反対に、第1抗原に対する抗体の結合親和性は、例えば、第1抗原に対する抗体のK<sub>D</sub>が第2抗原に対する抗体のK<sub>D</sub>よりも高い場合に、第2抗原に対するその親和性よりも「弱い」と見なされる。いくつかの実施形態において、第1抗原に対する抗体の結合親和性は、第1抗原に対する抗体のK<sub>D</sub>が、第2抗原に対する抗体のK<sub>D</sub>よりも少なくとも1.5倍、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも5倍、または少なくとも10倍高い場合に、「より弱い」と見なされる。

#### 【0023】

「キメラ」抗体は、少なくとも2つの異なる源由来の成分で構成される抗体を指す。いくつかの実施形態において、キメラ抗体は、別の分子、例えば第2の種由来の抗体の一部と融合した第1の種由来の抗体の一部を含む。いくつかのそのような実施形態において、キメラ抗体は、ヒト由来の抗体の一部と融合した非ヒト動物由来の抗体の一部を含む。いくつかのそのような実施形態において、キメラ抗体は、ヒト抗体由来の定常領域と融合した非ヒト動物由来の抗体の可変領域の全部または一部を含む。

#### 【0024】

「エピトープ」という用語は、イムノグロブリンまたはT細胞受容体と特異的に結合することができる任意のポリペプチド決定因子を指す。いくつかの実施形態において、エピトープは、抗体により特異的に結合される抗原の領域である。いくつかの実施形態において、エピトープは、アミノ酸、糖側鎖、ホスホリル、またはスルホニル基などの分子の化学的に活性な表面基を含んでもよい。いくつかの実施形態において、エピトープは特定の3次元構造特性(例えば、「立体構造」エピトープ)および/または特定の電荷特性を有

し得る。

【 0 0 2 5 】

特定の抗体が両方のエピトープと特異的に結合するならば、1つのエピトープはもう1つのエピトープと「同じ」と定義される。いくつかの実施形態において、異なる一次アミノ酸配列を有するポリペプチドは、同じであるエピトープを含み得る。異なる抗体は、そのエピトープに対する特異的結合について競合するならば、同じエピトープと結合するといわれる。

【 0 0 2 6 】

参照ポリペプチドの「断片」は、参照ポリペプチドの任意の部分由来の一続きのアミノ酸を指す。断片は、参照ポリペプチドの長さよりも短い任意の長さのものであり得る。いくつかの実施形態において、断片は、特定の活性を有するかまたは特定のエピトープを含有する参照ポリペプチドの任意の部分由来の一続きのアミノ酸である。

【 0 0 2 7 】

「ヒト抗体」という用語は、ヒト抗体配列を含み、非ヒト動物由来の抗体配列を含まないモノクローナル抗体を指す。いくつかの実施形態において、ヒト抗体は、天然の抗体で見出されない合成配列を含む可能性がある。この用語は、抗体が作製される方法によって限定されない。例えば、様々な実施形態で、ヒト抗体は、トランスジェニックマウスにおいて、ファージディスプレイにより、ヒトBリンパ球により、または組換え法により作製することができる。

【 0 0 2 8 】

「ヒト化」抗体は、(アミノ酸配列において)ヒト抗体とより密接にマッチするように修飾された非ヒト化抗体を指す。ヒト化抗体はしたがって、一種のキメラ抗体である。いくつかの実施形態において、非ヒト抗体の可変領域の抗原結合残基の外側のアミノ酸残基は修飾されている。いくつかの実施形態において、ヒト化抗体は、ヒト抗体の1以上の相補性決定領域(CDR)の全部または一部を、例えば所望の抗原結合特異性を有する非ヒト抗体などの別の抗体由来の1以上のCDRの全部または一部で置換することによって構築される。いくつかの実施形態において、ヒト化抗体は、CDRの全部または実質的に全部が非ヒト抗体のCDRに相当し、フレームワーク領域(FR)の全部または実質的に全部がヒト抗体のFRに相当する可変領域を含む。いくつかの実施形態において、非ヒト抗体の1以上のCDR内の1以上のアミノ酸はヒト化抗体で、例えば親和性成熟のプロセスによって変更される。親和性成熟の例示的方法は当該技術分野で公知である。いくつかのそのような実施形態において、ヒト化抗体は、ヒト抗体の定常領域(Fc)をさらに含む。

【 0 0 2 9 】

他に指定のない限り、「含む(include、includes、including)」という用語は、「含むが、これらに限定されるものではない」と同じ意味を有する。同様に、「例えば」という用語は、「これらに限定されないが、例えば」という用語と同じ意味を有する。

【 0 0 3 0 】

他に指定のない限り、「管理(manage、managingおよびmanagement)」という用語は、すでに特定の疾患または障害に苦しんでいる患者においてその疾患もしくは障害の再発を防止すること、および/またはその疾患もしくは障害に苦しんでいる患者が寛解期にある時間を延長することを包含する。この用語は、疾患もしくは障害の閾値、発症および/または期間を調節すること、あるいは患者が疾患もしくは障害に反応する方法を変更することを包含する。

【 0 0 3 1 】

「モノクローナル抗体」という用語は、同じエピトープに特異的に結合する抗体の実質的に均一な集団由来の抗体を指す。いくつかの実施形態において、モノクローナル抗体はハイブリドーマによって分泌される。いくつかのそのような実施形態において、ハイブリドーマは当業者に公知のいくつかの方法にしたがって産生される。例えば、Kohler and Milstein (1975) *Nature*256: 495-499を参照のこと。いくつかの実施形態において、モノ

10

20

30

40

50

クローナル抗体は組換えDNA法を用いて産生される（例えば、米国特許第4,816,567号を参照のこと）。いくつかの実施形態において、モノクローナル抗体は、ファージディスプレイライブラリーから単離された抗体断片を指す。例えば、Clackson et al. (1991) Nature 352: 624-628、およびMarks et al. (1991) J. Mol. Biol. 222: 581-597を参照のこと。種々の他のモノクローナル抗体産生技術については、例えばHarlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) を参照のこと。

【0032】

「中和抗体」または「中和する抗体」という用語は、抗体が特異的に結合するエピトープを含むポリペプチドの少なくとも1つの活性を減弱する抗体を指す。いくつかの実施形態において、中和抗体は*in vitro*および/または*in vivo*でポリペプチドの活性を減弱する。

10

【0033】

「NOTUM」という用語は、特に明記しない限り、ヒト、ウシ、ニワトリ、齧歯類、マウス、ラット、ブタ、ヒツジ、霊長類、サル、およびモルモットをはじめとする脊椎動物またはほ乳類源由来のアミノ酸配列を有するノータム・ペクチンアセチルエステラーゼ (notum pectinaceylesterase) を指す。この用語はさらに、天然のNOTUMの少なくとも1つの*in vivo*または*in vitro*活性を維持する天然のNOTUMの断片および変異体も指す。この用語は、NOTUMの完全長未処理前駆体形態ならびにシグナルペプチドの翻訳後切断およびタンパク質分解処理の他の形態から生じる成熟形態を包

20

【0034】

「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」という用語は、本明細書中では交換可能に用いられ、アミノ酸残基のポリマーを指す。この用語は、天然に存在するアミノ酸を含有するアミノ酸ポリマーならびに1以上のアミノ酸残基が対応する天然に存在するアミノ酸の人工の化学アナログであるアミノ酸ポリマーに適用される。アミノ酸ポリマーは、任意の長さのものであり得る。「天然のポリペプチド」という用語は、天然に存在するポリペプチドを指す。

30

【0035】

他に指定のない限り、「防止 (preventing, prevent、およびprevention)」という用語は、患者が特定の疾患または障害に苦しみ始める前に起こる作用であって、その疾患または障害の重症度を阻害または減少させる作用を想定する。言い換えれば、この用語は予防を包含する。

【0036】

他に指定のない限り、化合物の「予防有効量」は、疾患もしくは状態、または疾患もしくは状態に関連する1以上の症状を防止するため、またはその再発を予防するために十分な量である。化合物の「予防有効量」は、単独または他の薬剤との組み合わせで、疾患の防止において予防的利点を提供する治療薬の量を意味する。「予防有効量」という用語は、全体的な予防を改善するか、または別の予防薬の予防効果を増強する量を包含する可能性がある。

40

【0037】

抗体は、タンパク質および/または巨大分子の複合混合物中の抗原を優先的に認識する場合に、抗原と「特異的に結合する」。いくつかの実施形態において、抗体は、特定のエピトープと特異的に結合する抗原結合部位を含む。いくつかのそのような実施形態において、抗体は、異なる抗原が特定のエピトープを含む限り、異なる抗原と結合することができる。場合によっては、例えば、異なる種由来の相同タンパク質は同じエピトープを含む可能性がある。いくつかの実施形態において、抗体は、解離定数 ( $K_D$ ) が  $1 \mu M$  である場合に、いくつかの実施形態では解離定数が  $100 nM$  である場合、そしていくつか

50

の実施形態では解離定数が  $10 \text{ nM}$  である場合に、抗原と特異的に結合すると言われる。

【0038】

「対象」および「患者」という用語は、ヒトおよび動物の両方を含む。いくつかの実施形態において、対象または患者はほ乳類である。いくつかのそのような実施形態において、対象または患者はヒトである。

【0039】

他に指定のない限り、化合物の「治療有効量」は、疾患もしくは状態の治療もしくは管理において治療効果を提供するために、または疾患もしくは状態に関連する1以上の症状を遅延させるかまたは最小限に抑えるために有効な量である。化合物の「治療有効量」は、疾患または状態の治療または管理において治療効果を提供する、単独または他の治療薬と組み合わせた治療薬の量を意味する。「治療有効量」という用語は、全体的な治療を改善する、または疾患もしくは状態の症状もしくは原因を軽減もしくは回避する、または別の治療薬の治療効果を増強する量を包含する可能性がある。

【0040】

他に指定のない限り、「治療 (treat、treatingおよびtreatment)」という用語は、患者が特定の疾患または障害に苦しんでいる間に起こる作用であって、疾患もしくは障害の重症度を軽減するか、または疾患もしくは障害の進行を遅延もしくは減速させる作用を想定する。

【0041】

5.2. 抗体

5.2.1. 抗体構造例

天然の抗体は、典型的には四量体構造を有する。四量体は、典型的にはポリペプチド鎖の2つの同じ対を含み、各対は、1つの軽鎖 (いくつかの実施形態では、約  $25 \text{ kDa}$ ) および1つの重鎖 (いくつかの実施形態では、約  $50 \sim 70 \text{ kDa}$ ) を有する。天然の抗体では、重鎖は、可変領域  $VH$ 、および3つの定常領域  $CH1$ 、 $CH2$ 、および  $CH3$  を含む。 $VH$  ドメインは重鎖のアミノ末端にあり、 $CH3$  ドメインはカルボキシ末端にある。天然の抗体では、軽鎖は可変領域  $VL$ 、および定常領域  $CL$  を含む。軽鎖の可変領域は、軽鎖のアミノ末端にある。天然の抗体では、軽鎖/重鎖対の可変領域は、典型的には抗原結合部位を形成する。定常領域は、典型的にはエフェクター機能の原因となる。

【0042】

天然のヒト軽鎖は、典型的にはカッパおよびラムダ軽鎖として分類される。天然のヒト重鎖は、典型的には、ミュー、デルタ、ガンマ、アルファ、またはイプシロンに分類され、抗体のイソ型をそれぞれ  $IgM$ 、 $IgD$ 、 $IgG$ 、 $IgA$ 、および  $IgE$  と定義する。 $IgG$  は、 $IgG1$ 、 $IgG2$ 、 $IgG3$ 、および  $IgG4$  を含むサブクラスを有する。 $IgM$  は、 $IgM1$  および  $IgM2$  を含むサブクラスを有する。 $IgA$  は、 $IgA1$  および  $IgA2$  を含むサブクラスを有する。天然のヒト軽鎖および重鎖内で、可変および定常領域は、典型的には、約12以上のアミノ酸の「J」領域により結合され、重鎖は約10以上のアミノ酸の「D」領域も含む。例えば、Fundamental Immunology (1989) Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y.) を参照のこと。

【0043】

天然の抗体では、可変領域は典型的には、比較的保存されたフレームワーク領域 ( $FR$ ) が、相補性決定領域 ( $CDR$ ) ととも呼ばれる3つの超可変領域によって結合される、同じ一般的構造を示す。各対の2つの鎖由来の  $CDR$  は、典型的には、特異的エピトープとの結合を可能にする可能性があるフレームワーク領域と並んでいる。N末端からC末端へ、軽鎖および重鎖可変領域はどちらも、典型的にはドメイン  $FR1$ 、 $CDR1$ 、 $FR2$ 、 $CDR2$ 、 $FR3$ 、 $CDR3$  および  $FR4$  を含む。重鎖上の  $CDR$  は  $H1$ 、 $H2$ 、および  $H3$  と称され、一方、軽鎖上の  $CDR$  は  $L1$ 、 $L2$ 、および  $L3$  と称される。典型的には、 $CDR3$  は抗原結合部位内の分子多様性の最大の原因である。 $H3$  は、例えばある例では2個のアミノ酸残基程度の長さである可能性があるか、または26個より長い可能性が

10

20

30

40

50



ある。アミノ酸の各ドメインへの帰属は、典型的には、Kabat et al.(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institutes of Health, Publication No. 91-3242, vols. 1-3, Bethesda, MD);Chothia, C., and Lesk, A.M. (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917;またはChothia, C. et al. Nature 342:878-883 (1989)の定義にしたがう。本出願では、「CDR」という用語は、特別の定めのない限り、軽鎖または重鎖のいずれかからのCDRを指す。

【0044】

「Fab」断片は、1つの軽鎖ならびに1つの重鎖のCH1および可変領域を含む。Fab分子の重鎖は、別の重鎖分子とジスルフィド結合を形成することができない。A「Fab'」断片は、1つの軽鎖ならびにCH1およびCH2ドメイン間のさらなる定常領域を含む1つの重鎖を含む。鎖間ジスルフィド結合をFab'断片の2つの重鎖間で形成して、「F(ab')<sub>2</sub>」分子を形成することができる。

10

【0045】

「Fv」断片は、重鎖および軽鎖由来の可変領域を含むが、定常領域が欠けている。単鎖Fv(scFv)断片は、可動性リンカーにより連結された重および軽鎖可変領域を含み、抗原結合領域を有するポリペプチド単鎖を形成する。例示的単鎖抗体は、国際公開第88/01649号ならびに米国特許第4,946,778号および同第5,260,203号で詳細に検討されている。ある例では、単一の可変領域(すなわち、重鎖可変領域または軽鎖可変領域)は、抗原を認識および結合する能力を有する可能性がある。

【0046】

20

本明細書中で用いられる場合、「重鎖」という用語は、軽鎖との組み合わせのいずれかで抗原特異性を付与するために十分な重鎖可変領域配列を含むポリペプチドを指す。

【0047】

本明細書中で用いられる場合、「軽鎖」という用語は、単独または重鎖との組み合わせのいずれかで抗原特異性を付与するために十分な軽鎖可変領域配列を含むポリペプチドを指す。

【0048】

5.2.2. 例示的抗体

いくつかの実施形態において、NOTUMと特異的に結合するモノクローナル抗体が提供される。いくつかのそのような実施形態において、モノクローナル抗体は、in vivoおよび/またはin vitroでNOTUMの少なくとも1つの活性を減弱させる中和抗体である。

30

【0049】

いくつかの実施形態において、NOTUMに対する中和抗体は、in vitroでの8-オクタノイルオキシピレン-1,3,6-トリスルホン酸三ナトリウム(OPTS)アッセイにおいてNOTUM活性を減弱する。いくつかの実施形態において、NOTUMに対する中和抗体は、in vitroでのWntシグナル伝達アッセイにおけるNOTUM活性を減弱する。

【0050】

いくつかの実施形態において、NOTUMに対する中和抗体は、対象に対して十分な量で十分な期間投与される場合に、in vivoで血清PINPレベルを増大させる。十分な量を十分な期間投与するための例示的投薬量および投薬スケジュールは本明細書中で検討されている。いくつかの実施形態において、NOTUMに対する中和抗体は、骨塩密度を増大させる。いくつかの実施形態において、NOTUMに対する中和抗体はin vivoで大腿骨骨幹中央部の皮質厚を増大させる。いくつかの実施形態において、NOTUMに対する中和抗体はin vivoで大腿骨骨幹中央部の骨領域を増大させる。いくつかの実施形態において、NOTUMに対する中和抗体はin vivoで上腕骨骨幹中央部の皮質厚を増大させる。いくつかの実施形態において、NOTUMに対する中和抗体はin vivoで皮質内骨形成を増大させる。いくつかの実施形態において、NOTUMに対する中和抗体はin vivoでL5椎体中の皮質骨体積の割合を増大させる。

40

50

「L V 5 椎体中の皮質骨体積の割合」により、L V 5 椎体の全体積に対する皮質骨体積の割合を意味する。いくつかの実施形態において、NOTUMに対する中和抗体は、*in vivo*で大腿骨頸部の全体積に対する大腿骨頸部骨体積の割合を増大させる。

#### 【0051】

いくつかの実施形態において、マウスNOTUMと特異的に結合する中和抗体が提供される。いくつかの実施形態において、ヒトNOTUMと特異的に結合する中和抗体が提供される。いくつかの実施形態において、ヒトNOTUMのQ 4 7からM 1 7 7までの領域に結合する中和抗体が提供される。いくつかの実施形態において、結合についてヒトNOTUMのQ 4 7からM 1 7 7までの領域に依存する中和抗体が提供される。いくつかの実施形態において、異なる種由来のNOTUMの同じ領域に特異的に結合する中和抗体（すなわち、交差反応性を示す抗体）が提供される。いくつかの実施形態において、ヒトNOTUMならびに、マウス、ラット、モルモット、カニクイザル、マーモセット、およびアカゲザルから選択される少なくとも1種由来のNOTUMと結合する中和抗体が提供される。いくつかのそのような実施形態において、抗体は、非ヒト霊長類NOTUMおよびヒトNOTUMの両方に特異的に結合する。いくつかの実施形態において、抗体はマウスNOTUMおよびヒトNOTUMの両方に特異的に結合する。

#### 【0052】

いくつかの実施形態において、Q 4 7からM 1 7 7までのヒトNOTUMの領域に結合する中和抗体が提供される。いくつかの実施形態において、結合についてQ 4 7からM 1 7 7までのヒトNOTUMの領域に依存する中和抗体が提供される。いくつかの実施形態において、ヒト - マウスキメラNOTUM（配列番号83）と、マウス - ヒトキメラNOTUM（配列番号84）に対する親和性よりも少なくとも5倍、少なくとも10倍、または少なくとも20倍強力な親和性で結合するNOTUM中和抗体が提供される。いくつかの実施形態において、ヒト - マウス - ヒトキメラNOTUM（配列番号85）と、マウス - ヒト - マウスキメラNOTUM（配列番号86）に対する親和性よりも少なくとも5倍、少なくとも10倍、または少なくとも20倍強力な親和性で結合するNOTUM中和抗体が提供される。いくつかの実施形態において、ヒトNOTUM（配列番号1）と、NOTUM D 1 4 1 S（配列番号94）に対する親和性よりも少なくとも5倍、少なくとも10倍、または少なくとも20倍強力な親和性で結合するNOTUM中和抗体が提供される。いくつかの実施形態において、マウスNOTUM S 1 4 8 D（配列番号95）と、マウスNOTUM（配列番号2）に対する親和性よりも少なくとも5倍、少なくとも10倍、または少なくとも20倍強力な親和性で結合するNOTUM中和抗体が提供される。いくつかの実施形態において、ヒトNOTUM（配列番号1）と、ヒトNOTUM R 1 4 4 A / R 1 4 5 A（配列番号99）に対する親和性よりも少なくとも5倍、少なくとも10倍、または少なくとも20倍強力な親和性で結合するNOTUM中和抗体が提供される。

#### 【0053】

いくつかの実施形態において、NOTUMに対する中和抗体は、ヒトNOTUM（配列番号1）と、実施例6.8で記載されるように測定して、100 nM未満、50 nM未満、40 nM未満、30 nM未満、25 nM未満、20 nM未満、15 nM未満、10 nM未満、5 nM未満、3 nM未満、または2 nM未満の親和性（ $K_D$ ）で結合する。いくつかの実施形態において、NOTUMに対する中和抗体は、実施例6.4.1で記載されるようにして測定して、100 nM未満、75 nM未満、50 nM未満、40 nM未満、30 nM未満、25 nM未満、20 nM未満、15 nM未満、または10 nM未満のOPTSアッセイでの $IC_{50}$ を有する。いくつかの実施形態において、NOTUMに対する中和抗体は、実施例6.4.2で記載されるようにして測定して、100 nM未満、75 nM未満、50 nM未満、40 nM未満、30 nM未満、25 nM未満、20 nM未満、15 nM未満、または10 nM未満のWntシグナル伝達アッセイでの $IC_{50}$ を有する。いくつかの実施形態において、 $IC_{50}$ はヒトNOTUMについてのものである。いくつかの実施形態において、 $IC_{50}$ はマウスNOTUMについてのものである。

## 【 0 0 5 4 】

いくつかの実施形態において、中和抗体は非ヒトモノクローナル抗体である。いくつかのそのような実施形態において、中和抗体は齧歯類モノクローナル抗体である。いくつかのそのような実施形態において、中和抗体はマウスモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態において、中和抗体はキメラモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態において、中和抗体はヒト化モノクローナル抗体である。いくつかの実施形態において、中和抗体はヒトモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態において、キメラ、ヒト化、および/またはヒトモノクローナル抗体はヒトにおける治療抗体として有用である。

## 【 0 0 5 5 】

いくつかの実施形態において、中和抗体は抗体断片である。例示的抗体断片としては、 $Fab$ 、 $Fab'$ 、 $F(ab')_2$ 、 $Fv$ 、 $scFv$ 、 $Fd$ 、二重特異性抗体などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

## 【 0 0 5 6 】

非限定的例示的NOTUM中和抗体は、 $MAb1.731$ 、 $1.802$ 、 $1.815$ 、 $1.846$ 、 $2.1029$ 、 $2.55$ 、および $2.78$ を含む。 $MAb1.731$ 、 $1.802$ 、 $1.815$ 、 $1.846$ 、 $2.1029$ 、 $2.55$ 、および $2.78$ のそれぞれは、NOTUMの少なくとも1つの活性を中和する。さらに、少なくとも $MAb1.802$ 、 $1.815$ 、 $1.846$ 、および $2.78$ は、NOTUMに対する結合に関して、アミノ酸 $Q47 \sim M177$ により結合したヒトNOTUMの領域の少なくとも一部に依存する。いくつかの実施形態において、NOTUM中和抗体は、NOTUMに対する結合に関して、 $MAb1.731$ 、 $1.802$ 、 $1.815$ 、 $1.846$ 、 $2.1029$ 、 $2.55$ 、および $2.78$ から選択される少なくとも1つの抗体と競合する。いくつかの実施形態において、NOTUM中和抗体は、 $MAb1.731$ 、 $1.802$ 、 $1.815$ 、 $1.846$ 、 $2.1029$ 、 $2.55$ 、および $2.78$ から選択される少なくとも1つの抗体によって結合されるエピトープと少なくとも部分的に重複するNOTUMのエピトープと結合する。加えて、いくつかの実施形態において、NOTUMに対する結合について $MAb1.731$ 、 $1.802$ 、 $1.815$ 、 $1.846$ 、 $2.1029$ 、 $2.55$ 、および $2.78$ から選択される少なくとも1つの抗体と競合する抗体は、NOTUM中和抗体であると予想される。 $MAb1.731$ 、 $1.802$ 、 $1.815$ 、 $1.846$ 、 $2.1029$ 、 $2.55$ 、および $2.78$ のCDRおよび可変領域の配列を以下のセクション7で示す。

## 【 0 0 5 7 】

いくつかの実施形態において、 $MAb1.731$ が結合する同じエピトープと結合するNOTUM中和抗体が提供される。いくつかの実施形態において、 $MAb1.802$ が結合する同じエピトープと結合するNOTUM中和抗体が提供される。いくつかの実施形態において、 $MAb1.815$ が結合する同じエピトープと結合するNOTUM中和抗体が提供される。いくつかの実施形態において、 $MAb1.846$ が結合する同じエピトープと結合するNOTUM中和抗体が提供される。いくつかの実施形態において、 $MAb2.1029$ が結合する同じエピトープと結合するNOTUM中和抗体が提供される。いくつかの実施形態において、 $MAb2.55$ が結合する同じエピトープと結合するNOTUM中和抗体が提供される。いくつかの実施形態において、 $MAb2.78$ が結合する同じエピトープと結合するNOTUM中和抗体が提供される。

## 【 0 0 5 8 】

いくつかの実施形態において、NOTUM中和抗体は、配列番号7、15、23、31、39、および47から選択される重鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態において、NOTUM中和抗体は、配列番号8、16、24、32、40、および48から選択される軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態において、NOTUM中和抗体は、配列番号7のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、および配列番号8のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態において、NOTUM中和抗体は、配列番号15のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、および配列番号16のアミノ酸配列を有する軽鎖可

変領域を含む。いくつかの実施形態において、NOTUM中和抗体は、配列番号23のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、および配列番号24のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態において、NOTUM中和抗体は、配列番号31のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、および配列番号32を有するアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態において、NOTUM中和抗体は、配列番号39のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、および配列番号40を有するアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態において、NOTUM中和抗体は、配列番号47のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、および配列番号48のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む。

【0059】

いくつかの実施形態において、NOTUM中和抗体は、配列番号9、17、25、33、41、49、および90から選択される重鎖CDR1を含む。いくつかの実施形態において、NOTUM中和抗体は、配列番号10、18、26、34、42、および50から選択される重鎖CDR2を含む。いくつかの実施形態において、NOTUM中和抗体は、配列番号11、19、27、35、43、51、および91から選択される重鎖CDR3を含む。いくつかの実施形態において、NOTUM中和抗体は、配列番号9のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号10のアミノ酸配列を有するCDR2、および配列番号11のアミノ酸配列を有するCDR3を含む重鎖を含む。いくつかの実施形態において、NOTUM中和抗体は、配列番号17および90から選択されるアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号18のアミノ酸配列を有するCDR2、ならびに配列番号19および91から選択されるアミノ酸配列を有するCDR3を含む重鎖を含む。いくつかの実施形態において、NOTUM中和抗体は、配列番号17のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号18のアミノ酸配列を有するCDR2、および配列番号19のアミノ酸配列を有するCDR3を含む重鎖を含む。いくつかの実施形態において、NOTUM中和抗体は、配列番号25および90から選択されるアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号26のアミノ酸配列を有するCDR2、および配列番号27のアミノ酸配列を有するCDR3を含む重鎖を含む。いくつかの実施形態において、NOTUM中和抗体は、配列番号25のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号26のアミノ酸配列を有するCDR2、および配列番号27のアミノ酸配列を有するCDR3を含む重鎖を含む。いくつかの実施形態において、NOTUM中和抗体は、配列番号33および90から選択されるアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号34のアミノ酸配列を有するCDR2、ならびに配列番号35および91から選択されるアミノ酸配列を有するCDR3を含む重鎖を含む。いくつかの実施形態において、NOTUM中和抗体は、配列番号33のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号34のアミノ酸配列を有するCDR2、および配列番号35のアミノ酸配列を有するCDR3を含む重鎖を含む。いくつかの実施形態において、NOTUM中和抗体は、配列番号41のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号42のアミノ酸配列を有するCDR2、および配列番号43のアミノ酸配列を有するCDR3を含む重鎖を含む。いくつかの実施形態において、NOTUM中和抗体は、配列番号49のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号50のアミノ酸配列を有するCDR2、および配列番号51のアミノ酸配列を有するCDR3を含む重鎖を含む。いくつかの実施形態において、NOTUM中和抗体は、配列番号57のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号58のアミノ酸配列を有するCDR2、および配列番号59のアミノ酸配列を有するCDR3を含む重鎖を含む。いくつかの実施形態において、配列番号90中の $X_1$ は、YおよびFから選択される。いくつかの実施形態において、配列番号91中の $X_2$ は、HおよびNから選択される。

【0060】

いくつかの実施形態において、NOTUM中和抗体は、配列番号12、20、28、36、44、52、60、および92から選択される軽鎖CDR1を含む。いくつかの実施形態において、NOTUM中和抗体は、配列番号13、21、29、37、45、53、61、および93から選択される軽鎖CDR2を含む。いくつかの実施形態において、NOTUM中和抗体は、配列番号14、22、30、38、46、54、および62から選

10

20

30

40

50

30

## 50

酸配列を有するCDR1、配列番号29および93から選択されるアミノ酸配列を有するCDR2、ならびに配列番号30のアミノ酸配列を有するCDR3を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態において、NOTUM中和抗体は、配列番号25のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号26のアミノ酸配列を有するCDR2、および配列番号27のアミノ酸配列を有するCDR3を含む重鎖；ならびに配列番号28のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号29のアミノ酸配列を有するCDR2、および配列番号30のアミノ酸配列を有するCDR3を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態において、NOTUM中和抗体は、配列番号33および90から選択されるアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号34のアミノ酸配列を有するCDR2、ならびに配列番号35および91から選択されるアミノ酸配列を有するCDR3を含む重鎖；ならびに配列番号36および92から選択されるアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号37および93から選択されるアミノ酸配列を有するCDR2、ならびに配列番号38のアミノ酸配列を有するCDR3を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態において、NOTUM中和抗体は、配列番号33のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号34のアミノ酸配列を有するCDR2、および配列番号35のアミノ酸配列を有するCDR3を含む重鎖；ならびに配列番号36のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号37のアミノ酸配列を有するCDR2、および配列番号38のアミノ酸配列を有するCDR3を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態において、NOTUM中和抗体は、配列番号41のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号42のアミノ酸配列を有するCDR2、および配列番号43のアミノ酸配列を有するCDR3を含む重鎖；ならびに配列番号44のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号45のアミノ酸配列を有するCDR2、および配列番号46のアミノ酸配列を有するCDR3を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態において、NOTUM中和抗体は、配列番号49のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号50のアミノ酸配列を有するCDR2、および配列番号51のアミノ酸配列を有するCDR3を含む重鎖；ならびに配列番号52のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号53のアミノ酸配列を有するCDR2、および配列番号54のアミノ酸配列を有するCDR3を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態において、NOTUM中和抗体は、配列番号57のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号58のアミノ酸配列を有するCDR2、および配列番号59のアミノ酸配列を有するCDR3を含む重鎖；ならびに配列番号60のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号61のアミノ酸配列を有するCDR2、および配列番号62のアミノ酸配列を有するCDR3を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態において、配列番号90中の $X_1$ はYおよびFから選択される。いくつかの実施形態において、配列番号91中の $X_2$ はHおよびNから選択される。いくつかの実施形態において、配列番号92中の $X_3$ はIおよびSから選択される；配列番号92中の $X_4$ はTおよびEから選択される；そして配列番号92中の $X_5$ はMおよびIから選択される。いくつかの実施形態において、配列番号93中の $X_6$ はDおよびNから選択される。

#### 【0062】

いくつかの実施形態において、ヒトNOTUMと特異的に結合するNOTUM中和抗体が提供される。いくつかの実施形態において、異なる種由来のNOTUM中の同じエピートプに特異的に結合するNOTUM中和抗体（すなわち、交差反応性を示す抗体）が提供される。いくつかの実施形態において、ヒトNOTUMと特異的に結合し、マウス、ラット、モルモット、カニクイザル、マーモセット、およびアカゲザルから選択されるNOTUMの少なくとも1つの種とも特異的に結合するNOTUM中和抗体が提供される。いくつかの実施形態において、ヒトNOTUMおよび少なくとも1種の非ヒト霊長類由来のNOTUMと特異的に結合するNOTUM中和抗体が提供される。いくつかの実施形態において、ヒトNOTUMおよびマウスNOTUMと特異的に結合するNOTUM中和抗体が提供される。

#### 【0063】

##### 5.2.2.1. キメラ化およびヒト化モノクローナル抗体

いくつかの実施形態において、非ヒト抗体はキメラ化されている。いくつかの実施形態

10

20

30

40

50

において、ヒトNOTUMと特異的に結合するマウスモノクローナル抗体はキメラ化されている。キメラ抗体を作製するためのある例示的方法は、例えば、Morrison et al. (1984) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA81:6851-6855; Neuberger et al. (1984) Nature312:604-608; Takeda et al. (1985) Nature314:452-454; ならびに米国特許第6,075,181号および同第5,877,397号で提供されている。

#### 【0064】

いくつかの実施形態において、非ヒト抗体は「ヒト化」される。いくつかの実施形態において、ヒトNOTUMと特異的に結合するマウスモノクローナル抗体はヒト化される。いくつかの実施形態において、マウスNOTUMに対するものであるが、ヒトNOTUMと特異的に結合する（すなわち、交差反応する）マウスモノクローナル抗体は、ヒト化されている。いくつかの実施形態において、ヒトに投与された場合、ヒト化抗体はそれらの結合特異性を保持し、減少した免疫原性（例えば、減少したヒト抗マウス抗体（HAMA）応答）を有する。いくつかの実施形態において、ヒト化は、以下で詳細に記載するように、CDRグラフティングおよび人間工学をはじめとする方法によって達成される。

#### 【0065】

ヒト化抗体のいくつかの実施形態において、所望の結合特異性（「ドナー」抗体）を有する抗体の軽鎖および重鎖可変領域由来の1以上の相補性決定領域（CDR）は「アクセプター」抗体中のヒトフレームワーク領域（FR）上にグラフトされる。例示的CDRグラフティングは、例えば、米国特許第6,180,370号、同第5,693,762号、同第5,693,761号、同第5,585,089号、および同第5,530,101号; Queen et al. (1989) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA86:10029-10033で記載される。いくつかの実施形態において、軽鎖および重鎖可変領域由来の1以上のCDRはアクセプター抗体中のコンセンサスヒトFR上にグラフトされる。コンセンサスヒトFRを作製するために、いくつかの実施形態において、いくつかのヒト重鎖または軽鎖アミノ酸配列由来のFRを整列させて、コンセンサスアミノ酸配列を同定する。

#### 【0066】

いくつかの実施形態において、アクセプター抗体中のあるFRアミノ酸は、ドナー抗体からのFRアミノ酸で置換される。あるそのような実施形態において、FRドナー抗体からのアミノ酸は、標的抗原に対するドナー抗体の親和性に寄与するアミノ酸である。例えば、米国特許第6,180,370号、同第5,693,762号、同第5,693,761号、同第5,585,089号、および同第5,530,101号; Queen et al. (1989) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA86:10029-10033を参照のこと。いくつかの実施形態において、コンピュータープログラムは、ドナーおよび/またはアクセプター抗体をモデル化するために使用され、抗原の結合に関与および/または抗原結合部位の構造に寄与する可能性がある残基を特定し、かくしてドナー抗体において置換されるFR残基などの残基の選択に役立つ。

#### 【0067】

いくつかの実施形態において、ドナー抗体由来のCDRは、ヒト定常領域を含むアクセプター抗体上にグラフトされる。いくつかのそのような実施形態において、FRはアクセプター上にもグラフトされる。いくつかの実施形態において、ドナー抗体由来のCDRは単鎖Fv抗体から誘導される。いくつかの実施形態において、ドナー抗体由来のFRは、単鎖Fv抗体から誘導される。いくつかの実施形態において、ヒト化抗体中のグラフトされたCDRを（例えば、アミノ酸置換、欠失、または挿入により）さらに修飾して、標的抗原に対するヒト化抗体の親和性を増大させる。いくつかの実施形態において、ヒト化抗体中のグラフトされたFRを（例えば、アミノ酸置換、欠失、または挿入により）さらに修飾して、標的抗原に対するヒト化抗体の親和性を増大させる。

#### 【0068】

いくつかの実施形態において、非ヒト抗体は、「人間工学」法を用いてヒト化することができる。例えば、米国特許第5,766,886号および同第5,869,619号を参照のこと。人間工学のいくつかの実施形態において、抗体可変ドメインの構造に関する

情報（例えば、結晶構造および/または分子モデリングから得られる情報）を用いて、可変領域中の所定のアミノ酸残基が（a）抗原結合に関与する可能性、（b）抗体表面上で曝露される（すなわち、溶媒に接近可能）可能性、または（c）抗体可変領域内に埋め込まれている（すなわち、可変領域の構造の維持に関与する）可能性を評価する。さらに、いくつかの実施形態において、ヒト可変領域コンセンサス配列を生成させて、ヒト可変領域間で保存される残基を同定する。いくつかの実施形態において、その情報は、非ヒト抗体の可変領域中のアミノ酸残基が置換されるべきかどうかについての指針を提供する。

#### 【0069】

いくつかの実施形態において、ヒト化NOTUM中和抗体は、MAb 1.731、1.802、1.815、1.846、2.1029、2.55、および2.78から選択される抗体のCDR1、CDR2、およびCDR3の少なくとも1つを含む重鎖を含む。いくつかの実施形態において、NOTUM中和抗体は、MAb 1.731、1.802、1.815、1.846、2.1029、2.55、および2.78から選択される抗体のCDR1、CDR2、およびCDR3を含む重鎖を含む。いくつかの実施形態において、NOTUM中和抗体は、MAb 1.731、1.802、1.815、1.846、2.1029、2.55、および2.78から選択される抗体のCDR1、CDR2、およびCDR3の少なくとも1つを含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態において、NOTUM中和抗体は、MAb 1.731、1.802、1.815、1.846、2.1029、2.55、および2.78から選択される抗体のCDR1、CDR2、およびCDR3を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態において、NOTUM中和抗体は、重鎖CDR1、CDR2、およびCDR3、ならびにMAb 1.731、1.802、1.815、1.846、2.1029、2.55、および2.78から選択される抗体由来の軽鎖CDR1、CDR2、およびCDR3を含む。

#### 【0070】

いくつかの実施形態において、NOTUM中和抗体は、配列番号63、67、71、75、および79から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施形態において、NOTUM中和抗体は、配列番号64、68、72、76、および80から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施形態において、NOTUM中和抗体は、配列番号65、69、73、77、および81から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態において、NOTUM中和抗体は、配列番号66、70、74、78、および82から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態において、NOTUM中和抗体は、配列番号63のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号65を含むアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態において、NOTUM中和抗体は、配列番号67のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号69のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態において、NOTUM中和抗体は、配列番号71のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号73のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態において、NOTUM中和抗体は配列番号75のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号77のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態において、NOTUM中和抗体は、配列番号79のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号81のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態において、NOTUM中和抗体は、配列番号64のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号66のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態において、NOTUM中和抗体は、配列番号68のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号70のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態において、NOTUM中和抗体は、配列番号72のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号74のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態において、NOTUM中和抗体は、配列番号76のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号78のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態において、NOTUM中和抗体は、配列番号80のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号82のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

#### 【0071】

5.2.2.2. 抗体イソ型

10

20

30

40

50



いくつかの実施形態において、NOTUMに対する抗体は、IgM、IgD、IgG、IgA、およびIgEから選択される任意のイソ型のものである。いくつかの実施形態において、NOTUMに対する抗体は、IgGイソ型のものである。あるそのような実施形態において、抗体はサブクラスIgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4のものである。いくつかの実施形態において、NOTUMに対する抗体はIgMイソ型のものである。あるそのような実施形態において、抗体はサブクラスIgM1またはIgM2のものである。いくつかの実施形態において、NOTUMに対する抗体はIgAイソ型のものである。あるそのような実施形態において、抗体はサブクラスIgA1またはIgA2のものである。NOTUMに対する抗体は、例えばヒトまたはマウス起源のラムダまたはカッパ軽鎖定常領域を含んでもよい。いくつかの実施形態において、NOTUMに対する抗体は、ヒトカッパ軽鎖定常領域およびヒトIgG1、IgG2、またはIgG4重鎖定常領域を含む。いくつかの実施形態において、NOTUMに対する抗体はマウスカッパ軽鎖およびマウスIgG1またはIgG2重鎖を含む。

10

#### 【0072】

##### 5.2.2.3. 修飾抗体

いくつかの実施形態において、抗体を修飾して、1以上のその特定を改変する。いくつかの実施形態において、修飾抗体は、例えば安定性の増加、循環における時間の増加、または免疫原性の減少などの非修飾抗体よりすぐれた利点を有する可能性がある（例えば、米国特許第4,179,337号を参照のこと）。いくつかの実施形態において、抗体を非タンパク質様部分に対して連結することによって修飾する。いくつかの実施形態において、抗体は、例えば、抗体上の炭水化物鎖の数、タイプ、結合、および/または位置を変更することによって、抗体のグリコシル化状態を改変することにより修飾される。抗体のグリコシル化状態を改変することにより修飾される。いくつかの実施形態において、抗体はグリコシル化されないように変更される。

20

#### 【0073】

いくつかの実施形態において、1以上の化学部分を抗体のアミノ酸骨格および/または炭水化物残基に結合させる。化学部分を抗体に結合させるためのある例示的な方法は当業者に公知である。そのような方法としては、アシル化反応またはアルキル化反応が挙げられるが、これらに限定されるものではない。例えば、欧州特許出願公開第0401384号；Malik et al. (1992), Exp. Hematol., 20:1028-1035; Francis (1992) Focus on Growth Factors3(2):4-10, published by Mediscript, Mountain Court, Friern Barnet Lane, London N20 0LD, UK；欧州特許出願公開第0154316号；欧州特許出願公開第0401384号；国際公開第92/16221号；国際公開第95/34326号；国際公開第95/13312号；国際公開第96/11953号；国際公開第96/19459号および国際公開第96/19459号を参照のこと。いくつかの実施形態において、これらの反応のいずれかを用いて、そのアミノ末端で化学的に修飾された抗体を生成させる。

30

#### 【0074】

いくつかの実施形態において、抗体を検出可能な標識、例えば、酵素標識、蛍光標識、アイソトープ標識または親和性標識と結合させる。あるそのような実施形態において、検出可能な標識は、抗体の検出または単離を可能にする。いくつかの実施形態において、検出可能な標識は、抗体によって結合された抗原の検出を可能にする。

40

#### 【0075】

いくつかの実施形態において、抗体を1以上のポリマーに連結させることによって修飾する。いくつかの実施形態において、抗体を1以上の水溶性ポリマーに連結させる。あるそのような実施形態において、水溶性ポリマーへの結合によって、抗体が生理学的環境などの水性環境中で沈殿する可能性は減少する。いくつかの実施形態において、治療抗体を水溶性ポリマーと連結させる。いくつかの実施形態において、当業者は、ポリマー/抗体結合体が患者の治療で用いられるかどうか、もし用いられる場合は抗体の薬理学的プロファイル（例えば、半減期、投薬量、活性、抗原性、および/または他の因子）をはじめと

50

する検討項目に基づいて、好適な水溶性ポリマーを選択することができる。

【0076】

ある例示的な臨床的に許容される水溶性ポリマーとしては、ポリエチレングリコール (PEG) ; ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒド ; エチレングリコール / プロピレングリコールのコポリマー ; モノメトキシ - ポリエチレングリコール ; カルボキシメチルセルロース ; デキストラン ; ポリビニルアルコール (PVA) ; ポリビニルピロリドン、ポリ - 1, 3 - ジオキソラン ; ポリ - 1, 3, 6 - トリオキサン ; エチレン / 無水マレイン酸コポリマー ; ポリ - アミノ酸 (ホモポリマーまたはランダムコポリマーのいずれか) ; ポリ (n - ビニルピロリドン) ポリエチレングリコール ; ポリプロピレングリコールホモポリマー (PPG) および他のポリアルキレンオキシド ; ポリプロピレンオキシド / エチレンオキシドコポリマー ; ポリオキシエチル化ポリオール (POG) (例えば、グリセロール) および他のポリオキシエチル化ポリオール ; ポリオキシエチル化ソルビトール、ポリオキシエチル化グルコース、コロニック酸 (colonic acid) または他の炭水化物ポリマー ; ならびにフィコール、デキストラン、またはそれらの混合物が挙げられるが、これらに限定されるものではない。ある例示的な PEG としては、抗体修飾で有用であることが当該技術分野で知られているある形態、例えば、モノ - (C<sub>1</sub> - C<sub>10</sub>) アルコキシ - またはアリールオキシ - PEG が挙げられるが、これらに限定されるものではない。いくつかの実施形態において、PEG プロピオンアルデヒドは、その水中安定性のために製造において利点を有する可能性がある。

10

【0077】

いくつかの実施形態において、水溶性ポリマーは任意の分子量のものである。いくつかの実施形態において、水溶性ポリマーは分枝または非分枝である。いくつかの実施形態において、水溶性ポリマーは約 2 kDa ~ 約 100 kDa (この範囲の終点間の全ての点を含む) の平均分子量を有する。いくつかの実施形態において、水溶性ポリマーは約 5 kDa ~ 約 40 kDa の平均分子量を有する。いくつかの実施形態において、水溶性ポリマーは約 10 kDa ~ 約 35 kDa の平均分子量を有する。いくつかの実施形態において、水溶性ポリマーは約 15 kDa ~ 約 30 kDa の平均分子量を有する。

20

【0078】

いくつかの実施形態において、抗体はポリエチレングリコールに連結される (PEG ; すなわち、抗体は「ペグ化」される)。様々な実施形態において、PEG はほ乳類において低い毒性を有する。Carpenter et al. (1971) Toxicol. Appl. Pharmacol.、18:35-40 を参照のこと。特に、アデノシンデアミナーゼの PEG 付加物は、米国で重度の複合免疫不全症候群の治療のためのヒトにおける使用に関して認可されている。様々な実施形態において、PEG は、抗体の免疫原性を減少させる可能性がある。例えば、いくつかの実施形態において、非ヒト配列を有する抗体に対する PEG の連結は、ヒトに施された場合、その抗体の抗原性を減弱させる可能性がある。

30

【0079】

いくつかの実施形態において、ポリマーは抗体中の 1 以上の反応性アミノ酸残基に連結される。ある例示的な反応性アミノ酸残基としては、アミノ末端アミノ酸のアルファ - アミノ基、リジン側鎖のイプシロンアミノ基、システイン側鎖のスルフヒドリル基、アスパルチルおよびグルタミル側鎖のカルボキシル基、カルボキシ末端アミノ酸のアルファ - カルボキシル基、チロシン側鎖、およびあるアスパラギン、セリンまたはスレオニン残基に連結した活性化グリコシル鎖が挙げられるが、これらに限定されるものではない。タンパク質との反応をおこなうために好適な、PEG のある例示的な活性化形態 (「PEG 試薬」) は、当業者に公知である。例えば、いくつかの実施形態において、アミノ基に対する連結に好適な PEG 試薬としては、カルボン酸の活性エステルまたは PEG のカーボネート誘導体、例えば、脱離基が N - ヒドロキシスクシンイミド、p - ニトロフェノール、イミダゾールまたは 1 - ヒドロキシ - 2 - ニトロベンゼン - 4 - スルホネートであるものが挙げられるが、これらに限定されるものではない。いくつかの実施形態において、マレイミドまたはハロアセチル基を含有する PEG 試薬を使用して、スルフヒドリル基を修飾す

40

50

る。いくつかの実施形態において、アミノ、ヒドラジンおよび/またはヒドラジド基を含有するPEG試薬を、タンパク質中の炭水化物基の過ヨウ素酸塩酸化によって生成するアルデヒドとの反応で使用する事ができる。

#### 【0080】

いくつかの実施形態において、水溶性ポリマーは少なくとも1つの反応性基を有する。いくつかの実施形態において、PEGなどの水溶性ポリマーの活性化誘導体は、水溶性ポリマーを活性化基と反応させることによって作製される。いくつかの実施形態において、活性化基は、一官能性、二官能性、または多官能性であってよい。水溶性ポリマーを2以上の抗体と連結させるために用いられるある例示的な活性化基としては、以下の基：スルホン（例えば、クロロスルホン、ビニルスルホンおよびジビニルスルホン）、マレイミド、スルフヒドリル、チオール、トリフレート、トレシレート (tresylate)、アジジリン (azidirine)、オキシランおよび5 - ピリジルが挙げられるが、これらに限定されるものではない。いくつかの実施形態において、PEG誘導体は、典型的には、加水分解に対して長期間にわたり約11以下のpHの水性環境中で安定である。いくつかの実施形態において、抗体などの別の分子と連結したPEG誘導体は、分子に加水分解からの安定性を付与する。ある例示的なホモ二官能性PEG誘導体としては、PEG - ビス - クロロスルホンおよびPEG - ビス - ビニルスルホンが挙げられるが、これらに限定されるものではない（国際公開第95/13312号を参照のこと）。

#### 【0081】

##### 5.2.3. モノクローナル抗体を作製するある方法

##### 5.2.3.1. あるハイブリドーマ法

いくつかの実施形態において、モノクローナル抗体は標準的技術によって産生される。いくつかの実施形態において、モノクローナル抗体は、ハイブリドーマペースの方法によって産生される。そのようなある方法は、当業者に公知である。例えば、Kohler et al. (1975) Nature256:495-497; Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual Ch. 6 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)を参照のこと。あるそのような実施形態において、好適な動物、例えばマウス、ラット、ハムスター、サル、または他のほ乳類を免疫原で免疫化して、抗体分泌細胞を産生する。いくつかの実施形態において、抗体分泌細胞は、B細胞、例えばリンパ球または脾細胞である。いくつかの実施形態において、リンパ球（例えば、ヒトリンパ球）を *in vitro* で免疫化して、抗体分泌細胞を生成させる。例えば、Borreback et al. (1988) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85:3995-3999を参照のこと。

#### 【0082】

いくつかの実施形態において、抗体分泌細胞を「不死化」細胞系、例えば骨髓型細胞系と融合させて、ハイブリドーマ細胞を産生する。いくつかの実施形態では、所望の抗体を産生するハイブリドーマ細胞は、例えばELISAによって同定される。いくつかの実施形態において、標準的方法を用いてそのような細胞を次いでサブクローン化することができ、培養することができる。いくつかの実施形態において、そのような細胞を好適な動物宿主における腹水腫瘍など *in vivo* で増殖させることもできる。いくつかの実施形態において、モノクローナル抗体をハイブリドーマ培養培地、血清、または腹水から、親和性クロマトグラフィーなどの標準的分離手順を用いて単離する。ある実施形態によるハイブリドーマの産生およびモノクローナル抗体の精製のための手引きは、例えば、Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual Ch. 8 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)で提供されている。

#### 【0083】

いくつかの実施形態において、マウスモノクローナル抗体は、遺伝子改変マウスを免疫原で免疫化することによって産生される。あるそのような実施形態において、マウスはNOTUM欠損マウスであり、これはNOTUM機能が部分的または完全に欠けている。あるそのような実施形態において、マウスは、NOTUMをコードする遺伝子の全部または一部が欠けている「ノックアウト」マウスである。いくつかの実施形態において、そのよ

うなノックアウトマウスをマウスNOTUMで免疫化する。いくつかの実施形態において、そのようなノックアウトマウスをヒトNOTUMで免疫化する。

#### 【0084】

いくつかの実施形態において、ヒトモノクローナル抗体を、ヒト抗体を産生することができるトランスジェニック動物（例えば、マウス）において産生させる。例えば、米国特許第6,075,181A号および同第6,114,598A号；ならびに国際公開第98/24893A2号を参照のこと。例えば、いくつかの実施形態において、ヒトイムノグロブリン遺伝子を、内因性Ig遺伝子が不活性化されたマウスに導入する（例えば、酵母人工染色体、ヒト染色体断片、または生殖細胞系組み込みを使用）。例えば、Jakobovits et al. (1993) Nature362:255-258; Tomizuka et al. (2000) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 97:722-727; および Mendez et al. (1997) Nat. Genet. 15:146-156 (トランスジェニックマウスのXenoMouse II (登録商標)系を記載)を参照のこと。

10

#### 【0085】

いくつかの実施形態において、そのようなトランスジェニックマウスを免疫原で免疫化する。あるそのような実施形態において、抗体を発現するマウスからのリンパ細胞（例えばB細胞）を得る。あるそのような実施形態において、そのような回収された細胞を骨髓型細胞系などの「不死化」細胞系と融合させて、ハイブリドーマ細胞を産生する。あるそのような実施形態において、ハイブリドーマ細胞をスクリーンし、選択して、関心のある抗原に特異的な抗体を産生するものを同定する。ヒトモノクローナル抗体の産生に好適なある例示的な方法およびトランスジェニックマウスは、例えば、Jakobovits et al. (1993) Nature362:255-258; Jakobovits (1995) Curr. Opin. Biotechnol. 6:561-566; Lonberg et al. (1995) Int'l Rev. Immunol. 13:65-93; Fishwild et al. (1996) Nat. Biotechnol. 14:845-851; Mendez et al. (1997) Nat. Genet. 15:146-156; Green (1999) J. Immunol. Methods 231:11-23; Tomizuka et al. (2000) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 97:722-727で記載され; Little et al. (2000) Immunol. Today 21:364-370; および国際公開第98/24893号で概説されている。いくつかの実施形態において、NOTUMに対するヒトモノクローナル抗体は、治療抗体としての使用に好適である。以下のパートV.G.を参照のこと。

20

#### 【0086】

##### 5.2.3.2. あるディスプレイベースの方法

30

いくつかの実施形態において、ヒトモノクローナル抗体は、以下で記載するもののいずれかなどのディスプレイベースの方法を用いて産生される。

#### 【0087】

いくつかの実施形態において、モノクローナル抗体は、ファージディスプレイ技術を用いて産生される。種々の抗体ファージディスプレイ法が当業者には知られており、例えば、Hoogenboom, Overview of Antibody Phage-Display Technology and Its Applications, from Methods in Molecular Biology: Antibody Phage Display: Methods and Protocols (2002) 178:1-37 (O'Brien and Aitken, eds., Human Press, Totowa, NJ)で記載されている。例えば、いくつかの実施形態において、抗体のライブラリーは、非溶解性繊維状ファージfdまたはM13などの繊維状ファージの表面上で提示される。いくつかの実施形態において、抗体は、 $V_H - V_L$ 対を安定化させるために操作された分子間ジスルフィド結合を有するscFv、Fab、Fvなどの抗体断片、および二重特異性抗体である。いくつかの実施形態において、所望の結合特異性を有する抗体を次いで選択することができる。抗体ファージディスプレイ法の非限定的例示的な実施形態を以下でさらに詳細に記載する。

40

#### 【0088】

いくつかの実施形態において、抗体ファージ-ディスプレイライブラリーは、当業者に公知のある方法を用いて調製することができる。例えば、Hoogenboom, Overview of Antibody Phage Display Technology and Its Applications, from Methods in Molecular Biology: Antibody Phage Display: Methods and Protocols (2002) 178:1-37 (O'Brien

50

and Aitken, eds., Human Press, Totowa, NJ)を参照のこと。いくつかの実施形態において、可変遺伝子レパートリーは、抗体分泌細胞のmRNAから誘導されるゲノムDNAまたはcDNAのPCR増幅によって調製される。例えば、いくつかの実施形態において、cDNAはB細胞のmRNAから調製される。いくつかの実施形態において、重鎖および軽鎖の可変領域をコードするcDNAは、例えば、PCRによって増幅される。

【0089】

いくつかの実施形態において、重鎖cDNAおよび軽鎖cDNAを好適なベクター中にクローン化する。いくつかの実施形態において、重鎖cDNAおよび軽鎖cDNAをクローニングプロセス中にランダムに組み合わせて、それによって多様なscFvまたはFabをコードするcDNAライブラリーのアセンブリを得る。いくつかの実施形態において、重鎖cDNAおよび軽鎖cDNAをライゲートした後、好適なベクター中にクローン化する。いくつかの実施形態において、重鎖cDNAおよび軽鎖cDNAを段階的クローニングによって好適なベクター中にライゲートする。

【0090】

いくつかの実施形態において、cDNAをファージディスプレイベクター、例えばファージミドベクター中にクローン化する。ある例示的なファージミドベクター、例えばpCES1は、当業者に公知である。いくつかの実施形態において、重鎖および軽鎖の両方をコードするcDNAが同じベクター上に存在する。例えば、いくつかの実施形態において、scFvをコードするcDNAを、マイナーファージコートタンパク質pIIIをコードする遺伝子IIIの全部または一部でフレーム中にクローン化する。あるそのような実施形態において、ファージミドはファージ表面上でscFv-pIII融合の発現をおこなう。別法として、いくつかの実施形態において、重鎖（または軽鎖）をコードするcDNAを遺伝子IIIの全部または一部でフレーム中にクローン化し、軽鎖（または重鎖）をコードするcDNAを同じベクター中のシグナル配列の下流でクローン化する。シグナル配列は、軽鎖（または重鎖）の宿主細胞のペリプラズムへの発現をおこない、この場合、重鎖および軽鎖を集めてFab断片を構築する。別法として、いくつかの実施形態において、重鎖をコードするcDNAおよび軽鎖をコードするcDNAが別のベクター上に存在する。あるそのような実施形態において、重鎖および軽鎖cDNAを別々に、1つはファージミド中へ、もう1つはファージベクター中へクローン化し、どちらも宿主細胞でのin vivo組換えに関するシグナルを含む。

【0091】

いくつかの実施形態において、組換えファージミドまたはファージベクターをイー・コリ(E. coli)などの好適な細菌宿主中に導入する。ファージミドを使用するいくつかの実施形態において、宿主はヘルパーファージに感染して、ファージ構造タンパク質を供給し、それによってファージ表面上に抗体-pIII融合タンパク質を有するファージ粒子の発現が可能になる。

【0092】

いくつかの実施形態において、「合成」抗体ライブラリーは、in vitroで再配列される可変遺伝子のレパートリーを用いて構築される。例えば、いくつかの実施形態において、重鎖または軽鎖をコードする個々の遺伝子断片（それぞれV-D-JまたはV-J）を、PCRを用いてランダムに組み合わせる。いくつかの実施形態において、さらなる配列多様性を、CDR、およびおそらくFRに、例えばエラーブローンPCRによって導入することができる。いくつかのそのような実施形態において、さらなる配列多様性がCDR3、例えば重鎖のH3に導入される。

【0093】

いくつかの実施形態において、「ナイーブ」または「ユニバーサル」ファージディスプレイライブラリーを、免疫化されていない動物由来の核酸を用いて前述のようにして構築する。いくつかの実施形態において、免疫化されていない動物はヒトである。いくつかの実施形態において、「免疫化された」ファージディスプレイライブラリーを、免疫化された動物由来の核酸を用いて前述のようにして構築する。いくつかの実施形態において、免

疫化された動物は、ヒト、ラット、マウス、ハムスター、またはサルである。あるそのような実施形態において、動物を後述する免疫源のいずれかで免疫化する。

【0094】

ある例示的ユニバーサルヒト抗体ファージディスプレイライブラリーは、商業的供給源から入手可能である。ある例示的なライブラリーとしては、MorphoSys AG(Martinstreid/Munich, Germany)からのH u C A L (登録商標)シリーズのライブラリー; MAbstract (登録商標)技術を用いたCrucell(Leiden, the Netherlands)からのライブラリー; BioInv ent (Lund, Sweden)からのn-CoDeR (商標) F a bライブラリー; およびCambridge Antib ody Technology (Cambridge, UK)から入手可能なライブラリーが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

10

【0095】

いくつかの実施形態において、ファージディスプレイライブラリーからの所望の結合特異性を有する抗体の選択は、連続パニングステップによって達成される。パニングのいくつかの実施形態において、ライブラリーファージ調製物を抗原に曝露する。あるそのような実施形態において、ファージ-抗原複合体を洗浄し、そして非結合ファージを捨てる。あるそのような実施形態において、結合ファージを回収し、続いてイー・コリを感染させることによって増幅させる。そのようなある実施形態において、モノクローナル抗体産生ファージは、単一のプラークを選択することによってクローン化することができる。いくつかの実施形態において、上記プロセスを繰り返す。

【0096】

20

いくつかの実施形態において、パニングで使用される抗原は、後述される免疫原のいずれかである。いくつかの実施形態において、抗原を固体支持体上に固定して、親和性クロマトグラフィーにより抗原結合ファージを精製する。いくつかの実施形態において、抗原をビオチニル化し、それによってストレプトアビジンでコーティングされた磁気ビーズを用いて非結合ファージから結合ファージを分離させる。いくつかの実施形態において、抗原を細胞(直接パニングのため)上、組織低温切開片中、または膜(例えば、ナイロンもしくはニトロセルロース膜)上に固定することができる。あるパニング手順の他のバリエーションは当業者が慣例的に決定することができる。

【0097】

いくつかの実施形態において、酵母ディスプレイシステムを用いてモノクローナル抗体を産生する。あるそのようなシステムにおいて、抗体を融合タンパク質として酵母A G A 2タンパク質の全部または一部で発現させ、これは酵母細胞壁の表面上に提示されるようになる。あるそのような実施形態において、所望の結合特異性を有する抗体を発現する酵母細胞を、次いで細胞を蛍光標識された抗原に曝露することによって同定することができる。あるそのような実施形態において、抗原に結合する酵母細胞を次いでフローサイトメトリーによって単離することができる。例えば、Boder et al. (1997) Nat. Biotechnol. 15:553-557を参照のこと。

30

【0098】

5.2.3.3. ある親和性成熟法

いくつかの実施形態において、特定の抗原の抗体の親和性は、抗体をin vitroで親和性成熟(または「定向進化」)に付すことによって増大させる。in vivoで、天然の抗体は体細胞超変異による親和性成熟と、それに続いて選択を受ける。いくつかのin vitro法はそのin vivoプロセスを模倣し、それによって、天然の抗体の親和性に等しいか、または上回る親和性を有する抗体を産生させる。

40

【0099】

親和性成熟のいくつかの実施形態において、所望の結合特異性を有する抗体の可変領域をコードする核酸配列に突然変異を導入する。例えば、Hudson et al. (2003) Nat. Med. 9:129-134; Brekke et al. (2002) Nat. Reviews 2:52-62を参照のこと。いくつかの実施形態において、突然変異を重鎖、軽鎖、または両者の可変領域に導入する。いくつかの実施形態において、突然変異を1以上のCDRに導入する。あるそのような実施形態にお

50

いて、突然変異をH3、L3、または両者に導入する。いくつかの実施形態において、突然変異を1以上のFRに導入する。いくつかの実施形態において、突然変異のライブラリーを、例えば、ファージ、リボソーム、または酵母ディスプレイライブラリーにおいて作製して、親和性が増大した抗体を、標準的スクリーニング法によって同定することができる。例えば、Boder et al. (2000) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA97:10701-10705; Foote et al. (2000) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA97:10679-10681; Hoogenboom, Overview of Antibody Phage Display Technology and Its Applications, from Methods in Molecular Biology: Antibody Phage Display: Methods and Protocols(2002) 178:1-37 (O'Brien and Aitken, eds., Human Press, Totowa, NJ);およびHanes et al. (1998) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA95:14130-14135を参照のこと。

10

#### 【0100】

いくつかの実施形態において、抗体の構造、例えば抗原結合部位に関する情報に基づいた部位特異的突然変異によって突然変異を導入する。いくつかの実施形態において、CDRの組み合わせ突然変異誘発を用いて突然変異を導入する。いくつかの実施形態において、可変領域コード配列の全部または一部を、例えば、イー・コリミューテーター細胞、ホモロガスな遺伝子再構成、またはエラープロンプPCRを用いてランダムに突然変異させる。いくつかの実施形態において、突然変異を、「DNAシャッフリング」を用いて導入する。例えば、Cramer et al. (1996) Nat. Med.2:100-102; Fermer et al. (2004) Tumor Biol. 25:7-13を参照のこと。

#### 【0101】

20

いくつかの実施形態において、「鎖シャッフリング」を使用して、親和性が増大した抗体を生成させる。鎖シャッフリングのいくつかの実施形態において、1つの鎖、例えば軽鎖は軽鎖のレパートリーで置換され、一方、他の鎖、例えば重鎖は変更されず、かくして特異性を提供する。あるそのような実施形態において、鎖シャッフリングされた抗体のライブラリーを作製し、この場合、未変化の重鎖が軽鎖のレパートリーからの各軽鎖との組み合わせで発現される。いくつかの実施形態において、そのようなライブラリーを次いで親和性が増大した抗体についてスクリーンすることができる。いくつかの実施形態において、重鎖および軽鎖の両方が逐次置換される。いくつかの実施形態において、重および/または軽鎖の可変領域だけが置換される。いくつかの実施形態において、重および/または軽鎖の可変領域の一部分だけ、例えば、CDRが置換される。例えば、Hudson et al. (2003) Nat. Med. 9:129-134; Brekke et al. (2002) Nat. Reviews2:52-62; Kang et al. (1991) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA88:11120-11123; Marks et al. (1992) Biotechnol.10:779-83を参照のこと。

30

#### 【0102】

いくつかの実施形態において、ヒトNOTUMと特異的に結合するマウスモノクローナル抗体(マウスNOTUMに対するものであるが、ヒトNOTUMと特異的に結合する(即ち、交差反応する)マウスモノクローナル抗体を含む)を、逐次鎖シャッフリングに付す。いくつかの実施形態において、例えば、所定のマウスモノクローナル抗体の重鎖をヒト軽鎖の新しいレパートリーと組み合わせ、そして所望の親和性を有する抗体を選択する。あるそのような実施形態において、選択された抗体の軽鎖を次いでヒト重鎖の新しいレパートリーと組み合わせ、そして所望の親和性を有する抗体を選択する。このように、いくつかの実施形態において、所望の抗原結合特異性および親和性を有するヒト抗体が選択される。

40

#### 【0103】

別法として、いくつかの実施形態において、所定のマウスモノクローナル抗体の重鎖をヒト軽鎖の新しいレパートリーと組み合わせ、所望の親和性を有する抗体をこの第1ラウンドのシャッフリングから選択する。いくつかの実施形態において、もとのマウスモノクローナル抗体の軽鎖をヒト重鎖の新しいレパートリーと組み合わせ、そして所望の親和性を有する抗体をこの第2ラウンドのシャッフリングから選択する。いくつかの実施形態において、第1ラウンドのシャッフリングから選択される抗体由来のヒト軽鎖を次いで第2

50

ラウンドのシャッフリングで選択された抗体由来のヒト重鎖と組み合わせる。かくして、いくつかの実施形態において、所望の抗原結合特異性および親和性を有するヒト抗体が選択される。

#### 【0104】

いくつかの実施形態において、抗体選択と親和性成熟とが交互になった「リボソームディスプレイ」法を使用する。リボソームディスプレイ法のいくつかの実施形態において、抗体コード化核酸を選択ステップ間のRT-PCRによって増幅させる。したがって、いくつかの実施形態において、エラープローンポリメラーゼを用いて突然変異を核酸に導入することができる。そのような方法の非限定的例は、Hanes et al. (1998) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA95:14130-14135で記載されている。

10

#### 【0105】

##### 5.2.3.4. ある組換え法

いくつかの実施形態において、モノクローナル抗体は組換え技術によって産生される。例えば、米国特許第4,816,567号を参照のこと。あるそのような実施形態において、核酸コード化モノクローナル抗体鎖をクローン化し、好適な宿主細胞中で発現させる。例えば、いくつかの実施形態において、RNAは所望の抗体を発現する細胞、例えば成熟B細胞またはハイブリドーマ細胞から、標準的方法を用いて調製することができる。いくつかの実施形態において、標準的方法を用いてcDNAを作製するためにRNAを次いで使用することができる。いくつかの実施形態において、重鎖または軽鎖ポリペプチドをコードするcDNAは、例えばPCRにより、特異的オリゴヌクレオチドプライマーを用いて増幅される。いくつかの実施形態において、cDNAを好適な発現ベクター中にクローン化する。いくつかの実施形態において、発現ベクターを次いで、好適な宿主細胞、例えば内因的に抗体を産生しない宿主細胞などの好適な宿主細胞に形質転換またはトランスフェクトする。ある例示的な宿主細胞としては、イー・コリ、COS細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、および骨髄腫細胞が挙げられるが、これらに限定されるものではない。重鎖および軽鎖が同じ宿主中で同時発現されるいくつかの実施形態において、再構成された抗体を単離することができる。

20

#### 【0106】

いくつかの実施形態において、重鎖または軽鎖をコードするcDNAを修飾することができる。例えば、いくつかの実施形態において、マウス重鎖または軽鎖の定常領域をヒト重鎖または軽鎖の定常領域で置換することができる。このようにして、いくつかの実施形態において、ヒト抗体定常領域を有するが、マウス抗体の結合特異性を保持するキメラ抗体を産生することができる。

30

#### 【0107】

いくつかの実施形態において、核酸分子は、NOTUM中和抗体の重鎖または軽鎖をコードするポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、単一の核酸分子は、NOTUM中和抗体の重鎖をコードする第1ポリヌクレオチド配列およびNOTUM中和抗体の軽鎖をコードする第2ポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、例えば、抗体が単鎖Fv(scfv)である場合、重鎖のコード配列および軽鎖のコード配列は連続コード配列の一部であるので、単一ポリペプチドが発現され、これは抗体の重鎖および軽鎖の両方を含む。いくつかの実施形態では、重鎖および軽鎖の両方をコードする単一の核酸分子は、2つの鎖を別々のポリペプチドとして発現することができる。いくつかのそのような実施形態では、各鎖は別のプロモーターの制御下にある。いくつかの実施形態では、2つの鎖は同じプロモーターの制御下にある。当業者は、意図される適用にしたがってNOTUM中和抗体の重鎖および軽鎖の好適な立体配置および好適な制御要素を選択することができる。

40

#### 【0108】

いくつかの実施形態において、核酸は、ベクター、例えば特定の宿主細胞中の重鎖および/または軽鎖を発現するために好適な発現ベクターである。当業者は、好適な発現ベクター（複数可）を発現のために用いられる宿主細胞に応じて選択することができる。その

50



ようなベクターの多数の例は当該技術分野で公知である。

【0109】

いくつかの実施形態において、核酸分子は、MAb 1.731、1.802、1.815、1.846、2.1029、2.55、2.78、およびそのようなMAbのヒト化バージョンから選択されるNOTUM中和抗体の重鎖をコードするポリヌクレオチド配列を含む。いくつかのそのような実施形態において、核酸分子は、配列番号101、103、105、107、109、111、112、115、116、119、120、123、124、127、および128から選択されるポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、核酸分子は、MAb 1.731、1.802、1.815、1.846、2.1029、2.55、2.78、およびそのようなMAbのヒト化バージョンから選択されるNOTUM中和抗体の軽鎖をコードするポリヌクレオチド配列を含む。いくつかのそのような実施形態において、核酸分子は、配列番号102、104、106、108、110、113、114、117、118、121、122、125、126、129、および130から選択されるポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、核酸分子は、MAb 1.731、1.802、1.815、1.846、2.1029、2.55、2.78、およびそのようなMAbのヒト化バージョンから選択されるNOTUM中和抗体の、重鎖をコードする第1ポリヌクレオチド配列および軽鎖をコードする第2ポリヌクレオチド配列を含む。

10

【0110】

いくつかの実施形態において、組換え抗体をある細胞系で発現させることができる。いくつかの実施形態において、特定の抗体をコードする配列を、好適なほ乳類宿主細胞の形質転換のために用いることができる。ある実施形態によれば、形質転換はポリヌクレオチドを宿主細胞中に導入するための任意の公知方法によるものであり得る。ある例示的な方法としては、ポリヌクレオチドをウイルス中（またはウイルスベクター中）にパッケージングし、そして宿主細胞をウイルス（またはベクター）で、米国特許第4,399,216号、同第4,912,040号、同第4,740,461号、および同第4,959,455号によって例示される当該技術分野で公知のあるトランスフェクション手順を用いて形質導入することが挙げられるが、これらに限定されるものではない。いくつかの実施形態において、使用される形質転換手順は、形質転換される宿主に依存する可能性がある。ヘテロローガスなポリヌクレオチドをほ乳類細胞中に導入するためのある例示的な方法は当該技術分野で公知であり、デキストラン媒介性トランスフェクション、リン酸カルシウム沈殿、ポリブレン媒介性トランスフェクション、原形質融合、エレクトロポレーション、ポリヌクレオチド（複数可）のリポソーム中への封入、およびDNAの核中への直接微量注入が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

20

30

【0111】

発現のための宿主として利用可能なある例示的ほ乳類細胞系は当該技術分野で公知であり、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、HeLa細胞、ベビーハムスター腎臓（BHK）細胞、サル腎臓細胞（COS）、ヒト肝細胞ガン細胞（例えば、Hep G2）、および多くの他の細胞系をはじめとするAmerican Type Culture Collection (ATCC) から入手可能な多くの不死化細胞系が挙げられるが、これらに限定されるものではない。いくつかの実施形態において、細胞系は、どの細胞系が、NOTUMと特異的に結合する高レベルの抗体を産生するかを決定することによって選択することができる。

40

【0112】

5.3. 治療方法

本発明は、患者において皮質内骨形成を刺激する方法であって、それを必要とする患者に有効量の本発明の抗体を投与することを含む方法を包含する。本発明は、皮質骨厚みを増大させる方法であって、それを必要とする患者に有効量の本発明の抗体を投与することを含む方法も包含する。

【0113】

本発明は、骨量の減少に関連する疾患もしくは障害を治療、管理、または防止する方法

50

であって、それを必要とする患者に治療有効量または予防有効量の本発明の抗体を投与することを含む方法を包含する。疾患および障害の例としては、骨粗鬆症（例えば、閉経後骨粗鬆症、ステロイドまたはグルココルチコイド誘発性骨粗鬆症、男性骨粗鬆症、および特発性骨粗鬆症）、オステオペニア、およびパジェット病が挙げられる。

#### 【0114】

骨折を治療、管理、または防止する方法であって、それを必要とする患者に治療有効量または予防有効量の本発明の抗体を投与することを含む方法も本発明に含まれる。特定の骨折は、転移性骨疾患、すなわち、骨に転移したガンに関連する。骨に転移する可能性のあるガンの例としては、前立腺ガン、乳ガン、肺ガン、甲状腺ガン、および腎臓ガンが挙げられる。

10

#### 【0115】

本発明はさらに、疾患もしくは障害に関連するか、または起因する骨量の減少を治療、管理、または防止する方法であって、それを必要とする患者に治療有効量または予防有効量の本発明の抗体を投与することを含む方法も包含する。疾患および障害の例としては、セリアック病、クローン病、クッシング症候群、副甲状腺機能亢進症、炎症性腸疾患、および潰瘍性大腸炎が挙げられる。

#### 【0116】

本発明の方法から恩恵を受ける可能性がある非限定的患者としては、55才以上の年齢の男性および女性、閉経後の女性、ならびに腎不全に苦しんでいる患者が挙げられる。

#### 【0117】

20

本発明の抗体は、骨に影響を及ぼす疾患もしくは状態の治療、管理、または防止において有用であることが知られている他の薬物と組み合わせて（例えば、同時に、もしくは異なる時に）投与することができる。例としては：アンドロゲン受容体モジュレーター；ビスホスフェート；カルシトニン；カルシウム感知受容体アンタゴニスト；RANKL抗体、カテプシンK阻害剤；エストロゲンおよびエストロゲン受容体モジュレーター；インテグリンバインダー、抗体、および受容体アンタゴニスト；副甲状腺ホルモン（PTH）ならびにそれらのアナログおよび模倣物；ならびにビタミンDおよび合成ビタミンDアナログが挙げられる。

#### 【0118】

アンドロゲン受容体モジュレーターの例としては、フィナステリドおよび他の5 $\alpha$ -リダクターゼ阻害剤、ニルタミド、フルタミド、ピカルタミド、リアロゾール、および酢酸アピラテロンが挙げられる。

30

#### 【0119】

ビスホスフェートの例としては、アレンドロネート、シマドロネート（cimadronate）、クロドロネート、エチドロネート、イバンドロネート、インカドロネート、ミノドロネート、ネリドロネート、オルパドロネート、パミドロネート、ピリドロネート（piridronate）、リセドロネート（risedronate）、チルドロネート、およびゾレンドロネート（zoledronate）、ならびにそれらの薬剂的に許容される塩およびエステルが挙げられる。

#### 【0120】

40

カテプシンK阻害剤の例としては、VEL-0230、AAE581（バリカチブ）、MV061194、SB-462795（レラカチブ）、MK-0822（オダナカチブ）、およびMK-1256が挙げられる。

#### 【0121】

エストロゲンおよびエストロゲン受容体モジュレーターの例としては、天然に存在するエストロゲン（例えば、7-エストラジオール、エストロン、およびエストリオール）、共役エストロゲン（例えば、共役ウマエストロゲン）、経口避妊薬、硫酸化エストロゲン、プロゲステロン、エストラジオール、ドロキシフェン、ラロキシフェン、ラソフォキシフェン、TSE-424、タモキシフェン、イドキシフェン、LY353381、LY117081、トレミフェン、フルベストラント、4-[7-(2,2-ジメチル-1-

50

オキソプロボキシ - 4 - メチル - 2 - [ 4 - [ 2 - ( 1 - ピペリジニル ) エトキシ ] フェニル ] - 2 H - 1 - ベンゾピラン - 3 - イル ] - フェニル - 2 , 2 - ジメチルプロパノエート、4 , 4 ' - ジヒドロキシベンゾフェノン - 2 , 4 - ジニトロフェニル - ヒドラゾン、および S H 6 4 6 が挙げられる。

#### 【 0 1 2 2 】

インテグリンバインダー、抗体、および受容体アンタゴニストの例としては、ピタキシン ( M E D I - 5 2 2 )、シレンジタイドおよび L - 0 0 0 8 4 5 7 0 4 が挙げられる。

#### 【 0 1 2 3 】

##### 5 . 4 . 医 薬 処 方

本発明は、1 以上の本発明の抗体、および場合によって 1 以上の他の薬物、例えば前述のものを含む医薬組成物を包含する。

#### 【 0 1 2 4 】

いくつかの実施形態において、N O T U M 中和抗体を治療抗体として用いることができる。治療抗体として用いることができる例示的 N O T U M 中和抗体としては、キメラ抗体、ヒト化抗体、およびヒト抗体が挙げられるが、これらに限定されるものではない。当業者は治療薬としての抗体の使用をよく知っている。

#### 【 0 1 2 5 】

いくつかの実施形態において、有効量の N O T U M に対する抗体および薬剂的に許容される希釈剤、担体、可溶化剤、乳化剤、保存料および / またはアジュバントを含む医薬組成物が提供される。いくつかの実施形態において、有効量の N O T U M に対する抗体および有効量の少なくとも 1 つのさらなる治療薬を、薬剂的に許容される希釈剤、担体、可溶化剤、乳化剤、保存料および / またはアジュバントとともに含む医薬組成物が提供される。いくつかの実施形態において、少なくとも 1 つのさらなる治療薬は、前述のものから選択される。

#### 【 0 1 2 6 】

いくつかの実施形態において、医薬組成物用の処方材料は用いられる投薬量および濃度で受容者に対して非毒性である。

#### 【 0 1 2 7 】

いくつかの実施形態において、医薬組成物は、例えば、組成物の、p H、オスモル濃度、粘度、透明性、色、等張性、臭い、滅菌性、安定性、溶解もしくは放出速度、吸着または浸透を修飾、維持または保存するための処方材料を含む。いくつかの実施形態において、好適な処方材料としては、アミノ酸（例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンおよびリジン）；抗菌剤；抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸、亜硫酸ナトリウムおよび亜硫酸水素ナトリウム）；緩衝液（例えば、ホウ酸塩、重炭酸塩、T r i s - H C l、クエン酸塩、リン酸塩および他の有機酸）；増量剤（例えば、マンニトールおよびグリシン）；キレート化剤（例えば、エチレンジアミン四酢酸 ( E D T A ) ) ；錯化剤（例えば、カフェイン、ポリビニルピロリドン、ベータ - シクロデキストリン、およびヒドロキシプロピル - ベータ - シクロデキストリン）；充填剤；モノサッカライド、ジサッカライド、および他の炭水化物（例えば、グルコース、マンノースおよびデキストリン）；タンパク質（例えば、血清アルブミン、ゼラチンおよびイムノグロブリン）；着色剤、香料、および希釈剤；乳化剤；親水性ポリマー（例えば、ポリビニルピロリドン）；低分子量ポリペプチド；塩形成カウンターイオン（例えば、ナトリウム）；保存料（例えば、塩化ベンザルコニウム、安息香酸、サリチル酸、チメロサル、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロルヘキシジン、ソルビン酸および過酸化水素）；溶媒（例えば、グリセリン、プロピレングリコールおよびポリエチレングリコール）；糖アルコール（例えば、マンニトールおよびソルビトール）；懸濁化剤；界面活性剤または湿潤剤（例えば、プルロニック、P E G、ソルピタンエステル、ポリソルベート（例えば、ポリソルベート 2 0 およびポリソルベート 8 0 ））、トリトン、トロメタミン、レシチン、コレステロール、およびチロキサパル ( tyloxapal ) ) ；安定性促進剤（例えば、スクロースおよびソルビトール）；張性増加剤（例えば、アルカリ金属ハロゲン化物（例

10

20

30

40

50

えば、塩化ナトリウムまたはカリウム)、マンニトール、およびソルビトール); 送達ビヒクル; 希釈剤; 賦形剤; ならびに医薬アジュバントが挙げられるが、これらに限定されるものではない。(Remington's Pharmaceutical Sciences, 18<sup>th</sup> Edition, A.R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company (1990)).

【0128】

いくつかの実施形態において、NOTUMに対する抗体または他の治療分子を半減期延長ビヒクルと結合させる。非限定的例示的半減期延長ビヒクルには、当該技術分野で公知のものが含まれる。そのようなビヒクルとしては、Fcドメイン、ポリエチレングリコール、およびデキストランが挙げられるが、これらに限定されるものではない。例示的なそのようなビヒクルは、例えば、公開されたPCT出願国際公開第99/25044号で記載されている。

10

【0129】

いくつかの実施形態において、最適な医薬組成物は、例えば、意図される投与経路、送達形式、および所望の投薬量に応じて当業者によって決定されるであろう。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences (上出) を参照のこと。いくつかの実施形態において、そのような組成物は、中和抗体の物理状態、安定性、in vivo 放出速度、または in vivo クリアランス速度に影響を及ぼす可能性がある。

【0130】

いくつかの実施形態において、医薬組成物中の一次ビヒクルまたは担体は、本来は水性または非水性のいずれかであり得る。例えば、いくつかの実施形態において、好適なビヒクルまたは担体は、注射用水、生理食塩水、または人工脳脊髄液であって、おそらくは非経口投与用組成物で一般的な他の材料を添加したものであってよい。例示的ビヒクルとしては、中性緩衝食塩水および血清アルブミンと混合された食塩水が挙げられるが、これらに限定されるものではない。いくつかの実施形態において、医薬組成物は、pH 約 7.0 ~ 8.5 の Tris 緩衝液、または pH 約 4.0 ~ 5.5 の酢酸塩緩衝液を含み、これは、ソルビトールもしくはそれに対する好適な代替物をさらに含んでもよい。いくつかの実施形態において、少なくとも1つのさらなる治療薬の有無を問わずNOTUMに対する抗体を含む組成物は、所望の程度の純度を有する選択された組成物を、任意の処方薬剤 (Remington's Pharmaceutical Sciences、上出) と混合することによって、凍結乾燥されたケーキまたは水溶液の形態で貯蔵用に調製することができる。いくつかの実施形態において、NOTUMに対する抗体を、少なくとも1つのさらなる治療薬の有無を問わず含む組成物を、スクロースなどの適切な賦形剤を用いて凍結乾燥物として処方することができる。

20

30

【0131】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は非経口送達のために選択される。いくつかの実施形態では、医薬組成物は吸入または経口などの消化管を通した送達のために選択される。薬剤的に許容される組成物を調製するための種々の技術は当業者の技術範囲内である。

【0132】

いくつかの実施形態において、処方成分は投与の部位に対して許容される濃度で存在する。いくつかの実施形態において、組成物を生理学的 pH または若干低い pH、典型的には約 5 ~ 約 8 の pH 範囲内に維持するために緩衝液を使用する。

40

【0133】

いくつかの実施形態において、非経口投与が想定される場合、医薬組成物は、さらなる治療薬の有無を問わず、薬剤的に許容されるビヒクル中にNOTUMに対する所望の抗体を含むパイロジェンフリーな非経口的に許容される水溶液の形態であってよい。いくつかの実施形態において、非経口注射用ビヒクルは無菌蒸留水であり、この中で、NOTUMに対する抗体が、少なくとも1つのさらなる治療薬の有無を問わず、適切に保存される、無菌等張液として処方される。いくつかの実施形態において、製剤は、所望の分子の、製品の制御放出または持続放出のために提供することができる注射可能なマイクロスフェア、生体内分解性粒子、ポリマー化合物 (例えばポリ乳酸もしくはポリグリコール酸)、ピー

50

ズまたはリポソームなどの薬剤との処方を含む可能性があり、これを次いでデポー注射によって送達することができる。いくつかの実施形態において、ヒアルロン酸も用いることができ、循環中長時間促進効果を有し得る。いくつかの実施形態において、移植可能な薬物送達デバイスを用いて所望の分子を導入することができる。

#### 【0134】

いくつかの実施形態において、医薬組成物を吸入用に処方することができる。いくつかの実施形態において、NOTUMに対する抗体は、少なくとも1つのさらなる治療薬の有無を問わず、吸入用に乾燥粉末として処方することができる。いくつかの実施形態において、少なくとも1つのさらなる治療薬の有無を問わずNOTUMに対する抗体を含む吸入溶液を、エアロゾル送達のためのプロペラントと配合してもよい。いくつかの実施形態において、溶液を噴霧することができる。

10

#### 【0135】

いくつかの実施形態において、処方を経口投与することができる。いくつかの実施形態において、少なくとも1つのさらなる治療薬の有無を問わず、このように投与されるNOTUMに対する抗体は、錠剤およびカプセルなどの固体投与形態の配合で、通例用いられる担体の有無を問わず用いることができる。いくつかの実施形態において、カプセルは、バイオアベイラビリティが最大化され、前全身性分解が最小に抑えられる場合に、胃腸管中の場所で処方の有効成分を放出するように設計することができる。いくつかの実施形態において、少なくとも1つのさらなる薬剤を含めて、さらなる治療薬の有無を問わず、NOTUMへの抗体の吸収を促進することができる。いくつかの実施形態において、希釈剤、香味料、低融点ワックス、植物油、潤滑剤、懸濁化剤、錠剤崩壊剤、および/またはバインダーも用いることができる。

20

#### 【0136】

いくつかの実施形態において、医薬組成物は、少なくとも1つのさらなる治療薬の有無を問わず、有効量のNOTUMに対する抗体を、錠剤の製造に好適な非毒性賦形剤との混合物中に含む。いくつかの実施形態において、錠剤を無菌水、または別の適切なビヒクル中に溶解させることによって、溶液を単位剤形で調製することができる。例示的賦形剤としては、不活性希釈剤（例えば、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、重炭酸ナトリウム、ラクトース、およびリン酸カルシウム）；結合剤（例えば、デンプン、ゼラチン、およびアカシア）；ならびに潤滑剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、およびタルク）が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

30

#### 【0137】

少なくとも1つのさらなる治療薬の有無を問わずNOTUMに対する抗体を持続送達または制御送達処方中に含む処方をはじめとするさらなる医薬組成物は、当業者には明かであろう。例示的持続送達または制御送達処方としては、リポソーム担体、生体内分解性微小粒子、多孔性ビーズ、およびデポー注射が挙げられるが、これらに限定されるものではない。処方を調製するための種々の技術が当業者には知られている。いくつかの実施形態において、持続放出製剤は、成形品、例えばフィルムまたはマイクロカプセルなどの成形品の形態の半透性ポリマーマトリックスを含んでもよい。例示的持続放出マトリックスとしては、ポリエステル、ヒドロゲル、ポリラクチド（例えば、米国特許第3,773,919号および欧州特許出願公開第058,481号を参照のこと）、L-グルタミン酸およびガンマエチル-L-グルタメートのコポリマー（例えば、Sidman et al. (1983) *Bio polymers* 22:547-556を参照のこと）、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)（例えば、Langer et al. (1981) *J. Biomed. Mater. Res.* 15:167-277およびLanger (1982) *Chem. Tech.* 12:98-105を参照のこと）、エチレンビニルアセテート（Langer et al.、上出）、およびポリ-D(-)-3-ヒドロキシ酪酸（欧州特許出願公開第133,988号）が挙げられるが、これらに限定されるものではない。いくつかの実施形態において、持続放出組成物はリポソームを含む可能性があり、これは、いくつかの実施形態において、当該技術分野で公知のいくつかの方法のうちいずれかによって調製することができる。例えば、Eppstein et al. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:3688-3692；欧州

40

50

特許出願公開第036,676号；欧州特許出願公開第088,046号；および欧州特許出願公開第143,949号を参照のこと。

【0138】

いくつかの実施形態において、*in vivo*投与で使用される医薬組成物は、典型的には無菌である。いくつかの実施形態において、これは、無菌ろ過膜を通したろ過によって得ることができる。組成物が凍結乾燥されるいくつかの実施形態において、この方法を使用する殺菌を凍結乾燥および再構成の前または後のいずれかで実施することができる。いくつかの実施形態において、非経口投与用の組成物は、凍結乾燥形態または溶液中で貯蔵することができる。いくつかの実施形態において、非経口組成物は、一般的に、無菌点検口を有する容器、例えば、皮下注射針によって穿孔可能なストッパーを有する静脈内溶液袋またはバイアル中に入れられる。

10

【0139】

いくつかの実施形態において、医薬組成物を処方したら、それは、溶液、懸濁液、ゲル、エマルジョン、固体として、または脱水もしくは凍結乾燥粉末として無菌バイアル中で貯蔵することができる。いくつかの実施形態において、そのような処方は、すぐに使える形態または投与前に再構成される形態（例えば、凍結乾燥品）のいずれかで貯蔵することができる。

【0140】

いくつかの実施形態において、単回投与単位を製造するためのキットが提供される。いくつかの実施形態において、キットは、それぞれ乾燥タンパク質を有する第1容器および水性処方を含む第2容器の両方を含有してもよい。いくつかの実施形態において、単一または複数のチャンバーを有するあらかじめ充填されたシリンジ（例えば、液体シリンジおよびリオシリンジ（lyosyringe）を含むキットが含まれる。

20

【0141】

いくつかの実施形態において、治療的に用いられる、少なくとも1つのさらなる治療薬の有無にかかわらずNOTUMに対する抗体を含む医薬組成物の有効量は、例えば、治療の背景および目的によって変わるであろう。当業者は、いくつかの実施形態による治療のための適切な投薬量レベルが、したがって、送達される分子、NOTUMに対する抗体が少なくとも1つのさらなる治療薬の有無にかかわらず使用される兆候、投与経路、ならびに患者のサイズ（体重、体表または器官のサイズ）および/または状態（年齢および全体的な健康）に応じて変わることを理解するであろう。いくつかの実施形態において、臨床医は投薬量を滴定し、投与経路を修飾して、最適の治療効果を得ることができる。いくつかの実施形態において、典型的な投薬量は、前述の因子によって、約0.1 μg/kg患者体重から約100 mg/kg以上まで及ぶ可能性がある。いくつかの実施形態において、投薬量は、0.1 μg/kgから約100 mg/kgまで；1 μg/kgから約100 mg/kgまで；または5 μg/kgから約100 mg/kgまで（前記終点の任意のもの間の全ての点（小数を含む）を含む）に及ぶ可能性がある。いくつかの実施形態において、投薬量は約1 mg/kg体重～約60 mg/kg体重である。いくつかの実施形態において、投薬量は約1 mg/kg体重、約3 mg/kg体重、約5 mg/kg体重、約10 mg/kg体重、約20 mg/kg体重、約30 mg/kg体重、約40 mg/kg体重、約50 mg/kg体重、または約60 mg/kg体重である。

30

40

【0142】

いくつかの実施形態において、NOTUMに対する中和抗体のヒト用量は、例えばマウス、イヌ、サルなどの別の種における同じ抗体の有効用量に基づいて決定される。いくつかの実施形態において、NOTUMに対する中和抗体のヒト用量は、“Guidance for Industry: Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers,” U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, and Center for Drug Evaluation and Research (CDER), July 2005 (Pharmacology and Toxicology)を用いて決定される。

【0143】

50

いくつかの実施形態において、好適な投薬量は、当業者が、例えば動物実験に基づいて決定することができる。

【0144】

様々な実施形態でNOTUMに対する中和抗体を患者に対して、週2回、週1回、2週ごとに1回、1ヶ月に1回、隔月に1回、またはさらに低頻度で投与する。

【0145】

いくつかの実施形態において、投薬の頻度は、NOTUMに対する抗体の薬物動態パラメータおよび、該当する場合、使用される処方中の任意のさらなる治療薬を考慮する。いくつかの実施形態において、臨床医は、投薬量が所望の効果を達成する値に到達するまで、組成物を投与するであろう。いくつかの実施形態において、組成物は、したがって、単回投与として、または2以上の投与量（同じ量の所望の分子を含有してもよいし、または含有しなくてもよい）として長時間にわたり、または埋込デバイスもしくはカテーテルによる連続注入として、投与することができる。いくつかの実施形態において、適切な投薬量のさらなる改良は当業者によって慣例的におこなわれ、当業者が慣例的に実施する職務の範囲内である。いくつかの実施形態において、適切な投薬量は、適切な用量応答データの使用により確認することができる。いくつかの実施形態において、患者は、NOTUMに対する抗体を含む医薬組成物を1回投与される。いくつかの実施形態において、患者は、NOTUMに対する抗体を含む医薬組成物を1日につき1、2、3、または4回投与される。いくつかの実施形態において、患者は、NOTUMに対する抗体を含む医薬組成物を1週間につき1、2、3、4、5、または6回投与される。いくつかの実施形態において、患者は、NOTUMに対する抗体を含む医薬組成物を1月あたり1、2、3、または4回投与される。

【0146】

いくつかの実施形態において、医薬組成物の投与経路は、公知方法にしたがい、例えば、経口、皮下、静脈内、腹腔内、大脳内（実質内）、脳室内、筋肉内、眼内、動脈内、門脈内、または病巣内経路による注射による；持続放出システムによるかもしくは埋込デバイスによる。いくつかの実施形態において、組成物は、ボーラス注射によるかもしくは注入により連続的に、または埋込デバイスにより投与することができる。

【0147】

いくつかの実施形態において、組成物は、その上に所望の分子を吸収もしくは封入させた、膜、スポンジまたは別の適切な材料の埋め込みによって局所的に投与することができる。埋込デバイスが使用されるいくつかの実施形態において、デバイスは任意の好適な組織または器官中に移植することができ、所望の分子の送達は、拡散、持続放出ボーラス、または連続投与による可能性がある。

【0148】

いくつかの実施形態において、少なくとも1つのさらなる治療薬の有無にかかわらず、NOTUMに対する抗体は、本明細書中に記載されるものなどの方法を用いて遺伝子操作されたある細胞を移植することによって送達され、ポリペプチドを発現し、分泌する。いくつかの実施形態において、そのような細胞は、動物またはヒト細胞であってよく、オートローガス、ヘテローガス、またはキセノーガスであってよい。いくつかの実施形態において、細胞は不死化されていてもよい。いくつかの実施形態において、免疫応答の機会を減少させるために、細胞を封入して、周辺組織の侵入を回避することができる。いくつかの実施形態において、封入材料は、典型的には、タンパク質産物（複数可）の放出を許容するが、患者の免疫系または周辺組織からの他の有害因子による細胞の破壊を防止する生体適合性半透性ポリマーエンクロージャーまたは膜である。

【実施例】

【0149】

6.1. ノックアウトマウス

ヒトNOTUM遺伝子のマウスオルソログ中の遺伝的に操作された変異とホモ接合型であるマウスを、変異マウスES細胞クローンのOMNIBANKコレクション由来の、対

10

20

30

40

50

応する変異胚性幹 (ES) 細胞のクローンを使用して作製した (一般的には、米国特許第 6,080,576 号を参照のこと)。簡単に説明すると、マウス NOTUM 遺伝子座への変異原性ウイルス挿入物を含む ES 細胞クローンを、胚盤胞に微量注入し、それを今後は偽妊娠の雌性宿主に移植し、出産に至らせた。その後、得られたキメラの子孫を、C57 黒色雌性マウス 6 匹により繁殖させ、その子孫における、ノックアウト NOTUM 対立遺伝子の生殖系列の伝達に関して調査した。続いて、変異 NOTUM 対立遺伝子に対してヘテロ接合型である動物を繁殖させ、変異 NOTUM 対立遺伝子に対してホモ接合型である子孫、変異 NOTUM 対立遺伝子に対してヘテロ接合型である子孫、または野生型の子孫を、約 1 : 2 : 1 の比率で得た。

#### 【0150】

NOTUM 遺伝子の破壊に対してホモ接合型である (-/-) マウスを、NOTUM 遺伝子の破壊に対してヘテロ接合型である (+/-) マウス、および野生型 (+/+) 同腹子とともに調査した。この分析の間、哺乳類対象における主要な器官系の機能を評価するために設計された、総合的な一連の医学的診断手順を使用して、マウスを医学的に精密検査した。ホモ接合型 (-/-) の「ノックアウト」マウスを、記載される数で、ならびにヘテロ接合型 (+/-) および野生型 (+/+) 同腹子とともに調査することにより、より信頼性が高く、再現性のあるデータが得られた。

#### 【0151】

図 1 に示す通り、NOTUM 遺伝子のホモ接合型の破壊を含む雄性マウス (「hom」) は、週齢 16 週において、それらの野生型同腹子と比較して、種々の骨部位でより大きな皮質厚を示した (マウスの数 N = 両群において 10)。マイクロ CT (スキャンコ社 (Scanco)  $\mu$ CT 40) により測定されたこれらの差異は：大腿骨骨幹中央部で 28% ( $p < 0.001$ )；上腕骨骨幹中央部で 19% ( $p < 0.001$ )；脛骨骨幹中央部で 17% ( $p < 0.001$ )；および脛骨 - 腓骨接合部で 11% ( $p < 0.001$ ) であった。図 2 に示す通り、週齢 16 週において、NOTUM 変異に対してヘテロ接合型であるマウス (「het」) の大腿骨骨幹中央部の皮質骨厚もまた、それらの野生型同腹子のもより大きく：雄性 het (N = 50) は、それらの野生型同腹子 (N = 23) と比較して、6% ( $p = 0.007$ ) の増加を示し；および雌性 het (N = 57) は、それらの野生型同腹子 (N = 22) と比較して、9% ( $p < 0.001$ ) の増加を示した。

#### 【0152】

NOTUM 動物において観察された骨形成再分布の実際的な徴候が、図 3 および 4 に示されており、これは、標準的な 4 点屈曲試験を使用した、大腿骨破壊強度試験 (スケルテック社 (SkeleTech)、現在はリセルカバイオサイエンス社 (Ricerca Biosciences)、により実施) の結果を示す。図 3 は、週齢 16 週の雄性マウスに関して得られた結果を示しており、het (N = 20) は、それらの野生型同腹子 (N = 23) と比較して、大腿骨破壊強度において 5% ( $p = 0.54$ ) の増加を示し、一方 hom (N = 17) は、28% ( $p < 0.001$ ) の増加を示した。これに対して、NOTUM hom および het 両方の脊椎圧迫試験では、最大脊椎圧迫負荷において、野生型対照と比較して有意な減少はみられなかった。週齢 16 週の雌性のマウスにおいても、類似した結果を得た。図 4 に示す通り、het (N = 20) は、それらの野生型同腹子 (N = 21) と比較して、大腿骨破壊強度において 12% ( $p = 0.04$ ) の増加を示し、一方 hom (N = 18) は、28% ( $p < 0.001$ ) の増加を示した。これらおよび他のデータの分析により、皮質厚および大腿骨破壊強度間の、強力な相関関係が明らかになった。

#### 【0153】

### 6.2. 組換え型 NOTUM タンパク質の作製および精製

それぞれの C 末端に 6XHis エピトープタグを付けた、ヒト、触媒的に不活性なヒト (S232A)、マウス、触媒的に不活性なマウス (S239A)、ラット、モルモット、カニクイザルサル、およびアカゲザルの NOTUM の完全長コード配列を、発現ベクター pIRES-puro2 (クローンテック社 (Clontech)) 中にサブクローニングした。発現構築体を使用して、一過性導入により、分泌された NOTUM タンパク質を含む馴化

10

20

30

40

50



培地を作製することができ、または、例えば、その後のNOTUMタンパク質精製のために、より多量の馴化培地を作製するための、安定したトランスフェクタントを作製することもできる。

#### 【0154】

Lipofectamine 2000 (インビトロジェン社 (Invitrogen)) を使用してHEK293F細胞をトランスフェクトし、振盪フラスコ中の、Freestyle 293 発現培地 (インビトロジェン社 (Invitrogen)) 中の懸濁培養液中で培養した。一過性導入用には、トランスフェクションの4日後に馴化培地を収集し、無菌濾過し、4で保管した。安定にNOTUMタンパク質を発現している細胞株を作製するために、ピューロマイシンの存在下で、発現プラスミドのゲノム挿入を選定した。

10

#### 【0155】

抗His抗体を使用して、NOTUMタンパク質の発現および分泌を、細胞可溶化物および/または馴化培地のウエスタンブロットにより確認した。限界希釈による、NOTUMを産生する大量の安定したトランスフェクタントのサブクローニングは、NOTUMを発現している個々のクローンを、抗Hisウエスタンブロットにより、比較的高レベルで同定することを可能にした。

#### 【0156】

精製したマウスおよびヒトNOTUMタンパク質を、10~20mgの規模で作製するため、マウスまたはヒトNOTUMのどちらかを発現しているクローンのHEK293F細胞株を、懸濁培養液中で、体積3Lまで増加させた。この体積における細胞密度が、 $1 \times 10^6$  生存細胞/mlに達した時点で、細胞を遠心分離によりペレット化し、新鮮なFreestyle 293 発現培地中に懸濁し、さらに96時間、追加で培地を取り換えることなく、培養液中に維持した。96時間後、培養液を収集し、細胞を遠心分離によりペレット化し、馴化培地を無菌濾過し、その後の処理のために、4で保管した。

20

#### 【0157】

精製の直前に、NOTUM含有馴化培地を3Lから1Lに濃縮し、次いで公称分画分子量10kDaの膜を使用したタンジェント流過により、緩衝剤を、ニッケル固定化金属アフィニティークロマトグラフィー (IMAC) 緩衝剤 (20mMトリス-HCl、10mMイミダゾール、0.5M NaCl、pH7.4) に交換した。その後、濃縮し緩衝剤を交換した馴化培地を、平衡化しニッケル荷電した、金属キレート化カラムに通した。結合したタンパク質を洗浄し、イミダゾールの濃度勾配を使用して溶出した。純粋なNOTUMタンパク質を含む溶出画分をプールし、リン酸緩衝食塩水に対して透析して、溶出緩衝剤を除去した。精製し、透析したタンパク質を分割し、-80で凍結した。

30

#### 【0158】

タンパク質の各1回分として、1つの分割量を使用し、ビシンコニン酸 (BCA) アッセイ (サーモサイエンティフィック社 (Thermo Scientific)、イリノイ州、ロックフォード) によるタンパク質濃度の測定、SDS PAGEおよびその後のクーマシーまたは銀染色による純度の測定、無細胞OPTS酵素アッセイ (以下の実施例6.4.1に記載) および細胞ベースのWntシグナル伝達アッセイ (以下の実施例6.4.2に記載) の両方における活性の測定、ならびにリムルス変形細胞溶解物 (LAL) アッセイ (ロンザ社 (Lonza)、スイス、バーゼル) による内毒素濃度の測定を行った。

40

#### 【0159】

### 6.3. NOTUMに対するマウスモノクローナル抗体の作製

精製した組換え型ヒトおよびマウスNOTUMタンパク質に対する抗体を、2つの別々の免疫化キャンペーンにおいて作成した。

#### 【0160】

キャンペーン1において、NOTUM遺伝子中の遺伝子トラップ挿入物に対してホモ接合型であり、そのため内在性のNOTUMタンパク質を欠いているマウスを、以下の通り、ヒトNOTUMタンパク質で免疫化した。フロイント完全アジュバント中20μgのヒトNOTUMタンパク質を、腹腔内に注射することにより、マウスをプライミングした。

50

フロイント不完全アジュバント中20 µgのヒトNOTUMタンパク質を、2～3週に1回、腹腔内に注射することにより、マウスを追加免疫した。ELISAによる測定において、ヒトNOTUMに対して、強い血清力価を示しているマウスには、PBS中10 µgのヒトNOTUMタンパク質を静脈内(i.v.)に注射することにより、最終の追加免疫を施した。

#### 【0161】

キャンペーン2において、NOTUM遺伝子中の遺伝子トラップ挿入物に対してホモ接合型のマウスを、CpG DNAを含むTiterMaxアジュバント中10 µgマウスNOTUMタンパク質による、後足蹠からのプライミング免疫化の後、CpG DNAを含むミョウバンアジュバント中10 µgのマウスNOTUMタンパク質による、3日または4日おきの、10回の追加免疫により、免疫化した。PBS中10 µgのマウスNOTUMタンパク質による足蹠からの最終追加免疫の後、高力価マウスから鼠径部および膝窩リンパ節を収集した。

10

#### 【0162】

静脈注射で追加免疫したマウス由来の脾臓または足蹠から免疫化したマウス由来のリンパ節を、最終の追加免疫の4日後に収集し、細かく刻んで濾し、細胞懸濁液を得た。赤血球を溶解させ、非B細胞集団に特異的な抗体でコーティングされた磁気ビーズを使用した陰性選択により、細胞懸濁液のB細胞を濃縮した。濃縮したB細胞とマウスNS1骨髓腫細胞の電気細胞融合によりハイブリドーマを作製し、96ウェルプレート上の、ヒボキサンチンおよびアミノプテリンを含むハイブリドーマ培地中に播種して、生存B細胞/骨髓腫細胞ハイブリドーマを選択した。

20

#### 【0163】

ハイブリドーマ馴化培地を、受動的に吸着されたNOTUMタンパク質で、免疫反応性についてELISA型でアッセイすることにより、ハイブリドーマを、NOTUM特異的な抗体の作製のためにスクリーニングした。マウスおよび/またはヒトNOTUMに特異的な抗体を分泌する、何百個ものハイブリドーマが、両免疫化キャンペーンから発見された。

#### 【0164】

##### 6.4. NOTUM中和アッセイ

##### 6.4.1. OPTSアッセイ

30

OPTSアッセイにおいては、エステラーゼおよびリパーゼの蛍光アッセイのための水溶性酵素基質である、8-オクタノイルオキシピレン-1,3,6-トリスルホン酸三ナトリウム(OPTS)を使用して、NOTUM活性を測定する。OPTSにおけるエステル結合の酵素的開裂により、蛍光生成物が生成される。

#### 【0165】

ハイブリドーマ馴化培地が、一般的に、OPTSアッセイに干渉したことが分かったが、これはおそらくは、同じくOPTSを切断することが出来る加水分解酵素が、瀕死の細胞から放出されることが原因である。この理由により、ELISAにおいて当初から最高レベルの結合活性を示していた細胞株のための、追加のハイブリドーマ馴化培地を作製し、プロテインAビーズを使用したアフィニティークロマトグラフィーにより、96ウェル型中で、抗体を精製した。次いでこれらの精製された抗体を、前もって定量化することなく、OPTSアッセイにおいて、4倍希釈で試験した。

40

#### 【0166】

抗体を、384ウェルプレート中、4つ一組で試験した。4X反応緩衝液(20 mM CaCl<sub>2</sub>、2 mM MgCl<sub>2</sub>、50 mM トリス-HCl、pH 7.4)中125 ngの精製NOTUMを含む12.5 µlを、12.5 µlの精製抗体に添加した。混合後、抗体およびNOTUMを、室温で20分間インキュベートし、その後50 mM トリス-HCl、pH 7.4中の1.25 µM OPTS(シグマ社(Sigma)、カタログ番号: 74875)25 µlを添加した。混合後、室温で10分間酵素反応を進行させ、その後3% SDS、25 µlの添加により、反応を停止した。Envisionプレートリー

50

ダー上で、485 nmの励起波長および535 nmの発光波長でプレートを読み取り、切断産物の量を定量化した。

【0167】

キャンペーン1で得たヒトNOTUM免疫反応性ハイブリドーマ1, 135個のスクリーニングにより、70%超のヒトNOTUMの阻害を示す3つの抗体を得た。クローンのハイブリドーマ由来の50 mlの馴化培地を使用した、限界希釈およびプロテインAアフィニティークロマトグラフィーによる小規模の精製抗体作製により、これら3つの抗体とともに、OPTSアッセイにおいてある程度の中和を示した追加の5つのハイブリドーマを、サブクロニングのために選択した。

【0168】

キャンペーン2で特定された1, 056個のマウスNOTUM免疫反応性ハイブリドーマのOPTSアッセイスクリーニングにより、50%超のマウスNOTUM阻害を示した6つの抗体を得た。クローンのハイブリドーマ由来の50 mlの馴化培地を使用した、限界希釈およびプロテインAアフィニティークロマトグラフィーによる小規模の精製抗体作製により、これら6つの抗体とともに、OPTSアッセイにおいてある程度の中和を示した追加の6つのハイブリドーマを、サブクロニングのために選択した。

【0169】

6.4.2. Wntシグナル伝達アッセイ

NOTUMは、Wntシグナル伝達の負の制御因子として作用し得る。Cell Sensor (登録商標) 技術および以下のとおり作製される馴化培地を使用するWntシグナル伝達アッセイにおいて、Wntシグナル伝達における影響を介して測定された抗体中和活性を測定した。pcDNA3.1(+)ベクター中のプラスミド含有ヒトNOTUMを、HEK293細胞中にトランスフェクトし、400 µg/mlのG418の存在下で培養することにより、クローンを選択した。これらの細胞由来の馴化培地を、アッセイに使用した。馴化培地中にWnt3aを過剰発現および分泌しているL細胞をATCCから購入した。

【0170】

アッセイプロトコルは以下のとおりである。Cell Sensor (登録商標) LEF/TCF-bla Free Style (商標) 293F細胞(インビトロジェン社(Invitrogen))を、10% 透析FBS、5 µg/ml プラストサイジン(インビトロジェン社(Invitrogen)、R210-01)、0.1 mM NEAA、25 mM HEPESおよび1xGPSを含むDMEM中で、15 cmプレート中、コンフルエント近くまで培養した。最初にPBSで洗浄し、その後5 mLのトリプシンを添加し、プレートを室温で2分間インキュベートすることにより、細胞をトリプシン処理した。次いで、15 cmプレートあたり、合計10 mLのアッセイ培地(Opti-MEM、+0.5% 透析FBS、0.1 mM NEAA、1 mM ピルビン酸ナトリウム、10 mM HEPES、1xGPS)を添加した。細胞をカウントし、50,000細胞/mLで懸濁した。Biocoat 384ウェルプレート(フィッシャー社(Fisher)、カタログ番号: 356663)中に、10000細胞/20 µL/ウェルの密度で、細胞を播種した。細胞を37

で3時間インキュベートした後、アッセイ培地中30 mMのLiCl、10 µLをウェルあたりに添加し、その後、37 で一晩インキュベートした。翌日、ともにアッセイ培地中の、抗体15 µLおよび精製NOTUM 15 µLを、総体積45 µLのアッセイ培地中、室温で30分間、96ウェルプレート中で共インキュベートした。アッセイにおいて、50%阻害をもたらすことが予め測定された濃度、一般的に25 nM、のNOTUMを使用した。30分間のインキュベーションの後、15 µLの未希釈のL-Wnt3a馴化培地を、45 µLの抗体/NOTUM混合物に添加し、10 µLの得られた混合物を、Cell Sensor (登録商標)細胞を含む384ウェルプレートのウェル、4組に、添加した。対照には、いずれの細胞をも欠くウェル、NOTUMを欠くウェル、およびL-Wnt3a馴化培地を欠くウェルが含まれた。アッセイプレートを37 で5時間インキュベートして、Wntを介した ラクタマーゼ上方制御を可能にし、次いで8 µLのLi

10

20

30

40

50

veBLAzer (商標) - FRET B/G基質 (CCF4-AM、インビトロジェン社 (Invitrogen)) を各ウェルに添加し、プレートを室温で3時間、暗所にてインキュベートした。次いで、Envisionプレートリーダー上で、400nmの励起波長および460nmのおよび535nmの発光波長を使用して、プレートを読み取った。

【0171】

#### 6.5. NOTUM中和抗体の特徴付け

クローンのハイブリドーマから精製された抗体を、それらの種交差反応性に関してはELISAにより、減少し変性したNOTUMタンパク質を認識する能力に関してはウエスタンブロットにより、ならびにそれらの中和作用強度に関しては、ともに実施例6.4において上述された無細胞OPTSアッセイおよび細胞ベースのWntシグナル伝達アッセイにおいて、特徴付けした。

【0172】

キャンペーン1由来のモノクローナル抗体の機能的試験により、OPTSおよびWntシグナル伝達アッセイの両方において、1~10nMの範囲のIC<sub>50</sub>で、ヒトNOTUMを中和する3つの抗体、1.802、1.815、1.846が明らかになった。これらの抗体は、マウスNOTUMの活性にはいかなる影響も及ぼさず、ELISAにより、ヒトNOTUMには結合するが、マウスNOTUMには結合しないことが示された。さらに、これらの抗体は、NOTUMタンパク質をアッセイプレートに受動的に吸着させた場合には、ごく弱くしかヒトNOTUMを認識せず、および抗His提示ヒトNOTUMタンパク質に対して、より一層感受性が高かった。

【0173】

表1は、キャンペーン1由来のある特定の抗体に対する、種々の特徴付け実験の結果を示す。「Bin」列中のデータは、以下の実施例6.6に記載される方法を用いて、作成された。

【0174】

【表1】

表1：ヒトNOTUMに対して作製された、ある特定の抗体の特徴付け

| 抗体    | イソ型   | Bin | OPT<br>S<br>I<br>C <sub>50</sub><br>(nM; ヒトNOTUM) | Wntシグ<br>ナル伝達<br>IC <sub>50</sub><br>(nM; ヒトNOTUM) | OPTS<br>IC <sub>50</sub><br>(nM; マウスNOTUM) | Wntシ<br>グナル伝<br>達 IC <sub>50</sub><br>(nM; マウスNOTUM) | マウス<br>NOTUM<br>結合 | ウエスタ<br>ンブロッ<br>ト結合 |
|-------|-------|-----|---|--|--|--|--------------------|---------------------|
| 1.802 | IgG1  | 1   | 6.44  | 5.71   | 阻害無し                                       | 阻害無し   | 無し                 | 無し                  |
| 1.815 | IgG1  | 1   | 7.62  | 6.88   | 阻害無し                                       | 不検出  | 無し                 | 無し                  |
| 1.846 | IgG2b | 1   | 10.07   | 1.70   | 阻害無し                                       | 不検出  | 無し                 | 無し                  |
| 1.731 | IgG1  | 3   | >166.67   | 15.52  | 196.74                                     | 阻害無し   | 有り                 | 有り                  |
| 1.655 | IgG1  | 3   | >166.67   | 不検出  | >166.67                                    | 不検出  | 不検出                | 有り                  |
| 1.168 | IgG2a | 4   | 56.61   | 阻害無し   | 阻害無し                                       | 不検出  | 有り                 | 有り                  |
| 1.712 | IgG2a | 2   | 125.36  | 58.49  | 阻害無し                                       | 不検出  | 有り                 | 有り                  |
| 1.807 | IgG2a | 2   | 不検出   | 阻害無し   | 阻害無し                                       | 不検出  | 有り                 | 有り                  |

【0175】

キャンペーン2由来のモノクローナル抗体の機能的試験により、興味深い活性プロファイルが明らかになった。より詳細には、モノクローナル抗体2.78は、OPTSおよび

W n tシグナル伝達アッセイの両方において、マウスおよびヒトNOTUM両方を、3 ~ 50 nMの範囲のIC<sub>50</sub>で中和した。一方モノクローナル抗体2.1029は、OPTSアッセイにおいて、マウスおよびヒトNOTUMの両方を5 ~ 30 nMの範囲のIC<sub>50</sub>で中和したが、W n tシグナル伝達アッセイにおいては、ヒトNOTUMのみを14 nMのIC<sub>50</sub>で中和した。後者の観察結果は、組換え型のマウスおよびヒトNOTUMタンパク質の質に、いくらかの差異が存在することに起因した。該タンパク質間の、1つの周知の差異は、組換え型マウスNOTUMは、組換え型ヒトNOTUMよりも、より一層大きな割合で、多量体/集合体として存在するということである。2.78または2.1029のどちらも、ウエスタンブロットにおいて、減少し変性したNOTUMタンパク質を認識せず、およびどちらも、受動的に吸着されたNOTUMに比べて、抗His提示NOTUMに対し、実質的により免疫反応性が高かった。

#### 【0176】

表2は、キャンペーン2由来のある特定の抗体についての、種々の特徴付け実験の結果を示す。「Bin」列中のデータは以下の実施例6.6に記載される方法を使用して、作成された。

#### 【0177】

#### 【表2】

表2：マウスNOTUMに対して作製された、ある特定の抗体の特徴付け

| 抗体     | イソ型   | Bin | OPTS<br>IC <sub>50</sub><br>(nM; マウスNOTUM) | W n tシグ<br>ナル伝達<br>IC <sub>50</sub><br>(nM; マウスNOTUM) | OPTS<br>IC <sub>50</sub><br>(nM; ヒトNOTUM) | W n tシグナル伝達<br>IC <sub>50</sub><br>(nM; ヒトNOTUM) | ヒトNOTUM結合 | ウエスタンブロット結合 |
|--------|-------|-----|--|---|---|--|-----------|-------------|
| 2.78   | IgG2b | 2   | 35.65                                      | 3.75  | 15.49                                     | 45.94  | 有り        | 無し          |
| 2.1029 | IgG2a | 3   | 29.19                                      | 阻害無し  | 5.77                                      | 14.02  | 有り        | 無し          |
| 2.816  | IgG2a | 3   | 31.70                                      | 阻害無し  | 阻害無し                                      | 39.11  | 有り        | 無し          |
| 2.856  | IgG2b | 3   | 37.70                                      | 阻害無し  | 阻害無し                                      | 阻害無し   | 有り        | 無し          |
| 2.1001 | IgG2b | 3   | >166.67                                    | 阻害無し  | 阻害無し                                      | 阻害無し   | 無し        | 有り          |
| 2.55   | IgG2a | 1   | 26.13                                      | 阻害無し  | 阻害無し                                      | 阻害無し   | 有り        | 有り          |
| 2.1002 | IgG2a | 1   | 42.39                                      | 阻害無し  | 阻害無し                                      | 阻害無し   | 有り        | 有り          |
| 2.497  | IgG2a | 1   | 54.95                                      | 阻害無し  | 阻害無し                                      | 阻害無し   | 有り        | 有り          |
| 2.341  | IgG2a | 1   | 56.95                                      | 阻害無し  | 阻害無し                                      | 阻害無し   | 有り        | 有り          |
| 2.236  | IgG2a | 1   | 64.54                                      | 阻害無し  | 阻害無し                                      | 阻害無し   | 有り        | 有り          |
| 2.688  | IgG2a | 4   | 阻害無し                                       | 阻害無し  | 12.84 <sup>†</sup>                        | 阻害無し   | 有り        | 無し          |
| 2.1006 | IgG2a | 5   | >166.67                                    | 阻害無し  | >166.67 <sup>†</sup>                      | 阻害無し   | 有り        | 有り          |

#### 【0178】

#### 6.6. NOTUM中和抗体を使用した結合競合実験

両免疫化キャンペーン由来の抗体の、NOTUMタンパク質に対する互いの結合を妨げる能力について、エピトープ結合アッセイにおいて評価した。このアッセイは、抗Hisで捕獲したNOTUMタンパク質を使用して、ELISA型で実施した。捕獲したNOTUMタンパク質を、過剰な量の、未標識のNOTUM特異的抗体(「遮断」抗体)とともに

にインキュベートし、その後ビオチン標識したNOTUM特異的抗体（「プローブ」抗体）を添加した。プローブ抗体の結合を、ストレプトアビジンに結合したHRPを使用して測定した。2つの抗体が同一のエピトープ空間での結合において競合する場合、または遮断抗体が、例えばアロステリックな干渉などにより、プローブ抗体の結合能力に何らかの影響を与える場合、信号は生成されない。2つの抗体が互いに干渉しない場合は、遮断抗体の不存在下で試験されたビオチン標識抗体に類似する信号が生成される。抗体を、逆行列型で試験する。典型的に、一組の抗体は、2つのうちのどちらが遮断抗体でどちらがプローブ抗体であるかに関わらず、同レベルの干渉を示す。類似したプロファイルを示す抗体を、同一のエピトープ「bin」に割り当てる。

#### 【0179】

この方法論を使用することにより、モノクローナル抗体、1.802、1.815、1.846、2.78、および2.1029すべてが、ヒトNOTUMに対する互いの結合に干渉するが、いくつかの他のより強力ではない中和剤または非中和剤の結合は干渉しないことが示された。

#### 【0180】

#### 6.7. NOTUM中和抗体のエピトープマッピング

ヒトNOTUM特異的モノクローナル抗体、1.802、1.815、および1.846の結合に関与するアミノ酸のマッピングをするために、NOTUMのオープンリーディングフレームをコードする発現構築体のHEK293F中に、ヒトおよびマウス配列の混合物を一過性導入することにより、ヒト/マウスのキメラNOTUMタンパク質を作製した。抗His抗体を用いたウエスタンブロットおよびOPTSアッセイにより、これらのトランスフェクション由来の馴化培地が、機能的なNOTUMキメラを含有することが示された。

#### 【0181】

図5は、この実験において使用されたヒト/マウスのキメラNOTUMタンパク質の模式図である。これらのタンパク質の配列を、第7節（配列表）に示す。馴化培地をELISA型において使用し、抗体の特異性を測定した。ヒト特異的モノクローナル抗体の、特定のキメラに対する結合の損失に基づき、モノクローナル抗体1.802、1.815、および1.846（これらすべては「Bin1」抗体である）が、結合において、Q47～M177間のヒトNOTUMアミノ酸に依存するということが判明した。図5を参照のこと。この領域内で、マウスおよびヒトNOTUMは、5つの位置（ヒト配列の番号付けに基づいて、R115K、D141S、R150K、R154H、およびY171H）において異なっている。ヒトNOTUMを発現している構築体に、これらの5つの位置それぞれにおいてマウスアミノ酸を一過性導入することにより、ヒトNOTUM点変異体を作製し、OPTSアッセイにおいて、点変異体がすべて、機能的であることが示された。ELISAにより、モノクローナル抗体1.802、1.815、および1.846は、ヒトNOTUM D141Sを除くすべての点変異体と結合し、このアミノ酸が、それらのヒトNOTUMに対する結合において重要であることを示した。一過性導入により、相互点変異を有するマウスNOTUMである、マウスNOTUM S148Dを作製した。マウスNOTUM S148Dは、OPTSアッセイにおいて活性であり、かつヒトNOTUM特異的モノクローナル抗体の結合を補助することが示された。従って、モノクローナル抗体1.802、1.815、および1.846の種特異性は、ヒトNOTUMの位置141のアミノ酸に依存するようであり、そのアミノ酸は、未変性のヒトNOTUMタンパク質においてはアスパラギン酸である。

#### 【0182】

キメラ手法は、モノクローナル抗体2.78または2.1029の結合に関与するアミノ酸をマッピングするためには使用することが出来ない。これらは、ヒトおよびマウスNOTUM両方と交差反応するからである。モノクローナル抗体1.802、1.815、1.846、2.78、および2.1029が互いの結合に干渉するという発見に基づき、ヒトD141近傍の荷電アミノ酸残基のアラニン走査変異誘発を実施した。5つのヒト

10

20

30

40

50

NOTUM変異体を、それぞれ、以下の、アラニンに変異した荷電残基のペアを用いて構築した：ヒトNOTUM N132A/R133A（配列番号96）；ヒトNOTUM E134A/N135A（配列番号97）；ヒトNOTUM D137A/R139A（配列番号98）；ヒトNOTUM R144A/R145A（配列番号99）；およびヒトNOTUM R150A/D151A（配列番号100）。一過性導入の後、全ての5つのヒト変異体が、効果的に発現され、分泌された。5つの変異体のうち4つが、OPTSアッセイにおいて有意な活性を示したが、5番目（ヒトNOTUM D137A/R139A）はわずかな活性を示すかまたは活性を示さなかった。キャンペーン1およびキャンペーン2のモノクローナル抗体のうちの少なくともいくつかにより、全ての5つの変異体が、ELISA型において検出された。モノクローナル抗体2.78は、ヒトNOTUM D137A/R139AおよびヒトNOTUM R144A/R145Aと結合することができず、一方モノクローナル抗体1.802、1.815、および1.846は、NOTUM R144A/R145Aのみと結合できなかった。モノクローナル抗体2.1029は、アラニン変異体の全て5つと免疫反応性であった。

【0183】

#### 6.8. NOTUM中和抗体の結合親和性

ある特定の抗NOTUMモノクローナル抗体の結合親和性を、Biacore3000を使用して測定した。多量体のマウスNOTUMタンパク質との結合に関する、意味のある親和性値を得るために、完全IgGをプロテアーゼのフィシンで消化し、その後未消化のIgGおよびFc断片をプロテインAアフィニティークロマトグラフィーで除去することにより、抗体Fab断片を作製した。Fabおよび完全IgGのヒトNOTUMとの結合に関する親和性値は一致し、およびそれらの親和性値は、表3に示す通り、一桁から低い二桁のnMの範囲にあった。

【0184】

【表3】

表3：ヒトおよびマウスNOTUMに対して作製された、ある特定の抗体の結合親和性

| ヒトNOTUMに対する親和性  |            |                               |                                |
|-----------------|------------|-------------------------------|--------------------------------|
| 抗体または断片         | $K_D$ (nM) | $k_{on}$ ( $M^{-1}sec^{-1}$ ) | $k_{off}$ ( $M^{-1}sec^{-1}$ ) |
| 1.802 IgG       | 1.42       | $2.57 \times 10^5$            | $3.65 \times 10^{-4}$          |
| 1.802 Fab       | 0.91       | $8.99 \times 10^5$            | $8.20 \times 10^{-4}$          |
| 2.78 IgG        | 17.6       | $4.79 \times 10^4$            | $8.41 \times 10^{-4}$          |
| 2.78 Fab        | 15.4       | $8.77 \times 10^4$            | $1.36 \times 10^{-3}$          |
| 2.1029 IgG      | 5.99       | $1.51 \times 10^5$            | $9.08 \times 10^{-4}$          |
| マウスNOTUMに対する親和性 |            |                               |                                |
| 抗体または断片         | $K_D$ (nM) | $k_{on}$ ( $M^{-1}sec^{-1}$ ) | $k_{off}$ ( $M^{-1}sec^{-1}$ ) |
| 1.802 Fab       | 結合は観測されず   |                               |                                |
| 2.78 Fab        | 4.99       | $3.91 \times 10^4$            | $1.95 \times 10^{-4}$          |

【0185】

#### 6.9. マウスへのNOTUM中和抗体の投与

##### 6.9.1. NOTUM中和抗体の週1回、8週間の投与

週齢8週の雄性F1ハイブリッド（129xC57）マウスに、NOTUM中和抗体2.1029もしくは2.78b、または対照抗体を、30mg/kgの腹腔内注射により、週1回、8週間投与した。群あたり、マウスは12匹であった。実験終了時、マウスを屠殺した。剖検後、マイクロCTにより、骨質量および骨構造を測定した。測定には、Scanco  $\mu$ CT40を、閾値240、積分時間200ミリ秒、およびX線管電圧55

keVで使用した。

【0186】

図6に示す通り、大腿骨骨幹中央部の皮質厚は、対照抗体と比較して、NOTUM中和抗体2.1029の投与により12% ( $P < 0.001$ )増加し、NOTUM中和抗体2.78bの投与により16% ( $P < 0.001$ )増加した。

【0187】

6.9.2. NOTUM中和抗体2.1029の週1回、4週間の投与

週齢8週の雄性F1ハイブリッド(129xC57)マウスに、NOTUM中和抗体2.1029を、3mg/kg、10mg/kg、または30mg/kgの腹腔内注射により、週1回、4週間投与した。群あたり、マウスは10匹であった。実験終了時、マウスを屠殺した。剖検後、マイクロCTにより、骨質量および骨構造を測定した。測定には、Scanco  $\mu$ CT40を、閾値240、積分時間200ミリ秒、およびX線管電圧55keVで使用した。

10

【0188】

図7に示す通り、30mg/kgのNOTUM中和抗体2.1029の投与により、大腿骨骨幹中央部の皮質厚は、対照抗体の投与と比較して、5% ( $P = 0.12$ )増加した。

【0189】

6.9.3. NOTUM中和抗体2.78bの週1回、4週間の投与

週齢8週の雄性F1ハイブリッド(129xC57)マウスに、NOTUM中和抗体2.78bを、3mg/kg、10mg/kg、または30mg/kgの腹腔内注射により、週1回、4週間投与した。第1実験において、群あたり、マウスは10匹であった。第2実験においては、NOTUM中和抗体2.78bを、0.3mg/kg、1mg/kg、または3mg/kgの腹腔内注射により、週1回、4週間投与した。第2実験において、群あたり、マウスは12匹であった。各実験終了時に、マウスを屠殺した。剖検後、マイクロCTにより、骨質量および骨構造を測定した。測定には、Scanco  $\mu$ CT40を、閾値240、積分時間200ミリ秒、およびX線管電圧55keVで使用した。

20

【0190】

図8Aに示す通り、第1実験において、3mg/kg、10mg/kg、および30mg/kgのNOTUM中和抗体2.78bの投与により、大腿骨骨幹中央部の皮質厚は、対照抗体の投与と比較して、それぞれ13% ( $P < 0.001$ )、17% ( $P < 0.001$ )、および16% ( $P < 0.001$ )増加した。図8Bに示す通り、第2実験において、0.3mg/kg、1mg/kg、および3mg/kgのNOTUM中和抗体2.78bの投与により、大腿骨骨幹中央部の皮質厚は、対照抗体の投与と比較して、それぞれ3% ( $P = 0.46$ )、7% ( $P = 0.01$ )、および10% ( $P < 0.001$ )増加した。

30

【0191】

6.9.4. ゴレドロン酸による前処置を伴う、NOTUM中和抗体2.78bの週1回、4週間の投与

週齢28週の雄性F1ハイブリッドマウス(129xC57)に、50 $\mu$ g/kgのゴレドロン酸一用量を、腹腔内注射により投与した。ゴレドロン酸の投与4週後、マウスに、10mg/kgのNOTUM中和抗体2.78bを、腹腔内注射により、週1回、4週間投与した。各実験終了時に、マウスを屠殺した。群あたり、マウスは11または12匹であった。剖検後、マイクロCTにより、骨質量および骨構造を測定した。測定には、Scanco  $\mu$ CT40を、閾値240、積分時間200ミリ秒、およびX線管電圧55keVで使用した。さらに、骨形成のマーカーであるPINPの血清レベルを、モノクローナル抗体2.78bの最初の投与から7日目に、市販のELISAアッセイ(イムノダイアグノスティックシステム社(Immunodiagnostic Systems)、アリゾナ州、スコッツデール)を使用して測定した。

40

【0192】

50



図9 Aに示す通り、ゾレドロン酸および対照抗体を投与したマウスにおける、大腿骨骨幹中央部の皮質厚は、生理食塩水および対照抗体を投与したマウスと比較して、 $10\mu\text{m}$ 、すなわち4% ( $P = 0.31$ ) 増加した。ゾレドロン酸による前処置なしでNOTUM中和抗体2.78bを投与したマウスにおける、大腿骨骨幹中央部の皮質厚は、生理食塩水および対照抗体を投与したマウスと比較して、 $23\mu\text{m}$ 、すなわち9% ( $P < 0.001$ ) 増加し、およびゾレドロン酸の前処置とともにNOTUM中和抗体2.78bを投与したマウスにおいては、ゾレドロン酸および対照抗体を投与したマウスと比較して、 $14\mu\text{m}$ 、すなわち5% ( $P = 0.06$ ) 増加した。図9 Bは、ゾレドロン酸処置および対照抗体の投与をしたマウスにおける血清PINPレベルが、生理食塩水および対照抗体を投与したマウスと比較して、 $15\text{ng/mL}$ 、すなわち50% ( $P < 0.001$ ) 減少したことを示す。ゾレドロン酸前処置なしでNOTUM中和抗体2.78bを投与したマウスにおけるPINPレベルは、生理食塩水および対照抗体を投与したマウスと比較して、 $14\text{ng/mL}$ 、すなわち47% ( $P < 0.001$ ) 増加し、およびゾレドロン酸前処置とともにNOTUM中和抗体2.78bを投与したマウスにおいては、ゾレドロン酸および対照抗体を投与したマウスと比較して、 $12\text{ng/mL}$ 、すなわち79% ( $P < 0.001$ ) 増加した。

#### 【0193】

6.9.5. NOTUM中和抗体2.78aの4週間の投与

この実験においては、IgG2b抗体である、モノクローナル抗体2.78(「2.78b」とも呼ばれる)を、IgG2a抗体として再構成した(IgG2a抗体はしばしば、IgG2b抗体よりも長い半減期を有する)。再構成したモノクローナル抗体2.78を、「2.78a」と呼ぶ。

#### 【0194】

週齢13週の雄性F1ハイブリッドマウス(129xC57)に、NOTUM中和抗体2.78aを、 $0.3\text{mg/kg}$ 、 $1\text{mg/kg}$ 、 $3\text{mg/kg}$ 、または $10\text{mg/kg}$ の腹腔内注射により、週1回、4週間投与した。群あたり、マウスは10または12匹であった。各実験の終了時に、マウスを屠殺した。剖検後、マイクロCTにより、骨質量および骨構造を測定した。測定には、Scanco  $\mu\text{CT}40$ を、閾値240、積分時間200ミリ秒、およびX線管電圧55keVで使用した。

#### 【0195】

図10に示す通り、その実験において、大腿骨骨幹中央部の皮質厚は、 $0.3\text{mg/kg}$ 、 $1\text{mg/kg}$ 、 $3\text{mg/kg}$ 、および $10\text{mg/kg}$ のNOTUM中和抗体2.78aの投与により、それぞれ3% ( $P = 0.57$ )、7% ( $P = 0.02$ )、9% ( $P = 0.002$ )、および10% ( $P < 0.001$ ) 増加した。

#### 【0196】

6.9.6. NOTUM中和抗体2.78aの週1回または2週に1回、12週間の投与

週齢10週の雄性F1ハイブリッドマウス(129xC57)に、対照抗体、 $0.3\text{mg/kg}$ のNOTUM中和抗体2.78aを、腹腔内注射により、週1回で12週間、または $1\text{mg/kg}$ のNOTUM中和抗体2.78aを、腹腔内注射により、1週おき(2週に1回)に12週間もしくは24週間投与した。投与群あたり、マウスは12匹であった。各実験の終了時に、マウスを屠殺した。剖検後、マイクロCTにより、骨質量および骨構造を測定した。測定には、Scanco  $\mu\text{CT}40$ を、閾値240、積分時間200ミリ秒、およびX線管電圧55keVで使用した。

#### 【0197】

図11 Aに示す通り、大腿骨骨幹中央部の皮質厚は、週1回、 $0.3\text{mg/kg}$ および2週に1回、 $1\text{mg/kg}$ のNOTUM中和抗体2.78aを12週間投与したマウスにおいて、それぞれ、6% ( $P < 0.001$ ) および9% ( $P < 0.001$ ) 増加した。同様に、図11 Bに示す通り、上腕骨骨幹中央部の皮質厚は、週1回、 $0.3\text{mg/kg}$ および2週に1回、 $1\text{mg/kg}$ のNOTUM中和抗体2.78aを12週間投与したマウス

スにおいて、それぞれ、5% ( $P = 0.007$ ) および7% ( $P < 0.001$ ) 増加した。

#### 【0198】

図12Aに示す通り、大腿骨骨幹中央部の皮質厚は、週1回、0.3 mg/kg および2週に1回、1 mg/kg のNOTUM中和抗体2.78 aを24週間投与したマウスにおいて、それぞれ、7% ( $P = 0.002$ ) および9% ( $P < 0.001$ ) 増加した。図12Bに示す通り、上腕骨骨幹中央部の皮質厚は、週1回、0.3 mg/kg および2週に1回、1 mg/kg のNOTUM中和抗体2.78 aを24週間投与したマウスにおいて、それぞれ、3% ( $P = 0.09$ ) および8% ( $P < 0.001$ ) 増加した。最後に、図12Cに示す通り、第9肋骨の皮質厚は、週1回、0.3 mg/kg および2週に1回、1 mg/kg のNOTUM中和抗体2.78 aを24週間投与したマウスにおいて、それぞれ、7% ( $P = 0.02$ ) および9% ( $P = 0.003$ ) 増加した。

#### 【0199】

### 6.10. 卵巣切除マウスへのNOTUM中和抗体の投与

#### 6.10.1. 卵巣切除

週齢16週のアルビノC57BL/6J雌性マウスに、卵巣切除または所与の偽手術を行った。骨形成のマーカーであるPINPの血清レベル、および骨吸収のマーカーであるCTXを、卵巣切除後およびNOTUM中和抗体投与前の期間に、市販のELISAアッセイ(イムノダイアグノスティックシステム社(Immunodiagnostic Systems)、アリゾナ州、スコッツデール)を使用して測定し、骨リモデリングの増加が、卵巣切除後に起きていることを確認した。

#### 【0200】

表4に示す通り、手術後および治療開始前に、卵巣切除マウスは、偽手術マウスと比較して、骨リモデリングの増加を示した。海綿骨は、皮質骨よりも多くの骨細胞を含有するため、これらのデータは、主に海綿骨リモデリングの増加を反映している可能性がある。

#### 【0201】

#### 【表4】

表4：手術後の骨マーカーレベル

| マーカー         | 手術後<br>週数 | 偽手術<br>(N=10) | OVX手術<br>(N=10) | 統計                             |
|--------------|-----------|---------------|-----------------|--------------------------------|
| PIN (ng/ml)  | 1         | 36.4 ± 0.9    | 50.6 ± 5.3      | $\Delta = 39\%$<br>$P = 0.02$  |
| CTX (ng/ml)  | 2         | 10.5 ± 0.9    | 14.1 ± 0.9      | $\Delta = 33\%$<br>$P = 0.01$  |
| PINP (ng/ml) | 4         | 41.2 ± 2.3    | 54.8 ± 2.5      | $\Delta = 33\%$<br>$P = 0.001$ |

#### 【0202】

### 6.10.2. 卵巣切除マウスへのNOTUM中和抗体2.78 bの投与

NOTUM中和抗体2.78 bまたは対照抗体を、手術後8週から、10 mg/kgで週1回、4週間、腹腔内注射により投与した。実験には、表5に示す治療群も含まれた。

#### 【0203】

## 【表 5】

表 5：卵巣切除（OVX）実験における治療群

| マウスの数 | 手術    | 抗体    |
|-------|-------|-------|
| 13    | 偽手術   | 対照    |
| 13*   | 偽手術   | NOTUM |
| 10    | OVX手術 | 対照    |
| 11    | OVX手術 | NOTUM |

\*この群のマウスは最初14匹であったが、1匹が実験中に死亡した。

10

## 【0204】

新たな骨形成の場所および程度を評価するため、蛍光色素骨標識を、治療第7日目、14日目、および21日目（すなわち、第2、第3、および第4治療とともに）に投与した。緑色に蛍光を発するカルセインを第7日目に投与し；赤色に蛍光を発するアリザリンを第14日目に投与し；および黄色に蛍光を発するテトラサイクリンを第21日目に投与した。4週間の治療終了時に、マウスを屠殺した。剖検時の子宮の重量により、卵巣切除手術が成功であったことを確認した。（データ無し）

## 【0205】

6.10.3. NOTUM中和抗体で治療した卵巣切除マウスの骨質量および骨構造  
剖検後、マイクロCTにより、骨質量および骨構造を測定した。測定には、Scanco  $\mu$ CT 40を、閾値240、積分時間200ミリ秒、およびX線管電圧55 keVで使用した。大腿骨骨幹中央部、L5椎体、および大腿骨頸部を走査した。

20

## 【0206】

図13Aに示す通り、NOTUM中和抗体2.78bを投与した偽手術マウスにおける、大腿骨骨幹中央部の皮質厚は、対照抗体を投与した偽手術マウスと比較して、 $22\mu\text{m}$ 、すなわち9%増加し、およびNOTUM中和抗体2.78bを投与した卵巣切除マウスにおいては、対照抗体を投与した卵巣切除マウスと比較して、 $26\mu\text{m}$ 、すなわち12%増加した。図13Bに示す通り、NOTUM中和抗体2.78bを投与した偽手術マウスにおける、大腿骨骨幹中央部の石灰化骨領域は、対照抗体を投与した偽手術マウスと比較して、 $0.1\text{mm}^2$ 、すなわち11%増加し、およびNOTUM中和抗体2.78bを投与した卵巣切除マウスにおいては、対照抗体を投与した卵巣切除マウスと比較して、 $0.08\text{mm}^2$ 、すなわち10%増加した。

30

## 【0207】

図14Aに示す通り、NOTUM中和抗体2.78bを投与した偽手術マウスにおける、L5椎体の、総体積に対する総骨体積（皮質骨+海綿骨）の比率は、対照抗体を投与した偽手術マウスと比較して、9%増加し、およびNOTUM中和抗体2.78bを投与した卵巣切除マウスにおいては、対照抗体を投与した卵巣切除マウスと比較して、3%増加した。図14Bに示す通り、NOTUM中和抗体2.78bを投与した偽手術マウスにおける、L5椎体の、総体積に対する皮質骨体積の比率は、対照抗体を投与した偽手術マウスと比較して、13%増加し、およびNOTUM中和抗体2.78bを投与した卵巣切除マウスにおいては、対照抗体を投与した卵巣切除マウスと比較して、9%増加した。図14Cに示す通り、L5椎体の、総体積に対する海綿骨体積の比率は、偽手術マウスまたは卵巣切除マウスのどちらにおいても、NOTUM中和抗体2.78bの投与により、有意に影響は受けなかった。

40

## 【0208】

最後に、図15に示す通り、NOTUM中和抗体2.78bを投与した偽手術マウスにおける、総体積に対する大腿骨頸部の骨体積の比率は、対照抗体を投与した偽手術マウスと比較して、4%増加し、およびNOTUM中和抗体2.78bを投与した卵巣切除マウスにおいては、対照抗体を投与した卵巣切除マウスと比較して、6%増加した。

## 【0209】

50

6.10.4. NOTUM中和抗体で治療した卵巣切除マウスにおける骨組織形態計測  
大腿骨骨幹を、急速包埋プロトコル (rapid embedding protocol) を使用してメチルメ  
タクリレート中に埋め込んだ。Brommage and Vafai, Calcified Tissue Int ' 1 67: 479  
(2000)を参照のこと。Leica SP1600骨鋸を使用して、約80 μmの厚さを有  
する骨幹中央部の横断面を準備した。次いで、Olympus BX60蛍光顕微鏡で、  
各部分を調査した。OsteoMeasure (商標)ソフトウェア (オステオメトリッ  
クス社 (OsteoMetrics)、ジョージア州、ディケーター) を使用して、種々の骨組織形態  
計測のパラメータを測定した。静的パラメータ (例えば骨領域および骨厚さ) ならびに動  
的パラメータ (例えば単一標識表面 (SLS)、骨石灰化速度 (MAR)、および骨形成  
速度 (BFR)) の両方を、拡大率100倍で測定した。

10

#### 【0210】

図16は、第7日目に投与したカルセイン、第14日目に投与したアリザリン、および  
第21日目に投与したテトラサイクリンで標識した、大腿骨骨幹中央部横断面の皮質内表  
面の割合 (%) を示す。表6は、図16のデータの統計的分析を示す。NOTUM中和抗  
体2.78bを投与したマウスは、対照抗体を投与したマウスと比較して、第7日目およ  
び第14日目に、有意により高い割合 (%) の皮質内部標識を示した。

#### 【0211】

##### 【表6】

表6：単一標識表面%の2因子ANOVA

| 2因子ANOVA | 第7日目      | 第14日目     | 第21日目    |
|----------|-----------|-----------|----------|
| 卵巣切除の効果  | P = 0.16  | P = 0.65  | P = 0.28 |
| 治療の効果    | P < 0.001 | P < 0.001 | P = 0.02 |
| 相互座用の効果  | P = 0.66  | P = 0.74  | P = 0.77 |

20

#### 【0212】

図17は、対照抗体またはNOTUM中和抗体2.78bを投与した偽手術および卵巣  
切除マウスの、骨石灰化速度 (A) および体積を参照対象とする骨形成速度 (B) を示す  
。カルセイン標識 (第7日目) およびアリザリン標識 (第14日目) 間の距離を測定し、  
7で除算して「第7日目～第14日目の速度」を得ることにより、ならびにアリザリン標  
識 (第14日目) およびテトラサイクリン標識 (第21日目) 間の距離を測定し、7で除  
算して「第14日目～第21日目の速度」を得ることにより、骨石灰化速度 (図17A)  
を測定した。表7は、17Aのデータの統計的分析を示す。NOTUM中和抗体2.78  
bを投与したマウスは、第7日目～第14日目の期間において、対照抗体を投与したマウ  
スよりも、より高い骨石灰化速度を示した。

30

#### 【0213】

##### 【表7】

表7：骨石灰化速度の2因子ANOVA

| 2因子ANOVA | 第7日目～第14日目 | 第14日目～第21日目 |
|----------|------------|-------------|
| 卵巣切除の効果  | P = 0.80   | P = 0.70    |
| 治療の効果    | P < 0.001  | P = 0.82    |
| 相互座用の効果  | P = 0.86   | P = 0.02    |

40

#### 【0214】

皮質内部石灰化表面率 (図16から得た、二重標識表面 + 単一標識表面の1/2の割合  
(%)) に、骨石灰化速度 (図17Aを参照) を乗算することを含む、標準的な計算によ

50

り、体積を参照対象とする骨形成速度（図 17B）を測定した。その結果は、骨形成速度を骨体積で除算したものであり、7日間あたりの割合（％）として表される。表 8 は、図 17B のデータの統計的分析を示す。図 17B において明白なように、中和抗体 2.78b 抗体を投与したマウスにおける骨体積あたりの骨形成速度は、対照抗体を投与したマウスよりも、有意により高かった。

【0215】

【表 8】

表 8：体積を参照対象とする骨形成速度の 2 因子 ANOVA

| 2 因子 ANOVA | 第 7 日目～第 14 日目 | 第 14 日目～第 21 日目 |
|------------|----------------|-----------------|
| 卵巣切除の効果    | $P = 0.95$     | $P = 0.80$      |
| 治療の効果      | $P < 0.001$    | $P < 0.001$     |
| 相互座用の効果    | $P = 0.39$     | $P = 0.30$      |

10

【0216】

#### 6.11. NOTUM 中和抗体の試験に好適な種の特定

公有財産から入手した多様な種のタンパク質の配列アライメントに基づき、モノクローナル抗体 1.802、1.815、および 1.846 がモルモット NOTUM に結合する  
 だろうこと、従ってこの種が前臨床的実験に好適であり得ることが予測された。この仮説  
 を試験するために、モルモット NOTUM をクローニングし、一過性導入により発現させ  
 、および OPTS アッセイにおいて活性であることが示された。モノクローナル抗体 1.  
 802、1.815、および 1.846 は、ELISA により、モルモット NOTUM に  
 結合することが判明し、ならびにモノクローナル抗体 1.802 は、OPTS アッセイに  
 おいて、モルモット NOTUM 活性を中和することが示された。モノクローナル抗体 2.  
 78 は、モノクローナル抗体 1.802 よりもより低い親和性でモルモット NOTUM と  
 結合し、および OPTS アッセイにおいて、対応するより低い阻害活性を有した。モノク  
 ローナル抗体 2.1029 は、モルモット NOTUM とごく弱くしか結合せず、OPTS  
 アッセイにおいて、モルモット NOTUM を有意には阻害しなかった。

20

30

【0217】

カニクイザルおよびアカゲザル NOTUM を、これらの種由来の cDNA 製剤からクロー  
 ニングした。配列の分析により、ヒト NOTUM D141 と同等の位置のアミノ酸が  
 、アスパラギンであることが明らかになったが、これはマウスおよびヒト NOTUM 両方  
 におけるその位置のアミノ酸とは異なっている。活性の（OPTS アッセイでの測定によ  
 る）カニクイザルおよびアカゲザル NOTUM タンパク質を、一過性導入により作製し、  
 モノクローナル抗体 1.802 がどちらのタンパク質とも結合せず、どちらをも阻害しな  
 いことが判明した。活性のヒト NOTUM 点変異体である、ヒト NOTUM D141N  
 を一過性導入により作製し、モノクローナル抗体 1.802 が、ヒト NOTUM 点変異体  
 とは結合しないことが判明した。

40

【0218】

モノクローナル抗体 2.78 は、ELISA により、カニクイザルおよびアカゲザル NOTUM と弱く結合したが、OPTS アッセイにおいて、どちらのタンパク質をも有意に阻害しなかった。対照的に、モノクローナル抗体 2.1029 は、ELISA により、ヒト NOTUM と結合するのと同様に、カニクイザルおよびアカゲザル NOTUM の両方と結合し、および OPTS アッセイにおいて、ヒト NOTUM を阻害するのと同様に、両タンパク質をも阻害した。

【0219】

#### 6.12. 抗体の配列決定およびヒト化

重鎖および軽鎖可変領域の配列を、適切なハイブリドーマ細胞株由来の全 RNA を使用

50

する特異的 R T - P C R 法により決定し、その後 P C R 生成物の配列を決定した。4つのキャンペーン1の抗体：1．731、1．802、1．815、および1．846、ならびに3つのキャンペーン2の抗体：2．1029、2．55、および2．78由来の、重鎖および軽鎖可変領域の配列を決定した。これらの抗体それぞれの、シグナル配列を除く可変領域配列を、以下の第7節（配列表）に示す。第7節はまた、これらの抗体それぞれの重鎖および軽鎖 C D R 1、C D R 2、および C D R 3 の配列をも示す。以下の表は、これらの抗体それぞれの、重鎖および軽鎖可変領域、ならびに C D R 1、C D R 2、および C D R 3 に対応する配列番号を示す。

【0220】

【表9】

10

| 表9：重鎖および軽鎖可変領域ならびにCDRの配列番号 |                             |                             |
|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| マウス抗体                      | 重鎖可変領域配列番号                  | 軽鎖可変領域配列番号                  |
|                            | (CDR 1、CDR 2、CDR 3<br>配列番号) | (CDR 1、CDR 2、CDR 3<br>配列番号) |
| 1.731                      | 7 (9、10、11)                 | 8 (12、13、14)                |
| 1.802                      | 15 (17、18、19)               | 16 (20、21、22)               |
| 1.815                      | 23 (25、26、27)               | 24 (28、29、30)               |
| 1.846                      | 31 (33、34、35)               | 32 (36、37、38)               |
| 2.1029                     | 39 (41、42、43)               | 40 (44、45、46)               |
| 2.55                       | 47 (49、50、51)               | 48 (52、53、54)               |
| 2.78                       | 55 (57、58、59)               | 56 (60、61、62)               |

20

【0221】

ある特定の重鎖および軽鎖 C D R は、2つ以上の配列決定した抗体間で、高い相同性を有することが判明した。モノクローナル抗体1．802および1．846は、同一の重鎖 C D R 1 ( G F T F S D Y G M H ; 配列番号17および33 ) を有し、一方モノクローナル抗体1．815の重鎖 C D R 1 ( G F T F S D F G M H ; 配列番号25 ) は、モノクローナル抗体1．802および1．846と、ただ一つの保存アミノ酸置換（チロシン（Y）の場所にフェニルアラニン（F））のみにより異なっている。従って、これらの抗体の重鎖 C D R 1 のコンセンサス配列は G F T F S D X<sub>1</sub> G M H （配列番号90）であり、ここで X<sub>1</sub> は F または Y である。モノクローナル抗体1．802および1．846の重鎖 C D R 3 は、ただ一つの保存アミノ酸置換（ヒスチジン（H）対アスパラギン（N））により異なっている。従って、これらの抗体の重鎖 C D R 3 のコンセンサス配列は K X<sub>2</sub> Y N G G Y F D V （配列番号91）であり、ここで X<sub>2</sub> は H または N である。モノクローナル抗体1．802および1．846は、同一の軽鎖 C D R 2 ( L A S N L E S ; 配列番号21および37 ) を有し、一方モノクローナル抗体1．815の軽鎖 C D R 2 ( L A S D L E S ; 配列番号29 ) は、モノクローナル抗体1．802および1．846と、ただ一つの保存アミノ酸置換（アスパラギン（N）の場所にアスパラギン酸（D））により異なっている。従って、これらの抗体の軽鎖 C D R 2 のコンセンサス配列は L A S X<sub>6</sub> L E S （配列番号93）であり、ここで X<sub>6</sub> は D または N である。最後に、キャンペーン1由来の3つの抗体、1．802、1．846、および1．815の軽鎖 C D R 1 のコンセンサス配列は R A S K X<sub>3</sub> V S X<sub>4</sub> S G Y S Y X<sub>5</sub> H （配列番号92）であり、ここで X<sub>3</sub> は I または S であり、X<sub>4</sub> は T または E であり、および X<sub>5</sub> は M または I である。

30

40

【0222】

公のデータベースに対して B L A S T 探査を実施し、マウス重鎖および軽鎖可変領域のそれぞれと最も高い類似性を有する、ヒト生殖系列可変領域の配列を特定した。次いで、A b M 定義を使用して、ヒト生殖系列 C D R のかわりに、マウス可変領域由来の C D R を

50

、コンピュータシミュレーション上で、これらのヒト生殖系列可変配列中に移植した。マウス抗体のうちの5つ（2．78、2．1029、1．802、1．815、および1．846）の、得られたヒト化可変領域を、インフレームのシグナルペプチドをコードする5'リーダー配列とともに合成し、重鎖可変配列の場合はヒトIgG2定常領域、軽鎖可変配列の場合は、ヒト定常領域をコードする配列の上流にクローニングした。ヒト化可変領域それぞれの配列を、完全長のヒト化重鎖および軽鎖（シグナルペプチドを除く）の配列とともに、以下の第7節（配列表）に示す。

【0223】

完全長のヒト化重鎖および軽鎖のコード配列を、哺乳類の発現ベクター中にサブクローニングし、対応する重鎖および軽鎖構築体を、CHO-S細胞中に同時導入した。得られた馴化培地を、抗ヒト二次抗体で、ウェスタンブロットにより試験し、インタクトなヒト化抗体の発現および分泌を確認した。次いで馴化培地をELISA型において試験し、ヒト化抗体が、ヒトNOTUMタンパク質と結合する能力を維持しているかどうかを測定した。ヒト化モノクローナル抗体1．802、1．815、1．846、および2．1029は、ヒトNOTUMと結合し、一方ヒト化モノクローナル抗体2．78は、ヒトまたはマウスNOTUMのどちらともわずかに結合するかまたは全く結合しなかった。

【0224】

上述で引用されたすべての参考文献は、全ての目的のために、その全体が、参照により本明細書に組み込まれる。

7. 配列表

【0225】

10

20

【表 10】

| 配列番号 | 説明                  | 配列  |
|------|---------------------|---|
| 1    | ヒトNOTUM             | MGRGVRVLLL LSLHCAGGS EGRKTWRRRG QPPPPPPRTE AAPAAGQPVE SFPLDFTAVE<br>GNMDSFMAQV KSLAQSLYPC SAQQLNEDLR LHLLNNTSVT CNDGSPAGYY LKESRGSRRW<br>LLFLEGGWYC FNRENCDSRY DTMRRLMSSR DWPRTRTGTG ILSSQPEENP YWWNANMVFI<br>PYCSDVWSG ASSKSEKNEY AFMGALIIQE VVRELLGRGL SGAKVLLLAG SSAGGTGVLL<br>NVDRVAEQLE KLGYPAIQVR GLADSGWFLD NKQYRHTDCV DTITCAPTEA IRRGIRYWNG<br>VVPERCRRQF QEGEEWNCFF GYKVYPTLRC PVFVVQWFLD EAQLTVDNVH LTGQPVQEG<br>RLYIQNLGRE LRHTLKDVPA SFAPACLSHE IIIRSHWTDV QVKGTSLPRA LHCWDRSLHD<br>SHKASKTPLK GCPVHLVDSC PWPHCNPSCP TVRDQFTGQE MNVAQFLMHM GFDMQTVAQP<br>QGLEPSELLG MLSNGS          |
| 2    | マウスNOTUM            | MGGEVRVLLL LGLLHWGGS EGRKTWRRRG QPPQPPPPP PLPQRAEVEP GAGQPVESFP<br>LDFTAVEGNM DSFMAQVKS L AQSLYPCSAQ QLNEDLRHL LLNTSVTCND GSPAGYYLKE<br>SKGSRRWLLF LEGGWYCFNR ENCDSRYSTM RRLMSSKDWP HTRTGTGILS SQPEENPHWW<br>NANMVFI PYC SSDVWSGASP KSDKNEYAFM GSLIIQEVVR ELLGKGLSGA KVLLLAGSSA<br>GGTGVLNVD RVAELLEELG YPSIQVRGLA DSGWFLDNKQ YRRSDCIDTI NCAPTDAIRR<br>GIRYWSGMVP ERCQRQFKEG EEWNCFFGYK VYPTLRCPVF VVQWLFDEAQ LTVDNVHLTG<br>QPVQEGQWLY IQNLGRELRG TLKDVQASFA PACLSHEIII RSYWTDVQVK GTSLPRALHC<br>WDRSFHDSHK ASKTPMKGCP FHLVDSCPWP HCNPSCPTIR DQFTGQEMNV AQFLMHMGFD<br>VQTVAQQQGM EPSKLLGMLS NGN |
| 3    | ヒトNOTUMS 2<br>3 2 A | MGRGVRVLLL LSLHCAGGS EGRKTWRRRG QPPPPPPRTE AAPAAGQPVE SFPLDFTAVE<br>GNMDSFMAQV KSLAQSLYPC SAQQLNEDLR LHLLNNTSVT CNDGSPAGYY LKESRGSRRW<br>LLFLEGGWYC FNRENCDSRY DTMRRLMSSR DWPRTRTGTG ILSSQPEENP YWWNANMVFI<br>PYCSDVWSG ASSKSEKNEY AFMGALIIQE VVRELLGRGL SGAKVLLLAG SAAGGTGVLL<br>NVDRVAEQLE KLGYPAIQVR GLADSGWFLD NKQYRHTDCV DTITCAPTEA IRRGIRYWNG<br>VVPERCRRQF QEGEEWNCFF GYKVYPTLRC PVFVVQWFLD EAQLTVDNVH LTGQPVQEG<br>RLYIQNLGRE LRHTLKDVPA SFAPACLSHE IIIRSHWTDV QVKGTSLPRA LHCWDRSLHD<br>SHKASKTPLK GCPVHLVDSC PWPHCNPSCP TVRDQFTGQE MNVAQFLMHM GFDMQTVAQP<br>QGLEPSELLG MLSNGS          |

10

20

30



|   |                      |  |    |
|---|----------------------|--|----|
| 4 | マウスNOTUMS<br>239A変異体 | MGGEVRVLLL LGLLHWVGGS EGRKTWRRRG QQPPQPPPPP PLPQRAEVEP GAGQPVESFP<br>LDFTAVEGNM DSFMAQVKS L AQLSLPCSAQ QLNEDLRLHL LLNTSVTCND GSPAGYYLKE<br>SKGSRRWLLF LEGGWYCFNR ENCDSRYSTM RRLMSSKDWP HTRTGTGILS SQPEENPHWW<br>NANMVFIKYC SSDVWVGASP KSKNEYAFM GSLIIQEVVR ELLGKGLSGA KVLLLAGSAA<br>GGTGVLNVD RVAELLEELG YPSIQVRGLA DSGWFLDNKQ YRRSDCIDTI NCAPTDAIRR<br>GIRYWSGMVP ERCQRQFKEG EEWNCFFGYK VYPTLRCPVF VVQWLFDEAQ LTVDNVHLTG<br>QPVQEGQWLY IQNLGRELRG TLKDVQASFA PACLSHEIII RSYWTDVQVK GTSPLRALHC<br>WDRSFHDSHK ASKTPMKGCP FHLVDSCPWP HCNPSCPTIR DQFTGQEMNV AQFLMHMGFD<br>VQTVAQQQGM EPSKLLGMLS NGN | 10 |
| 5 | モルモットNOTUM           | MGRGVRVLF LGLLHWAGG EGRKTWRRRG QPAPAPLPP QRTEAAPGTG QPVESFPLDF<br>TAVEGNMDSF MAQVKSQAQS LYPCSAQQLN EDLRLHLLN TSVTCNDGSP AGYYLKESKG<br>SRRWLLFLEG GWYCFRENC DSRDYTMRL MSKDWPQTR TGTGILSSQP EENPYWWNAN<br>MVFIKYCSSD VWSGASSKSE KNEYVFMGAL IIREVVQELL GRGLSGAKVL LLAGSSAGGT<br>GVLLNVDRA EQLEQLGYPA IQVRGLADSG WFLDNKQYRR TDCVDVTCA PTEAIRRGIR<br>YWNMGVPERC RSQFKEGEEW NCFLGYKVYP TLRCPVFVVQ WLFDEAQLTA DNAHLTGQPV<br>QEGQWLYIQN LGHELNTLK DVPASFAPAC LSHEIIIRSH WTDVQVKGT LPRALHCWDR<br>SLHDSHKASK TPLKGCPIHL VDSCPWPHCN PSCPTIRDQF TGQEMNVAQF LMHMGFDVQT<br>VAQQQGLEPS KLLGMLSSGS               | 20 |
|   | カニクイザルNOTUM          | MGRGVRVLLL LGLLHCAGGS EGRKTWRRRG QQPPPPPRTE AAPAAGQPVE SFPLDFTAVE<br>GNMDSFMAQV KSLAQSLYPC SAQQLNEDLR LHLLNTSVT CNDGSPAGYY LKESRGSRRW<br>LLFLEGGWYC FNRENCDSRY NMRRLMSSR DWPRTRTGTG ILSSQPEENP YWWNANMVFI<br>PYCSSDVWSG ASSKSEKNEY AFMGALIIQE VVRELLGRGL SGAKVLLLAG SSAGGTGVLL<br>NVDRVAEQLE ELGYPAIQVR GLADSGWFLD NKQYRHTDCV DTITCAPTEA IRRGIRYWNG<br>VVPERCRRQF QEGEEWNCFF GYKIYPTLRC PVFVVQWLF D EAQLTVDNVH LTGQPVQESQ<br>RLYIQNLGRE LRHTLKDVPA SFAPACLSHE IIIRSHWTDV QVKGTSLPRA LHCWDRSLHD<br>SHKTSKTPLK GCPVHLVDSC PWPCHNPSCP TVRDQFTGQE MNVAQFLMHM GFDVQTVAQQ<br>QGPEPSKLLG LPSDGS         | 30 |
| 6 | アカゲザルNOTUM           | MGRGVRVLLL LGLLHCAGGS EGRKTWRRRG QQPPPPPRTE AAPAAGQPVE SFPLDFTAVE<br>GNMDSFMAQV KSLAQSLYPC SAQQLNEDLR LHLLNTSVT CNDGSPAGYY LKESRGSRRW<br>LLFLEGGWYC FNRENCDSRY NMRRLMSSR DWPRTRTGTG ILSSQPEENP YWWNANMVFI<br>PYCSSDVWSG ASSKSEKNEY AFMGALIIQE VVRELLGRGL SGAKVLLLAG SSAGGTGVLL<br>NVDRVAEQLE ELGYPAIQVR GLADSGWFLD NKQYRHTDCV DTITCAPTEA IRRGIRYWNG<br>VVPERCRRQF QEGEEWNCFF GYKIYPTLRC PVFVVQWLF D EAQLTVDNVH LTGQPVQESQ<br>RLYIQNLGRE LRHTLKDVPA SFAPACLSHE IIIRSHWTDV QVKGTSLPRA LHCWDRSLHD<br>SHKNSKTPLK GCPVHLVDSC PWPCHNPSCP TVRDQFTGQE MNVAQFLMHM GFDVQTVAQQ<br>QGPEPSKLLG LPSDGS         | 40 |

|    |                           |  |
|----|---------------------------|--|
| 7  | MA b 1. 7 3 1 重<br>鎖可変領域  | EVQLQQSGPE LVKPGASVKV SCKASGYPFT DYFIHWVKQT HGKSLEWIGY FFPKNGANGY<br>NQKFEGKVTI TVDKSSSTAY MELRSLTSED SAVVYCARRY GNYYSMDYWG QGTSVTVSSA<br>KTPP |
| 8  | MA b 1. 7 3 1 軽<br>鎖可変領域  | SFVMTQTPKF LLVSAGDRVT ITCKASQSVG DDVAWYQQKP GQSPTLLIYR VSNRYTGVPD<br>RFTGSGYGTD FTFITNTVQA EDLAVYFCQQ DYSSPYTFGG GTQLEVKRAD AAP                |
| 9  | MA b 1. 7 3 1 重<br>鎖CDR 1 | GYPFTDYFIH   |
| 10 | MA b 1. 7 3 1 重<br>鎖CDR 2 | YFFPKNGANG   |
| 11 | MA b 1. 7 3 1 重<br>鎖CDR 3 | RYGNYYSMDY   |
| 12 | MA b 1. 7 3 1 軽<br>鎖CDR 1 | KASQSVGDDVA  |
| 13 | MA b 1. 7 3 1 軽<br>鎖CDR 2 | RVSNRYT  |
| 14 | MA b 1. 7 3 1 軽<br>鎖CDR 3 | QQDYSSPYT  |
| 15 | MA b 1. 8 0 2 重<br>鎖可変領域  | EVQLVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFTFS DYGHWFRQA PEKGLEWVAY ISSGSRTVYY<br>ADTVKGRFTI SRDIAKNTLS LQMTSLRSED TAMYICARKH YNGGYFDVWG TGTITVTVSSA<br>KTPP |
| 16 | MA b 1. 8 0 2 軽<br>鎖可変領域  | DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASKIVS TSGYSYMHY QQKPGQPPKL LIYLASNLES<br>GVPARFSGSG SGTDFTLNIIH PVEEEDAATY YCQHSRELPP TFGSGTKLEI KRADAAP            |
| 17 | MA b 1. 8 0 2 重<br>鎖CDR 1 | GFTFSDYGMH   |
| 18 | MA b 1. 8 0 2 重<br>鎖CDR 2 | YISSGSRTVY   |
| 19 | MA b 1. 8 0 2 重<br>鎖CDR 3 | KHYNGGYFDV   |
| 20 | MA b 1. 8 0 2 軽<br>鎖CDR 1 | RASKIVSTSGYSYMH  |
| 21 | MA b 1. 8 0 2 軽<br>鎖CDR 2 | LASNLES  |
| 22 | MA b 1. 8 0 2 軽<br>鎖CDR 3 | QHSRELPT   |

10

20

30

40

【 0 2 2 8 】

|     |                           |   |
|-----|---------------------------|---|
| 2 3 | MA b 1. 8 1 5 重<br>鎖可変領域  | DVQLLESGGG LVQPGGSRKL SCAASGFTFS DFGMHVVRQA PEKGLEWVAY SSSGGTTVYY<br>ADTVKGRLTL SRDNSKNTLF LEMTSLRSED TAMYYCARAS YDGGYFDCWG QGTSLTVSSA<br>KTTTP |
| 2 4 | MA b 1. 8 1 5 軽<br>鎖可変領域  | DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASKSVS TSGYSYIHWY QQKPGQPPKL LIYLASDLES<br>GVPARFSGSG SGAFTLNH PVEEDAATY YCHSRELPH TFGSGTKLEI KRADAAP                 |
| 2 5 | MA b 1. 8 1 5 重<br>鎖CDR 1 | GFTFSDFGMH  |
| 2 6 | MA b 1. 8 1 5 重<br>鎖CDR 2 | YSSSGGTTVY  |
| 2 7 | MA b 1. 8 1 5 重<br>鎖CDR 3 | ASYDGGYFDC  |
| 2 8 | MA b 1. 8 1 5 軽<br>鎖CDR 1 | RASKSVSTSGYSYIH   |
| 2 9 | MA b 1. 8 1 5 軽<br>鎖CDR 2 | LASDLES   |
| 3 0 | MA b 1. 8 1 5 軽<br>鎖CDR 3 | HHSRELPH  |
| 3 1 | MA b 1. 8 4 6 重<br>鎖可変領域  | EVQLVESGGD LVKPGGSLKL SCAASGFTFS DYGMHWRQA PEKGLEWVAY ISSGSTTLSY<br>ANTMKGRFTI SRDNAKTLT LQMTSLRSED TAIYVCARKN YNGGYFDVWG TGTITVSSA<br>KTTTP    |
| 3 2 | MA b 1. 8 4 6 軽<br>鎖可変領域  | DIVLTQSPAS LVVSLGQRAT ISCRASKSVS ESGYSYIHWY QQKPGQPPKL LIYLASNLES<br>GVPARFSGSG SGTDFTLNH PVEEGDATTY YCHSRVLPPT TFGSGTKLEI KRADAAP              |
| 3 3 | MA b 1. 8 4 6 重<br>鎖CDR 1 | GFTFSDYGMH  |
| 3 4 | MA b 1. 8 4 6 重<br>鎖CDR 2 | YISSGSTTLS  |
| 3 5 | MA b 1. 8 4 6 重<br>鎖CDR 3 | KNYNGGYFDV  |
| 3 6 | MA b 1. 8 4 6 軽<br>鎖CDR 1 | RASKSVSESGYSYMH   |
| 3 7 | MA b 1. 8 4 6 軽<br>鎖CDR 2 | LASNLES   |
| 3 8 | MA b 1. 8 4 6 軽<br>鎖CDR 3 | QHSRVLPPT   |
| 3 9 | MA b 2. 1 0 2 9<br>重鎖可変領域 | QVQLKESGPG LVAPSQSLSI TCTVSGFSLT SYGVHWRQP PGKLEWLGW IWAGGSTNYN<br>SALMSRLSIS KDNSKQVFL KMNSLQDDT AIYFCARDGD YGTIYAMDYV GQGTSTVSS<br>AKTTAPS    |

10

20

30

40

【 0 2 2 9 】

|     |                            |   |
|-----|----------------------------|---|
| 4 0 | MA b 2. 1 0 2 9<br>輕鎖可變領域  | DIQMTQTSS LSASLGDRVT ISCRASQDIS NYLNWYQQKP DGTVKLLIYY TSRLHSGVPS<br>RFTGSGSGTD YSLTISNLEQ EDIATYFCQQ GKTLPRTFGG GTMLEIKRAD AAP                    |
| 4 1 | MA b 2. 1 0 2 9<br>重鎖CDR 1 | GFSLTSYGVH  |
| 4 2 | MA b 2. 1 0 2 9<br>重鎖CDR 2 | VIWAGGSTN   |
| 4 3 | MA b 2. 1 0 2 9<br>重鎖CDR 3 | DGDYGTIYAMDY  |
| 4 4 | MA b 2. 1 0 2 9<br>輕鎖CDR 1 | RASQDISNYLN   |
| 4 5 | MA b 2. 1 0 2 9<br>輕鎖CDR 2 | YTSRLHS   |
| 4 6 | MA b 2. 1 0 2 9<br>輕鎖CDR 3 | QQGKTLPRT   |
| 4 7 | MA b 2. 5 5 重鎖<br>可變領域     | EVQLQQSGTV LARPGALVKM SCKASGYTFT SYWMHWVKQR PGQGLEWIGA IYPGKSDTRY<br>NPKFKDKAKL TAVTSTSTAY MDLSSLTDED SAVYYCSRRY GNIFYAMDYWG QGTSVTVSSA<br>KTTAPS |
| 4 8 | MA b 2. 5 5 輕鎖<br>可變領域     | SIVMTQTPKF LLVSAGDRVT MTCKASQSVS NDVAWYQQKP GQSPPELLIYY ASDRYTGVPD<br>RFTGSGYGT DFTLTISTVQA EDLAVYFCQQ DYSSPYTFGG GTKLEIKRAD AAP                  |
| 4 9 | MA b 2. 5 5 重鎖<br>CDR 1    | GYTFTSYWMH  |
| 5 0 | MA b 2. 5 5 重鎖<br>CDR 2    | AIYPGKSDTR  |
| 5 1 | MA b 2. 5 5 重鎖<br>CDR 3    | RYGNFYAMDY  |
| 5 2 | MA b 2. 5 5 輕鎖<br>CDR 1    | KASQSVSNDVA   |
| 5 3 | MA b 2. 5 5 輕鎖<br>CDR 2    | YASDRYT   |
| 5 4 | MA b 2. 5 5 輕鎖<br>CDR 3    | QQDYSSPYT   |
| 5 5 | MA b 2. 7 8 重鎖<br>可變領域     | DVQLVESGGG LVQPGGSRKL SCAASGFTFS SFGMHWRQA PEKGLEWVAY ITSGSGAIYY<br>ADTVRGRFTI SRDTPKNTLF LQMTSLRSED TAMYCARSA DGLDYWGQGT SVTVSSAKTT PPS          |
| 5 6 | MA b 2. 7 8 輕鎖<br>可變領域     | DIQMTQSPAS LYVSVGETVT ITCRASENIY SNLAWYQQKQ GKSPQLLVYG ATNLADGVPS<br>RFTGSGSGTQ YSLKINSLSK EDEGYSYQCQ FWGTPFTFGS GTKLEIKRAD AAP                   |
| 5 7 | MA b 2. 7 8 重鎖<br>CDR 1    | GFTFSSFGMH  |

10

20

30

40

【 0 2 3 0 】

|     |   |  |    |
|-----|---|--|----|
| 5 8 | MA b 2. 7 8 重鎖<br>CDR 2                 | YITSGSGAIY   |    |
| 5 9 | MA b 2. 7 8 重鎖<br>CDR 3                 | SADGLDY  |    |
| 6 0 | MA b 2. 7 8 軽鎖<br>CDR 1                 | RASENIYSNLA  |    |
| 6 1 | MA b 2. 7 8 軽鎖<br>CDR 2                 | GATNLAD  |    |
| 6 2 | MA b 2. 7 8 軽鎖<br>CDR 3                 | QHFWGTPFT  | 10 |
| 6 3 | ヒト化A b (H u m<br>A b) 2. 7 8 重鎖<br>可変領域 | EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SFGMHWRQA PGKLEWVSY ITSGSGAIYY<br>ADSVKGRFTI SRDIAKNSLY LQMNSLRAD TAVYYCARSA DGLDYWGQGT TVTVSS  |    |
| 6 4 | ヒト抗体2. 7 8 重鎖                           | EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SFGMHWRQA PGKLEWVSY ITSGSGAIYY<br>ADSVKGRFTI SRDIAKNSLY LQMNSLRAD TAVYYCARSA DGLDYWGQGT TVTVSSDVGW<br>QGTTVTVSSA STKGPSVFLP APCSRSTSES TAALGCLVKD YFPEPVTVSW NSGALTSGVH<br>TFPAVLQSSG LYSLSVVTV TSSNFGTQTY TCNVDPKPSN TKVDKVERK CCVECPCPA<br>PPVAGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VQFNWYVDGM EVHNAKTKPR<br>EEQFNSTFRV VSVLTIVHQD WLNGKEYKCK VSNKGLPAPI EKTISKTKGQ PREPQVYITLP<br>PSREEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPMMLDSG SFFLYSKLTV<br>DKSRWQQGNV FSCSVMEAL HNHYTQKSLK LSPGK         | 20 |
| 6 5 | ヒト抗体2. 7 8 軽鎖<br>可変領域                   | DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASENIY SNLAWYQQKPK GKAPKLLIYG ATNLADGVPS<br>RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQH FWGTPFTFGQ GTKVEI   |    |
| 6 6 | ヒト抗体2. 7 8 軽鎖                           | DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASENIY SNLAWYQQKPK GKAPKLLIYG ATNLADGVPS<br>RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQH FWGTPFTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP<br>SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWVK DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT<br>LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK   | 30 |
| 6 7 | ヒト抗体2. 1 0 2<br>9 重鎖可変領域                | QVQLQESGPG LVKPSSETLSL TCTVSGFSLT SYGVHWIRQP PGKLEWIGV IWAGGSTNIN<br>PSLKSRTVIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARDGD YGTIYAMDYV GQGTLLTVSS   |    |
| 6 8 | ヒト抗体2. 1 0 2<br>9 重鎖                    | QVQLQESGPG LVKPSSETLSL TCTVSGFSLT SYGVHWIRQP PGKLEWIGV IWAGGSTNIN<br>PSLKSRTVIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARDGD YGTIYAMDYV GQGTLLTVSS<br>DVWGQGTTVT VSSASTKGPS VFPLAPCSRS TSESTAALGC LKDYFPEPV TVSWNSGALT<br>SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVTSSNFG TQYTCNVDPH KPSNTKVDKT VERKCCVECP<br>PCPAPPVAGP SVFLFPPKPK DTLNISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVQFNWY VDGMEVHNAK<br>TKPREEQFNS TFRVSVLTIV VHQDWLNGKE YKCKVSNKGL PAPIEKTISK TKGQPREPQV<br>YTLPPSREEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPML DSDGSFFLYS<br>KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMEALHNHYTQ KSLSLSPGK | 40 |

|    |                      |  |
|----|----------------------|--|
| 69 | ヒト抗体2.102<br>9軽鎖可変領域 | DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKPKAPKLLIYY TSRLHSGVPS<br>RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCQQ GKTLPRTFGG GTKVEI  |
| 70 | ヒト抗体2.102<br>9軽鎖     | DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKPKAPKLLIYY TSRLHSGVPS<br>RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCQQ GKTLPRTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP<br>SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT<br>LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK  |
| 71 | ヒト抗体1.802<br>重鎖可変領域  | EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DYGMHWVRQA PGKGLEWVS YISSGSRTVYY<br>ADSVKGRFTI SRDANKSLY LQMNSLRDED TAVYYCARKH YNGGYFDVWG QGTLTVTVSS  |
| 72 | ヒト抗体1.802<br>重鎖      | EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DYGMHWVRQA PGKGLEWVS YISSGSRTVYY<br>ADSVKGRFTI SRDANKSLY LQMNSLRDED TAVYYCARKH YNGGYFDVWG QGTLTVTVSSD<br>VWGQGTITVTV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SSTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS<br>GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTVTSSNFGT QTYTCNV DHK PSNTKVDKTV ERKCCVECP<br>CPAPPVAGPS VFLPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGMEVHNAKT<br>KPREEQFNST FRVSVLTVV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISK TKGQPREPQVY<br>TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPMLD SDGSFFLYSK<br>LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK |
| 73 | ヒト抗体1.802<br>軽鎖可変領域  | DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCRASKIVS TSGYSYMHY QQKPGQPPKL LIYLASNLES<br>GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQHSRELPP TFGQGTKLEI   |
| 74 | ヒト抗体1.802<br>軽鎖      | DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCRASKIVS TSGYSYMHY QQKPGQPPKL LIYLASNLES<br>GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQHSRELPP TFGQGTKLEI KRTVAAPSVF<br>IFPPSDEQLK SGTASVCLL NNFYPREKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSL<br>STLTLSKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC   |
| 75 | ヒト抗体1.815<br>重鎖可変領域  | QVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS DFGMHWIRQA PGKGLEWVS YSSSGGTTVYY<br>ADSVKGRFTI SRDANKSLY LQMNSLRAED TAVYYCARAS YDGGYFDCWG QGTTTVTVSS  |
| 76 | ヒト抗体1.815<br>重鎖      | QVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS DFGMHWIRQA PGKGLEWVS YSSSGGTTVYY<br>ADSVKGRFTI SRDANKSLY LQMNSLRAED TAVYYCARAS YDGGYFDCWG QGTTTVTVSSD<br>VWGQGTITVTV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SSTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS<br>GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTVTSSNFGT QTYTCNV DHK PSNTKVDKTV ERKCCVECP<br>CPAPPVAGPS VFLPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGMEVHNAKT<br>KPREEQFNST FRVSVLTVV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISK TKGQPREPQVY<br>TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPMLD SDGSFFLYSK<br>LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK |
| 77 | ヒト抗体1.815<br>軽鎖可変領域  | DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCRASKIVS TSGYSYIH Y QQKPGQPPKL LIYLASDLES<br>GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCHSRELPP TFGQGTKLEI   |

10

20

30

40

|     |                                 |   |
|-----|---------------------------------|---|
| 7 8 | ヒト抗体 1. 8 1 5<br>軽鎖             | DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCRASKSVS TSGYSYIHWY QQKPGQPPKL LIYLASDLES<br>GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCHHSRELPF TFGQGTKLEI KRTVAAPSVF<br>IFPPSDEQLK SGTASVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS<br>STLTLSKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC   |
| 7 9 | ヒト抗体 1. 8 4 6<br>重鎖可変領域         | EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DYGMHWVRQA PGKGLEWVSQ ISSGSTTLSY<br>ADSVKGRFTI SRDIAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARKN YNGGYFDVWG QGTLVTVSS   |
| 8 0 | ヒト抗体 1. 8 4 6<br>重鎖             | EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DYGMHWVRQA PGKGLEWVSQ ISSGSTTLSY<br>ADSVKGRFTI SRDIAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARKN YNGGYFDVWG QGTLVTVSSD<br>VWGQGTITVTV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS<br>GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTVTSSNFGT QTYTCNVDPK PSNTKVDKTV ERKCCVECPP<br>CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGMEVHNAKT<br>KPREEQFNST FRVVSIVLTIV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISKT KGQPREPQVY<br>TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPMLD SDGSFFFLYSK<br>LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK |
| 8 1 | ヒト抗体 1. 8 4 6<br>軽鎖可変領域         | DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCRASKSVS ESGYSYMHY QQKPGQPPKL LIYLASNLES<br>GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQHSRVLP TFGQGTKLEI   |
| 8 2 | ヒト抗体 1. 8 4 6<br>軽鎖             | DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCRASKSVS ESGYSYMHY QQKPGQPPKL LIYLASNLES<br>GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQHSRVLP TFGQGTKLEI KRTVAAPSVF<br>IFPPSDEQLK SGTASVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS<br>STLTLSKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC   |
| 9 0 | キャンペーン 1 重鎖<br>CDR 1 コンセンサ<br>ス | GFTFSDX <sub>1</sub> GMH  |
| 9 1 | キャンペーン 1 重鎖<br>CDR 3 コンセンサ<br>ス | KX <sub>2</sub> YNGGYFDV  |
| 9 2 | キャンペーン 1 軽鎖<br>CDR 1 コンセンサ<br>ス | RASKX <sub>3</sub> VSX <sub>4</sub> SGYSYX <sub>6</sub> H   |
| 9 3 | キャンペーン 1 軽鎖<br>CDR 2 コンセンサ<br>ス | LASX <sub>6</sub> LES   |

10

20

30

【 0 2 3 3 】

|     |                        |   |    |
|-----|------------------------|---|----|
| 8 3 | ヒトーマウスメラ<br>NOTUM      | MGRGVRVLLL LSLHCAGGS EGRKTWRRRG QPPPPPPRTE AAPAQGPVE SFPLDFTAVE<br>GNMDSFMAQV KSLAQSLYPC SAQQLNEDLR LHLLNTSVT CNDGSPAGYY LKESRGSRRW<br>LLFLEGGWYC FNRENCDSRY DTMRLMSSR DWPRTTRGTG ILSSQPEENP YWWNANMVFI<br>PYCSSDVWSG ASSKSEKNEY AFMGALIIQE VVRELLGRGL SGAKVLLLAG SSAGGTGVLL<br>NVDRVAEQLE KLGYPAIQVR GLADSGWFLD NKQYRRSDCI DTINCAPTDA IRRGIRYWSG<br>MVPERCQRQF KEGEENWCCF GYKVYPTLRC PVFVVQWFLD EAQLTVDNVH LTGQPVQEGQ<br>WLYIQNLGRE LRGTLDKQVA SFAPACLSHE IIIRSYWTDV QVKGTSLPRA LHCWDRSFHD<br>SHKASKTPMK GCPFHLVDSC PWPHCNPSCP TIRDQFTGQE MNVAQFLMHM GFDVQTVAQQ<br>QGMEPSKLLG MLSNGN             | 10 |
| 8 4 | マウスーヒトメラ<br>NOTUM      | MGGEVRVLLL LGLLHWVGGS EGRKTWRRRG QPPQPPPPP PLPQRAEVPEP GAGQPVESFP<br>LDFTAVEGNM DSFMAQVKS L AQSLYPCSAQ QLNEDLRHL LLNTSVTCND GSPAGYYLKE<br>SKGSRRWLLF LEGGWYCFNR ENCDSRYSTM RRLMSSKDWP HTRTGTGILS SQPEENPHWW<br>NANMVFIPIYC SSDVWSGASP KSDKNEYAFM GSLIIQEVVR ELLGKGLSGA KVLLLAGSSA<br>GGTGVLNVD RVAELLEELG YPSIQVRGLA DSGWFLDNKQ YRHTDCVDTI TCAPTEAIRR<br>GIRYWNGVVP ERCRRQFQEG EEWNCFFGYK VYPTLRCPVF VVQWLFDEAQ LTVDNVHLTG<br>QPVQEGRLRY IQNLGRELRL TLKDVPAFSA PACLSHEIII RSHWTDVQVK GTSLPRLAHC<br>WDRSLHDSHK ASKTPLKGCP VHLVDSCPWP HCNPSCTVTR DQFTGQEMNV AQFLMHMGFD<br>MQTVAQPQGL EPSELLGMLS NGS | 20 |
| 8 5 | ヒトーマウスーヒト<br>メラNOTUM   | MGRGVRVLLL LSLHCAGGS EGRKTWRRRG QPPPPPPRTE AAPAQGPVE SFPLDFTAVE<br>GNMDSFMAQV KSLAQSLYPC SAQQLNEDLR LHLLNTSVT CNDGSPAGYY LKESRGSRRW<br>LLFLEGGWYC FNRENCDSRY DTMRLMSSR DWPRTTRGTG ILSSQPEENP YWWNANMVFI<br>PYCSSDVWSG ASPKSDKNEY AFMGSLIIQE VVRELLGKGL SGAKVLLLAG SSAGGTGVLL<br>NVDRVAELLE ELGYPSIQVR GLADSGWFLD NKQYRRSDCI DTINCAPTDA IRRGIRYWSG<br>MVPERCQRQF KEGEENWCCF GYKVYPTLRC PVFVVQWFLD EAQLTVDNVH LTGQPVQEG<br>RLYIQNLGRE LRHTLDKQVA SFAPACLSHE IIIRSHWTDV QVKGTSLPRA LHCWDRSLHD<br>SHKASKTPLK GCPVHLVDSC PWPHCNPSCP TVRDQFTGQE MNVAQFLMHM GFDMQTVAQP<br>QGLEPSELLG MLSNGS              | 30 |
| 8 6 | マウスーヒトーマウ<br>スキメラNOTUM | MGGEVRVLLL LGLLHWVGGS EGRKTWRRRG QPPQPPPPP PLPQRAEVPEP GAGQPVESFP<br>LDFTAVEGNM DSFMAQVKS L AQSLYPCSAQ QLNEDLRHL LLNTSVTCND GSPAGYYLKE<br>SKGSRRWLLF LEGGWYCFNR ENCDSRYSTM RRLMSSKDWP HTRTGTGILS SQPEENPHWW<br>NANMVFIPIYC SSDVWSGASS KSEKNEYAFM GALIIQEVVR ELLGRGLSGA KVLLLAGSSA<br>GGTGVLNVD RVAEQLEKLG YPAIQVRGLA DSGWFLDNKQ YRHTDCVDTI TCAPTEAIRR<br>GIRYWNGVVP ERCRRQFQEG EEWNCFFGYK VYPTLRCPVF VVQWLFDEAQ LTVDNVHLTG<br>QPVQEGQWLY IQNLGRELRL TLKDVQASFA PACLSHEIII RSYWTDVQVK GTSLPRLAHC<br>WDRSFHDSHK ASKTPMKGCP FHLVDSCPWP HCNPSCTIR DQFTGQEMNV AQFLMHMGFD<br>VQTVAQQQGM EPSKLLGMLS NGN  | 40 |



|     |   |  |
|-----|---|--|
| 8 7 | ヒトNOTUM (Δ<br>1-46) ; CD3<br>3シグナルペプチド<br>i n i t a l i c s | MPLLLLLPLL WAGALAQPVE SFPLDFTAVE GNMDSFMAQV KSLAQSLYPC SAQQLNEDLR<br>LHLLNNTSVT CNDGSPAGYY LKESRGSRRW LLFLEGGWYC FNRENCDSRY DTMRRLMSSR<br>DWPRTRTGTG ILSSQPEENP YWWNANMVFI PYCSDVWSG ASSKSEKNEY AFMGALIIQE<br>VVRELLGRGL SGAKVLLLAG SSAGGTGVLL NVDRVAEQLE KLGYPAIQVR GLADSGWFLD<br>NKQYRHTDCV DTITCAPTEA IRRGIRYWNG VVPERCRRQF QEGEEWNCFF GYKVYPTLRC<br>PVFVVQWFLD EAQLTVDNVH LTGQPVQEGE RLYIQNLGRE LRHTLKDVP A SFAPACLSHE<br>IIIRSHWTDV QVKGTSPLRA LHCWDRSLHD SHKASKTPLK GCPVHLVDSC PWPHCNPSCP<br>TVRDQFTGQE MNVAQFLMHM GFDMQTVAQP QGLEPSELLG MLSNGS                                    |
| 8 8 | ヒトNOTUMN9<br>6 D  | MGRGVRVLLL LSLHCAGGS EGRKTWRRRG QPPPPPPRTE AAPAAGQPVE SFPLDFTAVE<br>GNMDSFMAQV KSLAQSLYPC SAQQLNEDLR LHLLNNTSVT CNDGSPAGYY LKESRGSRRW<br>LLFLEGGWYC FNRENCDSRY DTMRRLMSSR DWPRTRTGTG ILSSQPEENP YWWNANMVFI<br>PYCSDVWSG ASSKSEKNEY AFMGALIIQE VVRELLGRGL SGAKVLLLAG SSAGGTGVLL<br>NVDRVAEQLE KLGYPAIQVR GLADSGWFLD NKQYRHTDCV DTITCAPTEA IRRGIRYWNG<br>VVPERCRRQF QEGEEWNCFF GYKVYPTLRC PVFVVQWFLD EAQLTVDNVH LTGQPVQEGE<br>RLYIQNLGRE LRHTLKDVP A SFAPACLSHE IIIRSHWTDV QVKGTSPLRA LHCWDRSLHD<br>SHKASKTPLK GCPVHLVDSC PWPHCNPSCP TVRDQFTGQE MNVAQFLMHM GFDMQTVAQP<br>QGLEPSELLG MLSNGS |
| 8 9 | ヒトNOTUMQ4<br>7-M177   | QPVE SFPLDFTAVE GNMDSFMAQV KSLAQSLYPC SAQQLNEDLR LHLLNNTSVT<br>CNDGSPAGYY LKESRGSRRW LLFLEGGWYC FNRENCDSRY DTMRRLMSSR DWPRTRTGTG<br>ILSSQPEENP YWWNANM   |
| 9 4 | ヒトNOTUMD1<br>41S  | MGRGVRVLLL LSLHCAGGS EGRKTWRRRG QPPPPPPRTE AAPAAGQPVE SFPLDFTAVE<br>GNMDSFMAQV KSLAQSLYPC SAQQLNEDLR LHLLNNTSVT CNDGSPAGYY LKESRGSRRW<br>LLFLEGGWYC FNRENCDSRY STMRRLMSSR DWPRTRTGTG ILSSQPEENP YWWNANMVFI<br>PYCSDVWSG ASSKSEKNEY AFMGALIIQE VVRELLGRGL SGAKVLLLAG SSAGGTGVLL<br>NVDRVAEQLE KLGYPAIQVR GLADSGWFLD NKQYRHTDCV DTITCAPTEA IRRGIRYWNG<br>VVPERCRRQF QEGEEWNCFF GYKVYPTLRC PVFVVQWFLD EAQLTVDNVH LTGQPVQEGE<br>RLYIQNLGRE LRHTLKDVP A SFAPACLSHE IIIRSHWTDV QVKGTSPLRA LHCWDRSLHD<br>SHKASKTPLK GCPVHLVDSC PWPHCNPSCP TVRDQFTGQE MNVAQFLMHM GFDMQTVAQP<br>QGLEPSELLG MLSNGS |

10

20

30

|     |                                |  |    |
|-----|--------------------------------|--|----|
| 9 5 | マウスNOTUMS<br>1 4 8 D           | MGGEVRVLLL LGLLHWVGGS EGRKTWRRRG QPPPPPPPP PLPQRAEVEP GAGQPVESFP<br>LDFTAVEGNM DSFMAQVKS AQSLYPCSAQ QLNEDLRLHL LLNTSVTCND GSPAGYYLKE<br>SKGSRRWLLF LEGGWYCFNR ENCDSRYDTM RRLMSSKDWP HTRTGTGILS SQPEENPHWW<br>NANMVFIKYC SSDVWSGASP KSKNEYAFM GSLIIQEVVR ELLGKGLSGA KVL LLAGSSA<br>GGTGVLLNVD RVAELLEELG YPSIQVRGLA DSGWFLDNKQ YRRSDCIDTI NCAPTDAIRR<br>GIRYWSGMVP ERCQRQFKEG EEWNCFFGYK VYPTLRCPVF VVQWLFEAQ LTVDNVHLTG<br>QPVQEGQWLY IQNLGRELRG TLKDVQASFA PACLSHEIII RSYWTDVQVK GTSLPRALHC<br>WDRSFHDSHK ASKTPMKGCP FHLVDSCWP HCNPSCPTIR DQFTGQEMNV AQFLMHMGFD<br>VQTVAQQQM EPSKLLGMLS NGN | 10 |
| 9 6 | ヒトNOTUMN1<br>3 2 A / R 1 3 3 A | MGRGVRVLLL LSLHCAGGS EGRKTWRRRG QPPPPPPRTE AAPAAGQPVE SFPLDFTAVE<br>GNMDSFMAQV KSLAQSLYPC SAQQLNEDLR LHLLNTSVT CNDGSPAGYY LKESRGSRRW<br>LLFLEGGWYC FAAENCDSRY DTMRLMSSR DWPRTGTGTG ILSSQPEENP YWWNANMVFI<br>PYCSDVWSG ASSKSEKNEY AFMGALIIQE VVRELLGRGL SGAKVLLLAG SSAGGTGVLL<br>NVDRVAEQLE KGYPAIQVR GLADSGWFLD NKQYRHTDCV DTITCAPTEA IRRGIRYWNG<br>VVPERCRRQF QEGEEWNCFF GYKVYPTLRC PVFVVQWFLD EAQLTVDNVH LTGQPVQEG<br>RLYIQNLGRE LRHTLKDVPA SFAPACLSHE IIIRSHWTDV QVKGTSPLRA LHCWDRSLHD<br>SHKASKTPLK GCPVHLVDSC PWPHCNPSCP TVRDQFTGQE MNVAQFLMHM GFDMQTVAP<br>QGLEPSELLG MLSNGS           | 20 |
| 9 7 | ヒトNOTUME1<br>3 4 A / N 1 3 5 A | MGRGVRVLLL LSLHCAGGS EGRKTWRRRG QPPPPPPRTE AAPAAGQPVE SFPLDFTAVE<br>GNMDSFMAQV KSLAQSLYPC SAQQLNEDLR LHLLNTSVT CNDGSPAGYY LKESRGSRRW<br>LLFLEGGWYC FNRAACDSRY DTMRLMSSR DWPRTGTGTG ILSSQPEENP YWWNANMVFI<br>PYCSDVWSG ASSKSEKNEY AFMGALIIQE VVRELLGRGL SGAKVLLLAG SSAGGTGVLL<br>NVDRVAEQLE KGYPAIQVR GLADSGWFLD NKQYRHTDCV DTITCAPTEA IRRGIRYWNG<br>VVPERCRRQF QEGEEWNCFF GYKVYPTLRC PVFVVQWFLD EAQLTVDNVH LTGQPVQEG<br>RLYIQNLGRE LRHTLKDVPA SFAPACLSHE IIIRSHWTDV QVKGTSPLRA LHCWDRSLHD<br>SHKASKTPLK GCPVHLVDSC PWPHCNPSCP TVRDQFTGQE MNVAQFLMHM GFDMQTVAP<br>QGLEPSELLG MLSNGS           | 30 |
| 9 8 | ヒトNOTUMD1<br>3 7 A / R 1 3 9 A | MGRGVRVLLL LSLHCAGGS EGRKTWRRRG QPPPPPPRTE AAPAAGQPVE SFPLDFTAVE<br>GNMDSFMAQV KSLAQSLYPC SAQQLNEDLR LHLLNTSVT CNDGSPAGYY LKESRGSRRW<br>LLFLEGGWYC FNRENCASAY DTMRLMSSR DWPRTGTGTG ILSSQPEENP YWWNANMVFI<br>PYCSDVWSG ASSKSEKNEY AFMGALIIQE VVRELLGRGL SGAKVLLLAG SSAGGTGVLL<br>NVDRVAEQLE KGYPAIQVR GLADSGWFLD NKQYRHTDCV DTITCAPTEA IRRGIRYWNG<br>VVPERCRRQF QEGEEWNCFF GYKVYPTLRC PVFVVQWFLD EAQLTVDNVH LTGQPVQEG<br>RLYIQNLGRE LRHTLKDVPA SFAPACLSHE IIIRSHWTDV QVKGTSPLRA LHCWDRSLHD<br>SHKASKTPLK GCPVHLVDSC PWPHCNPSCP TVRDQFTGQE MNVAQFLMHM GFDMQTVAP<br>QGLEPSELLG MLSNGS           | 40 |

|     |                               |  |    |
|-----|-------------------------------|--|----|
| 99  | ヒトNOTUMR1<br>44A/R145A        | MGRGVRVLLL LSLHCAGGS EGRKTWRRRG QPPPPPRTE AAPAAGQPVE SFPLDFTAVE<br>GNMDSFMAQV KSLAQSLYPC SAQQLNEDLR LHLLNLSVT CNDGSPAGYY LKESRGSRRW<br>LLFLEGGWYC FNRENCDSRY DTMAALMSSR DWPRTRTGTG ILSSQPEENP YWWNANMVFI<br>PYCSSDVWSG ASSKSEKNEY AFMGALIIQE VVRELLGRGL SGAKVLLLAG SSAGGTGVLL<br>NVDRVAEQLE KLGYPAIQVR GLADSGWFLD NKQYRHTDCV DTITCAPTEA IRRGIRYWNG<br>VVPERCRRQF QEGEEWNCFF GYKVYPTLRC PVFVVQWFLD EAQLTVDNVH LTGQPVQEG<br>RLYIQNLGRE LRHTLKDVP A SFAPACLSHE IIIRSHWTDV QVKGTSLPRA LHCWDRSLHD<br>SHKASKTPLK GCPVHLVDSC PWPCHNPSCP TVRDQFTGQE MNVAQFLMHM GFDMQTVAQP<br>QGLEPSELLG MLSNGS   | 10 |
| 100 | ヒトNOTUMR1<br>50A/D151A        | MGRGVRVLLL LSLHCAGGS EGRKTWRRRG QPPPPPRTE AAPAAGQPVE SFPLDFTAVE<br>GNMDSFMAQV KSLAQSLYPC SAQQLNEDLR LHLLNLSVT CNDGSPAGYY LKESRGSRRW<br>LLFLEGGWYC FNRENCDSRY DTMRLMSSA AWPRTRTGTG ILSSQPEENP YWWNANMVFI<br>PYCSSDVWSG ASSKSEKNEY AFMGALIIQE VVRELLGRGL SGAKVLLLAG SSAGGTGVLL<br>NVDRVAEQLE KLGYPAIQVR GLADSGWFLD NKQYRHTDCV DTITCAPTEA IRRGIRYWNG<br>VVPERCRRQF QEGEEWNCFF GYKVYPTLRC PVFVVQWFLD EAQLTVDNVH LTGQPVQEG<br>RLYIQNLGRE LRHTLKDVP A SFAPACLSHE IIIRSHWTDV QVKGTSLPRA LHCWDRSLHD<br>SHKASKTPLK GCPVHLVDSC PWPCHNPSCP TVRDQFTGQE MNVAQFLMHM GFDMQTVAQP<br>QGLEPSELLG MLSNGS    | 20 |
| 101 | 1.802重鎖可変<br>領域ポリヌクレオチ<br>ド配列 | ATGGACTCCA GGCTCAATTT AGTTTTCCTT GTCCTTATTT TAAAAGGTGT CCAGTGTGAG<br>GTGCAGCTGG TGGAGTCTGG GGGAGGCTTA GTGAAGCCTG GAGGGTCCCT GAAACTCTCC<br>TGTGCAGCCT CTGGATTCAC TTTCAGTGAC TATGGAATGC ACTGGTTTCG TCAGGCTCCA<br>GAGAAGGGGC TGGAGTGGGT TGCATATATT AGTAGTGGCA GTAGAACCGT CTAATATGCA<br>GACACAGTGA AGGGCCGATT CACCATCTCC AGAGACAATG CCAAGAACAC CCTGTCCCTG<br>CAAATGACCA GTCTGAGTGC TGAGGACACG GCCATGTATT ACTGTGCGAG GAAACATTAC<br>AACGGTGGAT ACTTCGATGT CTGGGGCACA GGGACCACGG TCACCGTCTC CTCAGCCAAA<br>ACGACACCCC CATCTGTCTA TCCACTGGCC CCTGGATCTG CTGCCCAAAC TAACTCCATG<br>GTGACCCTGG GATGC | 30 |
| 102 | 1.802軽鎖可変<br>領域ポリヌクレオチ<br>ド配列 | ATCCTCTCTT CCAGCTCTCA GAGATGGAGA CAGACACACT CCTGTTATGG GTACTGCTGC<br>TCTGGGTTC AGGTTCCT GGTGACATTG TGCTGACACA GTCTCTGCT TCCTTAGCTG<br>TATCTCTGG GCAGAGGGCC ACCATCTCAT GCAGGGCCAG CAAAATTGTC AGTACATCTG<br>GCTATAGTTA TATGCACTGG TACCAACAGA AACCAGGACA GCCGCCCAA CTCCTCATCT<br>ATCTGCATC CAACCTAGAA TCTGGGGTCC CTGCCAGGTT CAGTGCCAGT GGGTCTGGGA<br>CAGACTTCAC CCTCAACATC CATCCTGTGG AGGAGGAGGA TGCTGCAACC TATTACTGTC<br>AGCACAGTAG GGAGCTTCCT CCCACGTTCC GCTCGGGGAC AAAGTTGGAA ATAAAACGGG<br>CTGATGCTGC ACCAACTGTA TCCATCTTCC CACCATCCAG TGAGCAGTTA ACATCTGGAG GT                         | 40 |

|       |                                   |   |    |
|-------|-----------------------------------|---|----|
| 1 0 3 | 1. 8 1 5 重鎖可変<br>領域ポリヌクレオチ<br>ド配列 | TCTGACAGAG GAGCCAAGCC CTGGATTCCC AGGTCCTCAC ATTCAGTGAT CAGCACTGAA<br>CACAGACCAC TCACCATGGA CTCCAGGCTC AATTTAGTTT TCCTTGTCCT TATTTTAAAA<br>GGTGTCCAGT GTGATGTGCA ACTGCTGGAA TCTGGGGGAG GCTTAGTGCA GCCTGGAGGG<br>TCCCGGAAAC TCTCCTGTGC AGCCTCTGGA TTCACTTTCA GTGACTTTGG AATGCACTGG<br>GTTTCGTACAG CTCCAGAGAA GGGGCTGGAG TGGGTCGCAT ACAGTAGTAG TGGCGGTACT<br>ACCGTCTACT ATGCAGACAC GGTGAAGGGC CGACTCACCC TCTCCAGAGA CAATTCCAAG<br>AACACCCTGT TCCTGGAAAT GACCAGTCTA AGGTCTGAGG ACACGGCCAT GTATTACTGT<br>GCAAGAGCGT CCTATGATGG AGGGTACTTT GACTGCTGGG GCCAAGGCAC CTCTCTCACA<br>GTCTCCTCAG CAAAACGAC ACCCCCATCT GTCTATCCAC TGGCCCTGG ATCTGCTGCC<br>CAAATAACT CCATGGTGAC CCTGGGATGC     | 10 |
| 1 0 4 | 1. 8 1 5 軽鎖可変<br>領域ポリヌクレオチ<br>ド配列 | ATCCTCTCTT CCAGCTCTCA GAGATGGAGA CAGACACACT CTGTTATGG GTACTGCTGC<br>TCTGGGTTC AGGTTCCACT GGTGACATTG TGCTGACACA GTCTCCTGCT TCCTTAGCTG<br>TATCTCTGGG GCAGAGGGCC ACCATCTCAT GCAGGGCCAG CAAAAGTGTC AGTACATCTG<br>GCTATAGTTA TATACACTGG TACCAACAGA AACCAGGACA GCCACCCAAA CTCCTCATCT<br>ATCTTGCAATC CGACCTAGAA TCTGGGGTCC CTGCCAGGTT CAGTGGCAGT GGATCTGGGG<br>CAGCCTTCAC CCTCAACATC CATCCTGTGG AGGAGGAGGA TGCTGCAACC TATTACTGTC<br>ACCACAGTAG GGAGCTTCCA TTCACGTTGG GCTCGGGGAC AAAGTTGGAA ATAAAACGGG<br>CTGATGCTGC ACCAACTGTA TCCATCTTCC CACCATCCAG TGAGCAGTTA ACATCTGGAG<br>GTGCCTCAGT CGTGTGC   | 20 |
| 1 0 5 | 1. 8 4 6 重鎖可変<br>領域ポリヌクレオチ<br>ド配列 | AGAGGAGCCA AACCTGGAT TCCAGGTCC TCACATTCAG TGATCAGCAC TGAACACAGA<br>CCACTACCA TGGACTCCAG GCTCAATTTA GTTTTCCTTG TCCTTATTTT AAAAGGTGTC<br>CAGTGTGAGG TGCAGCTGGT GGAGTCTGGG GGAGACTTAG TGAAGCCTGG AGGGTCCCTG<br>AAACTCTCCT GTGCAGCCTC TGGATTCACT TTCAGTGAAT ATGGAATGCA CTGGCTTCGT<br>CAGGCTCCAG AGAAGGGGCT GGAGTGGGTT GCATATATTA GTAGTGGCAG TACTACCCTC<br>TCCTATGCAA ACACAATGAA GGGCCGATTC ACCATCTCCA GAGACAATGC CAAGAAAACC<br>CTGTCCCTGC AAATGACCAG TCTGAGGTCT GAGGACACGG CCATTTATTA CTGTGCGCGG<br>AAAAATTACA ACGGTGGTTA CTTGATGTC TGGGGCACAG GGACCACGGT CACCGTCTCC<br>TCAGCCAAAA CAACACCCCTC ATCAGTCTAT CCACTGGCCC CTGGGTGTGG AGATACAAC<br>GGTTCCTCTG TGACTCTGGG ATGCCTGGTC AAGGG | 30 |

|     |                          |   |
|-----|--------------------------|---|
| 106 | 1. 846 軽鎖可変領域ポリヌクレオチド配列  | ATCCTCTCTT CCAGCTCTCA GAGATGGAGA CAGACACACT CCTGTTATGG GTACTGCTGC<br>TCTGGGTTC AGGTTCCACT GGTGACATTG TGCTGACACA GTCTCCTGCT TCCTTAGTTG<br>TATCTCTGGG GCAGAGGGCC ACCATCTCAT GCAGGGCCAG CAAAAGTGTC AGTGAATCTG<br>GCTATAGTTA TATGCACTGG TACCAACAGA AACCAGGACA GCCACCCAAA CTCCTCATCT<br>ATCTTGCATC CAACCTAGAG TCTGGGTTC CTGCCAGGTT CAGTGGCAGT GGGTCTGGGA<br>CAGACTTCAC CCTCAACATC CATCCTGTGG AGGAGGGGGA TGCTACAACC TATTACTGTC<br>AGCACAGTAG GGTCTTCTT CCCACGTTCC GCTCGGGGAC AAAGTTGGAA ATAAACGGG<br>CTGATGCTGC ACCAACTGTA TCCATCTTCC CACCATCCAG TGAGCAGTTA ACATCTGGAG<br>GTGC  |
| 107 | 2. 78 重鎖可変領域ポリヌクレオチド配列   | GACAGAGGAG CCAAGCCCTG GATTCCCAGG TCCTCACATT CAGTGATCAG CACTGAACAC<br>AGACCACTCA CCATGGACTC CAGGCTCAAT TTAGTTTTCC TTGTCTTAT TTTAAAGGT<br>GTCCAGTGTG ATGTGCAGCT GGTGGAGTCT GGGGAGGCT TAGTGACCC TGGAGGGTCC<br>CGGAAACTCT CCTGTGCAGC CTCTGGATT ACTTTCAGTA GCTTTGGCAT GCACTGGGTT<br>CGTCAGGCTC CAGAGAAGG ACTGGAGTGG GTCGCATACA TTAAGTAGTG CAGTGGTGCC<br>ATCTACTATG CAGACACAGT GAGGGGCCGA TTCACCATCT CCAGAGACAC TCCCAAGAAC<br>ACCCTGTTCC TGCAGATGAC CAGTCTAAGG TCTGAGGACA CGCCATGTA TTAAGTGCA<br>AGATCGGCTG ATGGTTTGA CTAAGGGGT CAAGGAACCT CAGTACCGT CTCCTCAGCC<br>AAAACAACAC CCCCATCAGT CTATCCACTG GCGCTGGGT GTGGAGATAC AACTG          |
| 108 | 2. 78 軽鎖可変領域ポリヌクレオチド配列   | CAGCCTCACA CTGATCACAC ACAGACATGA GTGTGGCCAC TCAGGTCCTG GGGTGTCTGC<br>TGCTGTGGCT TACAGATGCC AGATGTGACA TCCAGATGAC TCAGTCTCCA GCCTCCCTAT<br>ATGTATCTGT GGGAGAACT GTCACCATCA CATGTCGAGC AAGTGAGAAT ATTTACAGTA<br>ATTTAGCATG GTATCAGCAG AAACAGGGAA AATCTCCTCA GCTCCTGGTC TATGGTGCAA<br>CAAACCTAGC AGATGGTGTG CCATCAAGGT TCAGTGGCAG TGGATCAGGC ACACAGTATT<br>CCCTCAAGAT CAACAGCCTG AAGTCTGAAG ATTTTGGAG TTATTACTGT CAACATTTTT<br>GGGGTACTCC ATTCACGTTT GGCTCGGGGA CAAAGTTGGA AATAAACGG GCTGATGCTG<br>CACCAACTGT ATCCATCTTC CCACCATCCA GTGAGCAGTT AACATCTGGA GGTGCCTCAG<br>TCGTGTGC   |
| 109 | 2. 1029 重鎖可変領域ポリヌクレオチド配列 | ATCTCCTCAC TAGAGCCCC ATCAGAGCAT GGCTGTCCTG GTGCTGTTCC TCTGCCTGGT<br>TGCATTTCCA AGCTGTGTCC TGTCACAGGT GCAGCTGAAG GAGTCAGGAC CTGGCCTGGT<br>GGCGCCCTCA CAGAGCCTGT CCATCACTTG CACTGTCTCT GGGTTTTTAT TAACCAGCTA<br>TGGTGACAC TGGGTTCGCC AGCCTCCAGG AAAGGGTCTG GAGTGGCTGG GAGTAATATG<br>GGCTGGTGA AGCACAAATT ATAATTCGGC TCTCATGTCC AGACTGAGCA TCAGCAAAGA<br>CAACTCCAAG AGCCAAGTTT TCTTAAAAAT GAACAGTCTG CAACTGATG ACACAGCCAT<br>CTACTTCTGT GCCAGAGATG GCGACTACGG TACTATCTAC GCTATGGAAT ACTGGGGTCA<br>AGGAACCTCA GTCACCGTCT CCTCAGCCAA AACAACAGCC CCATCGGTCT ATCCACTGGC<br>CCCTGTGTGT GGAGATACAA CTGGCTCCTC GGTGACTCTA GGATGCCTGG TCAAGG |

10

20

30

40

|       |   |   |
|-------|---|---|
| 1 1 0 | 2. 1 0 2 9 軽鎖可<br>変領域ポリヌクレオ<br>チド配列                   | ATTGAAGTCA AGACTCAGCC TGGACATGAT GTCCTCTGCT CAGTTCCTTG GTCTCCTGTT<br>GCTCTGTTTT CAAGGTACCA GATGTGATAT CCAGATGACA CAGACTACAT CCTCCCTGTC<br>TGCCTCTCTG GGAGACAGAG TCACCATCAG TTGCAGGGCA AGTCAGGACA TTAGCAATTA<br>TTTAAACTGG TATCAGCAGA AACCAGATGG AACTGTAAAA CTCCTGATCT ACTACACATC<br>AAGATTACAC TCAGGAGTCC CATCAAGGTT CACTGGCAGT GGGTCTGGAA CAGATTATTC<br>TCTCACCATT AGCAACCTGG AGCAAGAAGA TATTGCCACT TACTTTTGCC AACAGGGTAA<br>AACGCTTCCT CGGACGTTCG GTGGAGGCAC CATGCTGGAA ATCAAACGGG CTGATGCTGC<br>ACCAAATGTA TCCATCTTCC CACCATCCAG TGAGCAGTTA ACATCTGGAG GTGCCTCAGT<br>CGTGTGC |
| 1 1 1 | ヒト化A b (H u m<br>A b) 2. 7 8 重鎖<br>可変領域ポリヌクレ<br>オチド配列 | gaggtgcagc tgggtggagag cggcggcggc ctggtgcagc ccggcggcag cctgagactg<br>agctgcgccg ccagcggcctt caccctcagc agcttcggca tgcactgggt gagacaggcc<br>cccggcaagg gcctggagtg ggtgagctac atcaccagcg gcagcggcgc catctactac<br>gccgacagcg tgaagggcag attcaccatc agcagagaca acgccaagaa cagcctgtac<br>ctgcagatga acagcctgag agccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagaagcgcc<br>gacggccttg actactgggg ccagggcacc accgtgaccg tgagcagc   |

【 0 2 4 0 】

|       |                             |  |
|-------|-----------------------------|--|
| 1 1 2 | ヒト抗体2. 7 8 重鎖ポリヌクレオチド配列     | ATGCGTACTC TGGCTATCCT TGCAGCTATT CTGCTTGTG CACTGCAGGC TCAAGCGGAG<br>GTGCAGCTGG TGGAGAGCGG CGGCGGCCTG GTGCAGCCCC GCGGCAGCCT GAGACTGAGC<br>TGCGCCGCCA GCGGCTTCAC CTTACAGCAGC TTCGGCATGC ACTGGGTGAG ACAGGCCCCC<br>GGCAAGGGCC TGGAGTGGGT GAGCTACATC ACCAGCGGCA GCGGCGCCAT CTA CTACGCC<br>GACAGCGTGA AGGGCAGATT CACCATCAGC AGAGACAACG CCAAGAACAG CCTGTACCTG<br>CAGATGAACA GCCTGAGAGC CGAGGACACC GCCGTGTA CTACTGCCAG AAGCGCCGAC<br>GGCCTGGACT ACTGGGGCCA GGGCACCACC GTGACCGTGA GCAGCGATGT GTGGGGCCAG<br>GGCACCACCG TGACCGTGAG CAGCGCGTCG ACCAAGGGCC CATCGGTCTT CCCCCTGGCG<br>CCCTGCTCCA GGAGCACCTC CGAGAGCACA GCGGCCCTGG GCTGCCTGGT CAAGGACTAC<br>TTCCCCGAAC CCGTGACGGT GTCGTGGAAC TCAGGCGCTC TGACCAGCGG CGTGCACACC<br>TTCCCGGCTG TCCTACAGTC CTCAGGACTC TACTCCCTCA GCAGCGTGGT GACCGTGACC<br>TCCAGCAACT TCGGCACCCA GACCTACACC TGCAACGTAG ATCACAAGCC CAGCAACACC<br>AAGGTGGACA AGACAGTTGA GCGCAAATGT TGTGTCGAGT GCCCACCCTG CCCAGCACCA<br>CCTGTGGCAG GACCGTCAGT CTTCTCTTC CCCCCAAAAC CCAAGGACAC CCTCATGATC<br>TCCCGGACCC CTGAGGTCAC GTGCGTGGTG GTGGACGTGA GCCACGAAGA CCCCAGGTC<br>CAGTTCAACT GGTACGTGGA CGCATGGAG GTGCATAATG CCAAGACAAA GCCGCGGGAG<br>GAGCAGTTCA ACAGCACGTT CCGTGTGGTC AGCGTCCTCA CCGTCGTGCA CCAGGACTGG<br>CTGAACGGCA AGGAGTACAA GTGCAAGGTC TCCAACAAAG GCCTCCACGC CCCCATCGAG<br>AAAACCATCT CAAAACCAA AGGGCAGCCC CGAGAACCAC AGGTGTACAC CCTGCCCCCA<br>TCCCGGGAGG AGATGACCAA GAACCAGGTC AGCCTGACCT GCCTGGTCAA AGGCTTCTAC<br>CCCAGCGACA TCGCCGTGGA GTGGGAGAGC AATGGGCAGC CGGAGAACAA CTACAAGACC<br>ACACCTCCCA TGCTGGACTC CGACGGCTCC TTCTTCTCT ACAGCAAGCT CACCGTGGAC<br>AAGAGCAGGT GGCAGCAGGG GAACGTCTTC TCATGCTCCG TGATGCATGA GGCTCTGCAC<br>AACCACTACA CACAGAAGAG CCTCTCCCTG TCTCCGGGTA AATGA |
| 1 1 3 | ヒト抗体2. 7 8 軽鎖可変領域ポリヌクレオチド配列 | gacatccaga tgaccagag cccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc<br>atcacctgca gagccagcga gaacatctac agcaacctgg cctggtagca gcagaagccc<br>ggcaaggccc ccaagctget gatctacggc gccaccaacc tgccgacgg cgtgcccagc<br>agattcagcg gcagcggcag cggcaccgac ttcacctga ccatcagcag cctgcagccc<br>gaggacttcg ccacctaacta ctgccagcac ttctggggca ccccttctac ctctggccag<br>ggcaccaagg tggagatc  |

10

20

30

|       |                                 |   |
|-------|---------------------------------|---|
| 1 1 4 | ヒト抗体2. 7 8 軽鎖ポリヌクレオチド配列         | ATGAAAATCC TGATTCTCGG TATCTTCCTG TTTCTCTGTT CTA CTCCAGC TTGGGCAGAC<br>ATCCAGATGA CCCAGAGCCC CAGCAGCCTG AGCGCCAGCG TGGGCAGAG AGTGACCATC<br>ACCTGCAGAG CCAGCGAGAA CATCTACAGC AACCTGGCCT GGTACCAGCA GAAGCCCGGC<br>AAGGCCCCCA AGCTGCTGAT CTACGGCGCC ACCAACCTGG CCGACGGCGT GCCCAGCAGA<br>TTCAGCGGCA GCGGCAGCG CACCGACTTC ACCCTGACCA TCAGCAGCCT GCAGCCCGAG<br>GACTTCGCCA CCTACTACTG CCAGCACTTC TGGGGCACCC CCTTCACCTT CGGCCAGGGC<br>ACCAAGGTGG AGATCAAACG TACGGTGGCT GCACCATCTG TCTTCATCTT CCCGCCATCT<br>GATGAGCAGT TGAAATCTGG AACTGCCTCT GTTGTGTGCC TGCTGAATAA CTTCTATCCC<br>AGAGAGGCCA AAGTACAGTG GAAGGTGGAT AACGCCCTCC AATCGGGTAA CTCCCAGGAG<br>AGTGTACAG AGCAGGACAG CAAGGACAGC ACCTACAGCC TCAGCAGCAC CCTGACGCTG<br>AGCAAAGCAG ACTACGAGAA ACACAAAGTC TACGCCTGCG AAGTCACCCA TCAGGCGCTG<br>AGCTCGCCCG TCACAAAGAG CTTCAACAGG GGAGAGTGTT GA |
| 1 1 5 | ヒト抗体2. 1 0 2 9 重鎖可変領域ポリヌクレオチド配列 | caggtgcage tgcaggagag cggccccggc ctggtgaagc ccagegagac cctgagcctg<br>acctgcaccg tgagcggett cagcctgacc agctacggcg tgcaactggat cagacagccc<br>cccggcaagg gcctggagtg gatcggcgtg atctgggccc ggggcagcac caactacaac<br>ccagcctga agagcagagt gaccatcagc gtggacacca gcaagaacca gttagcctg<br>aagctgagca gcgtgaccgc cgccgacacc gccgtgtact actgcgccag agacggcgac<br>tacggcacca tctacgccat ggactactgg ggccagggca ccctggtgac cgtgagcage   |

10

20

【 0 2 4 2 】



|       |  |  |
|-------|--|--|
| 1 1 6 | ヒト抗体2. 1 0 2<br>9 重鎖ポリヌクレオ<br>チド配列     | ATGCGTACTC TGGCTATCCT TGCAGCTATT CTGCTTGTG CACTGCAGGC TCAAGCGCAG<br>GTGCAGCTGC AGGAGAGCGG CCCCAGCCTG GTGAAGCCCA GCGAGACCCT GAGCCTGACC<br>TGCACCGTGA GCGGCTTCAG CCTGACCAGC TACGGCGTGC ACTGGATCAG ACAGCCCCC<br>GGCAAGGGCC TGGAGTGGAT CGGCGTGATC TGGGCCGGCG GCAGCACCAA CTACAACCCC<br>AGCCTGAAGA GCAGAGTGAC CATCAGCGTG GACACCAGCA AGAACCAGTT CAGCCTGAAG<br>CTGAGCAGCG TGACCGCCGC CGACACCGCC GTGTACTACT GCGCCAGAGA CGGCGACTAC<br>GGCACCATCT ACGCCATGGA CTACTGGGGC CAGGGCACCC TGGTGACCGT GAGCAGCGAT<br>GTGTGGGGCC AGGGCACCAC CGTGACCGTG AGCAGCGCGT CGACCAAGGG CCCATCGGTC<br>TTCCCCCTGG CGCCCTGCTC CAGGAGCACC TCCGAGAGCA CAGCGGCCCT GGGCTGCCTG<br>GTCAAGGACT ACTTCCCCGA ACCGGTGACG GTGTCGTGGA ACTCAGGCGC TCTGACCAGC<br>GGCGTGACA CCTTCCCGGC TGTCTACAG TCCTCAGGAC TCTACTCCCT CAGCAGCGTG<br>GTGACCGTGA CCTCCAGCAA CTTCGGCACC CAGACCTACA CCTGCAACGT AGATCACAAG<br>CCCAGCAACA CCAAGGTGGA CAAGACAGTT GAGCGCAAT GTTGTGTCGA GTGCCACCG<br>TGCCAGCAC CACCTGTGGC AGGACCGTCA GTCTTCTCT TCCCCCAA ACCCAAGGAC<br>ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC ACGTGCCTGG TGGTGGACGT GAGCCACGAA<br>GACCCGAGG TCCAGTTCAA CTGGTACGTG GACGGCATGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA<br>AAGCGCGGG AGGAGCAGTT CAACAGCAG TTCCGTGTGG TCAGCGTCT CACCGTCGTG<br>CACCAGGACT GGCTGAACGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAG TCTCCAACA AGGCCTCCCA<br>GCCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAAACC AAAGGGCAGC CCCGAGAACC ACAGGTGTAC<br>ACCCTGCCCC CATCCCGGGA GGAGATGACC AAGAACCAGG TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC<br>AAAGGCTTCT ACCCCAGCGA CATCGCCGTG GAGTGGGAGA GCAATGGGA GCCGGAGAAC<br>AACTACAAGA CCACACCTCC CATGCTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCT CTACAGCAAG<br>CTCACCGTGG ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT<br>GAGGCTCTGC ACAACCTA CACACAGAAG AGCCTCTCCC TGTCTCCGG TAAATGA |
| 1 1 7 | ヒト抗体2. 1 0 2<br>9 軽鎖可変領域ポリ<br>ヌクレオチド配列 | gacatccaga tgaccagag cccagcagc ctgagcgcca gcgtggcgga cagagtgacc<br>atcacctgca gagccagcca ggacatcagc aactacctga actggtacca gcagaagccc<br>ggcaaggccc ccaagctgct gatctactac accagcagac tgcacagcgg cgtgcccage<br>agattcagcg gcagcggcag cggcaccgac ttcacctca ccatcagcag cctgcagecc<br>gaggacatcg ccacctacta ctgccagcag ggcaagcccc tgcccagaac cttcgcgggc<br>ggaccaaggg tggagatc  |

10

20

30

【 0 2 4 3 】

|     |                                   |   |
|-----|-----------------------------------|---|
| 118 | ヒト抗体2.102<br>9軽鎖ポリヌクレオ<br>チド配列    | ATGAAAATCC TGATTCTCGG TATCTTCTG TTTCTCTGTT CTA CTCCAGC TTGGGCAGAC<br>ATCCAGATGA CCCAGAGCCC CAGCAGCCTG AGCGCCAGCG TGGGCAGAC AGTGACCATC<br>ACCTGCAGAG CCAGCCAGGA CATCAGCAAC TACCTGAACT GGTACCAGCA GAAGCCCGGC<br>AAGGCCCCCA AGCTGCTGAT CTA CTACACC AGCAGACTGC ACAGCGGCGT GCCCAGCAGA<br>TTCAGCGGCA GCGGCAGCG CACCGACTTC ACCTTCACCA TCAGCAGCCT GCAGCCCGAG<br>GACATCGCCA CCTACTACTG CCAGCAGGGC AAGACCCTGC CCAGAACCTT CGGCGGCGGC<br>ACCAAGGTGG AGATCAAACG TACGGTGGCT GCACCATCTG TCTTCATCTT CCCGCCATCT<br>GATGAGCAGT TGAAATCTGG AACTGCCTCT GTTGTGTGCC TGCTGAATAA CTTCTATCCC<br>AGAGAGGCCA AAGTACAGTG GAAGGTGGAT AACGCCCTCC AATCGGGTAA CTCCAGGAG<br>AGTGTCACAG AGCAGGACAG CAAGGACAGC ACCTACAGCC TCAGCAGCAC CCTGACGCTG<br>AGCAAAGCAG ACTACGAGAA ACACAAAGTC TACGCCTGCG AAGTCACCCA TCAGGGCCTG<br>AGCTCGCCCG TCACAAAGAG CTCAACAGG GGAGAGTGT GA |
| 119 | ヒト抗体1.802<br>重鎖可変領域ポリヌ<br>クレオチド配列 | gaggtgcagc tgggtggagag cggcggcggc ctggtgcagc cggcggcag cctgagactg<br>agctgcgccg ccagcggcctt caccttcagc gactacggca tgcactgggt gagacaggcc<br>cccgcaagg gcctggagtg ggtgagctac atcagcagcg gcagcagaac cgtgtactac<br>gccgacagcg tgaagggcag attcaccatc agcagagaca acgccaagaa cagcctgtac<br>ctgcagatga acagcctgag agacgaggac accgccgtgt actactgcgc cagaaagcac<br>tacaacggcg gctacttcga cgtgtggggc cagggcaccc tggtgaccgt gagcagc   |

10

20

【 0 2 4 4 】

|       |                                      |   |
|-------|--------------------------------------|---|
| 1 2 0 | ヒト抗体1. 8 0 2<br>重鎖ポリヌクレオチ<br>ド配列     | ATGCGTACTC TGGCTATCCT TGCAGCTATT CTGCTTGTG CACTGCAGGC TCAAGCGGAG<br>GTGCAGCTGG TGGAGAGCGG CGGCGGCCTG GTGCAGCCCG GCGGCAGCCT GAGACTGAGC<br>TGCGCCGCCA GCGGCTTCAC CTTACAGCGAC TACGGCATGC ACTGGGTGAG ACAGGCCCCC<br>GGCAAGGGCC TGGAGTGGGT GAGCTACATC AGCAGCGGCA GCAGAACCGT GTACTACGCC<br>GACAGCGTGA AGGGCAGATT CACCATCAGC AGAGACAACG CCAAGAACAG CCTGTACCTG<br>CAGATGAACA GCCTGAGAGA CGAGGACACC GCCGTGTACT ACTGCCCCAG AAAGCACTAC<br>AACGGCGGCT ACTTCGACGT GTGGGGCCAG GGCACCCTGG TGACCGTGAG CAGCGATGTG<br>TGGGGCCAGG GCACCACCGT GACCGTGAGC AGCGCGTCGA CCAAGGGCCC ATCGGTCTTC<br>CCCCTGGCGC CCTGCTCCAG GAGCACCTCC GAGAGCACAG CGGCCCTGGG CTGCCTGGTC<br>AAGGACTACT TCCCGAACC GGTGACGGTG TCGTGAACT CAGGCGCTCT GACCAGCGGC<br>GTGCACACCT TCCCGGTGT CCTACAGTCC TCAGGACTCT ACTCCCTCAG CAGCGTGGTG<br>ACCGTGACCT CCAGCAACTT CGGCACCCAG ACCTACACCT GCAACGTAGA TCACAAGCCC<br>AGCAACACCA AGGTGGACAA GACAGTTGAG CGAAATGTT GTGTCGAGTG CCCACCGTGC<br>CCAGCACCACT CTGTGGCAGG ACCGTGAGTC TTCCTCTCC CCCCCAACCA CAAGGACACC<br>CTCATGATCT CCCGGACCCC TGAGGTACG TCGTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC<br>CCCAGGTCC AGTTCAACTG GTACGTGGAC GGCATGGAGG TGATAATGC CAAGACAAAG<br>CCGCGGGAGG AGCAGTTCAA CAGCACGTTT CGTGTGGTCA GCGTCTCTAC CGTCGTGCAC<br>CAGGACTGGC TGAACGGCAA GGAGTACAAG TGCAAGGTCT CCAACAAAGG CCTCCAGCC<br>CCCATCGAGA AAACCATCTC CAAAACCAA GGGCAGCCCC GAGAACCACA GGTGTACACC<br>CTGCCCCCAT CCCGGGAGGA GATGACCAAG AACCAGGTCA GCCTGACCTG CCTGGTCAAA<br>GGCTTCTACC CCAGCGACAT CGCCGTGGAG TGGGAGAGCA ATGGGAGACC GGAGAACAAC<br>TACAAGACCA CACCTCCCAT GCTGGACTCC GACGGCTCCT TCTTCTCTA CAGCAAGCTC<br>ACCGTGGACA AGAGCAGGTG GCAGCAGGGG AACGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG<br>GCTCTGCACA ACCACTACAC ACAGAAGAGC CTCTCCCTGT CTCCGGGTAA ATGA |
| 1 2 1 | ヒト抗体1. 8 0 2<br>軽鎖可変領域ポリヌ<br>クレオチド配列 | gacatcgtga tgacccagag ccccgacagc ctggccgtga gcctgggcca gagagccacc<br>atcaactgca gagccagcaa gatcgtgagc accagcggt acagctacat gcaactgtac<br>cagcagaagc ccggccagcc cccaagctg ctgatctacc tggccagcaa cctggagagc<br>ggcgtgcccg acagattcag cggcagcggc agcggcaccg acttcaccct gaccatcagc<br>agcctgcagg ccgaggacgt ggccgtgtac tactgccagc acagcagaga gctgcccccc<br>accttcggcc agggcaccaa gctggagatc   |

10

20

30

【 0 2 4 5 】

|       |                                      |  |
|-------|--------------------------------------|--|
| 1 2 2 | ヒト抗体1. 8 0 2<br>軽鎖ポリヌクレオチ<br>ド配列     | ATGAAAATCC TGATTCTCGG TATCTTCCTG TTTCTCTGTT CTA CTCCAGC TTGGGCAGAC<br>ATCGTGATGA CCCAGAGCCC CGACAGCCTG GCCGTGAGCC TGGGCAGAG AGCCACCATC<br>AACTGCAGAG CCAGCAAGAT CGTGAGCACC AGCGGCTACA GCTACATGCA CTGGTACCAG<br>CAGAAGCCCG GCCAGCCCC CAAGCTGCTG ATCTACCTGG CCAGCAACCT GGAGAGCGGC<br>GTGCCCAGCA GATTTCAGCG CAGCGGCAGC GGCACCGACT TCACCCTGAC CATCAGCAGC<br>CTGCAGGCCG AGGACGTGGC CGTGACTAC TGCCAGCACA GCAGAGAGCT GGGGGCACC<br>TTCGGCCAGG GCACCAAGCT GGAGATCAAA CGTACGGTGG CTGCACCATC TGTCTTCATC<br>TTCCCGCCAT CTGATGAGCA GTTGAAATCT GGAAGTGCCT CTGTTGTGTG CCTGCTGAAT<br>AACTTCTATC CCAGAGAGGC CAAAGTACAG TGAAGGTGG ATAACGCCCT CCAATCGGGT<br>AACTCCAGG AGAGTGTAC AGAGCAGGAC AGCAAGGACA GCACCTACAG CCTCAGCAGC<br>ACCCTGACGC TGAGCAAAGC AACTACGAG AAACACAAAG TCTACGCTG CGAAGTCACC<br>CATCAGGGCC TGAGCTCGCC CGTCACAAAG AGCTTCAACA GGGGAGAGTG TTGA |
| 1 2 3 | ヒト抗体1. 8 1 5<br>重鎖可変領域ポリヌ<br>クレオチド配列 | caggtgcagc tgggtggagag cggcggcggc ctggtgaagc ccggcggcag cctgagactg<br>agctgcgccg ccagcggett cacttcagc gacttcggca tgcaactggat cagacaggcc<br>cccggcaagg gcctggagtg ggtgagctac agcagcagcg gcggcaccac cgtgtactac<br>gccgacagcg tgaaggcgag attcaccatc agcagagaca acgccaagaa cagcctgtac<br>ctgcagatga acagcctgag agccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagagccagc<br>tacgacggcg gctacttcga ctgctggggc cagggcacca ccgtgaccgt gagcagc   |

10

20

【 0 2 4 6 】

|       |                                  |  |
|-------|----------------------------------|--|
| 1 2 4 | ヒト抗体1. 8 1 5<br>重鎖ポリヌクレオチド配列     | ATGCGTACTC TGGCTATCCT TGCAGCTATT CTGCTTGTG CACTGCAGGC TCAAGCGCAG<br>GTGCAGCTGG TGGAGAGCGG CGGCGGCCTG GTGAAGCCCG GCGGCAGCCT GAGACTGAGC<br>TGCGCCGCCA GCGGCTTCAC CTTCAGCGAC TTCGGCATGC ACTGGATCAG ACAGGCCCCC<br>GGCAAGGGCC TGGAGTGGT GAGCTACAGC AGCAGCGGCG GCACCACCGT GTACTACGCC<br>GACAGCGTGA AGGGCAGATT CACCATCAGC AGAGACAACG CCAAGAACAG CCTGTACCTG<br>CAGATGAACA GCCTGAGAGC CGAGGACACC GCCGTGTACT ACTGCGCCAG AGCCAGCTAC<br>GACGGCGGCT ACTTCGACTG CTGGGGCCAG GGCACCACCG TGACCGTGAG CAGCGATGTG<br>TGGGGCCAGG GCACCACCGT GACCGTGAGC AGCGCGTCGA CCAAGGGCCC ATCGGTCTTC<br>CCCCTGGCGC CCTGCTCCAG GAGCACCTCC GAGAGCACAG CGGCCCTGGG CTGCCTGGTC<br>AAGGACTACT TCCCGAACC GGTGACGGT TCGTGGAAC TCAAGGCTCT GACCAGCGGC<br>GTGCACACCT TCCCGGTGT CCTACAGTCC TCAGGACTCT ACTCCCTCAG CAGCGTGGTG<br>ACCGTGACCT CCAGCAACTT CGGCACCCAG ACCTACACCT GCAACGTAGA TCACAAGCCC<br>AGCAACACCA AGGTGGACAA GACAGTTGAG CGCAAATGTT GTGTCGAGTG CCCACCGTGC<br>CCAGCACCACT CTGTGGCAGG ACCGTGAGTC TTCCTCTCC CCCCCAACCA CAAGGACACC<br>CTCATGATCT CCCGGACCCC TGAGGTCACG TCGTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC<br>CCCAGGTCC AGTTCAACTG GTACGTGGAC GGCATGGAGG TGATAATGC CAAGACAAAG<br>CCGCGGGAGG AGCAGTTCAA CAGCACGTTT CGTGTGGTCA GCGTCTCTAC CGTCGTGCAC<br>CAGGACTGGC TGAACGGCAA GGAGTACAAG TGCAAGTCT CCAACAAAGG CCTCCAGCC<br>CCCATCGAGA AAACCATCTC CAAAACCAAA GGGCAGCCCC GAGAACCACA GGTGTACACC<br>CTGCCCCCAT CCCGGGAGGA GATGACCAAG AACCAGGTCA GCCTGACCTG CCTGGTCAAA<br>GGCTTCTACC CCAGCGACAT CGCCGTGGAG TGGGAGAGCA ATGGGCAGCC GGAGAACAAC<br>TACAAGACCA CACCTCCCAT GCTGGACTCC GACGGCTCCT TCTTCTCTA CAGCAAGCTC<br>ACCGTGGACA AGAGCAGGTG GCAGCAGGGG AACGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG<br>GCTCTGCACA ACCACTACAC ACAGAAGAGC CTCTCCCTGT CTCCGGGTAA ATGA |
| 1 2 5 | ヒト抗体1. 8 1 5<br>軽鎖可変領域ポリヌクレオチド配列 | gacatcgtag tgaccagag ccccgacagc ctggccgtga gcctgggcca gagagccacc<br>atcaactgca gagccagcaa gagcgtgagc accagcggt acagctacat ccactggtac<br>cagcagaagc ccggccagcc ccccaagctg ctgacttacc tggccagcga cctggagagc<br>ggcgtgcccc acagattcag cggcagcggc agcggcaccg acttcaccct gaccatcagc<br>agcctgcagg ccgaggacgt ggccgtgtac tactgccacc acagcagaga gctgccttc<br>accttcggcc agggcaccaa gctggagatc   |

10

20

30

|       |                                       |  |    |
|-------|---------------------------------------|--|----|
| 1 2 6 | ヒト抗体 1. 8 1 5<br>軽鎖ポリヌクレオチ<br>ド配列     | ATGAAAATCC TGATTCTCGG TATCTTCCTG TTTCTCTGTT CTACTIONCAGC TTGGGCAGAC<br>ATCGTGATGA CCCAGAGCCC CGACAGCCTG GCCGTGAGCC TGGGCGAGAG AGCCACCATC<br>AACTGCAGAG CCAGCAAGAG CGTGAGCACC AGCGGCTACA GCTACATCCA CTGGTACCAG<br>CAGAAGCCCG GCCAGCCCC CAAGCTGCTG ATCTACCTGG CCAGCGACCT GGAGAGCGGC<br>GTGCCCAGCA GATTGAGCGG CAGCGGCAGC GGCACCGACT TCACCCTGAC CATCAGCAGC<br>CTGCAGGCCG AGGACGTGGC CGTGTACTION TGCCACCACA GCAGAGAGCT GCCCTTCACC<br>TTCGGCCAGG GCACCAAGCT GGAGATCAAA CGTACGGTGG CTGCACCATC TGTCTTCATC<br>TTCCCGCCAT CTGATGAGCA GTTAAAATCT GGAAGTGCCT CTGTTGTGTG CCGTCTGAAT<br>AACTTCTATC CCAGAGAGGC CAAAGTACAG TGAAGGTGG ATAACGCCCT CCAATCGGGT<br>AACTCCAGG AGAGTGTAC AGAGCAGGAC AGCAAGGACA GCACCTACAG CCTCAGCAGC<br>ACCCTGACGC TGAGCAAAGC AGACTACGAG AAACACAAAG TCTACGCCCTG CGAAGTCACC<br>CATCAGGGCC TGAGCTCGCC CGTCACAAAG AGCTTCAACA GGGGAGAGTG TTGA | 10 |
| 1 2 7 | ヒト抗体 1. 8 4 6<br>重鎖可変領域ポリヌ<br>クレオチド配列 | gaggtgcagc tgggtggagag cggcgccggc ctggtgcagc cggcgccag cctgagactg<br>agctgcgccg ccagcggctt caccttcagc gactacggca tgcactgggt gagacaggcc<br>cccggcaagg gcctggagtg ggtgagctac atcagcagcg gcagcaccac cctgagctac<br>gccgacagcg tgaagggcag attcaccatc agcagagaca acgccaagaa cagcctgtac<br>ctgcagatga acagcctgag agacgaggac accgccgtgt actactgcgc cagaaagaac<br>tacaacggcg gctacttcga cgtgtggggc cagggcaccc tggtagaccgt gagcagc   | 20 |

【 0 2 4 8 】

30

|     |                               |   |
|-----|-------------------------------|---|
| 130 | ヒト抗体1.846<br>軽鎖ポリヌクレオチ<br>ド配列 | ATGAAAATCC TGATTCTCGG TATCTTCCTG TTTCTCTGTT CTACTCCAGC TTGGGCAGAC |
|     |                               | ATCGTGATGA CCCAGAGCCC CGACAGCCTG GCCGTGAGCC TGGGCGAGAG AGCCACCATC |
|     |                               | AACTGCAGAG CCAGCAAGAG CGTGAGCGAG AGCGGCTACA GCTACATGCA CTGGTACCAG |
|     |                               | CAGAAGCCCG GCCAGCCCC CAAGCTGCTG ATCTACCTGG CCAGCAACCT GGAGAGCGGC  |
|     |                               | GTGCCCCGACA GATTACGGG CAGCGGCAGC GGCACCGACT TCACCCTGAC CATCAGCAGC |
|     |                               | CTGCAGGCCG AGGACGTGGC CGTGTACTAC TGCCAGCACA GCAGAGTGCT GCGCCCCACC |
|     |                               | TTCGGCCAGG GCACCAAGCT GGAGATCAAA CGTACGGTGG CTGCACCATC TGTCTTCATC |
|     |                               | TTCCCCCAT CTGATGAGCA GTTGAAATCT GGAAGTGCCT CTGTTGTGTG CCGTCTGAAT  |
|     |                               | AACTTCTATC CCAGAGAGGC CAAAGTACAG TGGAAGGTGG ATAACGCCCT CCAATCGGGT |
|     |                               | AACTCCAGG AGAGTGTAC AGAGCAGGAC AGCAAGGACA GCACCTACAG CCTCAGCAGC   |
|     |                               | ACCCTGACGC TGAGCAAAGC AGACTACGAG AAACACAAAG TCTACGCTG CGAAGTCACC  |
|     |                               | CATCAGGGCC TGAGCTCGCC CGTCACAAAG AGCTTCAACA GGGGAGAGTG TTGA       |

10

## 【配列表フリーテキスト】

## 【0250】

配列番号1: ヒトNOTUM

配列番号2: マウスNOTUM

配列番号3: ヒトNOTUM S232A

配列番号4: マウスNOTUM S239A 変異体

配列番号5: モルモットNOTUM

配列番号6: アカゲザルNOTUM

配列番号7: 合成: MA b 1.731 重鎖可変領域

配列番号8: 合成: MA b 1.731 軽鎖可変領域

配列番号9: 合成: MA b 1.731 重鎖CDR1

配列番号10: 合成: MA b 1.731 重鎖CDR2

配列番号11: 合成: MA b 1.731 重鎖CDR3

配列番号12: 合成: MA b 1.731 軽鎖CDR1

配列番号13: 合成: MA b 1.731 軽鎖CDR2

配列番号14: 合成: MA b 1.731 軽鎖CDR3

配列番号15: 合成: MA b 1.802 重鎖可変領域

配列番号16: 合成: MA b 1.802 軽鎖可変領域

配列番号17: 合成: MA b 1.802 重鎖CDR1

配列番号18: 合成: MA b 1.802 重鎖CDR2

配列番号19: 合成: MA b 1.802 重鎖CDR3

配列番号20: 合成: MA b 1.802 軽鎖CDR1

配列番号21: 合成: MA b 1.802 軽鎖CDR2

配列番号22: 合成: MA b 1.802 軽鎖CDR3

配列番号23: 合成: MA b 1.815 重鎖可変領域

配列番号24: 合成: MA b 1.815 軽鎖可変領域

配列番号25: 合成: MA b 1.815 重鎖CDR1

配列番号26: 合成: MA b 1.815 重鎖CDR2

配列番号27: 合成: MA b 1.815 重鎖CDR3

配列番号28: 合成: MA b 1.815 軽鎖CDR1

配列番号29: 合成: MA b 1.815 軽鎖CDR2

配列番号30: 合成: MA b 1.815 軽鎖CDR3

配列番号31: 合成: MA b 1.846 重鎖可変領域

配列番号32: 合成: MA b 1.846 軽鎖可変領域

配列番号33: 合成: MA b 1.846 重鎖CDR1

20

30

40

50



|   |    |
|---|----|
| 配列番号 34 : 合成 : M A b 1 . 8 4 6 重鎖 C D R 2           |    |
| 配列番号 35 : 合成 : M A b 1 . 8 4 6 重鎖 C D R 3           |    |
| 配列番号 36 : 合成 : M A b 1 . 8 4 6 軽鎖 C D R 1           |    |
| 配列番号 37 : 合成 : M A b 1 . 8 4 6 軽鎖 C D R 2           |    |
| 配列番号 38 : 合成 : M A b 1 . 8 4 6 軽鎖 C D R 3           |    |
| 配列番号 39 : 合成 : M A b 2 . 1 0 2 9 重鎖可変領域             |    |
| 配列番号 40 : 合成 : M A b 2 . 1 0 2 9 軽鎖可変領域             |    |
| 配列番号 41 : 合成 : M A b 2 . 1 0 2 9 重鎖 C D R 1         |    |
| 配列番号 42 : 合成 : M A b 2 . 1 0 2 9 重鎖 C D R 2         |    |
| 配列番号 43 : 合成 : M A b 2 . 1 0 2 9 重鎖 C D R 3         | 10 |
| 配列番号 44 : 合成 : M A b 2 . 1 0 2 9 軽鎖 C D R 1         |    |
| 配列番号 45 : 合成 : M A b 2 . 1 0 2 9 軽鎖 C D R 2         |    |
| 配列番号 46 : 合成 : M A b 2 . 1 0 2 9 軽鎖 C D R 3         |    |
| 配列番号 47 : 合成 : M A b 2 . 5 5 重鎖可変領域                 |    |
| 配列番号 48 : 合成 : M A b 2 . 5 5 軽鎖可変領域                 |    |
| 配列番号 49 : 合成 : M A b 2 . 5 5 重鎖 C D R 1             |    |
| 配列番号 50 : 合成 : M A b 2 . 5 5 重鎖 C D R 2             |    |
| 配列番号 51 : 合成 : M A b 2 . 5 5 重鎖 C D R 3             |    |
| 配列番号 52 : 合成 : M A b 2 . 5 5 軽鎖 C D R 1             |    |
| 配列番号 53 : 合成 : M A b 2 . 5 5 軽鎖 C D R 2             | 20 |
| 配列番号 54 : 合成 : M A b 2 . 5 5 軽鎖 C D R 3             |    |
| 配列番号 55 : 合成 : M A b 2 . 7 8 重鎖可変領域                 |    |
| 配列番号 56 : 合成 : M A b 2 . 7 8 軽鎖可変領域                 |    |
| 配列番号 57 : 合成 : M A b 2 . 7 8 重鎖 C D R 1             |    |
| 配列番号 58 : 合成 : M A b 2 . 7 8 重鎖 C D R 2             |    |
| 配列番号 59 : 合成 : M A b 2 . 7 8 重鎖 C D R 3             |    |
| 配列番号 60 : 合成 : M A b 2 . 7 8 軽鎖 C D R 1             |    |
| 配列番号 61 : 合成 : M A b 2 . 7 8 軽鎖 C D R 2             |    |
| 配列番号 62 : 合成 : M A b 2 . 7 8 軽鎖 C D R 3             |    |
| 配列番号 63 : 合成 : ヒト化 A b ( H u m A b ) 2 . 7 8 重鎖可変領域 | 30 |
| 配列番号 64 : 合成 : ヒト抗体 2 . 7 8 重鎖                      |    |
| 配列番号 65 : 合成 : ヒト抗体 2 . 7 8 軽鎖可変領域                  |    |
| 配列番号 66 : 合成 : ヒト抗体 2 . 7 8 軽鎖                      |    |
| 配列番号 67 : 合成 : ヒト抗体 2 . 1 0 2 9 重鎖可変領域              |    |
| 配列番号 68 : 合成 : ヒト抗体 2 . 1 0 2 9 重鎖                  |    |
| 配列番号 69 : 合成 : ヒト抗体 2 . 1 0 2 9 軽鎖可変領域              |    |
| 配列番号 70 : 合成 : ヒト抗体 2 . 1 0 2 9 軽鎖                  |    |
| 配列番号 71 : 合成 : ヒト抗体 1 . 8 0 2 重鎖可変領域                |    |
| 配列番号 72 : 合成 : ヒト抗体 1 . 8 0 2 重鎖                    |    |
| 配列番号 73 : 合成 : ヒト抗体 1 . 8 0 2 軽鎖可変領域                | 40 |
| 配列番号 74 : 合成 : ヒト抗体 1 . 8 0 2 軽鎖                    |    |
| 配列番号 75 : 合成 : ヒト抗体 1 . 8 1 5 重鎖可変領域                |    |
| 配列番号 76 : 合成 : ヒト抗体 1 . 8 1 5 重鎖                    |    |
| 配列番号 77 : 合成 : ヒト抗体 1 . 8 1 5 軽鎖可変領域                |    |
| 配列番号 78 : 合成 : ヒト抗体 1 . 8 1 5 軽鎖                    |    |
| 配列番号 79 : 合成 : ヒト抗体 1 . 8 4 6 重鎖可変領域                |    |
| 配列番号 80 : 合成 : ヒト抗体 1 . 8 4 6 重鎖                    |    |
| 配列番号 81 : 合成 : ヒト抗体 1 . 8 4 6 軽鎖可変領域                |    |
| 配列番号 82 : 合成 : ヒト抗体 1 . 8 4 6 軽鎖                    |    |
| 配列番号 83 : 合成 : ヒト マウスキメラ N O T U M                  | 50 |

|   |    |
|---|----|
| 配列番号 84 : 合成 : マウス ヒトキメラ NOTUM  |    |
| 配列番号 85 : 合成 : ヒト マウス ヒトキメラ NOTUM   |    |
| 配列番号 86 : 合成 : マウス ヒト マウスキメラ NOTUM  |    |
| 配列番号 87 : ヒト NOTUM ( Delta 1 - 46 )   |    |
| 配列番号 88 : ヒト NOTUM N96D   |    |
| 配列番号 89 : ヒト NOTUM Q47 - M177   |    |
| 配列番号 90 : 合成 : キャンペーン 1 重鎖 CDR1 コンセンサス<br>X は Y または F                               |    |
| 配列番号 91 : 合成 : キャンペーン 1 重鎖 CDR3 コンセンサス<br>X は H または N                               | 10 |
| 配列番号 92 : 合成 : キャンペーン 1 軽鎖 CDR1 コンセンサス<br>X は I または S<br>X は T または E<br>X は M または I |    |
| 配列番号 93 : 合成 : キャンペーン 1 の軽鎖 CDR2 コンセンサス<br>X は D または N                              |    |
| 配列番号 94 : ヒト NOTUM D141S  |    |
| 配列番号 95 : マウス NOTUM S148D   |    |
| 配列番号 96 : ヒト NOTUM N132A / R133A  |    |
| 配列番号 97 : ヒト NOTUM E134A / N135A  | 20 |
| 配列番号 98 : ヒト NOTUM D137A / R139A  |    |
| 配列番号 99 : ヒト NOTUM R144A / R145A  |    |
| 配列番号 100 : ヒト NOTUM R150A / D151A   |    |
| 配列番号 101 : 合成 : 1 . 802 重鎖可変領域ポリヌクレオチド配列  |    |
| 配列番号 102 : 合成 : 1 . 802 軽鎖可変領域ポリヌクレオチド配列  |    |
| 配列番号 103 : 合成 : 1 . 815 重鎖可変領域ポリヌクレオチド配列  |    |
| 配列番号 104 : 合成 : 1 . 815 軽鎖可変領域ポリヌクレオチド配列  |    |
| 配列番号 105 : 合成 : 1 . 846 重鎖可変領域ポリヌクレオチド配列  |    |
| 配列番号 106 : 合成 : 1 . 846 軽鎖可変領域ポリヌクレオチド配列  |    |
| 配列番号 107 : 合成 : 2 . 78 重鎖可変領域ポリヌクレオチド配列   | 30 |
| 配列番号 108 : 合成 : 2 . 78 軽鎖可変領域ポリヌクレオチド配列   |    |
| 配列番号 109 : 合成 : 2 . 1029 重鎖可変領域ポリヌクレオチド配列   |    |
| 配列番号 110 : 合成 : 2 . 1029 軽鎖可変領域ポリヌクレオチド配列   |    |
| 配列番号 111 : 合成 : ヒト化 Ab ( HumAb ) 2 . 78 重鎖可変領域ポリヌクレオチド配列                            |    |
| 配列番号 112 : 合成 : ヒト抗体 2 . 78 重鎖ポリヌクレオチド配列  |    |
| 配列番号 113 : 合成 : ヒト抗体 2 . 78 軽鎖可変領域ポリヌクレオチド配列  |    |
| 配列番号 114 : 合成 : ヒト抗体 2 . 78 軽鎖ポリヌクレオチド配列  |    |
| 配列番号 115 : 合成 : ヒト抗体 2 . 1029 重鎖可変領域ポリヌクレオチド配列                                      |    |
| 配列番号 116 : 合成 : ヒト抗体 2 . 1029 重鎖ポリヌクレオチド配列  | 40 |
| 配列番号 117 : 合成 : ヒト抗体 2 . 1029 軽鎖可変領域ポリヌクレオチド配列                                      |    |
| 配列番号 118 : 合成 : ヒト抗体 2 . 1029 軽鎖ポリヌクレオチド配列  |    |
| 配列番号 119 : 合成 : ヒト抗体 1 . 802 重鎖可変領域ポリヌクレオチド配列                                       |    |
| 配列番号 120 : 合成 : ヒト抗体 1 . 802 重鎖ポリヌクレオチド配列   |    |
| 配列番号 121 : 合成 : ヒト抗体 1 . 802 軽鎖可変領域ポリヌクレオチド配列                                       |    |
| 配列番号 122 : 合成 : ヒト抗体 1 . 802 軽鎖ポリヌクレオチド配列   |    |
| 配列番号 123 : 合成 : ヒト抗体 1 . 815 重鎖可変領域ポリヌクレオチド配列                                       |    |
| 配列番号 124 : 合成 : ヒト抗体 1 . 815 重鎖ポリヌクレオチド配列   |    |
| 配列番号 125 : 合成 : ヒト抗体 1 . 815 軽鎖可変領域ポリヌクレオチド配列                                       |    |
| 配列番号 126 : 合成 : ヒト抗体 1 . 815 軽鎖ポリヌクレオチド配列   | 50 |

配列番号 1 2 7 : 合成 : ヒト抗体 1 . 8 4 6 重鎖可変領域ポリヌクレオチド配列  
 配列番号 1 2 8 : 合成 : ヒト抗体 1 . 8 4 6 重鎖ポリヌクレオチド配列  
 配列番号 1 2 9 : 合成 : ヒト抗体 1 . 8 4 6 軽鎖可変領域ポリヌクレオチド配列  
 配列番号 1 3 0 : 合成 : ヒト抗体 1 . 8 4 6 軽鎖ポリヌクレオチド配列  
 配列番号 1 3 1 : カニクイザル N O T U M

【 図 1 】

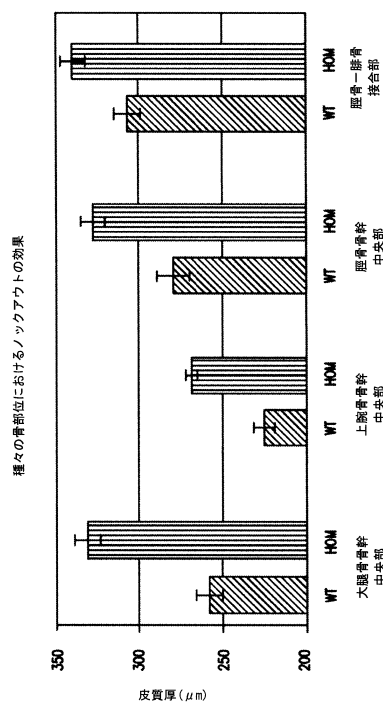


図 1

【 図 2 】

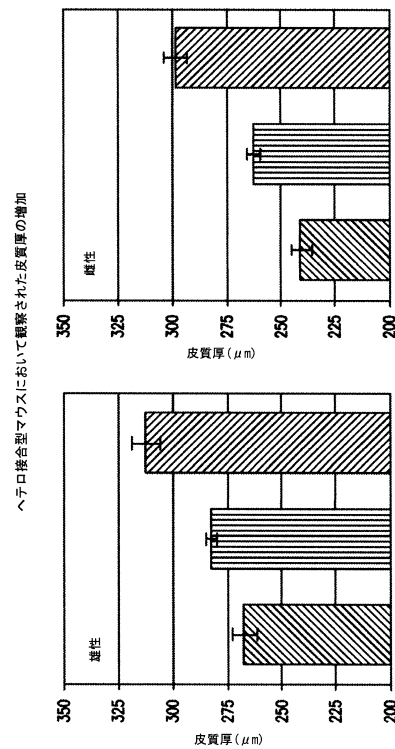


図 2

【図 3】

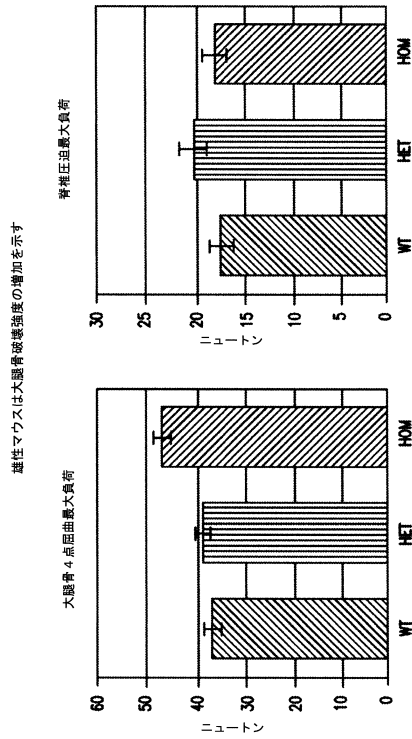


図 3

【図 4】

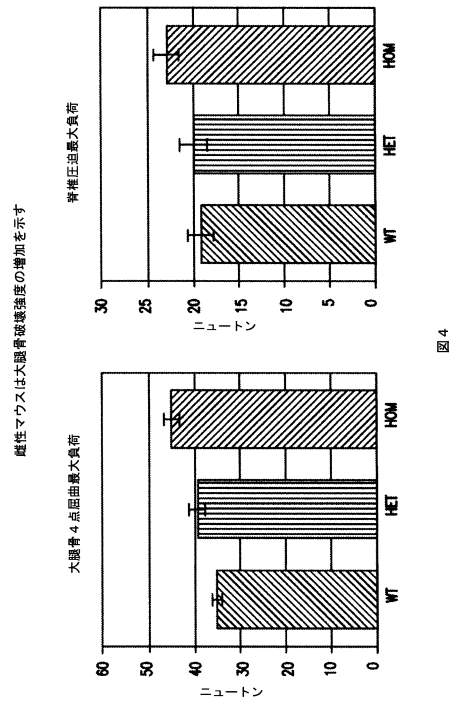


図 4

【図 5】

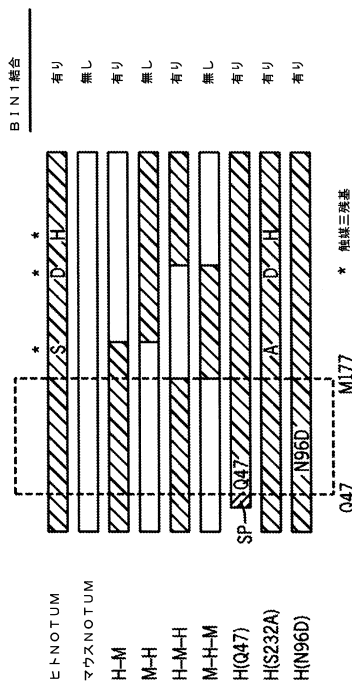


図 5

【図 6】

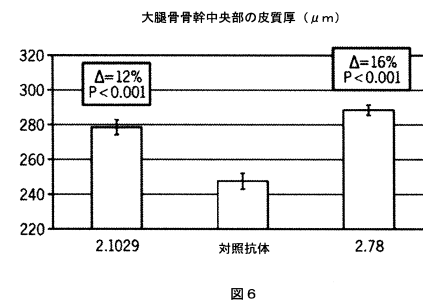


図 6

【図 7】

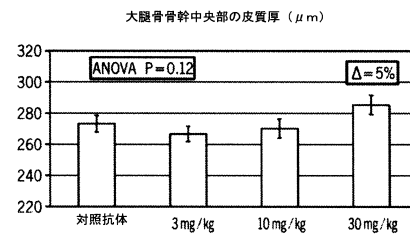


図 7

【図 8 A】

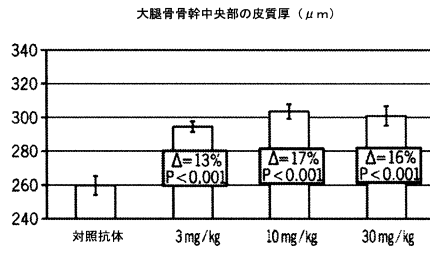


図 8 A

【図 9 A】

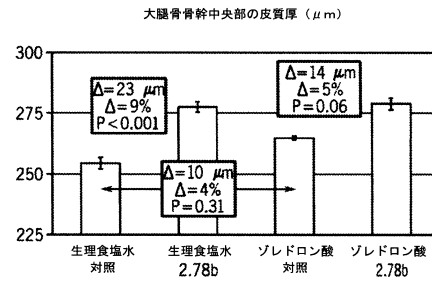


図 9 A

【図 8 B】

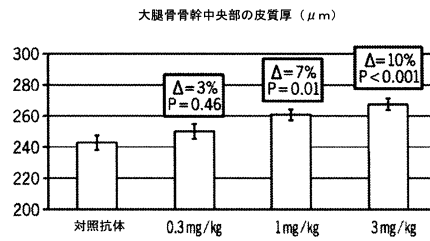


図 8 B

【図 9 B】

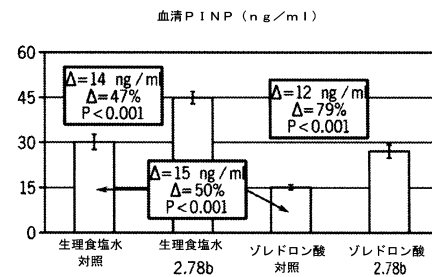


図 9 B

【図 10】

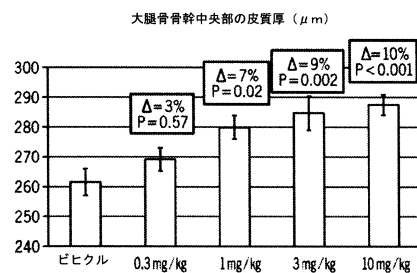


図 10

【図 11 B】

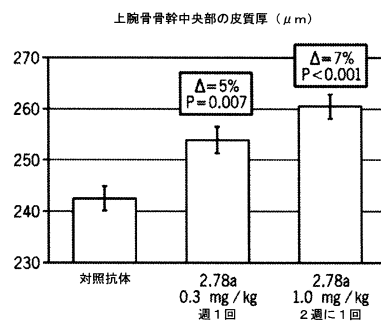


図 11 B

【図 11 A】

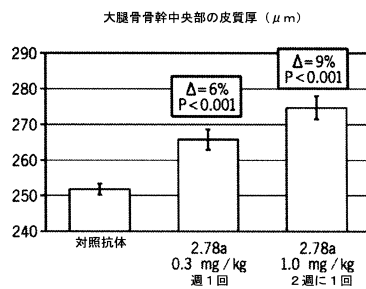


図 11 A

【図 12 A】

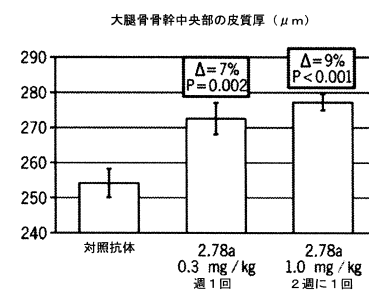


図 12 A

【図 1 2 B】

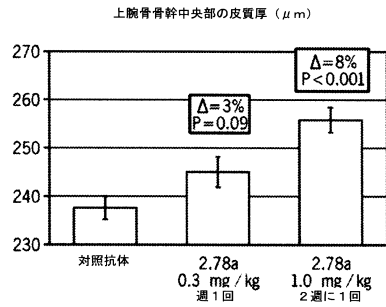


図 1 2 B

【図 1 2 C】

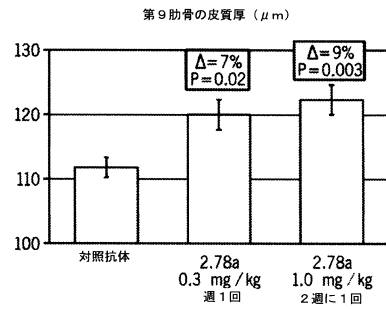


図 1 2 C

【図 1 3 A】

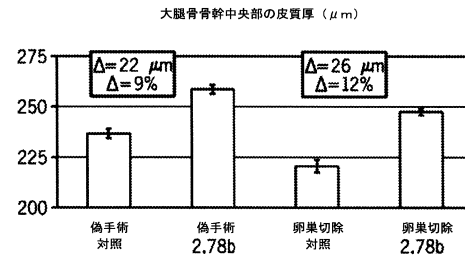


図 1 3 A

【図 1 3 B】

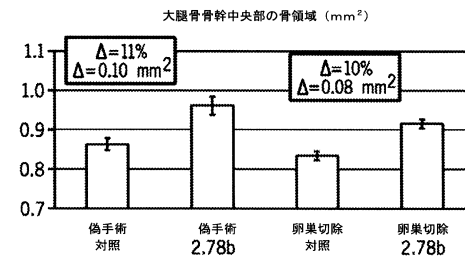


図 1 3 B

【図 1 4 A】

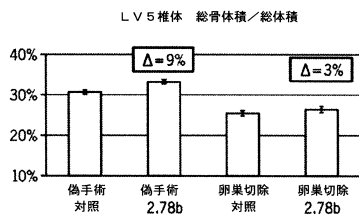


図 1 4 A

【図 1 4 C】

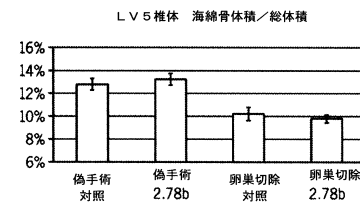


図 1 4 C

【図 1 4 B】

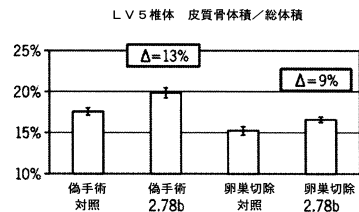


図 1 4 B

【図 1 5】

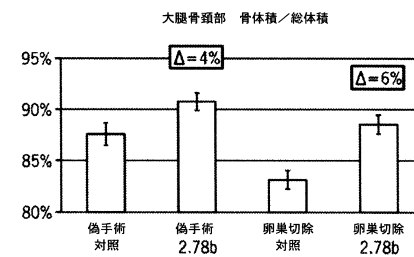


図 1 5

【図 1 6】

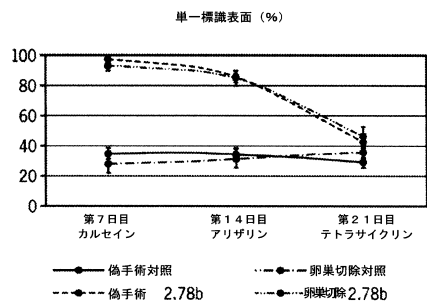


図 1 6

【図 1 7 B】

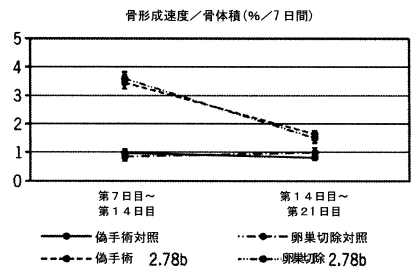


図 1 7 B

【図 1 7 A】

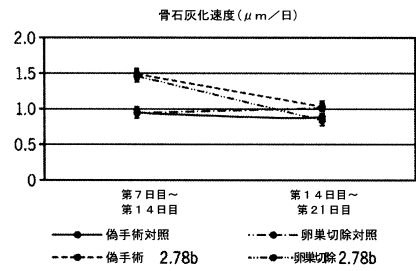


図 1 7 A

【配列表】

0006033229000001 . app

## フロントページの続き

|             |        |           |                  |
|-------------|--------|-----------|------------------|
| (51)Int.Cl. |        | F I       |                  |
| C 1 2 N     | 1/21   | (2006.01) | C 1 2 N 1/21     |
| C 1 2 N     | 5/12   | (2006.01) | C 1 2 N 5/12     |
| A 6 1 K     | 39/395 | (2006.01) | A 6 1 K 39/395 N |
| A 6 1 P     | 19/08  | (2006.01) | A 6 1 P 19/08    |
| A 6 1 P     | 19/10  | (2006.01) | A 6 1 P 19/10    |
| C 1 2 P     | 21/08  | (2006.01) | C 1 2 P 21/08    |

- (72)発明者 フォン シャオ  
アメリカ合衆国 7 7 3 8 1 - 1 1 6 0 テキサス州 ザ ウッドランズ テクノロジー フォレ  
スト ブレイス 8 8 0 0
- (72)発明者 ホン ソクジュ  
アメリカ合衆国 7 7 3 8 1 - 1 1 6 0 テキサス州 ザ ウッドランズ テクノロジー フォレ  
スト ブレイス 8 8 0 0
- (72)発明者 ランデス グレゴリー  
アメリカ合衆国 7 7 3 8 1 - 1 1 6 0 テキサス州 ザ ウッドランズ テクノロジー フォレ  
スト ブレイス 8 8 0 0
- (72)発明者 リュウ ジェフ  
アメリカ合衆国 7 7 3 8 1 - 1 1 6 0 テキサス州 ザ ウッドランズ テクノロジー フォレ  
スト ブレイス 8 8 0 0
- (72)発明者 ポッター デイビッド ジョージ  
アメリカ合衆国 7 7 3 8 1 - 1 1 6 0 テキサス州 ザ ウッドランズ テクノロジー フォレ  
スト ブレイス 8 8 0 0
- (72)発明者 パウウェル デイビッド リード  
アメリカ合衆国 7 7 3 8 1 - 1 1 6 0 テキサス州 ザ ウッドランズ テクノロジー フォレ  
スト ブレイス 8 8 0 0

審査官 坂崎 恵美子

- (56)参考文献 国際公開第 2 0 0 5 / 0 1 4 8 1 8 ( W O , A 1 )  
特表 2 0 1 3 - 5 3 9 4 6 8 ( J P , A )  
Cancer Sci. , 2 0 0 8 年 , Vol.99, No.6 , p.1139-1146  
骨粗しょう症治療 , 2 0 0 9 年 , Vol.8, No.4 , p.345-348  
Journal of Pathology , 2 0 0 9 年 , Vol.218, No.2 , p.201-209

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)  
C 1 2 N 1 5 / 0 9  
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
C A p l u s / M E D L I N E / W P I D S / B I O S I S ( S T N )  
U n i P r o t / G e n e S e q