

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-507652

(P2017-507652A)

(43) 公表日 平成29年3月23日 (2017.3.23)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 6 4
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28 Z N A	4 B 0 6 5
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	4 C 0 8 4
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	4 C 0 8 5
A O 1 K 67/027 (2006.01)	A O 1 K 67/027	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 217 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2016-548190 (P2016-548190)
 (86) (22) 出願日 平成27年1月23日 (2015.1.23)
 (85) 翻訳文提出日 平成28年9月21日 (2016.9.21)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/012731
 (87) 国際公開番号 W02015/112886
 (87) 国際公開日 平成27年7月30日 (2015.7.30)
 (31) 優先権主張番号 61/931, 531
 (32) 優先日 平成26年1月24日 (2014.1.24)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 514002695
 エヌジーエム バイオファーマシューティ
 カルス, インコーポレーテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94
 080 サウス サン フランシスコ ゲ
 ートウェイ ブルーバード 630
 (74) 代理人 100097456
 弁理士 石川 徹
 (72) 発明者 カルヤニ モンダル
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94
 404 サン マテオ ビスタ カイ 1
 937

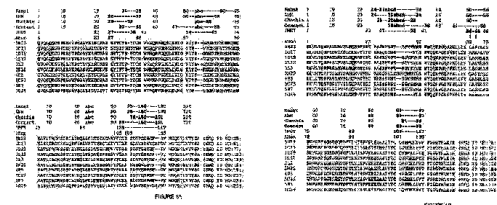
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 結合タンパク質及びその使用方法

(57) 【要約】

本開示は、ヒトβクロトーを含むβクロトーに結合する結合タンパク質、例えば、抗体及びその使用方法を提供する。

【選択図】 図 1



【特許請求の範囲】

【請求項1】

(i) 配列番号25のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域及び配列番号26のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む抗体によって認識されるヒトβクロトー及びカニクイザルβクロトーのエピトープに結合するか;又は(ii)ヒトβクロトーに対する結合について配列番号25のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域及び配列番号26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抗体又はその断片。

【請求項2】

βクロトーに結合する抗体又はその断片であって、該抗体又はその結合断片が:

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域:

10

(1) 以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する V_H CDR1:

(i) 配列番号1、27、53、79、105、131、157、183、209、もしくは235、

(ii) 配列番号7、33、59、85、111、137、163、189、215、もしくは241、

(iii) 配列番号12、38、64、90、116、142、168、194、220、もしくは246、

(iv) 配列番号13、39、65、91、117、143、169、195、221、もしくは247、及び

(v) 配列番号18、44、70、96、122、148、174、200、226、もしくは252;

(2) 以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する V_H CDR2:

(i) 配列番号2、28、54、80、106、132、158、184、210、もしくは236、

(ii) 配列番号8、34、60、86、112、138、164、190、216、もしくは242、

(iii) 配列番号14、40、66、92、118、144、170、196、222、もしくは248、

20

(iv) 配列番号19、45、71、97、123、149、175、201、227、もしくは253、及び

(v) 配列番号24、50、76、102、128、154、180、206、232、もしくは258;並びに

(3) 以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する V_H CDR3:

(i) 配列番号3、29、55、81、107、133、159、185、211、もしくは237、

(ii) 配列番号9、35、61、87、113、139、165、191、217、もしくは243、

(iii) 配列番号15、41、67、93、119、145、171、197、223、もしくは249、及び

(iv) 配列番号20、46、72、98、124、150、176、202、228、もしくは254;

並びに/又は

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域:

(1) 以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する V_L CDR1:

30

(i) 配列番号4、30、56、82、108、134、160、186、212、もしくは238、

(ii) 配列番号10、36、52、88、114、140、166、192、218、もしくは244、

(iii) 配列番号16、42、68、94、120、146、172、198、224、もしくは250、及び

(iv) 配列番号21、47、73、99、125、151、177、203、229、もしくは255;

(2) 以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する V_L CDR2:

(i) 配列番号5、31、57、83、109、135、161、187、213、もしくは239、

(ii) 配列番号11、37、63、89、115、141、167、193、219、もしくは245、及び

(iii) 配列番号22、48、74、100、126、152、178、204、230、もしくは256;並びに

(3) 以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する V_L CDR3:

(i) 配列番号6、32、58、84、110、136、162、188、214、もしくは240、

40

(ii) 配列番号17、43、69、95、121、147、173、199、225、もしくは251、及び

(iii) 配列番号23、49、75、101、127、153、179、205、231、もしくは257

を含む、前記抗体又はその断片。

【請求項3】

βクロトーに結合する抗体又はその断片であって、該抗体又はその結合断片が:

(1) 以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する V_H CDR1:

(i) 配列番号1、27、53、79、105、131、157、183、209、もしくは235、

(ii) 配列番号7、33、59、85、111、137、163、189、215、もしくは241、

(iii) 配列番号12、38、64、90、116、142、168、194、220、もしくは246、

(iv) 配列番号13、39、65、91、117、143、169、195、221、もしくは247、及び

50

- (v) 配列番号18、44、70、96、122、148、174、200、226、もしくは252;
 (2) 以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_H CDR2:
 (i) 配列番号2、28、54、80、106、132、158、184、210、もしくは236、
 (ii) 配列番号8、34、60、86、112、138、164、190、216、もしくは242、
 (iii) 配列番号14、40、66、92、118、144、170、196、222、もしくは248、
 (iv) 配列番号19、45、71、97、123、149、175、201、227、もしくは253、及び
 (v) 配列番号24、50、76、102、128、154、180、206、232、もしくは258;並びに
 (3) 以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_H CDR3:
 (i) 配列番号3、29、55、81、107、133、159、185、211、もしくは237、
 (ii) 配列番号9、35、61、87、113、139、165、191、217、もしくは243、
 (iii) 配列番号15、41、67、93、119、145、171、197、223、もしくは249、及び
 (iv) 配列番号20、46、72、98、124、150、176、202、228、もしくは254

10

を含む重鎖可変(V_H)領域を含む、前記抗体又はその断片。

【請求項4】

βクロトーに結合する抗体又はその断片であって、該抗体又はその結合断片が:

- (1) 以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_L CDR1:
 (i) 配列番号4、30、56、82、108、134、160、186、212、もしくは238、
 (ii) 配列番号10、36、52、88、114、140、166、192、218、もしくは244、
 (iii) 配列番号16、42、68、94、120、146、172、198、224、もしくは250、及び
 (iv) 配列番号21、47、73、99、125、151、177、203、229、もしくは255;
 (2) 以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_L CDR2:
 (i) 配列番号5、31、57、83、109、135、161、187、213、もしくは239、
 (ii) 配列番号11、37、63、89、115、141、167、193、219、もしくは245、及び
 (iii) 配列番号22、48、74、100、126、152、178、204、230、もしくは256;並びに
 (3) 以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_L CDR3:
 (i) 配列番号6、32、58、84、110、136、162、188、214、もしくは240、
 (ii) 配列番号17、43、69、95、121、147、173、199、225、もしくは251、及び
 (iii) 配列番号23、49、75、101、127、153、179、205、231、もしくは257

20

を含む軽鎖可変(V_L)領域を含む、前記抗体又はその断片。

【請求項5】

30

前記抗体又はその結合断片が:

(a) 以下をさらに含む重鎖可変(V_H)領域:

- (1) 配列番号278、279、280、及び378からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するFR1;
 (2) 配列番号281、282、及び283からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するFR2;
 (3) 配列番号284、285、286、287、及び379~381からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するFR3;並びに
 (4) 配列番号288のアミノ酸配列を有するFR4;

並びに/又は

(b) 以下をさらに含む軽鎖可変(V_L)領域:

40

- (1) 配列番号289、290、及び382~384からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するFR1;
 (2) 配列番号291、292、及び385~392からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するFR2;
 (3) 配列番号293、294、295、及び393~404からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するFR3;並びに
 (4) 配列番号296及び405~407からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するFR4
 を含む、請求項2~4のいずれか一項記載の抗体又はその断片。

【請求項6】

前記抗体又はその結合断片が、配列番号269、270、271、272、273、274、320、321、も

50

しくは322であるV_H配列及び/又は配列番号275、276、277、もしくは325～352であるV_L配列を含む、請求項1記載の抗体又はその断片。

【請求項7】

βクロトーに結合する抗体又はその断片であって：

配列番号25であるVH配列及び配列番号26であるVL配列を含む5H23と表記された抗体；

配列番号51であるVH配列及び配列番号52であるVL配列を含む1C17と表記された抗体；

配列番号77であるVH配列及び配列番号78であるVL配列を含む1D19と表記された抗体；

配列番号103であるVH配列及び配列番号104であるVL配列を含む2L12と表記された抗体；

配列番号129であるVH配列及び配列番号130であるVL配列を含む3L3と表記された抗体；

配列番号155であるVH配列及び配列番号156であるVL配列を含む3N20と表記された抗体；

配列番号181であるVH配列及び配列番号182であるVL配列を含む4P5と表記された抗体；

配列番号207であるVH配列及び配列番号208であるVL配列を含む5C23と表記された抗体；

配列番号233であるVH配列及び配列番号234であるVL配列を含む5F7と表記された抗体；又

は

配列番号259であるVH配列及び配列番号260であるVL配列を含むIG19と表記された抗体に由来する3つ全ての重鎖相補性決定領域(CDR)及び/又は3つ全ての軽鎖CDRを含む、前記抗体又はその断片。

【請求項8】

前記抗体又はその断片が、5H23と表記された抗体に由来する3つ全ての重鎖CDR及び/又は3つ全ての軽鎖CDRを含む、請求項7記載の抗体。

【請求項9】

前記抗体又はその断片が、1C17と表記された抗体に由来する3つ全ての重鎖CDR及び/又は3つ全ての軽鎖CDRを含む、請求項7記載の抗体。

【請求項10】

前記抗体又はその断片が、1D19と表記された抗体に由来する3つ全ての重鎖CDR及び/又は3つ全ての軽鎖CDRを含む、請求項7記載の抗体。

【請求項11】

前記抗体又はその断片が、2L12と表記された抗体に由来する3つ全ての重鎖CDR及び/又は3つ全ての軽鎖CDRを含む、請求項7記載の抗体。

【請求項12】

前記抗体又はその断片が、3L3と表記された抗体に由来する3つ全ての重鎖CDR及び/又は3つ全ての軽鎖CDRを含む、請求項7記載の抗体。

【請求項13】

前記抗体又はその断片が、3N20と表記された抗体に由来する3つ全ての重鎖CDR及び/又は3つ全ての軽鎖CDRを含む、請求項7記載の抗体。

【請求項14】

前記抗体又はその断片が、4P5と表記された抗体に由来する3つ全ての重鎖CDR及び/又は3つ全ての軽鎖CDRを含む、請求項7記載の抗体。

【請求項15】

前記抗体又はその断片が、5C23と表記された抗体に由来する3つ全ての重鎖CDR及び/又は3つ全ての軽鎖CDRを含む、請求項7記載の抗体。

【請求項16】

前記抗体又はその断片が、5F7と表記された抗体に由来する3つ全ての重鎖CDR及び/又は3つ全ての軽鎖CDRを含む、請求項7記載の抗体。

【請求項17】

前記抗体又はその断片が、IG19と表記された抗体に由来する3つ全ての重鎖CDR及び/又は3つ全ての軽鎖CDRを含む、請求項7記載の抗体。

【請求項18】

βクロトーに結合する抗体又はその断片であって、該抗体が：

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域：

10

20

30

40

50

(1)以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_H CDR1:

(i)

【化1】

GYTFTX₁YDIN (配列番号: 261)

(ここで、X₁は、天然のアミノ酸である)、

(ii)

【化2】

GYSITSGYYWN (配列番号: 27),

10

及び

(iii)

【化3】

GYIFTNYGIS (配列番号: 131);

(2)以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_H CDR2:

(i)

【化4】

WIYPGDX₁STKYNEKFKG (配列番号: 262)

20

(ここで、X₁は、天然のアミノ酸である)、

(ii)

【化5】

YINYX₁GX₂X₃NYX₄PSLKN (配列番号: 264)

(ここで、X₁、X₂、X₃、及びX₄は、天然のアミノ酸である)、並びに

(iii)

【化6】

EIYPRSGNTYYNEKFKG (配列番号: 132);

30

(3)以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_H CDR3:

(i)

【化7】

SDYYGSRsFX₁Y (配列番号: 263)

(ここで、X₁は、天然のアミノ酸である)、

(ii)

【化8】

X₁GAYYSNYDSFDV (配列番号: 265)

40

(ここで、X₁は、天然のアミノ酸である)、並びに

(iii)

【化9】

HWDGVLDYFDY (配列番号: 133);

並びに/又は

(b)以下を含む軽鎖可変(V_L)領域:

(1)以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_L CDR1:

(i)

【化 1 0】

RASKSVSTSGYSYX₁H (配列番号 :266)

(ここで、X₁は、天然のアミノ酸である)、

(ii)

【化 1 1】

KASQDINSYLS (配列番号 :30),

及び

(iii)

【化 1 2】

KSSQSLLNSGNQKNYLA (配列番号 :134);

(2)以下のアミノ酸配列を有するV_L CDR2:

(i)

【化 1 3】

LASNLES (配列番号 :57),

(ii)

【化 1 4】

RANRLVD (配列番号 :31),

及び

(iii)

【化 1 5】

GASTRES (配列番号 :135);

(3)以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_L CDR3:

(i)

【化 1 6】

X₁HSX₂ELPYT (配列番号 :267)

(ここで、X₁及びX₂は、天然のアミノ酸である)、

(ii)

【化 1 7】

LQYDEFPX₁T (配列番号 :268)

(ここで、X₁は、天然のアミノ酸である)、並びに

(iii)

【化 1 8】

LNDHSYPFT (配列番号 :136)

を含む、前記抗体又はその断片。

【請求項 1 9】

前記その抗体断片が:

(1)以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_H CDR1:

(i)

【化 1 9】

GYTFTX₁YDIN (配列番号 :261)

10

20

30

40

50

(ここで、 X_1 は、天然のアミノ酸である)、
(ii)
【化 2 0】

GYSITSGYYWN (配列番号：27),

及び
(iii)
【化 2 1】

GYIFTNYGIS (配列番号：131);

10

(2)以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する V_H CDR2:
(i)
【化 2 2】

WIYPGDX₁STKYNEKFKG (配列番号：262)

(ここで、 X_1 は、天然のアミノ酸である)、
(ii)
【化 2 3】

YINYX₁GX₂X₃NYX₄PSLKN (配列番号：264)

20

(ここで、 X_1 、 X_2 、 X_3 、及び X_4 は、天然のアミノ酸である)、並びに
(iii)
【化 2 4】

EIYPRSGNTYYNEKFKG (配列番号：132);

並びに
(3)以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する V_H CDR3:
(i)
【化 2 5】

SDYYGSRFX₁Y (配列番号：263)

30

(ここで、 X_1 は、天然のアミノ酸である)、
(ii)
【化 2 6】

X₁GAYYSNYDSFDV (配列番号：265)

(ここで、 X_1 は、天然のアミノ酸である)、及び
(iii)
【化 2 7】

HWDGVLDYFDY (配列番号：133)

40

を含む重鎖可変(V_H)領域を含む、請求項18記載の抗体又はその断片。
【請求項 2 0】

前記抗体又はその断片が:

(1)以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する V_L CDR1:
(i)
【化 2 8】

RASKSVSTSGYSYX₁H (配列番号：266)

(ここで、 X_1 は、天然のアミノ酸である)、

50

(ii)
【化 2 9】

KASQDINSYLS (配列番号 : 30),

及び

(iii)
【化 3 0】

KSSQSLLNSGNQKNYLA (配列番号 : 134);

(2) 以下のアミノ酸配列を有するV_L CDR2:

10

(i)
【化 3 1】

LASNLES (配列番号 : 57),

(ii)
【化 3 2】

RANRLVD (配列番号 : 31),

及び

(iii)
【化 3 3】

20

GASTRES (配列番号 : 135);

並びに

(3) 以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_L CDR3:

(i)
【化 3 4】

X₁HSX₂ELPYT (配列番号 : 267)

(ここで、X₁及びX₂は、天然のアミノ酸である)、

30

(ii)
【化 3 5】

LQYDEFPX₁T (配列番号 : 268)

(ここで、X₁は、天然のアミノ酸である)、並びに

(iii)
【化 3 6】

LNDHSTPFT (配列番号 : 136)

を含む軽鎖可変(V_L)領域を含む、請求項18記載の抗体又はその断片。

40

【請求項 2 1】

前記抗体又はその断片が:

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域:

(1)
【化 3 7】

GYTFTX₁YDIN (配列番号 : 261)

(ここで、X₁は、天然のアミノ酸である)のアミノ酸配列を有するV_H CDR1;

(2)

【化 3 8】

WIYPGDX₁STKYNEKFKG (配列番号：262)

(ここで、X₁は、天然のアミノ酸である)のアミノ酸配列を有するV_H CDR2;及び
(3)

【化 3 9】

SDYYGSRFSFX₁Y (配列番号：263)

(ここで、X₁は、天然のアミノ酸である)のアミノ酸配列を有するV_H CDR3
並びに

10

(b)以下を含む軽鎖可変(V_L)領域:

(1)

【化 4 0】

RASKSVSTSGYSYX₁H (配列番号：266)

(ここで、X₁は、天然のアミノ酸である)のアミノ酸配列を有するV_L CDR1;
(2)

【化 4 1】

LASNLES (配列番号：57)

20

のアミノ酸配列を有するV_L CDR2;並びに

(3)

【化 4 2】

X₁HSX₂ELPYT (配列番号：267)

(ここで、X₁及びX₂は、天然のアミノ酸である)のアミノ酸配列を有するV_L CDR3
を含む、請求項18記載の抗体又はその断片。

【請求項 2 2】

前記抗体又はその断片が:

(a)以下を含む重鎖可変(V_H)領域:

30

(1)

【化 4 3】

GYTFTX₁YDIN (配列番号：261)

(ここで、X₁は、R又はSである)のアミノ酸配列を有するV_H CDR1;

(2)

【化 4 4】

WIYPGDX₁STKYNEKFKG (配列番号：262)

(ここで、X₁は、G、D、S、又はIである)のアミノ酸配列を有するV_H CDR2;及び
(3)

40

【化 4 5】

SDYYGSRFSFX₁Y (配列番号：263)

(ここで、X₁は、V、T、又はAである)のアミノ酸配列を有するV_H CDR3
並びに

(b)以下を含む軽鎖可変(V_L)領域:

(1)

【化 4 6】

RASKSVSTSGYSYX₁H (配列番号 : 266)

(ここで、X₁は、M、L、又はVである)のアミノ酸配列を有するV_L CDR1;

(2)

【化 4 7】

LASNLES (配列番号 : 57)

のアミノ酸配列を有するV_L CDR2;及び

(3)

10

【化 4 8】

X₁HSX₂ELPYT (配列番号 : 267)

(ここで、X₁は、Q又はHであり、X₂は、R又はGである)のアミノ酸配列を有するV_L CDR3を含む、請求項21記載の抗体又はその断片。

【請求項 2 3】

前記抗体又はその断片が:

(a)以下を含む重鎖可変(V_H)領域:

(1)配列番号1及び配列番号53からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_H CDR1

20

、
(2)配列番号2、配列番号80、配列番号54、及び配列番号210からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_H CDR2、

(3)配列番号81、配列番号55、配列番号3からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_H CDR3;

並びに

(b)以下を含む軽鎖可変(V_L)領域:

(1)配列番号4、配列番号82、配列番号108からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_L CDR1、

(2)

【化 4 9】

30

LASNLES (配列番号 : 57)

のアミノ酸配列を有するV_L CDR2;及び

(3)配列番号6、配列番号84からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_L CDR3を含む、請求項22記載の抗体又はその断片。

【請求項 2 4】

前記抗体が:

(a)以下を含む重鎖可変(V_H)領域:

(1)

40

【化 5 0】

GYSITSGYYWN (配列番号 : 27)

のアミノ酸配列を有するV_H CDR1、

(2)

【化 5 1】

YINYX₁GX₂X₃NYX₄PSLKN (配列番号 : 264)

(ここで、X₁、X₂、X₃、及びX₄は、天然のアミノ酸である)のアミノ酸配列を有するV_H CDR2、並びに

50

(3)

【化 5 2】

 X_1 GAYYSNYDSFDV (配列番号：265)

(ここで、 X_1 は、天然のアミノ酸である)のアミノ酸配列を有する V_H CDR3
並びに

(b)以下を含む軽鎖可変(V_L)領域：

(1)

【化 5 3】

KASQDINSYLS (配列番号：30)

10

のアミノ酸配列を有する V_L CDR1、

(2)

【化 5 4】

RANRLVD (配列番号：31)

のアミノ酸配列を有する V_L CDR2、及び

(3)

【化 5 5】

LQYDEFPX₁T (配列番号：268)

20

(ここで、 X_1 は、天然のアミノ酸である)のアミノ酸配列を有する V_L CDR3
を含む、請求項18記載の抗体。

【請求項 2 5】

前記抗体が：

(a)以下を含む重鎖可変(V_H)領域：

(1)

【化 5 6】

GYSITSGYYWN (配列番号：27)

30

のアミノ酸配列を有する V_H CDR1、

(2)

【化 5 7】

YINYX₁GX₂X₃NYX₄PSLKN (配列番号：264)

(ここで、 X_1 は、D又はGであり、 X_2 は、N又はSであり、 X_3 は、S又はNであり、 X_4 は、T又はNである)のアミノ酸配列を有する V_H CDR2、

(3)

【化 5 8】

 X_1 GAYYSNYDSFDV (配列番号：265)

40

(ここで、 X_1 は、K又はRである)のアミノ酸配列を有する V_H CDR3；
並びに

(b)以下を含む軽鎖可変(V_L)領域：

(1)

【化 5 9】

KASQDINSYLS (配列番号：30)

のアミノ酸配列を有する V_L CDR1、

(2)

50

【化 6 0】

RANRLVD (配列番号 : 31)

のアミノ酸配列を有するV_L CDR2、及び

(3)

【化 6 1】

LQYDEFPX₁T (配列番号 : 268)

(ここで、X₁は、F又はYである)のアミノ酸配列を有するV_L CDR3
を含む、請求項24記載の抗体。

10

【請求項 2 6】

前記抗体が：

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域：

(1)

【化 6 2】

GYSITSGYYWN (配列番号 : 27)

のアミノ酸配列を有するV_H CDR1、

(2) 配列番号28、配列番号263からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_H CDR2

20

、
(3) 配列番号29、配列番号237からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_H CDR3；
並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域：

(1)

【化 6 3】

KASQDINSYLS (配列番号 : 30)

のアミノ酸配列を有するV_L CDR1、

(2)

【化 6 4】

30

RANRLVD (配列番号 : 31)

のアミノ酸配列を有するV_L CDR2、及び

(3) 配列番号32、配列番号240からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_L CDR3
を含む、請求項25記載の抗体。

【請求項 2 7】

前記抗体が：

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域：

(1)

【化 6 5】

40

GYIFTNYGIS (配列番号 : 131)

のアミノ酸配列を有するV_H CDR1；

(2)

【化 6 6】

EIYPRSGNTYYNEKFKG (配列番号 : 132)

のアミノ酸配列を有するV_H CDR2；及び

(3)

【化 6 7】

HWDGVLDYFDY (配列番号 : 133)

の アミノ酸配列を有する V_H CDR3

並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変 (V_L) 領域:

(1)

【化 6 8】

KSSQSLLNSGNQKNYLA (配列番号 : 134)

の アミノ酸配列を有する V_L CDR1;

(2)

【化 6 9】

GASTRES (配列番号 : 135)

の アミノ酸配列を有する V_L CDR2; 及び

(3)

【化 7 0】

LNDHSPFT (配列番号 : 136)

の アミノ酸配列を有する V_L CDR3

を含む、請求項18記載の抗体。

【請求項 2 8】

β クロトーに結合する抗体又はその断片であって、該抗体が:

(a) 表1~10に示される V_H CDR1、 V_H CDR2、及び V_H CDR3 アミノ酸配列を含む重鎖可変 (V_H) 領域;

並びに/又は

(b) 表1~10に示される V_L CDR1、 V_L CDR2、及び V_L CDR3 アミノ酸配列を含む軽鎖可変 (V_L) 領域

を含む、前記抗体又はその断片。

【請求項 2 9】

前記抗体が、表1~10に示される V_H CDR1、 V_H CDR2、及び V_H CDR3 アミノ酸配列を含む重鎖可変 (V_H) 領域を含む、請求項28記載の抗体。

【請求項 3 0】

前記抗体が、表1~10に示される V_L CDR1、 V_L CDR2、及び V_L CDR3 アミノ酸配列を含む軽鎖可変 (V_L) 領域を含む、請求項28記載の抗体。

【請求項 3 1】

前記抗体が:

(a) 以下を含む重鎖可変 (V_H) 領域:

(1) 配列番号1、7、12、13、及び18からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する V_H CDR1;

(2) 配列番号2、8、14、19、及び24からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する V_H CDR2;

(3) 配列番号3、9、15、及び20からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する V_H CDR3

; 並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変 (V_L) 領域:

(1) 配列番号4、10、16、及び21からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する V_L CDR1;

(2) 配列番号5、11、及び22からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する V_L CDR2; 並

10

20

30

40

50

びに

(3) 配列番号6、17、及び23からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_L CDR3を含む、請求項28記載の抗体。

【請求項 3 2】

前記抗体が：

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域：

- (1) 配列番号1のアミノ酸配列を有するV_H CDR1；
- (2) 配列番号2のアミノ酸配列を有するV_H CDR2；及び
- (3) 配列番号3のアミノ酸配列を有するV_H CDR3；

並びに

10

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域：

- (1) 配列番号4のアミノ酸配列を有するV_L CDR1；
- (2) 配列番号5のアミノ酸配列を有するV_L CDR2；及び
- (3) 配列番号6のアミノ酸配列を有するV_L CDR3

を含む、請求項28記載の抗体。

【請求項 3 3】

前記抗体が：

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域：

- (1) 配列番号7のアミノ酸配列を有するV_H CDR1；
- (2) 配列番号8のアミノ酸配列を有するV_H CDR2；及び
- (3) 配列番号9のアミノ酸配列を有するV_H CDR3；

20

並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域：

- (1) 配列番号10のアミノ酸配列を有するV_L CDR1；
- (2) 配列番号11のアミノ酸配列を有するV_L CDR2；及び
- (3) 配列番号6のアミノ酸配列を有するV_L CDR3

を含む、請求項31記載の抗体。

【請求項 3 4】

前記抗体が：

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域：

- (1) 配列番号12のアミノ酸配列を有するV_H CDR1；
- (2) 配列番号2のアミノ酸配列を有するV_H CDR2；及び
- (3) 配列番号3のアミノ酸配列を有するV_H CDR3；

30

並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域：

- (1) 配列番号4のアミノ酸配列を有するV_L CDR1；
- (2) 配列番号5のアミノ酸配列を有するV_L CDR2；及び
- (3) 配列番号6のアミノ酸配列を有するV_L CDR3

を含む、請求項31記載の抗体。

【請求項 3 5】

40

前記抗体が：

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域：

- (1) 配列番号13のアミノ酸配列を有するV_H CDR1；
- (2) 配列番号14のアミノ酸配列を有するV_H CDR2；及び
- (3) 配列番号15のアミノ酸配列を有するV_H CDR3；

並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域：

- (1) 配列番号16のアミノ酸配列を有するV_L CDR1；
- (2) 配列番号11のアミノ酸配列を有するV_L CDR2；及び
- (3) 配列番号17のアミノ酸配列を有するV_L CDR3

50

を含む、請求項31記載の抗体。

【請求項 3 6】

前記抗体が：

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域：

- (1) 配列番号18のアミノ酸配列を有する V_H CDR1；
- (2) 配列番号19のアミノ酸配列を有する V_H CDR2；及び
- (3) 配列番号20のアミノ酸配列を有する V_H CDR3；

並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域：

- (1) 配列番号21のアミノ酸配列を有する V_L CDR1；
- (2) 配列番号22のアミノ酸配列を有する V_L CDR2；及び
- (3) 配列番号23のアミノ酸配列を有する V_L CDR3

を含む、請求項31記載の抗体。

【請求項 3 7】

前記抗体が：

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域：

- (1) 配列番号1のアミノ酸配列を有する V_H CDR1；
- (2) 配列番号24のアミノ酸配列を有する V_H CDR2；及び
- (3) 配列番号3のアミノ酸配列を有する V_H CDR3；

並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域：

- (1) 配列番号4のアミノ酸配列を有する V_L CDR1；
- (2) 配列番号5のアミノ酸配列を有する V_L CDR2；及び
- (3) 配列番号6のアミノ酸配列を有する V_L CDR3

を含む、請求項31記載の抗体。

【請求項 3 8】

前記抗体が：

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域：

- (1) 配列番号27、33、38、39、及び44からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する V_H CDR1；
- (2) 配列番号28、34、40、45、及び50からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する V_H CDR2；並びに
- (3) 配列番号29、35、41、及び46からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する V_H CDR3；

並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域：

- (1) 配列番号30、36、42、及び47からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する V_L CDR1；

(2) 配列番号31、37、及び48からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する V_L CDR2、

並びに

- (3) 配列番号32、43、及び49からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する V_L CDR3

を含む、請求項28記載の抗体。

【請求項 3 9】

前記抗体が：

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域：

- (1) 配列番号27のアミノ酸配列を有する V_H CDR1；
- (2) 配列番号28のアミノ酸配列を有する V_H CDR2；及び
- (3) 配列番号29のアミノ酸配列を有する V_H CDR3；

並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域：

- (1) 配列番号30のアミノ酸配列を有するV_L CDR1;
- (2) 配列番号31のアミノ酸配列を有するV_L CDR2; 及び
- (3) 配列番号32のアミノ酸配列を有するV_L CDR3

を含む、請求項38記載の抗体。

【請求項 4 0】

前記抗体が:

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域:

- (1) 配列番号33のアミノ酸配列を有するV_H CDR1;
- (2) 配列番号34のアミノ酸配列を有するV_H CDR2; 及び
- (3) 配列番号35のアミノ酸配列を有するV_H CDR3;

10

並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域:

- (1) 配列番号36のアミノ酸配列を有するV_L CDR1;
- (2) 配列番号37のアミノ酸配列を有するV_L CDR2; 及び
- (3) 配列番号32のアミノ酸配列を有するV_L CDR3

を含む、請求項38記載の抗体。

【請求項 4 1】

前記抗体が:

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域:

- (1) 配列番号38のアミノ酸配列を有するV_H CDR1;
- (2) 配列番号28のアミノ酸配列を有するV_H CDR2; 及び
- (3) 配列番号29のアミノ酸配列を有するV_H CDR3;

20

並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域:

- (1) 配列番号30のアミノ酸配列を有するV_L CDR1;
- (2) 配列番号31のアミノ酸配列を有するV_L CDR2; 及び
- (3) 配列番号32のアミノ酸配列を有するV_L CDR3

を含む、請求項38記載の抗体。

【請求項 4 2】

前記抗体が:

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域:

- (1) 配列番号39のアミノ酸配列を有するV_H CDR1;
- (2) 配列番号40のアミノ酸配列を有するV_H CDR2; 及び
- (3) 配列番号41のアミノ酸配列を有するV_H CDR3;

30

並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域:

- (1) 配列番号42のアミノ酸配列を有するV_L CDR1;
- (2) 配列番号37のアミノ酸配列を有するV_L CDR2; 及び
- (3) 配列番号43のアミノ酸配列を有するV_L CDR3

を含む、請求項38記載の抗体。

40

【請求項 4 3】

前記抗体が:

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域:

- (1) 配列番号44のアミノ酸配列を有するV_H CDR1;
- (2) 配列番号45のアミノ酸配列を有するV_H CDR2; 及び
- (3) 配列番号46のアミノ酸配列を有するV_H CDR3;

並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域:

- (1) 配列番号47のアミノ酸配列を有するV_L CDR1;
- (2) 配列番号48のアミノ酸配列を有するV_L CDR2; 及び

50

(3) 配列番号49のアミノ酸配列を有するV_L CDR3を含む、請求項38記載の抗体。

【請求項 4 4】

前記抗体が：

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域：

- (1) 配列番号27のアミノ酸配列を有するV_H CDR1；
- (2) 配列番号50のアミノ酸配列を有するV_H CDR2；及び
- (3) 配列番号29のアミノ酸配列を有するV_H CDR3；

並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域：

- (1) 配列番号30のアミノ酸配列を有するV_L CDR1；
- (2) 配列番号31のアミノ酸配列を有するV_L CDR2；及び
- (3) 配列番号32のアミノ酸配列を有するV_L CDR3

を含む、請求項38記載の抗体。

【請求項 4 5】

前記抗体が：

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域：

- (1) 配列番号53、59、64、65、及び70からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_H CDR1；

- (2) 配列番号54、60、66、71、及び76からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_H CDR2；並びに

- (3) 配列番号55、61、67、及び72からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_H CDR3；

並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域：

- (1) 配列番号56、62、68、及び73からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_L CDR1；

- (2) 配列番号57、63、及び74からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_L CDR2；

並びに

- (3) 配列番号58、59、及び75からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_L CDR3
- を含む、請求項28記載の抗体。

【請求項 4 6】

前記抗体が：

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域：

- (1) 配列番号53のアミノ酸配列を有するV_H CDR1；
- (2) 配列番号54のアミノ酸配列を有するV_H CDR2；及び
- (3) 配列番号55のアミノ酸配列を有するV_H CDR3；

並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域：

- (1) 配列番号56のアミノ酸配列を有するV_L CDR1；
- (2) 配列番号57のアミノ酸配列を有するV_L CDR2；及び
- (3) 配列番号58のアミノ酸配列を有するV_L CDR3

を含む、請求項45記載の抗体。

【請求項 4 7】

前記抗体が：

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域：

- (1) 配列番号59のアミノ酸配列を有するV_H CDR1；
- (2) 配列番号60のアミノ酸配列を有するV_H CDR2；及び
- (3) 配列番号61のアミノ酸配列を有するV_H CDR3；

並びに

10

20

30

40

50

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域:

- (1) 配列番号62のアミノ酸配列を有する V_L CDR1;
- (2) 配列番号63のアミノ酸配列を有する V_L CDR2; 及び
- (3) 配列番号58のアミノ酸配列を有する V_L CDR3

を含む、請求項45記載の抗体。

【請求項 4 8】

前記抗体が:

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域:

- (1) 配列番号64のアミノ酸配列を有する V_H CDR1;
- (2) 配列番号54のアミノ酸配列を有する V_H CDR2; 及び
- (3) 配列番号55のアミノ酸配列を有する V_H CDR3;

10

並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域:

- (1) 配列番号56のアミノ酸配列を有する V_L CDR1;
- (2) 配列番号57のアミノ酸配列を有する V_L CDR2; 及び
- (3) 配列番号58のアミノ酸配列を有する V_L CDR3

を含む、請求項45記載の抗体。

【請求項 4 9】

前記抗体が:

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域:

20

- (1) 配列番号65のアミノ酸配列を有する V_H CDR1;
- (2) 配列番号66のアミノ酸配列を有する V_H CDR2; 及び
- (3) 配列番号67のアミノ酸配列を有する V_H CDR3;

並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域:

- (1) 配列番号68のアミノ酸配列を有する V_L CDR1;
- (2) 配列番号63のアミノ酸配列を有する V_L CDR2; 及び
- (3) 配列番号69のアミノ酸配列を有する V_L CDR3

を含む、請求項45記載の抗体。

【請求項 5 0】

30

前記抗体が:

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域:

- (1) 配列番号70のアミノ酸配列を有する V_H CDR1;
- (2) 配列番号71のアミノ酸配列を有する V_H CDR2; 及び
- (3) 配列番号72のアミノ酸配列を有する V_H CDR3;

並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域:

- (1) 配列番号73のアミノ酸配列を有する V_L CDR1;
- (2) 配列番号74のアミノ酸配列を有する V_L CDR2; 及び
- (3) 配列番号75のアミノ酸配列を有する V_L CDR3

40

を含む、請求項45記載の抗体。

【請求項 5 1】

前記抗体が:

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域:

- (1) 配列番号53のアミノ酸配列を有する V_H CDR1;
- (2) 配列番号76のアミノ酸配列を有する V_H CDR2; 及び
- (3) 配列番号55のアミノ酸配列を有する V_H CDR3;

並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域:

- (1) 配列番号56のアミノ酸配列を有する V_L CDR1;

50

(2) 配列番号57のアミノ酸配列を有するV_L CDR2;及び

(3) 配列番号58のアミノ酸配列を有するV_L CDR3

を含む、請求項45記載の抗体。

【請求項52】

前記抗体が:

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域:

(1) 配列番号79、85、90、91、及び96からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_H CDR1;

(2) 配列番号80、86、92、97、及び102からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_H CDR2;並びに

(3) 配列番号81、87、93、及び98からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_H CDR3;

並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域:

(1) 配列番号82、88、94、及び99からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_L CDR1;

(2) 配列番号83、89、及び100からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_L CDR2;

(3) 配列番号84、95、及び101からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_L CDR3
を含む、請求項28記載の抗体。

【請求項53】

前記抗体が:

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域:

(1) 配列番号79のアミノ酸配列を有するV_H CDR1;

(2) 配列番号80のアミノ酸配列を有するV_H CDR2;及び

(3) 配列番号81のアミノ酸配列を有するV_H CDR3;

並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域:

(1) 配列番号82のアミノ酸配列を有するV_L CDR1;

(2) 配列番号83のアミノ酸配列を有するV_L CDR2;及び

(3) 配列番号84のアミノ酸配列を有するV_L CDR3

を含む、請求項52記載の抗体。

【請求項54】

前記抗体が:

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域:

(1) 配列番号85のアミノ酸配列を有するV_H CDR1;

(2) 配列番号86のアミノ酸配列を有するV_H CDR2;及び

(3) 配列番号87のアミノ酸配列を有するV_H CDR3;

並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域:

(1) 配列番号88のアミノ酸配列を有するV_L CDR1;

(2) 配列番号89のアミノ酸配列を有するV_L CDR2;及び

(3) 配列番号84のアミノ酸配列を有するV_L CDR3

を含む、請求項52記載の抗体。

【請求項55】

前記抗体が:

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域:

(1) 配列番号90のアミノ酸配列を有するV_H CDR1;

(2) 配列番号80のアミノ酸配列を有するV_H CDR2;及び

(3) 配列番号81のアミノ酸配列を有するV_H CDR3;

並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域:

- (1) 配列番号82のアミノ酸配列を有する V_L CDR1;
- (2) 配列番号83のアミノ酸配列を有する V_L CDR2; 及び
- (3) 配列番号84のアミノ酸配列を有する V_L CDR3

を含む、請求項52記載の抗体。

【請求項56】

前記抗体が:

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域:

- (1) 配列番号91のアミノ酸配列を有する V_H CDR1;
- (2) 配列番号92のアミノ酸配列を有する V_H CDR2; 及び
- (3) 配列番号93のアミノ酸配列を有する V_H CDR3;

10

並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域:

- (1) 配列番号94のアミノ酸配列を有する V_L CDR1;
- (2) 配列番号89のアミノ酸配列を有する V_L CDR2; 及び
- (3) 配列番号95のアミノ酸配列を有する V_L CDR3

を含む、請求項52記載の抗体。

【請求項57】

前記抗体が:

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域:

- (1) 配列番号96のアミノ酸配列を有する V_H CDR1;
- (2) 配列番号97のアミノ酸配列を有する V_H CDR2; 及び
- (3) 配列番号98のアミノ酸配列を有する V_H CDR3;

20

並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域:

- (1) 配列番号99のアミノ酸配列を有する V_L CDR1;
- (2) 配列番号100のアミノ酸配列を有する V_L CDR2; 及び
- (3) 配列番号101のアミノ酸配列を有する V_L CDR3

を含む、請求項52記載の抗体。

30

【請求項58】

前記抗体が:

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域:

- (1) 配列番号79のアミノ酸配列を有する V_H CDR1
- (2) 配列番号102のアミノ酸配列を有する V_H CDR2、及び
- (3) 配列番号81のアミノ酸配列を有する V_H CDR3;

並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域:

- (1) 配列番号82のアミノ酸配列を有する V_L CDR1;
- (2) 配列番号83のアミノ酸配列を有する V_L CDR2; 及び
- (3) 配列番号84のアミノ酸配列を有する V_L CDR3

40

を含む、請求項52記載の抗体。

【請求項59】

前記抗体が:

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域:

- (1) 配列番号105、111、116、117、及び122からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する V_H CDR1;
- (2) 配列番号106、112、118、123、及び128からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する V_H CDR2; 並びに
- (3) 配列番号107、113、119、及び124からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する V

50

_H CDR3;

並びに

(b)以下を含む軽鎖可変(_LV)領域:

(1)配列番号108、114、120、及び125からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する_LV CDR1;

(2)配列番号109、115、及び126からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する_LV CDR 2;並びに

(3)配列番号110、121、及び127からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する_LV CDR 3

を含む、請求項28記載の抗体。

10

【請求項 6 0】

前記抗体が:

(a)以下を含む重鎖可変(_HV)領域:

(1)配列番号105のアミノ酸配列を有する_HV CDR1;

(2)配列番号106のアミノ酸配列を有する_HV CDR2;及び

(3)配列番号107のアミノ酸配列を有する_HV CDR3;並びに

(b)以下を含む軽鎖可変(_LV)領域:

(1)配列番号108のアミノ酸配列を有する_LV CDR1;

(2)配列番号109のアミノ酸配列を有する_LV CDR2;及び

(3)配列番号110のアミノ酸配列を有する_LV CDR3

20

を含む、請求項59記載の抗体。

【請求項 6 1】

前記抗体が:

(a)以下を含む重鎖可変(_HV)領域:

(1)配列番号111のアミノ酸配列を有する_HV CDR1;

(2)配列番号112のアミノ酸配列を有する_HV CDR2;及び

(3)配列番号113のアミノ酸配列を有する_HV CDR3;並びに

(b)以下を含む軽鎖可変(_LV)領域:

(1)配列番号114のアミノ酸配列を有する_LV CDR1;

(2)配列番号115のアミノ酸配列を有する_LV CDR2;及び

(3)配列番号110のアミノ酸配列を有する_LV CDR3

30

を含む、請求項59記載の抗体。

【請求項 6 2】

前記抗体が:

(a)以下を含む重鎖可変(_HV)領域:

(1)配列番号116のアミノ酸配列を有する_HV CDR1;

(2)配列番号106のアミノ酸配列を有する_HV CDR2;及び

(3)配列番号107のアミノ酸配列を有する_HV CDR3;並びに

(b)以下を含む軽鎖可変(_LV)領域:

(1)配列番号108のアミノ酸配列を有する_LV CDR1;

(2)配列番号109のアミノ酸配列を有する_LV CDR2;及び

(3)配列番号110のアミノ酸配列を有する_LV CDR3

40

を含む、請求項59記載の抗体。

【請求項 6 3】

前記抗体が:

(a)以下を含む重鎖可変(_HV)領域:

(1)配列番号117のアミノ酸配列を有する_HV CDR1;

(2)配列番号118のアミノ酸配列を有する_HV CDR2;及び

(3)配列番号119のアミノ酸配列を有する_HV CDR3;並びに

(b)以下を含む軽鎖可変(_LV)領域:

50

- (1) 配列番号120のアミノ酸配列を有するV_L CDR1;
- (2) 配列番号115のアミノ酸配列を有するV_L CDR2;及び
- (3) 配列番号121のアミノ酸配列を有するV_L CDR3

を含む、請求項59記載の抗体。

【請求項 6 4】

前記抗体が:

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域:

- (1) 配列番号122のアミノ酸配列を有するV_H CDR1;
- (2) 配列番号123のアミノ酸配列を有するV_H CDR2;及び
- (3) 配列番号124のアミノ酸配列を有するV_H CDR3;

10

並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域:

- (1) 配列番号125のアミノ酸配列を有するV_L CDR1;
- (2) 配列番号126のアミノ酸配列を有するV_L CDR2;及び
- (3) 配列番号127のアミノ酸配列を有するV_L CDR3

を含む、請求項59記載の抗体。

【請求項 6 5】

前記抗体が:

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域:

- (1) 配列番号105のアミノ酸配列を有するV_H CDR1;
- (2) 配列番号128のアミノ酸配列を有するV_H CDR2;及び
- (3) 配列番号107のアミノ酸配列を有するV_H CDR3;

20

並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域:

- (1) 配列番号108のアミノ酸配列を有するV_L CDR1;
- (2) 配列番号109のアミノ酸配列を有するV_L CDR2;及び
- (3) 配列番号110のアミノ酸配列を有するV_L CDR3

を含む、請求項59記載の抗体。

【請求項 6 6】

前記抗体が:

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域:

- (1) 配列番号131、137、142、143、及び148からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_H CDR1;
- (2) 配列番号132、138、144、149、及び154からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_H CDR2;並びに
- (3) 配列番号133、139、145、及び150からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_H CDR3;

並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域:

- (1) 配列番号134、140、146、及び151からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_L CDR1;
- (2) 配列番号135、141、及び152からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_L CDR2;並びに
- (3) 配列番号136、147、及び153からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_L CDR3

を含む、請求項28記載の抗体。

【請求項 6 7】

前記抗体が:

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域:

- (1) 配列番号131のアミノ酸配列を有するV_H CDR1;

50

- (2) 配列番号132のアミノ酸配列を有するV_H CDR2;及び
- (3) 配列番号133のアミノ酸配列を有するV_H CDR3;

並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域:

- (1) 配列番号134のアミノ酸配列を有するV_L CDR1;
- (2) 配列番号135のアミノ酸配列を有するV_L CDR2;及び
- (3) 配列番号136のアミノ酸配列を有するV_L CDR3

を含む、請求項66記載の抗体。

【請求項68】

前記抗体が:

10

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域:

- (1) 配列番号137のアミノ酸配列を有するV_H CDR1;
- (2) 配列番号138のアミノ酸配列を有するV_H CDR2;及び
- (3) 配列番号139のアミノ酸配列を有するV_H CDR3;

並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域:

- (1) 配列番号140のアミノ酸配列を有するV_L CDR1;
- (2) 配列番号141のアミノ酸配列を有するV_L CDR2;及び
- (3) 配列番号136のアミノ酸配列を有するV_L CDR3

を含む、請求項66記載の抗体。

20

【請求項69】

前記抗体が:

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域:

- (1) 配列番号142のアミノ酸配列を有するV_H CDR1;
- (2) 配列番号132のアミノ酸配列を有するV_H CDR2;及び
- (3) 配列番号133のアミノ酸配列を有するV_H CDR3;

並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域:

- (1) 配列番号134のアミノ酸配列を有するV_L CDR1;
- (2) 配列番号135のアミノ酸配列を有するV_L CDR2;及び
- (3) 配列番号136のアミノ酸配列を有するV_L CDR3

を含む、請求項66記載の抗体。

30

【請求項70】

前記抗体が:

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域:

- (1) 配列番号143のアミノ酸配列を有するV_H CDR1;
- (2) 配列番号144のアミノ酸配列を有するV_H CDR2;及び
- (3) 配列番号145のアミノ酸配列を有するV_H CDR3;

並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域:

- (1) 配列番号146のアミノ酸配列を有するV_L CDR1;
- (2) 配列番号141のアミノ酸配列を有するV_L CDR2;及び
- (3) 配列番号147のアミノ酸配列を有するV_L CDR3

を含む、請求項66記載の抗体。

40

【請求項71】

前記抗体が:

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域:

- (1) 配列番号148のアミノ酸配列を有するV_H CDR1;
- (2) 配列番号149のアミノ酸配列を有するV_H CDR2;及び
- (3) 配列番号150のアミノ酸配列を有するV_H CDR3;

50

並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域:

- (1) 配列番号151のアミノ酸配列を有する V_L CDR1;
- (2) 配列番号152のアミノ酸配列を有する V_L CDR2; 及び
- (3) 配列番号153のアミノ酸配列を有する V_L CDR3

を含む、請求項66記載の抗体。

【請求項 7 2】

前記抗体が:

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域:

- (1) 配列番号131のアミノ酸配列を有する V_H CDR1;
- (2) 配列番号154のアミノ酸配列を有する V_H CDR2; 及び
- (3) 配列番号133のアミノ酸配列を有する V_H CDR3;

10

並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域:

- (1) 配列番号134のアミノ酸配列を有する V_L CDR1;
- (2) 配列番号135のアミノ酸配列を有する V_L CDR2; 及び
- (3) 配列番号136のアミノ酸配列を有する V_L CDR3

を含む、請求項66記載の抗体。

【請求項 7 3】

前記抗体が:

20

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域:

- (1) 配列番号157、163、168、169、及び174からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する V_H CDR1;
- (2) 配列番号158、164、170、175、及び180からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する V_H CDR2; 並びに
- (3) 配列番号159、165、171、及び176からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する V_H CDR3;

並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域:

- (1) 配列番号160、166、172、及び177からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する V_L CDR1;
- (2) 配列番号161、167、及び178からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する V_L CDR2; 並びに
- (3) 配列番号162、173、及び179からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する V_L CDR3

を含む、請求項28記載の抗体。

【請求項 7 4】

前記抗体が:

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域:

- (1) 配列番号157のアミノ酸配列を有する V_H CDR1;
- (2) 配列番号158のアミノ酸配列を有する V_H CDR2; 及び
- (3) 配列番号159のアミノ酸配列を有する V_H CDR3;

40

並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域:

- (1) 配列番号160のアミノ酸配列を有する V_L CDR1;
- (2) 配列番号161のアミノ酸配列を有する V_L CDR2; 及び
- (3) 配列番号162のアミノ酸配列を有する V_L CDR3

を含む、請求項73記載の抗体。

【請求項 7 5】

前記抗体が:

50

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域:

- (1) 配列番号163のアミノ酸配列を有する V_H CDR1;
- (2) 配列番号164のアミノ酸配列を有する V_H CDR2; 及び
- (3) 配列番号165のアミノ酸配列を有する V_H CDR3;

並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域:

- (1) 配列番号166のアミノ酸配列を有する V_L CDR1;
- (2) 配列番号167のアミノ酸配列を有する V_L CDR2; 及び
- (3) 配列番号162のアミノ酸配列を有する V_L CDR3

を含む、請求項73記載の抗体。

10

【請求項76】

前記抗体が:

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域:

- (1) 配列番号168のアミノ酸配列を有する V_H CDR1;
- (2) 配列番号158のアミノ酸配列を有する V_H CDR2; 及び
- (3) 配列番号159のアミノ酸配列を有する V_H CDR3;

並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域:

- (1) 配列番号160のアミノ酸配列を有する V_L CDR1;
- (2) 配列番号161のアミノ酸配列を有する V_L CDR2; 及び
- (3) 配列番号162のアミノ酸配列を有する V_L CDR3

を含む、請求項73記載の抗体。

20

【請求項77】

前記抗体が:

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域:

- (1) 配列番号169のアミノ酸配列を有する V_H CDR1;
- (2) 配列番号170のアミノ酸配列を有する V_H CDR2; 及び
- (3) 配列番号171のアミノ酸配列を有する V_H CDR3;

並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域:

- (1) 配列番号172のアミノ酸配列を有する V_L CDR1;
- (2) 配列番号167のアミノ酸配列を有する V_L CDR2; 及び
- (3) 配列番号173のアミノ酸配列を有する V_L CDR3

を含む、請求項73記載の抗体。

30

【請求項78】

前記抗体が:

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域:

- (1) 配列番号174のアミノ酸配列を有する V_H CDR1;
- (2) 配列番号175のアミノ酸配列を有する V_H CDR2; 及び
- (3) 配列番号176のアミノ酸配列を有する V_H CDR3;

並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域:

- (1) 配列番号177のアミノ酸配列を有する V_L CDR1;
- (2) 配列番号178のアミノ酸配列を有する V_L CDR2; 及び
- (3) 配列番号179のアミノ酸配列を有する V_L CDR3

を含む、請求項73記載の抗体。

40

【請求項79】

前記抗体が:

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域:

- (1) 配列番号157のアミノ酸配列を有する V_H CDR1;

50

- (2) 配列番号180のアミノ酸配列を有するV_H CDR2;及び
 (3) 配列番号159のアミノ酸配列を有するV_H CDR3;

並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域:

- (1) 配列番号160のアミノ酸配列を有するV_L CDR1;
 (2) 配列番号161のアミノ酸配列を有するV_L CDR2;及び
 (3) 配列番号162のアミノ酸配列を有するV_L CDR3

を含む、請求項73記載の抗体。

【請求項 8 0】

前記抗体が:

10

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域:

- (1) 配列番号183、189、194、195、及び200からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_H CDR1;
 (2) 配列番号184、190、196、201、及び206からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_H CDR2;並びに
 (3) 配列番号185、191、197、及び202からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_H CDR3;

並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域:

- (1) 配列番号186、192、198、及び203からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_L CDR1; 20

- (2) 配列番号187、193、及び204からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_L CDR 2;並びに

- (3) 配列番号188、199、及び205からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_L CDR 3

を含む、請求項28記載の抗体。

【請求項 8 1】

前記抗体が:

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域:

- (1) 配列番号183のアミノ酸配列を有するV_H CDR1; 30
 (2) 配列番号184のアミノ酸配列を有するV_H CDR2;及び
 (3) 配列番号185のアミノ酸配列を有するV_H CDR3;

並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域:

- (1) 配列番号186のアミノ酸配列を有するV_L CDR1;
 (2) 配列番号187のアミノ酸配列を有するV_L CDR2;及び
 (3) 配列番号188のアミノ酸配列を有するV_L CDR3

を含む、請求項80記載の抗体。

【請求項 8 2】

前記抗体が:

40

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域:

- (1) 配列番号189のアミノ酸配列を有するV_H CDR1;
 (2) 配列番号190のアミノ酸配列を有するV_H CDR2;及び
 (3) 配列番号191のアミノ酸配列を有するV_H CDR3;

並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域:

- (1) 配列番号192のアミノ酸配列を有するV_L CDR1;
 (2) 配列番号193のアミノ酸配列を有するV_L CDR2;及び
 (3) 配列番号188のアミノ酸配列を有するV_L CDR3

を含む、請求項80記載の抗体。

50

【請求項 8 3】

前記抗体が：

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域：

- (1) 配列番号194のアミノ酸配列を有する V_H CDR1；
- (2) 配列番号184のアミノ酸配列を有する V_H CDR2；及び
- (3) 配列番号185のアミノ酸配列を有する V_H CDR3；

並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域：

- (1) 配列番号186のアミノ酸配列を有する V_L CDR1；
- (2) 配列番号187のアミノ酸配列を有する V_L CDR2；及び
- (3) 配列番号188のアミノ酸配列を有する V_L CDR3

を含む、請求項80記載の抗体。

10

【請求項 8 4】

前記抗体が：

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域：

- (1) 配列番号195のアミノ酸配列を有する V_H CDR1；
- (2) 配列番号196のアミノ酸配列を有する V_H CDR2；及び
- (3) 配列番号197のアミノ酸配列を有する V_H CDR3；

並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域：

- (1) 配列番号198のアミノ酸配列を有する V_L CDR1；
- (2) 配列番号193のアミノ酸配列を有する V_L CDR2；及び
- (3) 配列番号199のアミノ酸配列を有する V_L CDR3

を含む、請求項80記載の抗体。

20

【請求項 8 5】

前記抗体が：

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域：

- (1) 配列番号200のアミノ酸配列を有する V_H CDR1；
- (2) 配列番号201のアミノ酸配列を有する V_H CDR2；及び
- (3) 配列番号202のアミノ酸配列を有する V_H CDR3；

並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域：

- (1) 配列番号203のアミノ酸配列を有する V_L CDR1；
- (2) 配列番号204のアミノ酸配列を有する V_L CDR2；及び
- (3) 配列番号205のアミノ酸配列を有する V_L CDR3

を含む、請求項80記載の抗体。

30

【請求項 8 6】

前記抗体が：

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域：

- (1) 配列番号183のアミノ酸配列を有する V_H CDR1；
- (2) 配列番号206のアミノ酸配列を有する V_H CDR2；及び
- (3) 配列番号185のアミノ酸配列を有する V_H CDR3；

並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域：

- (1) 配列番号186のアミノ酸配列を有する V_L CDR1；
- (2) 配列番号187のアミノ酸配列を有する V_L CDR2；及び
- (3) 配列番号188のアミノ酸配列を有する V_L CDR3

を含む、請求項80記載の抗体。

40

【請求項 8 7】

前記抗体が：

50

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域:

(1) 配列番号209、215、220、221、及び226からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する V_H CDR1;

(2) 配列番号210、216、222、227、及び232からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する V_H CDR2;

(3) 配列番号211、217、223、及び228からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する V_H CDR3;

並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域:

(1) 配列番号212、218、224、及び229からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する V_L CDR1; 10

(2) 配列番号213、219、及び230からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する V_L CDR2; 並びに

(3) 配列番号214、225、及び231からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する V_L CDR3

を含む、請求項28記載の抗体。

【請求項 8 8】

前記抗体が:

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域:

(1) 配列番号209のアミノ酸配列を有する V_H CDR1; 20

(2) 配列番号210のアミノ酸配列を有する V_H CDR2; 及び

(3) 配列番号211のアミノ酸配列を有する V_H CDR3;

並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域:

(1) 配列番号212のアミノ酸配列を有する V_L CDR1;

(2) 配列番号213のアミノ酸配列を有する V_L CDR2; 及び

(3) 配列番号214のアミノ酸配列を有する V_L CDR3

を含む、請求項87記載の抗体。

【請求項 8 9】

前記抗体が:

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域:

(1) 配列番号215のアミノ酸配列を有する V_H CDR1;

(2) 配列番号216のアミノ酸配列を有する V_H CDR2; 及び

(3) 配列番号217のアミノ酸配列を有する V_H CDR3;

並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域:

(1) 配列番号218のアミノ酸配列を有する V_L CDR1;

(2) 配列番号219のアミノ酸配列を有する V_L CDR2; 及び

(3) 配列番号214のアミノ酸配列を有する V_L CDR3

を含む、請求項87記載の抗体。 40

【請求項 9 0】

前記抗体が:

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域:

(1) 配列番号220のアミノ酸配列を有する V_H CDR1;

(2) 配列番号210のアミノ酸配列を有する V_H CDR2; 及び

(3) 配列番号211のアミノ酸配列を有する V_H CDR3;

並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域:

(1) 配列番号212のアミノ酸配列を有する V_L CDR1;

(2) 配列番号213のアミノ酸配列を有する V_L CDR2; 及び 50

(3) 配列番号214のアミノ酸配列を有するV_L CDR3を含む、請求項87記載の抗体。

【請求項 9 1】

前記抗体が：

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域：

- (1) 配列番号221のアミノ酸配列を有するV_H CDR1；
- (2) 配列番号222のアミノ酸配列を有するV_H CDR2；及び
- (3) 配列番号223のアミノ酸配列を有するV_H CDR3；

並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域：

- (1) 配列番号224のアミノ酸配列を有するV_L CDR1；
- (2) 配列番号219のアミノ酸配列を有するV_L CDR2；及び
- (3) 配列番号225のアミノ酸配列を有するV_L CDR3

を含む、請求項87記載の抗体。

【請求項 9 2】

前記抗体が：

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域：

- (1) 配列番号226のアミノ酸配列を有するV_H CDR1；
- (2) 配列番号227のアミノ酸配列を有するV_H CDR2；及び
- (3) 配列番号228のアミノ酸配列を有するV_H CDR3；

並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域：

- (1) 配列番号229のアミノ酸配列を有するV_L CDR1；
- (2) 配列番号230のアミノ酸配列を有するV_L CDR2；及び
- (3) 配列番号231のアミノ酸配列を有するV_L CDR3

を含む、請求項87記載の抗体。

【請求項 9 3】

前記抗体が：

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域：

- (1) 配列番号209のアミノ酸配列を有するV_H CDR1；
- (2) 配列番号232のアミノ酸配列を有するV_H CDR2；及び
- (3) 配列番号211のアミノ酸配列を有するV_H CDR3；

並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域：

- (1) 配列番号212のアミノ酸配列を有するV_L CDR1；
- (2) 配列番号213のアミノ酸配列を有するV_L CDR2；及び
- (3) 配列番号214のアミノ酸配列を有するV_L CDR3

を含む、請求項87記載の抗体。

【請求項 9 4】

前記抗体が：

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域：

(1) 配列番号235、241、246、247、及び252からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_H CDR1；

(2) 配列番号236、242、248、253、及び258からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_H CDR2；並びに

(3) 配列番号237、243、249、及び254からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_H CDR3；

並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域：

(1) 配列番号238、244、250、及び255からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV

10

20

30

40

50

_L CDR1;

(2) 配列番号239、245、及び256からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_L CDR2;並びに

(3) 配列番号240、251、及び257からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_L CDR3

を含む、請求項28記載の抗体。

【請求項 9 5】

前記抗体が:

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域:

(1) 配列番号235のアミノ酸配列を有するV_H CDR1;

10

(2) 配列番号236のアミノ酸配列を有するV_H CDR2;及び

(3) 配列番号237のアミノ酸配列を有するV_H CDR3;

並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域:

(1) 配列番号238のアミノ酸配列を有するV_L CDR1;

(2) 配列番号239のアミノ酸配列を有するV_L CDR2;及び

(3) 配列番号240のアミノ酸配列を有するV_L CDR3

を含む、請求項94記載の抗体。

【請求項 9 6】

前記抗体が:

20

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域:

(1) 配列番号241のアミノ酸配列を有するV_H CDR1;

(2) 配列番号242のアミノ酸配列を有するV_H CDR2;及び

(3) 配列番号243のアミノ酸配列を有するV_H CDR3;

並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域:

(1) 配列番号244のアミノ酸配列を有するV_L CDR1;

(2) 配列番号245のアミノ酸配列を有するV_L CDR2;及び

(3) 配列番号240のアミノ酸配列を有するV_L CDR3

を含む、請求項94記載の抗体。

30

【請求項 9 7】

前記抗体が:

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域:

(1) 配列番号246のアミノ酸配列を有するV_H CDR1;

(2) 配列番号236のアミノ酸配列を有するV_H CDR2;及び

(3) 配列番号237のアミノ酸配列を有するV_H CDR3;

並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域:

(1) 配列番号238のアミノ酸配列を有するV_L CDR1;

(2) 配列番号239のアミノ酸配列を有するV_L CDR2;及び

(3) 配列番号240のアミノ酸配列を有するV_L CDR3

を含む、請求項94記載の抗体。

40

【請求項 9 8】

前記抗体が:

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域:

(1) 配列番号247のアミノ酸配列を有するV_H CDR1;

(2) 配列番号248のアミノ酸配列を有するV_H CDR2;及び

(3) 配列番号249のアミノ酸配列を有するV_H CDR3;

並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域:

50

- (1) 配列番号250のアミノ酸配列を有するV_L CDR1;
- (2) 配列番号245のアミノ酸配列を有するV_L CDR2;及び
- (3) 配列番号251のアミノ酸配列を有するV_L CDR3

を含む、請求項94記載の抗体。

【請求項 9 9】

前記抗体が:

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域:

- (1) 配列番号252のアミノ酸配列を有するV_H CDR1;
- (2) 配列番号253のアミノ酸配列を有するV_H CDR2;及び
- (3) 配列番号254のアミノ酸配列を有するV_H CDR3;

10

並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域:

- (1) 配列番号255のアミノ酸配列を有するV_L CDR1;
- (2) 配列番号256のアミノ酸配列を有するV_L CDR2;及び
- (3) 配列番号257のアミノ酸配列を有するV_L CDR3

を含む、請求項94記載の抗体。

【請求項 1 0 0】

前記抗体が:

(a) 以下を含む重鎖可変(V_H)領域:

- (1) 配列番号235のアミノ酸配列を有するV_H CDR1;
- (2) 配列番号258のアミノ酸配列を有するV_H CDR2;及び
- (3) 配列番号237のアミノ酸配列を有するV_H CDR3;

20

並びに

(b) 以下を含む軽鎖可変(V_L)領域:

- (1) 配列番号238のアミノ酸配列を有するV_L CDR1;
- (2) 配列番号239のアミノ酸配列を有するV_L CDR2;及び
- (3) 配列番号240のアミノ酸配列を有するV_L CDR3

を含む、請求項94記載の抗体。

【請求項 1 0 1】

前記V_H領域及び/又はV_L領域がヒトフレームワーク配列をさらに含む、請求項28~100のいずれか一項記載の抗体。

30

【請求項 1 0 2】

前記V_H領域及び/又はV_L領域が、フレームワーク1(FR1)、フレームワーク2(FR2)、フレームワーク3(FR3)、及び/又はフレームワーク4(FR4)配列をさらに含む、請求項28~100のいずれか一項記載の抗体。

【請求項 1 0 3】

前記抗体又はその結合断片が:

(a) 以下をさらに含む重鎖可変(V_H)領域:

(1) 配列番号278、279、280、及び378からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するFR1;

40

(2) 配列番号281、282、及び283からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するFR2;

(3) 配列番号284、285、286、287、及び379~381からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するFR3;並びに

(4) 配列番号288のアミノ酸配列を有するFR4;

並びに/又は

(b) 以下をさらに含む軽鎖可変(V_L)領域:

(1) 配列番号289、290、及び382~384からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するFR1;

(2) 配列番号291、292、及び385~392からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するFR2;

50

(3) 配列番号293、294、295、及び393～404からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するFR3;並びに

(4) 配列番号296及び405～407からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するFR4を含む、請求項28～100のいずれか一項記載の抗体。

【請求項104】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項1～103のいずれか一項記載の抗体又は断片。

【請求項105】

前記モノクローナル抗体が、ヒト化、ヒト、又はキメラ抗体である、請求項104記載の抗体又は断片。

【請求項106】

前記断片が、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、scFv、(scFv)₂、単鎖抗体分子、二重可変領域抗体、単一可変領域抗体、直鎖抗体、V領域、又は抗体断片から形成された多重特異性抗体である、請求項1～105のいずれか一項記載の抗体又はその断片。

【請求項107】

前記抗体又は断片が検出可能マーカーにコンジュゲートされている、請求項1～106のいずれか一項記載の抗体又は断片。

【請求項108】

前記検出可能マーカーが、放射性同位体、金属キレート剤、酵素、蛍光化合物、生体発光化合物、及び化学発光化合物から選択される、請求項107記載の抗体又は断片。

【請求項109】

請求項1～108のいずれか一項記載の抗体と本質的に同じエピトープに結合する結合物質。

【請求項110】

前記結合物質が、βクロトー及びFGF受容体を発現する細胞でFGF19及び/又はFGF21媒介性シグナル伝達を誘導する、請求項109記載の結合物質。

【請求項111】

抗体又はその断片である、請求項109記載の結合物質。

【請求項112】

アンチカリン、アドネクチン、アフィボディ、DARPin、フィノマー、アフィチン、アフィリン、アビマー、システインリッチノッチンペプチド、又は人工クニッツ型インヒビターである、請求項109記載の結合物質。

【請求項113】

βクロトーに結合することができる結合物質であって、請求項1～108のいずれか一項記載の抗体が競合結合アッセイで該結合物質に置き換わる、前記結合物質。

【請求項114】

βクロトーに結合することができる結合物質であって、該結合物質が競合結合アッセイで請求項1～108のいずれか一項記載の抗体に置き換わる、前記結合物質。

【請求項115】

前記結合物質が、抗体又はその断片である、請求項114記載の結合物質。

【請求項116】

前記結合物質が、抗体又はその断片である、請求項114記載の結合物質。

【請求項117】

請求項1～108のいずれか一項記載のモノクローナル抗体を産生するトランスジェニック動物。

【請求項118】

請求項1～108のいずれか一項記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項119】

請求項1～108のいずれか一項記載の抗体又はその断片をコードするポリヌクレオチドを含むベクター。

10

20

30

40

50

【請求項 1 2 0】

請求項1~108のいずれか一項記載の抗体又はその断片、及び医薬として許容し得る担体を含む医薬組成物。

【請求項 1 2 1】

βクロトー及びFGF受容体を発現する細胞でFGF19様及び/又はFGF21様シグナル伝達を誘導する方法であって、該細胞を請求項1~108のいずれか一項記載の抗体又は断片と接触させることを含む、前記方法。

【請求項 1 2 2】

βクロトー及びFGF受容体を発現する細胞でβクロトー/FGF受容体複合体を活性化する方法であって、該細胞を請求項1~108のいずれか一項記載の抗体又は断片と接触させることを含む、前記方法。

10

【請求項 1 2 3】

前記細胞が、ヒトβクロトー及びヒトFGF受容体ICを発現する、請求項121又は122記載の方法。

【請求項 1 2 4】

対象におけるグルコース代謝を改善する方法であって、該対象に、請求項1~108のいずれか一項記載の抗体もしくはその断片又は請求項120記載の医薬組成物を投与することを含む、前記方法。

【請求項 1 2 5】

前記グルコース代謝の改善が、グルコースレベルの低下、インスリン感受性の増加、インスリン抵抗性の低下、グルカゴンの低下、グルコース耐性の向上、及び/又は膵臓機能の向上である、請求項124記載の方法。

20

【請求項 1 2 6】

前記対象に、前記抗体又はその断片と組み合わせた1以上の治療剤を投与し、ここで、該治療剤が、鎮痛剤、麻酔剤、抗生物質、又は免疫調節剤である、請求項124記載の方法。

【請求項 1 2 7】

前記1以上の治療剤が、非ステロイド性抗炎症薬(NSAID)、プロピオン酸誘導体、酢酸誘導体、フェナム酸誘導体、ビフェニルカルボン酸誘導体、オキシカム、サリチレート、又はピラズロンから選択される、請求項126記載の方法。

30

【請求項 1 2 8】

前記1以上の治療剤が、ビグアニド及びスルホニルウレア、チアゾリジンジオン、GLP-1類似体、PPARγアゴニスト、ジペプチジルペプチダーゼ-4(DPP-4)阻害剤、プロモクリプチン製剤、胆汁酸隔離剤、インスリン、αグルコシダーゼ阻害剤、メトホルミン、SGLT-2阻害剤、食欲抑制薬、又は減量薬から選択される、請求項126記載の方法。

【請求項 1 2 9】

前記グルコース代謝の改善が血液グルコースレベルの低下と関連している、請求項124記載の方法。

【請求項 1 3 0】

生体試料中のβクロトーの存在を検出する方法であって、該生体試料を、請求項1~108のいずれか一項記載の抗体と、βクロトーに対する該抗体の結合が可能な条件下で接触させ、複合体が該抗体とβクロトーの間で形成されるかどうかを検出することを含む、前記方法。

40

【請求項 1 3 1】

前記生体試料が、2型糖尿病、肥満、脂質異常症、NASH、心血管疾患、又はメタボリックシンドロームを有するか又はこれらを有することが疑われる哺乳動物に由来するものである、請求項130記載の方法。

【請求項 1 3 2】

対象の疾患、障害、又は疾病において使用するためのものである医薬の製造における、請求項1~108のいずれか一項記載の抗体又はその断片の使用であって、該抗体又は断片を

50

該対象に投与することを含む、前記使用。

【請求項 1 3 3】

対象の疾患、障害、又は疾病において使用するためのものである医薬の製造における、請求項120記載の医薬組成物の使用であって、該方法が該医薬組成物を該対象に投与することを含む、前記使用。

【請求項 1 3 4】

生体試料中のβクロトーの存在を検出する方法で使用するための組成物の製造における、請求項1～108のいずれか一項記載の抗体又はその断片の使用であって、該方法が、該生体試料を、該抗体と、βクロトーに対する該抗体の結合が可能な条件下で接触させること、及び、複合体が該抗体とβクロトーの間で形成されるかどうかを検出することを含む、前記使用。

10

【請求項 1 3 5】

ヒトβクロトーに結合する抗体又はその断片であって、該抗体が、配列番号297のアミノ酸残基509～1044を含むヒトβクロトーのKLB2ドメインに結合する、前記抗体又はその断片。

【請求項 1 3 6】

ヒトβクロトーに結合する抗体又はその断片であって、該抗体が、配列番号297のアミノ酸残基517～967を含むヒトβクロトーのKLB2ドメインのグリコシルヒドロラーゼ1領域に結合する、前記抗体又はその断片。

【請求項 1 3 7】

ヒトβクロトーに結合する抗体又はその断片であって、該抗体が、配列番号297のアミノ酸残基657～703を含むヒトβクロトーの領域に結合する、前記抗体又はその断片。

20

【請求項 1 3 8】

カニクイザルβクロトーに結合する抗体又はその断片であって、該抗体が、配列番号299のアミノ酸残基657～703を含むカニクイザルβクロトーの領域に結合する、前記抗体又はその断片。

【請求項 1 3 9】

ヒトβクロトーに結合する抗体又はその断片であって、該抗体が、配列番号297のアミノ酸残基657、701、及び/もしくは703のうちの少なくとも1つを含むヒトβクロトーのエピトープに結合するか、該抗体が、ヒトβクロトー及びFGF受容体を発現する細胞でFGF19様シグナル伝達及び/もしくはFGF21様シグナル伝達を誘導するか、又は該抗体が、ヒトβクロトー及びFGF受容体を発現する細胞でβクロトー/FGF受容体複合体を活性化する、前記抗体又はその断片。

30

【請求項 1 4 0】

前記ヒトβクロトーのエピトープが、配列番号297の少なくともアミノ酸残基657を含む、請求項139記載の抗体又はその断片。

【請求項 1 4 1】

前記ヒトβクロトーのエピトープが、配列番号297の少なくともアミノ酸残基701を含む、請求項139記載の抗体又はその断片。

【請求項 1 4 2】

前記ヒトβクロトーのエピトープが、配列番号297の少なくともアミノ酸残基703を含む、請求項139記載の抗体又はその断片。

40

【請求項 1 4 3】

前記ヒトβクロトーのエピトープが、配列番号297の少なくともアミノ酸残基657及び701を含む、請求項139記載の抗体又はその断片。

【請求項 1 4 4】

前記ヒトβクロトーのエピトープが、配列番号297の少なくともアミノ酸残基657及び703を含む、請求項139記載の抗体又はその断片。

【請求項 1 4 5】

前記ヒトβクロトーのエピトープが、配列番号297の少なくともアミノ酸残基701及び70

50

3を含む、請求項139記載の抗体又はその断片。

【請求項146】

前記ヒト β クロトーのエピトープが、配列番号297の少なくともアミノ酸残基657、701、及び703を含む、請求項139記載の抗体又はその断片。

【請求項147】

前記抗体又はその断片がモノクローナル抗体である、請求項135～146のいずれか一項記載の抗体又はその断片。

【請求項148】

前記抗体又はその断片が、ヒト化、ヒト、又はキメラモノクローナル抗体である、請求項135～147のいずれか一項記載の抗体又はその断片。

【請求項149】

前記抗体又はその断片がアゴニスト抗体である、請求項135～148のいずれか一項記載の抗体又はその断片。

【請求項150】

前記アゴニスト抗体又はその断片が、FGF受容体のFGF19様シグナル伝達及び/又はFGF21様シグナル伝達を誘導する、請求項149記載の抗体又はその断片。

【請求項151】

前記アゴニスト抗体が、 β クロトー/FGF受容体複合体を活性化する、請求項149記載の抗体又はその断片。

【請求項152】

請求項135～151のいずれか一項記載の抗体又はその断片、及び医薬として許容し得る担体を含む医薬組成物。

【請求項153】

対象の2型糖尿病、肥満、脂質異常症、NASH、心血管疾患、又はメタボリックシンドロームを治療する方法であって、対象に、請求項1～108及び135～151のいずれか一項記載の抗体又はその断片又は請求項120もしくは152記載の医薬組成物を投与することを含む、前記方法。

【請求項154】

代謝パラメータを改善する方法であって、対象に、請求項1～108及び135～151のいずれか一項記載の抗体又はその断片又は請求項120もしくは152記載の医薬組成物を投与することを含む、前記方法。

【請求項155】

前記代謝パラメータの改善が、体重、体格指数、腹囲、皮下脂肪厚、グルコース、インスリン、及び/又はトリグリセリドの減少である、請求項154記載の方法。

【請求項156】

前記対象に、前記抗体又はその断片と組み合わせた1以上の治療剤を投与し、ここで、該治療剤が、鎮痛剤、麻酔剤、抗生物質、又は免疫調節剤である、請求項153～155のいずれか一項記載の方法。

【請求項157】

前記1以上の治療剤が、非ステロイド性抗炎症薬(NSAID)、プロピオン酸誘導体、酢酸誘導体、フェナム酸誘導体、ビフェニルカルボン酸誘導体、オキシカム、サリチレート、又はピラズロンから選択される、請求項153～155のいずれか一項記載の方法。

【請求項158】

前記1以上の治療剤が、ビグアニド及びスルホニルウレア、チアゾリジンジオン、GLP-1類似体、PPAR γ アゴニスト、ジペプチジルペプチダーゼ-4(DPP-4)阻害剤、プロモクリプチン製剤、胆汁酸隔離剤、インスリン、 α グルコシダーゼ阻害剤、メトホルミン、SGLT-2阻害剤、食欲抑制薬、又は減量薬から選択される、請求項153～155のいずれか一項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

20

30

40

50

【0001】

(関連出願の相互参照)

本出願は、その内容全体が引用により本明細書中に組み込まれる、2014年1月24日に出願された米国仮特許出願第61/931,531号の優先権の恩典を主張する。

【0002】

(分野)

本開示は、全体として、ヒトβクロトーを含むβクロトーに結合する結合タンパク質、例えば、抗体及びその使用方法に関する。

【背景技術】

【0003】

(背景)

クロトーファミリーに属するβクロトーは、1回膜貫通型のI型膜タンパク質である。βクロトーは、ファミリー1グリコシダーゼのメンバーとの相同性を共有するが、グルコシダーゼ触媒活性を欠く2つの内部反復からなる細胞外ドメインを有する。βクロトー発現は、主に、肝臓、膵臓、及び脂肪組織で検出される。Ito及び共同研究者らは、βクロトー欠損(KLB^{-/-})マウスが、CYP7A1及びCY8B1の上昇したmRNAレベルを有し、胆汁酸の増大した合成及び排出を示すことを報告している(Itoらの文献、2005, J Clin Invest 115: 202-2208)。βクロトーは、線維芽細胞成長因子(FGF)受容体との複合体を形成し、FGF19及びFGF21を含むFGFの共受容体として機能する。

【0004】

ヒトFGFファミリーの22のメンバーが同定されており、FGFに結合する4つのチロシンキナーゼ受容体(FGFR1~FGFR4)が同定されている。FGFとその受容体の相互作用は、FGFRの二量体化をもたらし、これが、該受容体の細胞質ドメインのトランスリン酸化及び活性化を可能にし、これがさらに、下流のシグナル伝達分子のリン酸化及び活性化を引き起こす。

【0005】

FGF19の高親和性受容体はFGFR4であり、FGF19のFGFR4への結合はβクロトーによって促進される。FGF19トランスジェニックマウスは、減少した肥満度、増加した代謝速度、低下した肝臓トリグリセリド、増加した脂肪酸酸化、低下したグルコースレベル、及び増加したインスリン感受性を有することが報告されている(Tomlinsonらの文献、2002, Endocrinology 143: 1741-1747)。さらに、これらのトランスジェニックマウスは、高脂肪食で肥満にも糖尿病にもならないことが報告された(Tomlinsonらの文献、2002, Endocrinology 143: 1741-1747)。FGF19処置により、褐色脂肪組織の遺伝的除去又はレプチンの遺伝的欠如によって肥満にさせられたマウスの糖尿病が予防されたか又は反転したことも報告されている(Fuらの文献、2004, Endocrinology 145: 2594-2603)。

【0006】

FGF21は、FGFRとβクロトーの相互作用を介して作用する。FGFR1は、白色脂肪組織内の豊富に存在する受容体であり、白色脂肪組織内のFGF21の主な機能的受容体である可能性が最も高い。FGF21発現は、肝臓、胸腺、脂肪組織、及び膵臓の島β細胞で検出される。FGF21とβクロトー-FGFR複合体との相互作用は、グルコースの取込みを刺激し、グルカゴン分泌を減少させ、インスリン感受性及びグルコースクリアランスを向上させ、空腹にตอบสนองして白色脂肪組織を促進し、空腹にตอบสนองして肝臓でのケトン生成を増加させ、血漿トリグリセリドレベルを低下させ、エネルギー消費を増加させることが報告されている(Iglesiassらの文献、2012, European Journal of Endocrinology 167: 301-309)。

【0007】

FGF19及びFGF21は、細胞シグナル伝達にFGFRとβクロトーの両方を必要とするので、FGF19及び/又はFGF21を模倣する薬剤は、それらの作用又はグルコース代謝又は脂肪代謝に望ましい可能性がある。しかしながら、薬剤がFGF19様又はFGF21様細胞シグナル伝達活性を付与するのにどの特徴が必要とされるのかは不明である。

【発明の概要】

【0008】

(概要)

本開示は、 β クロトーに結合する抗体などの結合タンパク質を含む、 β クロトーに結合するタンパク質を提供する。抗体を含む、そのような結合タンパク質は、 β クロトーポリペプチド、 β クロトー断片、及び/又は β クロトーエピトープに結合することができる。抗体を含む、そのような結合タンパク質は、アゴニストである(例えば、FGF受容体のFGF19様もしくはFGF21様シグナル伝達を誘導するか、又は β クロトー/FGF受容体複合体を活性化すること)ことができる。

【0009】

本開示は、(i)ヒト β クロトーに結合し、(ii)FGF19様シグナル伝達及び/又はFGF21様シグナル伝達を誘導し、かつ(iii) β クロトーとの相互作用をFGF19及び/又はFGF21と競合しない、抗体又はその断片を含む、結合タンパク質も提供する。

【0010】

いくつかの実施態様において、抗 β クロトー抗体は、 β クロトーポリペプチド、 β クロトー断片、又は β クロトーエピトープに結合するヒト化抗体である。ある実施態様において、抗 β クロトー抗体は、本明細書に記載される5H23、1C17、1D19、2L12、3L3、3N20、4P5、5C23、5F7、もしくは1G19と表記されたモノクローナル抗体、又はこれらのヒト化変異体のVH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2、及び/又はVL CDR3を含む。ある実施態様において、抗 β クロトー抗体は、ヒト免疫グロブリンアミノ酸配列又はその変異体のVH FR1、VH FR2、VH FR3、VH FR4、VL FR1、VL FR2、VL FR3、及び/又はVL FR4をさらに含むことができる。

【0011】

いくつかの実施態様において、結合タンパク質(例えば、抗 β クロトー抗体)は、6つのCDR又は6つ未満のCDRを含む。いくつかの実施態様において、結合タンパク質(例えば、抗 β クロトー抗体)は、VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2、及び/又はVL CDR3から選択される1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、又は6つのCDRを含む。いくつかの実施態様において、結合タンパク質(例えば、抗 β クロトー抗体)は、本明細書に記載される5H23、1C17、1D19、2L12、3L3、3N20、4P5、5C23、5F7、もしくは1G19と表記されたモノクローナル抗体、又はこれらのヒト化変異体のVH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2、及び/又はVL CDR3から選択される1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、又は6つのCDRを含む。いくつかの実施態様において、結合タンパク質(例えば、抗 β クロトー抗体)は、ヒト免疫グロブリンアミノ酸配列又はその変異体のVH FR1、VH FR2、VH FR3、VH FR4、VL FR1、VL FR2、VL FR3、及び/又はVL FR4を含む、スキヤフォールド領域又はフレームワーク領域をさらに含む。

【0012】

いくつかの実施態様において、抗体は、ヒト化抗体、モノクローナル抗体、組換え抗体、抗原結合断片、又はこれらの任意の組合せである。いくつかの実施態様において、抗体は、 β クロトーポリペプチド(例えば、細胞表面に発現されたもしくは可溶性の β クロトー)、 β クロトー断片、又は β クロトーエピトープに結合するヒト化モノクローナル抗体又はその抗原結合断片である。

【0013】

本開示はまた、(i)本明細書に提供される抗 β クロトー抗体が、 β クロトーポリペプチド(例えば、細胞表面に発現されたもしくは可溶性の β クロトー)、 β クロトー断片、又は β クロトーエピトープに結合するのを(例えば、用量依存的に)競合的に阻止し、及び/或いは(ii)本明細書に提供される抗 β クロトー抗体によって結合される β クロトーエピトープに結合する、結合タンパク質、例えば、抗 β クロトー抗体を提供する。他の実施態様において、結合タンパク質、例えば、抗 β クロトー抗体は、本明細書に記載されるモノクローナル抗体5H23もしくは1G19又はこれらのヒト化変異体が、 β クロトーポリペプチド(例えば、細胞表面に発現されたもしくは可溶性の β クロトー)、 β クロトー断片、又は β クロトーエピトープに結合するのを(例えば、用量依存的に)競合的に阻止する。他の実施態

様において、結合タンパク質、例えば、抗 β クロトー抗体は、本明細書に記載されるモノクローナル抗体5H23もしくは1G19又はこれらのヒト化変異体によって結合される(例えば、認識される) β クロトーエピトープに結合する。

【0014】

本開示はまた、(i)配列番号25のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域及び配列番号26のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む抗体によって認識されるヒト β クロトー及びカニクイザル β クロトーのエピトープに結合するか;又は(ii)配列番号25のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域及び配列番号26のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む抗体とヒト β クロトーへの結合を競合する、抗体又はその断片を含む、結合タンパク質を提供する。いくつかの実施態様において、ヒト β クロトー又はカニクイザル(cyno) β クロトーの領域(エピトープを含む)に結合する、抗体又はその断片を含む、結合タンパク質が本明細書に提供される。いくつかの実施態様において、抗体又はその断片を含む、結合タンパク質は、ヒト β クロトー又はカニクイザル β クロトーの領域に結合し、これには、例えば:(i)配列番号297のアミノ酸残基509~1044を含むヒト β クロトーのKLB2ドメイン;(ii)配列番号297のアミノ酸残基517~967を含むヒト β クロトーのKLB2ドメインのグリコシルヒドロラーゼ1領域;(iii)配列番号297のアミノ酸残基657~703を含むヒト β クロトーの領域;又は(iv)配列番号299のアミノ酸残基657~703を含むカニクイザル β クロトーの領域に結合するものが含まれる。

【0015】

いくつかの実施態様において、ヒト β クロトーの特異的なエピトープに結合する、抗体又はその断片を含む、結合タンパク質が本明細書に提供され、これには、例えば:(i)ヒト β クロトー(配列番号297)のアミノ酸残基657、701、及び/もしくは703のうちの少なくとも1つを含むヒト β クロトーのエピトープ;(ii)配列番号297の少なくともアミノ酸残基657を含むヒト β クロトーのエピトープ;(iii)配列番号297の少なくともアミノ酸残基701を含むヒト β クロトーのエピトープ;(iv)配列番号297の少なくともアミノ酸残基703を含むヒト β クロトーのエピトープ;(v)配列番号297の少なくともアミノ酸残基657及び701を含むヒト β クロトーのエピトープ;(vi)配列番号297の少なくともアミノ酸残基657及び703を含むヒト β クロトーのエピトープ;(vii)配列番号297の少なくともアミノ酸残基701及び703を含むヒト β クロトーのエピトープ;又は(viii)配列番号297の少なくともアミノ酸残基657、701、及び703を含むヒト β クロトーのエピトープに結合するものが含まれる。上で提供されているそのような抗体は、いくつかの実施態様において、ヒト β クロトー及びFGF受容体を発現する細胞でFGF19様シグナル伝達及び/もしくはFGF21様シグナル伝達を誘導し、又は β クロトー/FGF受容体複合体を活性化することができる。さらに、いくつかの実施態様において、抗体は、モノクローナル抗体、例えば、ヒト化、ヒト、又はキメラ抗体である。

【0016】

いくつかの実施態様において、本明細書に提供される結合タンパク質、例えば、抗 β クロトー抗体は、診断剤、検出可能な薬剤、又は治療剤にコンジュゲートされているか又は組換えにより連結されている。いくつかの態様において、治療剤は、ビグアニド及びスルホニルウレア(例えば、メトホルミン、トルブタミド、クロルプロパミド、アセトヘキサミド、トラザミド、グリベンクラミド、グリブリド、及びグリピジド)、チアゾリジンジオン(例えば、ロシグリタゾン、ピオグリタゾン)、GLP-1類似体、PPAR γ アゴニスト(例えば、ピオグリタゾン及びロシグリタゾン)、ジペプチジルペプチダーゼ-4(DPP-4)阻害剤(例えば、JANUVIN(登録商標)、ONGLYZA(登録商標))、プロモクリプチン製剤、並びに胆汁酸隔離剤(例えば、コレセベラム)、並びにインスリン(例えば、追加及び基礎類似体)、 α グルコシダーゼ阻害剤(例えば、アカルボース、ログリボース(roglibose))、チアゾリジンジオン(TZD)を含むもしくは含まないメトホルミン(例えば、メトホルミン塩酸塩)、SGLT-2阻害剤、食欲抑制薬、又は減量薬(例えば、Meridia(登録商標)/シブトラミン、Xenical(登録商標)/オルチスタット(ortistat))などの1以上の薬物を含む、薬物である。いくつかの態様において、検出可能な薬剤は、放射性同位体、酵素、蛍光化合物、生体発光化合

物、又は化学発光化合物である。

【0017】

ある実施態様において、本明細書に記載される結合タンパク質、例えば、抗βクロトー抗体を含む組成物が提供される。また本明細書に提供されるのは、本明細書に記載される結合タンパク質、例えば、βクロトー抗体を含む医薬組成物である。

【0018】

本開示はまた、βクロトーポリペプチド、βクロトーポリペプチド断片、又はβクロトーエピトープに結合する結合タンパク質(例えば、抗βクロトー抗体)の免疫グロブリン重鎖、免疫グロブリン軽鎖、VH領域、VL領域、VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2、及び/又はVL CDR3をコードする単離された核酸分子を提供する。いくつかの実施態様において、該核酸分子は、本明細書に記載される5H23、1C17、1D19、2L12、3L3、3N20、4P5、5C23、5F7、もしくは1G19と表記されたモノクローナル抗体、又はそのヒト化変異体のVH領域、VL領域、VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2、及び/又はVL CDR3をコードする。いくつかの実施態様において、該核酸分子は、ヒト免疫グロブリンアミノ酸配列又はその変異体のVH FR1、VH FR2、VH FR3、VH FR4、VL FR1、VL FR2、VL FR3、及び/又はVL FR4を含む、スキヤフォールド領域又はフレームワーク領域をさらにコードする。また本明細書に提供されるのは、結合タンパク質、例えば、抗βクロトー抗体をコードする核酸分子を含むベクター及び宿主細胞、並びに本明細書に提供される宿主細胞を結合タンパク質、例えば、抗βクロトー抗体の産生を促進する条件下で培養することにより、結合タンパク質、例えば、抗βクロトー抗体を産生する方法である。

【0019】

本開示はまた、疾患、障害、又は疾病(例えば、1以上の症状)を治療、予防、又は緩和する方法であって、本明細書に提供される結合タンパク質、例えば、抗βクロトー抗体の治療的有効量を、それを必要としている対象を含む、対象に投与し、それにより、該疾患、障害、又は疾病を治療、予防、又は緩和することを含む、方法である。いくつかの実施態様において、該疾患、障害、又は疾病は、βクロトーによって引き起こされるか、又はβクロトーと別の形で関連し、これには、例えば、対象におけるFGF19様及び/又はFGF21様シグナル伝達に関連するものがある。ある実施態様において、該疾患(例えば、2型糖尿病、肥満、脂質異常症、NASH、心血管疾患、メタボリックシンドローム)は、血液グルコース、インスリン、又は血清脂質レベルを低下させることによって治療可能である。

【0020】

いくつかの実施態様において、該疾患、障害、又は疾病は、グルコース代謝又は脂質代謝に関連する。いくつかの実施態様において、該疾患、障害、又は疾病は、高血糖状態(例えば、糖尿病、例えば、1型糖尿病、2型糖尿病、妊娠糖尿病、インスリン抵抗性、高インスリン血症、グルコース不耐性、メタボリックシンドローム、又は肥満)からなる群から選択される。

【0021】

いくつかの実施態様において、治療、予防、又は改善する方法は、グルコース代謝を改善する方法及び/又は脂質代謝を改善する方法を含む。いくつかの実施態様において、治療、予防、又は改善する方法は、グルコースレベルの低下(例えば、血液グルコースの低下)、インスリン感受性の増加、インスリン抵抗性の低下、グリコーゲンの低下、グルコース耐性の向上、グルコース耐性の向上、グルコース代謝の改善、ホメオスタシスの改善、膵臓機能の向上、トリグリセリドの低下、コレステロールの低下、IDLの低下、LDLの低下、VLDLの低下、血圧の減少、血管の内部肥厚の減少、及び/又は体質量増もしくは体重増の減少をもたらす。

【0022】

本開示は、ヒトFGF19及び/又はヒトFGF21と関連する疾患、障害、又は疾病を治療する方法を提供するものであり、該疾患、障害、又は疾病には、対象(例えば、患者)におけるその発症が、少なくとも部分的には、FGFR1c、FGFR2c、FGFR3c、又はFGFR4とβクロトーとFGF19又はFGF21とを含む複合体の形成によりインビボで開始される、FGF19様及び/又は

FGF21様シグナル伝達の誘導によって引き起こされる、任意の疾患、障害、又は疾病が含まれる。該疾患又は疾病の重症度を、FGF19様及び/又はFGF21様シグナル伝達の誘導によって減少させることもできる。結合タンパク質、例えば、抗 β クロトー抗体で治療することができる疾患及び疾病の例としては、2型糖尿病、肥満、脂質異常症、NASH、心血管疾患、及びメタボリックシンドロームが挙げられる。

【0023】

したがって、本明細書に記載される結合タンパク質、例えば、抗 β クロトー抗体を、2型糖尿病、肥満、脂質異常症(例えば、高トリグリセリド血症)、NASH、心血管疾患、及び/又はメタボリックシンドローム、並びにFGF19及び/又はFGF21のインビボ作用を模倣又は強化することが望ましい任意の疾患、障害、又は疾病を治療するために使用することができる、或いは症状(例えば、血漿グルコースレベルの上昇、トリグリセリド及びコレステロールレベルの上昇)を予防し、又はその頻度及び/もしくは重症度を低下させ、例えば、それにより、改善された血糖及び/もしくは心血管リスク因子プロファイルを提供するためを含めて、例えば、毎日、毎週、隔週、毎月、隔月、隔年などで投与される、予防的治療として利用することができる。本開示は、対象に、本明細書に記載される抗体もしくはその断片を含む、結合タンパク質、又は本明細書に記載される医薬組成物を投与することにより、代謝パラメータを改善する方法を提供するものであり、該方法には、例えば、該改善が、体重、体格指数、腹囲、皮下脂肪厚、グルコース、インスリン、及び/又はトリグリセリドの減少を含むものが含まれる。

【0024】

本開示はまた、 β クロトー及び1以上のFGF受容体、例えば、FGFR1、FGFR2、FGFR3、又はFGFR4の細胞表面発現を有する細胞のFGF19様又はFGF21様シグナル伝達を誘導する方法であって、該細胞を、本明細書に記載される β クロトーに結合する結合タンパク質(例えば、抗体)の有効量と接触させることを含む、方法を提供する。いくつかの実施態様において、該細胞は、脂肪細胞又は肝細胞である。他の実施態様において、該細胞は、 β クロトーをコードする遺伝子、及び任意に、FGF受容体をコードする遺伝子でトランスフェクトされた細胞である。提供されるさらなる方法は、FGF19様及び/又はFGF21様シグナル伝達作用を媒介する活性を有する本明細書に記載される抗 β クロトー抗体を使用することを含む。

【0025】

本開示はまた、対象におけるFGF19様又はFGF21様シグナル伝達を調節する方法であって、本明細書に記載される結合タンパク質、例えば、抗 β クロトー抗体の有効量を、それを必要としている対象を含む、対象に投与することを含む、方法を提供する。いくつかの実施態様において、該調節は、FGF19様活性化を含む。いくつかの実施態様において、該調節は、FGF21様活性化を含む。いくつかの実施態様において、該調節は、グルコース代謝を増加させること(例えば、グルコースレベル、例えば、血液グルコースレベルを低下させること)を含む。

【0026】

本開示はまた、試料中の β クロトーを検出する方法であって、該試料を、検出可能な薬剤を含む、本明細書に記載される結合タンパク質、例えば、抗 β クロトー抗体と接触させることを含む、方法を提供する。ある実施態様において、該試料は、 β クロトーをその表面に発現する細胞を含む。

【0027】

本開示はまた、本明細書に記載される、 β クロトーポリペプチド、 β クロトー断片、又は β クロトーエピトープに結合する結合タンパク質、例えば、抗 β クロトー抗体を含むキットを提供する。

【図面の簡単な説明】

【0028】

(図面の簡単な説明)

【図1】図1A~1Bは、5H23、1C17、1D19、2L12、3L3、3N20、4P5、5C23、5F7、及び1G19

と表記された抗βクロトー抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域の配列アラインメントを示している。CDRの境界は、Kabat付番、AbM付番、Chothia付番、接触付番、及びIMGT付番によって示されている。

【0029】

【図2】図2A-1及び2A-2は、コンセンサスCDR配列を提供する抗βクロトー抗体の重鎖可変領域の配列アラインメントを示している。上の分類は、5H23、1D19、2L12、3L3、4P5、5C23、及び5F7と表記された抗体からなる。その下の分類は、1C17及び1G19と表記された抗体からなる。一番下の分類は、3N20と表記された抗体のみからなる。可変残基は、「X」によって示されている。CDRの境界は、Kabat付番、AbM付番、Chothia付番、接触付番、及びIMGT付番によって示されている。

10

【0030】

図2B-1及び2B-2は、コンセンサスCDR配列を提供する抗βクロトー抗体の軽鎖可変領域の配列アラインメントを示している。上の分類は、5H23、1D19、2L12、3L3、4P5、5C23、及び5F7と表記された抗体からなる。その下の分類は、1C17及び1G19と表記された抗体からなる。一番下の分類は、3N20と表記された抗体のみからなる。可変残基は、「X」によって示されている。CDRの境界は、Kabat付番、AbM付番、Chothia付番、接触付番、及びIMGT付番によって示されている。

【0031】

【図3】図3A-1及び3A-2は、ヒト化配列を有する5H23と表記された抗βクロトー抗体の重鎖可変領域(vH1~vH9)の配列アラインメントを示している。太字の残基は、もとの抗体から修飾されている例示的な残基を示す。太字でかつ下線が引かれた残基は、改変されてマウス残基に戻った残基を示す。

20

【0032】

図3Bは、ヒト化配列を有する5H23と表記された抗βクロトー抗体の軽鎖可変領域(vL1~vL5)の配列アラインメントを示している。太字の残基は、修飾されている例示的な残基を示す。太字でかつ下線が引かれた残基は、改変されてマウス残基に戻った残基を示す。

【0033】

図3C-1及び3C-2は、ヒト化配列を有する5H23と表記された抗βクロトー抗体の軽鎖可変領域(v1-39a~v1-39p)の配列アラインメントを示している。太字の残基は、修飾されている例示的な残基を示す。

30

【0034】

図3D-1及び3D-2は、様々なヒト化配列を有する5H23と表記された抗βクロトー抗体の軽鎖可変領域(v3-20a~v3-20j)の配列アラインメントを示している。太字の残基は、修飾されている例示的な残基を示す。

【0035】

【図4】図4A~4Cは、ヒトβクロトーポリペプチドとマウスβクロトーポリペプチドとキメラβクロトーポリペプチドの間の配列アラインメントを示している。キメラポリペプチドchMoHuは、マウスKLB(M1-F506)-ヒトKLB(S509-S1044)を示す。キメラポリペプチドchHuMoは、ヒトKLB(M1-F508)-マウスKLB(P507-S1043)を示す。マウス残基に対応する残基は、太字かつイタリック体になっている。

40

【0036】

【図5】図5A~5Fは、本明細書に記載される様々な種由来のβクロトーポリペプチド間の配列アラインメントを示している。

【0037】

【図6】図6は、ヒト細胞質ゾルβ-グルコシダーゼ上の相当する位置の同定された3つの結合残基(色の濃い球)の3次元モデルを示している。構造は、クロトー-β残基521~963に相当するものを示している。

【発明を実施するための形態】

【0038】

(詳細な説明)

50

結合タンパク質、例えば、ヒト及び/又はカニクイザルβクロトーを含む、βクロトーに結合する抗体が本明細書に提供される。本明細書に開示される抗体を含む、そのような結合タンパク質の独特な性質は、その拮抗的な性質であり、これには、FGF19及び/又はFGF21のインビボ作用を模倣する能力並びにFGF19様シグナル伝達及び/又はFGF21様シグナル伝達を誘導する能力が含まれる。より顕著かつ具体的には、本明細書に開示される結合タンパク質、例えば、βクロトーに対する抗体のうちのいくつかは、(i)ヒト及びカニクイザルβクロトーに結合し、(ii)FGF19及び/又はFGF21との結合を競合せず、かつ(iii)例えば、いくつかのインビトロでの細胞ベースのアッセイにおいてを含め、FGF19様シグナル伝達及び/又はFGF21様シグナル伝達を誘導する。そのようなアッセイとしては、(1)ELK-ルシフェラーゼレポーターアッセイ(例えば、実施例4を参照されたい);(2)ERK-リン酸化
10
についての組換えFGF19受容体媒介細胞アッセイ(例えば、実施例4を参照されたい);及び(3)ERK-リン酸化についてのヒト脂肪細胞アッセイ(例えば、実施例5を参照されたい)を挙げることができる。したがって、本明細書に記載される結合タンパク質、例えば、抗βクロトー抗体は、FGF19及び/又はFGF21の天然の生物学的機能と一致するインビボでの活性を示すと考えられる。この性質のために、抗βクロトー抗体を含む、開示された結合タンパク質は、代謝性疾患(例えば、2型糖尿病、肥満、脂質異常症、NASH、心血管疾患、メタボリックシンドローム)、並びにFGF19及び/又はFGF21のインビボ作用を模倣又は強化することが望ましい広く任意の疾患、障害、又は疾病の治療のための実現可能な治療剤となる。

【0039】

本明細書に提供される結合タンパク質、例えば、βクロトーに結合する抗体は、βクロトーの結合を相互に競合するという共通の特徴を共有する(例えば、5H23エピトープビンの抗体に記載している実施例3を参照されたい)。この競合的阻害は、各々の抗体がβクロトーの同じ領域(例えば、同じエピトープ)に結合し、それにより、同様の作用が現われることを示している。本明細書に提供される抗βクロトー抗体には、表1~10又は図1~3に記載されるCDR配列を有する、5H23、1C17、1D19、2L12、3L3、3N20、4P5、5C23、5F7、及び/又は1G19に由来し又はこれらに基づく、ヒト化抗βクロトー抗体を含む、ヒト化抗βクロトー抗体、例えば、ヒトβクロトーの特定のドメイン(例えば、KL2(残基S509~S1044);実施例9を参照されたい)に結合する、ヒト化抗βクロトー抗体を含む、抗βクロトー抗体が含まれる。さらに、そのような結合は、大部分、本明細書に記載される抗βクロトー
30
抗体によって認識されるエピトープを含む、KL2領域内の特定のアミノ酸残基(例えば、H657、Y701、及びR703)に起因するものであることができる。まとめると、本明細書に記載される結果は、表1~10又は図1~3に記載される1以上のCDRを有する抗体を含む、5H23又は5H23エピトープビンの抗体に由来し又はこれらに基づく抗βクロトー抗体について観察された作用を、同じ又は類似のエピトープ特異性(例えば、同じ又は類似のCDR)を有する本明細書に記載される他の抗βクロトー抗体に外挿することができることを示している。例えば、実施例4~7及び9で示される抗体のインビトロ活性、並びに例示的なヒト化抗βクロトー抗体について実施例8で示されるインビボ作用は、本明細書に記載される抗βクロトー抗体の活性及び作用を代表するものである。

【0040】

本開示のいくつかの実施態様において、結合タンパク質、例えば、抗βクロトー抗体は、表1~10に記載される1以上の相補性決定領域(CDR)を含む免疫グロブリン可変領域を含み得る。そのような結合タンパク質(例えば、抗βクロトー抗体)において、CDRは、1以上のスキュフォールド領域又はフレームワーク領域と接続されていてもよく、該領域は、CDRの適切な抗原結合特性が達成されるようにCDRを配向させる。本明細書に記載される抗βクロトー抗体を含む、そのような結合タンパク質は、FGFR1cとβクロトーの相互作用を促進又は増強することができ、かつFGF19様及び/又はFGF21様シグナル伝達を誘導することができる。

【0041】

(一般技術)

10

20

30

40

50

本明細書に記載又は言及される技法及び手順は、当業者によって一般に十分に理解されており、かつ/又は従来の方法論、例えば、Sambrookらの文献、分子クローニング:実験マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)、第3版(2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.;分子生物学の最新プロトコル(Current Protocols in Molecular Biology)(F. M. Ausubelら編(2003));治療用モノクローナル抗体:ベンチから臨床まで(Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic)、Z. An編、Wiley, Hoboken N.J.(2009);モノクローナル抗体:方法及びプロトコル(Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols)、M. Albitar編、Humana Press, Totawa, N.J.(2010);及び抗体エンジニアリング(Antibody Engineering)、第2版、第1巻及び第2巻、Kontermann及びDubel編、Springer-Verlag, Heidelberg, 2010に記載されている広く利用されている方法論などを用いて一般に利用されるものを含む。

10

【0042】

(用語法)

別途記載されない限り、本明細書で使用される技術的及び科学的用語は全て、当業者によって一般に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書を解釈するために、以下の用語の説明が適用され、適切な場合はいつでも、単数で使用される用語は複数も含み、逆もまた同様である。特許、出願、公開出願、及び他の刊行物は全て、その全体が引用により組み込まれる。記載された用語の任意の説明が引用により本明細書中に組み込まれる任意の文書と相容れない場合、下記の用語の説明が優先されるものとする。

【0043】

「βクロトー」又は「βクロトーポリペプチド」という用語及び類似の用語は、別途示されない限り、ポリペプチド(「ポリペプチド」及び「タンパク質」は、本明細書で互換的に使用される)又は哺乳動物、例えば、霊長類(例えば、ヒト、カニクイザル(cyno))、イヌ、並びに齧歯類(例えば、マウス及びラット)を含む、任意の脊椎動物源由来の任意のネイティブなβクロトーを指し、ある実施態様において、これには、そのSNP変異体を含む、関連するβクロトーポリペプチドが含まれる。βクロトーは、βクロトー1(KLB1)及びβクロトー2(KLB2)という2つのドメインを含む。各々のβクロトードメインは、グリコシルヒドロラーゼ1領域を含む。例えば、ヒトβクロトーのKLB1ドメインは、グリコシルヒドロラーゼ1領域を構成するアミノ酸残基77～508を含むアミノ酸残基1～508を含み、ヒトβクロトーのKLB2ドメインは、グリコシルヒドロラーゼ1領域を構成するアミノ酸残基517～967を含むアミノ酸残基509～1044を含む。ヒトβクロトーのアミノ酸配列が以下に提供されている:

20

30

【化 1】

```

1 MKPGCAAGSP GNEWIFFSTD EITTRYRNTM SNGGLQRSVI LSALILLRAV
51 TGFSGDGRAI WSKNPNFTPV NESQLFLYDT FPKNFFWGIG TGALQVEGSW
101 KKDGGKPSIW DHFIHHLKN VSSTNGSSDS YIFLEKDLA LDFIGVSFYQ
151 FSISWPRLFP DGIVTVANAK GLQYYSTLLD ALVLRNIEPI VTLYHWDLPL
201 ALQEKYGGWK NDTIIDIFND YATYCFQMFG DRVKYWITIH NPYLVAWHGY
251 GTGMHAPGEK GNLAAYTVG HNLIKAHASKV WHNYNTHFRP HQKGWLSITL 10
301 GSHWIEPNRS ENTMDIFKCQ QSMVSVLGWF ANPIHGDGDY PEGMRKKLFS
351 VLPIFSEA EK HEMRGTAFF AFSFGPNF NK PLNTMAKMGQ NVSLNLREAL
401 NWIKLEYNNP RILIAENGWF TDSRVKTEDT TAIYMMKNFL SQVLQAIRLD
451 EIRVFGYTAW SLLDGF EWQD AYTIRRG LFY VDFNSKQKER KPKSSAHYYK
501 QIIRENGFSL KESTPDVQGG FPCDFSWGVT ESVLKPESVA SSPQFSDPHL
551 YVWNATGNRL LHRVEGVRLK TRPAQCTDFV NIKKQLEMLA RMKVTHYRFA
601 LDWASVLPTG NLSAVNRQAL RYYRCVVSEG LKLGISAMVT LYYPTHALHG 20
651 LPEPLLHADG WLN PSTAEAF QAYAGLCFQE LGDLVKLWIT INEPNRLSDI
701 YNRSGNDTYG AAHNLVLAHA LAWRLYDRQF RPSQRGAVSL SLHADWAEPA
751 NPYADSHWRA AERFLQFEIA WFAEPLFKTG DYPAMREYI ASKHRRGLSS
801 SALPRLTEAE RRLKGTVD F CALNHFTTRF VMHEQLAGSR YDSDRDIQFL
851 QDITRLSSPT RLAVIPWGV R KLLRWVRNY GDMDIYITAS GIDDQALEDD
901 RLRKY YLGKY LQEV LKAYLI DKVRIKGYA FKLAE EKSKP RFGFFT SDFK
951 AKSSI QFYNK VISSRGFPFE NSSSRC SQTQ ENTECTVCLF LVQKKPLIFL 30
1001 GCCFFSTLVL LLSIAIFQRQ KRRKFWKAKN LQHIPLKKGK RVVS

```

(配列番号 : 297)

【 0 0 4 4 】

ヒト β クロトーのコード核酸配列が以下に提供されている：

【化 2】

atgaagccaggctgtgcggcaggatctccagggaaatgaatggatTTTTcttcagcactgatga
aataaccacacgctataggaataacaatgtccaacgggggattgcaaagatctgtcatcctgt
cagcacttattctgctacgagctgttactggattctctggagatggaagagctatatggtct
aaaaatcctaattttactccggtaaatgaaagtcagctgtttctctatgacactttccctaa
aaactTTTTctggggatttgggactggagcattgcaagtggaagggagttggaagaaggatg
gaaaaggaccttctatatgggatcatttcacccacacacaccttaaaaatgtcagcagcacg
aatggttccagtgcagttatatTTTTctggaaaaagacttatcagccctggatTTTtatagg
agtttctttttatcaattttcaatttcctggccaaggcttttccccgatggaatagtaacag
ttgccaacgcaaaaggtctgcagtactacagtactcttctggacgctctagtgttagaaac
attgaacctatagttactttataccactgggatttgcctttggcactacaagaaaaatatgg
ggggtggaaaaatgataccataatagatatcttcaatgactatgccacatactgtttccaga

10

tgtttggggaccgtgtcaaatattggattacaattcacaacccatatctagtggcttggcat
gggtatgggacaggtatgcatgccccctggagagaagggaaatttagcagctgtctacactgt
gggacacaacttgatcaaggctcactcgaaagtttggcataactacaacacacatttccgcc
cacatcagaaggggttggttatcgatcacgttgggatctcattggatcgagccaaaccggctg
gaaaacacgatggatatattcaaagtcaacaatccatggtttctgtgcttggatggtttgc
caaccctatccatggggatggcgactatccagaggggatgagaaagaagttgttctccgttc
taccatttttctctgaagcagagaagcatgagatgagaggcacagctgatttctttgccttt
tcttttggaccaacaacttcaagcccctaacacccatggctaaaatgggacaaaatgtttc
acttaatttaagagaagcgctgaactggattaaactggaatacaacaaccctcgaatcttga
ttgctgagaatggctgggttcacagacagtcgtgtgaaaacagaagacaccacggccatctac
atgatgaagaatttctcagccaggtgcttcaagcaataagggttagatgaaatacagagtgtt
tggttatactgcttggctctctcctggatggctttgaatggcaggatgcttacaccatccgcc
gaggattattttatgtggatttttaacagtaaacagaaagagcggaaacctaagtcttcagca
cactactacaacagatcatacgagaaaatgggtttttctttaaaagagtcacagccagatgt
gcagggccagtttccctgtgacttctcctgggtgtcactgaatctgttcttaagcccagat
ctgtggcttcgtccccacagttcagcgatcctcatctgtacgtgtggaacgccactggcaac
agactgttgacccaggtggaaggggtgaggctgaaaacacgaccgcgtcaatgcacagattt
tgtaaacatcaaaaaacaacttgagatgttggcaagaatgaaagtcacccactaccggtttg
ctctggattgggcctcggctcttcccactggcaacctgtccgcggtgaaccgacaggccctg
aggactacaggtgcgtggtcagtgaggggctgaagcttggcatctccgcgatggtcacct
gtattatccgacccacgcccacctaaggcctccccgagcctctgttgcacgacgggtggc
tgaacccatcgacggccgaggccttccaggcctacgctgggctgtgcttccaggagctgggg
gacctgggtgaagctctggatcaccatcaacgagcctaaccggctaagtacatctacaaccg
ctctggcaacgacacctacggggcggcgcacaacctgctgggtggcccacgccctggcctggc
gcctctacgaccggcagttcaggccctcacagcgcgggggcgtgtcgctgtcgctgcacgcg
gactgggcggaacccgccaaaccctatgctgactcgactggagggcgggccgagcgcttct
gcagttcgagatcgcttggctcgccgagccgctcttcaagaccggggactaccccgcgcca
tgagggaatacattgcctccaagcaccgacgggggctttccagctcgccctgcccgcctc
accgagggccgaaaggaggctgctcaagggcacggtcgacttctgcgcgctcaaccacttcac
cactaggttcgtgatgcacgagcagctggccggcagccgctacgactcggacagggacatcc
agtttctgcaggacatcaccgcctgagctccccacgcgcctggctgtgattccctggggg
gtgcgcaagctgctgcggtgggtccggagggaactacggcgacatggacatttacatcaccgc
cagtggcacgcgaccaggtcttgaggatgaccggctccggaagtactacctaggggaagt
accttcaggagggtgctgaaagcatacctgattgataaagtcagaatcaaaggctattatgca

10

20

30

40

ttcaaactggctgaagagaaatctaaacccagatttggattcttcacatctgatttttaaagc
 taaatcctcaatacaatttttacaacaaagtgatcagcagcaggggcttcccttttgagaaca
 gtagttctagatgcagtcagacccaagaaaatacagagtgcactgtctgcttattccttgtg
 cagaagaaaccactgatattcctgggttggttgccttcttctccaccctggttctactcttatac
 aattgccattttttcaaaggcagaagagaagaaagttttggaaagcaaaaaacttacaacaca
 taccattaaagaaaggcaagagagttgttagc

(配列番号 : 298)

10

【 0 0 4 5 】

カニクイザル(cyno)、学名マカカ・ファスシクラリス(Macaca fascicularis)由来のβ
 クロトーのアミノ酸配列が以下に提供されている:

【 化 3 】

1	MKPGCAAGSP	GNWIFFSTD	EITIRYRNTM	SNGGLQRSVI	LSALTLLRAV	
51	TGFSGDGRAV	WSKNPNFTPV	NESQLFLYDT	FPKNFFWGVG	TGALQVEGSW	
101	KKDGKGPSIW	DHFVHThLKN	VSSTNGSSDS	YIFLEKDLSA	LDFIGVSFYQ	
151	FSISWPRLLP	DGIVTVANAK	GLQYYNTLLD	SLVLRNIEPI	VTLYHWDLPL	20
201	ALQEKYGGWK	NDTIIDIFND	YATYCFQTFG	DRVKYWITIH	NPYLVAWHGY	
251	GTGMHAPGEK	GNLAAVYTVG	HNLIKAHSKV	WHNYNTHFRP	HQKGWLSITL	
301	GSHWIEPNRS	ENTMDILKCQ	QSMVSVLGWF	ANPIHGDGDY	PEGMKKKLLS	
351	ILPLFSEAEK	NEVRGTADFF	AFSFGPNNFK	PLNTMAKMGQ	NVSLNLREAL	
401	NWIKLEYNNP	RILIAENGWF	TDSHVKTEDT	TAIYMMKNFL	SQVLQAIRLD	
451	EIRVFGYTAW	SLLDGFWEQD	AYTIRRGFLY	VDFNSKQKER	KPKSSAHYYK	
501	QIIRENGFSL	KEATPDVQGG	FPCDFSWGVT	ESVLKPESVA	SSPQFSDPYL	30
551	YVWNATGNRL	LHRVEGVRLK	TRPAQCTDFV	NIKKQLEMLA	RMKVTHYRFA	
601	LDWASVLPTG	NLSAVNRQAL	RYYRCVVSEG	LKLGISAMVT	LYYPTHAHLG	
651	LPEPLHAGG	WLNPTVEAF	QAYAGLCFQE	LGDLVKLWIT	INEPNRLSDI	
701	YNRSGNDTYG	AAHNLLVAHA	LAWRLYDRQF	RPSQRGAVSL	SLHADWAEPA	
751	NPYADSHWRA	AERFLQFEIA	WFAEPLFKTG	DYPAAMREYI	ASKHRRGLSS	
801	SALPRLTEAE	RRLKGTVDV	CALNHFTTRF	VMHEQLAGSR	YDSDRDIQFL	
851	QDITRLSSPT	RLAVIPWGV	KLLRWVRRNY	GDMDIYITAS	GIDDQALEDD	40
901	RLRKYYLEKY	LQEVLKAYLI	DKVRIKGYA	FKLAEKSKP	RFGFFTSDFK	
951	AKSSIQFYNK	MISSSGFPSE	NSSSRCSQTQ	KNTECTVCLF	LVQKKPLIFL	
1001	GCCFFSTLVL	LLSITIFHRQ	KRRKFWKAKN	LQHIPLKKGK	RVLS	

(配列番号 : 299)

【 0 0 4 6 】

カニクイザルβクロトーのコード核酸配列が以下に提供されている:

【化 4】

atgaagcctggatgtgccgccggaagccccggcaacgagtgatcttcttcagcaccgacga
gatcaccatccggtacagaaacaccatgagcaacggcgccctgcagcggagcgtgatcctgt
ctgctctgacctgctgagagccgtgaccggcttcagcggagatggcagagccgtgtggtcc
aagaaccccaacttcacccccgtgaacgagagccagctgttcctgtacgataccttcccaa
gaacttcttctggggcgtgggcacaggcgccctgcaggtggaaggatcctggaagaaggacg
gcaagggccccagcatctgggaccactttgtgcacaccacctgaagaacgtgtccagcacc
aacggcagcagcagacagctacatctttctggaaaaggacctgagcgccttggaacttcacgg
cgtgtccttctaccagttcagcatcagctggcccagactgttccccgacggcatcgtgacag
tgccaatgccaagggcctgcagtactacaacaccctgctggacagcctgggtgctgcggaac
atcgagcccatcgtgacctgtaccactgggacctgccactggctctgcaggagaaatacgg
cggctggaagaacgacaccatcatcgacatcttcaacgactacgccacctactgcttccaga
ccttcggcgacagagtgaagtactggatcacaatccacaacccctacctgggtggcctggcac
ggctatggcaccggaatgcatgcccctggcgagaagggaatatctggccgcctgttacaccgt
gggccacaacctgatcaaggcccacagcaaagtgtggcacaactacaatacccaacttccggc
cccaccagaagggctggctgtctatcacactgggcagccactggatcgagcctaaccgcagc
gagaacaccatggacatcctgaagtgccagcagagcatgggtgtccgtgctgggatggttcgc
caaccccatcaccggcgacggcgattaccccgagggcatgaagaagaagctgctgagcatcc
tgccctgttcagcagaggccgagaagaacgaagtgcggggcaccgcccgatcttcttcgccttt
agcttcggccccaacaacttcaagccctgaataccatggccaagatgggccagaatgtgtc
cctgaacctgagagaggccctgaactggatcaagctggagtacaacaacccccggatcctga
tcgccgagaacggctgggttcaccgacagccacgtgaaaaccgaggacaccaccgccatctat
atgatgaagaacttctgagccaggtgctgcaggctatccggctggatgagatccgggtgtt
cggctacaccgcctggctactgctggacggcttcgaatggcaggacgcctacaccatcagac
ggggcctgttctacgtggacttcaacagcaagcagaaagagcggaagcccaagagcagcgcc
cactactacaagcagatcatcagagagaatggcttcagcctgaaagaggccacccccgacgt
gcagggccagttcccttgtgatttctcttggggcgtgaccgagagcgtgctgaagcctgaaa
gcgtggccagcagccccagttcagcgacccttacctgtacgtgtggaacgccaccgggaac
cggctgctgcatagagtggaaggcgtgcggctgaaaaccagacccgcccagtgacccgactt
cgtgaacatcaagaaacagctggaaatgctggcccggatgaaagtgaccactacagattcg
ccctggactgggccagcgtgctgcctaccggaaatctgagcgccgtgaacagacaggccctg
cggctactacagatgcgtgggtgtccgagggcctgaagctgggcatcagcgccatgggtcacct
gtactaccctaccacgcccacctgggactgcctgaacctctgctgcatgctggcggtggc
tgaaccctagcacctggaagcctttcaggcctacgcgggctgtgcttccaggaactgggc

10

20

30

40

gacctcgtgaagctgtggatcaccatcaacgagcccaacagactgagcgacatctacaacag
aagcggcaacgacacctacggcgctgcccacaatctgctgggtggctcatgccctggcttggc
ggctgtacgacagacagttccggccttctcagcggggagccgtgtctctgtctctgcatgcc
gattggggccgagccccgcccaacccttacgccgactctcattggagagccgccgagcggttcct
gcagttcgagatcgcttggtttgccgagccccctgttcaagaccggcgattaccctgccgcca
tgagagagtatatcgccagcaagcacagacggggcctgagcagctctgccctgcctagactg
accgaggccgagcgggagactgctgaagggaaccgtggatttctgcgccctgaaccacttcac
caccagattcgtgatgcacgagcagctggccggcagcagatacgacagcgaccgggacatcc
agtttctgcaggacatcacccggctgagcagccctacaagactggccgtgatcccttgggga
gtgcggaagctgctgagatgggtgcgcagaaactacggcgacatggatatctacatcacgc
cagcggcatcgacgaccaggccctggaagatgaccggctgcggaagtactacctggaaaagt
acctgcaggaagtgctgaaggcctacctgatcgacaaagtgcggatcaagggtactacgcc
ttcaagctggccgaggaaaagagcaagcccagattcggcttcttcaccagcgacttcaaggc
caagagcagcatccagttctacaacaagatgatcagcagcagcggcttccccagcgagaaca
gcagctccagatgcagccagacccagaaaaacaccgagtgtaccgtgtgcctgttcctgggtg
cagaagaagccccctgatcttcctgggctgctgcttctttagcaccctgggtgctgctgctgctc
catcaccatcttccaccggcagaagcggagaaagtcttggaaggccaaaaacctgcagcaca
tccccctgaagaaaggcaagcgggtgctgagctga

10

20

(配列番号：300)

【0047】

マウス、学名ムス・ムスクリス(Mus musculus)由来のβクロトーホモログのアミノ酸配列が以下に提供されている：

30

【化 5】

1	MKTGCAAGSP	GNWIFFSSD	ERNTRSRKTM	SNRALQRSAV	LSAFVLLRAV	
51	TGFSGDGKAI	WDKKQYVSPV	NPSQLFLYDT	FPKNFSWGVG	TGAFQVEGSW	
101	KTDGRGPSIW	DRYVYSHLRG	VNGTDRSTDS	YIFLEKDLLA	LDFLGVSFYQ	
151	FSISWPRLFP	NGTVAAVNAQ	GLRYRALLD	SLVLRNIEPI	VTLYHWDLPL	
201	TLQEEYGGWK	NATMIDLFND	YATYCFQTFG	DRVKYWITIH	NPYLVAWHGF	
251	GTGMHAPGEK	GNLTAVYTVG	HNLIKAHSKV	WHNYDKNFRP	HQKGWLSITL	10
301	GSHWIEPNRT	DNMEDVINCQ	HSMSSVLGWF	ANPIHGDGDY	PEFMKTGAMI	
351	PEFSEAEKEE	VRGTADFFAF	SFGPNNFRPS	NTVVKMGQNV	SLNLRQVLNW	
401	IKLEYDDPQI	LISENGWFTD	SYIKTEDTTA	IYMMKNFLNQ	VLQAIKFDEI	
451	RVFGYTAWTL	LDGFEWQDAY	TTRRGLFYVD	FNSEQKERKP	KSSAHYYKQI	
501	IQDNGFPLKE	STPDMKGRFP	CDFSWGVTES	VLKPEFTVSS	PQFTDPHLYV	
551	WNVTGNRLLY	RVEGVRLKTR	PSQCTDYVSI	KKRVEMLAKM	KVTHYQFALD	
601	WTSILPTGNL	SKVNRQVLRY	YRCVVSEGLK	LGVFPMVTLY	HPTHSHLGLP	20
651	LPLLSSGGWL	NMNTAKAFQD	YAELCFRELG	DLVKLWITIN	EPNRLSDMYN	
701	RTSNDTYRAA	HNLMIHAQV	WHLYDRQYRP	VQHGAVSLSL	HCDWAEPANP	
751	FVDSHWKAAE	RFLQFEIAWF	ADPLFKTGDY	PSVMKEYIAS	KNQRLSSSV	
801	LPRFTAKESR	LVKGTVDIFYA	LNHFTRFVI	HKQLNTNRSV	ADRDVQFLQD	
851	ITRLSSPSRL	AVTPWGVRLK	LAWIRRNRYD	RDIYITANGI	DDLALEDDQI	
901	RKYYLEKYVQ	EALKAYLIDK	VKIKGYIAFK	LTEEKSKPRF	GFFTSDFRAK	
951	SSVQFYSKLI	SSSGLPAENR	SPACGQPAED	TDCTICSFLV	EKKPLIFFGC	30
1001	CFISTLAVLL	SITVFHHQKR	RKFQKARNLQ	NIPLKKGHSR	VFS	

(配列番号 : 301)

【 0 0 4 8 】

マウス β クロトーのコード核酸配列が以下に提供されている :

【化 6】

atgaagacaggctgtgcagcaggggtctccggggaatgaatggatTTTTcttcagctctgatga
aagaaacacacgctctaggaaaacaatgtccaacagggcactgcaaagatctgccgtgctgt
ctgcggtttgttctgctgcgagctgttaccggcttctccggagacgggaaagcaatatgggat
aaaaaacagtacgtgagtcgggtaaacccaagtcagctgttcctctatgacactttccctaa
aaacttttcctggggcggttgggaccggagcatttcaagtggagggagttggaagacagatg
gaagaggaccctcgatctgggatcggtacgtctactcacacctgagaggtgtcaacggcaca
gacagatccactgacagttacatctttctggaaaaagacttggttggtctctggattttttagg
agtttctttttatcagttctcaatctcctggccacgggttggttcccaatggaacagtagcag
cagtgaatgcgcaaggtctccggtactaccgtgcacttctggactcgctggtacttaggaat
atcgagcccattgttaccttgtaccattgggatttgctctgacgctccaggaagaatatgg
gggctggaaaaatgcaactatgatagatctcttcaacgactatgccacatactgcttccaga
cctttggagaccgtgtcaaataattggattacaattcacaacccttaccttggttgcttggcat
gggtttggcacagggtatgcatgcaccaggagagaagggaatttaacagctgtctacactgt
gggacacaacctgatcaaggcacattcgaaagtgtggcataactacgacaaaaacttccgcc
ctcatcagaagggttggctctccatcaccttgggggtcccattggatagagccaaacagaaca
gacaacatggaggacgtgatcaactgccagcactccatgtcctctgtgcttggatgggttcgc
caaccccatccacggggacggcgactaccctgagttcatgaagacgggcgccatgatcccg
agttctctgaggcagagaaggaggaggtgaggggcacggctgatttctttgccttttccttc
gggccaacaacttcaggccctcaaacaccgtggtgaaaatgggacaaaatgtatcactcaa

10

20

cttaaggcaggtgctgaactggattaaactggaatac gatgaccctcaa atcttgatttcgg
agaacggctggttcacagatagctatataaagacagaggacaccacggccatctacatgatg
aagaatttcctaaaccaggttcttcaagcaataaaatttgatgaaatccgcgtgtttggtta
tacggcctggactctcctggatggctttgagtggcaggatgcctatac gacccgacgagggc
tgttttatgtggactttaacagtgagcagaaagagaggaaacccaagtcctcggctcattac
tacaagcagatcatacaagacaacggcttccctttgaaagagtccacgccagacatgaaggg
tcggttccccctgtgatttctcttgaggagtcactgagtcgttcttaagcccgagtttacgg
tctcctccccgcagtttacgatcctcacctgtatgtgtggaatgtcactggcaacagattg
ctctaccgagtggaaggggtaaggctgaaaacaagaccatcccagtgcacagattatgtgag
catcaaaaaacgagttgaaatgttggaacaaaatgaaagtcacccactaccagtttgctctgg
actggacctctatccttcccactggcaatctgtccaaagttaacagacaagtgttaagggtac
tataggtgtgtggtgagcgaaggactgaagctgggcgtcttccccatggtgacgttgtagca
cccaacccactcccatctcggcctccccctgccacttctgagcagtggggggtgggctaaaca
tgaacacagccaaggccttccaggactacgctgagctgtgcttccgggagttgggggacttg
gtgaagctctggatcaccatcaatgagcctaacaggctgagtgacatgtacaaccgcacgag
taatgacacctaccgtgcagcccacaacctgatgatcgcccatgccaggtctggcacctct
atgataggcagtataggccggtccagcatggggctgtgtcgtgtccttacattgcgactgg
gcagaacctgccaacccctttgtggattcacactggaaggcagccgagcgcttcctccagtt
tgagatcgctggtttgagatccgctcttcaagactggcgactatccatcggttatgaagg
aatacatcgctccaagaaccagcgaggggtgtctagctcagtcctgccgcgcttcaccgcg
aaggagagcaggctggtgaagggtaaccgtcgacttctacgcactgaaccacttactacgag
gttcgtgatacacaagcagctgaacaccaaccgctcagttgcagacagggacgtccagttcc
tgaggacatcaccgcctaagctcgccagccgctggctgtaacacctggggagtgccg
aagctccttgctggatccggagggaactacagagacagggatatctacatcacagccaatgg
catcgatgacctggctctagaggatgatcagatccgaaagtactacttgagagaagtatgtcc
aggaggctctgaaagcatatctcattgacaaggtcaaaatcaaaggctactatgcattcaaa
ctgactgaagagaaatctaagcctagatttggaatttttcacctctgacttcagagctaatgc
ctctgtccagttttacagcaagctgatcagcagcagtggcctccccgctgagaacagaagtc
ctgcgtgtggtcagcctgcggaagacacagactgcaccatttgctcatttctcgtggagaag
aaaccactcatcttcttcggttgctgcttcatctccactctggctgtactgctatccatcac
cgtttttcatcatcaaaagagaagaaaattccagaaagcaagggaacttacaaaatatccat
tgaagaaaggccacagcagagttttcagc

10

20

30

40

(配列番号 : 302)

【 0 0 4 9 】

ラット、学名ラッツス・ノルベギクス(Rattus norvegicus)由来のβクロトーのアミノ酸配列が以下に提供されている:

50

【化 7】

MKTGCAAGSPGNEWVFFSSDERSTRSRKTMSNGALQRSALVLSALVLLRAVTGFSG
DGKAIWDKKQYVSPVNPQQLFLYDTFKNFSWGVGTGAFQVEGSWKADGRGPSI
WDRYVDSHLRGVNSTDRSTDYVFLEKDLLALDFLGVSFYQFSISWPRLFPNGTVA
AVNAKGLQYYRALLDSLVLRNIEPIVTLYHWDLPRTLQEEYGGWKNATMIDLFNDYA
TYCFQTFGDRVKYWITIHNPYLVAWHGFGTGMHAPGEKGNLTAVYTVGHNLKAHS
KVWHNYDKNFRPHQKGWLSITLGSHWIEPNRTENMEDVINCQHSMSSVLGWFAN
PIHGDGDYPEFMKTSSVIPEFSEAEKEEVRGTADFFAFSFGPNNFRPSNTVVKMGQ
NVSLNLRQVLNWIKLEYDNPRILISENGWFTDSYIKTEDTTAIYMMKNFLNQVLQAIK
FDEIQVFGYTAWTLLDGFQWQDAYTTRRGLFYVDFNSEQKERKPKSSAHYYKQIIQ
DNGFPLQESTPDMKGQFPCDFSWGVTESVLKPEFTVSSPQFTDPHLYVWNVTGN
RLLYRVEGVRLKTRPSQCTDYVSIKKRVEMLAKMKVTHYQFALDWTSILPTGNLSKI
NRQVLRYYRCVVSEGLKLGISPMVTLYHPTHSHLGLPMPLLSSGGWLNTNTAKAFQ
DYAGLCFKELGDLVKLWITINEPNRLSDMYNRTSNDTYRAAHNLMIAHAQVWHLYD
RQYRPVQHGAVSLSLHSDWAEPANPYVESHWKAERFLQFEIAWFADPLFKTGDY
PLAMKEYIASKKQRGLSSSVLPRFTLKESSLVKGTIDFYALNHFTTRFVIHKQLNTNC
SVADRDVQFLQDITRLSSPSRLAVTPWGMRKLLGWIRRNRYRDMDIYVTANGIDDLA
LEDDQIRKYYLEKYVQEALKAYLIDKVKIKGYAFKLTEEKSKPRFGFFTSDFKAKSS
VQFYSKLISSSGFSSENRSRSPACGQPPEDTECAICSFLTQKKPLIFFGCCFISTLAALL
SITIFHHRKRRKFQKARNLQNIPLKKGHSRVFS (配列番号 : 356)

10

20

【 0 0 5 0】

ラット β クロトーのコード核酸配列が以下に提供されている：

【化 8】

ATGAAGACAGGCTGTGCAGCAGGGTCTCCAGGGAATGAATGGGTTTTCTTCAG
CTCTGATGAAAGAAGCACACGCTCTAGGAAAACAATGTCCAACGGAGCACTGC
AAAGATCTGCCGTGCTGTCTGCATTGGTTCTGCTGCGAGCTGTTACCGGCTTCT
CTGGAGACGGAAAAGCAATATGGGATAAAAAACAATACGTGAGTCCGGTAAACC
CAGGTCAGCTGTTCTCTATGACACTTTCCCTAAAACTTTTCTGGGGCGTTG
GGACCGGAGCATTTCAAGTGGAAGGGAGTTGGAAGGCAGATGGAAGAGGACC
CTCGATCTGGGACCGTTATGTCGACTCACACCTGAGAGGTGTCAACAGCACAG
ACAGATCCACTGACAGTTATGTCTTTCTGGAAAAGGACTTGCTGGCTCTGGATT
TTTAGGAGTTTCTTTTATCAGTTCTCAATCTCCTGGCCGCGGTTGTTCCCCAA
CGGAACAGTAGCAGCTGTGAATGCAAAGGTCTCCAGTACTACAGAGCACTTCT

40

30

GGACTCGCTGGTACTTAGGAATATCGAACCCATTGTTACCTTATACCATTGGGA
TTTGCCTTTGACGCTACAGGAAGAATATGGGGGCTGGAAAAATGCAACTATGAT
AGATCTCTTCAATGACTATGCCACATACTGCTTCCAGACCTTTGGAGACCGTGT
CAAATATTGGATTACAATTCACAACCCTTACCTCGTTGCTTGGCATGGGTTTGGC
ACAGGTATGCATGCGCCAGGAGAGAAGGGAAATTTAACAGCTGTCTACACTGT
GGGACACAACCTGATCAAGGCGCATTTCGAAAGTGTGGCATAACTACGACAAAA
ACTTCCGCCCTCATCAGAAGGGTTGGCTCTCCATCACCTTGGGGTCCCATTGG
ATAGAACCAAACAGAACAGAAAACATGGAGGACGTGATCAACTGCCAGCACTC
CATGTCTTCTGTGCTCGGATGGTTTGCCAACCCCATCCACGGAGACGGCGACT
ACCCCGAGTTCATGAAGACGAGCTCCGTAATCCCTGAGTTCTCTGAGGCAGAG
AAGGAGGAGGTGCGGGGCACTGCTGACTTCTTTGCCTTTTCCTTCGGGCCCAA
CAATTCAGGCCCTCGAACACCGTGGTAAAAATGGGACAAAATGTATCACTCAA
CTTAAGACAGGTGCTGAACTGGATTAACTAGAATATGACAACCCTCGAATCTT
GATTTTCGGAGAACGGCTGGTTCACAGATAGTTATATAAAGACGGAAGATACCAC
GGCCATCTACATGATGAAGAATTCCTCAACCAGGTTCTTCAAGCAATAAAGTTT
GATGAAATACAAGTGTTTGGTTATACGGCTTGGACTCTCCTGGATGGCTTTGAG
TGGCAGGATGCCTACACGACCCGACGAGGGCTGTTTTATGTGGACTTTAATAGT
GAGCAGAAAGAGAGGAAACCCAAGTCCTCCGCTCATTACTACAAACAGATTATA
CAAGACAACGGTTTCCCTTTGCAAGAATCCACACCAGACATGAAGGGTCAGTTT
CCCTGTGACTTCTCCTGGGGAGTCACTGAGTCTGTTCTTAAGCCGGAGTTTACG
GTGTCCTCCCCACAGTTTACTGATCCTCACCTGTATGTGTGGAATGTCACTGGC
AACAGATTGCTATACCGAGTGGAAGGAGTCAGGCTAAAAACAAGACCGTCCCA
ATGCACAGATTATGTGAGCATCAAAAAACGAGTTGAAATGTTGGCCAAAATGAA
AGTCACCCACTACAGTTTGCTCTGGACTGGACCTCTATCCTCCCTACCGGAAA
TCTGTCTAAAATTAATAGACAAGTGTTGAGGTACTATAGGTGTGTGGTGAGCGA
AGGACTGAAGCTGGGCATCTCCCCTATGGTGACGTTGTACCACCCGACCCACT
CCCATCTAGGCCTCCCCATGCCACTTCTGAGCAGTGGGGGATGGCTAAACACC
AACACAGCCAAGGCCTTCCAGGACTACGCAGGCCTGTGCTTCAAGGAGCTGGG
GGACTTGGTAAAGCTCTGGATCACCATCAATGAACCCAATAGGCTGAGTGACAT
GTACAACCGCACGAGTAACGACACCTACCGTGCGGCCCAACCTGATGATCG
CCCATGCCCAGGTCTGGCACCTCTATGATAGGCAGTATAGGCCGGTCCAGCAC
GGGGCTGTGTCGCTGTCCTTACATTCCGACTGGGCAGAACCTGCCAACCCTTA
TGTGGAGTCTCACTGGAAGGCAGCCGAGCGCTTCCTCCAGTTTGAGATCGCCT
GGTTTGCGGATCCACTCTTCAAGACTGGTGACTACCCGCTGGCCATGAAGGAA

10

20

30

40

TACATCGCCTCCAAGAAGCAGCGAGGGCTGTCTAGCTCAGTCCTGCCGCGCTT
TACCTTGAAGGAGAGCAGGCTGGTGAAGGGGACCATCGACTTTTACGCACTGA
ACCACTTCACTACTAGATTCGTGATACACAAGCAGTTGAATACCAACTGCTCAGT
GGCAGACAGGGACGTCCAGTTCCTGCAGGACATCACCCGCCTGAGCTCGCCC
AGTCGCCTAGCCGTAACGCCCTGGGGAATGCGCAAGCTCCTTGGGTGGATCC
GGAGGAACTACAGAGACATGGATATCTACGTCACAGCCAATGGCATTGATGATC
TTGCTCTAGAGGACGATCAGATTAGAAAGTACTACTTGGAGAAGTACGTCCAGG
AGGCTCTGAAAGCATATCTGATTGACAAGGTCAAATCAAAGGCTACTATGCAT
TCAAACCTGACTGAAGAGAAATCTAAGCCTAGATTTGGATTTTTACATCTGACTT
CAAAGCTAAATCTTCTGTACAGTTTTATAGCAAGCTGATCAGCAGCAGCGGCTT
CTCCTCTGAGAACAGAAGTCCTGCCTGTGGTCAGCCTCCAGAAGACACAGAAT
GCGCCATTTGCTCCTTCCTTACACAGAAGAAACCACTCATCTTCTTTGGTTGTTG
CTTCATCTCCACTCTGGCTGCACTGCTATCAATCACTATTTTTTCATCATCGGAAG
AGAAGAAAATTCCAGAAAGCAAGGAACTTACAAAATATACCATTGAAGAAAGGG
CACAGCAGAGTTTTTAGCTAA (配列番号 : 357)

10

20

【 0 0 5 1 】

ハムスター、学名クリセツルス・グリセウス(*Cricetulus griseus*)由来のβクロトーのアミノ酸配列が以下に提供されている:

【化 9】

MKAGCAAGSPGNEWIFLSSYERNTRSKKTMSNRALQRSVVLSTAFVLLRAVTGLSG
DGKAIWDKKQYVSPVNASQLFLYDTFKNFFWGVGTGAFQVEGNWQADGRGPSI
WDRFIYTHLRDVSITEKSADSYIFLEKDLLALDFLGVSFYQFSISWPRLFPNGTVASV
NAKGLQYYNKLLDSLILRNIEPVVTLYHWDLPLALQEDYGGWKNATMIDLFNDYATY
CFQTFGDRVKYWITIHPYLVAWHGFATGMHAPGETGNLTAVYIVGHNLKAHSKV
WHNYDKNFRPHQKGLLSITLGSHWIEPNKTENMADTISCQHSMAFVLGWFANPIHA
DGDYPEFMKTLSTMPVFSEAEKEEVRGTADFFAFSFGPNNFRPSNTVVKMGQNV
LNLRQVLNWIKLEYDNPRILISENGWFTDSDIKTEDTTAIYMMKHFLNQVLQAIQFDEI
RVFGYTAWSLLDGFEWQYAYTSRRGLFYVDFNSEQKERKPKTSAHYKQIIQENG
FPLKESTPDMQGGQFPCDFSWGVTESVLKPEFMVSSPQFTDPHLYVWNATGNRLL
QRVEGVRLKTKPSHCTDYVSIKKRVEMLAKMKVTHYQFALDWATILPTGNLSEVNR
QVLRYYRCVVSEGLKLGVSMPVTLYHPTHSHLGLPELLNSGGWLNTYTAKAFQD
YAGLCFQELGDLVKLWITINEPNRLSDMYNRTSNDTYRAAHNLMIAHAQVWRLYDR
QYRPVQHGA VSLSLHSDWVEPANPYVDSHWKAAERFLLFEIAWFADPLFKTGDYP
LAMKEYIASKNQQGLSRSVLPRFTPEESRLVKGTIDFYALNHFTTRFVIHKQLNSSR
SMADRDVQFLQDITRLSSPSRLAVMPWGARKLLGWIQRNYGDMDIYITANGIDDLA
LENDGIRKYYLEKYIQEALKAYLIDKVKIKGYAFKLTEEKSKPRFGFFTSDFKAKSS
VEFYSKLISRSGFPSETSNPACGQPPEDTDCTICSFFTQKKS LIFFGCCFISTLAVLLS
ITIFHHRKRRFHKSKNLENIPLKEGHSRVLS (配列番号 : 408

10

20

30

【0052】

ハムスターβクロトローのコード核酸配列が以下に提供されている：

【化 10】

atgtccaacagggcactgcaaagatctgtcgtgctgtcagcgttgttctgctgagctgttaccggattgtctggagac
gggaaagcgatatgggataaaaaacagtacgtgagtcgggtgaatgcaagtcagctgttctctatgacactttcccta
aaaacttttctgggtgttggaactggagcatttcaagtgaaggggaattggcaggcagacggaagaggaccctcg
atttgggatcgtttcatctacacacacctgagagatgtcagcatcacagagaaatccgccgacagttacattttctgga
aaaagatttgttggtctggatttttaggagtttctttatcagttctcaatctcctggccacggtgttccccaatggaaca
gtagcatccgtgaatgcaaaaggctccaataactacaacaaacttctggactcgctgatacttaggaatattgagcccg
ttgttaccttataccattgggatttgccttggcgctacaggaagactatgggggttgaaaaatgcaactatgatagatc
tctcaatgactatgccacatactgctccagaccttggagaccgtgtcaagtattggattacaattcacaacccttacct
ggttgcttggcatgggttggcacaggatgtcatgcgccaggagagacgggaaatttaacagctgtctacattgtggga
cacaacctgatcaaggctcattcgaaagtgtggcataactacgacaaaaacttccgcccccatcagaagggttgc
gtccattaccttgggtcccactggatagaaccaaaaaacagaaaaatggccgatacaatcagctgccagca
ctctatggcttttgccttgggtgttggcaaccccatccatgcagacggcgactaccctgagttcatgaaaacattgtc
caccatgccagtggtctctgaggcagagaaggaggaggtgaggggcacagctgacttcttgccttttcccttgggccc
aacaatttcaggccctcgaacactgtagtgaatgggacaaaatgtatcactcaactaagacaggtgctgaactg
gattaaattagaatatgacaacctcgaatcttgatttcggagaatggctgggtcacagatagtgacataaagacaga
ggacaccacagccatctacatgatgaagcatttctcaaccagggttctcaagcaatacagttgatgaatacagagt
tttggttacacggcctggtctctcctggatggcttgaatggcagtatgcctacacgtctcgcgaggactgtttatgtgga
ctttaatagtgaacagaaagaaaggaaaccaagacctggcacattactacaaacagatcatacaagaaaatgg
ttcccttgaagagtgccacgccagacatgcagggtcagttccctgtgacttctcctggggggtcaccgagtcgttctt
aagccggagtttatggttctcccccacagtttaccgacctcacctgtatgtgtggaatgccactggcaacagattgct
acagcgagtagaaggagtaaggctaaaaacaaaacccatccactgcacagactatgttagcatcaaaaaacgag
ttgagatgttgccaaaaatgaaagtcacccactaccagtttgccttgactgggccaccatccttccactggcaatctg
tctgaagttaatagacaagtactaaggtactataggtgtgtggtgagcgaaggactgaagctgggctctctcccatg
gtgacgtgttaccacccacccactcccatctaggcctccctgagccgcttctaacagtgggggatggctaaacactt
acaccgccaaggccttccaggactacgcaggactgtgcttcaggaactaggggacttgggaagctctggatcac
catcaatgagcctaataaggctgagtgacatgtacaaccgcagagtaatgacacctaccgtgcagcccataacctg

10

20

30

atgattgcccagggctgtggcgtctctacgacaggcagtataggccagtcagcatggagctgtgtcgctgtccc
tacattctgactgggtggaacctgccaacccctatgtggactcacactggaaggcagcggagcgcttcctcctgtttga
gatcgctggttcgctgatccgctcttcaagactggcgactatccactggccatgaaggagtacatcgctccaagaa
ccagcaaggggtgtcccgtcagtcctgccgcgttcacccagaggagagcaggctgggtgaagggcaccatcga
cttctacgcactgaaccacttcactactaggttcgtgatacacaacagctcaacagcagccgctctatggcagacag
ggacgtccagttcctgcaggacatcacccgctgagctcgcccagccgctggctgttatgccctggggagcacgca
agctgcttgggtggatccagaggaactatggggacatggacatctacatcacagccaatggcatcgatgatctggct
ctggagaatgatgggatccgaaagtactacttggagaagtacatccaggaggctctgaaagcatacctcattgacaa
agtcaaaatcaaaggctattatgcattcaaactgactgaagagaaatctaagcctagatttggattttcacatctgactt
caaagctaagtcattctgtagagttttatagcaagttgatcagcagaagtggcttcccctctgagactagcaatcccgcat
gtggtcagcctccagaagacacagactgcaccatctgctcattttcactcagaagaaatctctgatcttcttgggtgttg
cttcattccactctggctgtactgctgtcaatcaccattttcatcatcgaaagagaagatttcataaatcaaagaactta
gaaaatataccattgaaggaaggccacagtagagttcttagctaa (配列番号 : 409)

10

20

【 0 0 5 3 】

ウサギ、学名オリクトラグス・クニクルス(*Oryctolagus cuniculus*)由来のβクロトロー
のアミノ酸配列が以下に提供されている：

【化 1 1】

MKPGCAAGSPGNEWVSFCTDERNRRCRETMSSGRLRRSVMLSAFILLRAVTGFP
GDGRAVWSQNPNSPVNESQLFLYDTFKNFFWGVGTGAFQVEGSWKKDGKGL
SVWDHFIATHLNVSSRDGSSDSYIFLEKDLSALDFLGVSFYQFSISWPRLFPDGTVA
VANAKGLQYYNRLLDSLLLNRNIEPVVTLYHWDLPWALQEKGWKNETLIDLFNDY
ATYCFQTFGDRVKYWITIHNPLYVAWHGYGTGLHAPGEKGNVAAVYTVGHNLLKA
HSKVWHNYNRNFRPHQKGWLSITLGSHWIEPNRAESIVDILKCQQSMVSVLGWFA
NPIHGDGDYPEVMTKKLLSVLPAFSEAEKNEVRGTADFFAFSFGPNNFKPLNTMAK
MGQNVSLNLRQVLNWKLEYGNPRILIAENGWFTDSYVQTEDTTAIYMMKNFLNQV
LQAIRLDGVRVFGYTAWSLLDGFEWQDAYNTRRGLFYVDFNSEQRERRPKSSAHY
YKQVIGENGFTLREATPDLQGGQFPCDFSWGVTESVLKPESVASSPQFSDPHLYVW
NATGNRMLHRVEGVRLKTRPAQCTDFITIKKQLEMLARMKVTHFRFALDWASVLPT
GNLSEVNRQALRYRCVVTEGLKLNISPMVTLYYPHTAHLGLPAPLLHSGGWLDPS
TAKAFRDYAGLCFRELGDLVKLWITINEPNRLSDVYNRTSNDTYQAAHNLLIAHALV
WHLYDRQYRPSQRGALSLSLHSDWAEPANPYVASHWQAAERFLQFEIAWFAEPLF
KTGDYPVAMREYIASKTRRGLSSSVLPRFSDAERRLVKGAADFALNHFTTRFVMH
EQQNGSRYDSDRDVQFLQDITRLASPSRLAVMPWGEGKLLRWMRNNYGDLDVYI
TANGIDDQALQNDQLRQYYLEKYVQEALKAYLIDKIKIKGYAFKLTEEKSKPRFGFF
TSDFKAKSSIQFYNKLITSNGFPSENGGPRCNQTQGNPECTVCLLLLQKKPLIFFSC
CFFCTLVLLSSITIFHRRKRRKFWKAKDLQHIPLKKGHKRVLS (配列番号 : 410)

10

20

【 0 0 5 4】

ウサギ β クロトーのコード核酸配列が以下に提供されている：

30

【化 1 2】

tgaagccgtgataagacgggtcccgagttcgtggcaaatgaagccaggctgtgcggcaggatctccagggaaatga
atgggtttccttctgcaccgatgaaagaaacagacgctgtagggaaacgatgtccagcggacgcctgcggagatct
gtcatgtctgcagcctcatcctgtctgcgagccgtgactgggttccccggagacggaagagctgtatggtcgcaaat
cctaatttgagtccggtaaacgaaagtcagctgtttctctatgacactttccaaaaaacttttctgggggtgtggggactg
gagccttccaagtggaagggagttggaagaaggatgggaaaggactctctgtatgggatcatttcacgtacacac
ctgaacgtcagcagccgcgatggctccagtacagctacatttttggagaaagacttatcggcgctggatttttagg
agtctcttttatcagttttcaatttctggccaagactgttcccggatggcacagtagcagtcgccaatgcaaaaggctc
cagtactataatcggctcctggactctctgctacttagaaacattgaacctgtagtactttataaccattgggatctgccttg
ggcgctacaagaaaaatacgggggtggaaaaacgagacgcttgattgatttattcaatgactatgccacactactgttctc
cagacgtttggggaccgtgtcaaatactggatcaccattcacaatccctatctggtggcttggcatggctacgggacag
gtctgcatgtctccgggagagaaggggaatgtggcagctgtctacactgtgggacacaacctgttaaggctcattca
aaagtctggcacaactacaacaggaatttccgcccgcacagaaaggctggctgtcgatcacgctgggatcccact
ggattgagccaaacagagcggaaagcatcgtggacatactcaagtgccagcagtccttggtctcgggtgctgggctg
gtttgccaacccgatccacggggacggggactaccagaggtgatgacaaagaagctgtctcctcctgcccgtt
tctcagaagcagagaagaacgaggtacgaggcaccgcagacttcttgccttttgcgttggaccaacaactcaagc
ccttaaacaccatggctaaaaatggggcagaatgtgtcactcaatctaagacaggtgctgaactggattaaactggaat
atggcaacccctcgaatcctgatcgctgagaacggctggttcacagacagttacgtgcaaacagaagacaccacag
ccatctacatgatgaagaatttctcaaccaggttctcaagcaataagggttgatggagtccgagtggttggtacact
gcctggtctctcctggatggcttgaatggcaggacgcttacaacacccgcccgtggactgtttatgtggacttcaacag
cgaacagagagaaagaaggcccaagtctcggcgcatctataaacaggctcataggagaaaacggcttcacgc
tcagagaggccaccccgatctgcaggggcagttccctgtgacttctcctggggcgctaccgagctgttcttaagcc
cgagtgggtggcttctcgcacagttcagcgaccctcacctctacgtgtggaacgccactggcaaccgaatgcttca
ccgggtggaaggggtgaggctgaaaacacggcccgctcagtgcacagatttcacacatcaagaaacaactcga
gatgttggaagaatgaaagtcaccacttccggttgccttgactgggcctcggctctccacgggcaacctgtcc
gaggtgaaccgacaagccctgaggtactacaggtgtgtggtcaccgaggggctgaagctcaacatctcgcccatgg
tcacctgtactacccgacccatgccacctgggctgcccgcgcccgtgctgcacagcgggggggtggctggaccc
atccacggccaaggccttccgcgactacgcagggctgtgcttccgggagctgggggacctggtgaagctctggatc
accatcaacgagcccaaccggctgagcgacgtctacaaccgcaccagcaacgacacctaccaggccgcccaca
acctgtgatcgcgacgcgctcgtgtggcacctgtacgaccgcccagtaaccggccgtcgacgcgggggcgctgtc

10

20

30

40

gctgtccctgcactcggactgggcccagagcccgccaacccctacgtggcctcgcactggcaggcggccgagcgcttc
ctgcagttcgagattgctgtggtcgcgagccccgttcaagaccggggactaccgggtggccatgagggagtacat
cgctccaagacccggcgcgggctctccagctccgtgctgccccgcttcagcgacgccgagcggcggtggtcaa
ggcgccgcccgaactctacgccctcaaccacttcaccaccagggttcgtgatgcacgagcagcagaacggcagccg
ctacgactcggacagggacgtgcagttcctgcaggacatcacccgcctggcctcaccagccgcctggccgtgatg
ccctggggcgagggcaagctgctgcggtggatgcggaacaactacggagacctggacgtctacatcacggccaat
ggcatcgacgaccaggccctgcagaacgaccagcttcgccagtactacctggagaagtacgtccaggaggctctg
aaagcatatctgatagataaaaataaaaatcaaaggctattatgcattcaaactgactgaagaaaaatctaaaccag
gtttggattcttcacctctgatttcaaagccaagtcttcaatacagttttacaacaaactaattaccagcaacggcttccc
tctgagaacggcggtcctagatgcaatcagactcaaggaaatcccgagtgcaccgctctgcttactcctcctgcagaa
gaagccgctgatattcttagctgctgcttctgcacccctgggttctactctcatcaattaccatctttcacagacggaaga
gaagaaaattttgaaagcaaaggacttacaacacataccattaaagaaaggccacaagagagtccttagctaaa
gtgaacttatttctctgaagagtttagaaattcactccagttccatatgctggtaacacaaaagacatacccgatttga
cacagagtatttgagatactgtgctaaccaaggcgatgacaatcaaaacctctgccatgtggttgatgcattttccctt
aagcggtgacaatcagcgaactcagttcttggtctaaaggaggcttcgcactgccactaggctatgagtattacctga
cgcattgctttgtcaagttgatgagctgttcgcatcattctctagctttcttagataccaatagctactatggtaaaagtgt
ttttaaagtc aaactctgtaaggcttcacagcagatttaaaactattctttacactggatctgtgattttgtcactcgtagca
aggtgctttcccttttggctcctagtggtctcaaatagaaagcaaacacatcttagggtaactctacttatctatagccaat
cacagcactgacccacaactacacaaatccgttagctcttctccataaaacacctaattttgtgatcttttaagtaactg
aaatgtaaaagtatgacttccgtaacccatctcatggaaagatcgactaaggagagccataccagctgtgaggac
aatttagtactaatctcaccgtactgcaacttctccttttagagcaggcattccttaccatttttgaagatgacatgattta
gcatctagaacccctatctgcagtttcttctatggcttacctacatttcaagaatattgaacggaaaatttcagaaagattt
ccaagttttaaattgtgtactagcattagtgatgaaatctcattttcttctccatcctgcacaggatgtgaaacatc
cctctgtccagcaagccaagctacctatattactcacttgatagtcacatgggtatccagctgttattacttgctcatacc
caggtaaccttttttatttaatatagctccaaagtataagactagtgatgaaaaggaggtaagtcatacaaatatggaa
ggacagattaactctggcactaagtgggaatgctgcaggttttacaggaaaacaaaattcagtcagtggtttaagca
tcctctgaggtacctggggcacaatctccacagataaggggaaagagcactgacaaagactaaacatcctaaaaa
gacgcaatgttctacttactggccatcagaataatggccaaaggaccctatacttgctgctctctagccaagtttcgctg
cacataggtgtagaatgcagcgactgacctggatgcgattcagaatgctgatctgagtgaactagttttatacagca
cttttaaagcctagaattcttccatctgaactgggagttttgactttttgaaattaattgtgcttaagattattcagtgattct
aaacactggaggtagaaaactgtataccattatgcctattaattttcttgattagccaacatttaataaccacaaagt
ggccagtcggttcttccctttcaggaatttaagtcaaaggatgctgctgcctgcgatgctggcacttcatagggggtgac
agtttgctccctgcggttccacttccatccagctccctgctaattggcttgggagagccctgcacccacatgggagacc
caaaagcagatcctgctgcttcagcctgctgcggccacttggagtatgaaccagtggtggaagatcaatgtctctcc

10

20

30

40

caacaattcttgaataaatttttcaaaagtcaaaataaaattctccagctcaaaaagcttagtagaaaacgacacctac
attaaggcggttgattgtatcccaagtgcatctacgttacaaaccaaattgagtagcaattcagtagctactagact
ataaggagaaaacagccaattcaacaaaaataccaaagtcacgtgcagttaatttgcttctggttgccaaatgttttt
ttctcttctgccaccactggtttacatgtactttagaagaaaatttgacttttgcttctttagagaaatcactattatcaaaggc
aattcataattacaagtggtccattgtcttaagagctcaagattatagcccttcaaactgccaaactcctcaaatagtga
agctcctaacgaagggtttacaacatcctgttcttaggggttatattttaagtgactgtaattacctaacaaattaatct
ggctatctattggaatacatgtaattcagggttatcataaaccacttaaaaactaaagggttaagtggaagttgctgct
tttcaaagtaacagggttctcaggggaaaatatcaccttagcgtccacctggtactacatctcgtgtattcactgtaaccc
atctttccgaacatgtctgatatatatggaaacaacactagtgcttagcctctggaaatgaggccaggattttgtgattaa
atgtctaatttattccaaataaactgatttacgccaata (配列番号 : 411)

10

【 0 0 5 5 】

イヌ、学名カニス・ループス・ファミリアリス (*Canis lupus familiaris*) 由来の β クロ
トーのアミノ酸配列が以下に提供されている :

【 化 1 3 】

20

MKPGCAAGSPGNEWIFLSTDESNTHYRKTCMNHGLQRSVILSAFILLGAVPGFSGD
GRAIWSKNPHFSPVNESQLFLYDTFPKNFFWGVGTGAFQVEGNWKTDGKGPSIW
DHFHHTHLKNVNSMNSSSDSYIFLEKDL SALDFIGVSFYQFSISWPRLFPDGIAAVAN
AKGLQYYNSLLDALVLRNIEPIVTLYHWDLPLALQEKYGGWKNETITDIFNDYATYCF
QTFGDRVKYWITIHNPYLVAWHGYGTGMHAPGEKGNLAAVYTVGHNLKAHSKVV
HNYNTNFRPYQKGLLSITLGSHWIEPNRSENMMDILKCQQSMVSVLGWFANPIHGN
GDYPEVMKKKLLSTLPLFSEAEKNEVRGTADFFAFSFGPNNFKPQNTMAKMGQNV
SLNLREVLNWIKLEYGNPRILIAENGWFTDSHVKTEDTTAIYMMKNFLNQVLQAIRFD
EIQVFGYTAWSLLDGFEWQDAYSTRRGLFYVDFNSKQKERKPKSSAYYYKQIIQEN
GFTFKESTPDVQGGQFPCDFSWGVTESVLKPKVVASSPQFSDPHLYVWNVTGNRLL
HRVEGVRLKTRPAQCTDFVSIKRQLEMLARMNVTHYRFALDWPSILPTGNLSTVNR
QALRYRRCVVSESLKLSISPMVTLYYPHTAHLGLPSPLLHSGGWL NASTARAFQDY
AGLCFQELGDLVKLWITINEPNRLSDVYSHTSSDTYRAAHNLLIAHALVWHL YDRRY
RPAQRGAVSLSLHSDWAEPANPYADSHWKAERFLQFEIAWFAEPLFKTG DYPPA
MREYIASKNRQGLSRSTLPRFTDEERRLVKGAADFYALNHFTTRFVMHARQNGSR
YDADR DVQFLQDITCLSSPSRLAVLPWGERKVL RWIQKNYGDVDVYITASGIDDQS
LENDEL RKYYLEKYIQEALKAHLIDKVVKGYAFKLTEEKSKPRFGFFTSEFKAKSS
VQLYNKLISNSGFPSENRSPRCSETQRNTECMVCLFLVQKKPLIFFSCCFFSTLVLL
SSITILHKRKRRKIWKAKNLQHIPLKKSNSLQS (配列番号 : 412)

30

40

【 0 0 5 6 】

イヌ β クロトーのコード核酸配列が以下に提供されている :

【化 1 4】

acaatcacagctttactgaagcgttgataagacaggcgagcagttagtggcaaataagccaggctgtgcggctg
gatctccagggaaatgaatggattttcctcagcaccgatgaaagcaacacacactataggaacaatgtgcaacca
cgggctacagagatctgtcatcctgtcagcatttattccttaggagctgttcctggattctctggagacggaagagctat
atggtctaaaaatcctcattttagtccggtaaataagagtcagctgtttctctatgacacttttctaaaaacttttttggggc
gttgggactggagcatttcaagtgaagggaattggaagacagatggaaaaggaccctctatatgggatcatttcac
cacacacaccttaaaaaatgtaacagcatgaatagtccagtgacagttacattttctggaaaaagacctatcagccc
tggattttatcggagtttcttttatcaatttcaatttcttgccaaggcttttccccgatggaatagcagcagttgccaacgc
aaaaggctccagtactacaattcttctcgtatgctctagtacttaggaacattgaacctatagttactttataccattggg
atttgcctttggcactacaagaaaaatatgggggtggaaaaatgaaaccataacggatatcttcaatgactatgcc
cctactgttccagacggttcggggatcgtgtcaaatactggattacaattcacaatccatatctagttgcttggcatgggta
tgggacaggatgcacgcgcctggagagaagggaacttagcagctgtctacactgtgggacacaacctaatcaa
ggctcattcgaaagtttggcataactacaacacaaatttccgcccatatcagaagggtttgtatcaatcacgttgggat
ccattggattgaacaaacagatcagaaaacatgatggatatactcaaattgtcaacaatccatggtttcagtgtctg
gggtgtttgccaaccccatccatgggaatggagactatccagaagtgtgaaaaagaagttgctctccactctacccc
tttctctgaagcagagaagaatgaagtgggggacagctgacttcttgccttttcttggacccaacaatttcaagc
cccagaacacccatggctaaaatgggacaaaatgtgtcactcaatttaagagaagtgtgaattggattaaactggaa
tatggcaacccccgaatcttgattgtgagaatggctgggtcacagacagtcattgtgaaaacagaagataccacagc
catttacatgatgaagaatttctcaaccagggttctcaagcaataagggttgacgaaatacaagtggttggctacactgc
ttggtctctcctggatggctttgaatggcaggatgcttactccactcgccaggatttttatgtggattttaatagtaaaca
aaaagaaagaaagcccaagtcttcggcatattactataaacagatcatacaagaaaatggttttactttcaagagtc
caccacagatgtgcagggtcagtttccctgtgacttctcatgggggtgcaccgaatctgtccttaagcccaaagtcgtgg
cttctccccacagttcagcgaacctcacctgtacgttggaatgtgacaggcaacagactgttgaccgagtggaag
gggtgaggctgaagacacggccggctcaatgcacagattttgtcagcatcaaaagacaacttgagatgttggcgag
gatgaacgtcactcactacagggttgcctggactggccctccatccttcccaccgggaacctgtccacgggtaaccga
caagccctgaggctactacaggtgtgtggtcagcagtcgtgaagctcagcatctccccgatggtcacgctgtactac
ccgaccacgcccacctgggctcccctcgccgtgtgtcacagcgggggtggctgaacgcgtccaccgcccgc
gccttccaggactatgccgggctgtgcttccaggagctgggggacctggtgaagctctggatcaccatcaatgagcc
caaccggctgagtgacgtctacagccacaccagcagcgacacctaccgggcagcgacacacctgtgatcgccc
acgcccgtgtgtggcacctgtacgaccggcggtaccggccggcgagcgcggggcccgtgtcgctgtccctgcactc
ggactgggcgagcccgccaacccctacgcccactgcactggaaggcgccgagcgcttctgcagttcgaaat
cgctgttgcggagccgctcttcaagaccggggactaccgcccggccatgaggagtagcatcgctccaagaa
caggcaggggctctcgctccaccctgccccgttaccgacgaggagaggaggtgtgtaaggcgccgccc
acttctacgctgaaccacttaccaccagggttcgtgatgcacgcgcgcagaaacggcagccgctacgacgcgg
accgcgacgtccagttctgcaggacatcacctgcctgagctccccagccgctggccgtctgccttgggggga

10

20

30

40

gcgcaagggtgctcaggtggatccagaagaactacggagacgtggacgtgtacatcacggccagtggcatcgatga
ccagtctctggaaaatgatgagctcagaaaatactacttgagaaaatacatccaggaggctctgaaagcacaccta
attgataaagtcaaagctaaaggctattatgcattcaaactgactgaagaaaaatctaaaccagatttggattcttcac
gtctgaattcaaagctaaatcctcagttcagctttacaacaaactgatcagcaacagtggcttccctctgagaacagg
agtcctagatgcagtgagactcaaagaaacacagagtgcatggctgtcttatttctgtgcaaaagaaaccactgatat
tctttagttgttgcttcttctaccctgggtctactttcatcgattaccattcttcataagcgaaagagaagaaaaatttgaa
agcaagaacttacaacatataccattaaagtgaggccacagaaagttcttagtgaaactgatcctatttctgtctgcat
gatagaaagtctaaaaattcactccagttccaaatactggtaacatagaagacaatttgaaacactagtagtaacca
aggtgatgacaatcaaggtctctgtgtgtgtggtccaaatgaattttccattaggtgttgacatcactgaatacagtttttag
atctgaagactaagatctagagagtaagctaggattatctgatacaatgcttcattaagttaataagctgttatccatcat
tcttctctggcttccctctagaaataccaatagctaattatagcaacttagaaaaaagtgaacttttgctagactccatag
cagaaatctaaaactcttaacactggatattcagtgattattctatcacttctaacaagggtgcttttccctttagaagatat
acaatagggtaaatagtgctcctttatcatccattccagcactttttttccagcatagactcttaaacacattgatcctagtt
tttctcaatagaaataaaaaatcatttagaaaacatggaattttgtgaggtctctccttgcatagatctgagtttttttaaaa
aaaagacttaactccataaccatctcatgggaagatcacaggactaagattaaggagagtttagacccatcaactg
cctgaggagacagcactcaacctcacagtacagcaaattcctgggacaaactgacagcaatctccgcacttggat
tgttgaggcagcacacaagatcttaacatacttaggaaaggttaaataattctaaaaagatgtaaagtttttttattatcaa
gtcttcaaaggacatattattccataagacttgctctctcctgagttccactcttctgacactatgtgtatatggggacact
caaactgcaccttgacattgcaactttggatacaattcagaatgtaaatgtttgaaggacttaaaacttttccactgcac
ctttgaagctgggattaagtaatacgaactgggagttgactttttgaactctgtgcttgattattcactgtattctaaattt
taaggaaaacctgaatgtaaaccattcatacccttcttgggttagtaaacatttaaccacccatttca (配列
番号 : 413)

10

20

30

【 0 0 5 7 】

ヒト/マウス β クロトーキメラタンパク質 (ヒト KLB (M1-F508) - マウス KLB (P507-S1043))
の アミノ酸配列が以下に提供されている :

【化 1 5】

MKPGCAAGSPGNEWIFFSTDEITTRYRNTMSNGGLQRSVILSALILLRAVTGFSGDG
RAIWSKNPNFTPVNESQLFLYDTFPKNFFWGIGTGALQVEGSWKKDGKGPSIWDH
FIHTHLKNVSSTNGSSDSYIFLEKDLSALDFIGVSFYQFSISWPRLFPDGIVTVANAK
GLQYYSTLLDALVLRNIEPIVTLYHWDLPLALQEKGWKNNDTIIDIFNDYATYCFQM
FGDRVKYWITIHNPYLVAWHGYGTGMHAPGEKGNLAAVYTVGHNLIAHSAVWHN
YNTHFRPHQKGWLSITLGSHWIEPNRSENTMDIFKCQQSMVSVLGWFANPIHGDG
DYPEGMRKKLFSVLPIFSEAEKHEMRGTADFFAFSFGPNNFKPLNTMAKMGQNV
LNLREALNWIKLEYNNPRILIAENGWFTDSRVKTEDTTAIYMMKNFLSQVLQAIRLDE
IRVFGYTAWSLLDGFEWQDAYTIRRGFLFYVDFNSKQKERKPKSSAHYYKQIIRENG
FPLKESTPDMKGRFPCDFSWGVTESVLKPEFTVSSPQFTDPHLYVWNVTGNRLLY
RVEGVRLKTRPSQCTDYVSIKKRVEMLAKMKVTHYQFALDWTSLPTGNLSKVN
RLVRYRCVVSEGLKLGVPMTLYHPTHSHLGLPLLLSSGGWLNMTAKAFQDY
AELCFRELGLVKLWITINEPNRLSDMYNRTSNDTYRAAHNLMIAHAQVWHLYDRQ
YRPVQHGAVSLSLHCDWAEPANPFVDSHWKAAERFLQFEIAWFADPLFKTGDYPS
VMKEYIASKNQRLSSSVLPRFTAKESRLVKGTVDYALNHFTTRFVIHKQLNTNRS
VADRDVQFLQDITRLSSPSRLAVTPWGVRLKLLAWIRRNRYRDRDIYITANGIDDL
ALEDDQIRKYYLEKYVQEALKAYLIDKVKIKGYAFKLTEEKSKPRFGFFTSDFRAKSSV
QFYSKLISSSGLPAENRSPACGQPAEDTDCTICSFLVEKKPLIFFGCCFISTLAVLLSI
TVFHHQKRRKFQKARNLQNIPLKKGHSRVFS (配列番号 : 374)

10

20

【 0 0 5 8】

ヒト/マウス β クロトーキメラタンパク質のコード核酸配列が以下に提供されている:

30

【化 1 6】

ATGAAGCCAGGCTGTGCGGCAGGATCTCCAGGGAATGAATGGATTTTCTTCAG
CACTGATGAAATAACCACACGCTATAGGAATACAATGTCCAACGGGGGATTGCA
AAGATCTGTCATCCTGTCAGCACTTATTCTGCTACGAGCTGTTACTGGATTCTCT
GGAGATGGAAGAGCTATATGGTCTAAAAATCCTAATTTTACTCCGGTAAATGAAA
GTCAGCTGTTTCTCTATGACACTTTCCCTAAAAACTTTTTCTGGGGTATTGGGAC
TGGAGCATTGCAAGTGGAAGGGAGTTGGAAGAAGGATGGAAAAGGACCTTCTA
TATGGGATCATTTTCATCCACACACACCTTAAAAATGTCAGCAGCACGAATGGTT
CCAGTGACAGTTATATTTTTCTGGAAAAAGACTTATCAGCCCTGGATTTTATAGG
AGTTTCTTTTTATCAATTTTCAATTTCTGGCCAAGGCTTTTCCCCGATGGAATA
GTAACAGTTGCCAACGCAAAAGGTCTGCAGTACTACAGTACTCTTCTGGACGCT
CTAGTGCTTAGAAACATTGAACCTATAGTTACTTTATACCACTGGGATTTGCCTT
TGGCACTACAAGAAAAATATGGGGGGTGGAAAAATGATACCATAATAGATATCT
TCAATGACTATGCCACATACTGTTTCCAGATGTTTGGGGACCGTGTCAAATATTG
GATTACAATTCACAACCCATATCTAGTGGCTTGGCATGGGTATGGGACAGGTAT
GCATGCCCCTGGAGAGAAGGGAAATTTAGCAGCTGTCTACACTGTGGGACACA
ACTTGATCAAGGCTCACTCGAAAGTTTGGCATAACTACAACACACATTTCCGCC
CACATCAGAAGGGTTGGTTATCGATCACGTTGGGATCTCATTGGATCGAGCCAA
ACCGGTTCGGAAAACACGATGGATATATTCAAATGTCAACAATCCATGGTTTCTG
TGCTTGGATGGTTTGCCAACCCTATCCATGGGGATGGCGACTATCCAGAGGGG

10

20

ATGAGAAAGAAGTTGTTCTCCGTTCTACCCATTTTCTCTGAAGCAGAGAAGCAT
GAGATGAGAGGCACAGCTGATTTCTTTGCCTTTTCTTTTGGACCCAACAACCTTCA
AGCCCCTAAACACCATGGCTAAAATGGGACAAAATGTTTCACTTAATTTAAGAGA
AGCGCTGAACTGGATTAACTGGAATACAACAACCCTCGAATCTTGATTGCTGA
GAATGGCTGGTTCACAGACAGTCGTGTGAAAACAGAAGACACCACGGCCATCT
ACATGATGAAGAATTTCTCAGCCAGGTGCTTCAAGCAATAAGGTTAGATGAAA
TACGAGTGTTTGGTTATACTGCCTGGTCTCTCCTGGATGGCTTTGAATGGCAGG
ATGCTTACACCATCCGCCGAGGATTATTTTATGTGGATTTTAACAGTAAACAGAA
AGAGCGGAAACCTAAGTCTTCAGCACACTACTACAAACAGATCATACGAGAAAA
TGGTTTTCTTTGAAAGAGTCCACGCCAGACATGAAGGGTTCGGTTCCCCTGTGA
TTTCTCTTGGGGAGTCACTGAGTCTGTTCTTAAGCCCGAGTTTACGGTCTCCTC
CCCGCAGTTTACCGATCCTCACCTGTATGTGTGGAATGTCACTGGCAACAGATT
GCTCTACCGAGTGGAAGGGGTAAGGCTGAAAACAAGACCATCCCAGTGCACAG
ATTATGTGAGCATCAAAAAACGAGTTGAAATGTTGGCAAAAATGAAAGTCACCC
ACTACCAGTTTGCTCTGGACTGGACCTCTATCCTTCCCACTGGCAATCTGTCCA
AAGTTAACAGACAAGTGTTAAGGTACTATAGGTGTGTGGTGAGCGAAGGACTGA
AGCTGGGCGTCTTCCCCATGGTGACGTTGTACCACCCAACCCACTCCCATCTC
GGCCTCCCCCTGCCACTTCTGAGCAGTGGGGGGTGGCTAAACATGAACACAGC
CAAGGCCTTCCAGGACTACGCTGAGCTGTGCTTCCGGGAGTTGGGGGACTTGG
TGAAGCTCTGGATCACCATCAATGAGCCTAACAGGCTGAGTGACATGTACAACC
GCACGAGTAATGACACCTACCGTGCAGCCCACAACCTGATGATCGCCCATGCC
CAGGTCTGGCACCTCTATGATAGGCAGTATAGGCCGGTCCAGCATGGGGCTGT
GTCGCTGTCCTTACATTGCGACTGGGCAGAACCTGCCAACCCCTTTGTGGATT
CACTGGAAGGCAGCCGAGCGCTTCCTCCAGTTTGAGATCGCCTGGTTTGCAG
ATCCGCTCTTCAAGACTGGCGACTATCCATCGGTTATGAAGGAATACATCGCCT
CCAAGAACCAGCGAGGGGCTGTCTAGCTCAGTCCTGCCGCGCTTCACCGCGAAG
GAGAGCAGGCTGGTGAAGGGTACCGTCACTTCTACGCACTGAACCACTTCAC
TACGAGGTTCTGTGATACACAAGCAGCTGAACACCAACCGCTCAGTTGCAGACA
GGGACGTCCAGTTCCTGCAGGACATCACCCGCCTAAGCTCGCCCAGCCGCCT
GGCTGTAACACCCTGGGGAGTGCGCAAGCTCCTTGCGTGGATCCGGAGGAAC
TACAGAGACAGGGATATCTACATCACAGCCAATGGCATCGATGACCTGGCTCTA
GAGGATGATCAGATCCGAAAGTACTACTTGGAGAAGTATGTCCAGGAGGCTCT
GAAAGCATATCTCATTGACAAGGTCAAATCAAAGGCTACTATGCATTCAAACCTG
ACTGAAGAGAAATCTAAGCCTAGATTTGGATTTTTCACCTCTGACTTCAGAGCTA

10

20

30

40

AGTCCTCTGTCCAGTTTTACAGCAAGCTGATCAGCAGCAGTGGCCTCCCCGCT
GAGAACAGAAGTCCTGCGTGTGGTCAGCCTGCGGAAGACACAGACTGCACCAT
TTGCTCATTTCTCGTGGAGAAGAAACCACTCATCTTCTTCGGTTGCTGCTTCATC
TCCACTCTGGCTGTACTGCTATCCATCACCGTTTTTTCATCATCAAAAGAGAAGAA
AATTCCAGAAAGCAAGGAACTTACAAAATATACCATTGAAGAAAGGCCACAGCA
GAGTTTTTCAGCTGA (配列番号 : 375)

10

【 0 0 5 9 】

マウス/ヒト β クロトーキメラタンパク質 (マウス KLB(M1-F506) - ヒト KLB(S509-S1044))
のアミノ酸配列が以下に提供されている :

【 化 1 7 】

MKTGCAAGSPGNEWIFFSSDERNTRSRKTMSNRALQRSVLSAFVLLRAVTGFSG
DGKAIWDKKQYVSPVNPSQLFLYDTFPKNFSWGVGTGAFQVEGSWKTDGRGPSI
WDRYVYSHLRGVNGTDRSTDYIFLEKDLLALDFLGVSFYQFSISWPRLFPNGTVA
AVNAQGLRYYRALLDSLVLNRNIEPIVTLYHWDPLTLQEEYGGWKNATMIDLFNDYA
TYCFQTFGDRVKYWITIHPYLVAWHGFGTGMHAPGEKGNLTAVYTVGHNLKAHS
KVWHNYDKNFRPHQKGWLSITLGSHWIEPNRTDNMEDVINCQHSMSSVLGWFAN
PIHGDGDYPEFMKTGAMIPEFSEAEKEEVRGTADFFAFSFGPNNFRPSNTVVKMG
QNVSLNLRQVLNWKLEYDDPQILISENGWFTDSYIKTEDTTAIYMMKNFLNQVLQAI
KFDEIRVFGYTAWTLLDGFQWQDAYTTRRGLFYVDFNSEQKERKPKSSAHYYKQII
QDNGFSLKESTPDVQGGQFPCDFSWGVTESVLKPESVASSPQFSDPHLYVWNATG
NRLLHRVEGVRLKTRPAQCTDFVNIKKQLEMLARMKVTHYRFALDWASVLPTGNLS
AVNRQALRYRRCVVSEGLKLGISAMVTLYYPHTAHLGLPEPLLHADGWLNPSTAEA
FQAYAGLCFQELGDLVKLWITINEPNRLSDIYNRSGNDTYGAAHNLVAHALAWRLY
DRQFRPSQRGAVSLSLHADWAEPANPYADSHWRAAERFLQFEIAWFAEPLFKTGD
YPAAMREYIASKHRRGLSSSALPRLTEAERRLLKGTVDFCALNHFTTRFVMHEQLA
GSRYDSDRDIQFLQDITRLSSPTRLAVIPWGVVRKLLRWVRRNYGDMDIYITASGIDD
QALEDDRRLRKYLLGKYLQEVLKAYLIDKVKRIKGYAFKLAEEKSKPRFGFFTSDFKA
KSSIQFYNKVISSRGFPFENSSSRCSQTQENTECTVCLFLVQKKPLIFLGCCFFSTLV
LLLSIAIFQRQKRRKFWKAKNLQHIPLKKGKRVVS (配列番号 : 376)

20

30

40

【 0 0 6 0 】

マウス/ヒト β クロトーキメラタンパク質のコード核酸配列が以下に提供されている :

【 化 1 8 】

ATGAAGACAGGCTGTGCAGCAGGGTCTCCGGGGAATGAATGGATTTTCTTCAG
CTCTGATGAAAGAAACACACGCTCTAGGAAAACAATGTCCAACAGGGGCACTGCA

AAGATCTGCCGTGCTGTCTGCGTTTGTCTGCTGCGAGCTGTTACCGGCTTCTC
CGGAGACGGGAAAGCAATATGGGATAAAAAACAGTACGTGAGTCCGGTAAACC
CAAGTCAGCTGTTCTCTATGACACTTTCCCTAAAACTTTTCTGGGGCGTTG
GGACCGGAGCATTTCAAGTGGAAGGGAGTTGGAAGACAGATGGAAGAGGACC
CTCGATCTGGGATCGGTACGTCTACTCACACCTGAGAGGTGTCAACGGCACAG
ACAGATCCACTGACAGTTACATCTTTCTGGAAAAAGACTTGTTGGCTCTGGATTT
TTTAGGAGTTTCTTTTTTATCAGTTCTCAATCTCCTGGCCACGGTTGTTTCCCAAT
GGAACAGTAGCAGCAGTGAATGCGCAAGGTCTCCGGTACTACCGTGCACTTCT
GGACTCGCTGGTACTTAGGAATATCGAGCCCATTGTTACCTTGTACCATTGGGA
TTTGCCTCTGACGCTCCAGGAAGAATATGGGGGCTGGAAAAATGCAACTATGAT
AGATCTCTTCAACGACTATGCCACATACTGCTTCCAGACCTTTGGAGACCGTGT
CAAATATTGGATTACAATTCACAACCCCTTACCTTGTTGCTTGGCATGGGTTTGGC
ACAGGTATGCATGCACCAGGAGAGAAGGGAAATTTAACAGCTGTCTACACTGTG
GGACACAACCTGATCAAGGCACATTGCAAAGTGTGGCATAACTACGACAAAAAC
TTCCGCCCTCATCAGAAGGGTTGGCTCTCCATCACCTTGGGGTCCCATTGGATA
GAGCCAAACAGAACAGACAACATGGAGGACGTGATCAACTGCCAGCACTCCAT
GTCCTCTGTGCTTGGATGGTTCGCCAACCCCATCCACGGGGACGGCGACTACC
CTGAGTTCATGAAGACGGGCGCCATGATCCCCGAGTTCTCTGAGGCAGAGAAG
GAGGAGGTGAGGGGCACGGCTGATTTCTTTGCCTTTTCTTCGGGGCCCAACAA
CTTCAGGCCCTCAAACACCGTGGTGAAAATGGGACAAAATGTATCACTCAACTT
AAGGCAGGTGCTGAACTGGATTAACTGGAATACGATGACCCTCAAATCTTGAT
TTCGGAGAACGGCTGGTTCACAGATAGCTATATAAAGACAGAGGACACCACGG
CCATCTACATGATGAAGAATTCCTAAACCAGGTTCTTCAAGCAATAAAATTTGA
TGAAATCCGCGTGTTTGGTTATACGGCCTGGACTCTCCTGGATGGCTTTGAGTG
GCAGGATGCCTATACGACCCGACGAGGGCTGTTTTATGTGGACTTTAACAGTGA
GCAGAAAGAGAGGAAACCCAAGTCCTCGGCTCATTACTACAAGCAGATCATACA
AGACAACGGCTTCTCTTTAAAAGAGTCCACGCCAGATGTGCAGGGCCAGTTTCC
CTGTGACTTCTCCTGGGGTGTCACTGAATCTGTTCTTAAGCCCGAGTCTGTGGC
TTCGTCCCCACAGTTCAGCGATCCTCATCTGTACGTGTGGAACGCCACTGGCAA
CAGACTGTTGCACCGAGTGGAAGGGGTGAGGCTGAAAACACGACCCGCTCAAT
GCACAGATTTTGTAAACATCAAAAAACAACCTTGAGATGTTGGCAAGAATGAAAGT
CACCCACTACCGGTTTGTCTCTGGATTGGGCCTCGGTCTTCCCACTGGCAACC
TGTCGCGGTGAACCGACAGGCCCTGAGGTACTACAGGTGCGTGGTCAGTGA
GGGGCTGAAGCTTGGCATCTCCGCGATGGTCACCCTGTATTATCCGACCCACG

10

20

30

40

CCCACCTAGGCCTCCCCGAGCCTCTGTTGCATGCCGACGGGTGGCTGAACCCA
TCGACGGCCGAGGCCTTCCAGGCCTACGCTGGGCTGTGCTTCCAGGAGCTGG
GGGACCTGGTGAAGCTCTGGATCACCATCAACGAGCCTAACCGGCTAAGTGAC
ATCTACAACCGCTCTGGCAACGACACCTACGGGGCGGCGCACAACCTGCTGGT
GGCCCACGCCCTGGCCTGGCGCCTCTACGACCGGCAGTTCAGGCCCTCACAG
CGCGGGGCGCGTGTCTGCTGTCTGCTGCACGCGGACTGGGCGGAACCCGCCAAC
CCCTATGCTGACTCGCACTGGAGGGCGGCCGAGCGCTTCCTGCAGTTCGAGAT
CGCCTGGTTCGCCGAGCCGCTCTTCAAGACCGGGGACTACCCCGCGGCCATG
AGGGAATACATTGCCTCCAAGCACCGACGGGGGCTTTCCAGCTCGGCCCTGCC
GCGCCTCACCGAGGCCGAAAGGAGGCTGCTCAAGGGCACGGTCGACTTCTGC
GCGCTCAACCACTTCACCACTAGGTTCTGTGATGCACGAGCAGCTGGCCGGCAG
CCGCTACGACTCGGACAGGGACATCCAGTTTCTGCAGGACATCACCCGCCTGA
GCTCCCCACGCGCCTGGCTGTGATTCCCTGGGGGGTGGCGCAAGCTGCTGCG
GTGGGTCCGGAGGAACTACGGCGACATGGACATTTACATCACCGCCAGTGCGA
TCGACGACCAGGCTCTGGAGGATGACCGGCTCCGGAAGTACTACCTAGGGAA
GTACCTTCAGGAGGTGCTGAAAGCATACCTGATTGATAAAGTCAGAATCAAAGG
CTATTATGCATTCAAACCTGGCTGAAGAGAAATCTAAACCCAGATTTGGATTCTTC
ACATCTGATTTTAAAGCTAAATCCTCAATACAATTTTACAACAAAGTGATCAGCA
GCAGGGGCTTCCCTTTTGAGAACAGTAGTTCTAGATGCAGTCAGACCCAAGAAA
ATACAGAGTGCACTGTCTGCTTATTCCTTGTGCAGAAGAAACCACTGATATTCCT
GGGTTGTTGCTTCTTCTCCACCCTGGTTCTACTCTTATCAATTGCCATTTTCAA
AGGCAGAAGAGAAGAAAGTTTTGGAAAGCAAAAACTTACAACACATACCATTA
AAGAAAGGCAAGAGAGTTGTTAGCTAG (配列番号 : 377)

10

20

30

【 0 0 6 1 】

関連するβクロトーポリペプチドとしては、アレル変異体(例えば、SNP変異体);スプライス変異体;断片;誘導体;置換、欠失、及び挿入変異体;融合ポリペプチド;並びに種間ホモログ、好ましくは、βクロトー活性を保持し、及び/又は抗βクロトー免疫応答を発生させるのに十分であるものが挙げられる。当業者が理解するように、本明細書に提供される抗βクロトー抗体は、βクロトーポリペプチド、βクロトーポリペプチド断片、βクロトー抗原、及び/又はβクロトーエピトープに結合することができる。エピトープは、より大きいβクロトー抗原の一部であってもよく、該βクロトー抗原は、より大きいβクロトーポリペプチド断片の一部であってもよく、該βクロトーポリペプチド断片はさらに、より大きいβクロトーポリペプチドの一部であってもよい。βクロトーは、ネイティブな形態又は変性した形態で存在することができる。本明細書に記載されるβクロトーポリペプチドは、様々な源から、例えば、ヒト組織型からもしくは別の源から単離するか、又は組換え法もしくは合成法により調製することができる。βクロトーポリペプチドは、天然に由来する対応するβクロトーポリペプチドと同じアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むことができる。βクロトーポリペプチドは、βクロトーポリペプチドの切断又は分泌形態(例えば、細胞外ドメイン配列)、該ポリペプチドの変異体形態(例えば、選択的スプ

40

50

ライシング形態)及びアレル変異体を包含する。βクロトーポリペプチドのオルソログも当技術分野で周知である。

【0062】

「βクロトー」という用語は、「全長」のプロセシングされていないβクロトー、及び細胞内でのプロセシングによって生じるβクロトーの任意の形態を包含する。この用語は、βクロトーの天然の変異体又は突然変異(例えば、スプライス変異体、アレル変異体、SNP変異体、及びアイソフォーム)も包含する。本明細書に記載されるβクロトーポリペプチドは、様々な源から、例えば、ヒト組織型からもしくは別の源から単離するか、又は組換え法もしくは合成法により調製することができる。

【0063】

「FGF19様シグナル伝達」及び「FGF19様シグナル伝達を誘導する」という用語は、本開示のβクロトーに結合する結合タンパク質、例えば、抗体に適用される場合、該結合タンパク質(例えば、抗体)が、(i)βクロトー;(ii)FGFR1c、FGFR2c、FGFR3c、及びFGFR4;又は(iii)βクロトー並びにFGFR1c、FGFR2c、FGFR3c、及びFGFR4のうちの1つを含む複合体の結合によって誘導されるインビボの生物学的作用を模倣又は調節し、かつそうでなければ、FGF19が(i)βクロトー;(ii)FGFR1c、FGFR2c、FGFR3c、もしくはFGFR4;又は(iii)βクロトー並びにFGFR1c、FGFR2c、FGFR3c、及びFGFR4のうちの1つを含む複合体に結合することによりインビボで生じるであろう生物学的作用を誘導することを意味する。抗βクロトー抗体、例えば、βクロトー(例えば、ヒトβクロトー)に結合する抗体又はその断片の結合及び特異性を評価するとき、抗体又はその断片は、生物学的作用が、配列番号304の成熟形態(例えば、ヒトFGF19配列の成熟形態)を含む野生型FGF19標準の活性の5%以上、好ましくは、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、又は95%以上であり、かつ以下の性質を有する:(1)組換えFGF19受容体媒介ルシフェラーゼ-レポーター細胞アッセイ(例えば、実施例4を参照されたい);(2)組換えFGF19受容体媒介細胞アッセイでのERK-リン酸化(例えば、実施例4を参照されたい);又は(3)ヒト脂肪細胞でのERK-リン酸化(例えば、実施例5を参照されたい)において、100nM以下、例えば、90nM、80nM、70nM、60nM、50nM、40nM、30nM、20nM、又は10nMのEC50で、FGF19標準の5%以上の効力レベルを示すとき、生物学的作用を誘導するとみなされる。

【0064】

「FGF19R」という用語は、FGF19がインビボで形成することが知られているか又はFGF19がインビボで形成すると考えられている多量体受容体複合体を指すことができる。様々な実施態様において、FGF19Rは、(i)FGFR、例えば、FGFR1c、FGFR2c、FGFR3c、又はFGFR4、及び(ii)βクロトーを含む。

【0065】

「FGF21様シグナル伝達」及び「FGF21様シグナル伝達を誘導する」という用語は、本開示のβクロトーに結合する抗体などの結合タンパク質に適用される場合、該結合タンパク質(例えば、抗体)が、(i)βクロトー;(ii)FGFR1c、FGFR2c、FGFR3c、及びFGFR4;又は(iii)βクロトー並びにFGFR1c、FGFR2c、FGFR3c、及びFGFR4のうちの1つを含む複合体の結合によって誘導されるインビボの生物学的作用を模倣又は調節し、かつそうでなければ、FGF21が(i)βクロトー;(ii)FGFR1c、FGFR2c、FGFR3c、もしくはFGFR4;又は(iii)βクロトー並びにFGFR1c、FGFR2c、FGFR3c、及びFGFR4のうちの1つを含む複合体に結合することによりインビボで生じるであろう生物学的作用を誘導することを意味する。抗βクロトー抗体、例えば、βクロトー(例えば、ヒトβクロトー)に結合する抗体又はその断片の結合及び特異性を評価するとき、抗体又はその断片は、生物学的作用が、配列番号306又は429の成熟形態(例えば、ヒトFGF21配列の成熟形態)を含む野生型FGF21標準の活性の5%以上、好ましくは、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、又は95%以上であり、かつ以下の性質を有する:(1)組換えFGF21受容体媒介ルシフェラーゼ-レポーター細胞アッセイ(例えば、実施例4を参照されたい);(2)組換えFGF21受容体媒介細胞アッセイでのERK-リン酸化(例えば、実施例4を参

照されたい);又は(3)ヒト脂肪細胞でのERK-リン酸化(例えば、実施例5を参照されたい)において、100nM以下、例えば、90nM、80nM、70nM、60nM、50nM、40nM、30nM、20nM、又は10nMのEC50で、FGF21標準の5%以上の効力レベルを示すとき、生物学的応答を誘導するとみなされる。

【0066】

「FGF21R」という用語は、FGF21がインビボで形成することが知られているか又はFGF21がインビボで形成すると考えられている多量体受容体複合体を指すことができる。様々な実施態様において、FGF21Rは、(i)FGFR、例えば、FGFR1c、FGFR2c、FGFR3c、又はFGFR4、及び(ii)βクロトーを含む。

【0067】

「結合タンパク質」という用語は、ヒト及び/又はカニクイザルβクロトーを含む、βクロトーに結合する部分(例えば、1以上の結合領域、例えば、CDR)、並びに任意に、該結合部分が、結合タンパク質のβクロトーポリペプチド、断片、又はエピトープへの結合を促進する立体構造を取るのを可能にするスキヤフォールド又はフレームワーク部分(例えば、1以上のスキヤフォールド又はフレームワーク領域)を含むタンパク質を指す。そのような結合タンパク質の例としては、抗体、例えば、ヒト抗体、ヒト化抗体;キメラ抗体;組換え抗体;単鎖抗体;ダイアボディ;トリアボディ;テトラボディ; Fab断片; F(ab')₂断片; IgD抗体; IgE抗体; IgM抗体; IgG1抗体; IgG2抗体; IgG3抗体;又はIgG4抗体、及びこれらの断片が挙げられる。結合タンパク質は、例えば、CDR又はCDR誘導体が移植された代替的なタンパク質スキヤフォールド又は人工スキヤフォールドを含むことができる。そのようなスキヤフォールドには、例えば、該結合タンパク質の3次元構造を安定化するために導入される突然変異を含む抗体由来スキヤフォールド及び例えば、生体適合性ポリマーを含む完全合成スキヤフォールドが含まれるが、これらに限定されない。例えば、Korndorferらの文献、2003、タンパク質:構造、機能、及びバイオインフォマティクス(Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics)、53(1):121-129(2003); Roqueらの文献、Biotechnol. Prog. 20:639-654(2004)を参照されたい。さらに、ペプチド抗体模倣物(「PAM」)、及びフィブロンectin構成要素をスキヤフォールドとして利用した抗体模倣物に基づくスキヤフォールドを使用することができる。本開示との関連において、結合タンパク質は、例えば、解離定数(K_D)が $\leq 10^{-8}M$ であるとき、βクロトーに特異的に結合する又は選択的に結合すると言われる。結合タンパク質(例えば、抗体)は、 K_D が $\leq 10^{-9}M$ であるか又は K_D が $\leq 10^{-10}M$ であるとき、高い親和性でβクロトーに特異的に結合することができる。いくつかの実施態様において、結合タンパク質(例えば、抗体)は、βクロトー又はFGFR1c及びβクロトーを含む複合体に、例えば、約 $10^{-7}M$ ~約 $10^{-12}M$ の K_D で結合することができる。他の実施態様において、結合タンパク質(例えば、抗体)は、 $1 \sim 2 \times 10^{-9}M$ の K_D で結合することができる。

【0068】

「抗体」及び「免疫グロブリン」又は「Ig」という用語は、本明細書で互換的に使用され、かつ最も広い意味で使用されており、具体的には、例えば、下記のような、個々の抗βクロトーモノクローナル抗体(アゴニスト、アンタゴニスト、中和抗体、全長又は無傷のモノクローナル抗体を含む)、多エピトープ又は単一エピトープ特異性を有する抗βクロトー抗体組成物、ポリクローナル又は一価抗体、多価抗体、少なくとも2つの無傷抗体から形成された多重特異性抗体(例えば、それらが、所望の生物活性を示す限り、二重特異性抗体)、単鎖抗βクロトー抗体、及び抗βクロトー抗体の断片を含む。抗体は、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、及び/又は親和性成熟抗体、並びに他の種、例えば、マウス、ウサギなどに由来する抗体であることができる。「抗体」という用語は、特定の分子抗原に結合することができ、かつ2つの同一のポリペプチド鎖対から構成される免疫グロブリンクラスのポリペプチドの範囲内のB細胞のポリペプチド産物を含むことが意図され、ここで、各々の対は、1つの重鎖(約50~70kDa)と1つの軽鎖(約25kDa)を有し、各々の鎖の各々のアミノ末端部分は、約100~約130又はそれより多くのアミノ酸の可変領域を含み、各々の鎖の各々のカルボキシ末端部分は、定常領域を含む(Borrebaeck(編)(1995)、

10

20

30

40

50

抗体エンジニアリング(Antibody Engineering)、第2版、Oxford University Press.; Kubyの文献(1997)、免疫学(Immunology)、第3版、W.H. Freeman and Company, New Yorkを参照されたい)。具体的な実施態様において、本明細書に提供される抗体によって結合されることができる特定の分子抗原には、 β クロトーポリペプチド、 β クロトー断片、又は β クロトーエピトープが含まれる。抗体には、合成抗体、モノクローナル抗体、組換え産生抗体、多重特異性抗体(二重特異性抗体を含む)、ヒト抗体、ヒト化抗体、ラクダ化抗体、キメラ抗体、イントラボディ、抗イディオタイプ(抗Id)抗体、及び上記のもののいずれかの機能性断片(例えば、抗原結合断片、例えば、 β クロトー結合断片)(これは、該断片が由来した抗体の結合活性の一部又は全てを保持する抗体重鎖又は軽鎖ポリペプチドの部分(10)を指す)も含まれるが、これらに限定されない。機能性断片(例えば、抗原結合断片、例えば、 β クロトー結合断片)の非限定的な例としては、単鎖Fv(scFv)(例えば、単一特異性、二重特異性などを含む)、Fab断片、F(ab')断片、F(ab)2断片、F(ab')2断片、ジスルフィド結合Fv(sdFv)、Fd断片、Fv断片、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、及びミニボディが挙げられる。特に、本明細書に提供される抗体には、免疫グロブリン分子及び免疫グロブリン分子の免疫学的活性部分、例えば、抗原結合ドメイン、又は β クロトー抗原に結合する抗原結合部位(例えば、抗 β クロトー抗体の1以上の相補性決定領域(CDR))を含有する分子が含まれる。そのような抗体断片は、例えば、Harlow及びLaneの文献、抗体:実験マニュアル(Antibodies: A Laboratory Manual)、Cold Spring Harbor Laboratory, New York(1989); Myers(編)、分子生物学及び生命工学:包括的卓上参考書(Molec. Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference)、New York: VCH Publisher社(20); Hustonらの文献、Cell Biophysics, 22:189-224(1993); Pluckthun及びSkerraの文献、Meth. Enzymol., 178:497-515(1989)、及びDay, E.D.の文献、先端免疫化学(Advanced Immunochimistry)、第2版、Wiley-Liss社、New York, NY(1990)に見出すことができる。本明細書に提供される抗体は、免疫グロブリン分子の任意のタイプ(例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、及びIgY)、任意のクラス(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、及びIgA2)、又は任意のサブクラス(例えば、IgG2a及びIgG2b)のものであることができる。抗 β クロトー抗体は、作動性抗体又は拮抗性抗体であることができる。本明細書に提供されるのは、 β クロトーに対する作動性抗体であり、これには、FGF19様シグナル伝達及び/又はFGF21様シグナル伝達を誘導する抗体が含まれる。 β クロトーに対する好ましい作動性抗体は、例えば、FGFR1c、FGFR2c、FGFR3c、又はFGFR4cを含むFGF受容体に対するFGF19及び/又はFGF21の結合を競合しない。30

【0069】

「線維芽細胞成長因子」という用語は、ヒトFGFファミリーの22のメンバーを含む、成長因子のファミリーを指す。線維芽細胞成長因子のFGF19サブファミリーは、ヒトFGF21、FGF23、及びFGF19、並びにマウスFGF15からなる。FGFファミリーメンバーの作用は、各々チロシンキナーゼドメインを有する4つのメンバーであるFGFR1、FGFR2、FGFR3、及びFGFR4並びにFGFR1、FGFR2、及びFGFR3の各々の2つのスプライス変異体を含む、FGF受容体チロシンキナーゼ(FGFR)ファミリーの1以上のメンバーに対するそのヘパリン依存的結合の結果として生じるものである。FGFR1、FGFR2、及びFGFR3のエキソン3に生じるこれらのスプライス変異体は、「b」及び「c」変異体と表記される(例えば、FGFR1b、FGFR2b、FGFR3c(40)、FGFR1c、FGFR2c、及びFGFR3c、これらは、それぞれ、FGFR1(III)b、FGFR2(III)b、FGFR3(III)c、FGFR1(III)c、FGFR2(III)c、及びFGFR3(III)cとしても知られる)。例えば、FGF19は、脂肪細胞と肝細胞の両方を標的とし、かつこれら両方に対する作用を有する。組換えヒトFGF19(rhFGF19)で処置されたマウスは、高脂肪食を取っているにもかかわらず、代謝速度の増加、脂質酸化の増加、より低い呼吸商、及び体重減少を示す。さらに、そのようなマウスは、高脂肪食を取り、かつ食欲減退がないにもかかわらず、より低い血清レベルのレプチン、インスリン、コレステロール、及びトリグリセリド、並びに正常レベルの血液グルコースを示した。さらに、レプチンを欠如しているが、FGF19導入遺伝子を含む肥満マウスは、体重減少、コレステロール及びトリグリセリドの低下を示し、糖尿病を発症しなかった。さらに、レプチンを欠如している肥満の糖尿病マウスは、rhFGF19を注射50

したとき、その代謝的特徴の逆転を体重減少及び血液グルコースの低下という形で示した。例えば、FGF21は、主に、肝臓により発現され、FGF19の代謝作用と同様の代謝作用、例えば、脂肪組織に対するその作用を介した代謝の増加、体重減少、血液グルコースレベルの低下、並びに肥満及び糖尿病に対する抵抗性を有している。FGF21トランスジェニックマウスも食餌誘発性肥満に抵抗性であり、糖尿病齧歯類モデルでは、FGF21投与によって、血液グルコース及びトリグリセリドレベルが低下した。FGF19及びFGF21の代謝作用は、FGFR1c、FGFR2c、及びFGFR3c受容体を含む、それらの結合するFGF受容体を介して生じ、結合にβクロトーを必要とした。FGF19及びFGF21のFGFR1c及びFGFR2cに対する結合が顕著である。FGF19は、FGF21と異なる代謝作用を有することも示されており、これには、その肝臓特異的作用を介した肝臓による胆汁酸産生の調節、食後の胆汁酸産生に応答した胆汁酸産生の負の調節、及びFGF21については観察されない肝臓マイトジェン作用が含まれる。例えば、FGF19トランスジェニックマウスは、肝細胞の増殖及び異形成の増加が原因で肝腺癌を発症し、rhFGF19処置マウスは、肝細胞の肝細胞増殖を示す。FGF19のこれらのさらなる活性は、FGFR4へのその結合によって媒介されるように思われる。FGF19は、βクロトー依存的様式とβクロトー非依存的様式の両方でFGFR4に結合することができる。FGF21も、βクロトー依存的様式でFGFR4に結合することが示されているが、効率的なシグナル伝達は、これまでにFGF21のFGFR4に対する結合から観察されていない。

10

【0070】

本明細書に開示される結合タンパク質、例えば、抗βクロトー抗体は、本明細書に記載されるFGF19様シグナル伝達を誘導することができる。インビボにおいて、FGF19の成熟形態は、該分子の活性形態である。全長FGF19をコードする核酸配列が以下に提供されており；シグナル配列をコードするヌクレオチドに下線が引かれている。

20

【化19】

atgcggagcgggtgtgtggtggtccacgtatggatcctggccggcctctggctggccgtggc
cgggcgccccctcgcttctcggaacgcgggggccccacgtgcactacggctggggcgacccca
tcgcctgcggcacctgtacacctccggccccccacgggctctccagctgcttctgcgcac
cgtgccgacggcgctcgtggactgcgcgcggggccagagcgcgcacagtttgctggagatcaa
ggcagtcgctctgcggaccgtggccatcaagggcgctgcacagcgtgcggtacctctgcatgg
gcgcccagcggcaagatgcaggggctgcttcagtactcggaggaagactgtgctttcgaggag
gagatccgcccagatggctacaatgtgtaccgatccgagaagcacccgcctcccgggtctccct
gagcagtgccaaacagcggcagctgtacaagaacagaggctttcttccactctctcatttcc
tgcccatgctgcccattggtcccagaggagcctgaggacctcagggggccacttggaatctgac
atgttctcttcgccccctggagaccgacagcatggacctttgggcttgtcaccgggactgga
ggccgtgaggaggtcccagctttgagaagtaa

30

(配列番号 : 303)

40

【0071】

全長FGF19のアミノ酸配列が提供されており；シグナル配列を構成するアミノ酸に下線が引かれている：

【化 2 0】

mrsgcvvvhvhwilaglwlavagRPLAFSDAGPHVHYGWDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRI
 RADGVVDCARGQSAHSLLLEIKAVALLRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQLLQYSEEDCAFEE
 EIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESD
 MFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEEK

(配列番号 : 304)

【0 0 7 2】

10

本明細書に記載される結合タンパク質、例えば、抗 β クロトー抗体は、本明細書に記載されるFGF21様シグナル伝達を誘導することができる。インビボにおいて、FGF21の成熟形態は、該分子の活性形態である。全長FGF21をコードする核酸配列が提供されており；シグナル配列をコードするヌクレオチドに下線が引かれている：

【化 2 1】

atg gac tcg gac gag acc ggg ttc gag cac tca gga ctg tgg gtt
tct gtg ctg gct ggt ctt ctg ctg gga gcc tgc cag gca cac ccc
 atc cct gac tcc agt cct ctc ctg caa ttc ggg ggc caa gtc cgg
 cag cgg tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca gaa gcc cac
 ctg gag atc agg gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct gct gac cag
 agc ccc gaa agt ctc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga gtt
 att caa atc ttg gga gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg
 cca gat ggg gcc ctg tat gga tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc
 tgc agc ttc cgg gag ctg ctt ctt gag gac gga tac aat gtt tac
 cag tcc gaa gcc cac ggc ctc ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag
 tcc cca cac cgg gac cct gca ccc cga gga cca gct cgc ttc ctg
 cca cta cca ggc ctg ccc ccc gca ccc ccg gag cca ccc gga atc
 ctg gcc ccc cag ccc ccc gat gtg ggc tcc tcg gac cct ctg agc
 atg gtg gga cct tcc cag ggc cga agc ccc agc tac gct tcc tga

20

30

(配列番号 : 305)

【0 0 7 3】

全長FGF21のアミノ酸配列が以下に提供されており；シグナル配列を構成するアミノ酸に下線が引かれている：

40

【化 2 2】

m d s d e t g f e h s g l w v s v l a g l l l g a c q a H P I
 P D S S P L L Q F G G Q V R Q R Y L Y T D D A Q Q T E A H L E I
 R E D G T V G G A A D Q S P E S L L Q L K A L K P G V I Q I L
 G V K T S R F L C Q R P D G A L Y G S L H F D P E A C S F R E
 L L L E D G Y N V Y Q S E A H G L P L H L P G N K S P H R D P
 A P R G P A R F L P L P G L P P A P P E P P G I L A P Q P P D
 V G S S D P L S M V G P S Q G R S P S Y A S

10

(配列番号 : 306)

【 0 0 7 4】

同じく全長FGF21をコードする核酸配列が提供されており;シグナル配列をコードするヌクレオチドに下線が引かれている:

【化 2 3】

atggactcggacgagaccgggttcgagcactcaggactgtgggtttctgtgctggctggtcttctgctgggagcc
tgccaggcaCACCCCATCCCTGACTCCAGTCCCTCTCCTGCAATTCGGGGGCCAAGTCCGGCAGCGGTACCTCTAC
 ACAGATGATGCCCAGCAGACAGAAGCCCACCTGGAGATCAGGGAGGATGGGACGGTGGGGGGCGCTGCTGACCAG
 AGCCCCGAAAGTCTCTGTCAGCTGAAAGCCCTTGAAGCCGGGAGTTATTCAAATCTTGGGAGTCAAGACATCCAGG
 TTCCTGTGCCAGCGGCCAGATGGGGCCCTGTATGGATCGCTCCACTTTGACCCTGAGGCCTGCAGCTTCCGGGAG
 CTGCTTCTTGAGGACGGATACAATGTTTACCAGTCCGAAGCCCACGGCCTCCCGCTGCACCTGCCAGGGAACAAG
 TCCCCACACCGGGACCCTGCACCCCGAGGACCAGCTCGCTTCCTGCCACTACCAGGCCTGCCCCCGCACTCCCG
 GAGCCACCCGGAATCTTGCCCCCAGCCCCCGATGTGGGCTCCTCGGACCCTCTGAGCATGGTGGGACCTTCC
 CAGGGCCGAAGCCCCAGCTACGCTTCCTGA

20

(配列番号 : 428)

30

【 0 0 7 5】

同じく全長FGF21をコードするアミノ酸配列が提供されており;シグナル配列をコードするアミノ酸に下線が引かれている:

【化 2 4】

mdsdetgfehsglwvsvlaglllgacqaHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIR
 EDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVILGVKTSRFLCQRPDGLYGSLHFDPEA
 CSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPhRDPAPRGPARFLPLPGLPPALPE
 PPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS

40

(配列番号 : 429)

【 0 0 7 6】

本明細書に記載される結合タンパク質、例えば、抗βクロトー抗体は、単独で又はFGF受容体、例えば、FGFR1cと複合体を形成して、βクロトーに結合する。ヒトFGFR1c(GenBank受託番号NM 023110; FGFRα IIIcとも表記される)のコード核酸配列が以下に提供されている:

【化 2 5】

atgtggagctggaagtgcctcctcttctgggctgtgctggtcacagcc
acactctgcaccgctagggcggtccccgaccttgacctgaacaagcccag
ccctggggagcccctgtggaagtggagtccttcttggtccaccccgg
gacctgctgcagcttcgctgtcggctgcgggacgatgtgcagagcatc
aactggctgcgggacggggtgcagctggcggaagcaaccgcacccg
catcacaggggaggaggtggaggtgcaggactccgtgcccgcagact
ccggcctctatgcttgctgaaccagcagcccctcgggcagtgacacca
cctacttctccgtcaatgtttcagatgctctccccctcctcggaggatga
tgatgatgatgatgactcctcttcagaggagaaagaaacagataaca
ccaaaccaaaccgtatgcccgtagctccatattggacatcaccagaaa
agatggaaaagaaattgcatgcagtgccggctgccaagacagtgaag
ttcaaattgcccttccagtgggacaccaaaccacactgcgctgggtg
aaaaatggcaaagaattcaaacctgaccacagaattggaggctacaa
ggtcggttatgccacctggagcatcataatggactctgtggtgcctc
tgacaagggcaactacacctgcattgtggagaatgagtacggcagca
tcaaccacacataccagctggatgtcgtggagcgggtccccctcacggc
ccatcctgcaagcagggttgcccgcacaaaaacagtggccctgggt
agcaacgtggagttcatgtgtaagggtgtacagtgacccgcagccgcac
atccagtggctaaagcacatcgaggatgaatgggagcaagattggccc
agacaacctgccttatgtccagatcttgaagactgctggagttaatac
caccgacaaagagatggaggtgcttcacttaagaaatgtctcctttga
ggacgcaggggaggtatacgtgcttgccgggtaactctatcggactctc
ccatcactctgcatgggtgaccgttctggaagccctggaagagaggcc
ggcagtgatgacctcgcccctgtacctggagatcatcatctattgcac
aggggccttctcatctcctgcatgggtggggtcgggtcatcgtctacaa
gatgaagagtggtagcaagaagagtgacttccacagccagatggctg
tgcacaagctggccaagagcatccctctgcgcagacaggtaacagtg
tctgctgactccagtgcattccatgaactctgggggttcttctgggttcggc
catcacggctctcctccagtgggactcccatgctagcaggggtctctg
agtatgagcttcccgaagaccctcgctgggagctgcctcgggacagac
tggctcttaggcaaaccctgggagagggctgctttgggcaggtgggtg
tggcagaggctatcgggctggacaaggacaaaccacacgtgtgacc

10

20

30

40

aaagtggctgtgaagatggtgaagtcggacgcaacagagaaagactt
gtcagacctgatctcagaaatggagatgatgaagatgatcgggaagc
ataagaatatcatcaacctgctgggggcctgcacgcaggatggtcctt
tgtatgtcatcgtggagtatgcctccaagggcaacctgcgggagtacc
tgcaggcccgaggagggccccagggctggaatactgctacaaccccagc
cacaacccagaggagcagctctcctccaaggacctgggtgtcctgcgcc
taccaggtggccccagggcatggagtatctggcctccaagaagtgcata
caccgagacctggcagccaggaatgtcctggtgacagaggacaatgt
gatgaagatagcagactttggcctcgcacgggacattcaccacatcga
ctactataaaaagacaaccaacggccgactgcctgtgaagtggatgg
caccgcaggcattatttgaccggatctacaccaccagagtgatgtgt
ggctcttcgggggtgctcctgtgggagatcttcactctgggcggctcccc
ataccccgggtgtgcctgtggaggaacttttcaagctgctgaaggaggg
tcaccgcatggacaagcccagtaactgcaccaacgagctgtacatgat
gatgcgggactgctggcatgcagtgccctcacagagaccaccttcaa
gcagctggtggaagacctggaccgcatcgtggccttgacctccaacca
ggagtacctggacctgtccatgccctggaccagtactccccagctt
tcccgacacccggagctctacgtgctcctcaggggaggattccgtctt
ctctcatgagccgctgcccgaggagccctgcctgccccgacaccagc
ccagcttgccaatggcggactcaaacgccgctga.

10

20

(配列番号 : 307)

30

【 0 0 7 7 】

ヒトFGFR1c(GenBank受託番号NP_075598)(FGFR α IIICとも表記される)のアミノ酸配列が
以下に提供されている:

【化 2 6】

MWSWKCLLFWAVLVTATLCTARPSPTLPEQAQPWGAPVEVESFLVHPG
DLLQLRCRLRDDVQSINWLRDGVQLAESNRTRITGEEVEVQDSVPADSGL
YACVTSSPSGSDTTYFSVNVSDALPSEDDDDDDSSSEEKETDNTKPNR
MPVAPYWTSPEKMEKKLHAVPAAKTVKFKCPSSGTPNPTLRWLKNGKEF
KPDHRIGGYKVRYATWSIIMDSVVP SDKGNYTCIVENEYGSINHTYQLDV
VERSPHRPILQAGLPANKTVALGSNVEFMCKVYSDPQPHIQWLKHIEVNG
SKIGPDNL PYVQILKTAGVNTTDKEMEVLHLRNVSFEDAGEYTCLAGNSI
GLSHHSAWLTVLEALEERPAVMTSPLYLEIIIIYCTGAFLISCMVGSVIVY
KMKSGTKKSDFHSQMAVHKLAKSIPLRRQVTVSADSSASMNSGVLLVRPS
RLSSSGTPMLAGVSEYELPEDPRWELPRDRLVLGKPLGEGCFGQVVLAEA
IGLDKDKPNRVTKVAVKMLKSDATEKDLSDLISEMEMMKMIGKHKNIIIN
LLGACTQDGPLYVIVEYASKGNLREYLQARRPPGLEYCYNPSHNPEEQLS
SKDLVSCAYQVARGMEYLASKKCIHRDLAARNVLVTEDNVMKIADFG
ARDIHHIDYYKKTNGRLPVKWMPEALFDRIYTHQSDVWSFGVLLWEI
FTLGGSPYPGPVVEELFKLLKEGHRMDKPSNCTNELYMMMRDCWHAVP
SQRPTFKQLVEDLDRIVALTSNQEYLDLSMPLDQYSPSPDTRSSTCSSG
EDSVFSHEPLPEEPCLPRHPAQLANGGLKRR.

10

20

(配列番号 : 308)

【 0 0 7 8】

本明細書に記載される結合タンパク質、例えば、抗 β クロトー抗体は、FGF受容体、例えば、FGFR1cの細胞外部分と複合体を形成して、 β クロトーに結合することができる。FGFR1cの細胞外領域の一例は、以下である：

30

【化 2 7】

MWSWKCLLFWAVLVTATLCTARPSPTLPEQAQPWGAPVEVESFLVHPGDL
LQLRCRLRDDVQSINWLRDGVQLAESNRTRITGEEVEVQDSVPADSGLYA
CVTSSPSGSDTTYFSVNVSDALPSEDDDDDDSSSEEKETDNTKPNRMP
VAPYWTSPEKMEKKLHAVPAAKTVKFKCPSSGTPNPTLRWLKNGKEFKPD
HRIGGYKVRYATWSIIMDSVVP SDKGNYTCIVENEYGSINHTYQLDVVER
SPHRPILQAGLPANKTVALGSNVEFMCKVYSDPQPHIQWLKHIEVNGSKI
GPDNL PYVQILKTAGVNTTDKEMEVLHLRNVSFEDAGEYTCLAGNSIGLS
HHSWLTVLEALEERPAVMTSPLY. (配列番号 : 309)

40

【 0 0 7 9】

FGFR1c (α IIIc)の細胞外領域の一例は、以下である：

【化 2 8】

RPSPTLPEQAQPPWGAPVEVESFLVHPGDLQLRCRLRDDVQSINWLRDGVQLAESNRTRITGEEVEVQDSVPADS
GLYACVTSSPSGSDTTYFSVNVSDALPSSSEDDDDDDSSSEEKETDNTKPNRMPVAPYWTSPEKMEKKLHAVPAA
KTVKFKCPSSGTPNPTLRWLKNGKEFKPDHRIGGYKVRYATWSIIMDSVVPSPDKGNYTCIVENEYGSINHTYQLD
VVERSPHRPILQAGLPANKTVALGSNVEFMCKVYSDPQPHIQWLKHIEVNGSKIGPDNLPHYVQILKTAGVNTTDK
EMEVHLNRNVSFEDAGEYTCLAGNSIGLSHHSAWLTVLEALEERPAVMTSPLYE.

(配列番号 : 427)

【 0 0 8 0】

10

FGFR1c (β IIIc) の細胞外領域の一例は、以下である :

【化 2 9】

RPSPTLPEQDALPSSSEDDDDDDSSSEEKETDNTKPNPVAPYWTSPEKMEKKLHAVPAAKTV
KFKCPSSGTPNPTLRWLKNGKEFKPDHRIGGYKVRYATWSIIMDSVVPSPDKGNYTCIVENEY
GSINHTYQLDVVERSPHRPILQAGLPANKTVALGSNVEFMCKVYSDPQPHIQWLKHIEVNGS
KIGPDNLPHYVQILKTAGVNTTDKEMEVHLNRNVSFEDAGEYTCLAGNSIGLSHHSAWLTVLE
ALEERPAVMTSPLYE.

20

(配列番号 : 426)

【 0 0 8 1】

本明細書に記載されるように、FGFR1cタンパク質には断片も含まれ得る。本明細書で使
用されるように、これらの用語は、 β クロトー及びFGF21と会合したときに、FGF21様シグ
ナル伝達活性を誘導する受容体、特に、及び別途指定されない限り、ヒト受容体を意味す
るように互換的に使用される。

【 0 0 8 2】

FGFR1cという用語は、FGFR1cアミノ酸配列の翻訳後修飾、例えば、考えられるN結合型
グリコシル化部位も含む。したがって、抗原結合タンパク質は、これらの位置のうちの1
つもしくは複数でグリコシル化されたタンパク質に結合することができるか、又は該タン
パク質から生成されることができる。

30

【 0 0 8 3】

本明細書に記載される結合タンパク質、例えば、抗 β クロトー抗体は、単独で又はFGF
受容体、例えば、FGFR2cと複合体を形成して、 β クロトーに結合する。ヒトFGFR2cのコー
ド核酸配列が以下に提供されている :

【化 3 0】

atgggtcagctggggctggtttcatctgcctggctggtggtcaccatggcaaccttgtccctggc
ccggccctccttcagtttagttgaggataccacattagagccagaagagccaccaaccaaat
accaaattctctcaaccagaagtgtacgtggctgcgccaggggagtcgctagaggtgcgctgc
ctggtgaaagatgccgccgtgatcagttggactaaggatgggggtgcacttggggcccaaca
taggacagtgtttattggggagtacttgcagataaagggcgccacgcctagagactccggcc
tctatgcttgtactgccagtaggactgtagacagtgaaacttggtaacttcatggtgaatgtc
acagatgccatctcatccggagatgatgaggatgacaccgatggtgcggaagattttgtcag
tgagaacagtaacaacaagagagcaccatactggaccaacacagaaaagatggaaaagcggc
tccatgctgtgcctgcggccaacactgtcaagtttcgctgccagccggggggaacccaatg
ccaaccatgcggtggctgaaaaacgggaaggagtttaagcaggagcatcgcattggaggcta
caaggtaacgaaaccagcactggagcctcattatggaaagtgtggtcccatctgacaaggga
attatacctgtgtagtggagaatgaatacgggtccatcaatcacacgtaccacctggatgtt
gtggagcgatcgctcaccggcccatcctccaagccggactgccggcaaatgcctccacagt
ggtcggaggagacgtagagtttgtctgcaaggtttacagtgatgccagccccacatccagt
ggatcaagcacgtggaaaagaacggcagtaaatacgggcccgcacgggctgcctacctcaag
gttctcaaggccgccggtgttaacaccacggacaaagagattgaggttctctatatattcgga
tgtaacttttgaggacgctggggaatatacgtgcttggcgggtaattctattgggatatcct
ttcactctgcatggttgacagttctgccagcgcctggaagagaaaaggagattacagcttcc
ccagactacctggagatagccatttactgcataggggtcttcttaatcgctgtatggtggt

10

20

aacagtcattcctgtgccgaatgaagaacacgaccaagaagccagacttcagcagccagccgg
ctgtgcacaagctgaccaaacgtatccccctgcgagacaggtaacagtttcggctgagtcc
agctcctccatgaactccaacacccccgctggtgaggataacaacacgcctctcttcaacggc
agacaccccccatgctggcaggggtctccgagtatgaacttcagaggacccaaaatgggagt
ttccaagagataagctgacactgggcaagccccctgggagaagggttgctttgggcaagtggtc
atggcggaagcagtgagggaattgacaaagacaagcccaaggaggcggtcacctggccgtgaa
gatgttgaaagatgatgccacagagaaagacctttctgatctggtgtcagagatggagatga
tgaagatgattgggaaacacaagaatatcataaatcttcttgagcctgcacacaggatggg
cctctctatgtcatagttgagtatgcctctaaaggcaacctccgagaataacctccgagccccg
gagggcaccggtgatggagtactcctatgacattaacctgttcttgaggagcagatgacct
tcaaggacttggtgtcatgcacctaccagctggccagaggcatggagtacttggcttcccaa
aaatgtattcatcgagatttagcagccagaaatgttttggtaacagaaaacaatgtgatgaa
aatagcagactttggactcgccagagatatcaacaatatagactattacaaaaagaccacca
atgggcggtctccagtcgaagtggatggctccagaagccctgtttgatagagtatacactcat
cagagtgatgtctggtccttcgggggtgttaatgtgggagatcttcactttaggggggtcgcc
ctaccagggattcccgtggagggaactttttaagctgctgaaggaaggacacagaatggata
agccagccaactgcaccaacgaactgtacatgatgatgagggactgttggcatgcagtgccc
tcccagagaccaacggttcaagcagttggtagaagacttggatcgaattctcactctcacaac
caatgaggaataacttggacctcagccaacctctcgaacagtattcacctagttaccctgaca
caagaagttcttgttcttcaggagatgattctgttttttctccagaccccatgccttacgaa
ccatgccttcctcagtatccacacataaacggcagtggttaaaacatga

10

20

30

(配列番号 : 310)

【 0 0 8 4 】

ヒトFGFR2cのアミノ酸配列が以下に提供されており;シグナル配列を構成するアミノ酸に下線が引かれている:

【化 3 1】

mvswgrfliclvvvtmatlslaRPSFSLVEDTTLEPEEPPTKYQISQPEVYVAAPGESLEVRC
LLKDAAVISWTKDGVHLGPNNRTVLIGEYLQIKGATPRDSGLYACTASRTVDSETWYFMVNV
TDAISSGDDEDDTDGAEDFVSENSNNKRAPYWTNTEKMEKRLHAVPAANTVKFRCPAGGNPM
PTMRWLKNGKEFKQEHRIGGYKVRNQHWSLIMESVVP SDKGNYTCVVENEYGSINHTYHLDV
VERSPHRPILQAGLPANASTVVGGDVEFVCKVYSDAQPHIQWIKHVEKNGSKYGPDGLPYLK
VLKAAGVNTTDKEIEVLYIRNVTFEDAGEYTCLAGNSIGISFHSAWLTVLPAPGREKEITAS
PDYLEIAIYCIGVFLIACMVVTVILCRMKNNTKKPDFSSQPAVHKLTKRIPLRRQVTVSAES
SSSMNSNTPLVRITTRLSSSTADTPMLAGVSEYELPEDPKWEFPRDKLTLGKPLGEGCFGQVV
MAEAVGIDKDKPKEAVTVAVKMLKDDATEKDLSDLVSEMEMMKMIGKHKNIINLLGACTQDG
PLYVIVEYASKGNLREYLRRARRPPGMEYSYDINRVPEEQMTFKDLVSCTYQLARGMEYLASQ
KCIHRDLAARNVLVTENNVMMKIADFGLARDINNIDYYKKTNGRLPVKWMapeALFDRVYTH
QSDVWSFGVLMWEIFTLGGSPYPGIPVEELFKLLKEGHRMDKPANCTNELYMMMRDCWHAVP
SQRPTFKQLVEDLDRILTTLTNEEYLDLSQPLEQYSPSYPDTRSSCSSGDDSVFSPDPMPYE
PCLPQYPHINGSVKT

10

20

(配列番号 : 311)

【 0 0 8 5】

本明細書に記載される結合タンパク質、例えば、抗βクロトー抗体は、単独で又はFGF受容体、例えば、FGFR3cと複合体を形成して、βクロトーに結合する。ヒトFGFR3c(GenBank受託番号NP_000133)のコード核酸配列が以下に提供されている：

【化 3 2】

atggggcgccccctgcctgcgccctcgcgctctgcgtggccgtggccatcgtggccggcgccctc
ctcggagtccttggggacggagcagcgctcgtggggcgagcggcagaagtcccggggcccag
agccccggccagcaggagcagttggtcttcggcagcggggatgctgtggagctgagctgtccc
ccgccccgggggtggtcccatggggcccaactgtctgggtcaaggatggcacagggtggtgcc
ctcggagcgtgtcctggtggggccccagcggctgcaggtgctgaatgcctcccacgaggact
ccggggcctacagctgccggcagcggctcacgcagcgcgtactgtgccacttcagtgtgcgg
gtgacagacgctccatcctcgggagatgacgaagacggggaggacgaggctgaggacacagg
tgtggacacagggggcccccttactggacacggccccgagcggatggacaagaagctgctggccg
tgccggccgcgaacacccgtccgcttcgctgccagccgctggcaacccccactccctccatc
tcctggctgaagaacggcagggagttccgcgggcgagcaccgcattggaggcatcaagctgcg
gcatcagcagtgaggcctggtcatggaaagcgtggtgccctcggaccgcggcaactacacct
gcgtcgtggagaacaagtttggcagcatccggcagacgtacacgctggacgtgctggagcgc
tccccgcaccggccccatcctgcaggcggggctgccggccaaccagacggcggtgctgggcag
cgacgtggagttccactgcaagggtgtacagtgcgcacagccccacatccagtggctcaagc
acgtggaggtgaatggcagcaagggtggggccccggacggcacaccctacgttacctgtctcaag
acggcgggcgctaaccaccaccgacaaggagctagagggttctctccttgccacaacgtcacctt
tgaggacgcgggggagtacacctgcctggcggggaattctattgggtttttctcatcactctg
cgtggctggtggtgctgccagccgaggaggagctggtggaggctgacgaggcgggcagtggtg
tatgcaggcatcctcagctacgggggtgggcttcttcctgttcacatcctggtggtggcggtgtg
gacgtcttgccgcctgcgcagcccccccaagaaaggcctgggctccccaccgtgcacaaga
tctcccgttcccgtcaagcgacaggtgtccctggagtccaacgcgtccatgagctccaac
acaccactggtgcgcacgcgaaggctgtcctcaggggagggccccacgctggccaatgtctc
cgagctcgagctgcctgccgacccccaaatgggagctgtctcggggcccggtgaccctgggca

10

20

30

agcccccttggggaggggctgcttcggccaggtgggtcatggcggaggccatcggcattgacaag
gaccggggccgccaagcctgtcacccgtagccgtgaagatgctgaaagacgatgccactgacaa
ggacctgtcggacctgggtgtctgagatggagatgatgaagatgatcgggaaacacaaaaaca
tcatcaacctgctgggcgcctgcacgcagggcgggccccctgtacgtgctgggtggagtacgcg
gccaaagggtaacctgcgggagtttctgcggggcgcgggcccccgggcctggactactcctt
cgacacctgcaagccgccccgaggagcagctcaccttcaaggacctgggtgtcctgtgcctacc
aggtggccccggggcatggagtacttggcctcccagaagtgcattccacagggacctggctgcc
cgcaatgtgctgggtgaccgaggacaacgtgatgaagatcgcagacttcgggctggccccggga
cgtgcacaacctcgactactacaagaagacaaccaacggccggctgcccgtgaagtggatgg
cgctgaggccttggtttgaccgagtctacactcaccagagtgcgtctggtcctttggggtc
ctgctctgggagatcttcacgctggggggctccccgtaccccgcatccctgtggaggagct
cttcaagctgctgaaggagggccaccgcatggacaagcccgccaactgcacacacgacctgt
acatgatcatgcgggagtgctggcatgccgcgcctcccagaggcccaccttcaagcagctg
gtggaggacctggacctgtccttaccgtgacgtccaccgacgagtacctggacctgtcggc
gccttttcgagcagtactccccgggtggccaggacacccccagctccagctcctcaggggacg
actccgtgtttgcccacgacctgctgcccccgggccccaccagcagtgggggctcgcggacg
tga

10

20

(配列番号 : 312)

【 0 0 8 6 】

ヒトFGFR3cのアミノ酸配列が以下に提供されており;シグナル配列を構成するアミノ酸に下線が引かれている:

30

【化 3 3】

mgapacalalcvavaivagassESLGTEQRVVGRAAEVPGPEPGQQEQLVFGSGDAVELSCP
PPGGGPMGPTVWVKDGTGLVPSEVLVGPQRLQVLNASHEDSGAYSCRQRLTQRVLCHFSVR
VTDAPSSGDDDEGEDEAEDTGVDTGAPYWTRPERMDKKLLAVPAANTVRFRCPAAGNPTPSI
SWLKNGREFRGEHRIGGIKLRHQQWSLVMESVVPSPDRGNITCVVENKFGSIRQTYTLDVLER
SPHRPILQAGLPANQTAVLGSDVEFHCKVYSDAQPHIQWLKHVEVNGSKVGPDPGTPYVTVLK
TAGANTTDKELEVLSLHNVTFEDAGEYTCLAGNSIGFSHHSAWLVVLPAAEEELVEADEAGSV
YAGILSYGVGFFLFILVVAAVTLCRLRSPPKKGLGSPTVHKISRFPKQVSLESNASMSSN
TPLVRIARLSSGEGPTLANVSELELPADPKWELSRARLTGKPLGEGCFGQVMAEAIGIDK
DRAAKPVTVAVKMLKDDATDKDLSDLVSEMEMMKMIGKHKNIINLLGACTQGGPLYVLVEYA
AKGNLREFLRARRPPGLDYSFDTCKPPEEQLTFKDLVSCAYQVARGMEYLASQKCIHRDLAA
RNVLVTEDNVMKIADFGLARDVHNLDYYKKTNGRLPVKWMAPEALFDRVYTHQSDVWSFGV
LLWEIFTLGGSPYPGIPVEELFKLLKEGHRMDKPANCTHDLYMIMRECWHAAAPSQRPTFKQL
VEDLDRVLTVTSTDEYLDLSAPFEQYSPGGQDTPSSSSSGDDSVFAHDLLPPAPPSSGGSRT

10

20

(配列番号 : 313)

【 0 0 8 7 】

本明細書に記載される結合タンパク質、例えば、抗βクロトー抗体は、単独で又はFGF受容体、例えば、FGFR4と複合体を形成して、βクロトーに結合する。ヒトFGFR4のコード核酸配列が以下に提供されている：

【化 3 4】

atgcggctgctgctggccctgttgggggtcctgctgagtgctgctgggcctccagtcttgct
cctggaggcctctgaggaagtggagcttgagccctgcctggctcccagcctggagcagcaag
agcaggagctgacagtagcccttgggcagcctgtgctgtgctgtgggcgggctgagcgt
ggtggccactggtacaaggaggggcagtcgctggcacctgctggccgtgtacgggggctggag
gggcccctagagattgccagcttccctacctgaggatgctggccgctacctctgcctggcac
gaggctccatgatcgtcctgcagaatctcaccttgattacaggtgactccttgacctccagc
aacgatgatgaggaccccaagtcccatagggacccctcgaataggcacagttacccccagca
agcacccctactggacacacccccagcgcattggagaagaaactgcatgcagtacctgcgggga
acaccgtcaagttccgctgtccagctgcaggcaacccccacgcccaccatccgctggcttaag
gatggacaggcctttcatggggagaaccgcattggaggcattcggctgcgccatcagcactg
gagtctcgtgatggagagcgtggtgcccctcgaccgcggcacatacacctgcctggtagaga
acgctgtgggcagcatccgctataactacctgctagatgtgctggagcgggtccccgcaccgg
cccatcctgcaggccgggctcccggccaacaccacagccgtggtgggcagcgcagctggagct
gctgtgcaaggtgtacagcgatgccagccccacatccagtggctgaagcacatcgtcatca
acggcagcagcttcggagccgacggtttcccctatgtgcaagtcctaaagactgcagacatc
aatagctcagagggtggaggctcctgtacctgcggaacgtgtcagccgaggacgcaggcgagta
cacctgcctcgcaggcaattccatcggcctctcctaccagtcctgcctggctcacggtgctgc
cagaggaggacccccacatggaccgcagcagcgcggccaggccaggtatacggacatcatcctg
tacgcgtcgggctccctggccttggctgtgctcctgctgctggccgggctgtatcgagggca
ggcgtccacggccggcaccgcccgcccgccgcccactgtgcagaagctctcccgttccctc
tggcccgacagttctccctggagtcaggctcttccggcaagtcaagctcatccctggtacga
ggcgtgcgtctctcctccagcggccccgccttgctcgccggcctcgtgagctctagatctacc
tctcgaccactatgggagttcccccgggacaggctggtgcttgggaagcccctaggcgagg
gctgctttggccaggtagtacgtgcagaggcctttggcatggaccctgcccggcctgaccaa
gccagcactgtggccgtcaagatgctcaaagacaacgcctctgacaaggacctggccgacct
ggtctcggagatggagggtgatgaagctgatcgcccgacacaagaacatcatcaacctgcttg
gtgtctgcaccaggaagggcccctgtacgtgatcgtggagtgcccgccaagggaaacctg
cgggagttcctgcggggcccggcgccccccaggccccgacctcagccccgacggtcctcggag

10

20

30

40

cagtgaggggcccgtctccttcccagtcctgggtctcctgcgcctaccaggtggccccgaggca
tgcagtatctggagtcccgggaagtgtatccaccgggacctgggtgccccgcaatgtgctgggtg
actgaggacaatgtgatgaagattgctgacttttgggctggccccgcgcgctccaccacattga
ctactataagaaaaccagcaacggccgcctgcctgtgaagtggatggcgccccgaggccttgt
ttgaccgggtgtacacacaccagagtgcgtgtgggtcttttgggatecctgctatgggagatc
ttcaccctcgggggctccccgtatcctggcatcccgggtggaggagctgttctcgctgctgcg
ggagggacatcggatggaccgacccccacactgccccccagagctgtacgggctgatgcgtg
agtgctggcacgcagcgcacctcccagaggcctaccttcaagcagctgggtggaggcgctggac
aaggctcctgctggccgtctctgaggagtacctcgacctccgcctgaccttcggaccctattc
cccctctgggtggggacgccagcagcacctgctcctccagcgattctgtcttcagccacgacc
ccctgccattgggatccagctccttccccttcggggtctgggggtgcagacatga

10

(配列番号 : 314)

【 0 0 8 8 】

ヒトFGFR4(GenBank受託番号NP.002002.3)のアミノ酸配列が以下に提供されており;シグナル配列を構成するアミノ酸に下線が引かれている:

20

【 化 3 5 】

mrlllallgvllsvpgppvlsLEASEEVELEPCLAPSLEQQEQELTVALGQPVRLCCGRAER
GGHWYKEGSRLAPAGRVGRWRGRLEIASFLPEDAGRYLCLARGSMIVLQNLTLITGDSLTS
NDDDEPKSHRDPSNRHSYPQQAPYWTHPQRMKKLHAVPAGNTVKFRCPAAGNPTPTIRWLK
DGQAFHGENRIGGIRLRHQHWSLVMESVVPSPDRGTYTCLVENAVGSIRYNYLLDVLERSPHR
PILQAGLPANTTAVVGSDVELLCKVYSDAQPHIQWLKHIVINGSSFGADGFPYVQVLKTADI
NSSEVEVLRLNVSAEDAGEYTCLAGNSIGLSYQSAWLTVLPEEDPTWTAAPEARYTDIIL
YASGSLALAVLLLLAGLYRGQALHGRHPRPPATVQKLSRFPLARQFSLESGSSGKSSSSLVR
GVRLSSSGPALLAGLVSLDLPLDPLWEFPRDRLVLGKPLGEGCFGQVVRAEAFGMDPARPDQ
ASTVAVKMLKDNASDKDLADLVSEMEVMKLIGRHKNIINLLGVCTQEGPLYVIVECAAKGNL
REFLRARRPPGPDLSPDGPRSSEGPLSFVPLVSCAYQVARGMQYLESRKCIHRDLAARNVLV
TEDNVMKIADFGVLARGVHHIDYYKKTSGNRLPVKWMPEALFDRVYTHQSDVWSFGILLWEI
FTLGGSPYPGIPVEELFSLREGHRMDRPPHCPPELYGLMRECWAAPSQRPTFKQLVEALD
KVLLAVSEEYLDLRLTFGPYSPSGGDASSTCSSSDSVFSDPLPLGSSSFPGSGVQT

30

40

(配列番号 : 315)

【 0 0 8 9 】

「抗原」は、抗体が選択的に結合することができる所定の抗原である。標的抗原は、ポリペプチド、炭水化物、核酸、脂質、ハプテン、又は他の天然もしくは合成の化合物であってもよい。好ましくは、標的抗原はポリペプチドである。

【 0 0 9 0 】

「抗原結合断片」、「抗原結合ドメイン」、「抗原結合領域」という用語及び類似の用語は、抗原と相互作用し、かつ該抗原に対するその特異性及び親和性を結合物質に対して

50

付与するアミノ酸残基を含む抗体の部分(例えば、相補性決定領域(CDR))を指す。

【0091】

「結合する(binds)」又は「結合する(binding)」という用語は、例えば、複合体を形成することを含む、分子間の相互作用を指す。相互作用は、例えば、水素結合、イオン結合、疎水性相互作用、及び/又はファンデルワールス相互作用を含む、非共有結合的相互作用であることができる。複合体は、共有結合的又は非共有結合的な結合、相互作用、又は力によって結び付けられた2以上の分子の結合を含むこともできる。抗体上の単一の抗原結合部位と標的分子、例えば、 β クロトーの単一のエピトープの間の全体的な非共有結合的相互作用の強度が、そのエピトープに対する抗体又は機能性断片の親和性である。一価抗原に対する抗体の会合(k_1)と解離(k_{-1})の比(k_1/k_{-1})が、親和性の尺度である会合定数 K である。10 K の値は、抗体と抗原の複合体の違いによって異なり、 k_1 と k_{-1} の両方に依存する。本明細書に提供される抗体の会合定数 K は、本明細書に提供される任意の方法又は当業者に周知の任意の他の方法を用いて決定することができる。1つの結合部位での親和性が、抗体と抗原の間の相互作用の真の強度を常に反映するとは限らない。複数の反復する抗原性決定基を含有する複合抗原、例えば、多価 β クロトーが、複数の結合部位を含有する抗体と接するとき、1つの部位での抗体と抗原との相互作用は、第2の部位での反応の可能性を増加させることになる。多価抗体と抗原の間のそのような複数の相互作用の強度は、結合力と呼ばれる。抗体の結合力は、その個々の結合部位の親和性よりも優れたその結合能の尺度であることができる。例えば、高い結合力は、5量体IgM抗体で時に見られる低い親和性を相殺することができ、この5量体IgM抗体は、IgGよりも低い親和性を有すること20 があるが、その多価状態(multivalence)によって生じるIgMの高い結合力のために、IgMが効果的に抗原に結合することができる。

【0092】

「 β クロトーに特異的に結合する抗体」、「 β クロトーエピトープに特異的に結合する抗体」という用語及び類似の用語も本明細書で互換的に使用され、 β クロトーポリペプチド、例えば、 β クロトー抗原、又は断片、又はエピトープ(例えば、ヒト β クロトー、例えば、ヒト β クロトーポリペプチド、抗原、又はエピトープ)に特異的に結合する抗体を指す。 β クロトー(例えば、ヒト β クロトー)に特異的に結合する抗体は、 β クロトーの細胞外ドメイン又は該細胞外ドメインに由来するペプチドに結合することができる。 β クロトー抗原(例えば、ヒト β クロトー)に特異的に結合する抗体は、関連抗原(例えば、カニクイザル β クロトー)と交差反応することができる。ある実施態様において、 β クロトー抗原に特異的に結合する抗体は、他の抗原と交差反応しない。 β クロトー抗原に特異的に結合する抗体は、例えば、免疫アッセイ、Biacore、又は当業者に公知の他の技法によって同定することができる。抗体は、それが、放射免疫アッセイ(RIA)及び酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)などの実験技法を用いて決定したとき、任意の交差反応性抗原に対するよりも高い親和性で β クロトー抗原に結合する場合、 β クロトー抗原に特異的に結合する。通常、特異的又は選択性反応は、バックグラウンドシグナル又はノイズの少なくとも2倍であり、バックグラウンドの10倍を上回る場合もある。例えば、抗体特異性に関する考察については、Paul編(1989)、基礎免疫学(Fundamental Immunology)、第2版、Raven Press, New Yorkの332~336ページを参照されたい。対象となる抗原(例えば、標的抗原、例えば、 β クロトー)に「結合する」抗体は、該抗体が、抗原を発現する細胞又は組織を標的とする際に治療剤として有用であり、かつ他のタンパク質と顕著には交差反応しないような十分な親和性で抗原に結合する抗体である。そのような実施態様において、「非標的」タンパク質に対する抗体の結合の程度は、例えば、蛍光活性化細胞選別(FACS)解析又は放射免疫沈降(RIA)によって決定したとき、その特定の標的タンパク質に対する抗体の結合の約10%未満である。標的分子に対する抗体の結合に関して、「特異的結合」又は特定のポリペプチドもしくは特定のポリペプチド標的上のエピトープ「に特異的に結合する」又は特定のポリペプチドもしくは特定のポリペプチド標的上のエピトープ「に特異的」であるという用語は、非特異的相互作用と測定可能な程度に異なる結合を意味する。特異的結合は、例えば、対照分子の結合と比較した分子の結合を決定することによって測定す40 50

ることができ、この対照分子は、通常、結合活性を有しない類似構造の分子である。例えば、特異的結合は、標的と類似している対照分子、例えば、過剰の非標識標的との競合によって決定することができる。この例では、標識された標的のプロープに対する結合が過剰の未標識標的によって競合的に阻害される場合、特異的結合が示される。本明細書で使用される「特異的結合」又は特定のポリペプチドもしくは特定のポリペプチド標的上のエピトープ「に特異的に結合する」又は特定のポリペプチドもしくは特定のポリペプチド標的上のエピトープ「に特異的」であるという用語は、分子が、標的に対する、例えば、少なくとも約 10^{-4} M、或いは少なくとも約 10^{-5} M、或いは少なくとも約 10^{-6} M、或いは少なくとも約 10^{-7} M、或いは少なくとも約 10^{-8} M、或いは少なくとも約 10^{-9} M、或いは少なくとも約 10^{-10} M、或いは少なくとも約 10^{-11} M、或いは少なくとも約 10^{-12} M、又はそれを上回るKdを有することにより示されることができる。一実施態様において、「特異的結合」という用語は、分子が、任意の他のポリペプチド又はポリペプチドエピトープに実質的に結合することなく、特定のポリペプチド又は特定のポリペプチド上のエピトープに結合する結合を指す。ある実施態様において、 β クロトーに結合する抗体は、10nM、5nM、4nM、3nM、2nM、1nM、0.9nM、0.8nM、0.7nM、0.6nM、0.5nM、0.4nM、0.3nM、0.2nM、又は0.1nM以下の解離定数(Kd)を有する。 K_D が低ければ低いほど、抗 β クロトー抗体の親和性は高い。ある実施態様において、抗 β クロトー抗体は、異なる種由来の β クロトー間で(例えば、ヒト β クロトーとカニクイザル β クロトーの間で)保存されている β クロトーのエピトープに結合する。

【0093】

「競合する」という用語は、標的上の同じエピトープ又は結合部位をめぐる競合する抗 β クロトー抗体(例えば、(i) β クロトー;又は(ii) β クロトー並びにFGFR1c、FGFR2c、FGFR3c、及びFGFR4のうちの1つを含む複合体に結合する作動性抗体及び結合タンパク質)との関連において使用されるとき、検討されているその抗体(又は結合断片)が、共通の抗原(例えば、 β クロトー又はその断片)に対する参照分子(例えば、参照リガンド又は参照抗原結合タンパク質、例えば、参照抗体)の特異的結合を妨害又は阻害するアッセイによって決定される競合を意味する。数多くの種類の競合結合アッセイを用いて、試験抗体が β クロトー(例えば、ヒト β クロトー)に対する結合を参照抗体と競合するかどうかを決定することができる。利用し得るアッセイの例としては、固相直接又は間接放射免疫アッセイ(RIA)、固相直接又は間接酵素免疫アッセイ(EIA)、サンドイッチ競合アッセイ(例えば、Stahliらの文献(1983) *Methods in Enzymology* 9:242-253を参照されたい);固相直接ビオチン-アビジンEIA(例えば、Kirklandらの文献(1986) *J. Immunol.* 137:3614-3619)、固相直接標識アッセイ、固相直接標識サンドイッチアッセイ(例えば、Harlow及びLaneの文献(1988)、抗体:実験マニュアル(*Antibodies, A Laboratory Manual*), Cold Spring Harbor Pressを参照されたい); 1-125標識を用いる固相直接標識RIA(例えば、Morelらの文献(1988) *Molec. Immunol.* 25:7-15を参照されたい);固相直接ビオチン-アビジンEIA(例えば、Cheungらの文献(1990) *Virology* 176:546-552を参照されたい);及び直接標識RIA(Moldenhauerらの文献(1990) *Scand. J. Immunol.* 32:77-82)が挙げられる。通常、そのようなアッセイは、未標識の試験抗原結合タンパク質(例えば、試験抗 β クロトー抗体)又は標識された参照抗原結合タンパク質(例えば、参照抗 β クロトー抗体)のいずれかを担持する固体表面又はセルに結合した精製抗原(例えば、 β クロトー、例えば、ヒト β クロトー)の使用を伴う。競合的阻害は、試験抗原結合タンパク質の存在下で該固体表面又はセルに結合した標識の量を決定することにより測定することができる。通常、試験抗原結合タンパク質は過剰に存在する。競合アッセイによって同定される抗体(競合抗体)には、参照抗体と同じエピトープに結合する抗体及び/又は参照によって結合されるエピトープに抗体の立体障害が生じるほど十分近接した隣接エピトープに結合する抗体が含まれる。競合的結合を決定する方法に関するさらなる詳細が本明細書に記載されている。通常、競合抗体タンパク質が過剰に存在するとき、それは、共通の抗原に対する参照抗体の特異的結合を、少なくとも23%、例えば、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、又は75%]]阻害する。場合により、結合は、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、もしくは97%、98%、

99%、又はそれより大きく阻害される。

【0094】

「抗βクロトー抗体」又は「βクロトーに結合する抗体」という用語は、抗体が、βクロトーを標的とする際に診断剤及び/又は治療剤として有用であるような十分な親和性でβクロトーに結合することができる抗体を含む。好ましくは、関連のない非βクロトータンパク質に対する抗βクロトー抗体の結合の程度は、例えば、蛍光活性化細胞選別(FACS)解析又は免疫アッセイ、例えば、放射免疫アッセイ(RIA)によって測定したとき、βクロトーに対する抗体の結合の約10%未満である。βクロトー「に特異的に結合する」又はβクロトー「に特異的」である抗体は、上に例示されている。ある実施態様において、本明細書に記載される、βクロトーに結合する抗体は、10nM、9nM、8nM、7nM、6nM、5nM、4nM、0.9nM、0.8nM、0.7nM、0.6nM、0.5nM、0.4nM、0.3nM、0.2nM、もしくは0.1nM以下、及び/又は0.1nM以上の解離定数(Kd)を有する。ある実施態様において、抗βクロトー抗体は、異なる種由来のβクロトー間で(例えば、ヒトβクロトーとカニクイザルβクロトーの間で)保存されているβクロトーのエピトープに結合する。

【0095】

「単離された」抗体は、細胞物質又は細胞もしくは組織源由来の他の夾雑タンパク質及び/又は抗体が由来する他の夾雑成分を実質的に含まないか、或いは化学合成される場合、化学前駆物質又は他の化学物質を実質的に含まない。「細胞物質を実質的に含まない」という言葉は、抗体が、それが単離されるか又は組換えにより産生される細胞の細胞成分から分離されている抗体の調製物を含む。したがって、細胞物質を実質的に含まない抗体には、(乾燥重量で)約30%、25%、20%、15%、10%、5%、又は1%未満の異種タンパク質(「夾雑タンパク質」とも呼ばれる)を有する抗体の調製物が含まれる。ある実施態様において、抗体が組換えにより産生される場合、それは、培養培地を実質的に含まず、例えば、培養培地は、タンパク質調製物の容量の約20%、15%、10%、5%、又は1%未満に相当する。ある実施態様において、抗体が化学合成によって産生される場合、それは、化学前駆物質又は他の化学物質を実質的に含まず、例えば、それは、タンパク質の合成に関与する化学前駆物質又は他の化学物質から分離されている。したがって、そのような抗体の調製物は、(乾燥重量で)約30%、25%、20%、15%、10%、5%、又は1%未満の化学前駆物質又は対象となる抗体以外の化合物を有する。夾雑成分としては、限定されないが、抗体の治療的使用を妨害する物質を挙げることができ、また、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質性又は非タンパク質性溶質を挙げることができる。ある実施態様において、抗体は、(1)Lowry法(Lowryらの文献、J. Bio. Chem. 193: 265-275, 1951)によって決定したとき、抗体の95重量%超、例えば、96重量%、97重量%、98重量%、もしくは99重量%まで、(2)スピニングカップシーケネーターの使用によって、N末端もしくは内部アミノ酸配列の少なくとも15残基を得るのに十分な程度まで、又は(3)クマシーブルー染色もしくは好ましくは銀染色を用いた還元もしくは非還元条件下でのSDS-PAGEによって均一になるまで精製される。抗体の天然環境の少なくとも1つの成分が存在しないため、単離された抗体には、組換え細胞内のインサイチュの抗体が含まれる。しかしながら、通常、単離された抗体は、少なくとも1つの精製工程によって調製される。具体的な実施態様において、本明細書に提供される抗体は、単離されている。

【0096】

4鎖抗体ユニットは、2つの同一の軽(L)鎖と2つの同一の重(H)鎖から構成されたヘテロ4量体糖タンパク質である。IgGの場合、4鎖ユニットは、通常、約150,000ダルトンである。各々のL鎖は、1つの共有結合的ジスルフィド結合によってH鎖に結合しているが、2つのH鎖は、H鎖アイソタイプに応じた1以上のジスルフィド結合によって互いに結合している。各々のH鎖及びL鎖は、規則的な間隔の鎖内ジスルフィド架橋も有する。各々のH鎖は、N末端に可変ドメイン(VH)を有し、次いで、α及びγ鎖の各々については3つの定常ドメイン(CH)、μ及びεアイソタイプについては4つのCHドメインを有する。各々のL鎖は、N末端に可変ドメイン(VL)を有し、次いで、そのもう一方の末端に定常ドメイン(CL)を有する。VLはVHと整列し、CLは、重鎖の第1の定常ドメイン(CH1)と整列する。特定のアミノ酸残

基が、軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインの接触面を形成すると考えられている。VHとVLが対形成して一体化すると、単一の抗原結合部位が形成される。異なるクラスの抗体の構造及び性質については、例えば、基礎及び臨床免疫学(Basic and Clinical Immunology)、第8版、Daniel P. Stites、Abba I. Terr、及びTristram G. Parslow(編)、Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994の71ページ及び第6章を参照されたい。

【0097】

「可変領域」又は「可変ドメイン」という用語は、通常、軽鎖又は重鎖のアミノ末端に位置し、重鎖では約120～130アミノ酸の長さ、軽鎖では約100～110アミノ酸の長さを有し、各々の特定の抗体のその特定の抗原に対する結合及び特異性に関して使用される抗体の軽鎖又は重鎖の部分指す。重鎖の可変領域は、「VH」と呼ぶことができる。軽鎖の可変領域は、「VL」と呼ぶことができる。「可変」という用語は、可変領域の特定のセグメントが、配列に関して抗体間で大きく異なるという事実を指す。V領域は抗原結合を媒介し、特定の抗体のその特定の抗原に対する特異性を規定する。しかしながら、可変性は、可変領域の110アミノ酸のスパンにわたって均一に分布しているわけではない。それどころか、V領域は、各々約9～12アミノ酸長の「超可変領域」と呼ばれる可変性がより大きい(例えば、極端に可変性がある)より短い領域によって隔てられた約15～30アミノ酸のフレームワーク領域(FR)と呼ばれる可変性がより小さい(例えば、比較的变化しない)ストレッチからなる。重鎖及び軽鎖の可変領域は各々、3つの超可変領域によって接続された、主にβシート形状を取る4つのFRを含み、該超可変領域は、該βシート構造を接続し、場合によっては、その一部を形成する、ループを形成する。各鎖中の超可変領域は、FRによって互いに近接して保持され、他の鎖由来の超可変領域とともに、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する(例えば、Kabatらの文献、免疫学的に興味深いタンパク質の配列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)、第5版、Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991を参照されたい)。定常領域は、抗体を抗原に結合させるのに直接は関与しないが、抗体依存性細胞傷害性(ADCC)及び補体依存性細胞傷害性(CDC)への抗体の関与などの様々なエフェクター機能を示す。可変領域は、異なる抗体間で配列が大きく異なる。配列のばらつきはCDRに集中しており、一方、可変領域内のばらつきの小さい部分はフレームワーク領域(FR)と呼ばれる。軽鎖及び重鎖のCDRは、主に、抗体と抗原との相互作用に関与する。具体的な実施態様において、可変領域は、ヒト可変領域である。

【0098】

「Kabatと同様の可変領域残基付番」又は「Kabatと同様のアミノ酸位置付番」という用語及びこれらの変化形は、Kabatらの文献、免疫学的に興味深いタンパク質の配列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)、第5版、Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD.(1991)における抗体の編集物の重鎖可変領域又は軽鎖可変領域に対して使用されている付番体系を指す。この付番体系を用いると、実際の直鎖アミノ酸配列は、可変ドメインのFRもしくはCDRの短縮又は可変ドメインのFRもしくはCDRへの挿入に対応するより少ないアミノ酸又は追加のアミノ酸を含有し得る。例えば、重鎖可変ドメインは、H2の残基52の後ろの単一のアミノ酸挿入(Kabatによれば、残基52a)及び重鎖FR残基82の後ろの挿入された残基(例えば、Kabatによれば、残基82a、82b、及び82cなど)を含み得る。残基のKabat付番は、抗体の配列と「標準的な」Kabat付番配列とが相同な領域におけるアラインメントにより、所与の抗体について決定することができる。Kabat付番体系は、通常、可変ドメイン(およそ軽鎖の残基1～107及び重鎖の残基1～113)中の残基を指すときに使用される(例えば、Kabatらの文献、免疫学的に興味深い配列(Sequences of Immunological Interest)、第5版、Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.(1991))。「EU付番体系」又は「EUインデックス」は、通常、免疫グロブリン重鎖定常領域中の残基を指すときに使用される(例えば、Kabatらの文献(上記)に報告されているEUインデックス)。「Kabatと同様のEUインデックス」は、ヒトIgG1 EU抗体の残基付番を指す。例えば、AbM、Chothia、接触、IMGT、及びAHonを含む、他の付番体系が記載されている。様々な番号体系が図1～3に例示されている。

【0099】

「無傷」抗体は、抗原結合部位並びにCL並びに少なくとも重鎖定常領域CH1、CH2、及びCH3を含む抗体である。定常領域には、ヒト定常領域又はそのアミノ酸配列変異体が含まれ得る。好ましくは、無傷抗体は、1以上のエフェクター機能を有する。

【0100】

「抗体断片」は、無傷抗体の一部、好ましくは、無傷抗体の抗原結合又は可変領域を含む。抗体断片の例としては、限定するものではないが、Fab、Fab'、F(ab')₂、及びFv断片；ダイアボディ及びジ-ダイアボディ（例えば、Holliger, P.らの文献(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. 90:6444-8; Lu, D.らの文献(2005) J. Biol. Chem. 280:19665-72; Hudsonらの文献、Nat. Med. 9:129-134(2003); WO 93/11161号;及び米国特許第5,837,242号及び第6,492,123号を参照されたい);単鎖抗体分子(例えば、米国特許第4,946,778号;第5,260,203号;第5,482,858号、及び第5,476,786号を参照されたい);二重可変ドメイン抗体(例えば、米国特許第7,612,181号を参照されたい);単一可変ドメイン抗体(SdAb)(例えば、Woolvenらの文献、Immunogenetics 50: 98-101, 1999; Streltsovらの文献、Proc Natl Acad Sci USA. 101:12444-12449, 2004を参照されたい);並びに抗体断片から形成された多重特異性抗体が挙げられる。

【0101】

治療的抗体の「機能性断片」又は「結合断片」又は「抗原結合断片」は、無傷抗体に起因する生物学的機能の、いくつか又は全てではないにしても、少なくとも1つを示し、該機能は、少なくとも標的抗原(例えば、βクロトー結合断片又はβクロトーに結合する断片)に対する結合を含む。

【0102】

本明細書で使用される「融合タンパク質」という用語は、抗体のアミノ酸配列及び異種ポリペプチド又はタンパク質(例えば、通常は抗体の一部ではないポリペプチド又はタンパク質(例えば、非抗βクロトー抗原結合抗体))のアミノ酸配列を含むポリペプチドを指す。「融合」という用語は、βクロトー又は抗βクロトー抗体との関連において使用されるとき、ペプチドもしくはポリペプチド、又はその断片、変異体、及び/もしくは誘導体と異種ペプチド又はポリペプチドとの結合を指す。ある実施態様において、融合タンパク質は、βクロトー又は抗βクロトー抗体の生物活性を保持する。ある実施態様において、融合タンパク質は、βクロトー抗体のVH領域、VL領域、VH CDR(1つ、2つ、もしくは3つのVH CDR)、及び/又はVL CDR(1つ、2つ、もしくは3つのVL CDR)を含み、その場合、該融合タンパク質は、βクロトーエピトープ、βクロトー断片、及び/又はβクロトーポリペプチドに結合する。

【0103】

「重鎖」という用語は、抗体との関連において使用されるとき、アミノ末端部分が約120~130個又はそれより多くのアミノ酸の可変領域を含み、かつカルボキシ末端部分が定常領域を含む、約50~70kDaのポリペプチド鎖を指す。定常領域は、重鎖定常領域のアミノ酸配列に基づくアルファ(α)、デルタ(δ)、イプシロン(ε)、ガンマ(γ)、及びミュー(μ)と呼ばれる5つの異なるタイプ(例えば、アイソタイプ)のうちの1つであることができる。異なる重鎖はサイズが異なり: α、δ、及びγは、約450個のアミノ酸を含有し、一方、μ及びεは、約550個のアミノ酸を含有する。軽鎖と組み合わせられると、これらの異なるタイプの重鎖は、IgGの4つのサブクラス、すなわち、IgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4を含め、それぞれ、IgA、IgD、IgE、IgG、及びIgMという、抗体の5つの周知のクラス(例えば、アイソタイプ)を生じる。重鎖は、ヒト重鎖であることができる。

【0104】

「軽鎖」という用語は、抗体との関連において使用されるとき、アミノ末端部分が約100~約110個又はそれより多くのアミノ酸の可変領域を含み、かつカルボキシ末端部分が定常領域を含む、約25kDaのポリペプチド鎖を指す。軽鎖のおおよその長さは、211~217アミノ酸である。定常ドメインのアミノ酸配列に基づくカッパ(κ)又はラムダ(λ)と呼ばれる2つの異なるタイプがある。軽鎖アミノ酸配列は当技術分野で周知である。軽鎖は、ヒ

ト軽鎖であることができる。

【0105】

本明細書で使用される「宿主」という用語は、動物、例えば、哺乳動物(例えば、ヒト)を指す。

【0106】

本明細書で使用される「宿主細胞」という用語は、核酸分子でトランスフェクトされ得る特定の対象細胞及びそのような細胞の子孫又は潜在的な子孫を指す。そのような細胞の子孫は、後続の世代で生じ得る突然変異もしくは環境的影響又は宿主細胞ゲノムへの核酸分子の組み込みのために、核酸分子でトランスフェクトされた親細胞と同一でなくてもよい。

10

【0107】

本明細書で使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を指し、例えば、該集団を構成する個々の抗体は、微かな量で存在し得る天然のあり得る突然変異を除いて同一であり、各々のモノクローナル抗体は、通常、抗原上の単一のエピトープを認識する。具体的な実施態様において、本明細書で使用される「モノクローナル抗体」は、単一のハイブリドーマ又は他の細胞によって産生される抗体であり、ここで、該抗体は、例えば、ELISA又は当技術分野で公知の他の抗原結合もしくは競合結合アッセイによって決定したとき、 β クロトーエピトープのみに結合する。「モノクローナル」という用語は、任意の特定の抗体作製方法に限定されない。例えば、本開示において有用なモノクローナル抗体は、Kohlerら(Nature, 256:495(1975))によって最初に記載されたハイブリドーマ法によって調製されてもよく、又は細菌、真核動物、もしくは植物細胞で組換えDNA法を用いて作製されてもよい(例えば、米国特許第4,816,567号を参照されたい)。「モノクローナル抗体」はまた、例えば、Clacksonらの文献、Nature, 352:624-628(1991)及びMarksらの文献、J. Mol. Biol., 222:581-597(1991)に記載されている技法を用いて、ファージ抗体ライブラリーから単離されてもよい。クローン細胞株及びそれにより発現されるモノクローナル抗体の他の調製方法が当技術分野で周知である(例えば、分子生物学のショートプロトコル(Short Protocols in Molecular Biology)(2002)、第5版、Ausubelら編、John Wiley and Sons, New York:の第11章を参照されたい)。例示的なモノクローナル抗体産生方法が本明細書中の実施例に提供されている。

20

【0108】

「ネイティブ」という用語は、生体物質、例えば、核酸分子、ポリペプチド、宿主細胞などとの関連において使用されるとき、天然に見出され、かつ人間によって操作、修飾、及び/又は改変(例えば、単離、精製、選択)されていないものを指す。

30

【0109】

本明細書に提供される抗体は、重鎖及び/又は軽鎖の一部が、特定の種に由来し又は特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一又は相同である一方、鎖の残りが、別の種に由来し又は別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一又は相同である「キメラ」抗体、並びに所望の生物活性を示す限り、そのような抗体の断片を含むことができる(米国特許第4,816,567号;及びMorrisonらの文献、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855(1984)を参照されたい)。

40

【0110】

「ヒト化」形態の非ヒト(例えば、マウス)抗体は、ネイティブなCDR残基が、所望の特異性、親和性、及び能力を有する、マウス、ラット、ウサギ、又は非ヒト霊長類などの非ヒト種の対応するCDR(例えば、ドナー抗体)に由来する残基に置き換えられているヒト免疫グロブリン(例えば、レシピエント抗体)を含むキメラ抗体である。場合によっては、ヒト免疫グロブリンの1以上のFR領域残基が対応する非ヒト残基に置き換えられる。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にもドナー抗体にも見られない残基を含むことができる。これらの修飾は、抗体性能をさらに精緻化するために行われる。ヒト化抗体の重鎖又は軽鎖は、少なくとも1つ又は複数の可変領域の実質的に全てを含むことができ、該可変領域では、CDRの全て又は実質的に全てが非ヒト免疫グロブリンのCDRに対応し、FRの全て

50

又は実質的に全てがヒト免疫グロブリン配列のFRに対応する。ある実施態様において、ヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部、通常、ヒト免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含む。さらなる詳細については、Jonesらの文献、Nature, 321:522-525(1986); Riechmannらの文献、Nature, 332:323-329(1988);及びPrestaの文献、Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596(1992); Carterらの文献、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285-4289(1992);及び米国特許第6,800,738号(2004年10月5日発行)、第6,719,971号(2005年9月27日発行)、第6,639,055号(2003年10月28日発行)、第6,407,213号(2002年6月18日発行)、及び第6,054,297号(2000年4月25日発行)を参照されたい。

【0111】

「ヒト抗体」は、ヒトによって産生された抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を保有し及び/又は本明細書に開示されるヒト抗体作製技法のいずれかを用いて作製された抗体である。ヒト抗体のこの定義は、具体的には、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を除外する。ヒト抗体は、ファージディスプレイライブラリー(Hoogenboom及びWinterの文献、J. Mol. Biol., 227:381(1991); Marksらの文献、J. Mol. Biol., 222:581(1991))及び酵母ディスプレイライブラリー(Chaoらの文献、Nature Protocols 1:755-768(2006))を含む、当技術分野で公知の様々な技法を用いて産生することができる。Coleらの文献、モノクローナル抗体及び癌療法(Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy)、Alan R. Liss, p.77(1985); Boernerらの文献、J. Immunol., 147(1):86-95(1991)に記載されている方法もヒトモノクローナル抗体の調製に利用可能である。van Dijk及びvan de Winkelの文献、Curr. Opin. Pharmacol., 5:368-74(2001)も参照されたい。ヒト抗体は、抗原刺激に応答してそのような抗体を産生するように修飾されているが、その内在性遺伝子座が無効化されているトランスジェニック動物、例えば、マウスに抗原を投与することにより調製することができる(例えば、Jakobovits, A.の文献、Curr. Opin. Biotechnol. 1995, 6(5):561-6; Bruggemann及びTaussingの文献、Curr. Opin. Biotechnol. 1997, 8(4):455-8;並びにXENOMOUSE(商標)技術に関する米国特許第6,075,181号及び第6,150,584号を参照されたい)。例えば、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術によって作製されるヒト抗体に関するLiらの文献、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562(2006)も参照されたい。

【0112】

「CDR」は、免疫グロブリン(Igもしくは抗体)VH β -シートフレームワークの非フレームワーク領域内の3つの超可変領域(H1、H2、もしくはH3)のうちの1つ、又は抗体VL β -シートフレームワークの非フレームワーク領域内の3つの超可変領域(L1、L2、もしくはL3)のうちの1つを指す。したがって、CDRは、フレームワーク領域配列内に散在する可変領域配列である。CDR領域は当業者に周知であり、例えば、抗体可変(V)ドメイン内の最も超可変性の領域として、Kabatによって定義されている(Kabatらの文献、J. Biol. Chem. 252:6609-6616(1977); Kabatの文献、Adv. Prot. Chem. 32:1-75(1978))。CDR領域配列は、保存された β -シートフレームワークの一部ではなく、そのため、様々な立体構造をとることができる残基として、Chothiaによって構造的に定義されている(Chothia及びLeskの文献、J. Mol. Biol. 196:901-917(1987))。両方の用語法が当技術分野で十分に認識されている。CDR領域配列は、AbM、接触、及びIMGTによっても定義されている。CDR領域配列は、図1~3に例示されている。標準的な抗体可変領域内のCDRの位置は、数多くの構造の比較によって決定されている(Al-Lazikaniらの文献、J. Mol. Biol. 273:927-948(1997); Moreaらの文献、Methods 20:267-279(2000))。超可変領域内の残基の数は異なる抗体で様々に異なるので、標準的な可変領域付番方式では、標準的な位置に対する追加の残基に、従来、残基番号の次にa、b、cなどの番号が付けられている(Al-Lazikaniらの文献、上記(1997))。そのような術語体系も同様に当業者に周知である。

【0113】

「超可変領域」、「HVR」、又は「HV」という用語は、本明細書で使用されるとき、配列が超可変であり及び/又は構造的に定義されたループを形成する抗体可変領域の領域を指す。通常、抗体は、6つの超可変領域; VHに3つ(H1、H2、H3)及びVLに3つ(L1、L2、L3)を含む。いくつかの超可変領域の描写が使用され、本明細書に包含されている。Kabat相

補性決定領域(CDR)は配列の可変性に基づくものであり、最も一般的に使用されている(例えば、Kabatらの文献、免疫学的に興味深いタンパク質の配列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)、第5版、Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD.(1991)を参照されたい)。Chothiaは、代わりに、構造的ループの位置に言及している(例えば、Chothia及びLeskの文献、J. Mol. Biol. 196:901-917(1987)を参照されたい)。Kabat付番慣例を用いて付番したときのChothia CDR-H1ループの末端は、ループの長さに応じてH32とH34の間で異なる(これは、Kabat付番方式ではH35AとH35Bに挿入を置くからであり; 35Aも35Bも存在しない場合、ループは32で終わり; 35Aしか存在しない場合、ループは33で終わり; 35Aと35Bの両方が存在する場合、ループは34で終わる)。AbM超可変領域は、Kabat CDRとChothia構造ループの折衷物に相当し、Oxford MolecularのAbM抗体モデリングソフトウェアによって使用される(例えば、Martinの文献、抗体エンジニアリング(Antibody Engineering)、第2巻、第3章、Springer Verlagを参照されたい)。「接触」超可変領域は、利用可能な複合体結晶構造の解析に基づくものである。これらの超可変領域又はCDRの各々に由来する残基が以下に記載されている。

【0114】

最近、ImMunoGeneTics(IMG) Information System(登録商標)という普遍的な付番体系が開発され、広く採用されている(Lafrancらの文献、Dev. Comp. Immunol. 27(1):55-77(2003))。IMGは、ヒト及び他の脊椎動物の免疫グロブリン(IG)、T細胞受容体(TR)、及び主要組織適合性複合体(MHC)に特化した総合情報システムである。ここでは、CDRがアミノ酸配列と軽鎖又は重鎖内の位置の両方に関して言及されている。免疫グロブリン可変ドメインの構造内のCDRの「位置」は種間で保存されており、かつループと呼ばれる構造に存在するので、構造的特徴に従って可変ドメイン配列を整列させる付番体系を用いることにより、CDR及びフレームワーク残基が容易に特定される。この情報は、ある種の免疫グロブリン由来のCDR残基を、典型的には、ヒト抗体由来のアクセプターフレームワークに移植して、置き換える際に使用することができる。さらなる付番体系(AHon)がHonegger及びPluckthunによって開発されている(J. Mol. Biol. 309: 657-670(2001))。例えば、Kabatの付番体系及びIMGの独特な付番体系を含む、付番体系間の対応は当業者に周知であり(例えば、Kabatの文献(上記); Chothia及びLeskの文献(上記); Martinの文献(上記); Lefrancらの文献(上記)を参照されたい)、図1~3にも例示されている。本明細書に示される例示的な体系は、KabatとChothiaを組み合わせている。

【表1】

	例示的	IMG	Kabat	AbM	Chothia	接触
V _H CDR1	26-35	27-38	31-35	26-35	26-32	30-35
V _H CDR2	50-65	56-65	50-65	50-58	53-55	47-58
V _H CDR3	95-102	105-117	95-102	95-102	96-101	93-101
V _L CDR1	24-34	27-38	24-34	24-34	26-32	30-36
V _L CDR2	50-56	56-65	50-56	50-56	50-52	46-55
V _L CDR3	89-97	105-117	89-97	89-97	91-96	89-96

【0115】

超可変領域は、以下のような「拡張された超可変領域」：VLの24~36又は24~34(L1)、46~56又は50~56(L2)、及び89~97又は89~96(L3)並びにVHの26~35又は26~35A(H1)、50~65又は49~65(H2)、及び93~102、94~102、又は95~102(H3)を含み得る。本明細書で 사용되는ように、「HVR」及び「CDR」という用語は、互換的に使用されている。

【0116】

「定常領域」又は「定常ドメイン」という用語は、抗体の抗原に対する結合に直接は関与しないが、Fc受容体との相互作用などの様々なエフェクター機能を示す、軽鎖及び重鎖

のカルボキシ末端部分を指す。これらの用語は、抗原結合部位を含有する、免疫グロブリンのもう一方の部分である可変領域と比べて、より保存されたアミノ酸配列を有する免疫グロブリン分子の部分の部分を指す。定常領域は、重鎖のCH1、CH2、及びCH3領域、及び軽鎖のCL領域を含有し得る。

【0117】

「フレームワーク」又は「FR」残基という用語は、CDRに隣接する可変領域残基である。FR残基は、例えば、キメラ、ヒト化、ヒト、ドメイン抗体、ダイアボディ、直鎖抗体、及び二重特異性抗体中に存在する。FR残基は、超可変領域残基又はCDR残基以外の可変ドメイン残基である。

【0118】

「親和性成熟」抗体は、1以上の変化(例えば、改変、付加、及び/又は欠失を含む、アミノ酸配列のバリエーション)を保有しない親抗体と比較して、抗原に対する抗体の親和性の向上をもたらすこれらの変化をその1以上のHVR中に有する抗体である。好ましい親和性成熟抗体は、標的抗原に対するナノモル濃度又はさらにはピコモル濃度の親和性を有する。親和性成熟抗体は、当技術分野で公知の手順によって産生される。総説については、Hudson及びSouriauの文献、Nature Medicine 9 :129-134(2003); Hoogenboomの文献、Nature Biotechnol. 23 : 1105-1116(2005); Quiroz及びSinclairの文献、Revista Ingeneria Biomedica 4 : 39-51(2010)を参照されたい。

【0119】

「ブロック」抗体又は「アンタゴニスト」抗体は、それが結合する抗原の生物活性を阻害し又は低下させる抗体である。例えば、ブロック抗体又はアンタゴニスト抗体は、抗原の生物活性を実質的に又は完全に阻害することができる。

【0120】

「アゴニスト抗体」は、応答を誘発する抗体、例えば、対象となるポリペプチド(例えば、FGF19又はFGF21)の機能活性のうちの少なくとも1つを模倣する抗体である。アゴニスト抗体には、リガンド模倣物となる抗体が含まれ、例えば、この場合、リガンドは、細胞表面受容体に結合し、該結合は、細胞内細胞シグナル伝達経路を介して細胞シグナル伝達又は活性を誘導し、該抗体は、同様の細胞シグナル伝達又は活性化を誘導する。

【0121】

β クロトーの「アゴニスト」は、例えば、 β クロトー及びFGF受容体を発現する細胞で、 β クロトーの生物活性のうちの1つ又は複数を活性化し又は別の形で増加させることができる分子を指す。いくつかの実施態様において、 β クロトーのアゴニスト(例えば、本明細書に記載される作動性抗体)は、例えば、 β クロトータンパク質及びFGF受容体を発現する細胞の活性化及び/又は細胞シグナル伝達経路を活性化し又は別の形で増加させることにより作用し、それにより、アゴニストの非存在下での β クロトー媒介生物活性と比べて該細胞の β クロトー媒介生物活性を増加させることができる。いくつかの実施態様において、本明細書に提供される抗体は、FGF19様シグナル伝達及び/又はFGF21様シグナル伝達を誘導する抗体を含む、作動性抗 β クロトー抗体である。

【0122】

「結合親和性」は、通常、分子(例えば、結合タンパク質、例えば、抗体)の単一の結合部位とその結合パートナー(例えば、抗原)の間の非共有結合的相互作用の合計の強度を指す。別途示されない限り、本明細書で使用されるように、「結合親和性」は、結合対のメンバー(例えば、抗体及び抗原)間の1:1相互作用を反映する固有の結合親和性を指す。結合分子Xのその結合パートナーYに対する親和性は、通常、解離定数(K_D)によって表すことができる。親和性は、本明細書に記載される方法を含む、当技術分野で公知の一般的な方法によって測定することができる。低親和性抗体は、通常、抗原にゆっくりと結合し、速やかに解離する傾向があるのに対し、高親和性抗体は、通常、抗原により速く結合し、より長く結合した状態に留まる傾向がある。結合親和性を測定する様々な方法が当技術分野で周知であり、これらのいずれかを本開示の目的のために使用することができる。具体的で例示的な実施態様には、以下のものが含まれる。一実施態様において、「 K_D 」又は「 K_D

10

20

30

40

50

値」は、当技術分野で公知のアッセイによって、例えば、結合アッセイによって測定することができる。K_Dは、例えば、対象となるFab型の抗体及びその抗原を用いて実施される、放射性標識抗原結合アッセイ(RIA)で測定することができる(Chenらの文献(1999) J. Mol Biol 293:865-881)。K_D又はK_D値は、例えば、BIAcore™-2000もしくはBIAcore™-3000(BIAcore社, Piscataway, NJ)を用いたBiacoreによる表面プラズモン共鳴アッセイを使用することによるか、又は例えば、OctetQK384システム(ForteBio, Menlo Park, CA)を用いたバイオレイヤー干渉法によって測定することができる。「結合速度(on-rate)」又は「会合の速度」又は「会合速度」又は「kon」も、例えば、BIAcore™-2000もしくはBIAcore™-3000(BIAcore社, Piscataway, NJ)、又はOctetQK384システム(ForteBio, Menlo Park, CA)を用いた上記の同じ表面プラズモン共鳴又はバイオレイヤー干渉法を用いて決定することができる。

【0123】

「実質的に類似する」又は「実質的に同じ」という語句は、当業者であれば、2つの値の違いを、該値(例えば、K_D値)によって測定される生物学的特徴との関連において、生物学的及び/又は統計学的にほとんど又は全く有意ではないと考えるほど十分に高い2つの数値(例えば、本開示の抗体と関連する一方の数値と参照抗体と関連するもう一方の数値)間の類似度を意味する。例えば、該2つの値の違いは、参照抗体についての値の関数として、約50%未満、約40%未満、約30%未満、約20%未満、約10%未満、約5%未満であり得る。

【0124】

本明細書で使用される「実質的に低下した」又は「実質的に異なる」という語句は、当業者であれば、2つの値の違いを、該値によって測定される生物学的特徴との関連において、統計学的に有意であると考えられるほど十分に高い2つの数値(例えば、本開示の抗体と関連する一方の数値と参照抗体と関連するもう一方の数値)間の相違度を意味する。例えば、該2つの値の違いは、参照抗体についての値の関数として、好ましくは、約10%超、約20%超、約30%超、約40%超、約50%超であり得る。

【0125】

抗体「エフェクター機能」は、抗体のFc領域(例えば、ネイティブ配列Fc領域又はアミノ酸配列変異体Fc領域)に起因する生物活性を指し、抗体アイソタイプによって異なる。抗体エフェクター機能の例としては：C1q結合及び補体依存性細胞傷害性；Fc受容体結合；抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性(ADCC)；食作用；細胞表面受容体(例えば、B細胞受容体)の下方調節；並びにB細胞活性化が挙げられる。

【0126】

本明細書における「Fc領域」という用語は、例えば、ネイティブ配列Fc領域、組換えFc領域、及び変異体Fc領域を含む、免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するために使用される。免疫グロブリン重鎖のFc領域の境界は様々であり得るが、ヒトIgG重鎖Fc領域は、多くの場合、位置Cys226のアミノ酸残基から又はPro230から、そのカルボキシル末端にまで及ぶと定義される。Fc領域のC末端リジン(EU付番体系によれば、残基447)は、例えば、抗体の産生もしくは精製中に、又は抗体の重鎖をコードする核酸を組換え技術で操作することにより除去することができる。したがって、無傷抗体の組成物は、全てのK447残基が除去された抗体集団、K447残基が除去されていない抗体集団、及びK447残基がある抗体とK447残基がない抗体の混合物を有する抗体集団を含むことができる。

【0127】

「機能的Fc領域」は、ネイティブ配列Fc領域の「エフェクター機能」を保有する。例示的な「エフェクター機能」としては、C1q結合；補体依存性細胞傷害性(CDC)；Fc受容体結合；抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性(ADCC)；食作用；細胞表面受容体(例えば、B細胞受容体；BCR)の下方調節などが挙げられる。そのようなエフェクター機能は、通常、Fc領域が結合領域又は結合ドメイン(例えば、抗体可変領域又はドメイン)と組み合わせられることを必要とし、開示される様々なアッセイを用いて評価することができる。

【0128】

10

20

30

40

50

「ネイティブ配列Fc領域」は、天然に見られ、かつヒトによって操作、修飾、及び/又は改変されていない(例えば、単離、精製、選択されていない、可変領域配列などの他の配列を含まない、又は該配列と組み合わせていない)、Fc領域のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を含む。ネイティブ配列ヒトFc領域には、ネイティブ配列ヒトIgG1 Fc領域(非A及びAアロタイプ);ネイティブ配列ヒトIgG2 Fc領域;ネイティブ配列ヒトIgG3 Fc領域;並びにネイティブ配列ヒトIgG4 Fc領域、並びにこれらの天然の変異体が含まれる。

【0129】

「変異体Fc領域」は、少なくとも1つのアミノ酸修飾(例えば、置換、付加、又は欠失)、好ましくは、1以上のアミノ酸置換によって、ネイティブ配列Fc領域のアミノ酸配列と異なるアミノ酸配列を含む。好ましくは、変異体Fc領域は、ネイティブ配列Fc領域又は親ポリペプチドのFc領域と比較して、少なくとも1つのアミノ酸置換、例えば、約1～約10個のアミノ酸置換、好ましくは、約1～約5個のアミノ酸置換をネイティブ配列Fc領域中又は親ポリペプチドのFc領域中に有する。本明細書における変異体Fc領域は、好ましくは、ネイティブ配列Fc領域及び/又は親ポリペプチドのFc領域との少なくとも約80%の同一性、より好ましくは、それらとの少なくとも約90%の同一性、例えば、それらとの少なくとも約95%の同一性を保有する。例えば、ヒトIgG1 Fc配列中の2つの位置でアラニンへの2アミノ酸変化を有する変異体が、以下に提供されるアミノ酸配列中で太字にして示されている:

【化36】

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA**AL**AGGPSVF
LFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(配列番号: 316)

そのような変異体配列は、以下に提供される5H23(vH3)-hIgG1(E233A)(L235A)と表記されたヒト化5H23-vH3(例えば、実施例7を参照されたい)のために、以下に示すようなヒト化重鎖コンストラクトを使用することができ;シグナル配列を構成するアミノ酸に下線が引かれており、可変領域配列が太字になっている:

【化37】

mdmrvpaqlllgllllwlrgarc**QVQLQQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF****TSYDINWVRQA**
PGQGLEWIGWIYPGDGSTKYNEKFKGKATITRDTSASTAYMELSSLRSED**TAVYFCARSDYY**
GSRSFAYWGQGT**LVTVSS**ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
HTCPPCPAPALAGGPSVFLEFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(配列番号: 317)

【0130】

「軽鎖定常領域」には、カップ及びラムダ定常領域が含まれる。例示的なカップ定常領域が以下に提供されている：

【化 3 8】

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYLSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(配列番号 : 318)

そのようなカップ定常領域配列は、以下に提供されるヒト化5H23-vL2(例えば、実施例7を参照されたい)のために、以下に示すようなヒト化軽鎖コンストラクトを使用することができ、シグナル配列を構成するアミノ酸に下線が引かれており、可変領域配列が太字になっている：

【化 3 9】

mdmrvpaqlllgllllwlrgarc**DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYVYMHWY**
QQKPGQPPKLLIYLASYLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS**SVQAEDVAVYYCQHSRDLTFPF**
GGG**TKLEIK**RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSTYLSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(配列番号 : 319)

【0131】

「変異体」という用語は、βクロトー又は抗βクロトー抗体との関連において使用されるとき、ネイティブな又は未修飾のβクロトー配列と比較して、1以上(例えば、約1～約25個、約1～約20個、約1～約15個、約1～約10個、又は約1～約5個など)のアミノ酸配列置換、欠失、及び/又は付加を含むペプチド又はポリペプチドを指すことができる。例えば、βクロトー変異体は、ネイティブなβクロトーのアミノ酸配列に対する1以上(例えば、約1～約25個、約1～約20個、約1～約15個、約1～約10個、又は約1～約5個など)の変化によって生じることができる。また例として、抗βクロトー抗体の変異体は、ネイティブな又は以前に修飾されていない抗βクロトー抗体のアミノ酸配列に対する1以上(例えば、約1～約25個、約1～約20個、約1～約15個、約1～約10個、又は約1～約5個など)の変化によって生じることができる。変異体は、アレル変異体もしくはスプライス変異体などの、天然に存在するものであってもよく、又は人為的に構築されたものであってもよい。ポリペプチド変異体は、該変異体をコードする対応する核酸分子から調製されてもよい。具体的な実施態様において、βクロトー変異体又は抗βクロトー抗体変異体は、それぞれ、βクロトー又は抗βクロトー抗体の機能活性を少なくとも保持する。具体的な実施態様において、抗βクロトー抗体変異体は、βクロトーに結合し、及び/又はβクロトー活性に対して拮抗性である。具体的な実施態様において、抗βクロトー抗体変異体は、βクロトーに結合し、及び/又はβクロトー活性に対して作動性である。ある実施態様において、該変異体は、βクロトー又は抗βクロトー抗体のVHもしくはVL領域もしくはサブ領域、例えば、1以上のCDRをコードする核酸分子の単一ヌクレオチド多型(SNP)変異体によってコードされる。

【0132】

「ベクター」という用語は、例えば、核酸配列を宿主細胞に導入するためを含め、核酸配列を担持又は包含するために使用される物質を指す。使用のために適用可能なベクターとしては、例えば、発現ベクター、プラスミド、ファージベクター、ウイルスベクター、エピソーム、及び人工染色体が挙げられ、これらは、宿主細胞の染色体への安定な組み込みのために作動可能な選択配列又はマーカーを含むことができる。さらに、ベクターは、1以上の選択可能マーカー遺伝子及び適切な発現制御配列を含むことができる。含めることができる選択可能マーカー遺伝子は、例えば、抗生物質もしくは毒素に対する抵抗性を提

供し、独立栄養欠損を相補し、又は培養培地中にない重要な栄養を供給する。発現制御配列は、当技術分野で周知である構成的及び誘導性プロモーター、転写エンハンサー、転写ターミネーターなどを含むことができる。2以上の核酸分子(例えば、抗体の重鎖と軽鎖の両方又は抗体のVHとVLの両方)が共発現されることになる場合、両方の核酸分子を、例えば、単一の発現ベクター又は別々の発現ベクターに挿入することができる。単一ベクター発現のために、コード核酸を、1つの共通の発現制御配列に機能的に連結するか、又は異なる発現制御配列、例えば、1つの誘導性プロモーター及び1つの構成的プロモーターに連結することができる。核酸分子の宿主細胞への導入は、当技術分野で周知の方法を用いて確認することができる。そのような方法としては、例えば、核酸解析、例えば、mRNAのノーザンブロットもしくはポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅、又は遺伝子産物の発現についての免疫ブロッティング、又は導入された核酸配列もしくはその対応する遺伝子産物の発現を試験する他の好適な解析方法が挙げられる。核酸分子は、所望の産物(例えば、本明細書に記載される抗 β クロトー抗体)を産生するのに十分な量で発現されることが当業者によって理解され、また、発現レベルを当技術分野で周知の方法を用いて最適化して、十分な発現を得ることができることがさらに理解される。

10

【0133】

「抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性」又は「ADCC」は、特定の細胞傷害性細胞(例えば、ナチュラルキラー(NK)細胞、好中球、及びマクロファージ)上に存在するFc受容体(FcR)に結合した分泌型Igによって、これらの細胞傷害性エフェクター細胞が抗原担持標的細胞に特異的に結合し、その後、該標的細胞を細胞毒素で死滅させることが可能になる細胞傷害性の形態を指す。抗体は、細胞傷害性細胞を「武装し」、そのような死滅化に完全に必要とされる。ADCCを媒介する主な細胞であるNK細胞がFc γ RIIIのみを発現するのに対し、単球は、Fc γ RI、Fc γ RII、及びFc γ RIIIを発現する。造血細胞上でのFcR発現が知られている(例えば、Ravetch及びKinetの文献、Annu. Rev. Immunol. 9:457-92(1991)の464ページの表3を参照されたい)。対象となる分子のADCC活性を評価するために、インビトロADCCアッセイ(例えば、米国特許第5,500,362号又は第5,821,337号を参照されたい)を実施してもよい。そのようなアッセイのための有用なエフェクター細胞としては、末梢血単核細胞(PBMC)及びナチュラルキラー(NK)細胞が挙げられる。代わりに、又はさらに、対象となる分子のADCC活性を、インビボで、例えば、動物モデルでアッセイしてもよい(例えば、Clynesらの文献(USA) 95:652-656(1998)を参照されたい)。ADCC活性がほとんど又は全くない抗体を使用のために選択してもよい。

20

30

【0134】

「Fc受容体」又は「FcR」は、抗体のFc領域に結合する受容体を言い表したものである。好ましいFcRは、ネイティブ配列ヒトFcRである。さらに、好ましいFcRは、IgG抗体に結合するもの(例えば、ガンマ受容体)であり、Fc γ RI、Fc γ RII、及びFc γ RIIIサブクラスを受容体を、これらの受容体のアレル変異体及び選択的スプライシング形態を含めて含む。Fc γ RII受容体には、Fc γ RIIA(「活性化受容体」)及びFc γ RIIB(「抑制受容体」)が含まれ、これらは、主にその細胞質ドメインが異なる類似のアミノ酸配列を有する(例えば、Daeronの総説、Annu. Rev. Immunol. 15:203-234(1997)を参照されたい)。FcRは公知である(例えば、Ravetch及びKinetの文献、Annu. Rev. Immunol. 9:457-492(1991); Capelらの文献、Immunomethods 4:25-34(1994);及びde Haasらの文献、J. Lab. Clin. Med. 126:330-41(1995)を参照されたい)。他のFcRは、将来同定されることになるものを含め、本明細書における「FcR」という用語によって包含される。この用語は、母親IgGの胎児への移動に参与する新生児受容体であるFcRnも含む(例えば、Guyerらの文献、J. Immunol. 117:587(1976)及びKimらの文献、J. Immunol. 24:249(1994)を参照されたい)。FcRに対する結合が向上又は減少した抗体変異体が記載されている(例えば、WO 2000/42072号;米国特許第7,183,387号、第7,332,581号、及び第7,335,742号; Shieldsらの文献、J. Biol. Chem. 9(2):6591-6604(2001)を参照されたい)。

40

【0135】

「補体依存性細胞傷害性」又は「CDC」は、補体の存在下での標的細胞の溶解を指す。

50

古典的補体経路の活性化は、補体系の第1の成分(C1q)がそのコグネートな抗原に結合している(適当なサブクラスの)抗体に結合することによって開始される。補体活性化を評価するために、CDCアッセイ(例えば、Gazzano-Santoroらの文献、J. Immunol. Methods 202:163(1996)を参照されたい)を実施してもよい。改変されたFc領域アミノ酸配列を有するポリペプチド変異体(変異体Fc領域を有するポリペプチド)及び増加又は減少したC1q結合能を有するポリペプチド変異体が記載されている(例えば、米国特許第6,194,551号、WO 1999/51642号、Idusogieらの文献、J. Immunol. 164: 4178-4184(2000)を参照されたい)。CDC活性がほとんど又は全くない抗体を使用のために選択してもよい。

【0136】

βクロトーポリペプチド「細胞外ドメイン」又は「ECD」は、膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインを本質的に含まないβクロトーポリペプチドの形態を指す。例えば、βクロトーポリペプチドECDは、そのような膜貫通ドメイン及び/又は細胞質ドメインの1%未満を有し得、好ましくは、そのようなドメインの0.5%未満を有し得る。「同一性」という用語は、2以上のポリペプチド分子又は2以上の核酸分子の配列を整列させ、比較することにより決定される、該配列間の関係性を指す。「パーセント同一性」は、比較される分子中のアミノ酸又はヌクレオチド間で同一な残基のパーセントを意味し、比較されている分子のうちの最も小さいもののサイズに基づいて計算される。これらの計算のためには、アラインメント中のギャップ(もし存在する場合)が特定の数学モデル又はコンピュータプログラム(例えば、「アルゴリズム」)によって対処されなければならない。整列した核酸又はポリペプチドの同一性を計算するために使用することができる方法としては、計算分子生物学(Computational Molecular Biology)(Lesk, A. M.編)(1988) New York: Oxford University Press; バイオコンピューティングインフォマティクス及びゲノムプロジェクト(Bioinformatics and Genome Projects)(Smith, D. W.編)、1993, New York: Academic Press; 配列データのコンピュータ解析(Computer Analysis of Sequence Data)、パートI(Griffin, A. M.及びGriffin, H. G.編)、1994, New Jersey: Humana Press; von Heinje, G.の文献(1987)、分子生物学における配列解析(Sequence Analysis in Molecular Biology)、New York: Academic Press; 配列解析プライマー(Sequence Analysis Primer)(Gribskov, M.及びDevereux, J.編)、1991, New York: M. Stockton Press; 及びCarilloらの文献(1988) SIAM J. Applied Math. 48:1073に記載されているものが挙げられる。

【0137】

パーセント同一性を計算する際、比較されている配列を、配列間で最大のマッチを与えるように整列させることができる。パーセント同一性を決定するために使用し得るコンピュータプログラムは、GAPを含むGCGプログラムパッケージである(Devereuxらの文献(1984) Nucl. Acid Res. 12:387; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.)。コンピュータアルゴリズムGAPを用いて、パーセント配列同一性を決定すべき2つのポリペプチド又はポリヌクレオチドを整列させる。配列は、そのそれぞれのアミノ酸又はヌクレオチドの最適なマッチング(アルゴリズムによって決定される「マッチしたスパン(matched span)を求めて整列させることができる。ギャップ開始ペナルティ(これは、平均対角の3倍として計算され、ここで、「平均対角」は、使用されている比較マトリックスの対角の平均であり;「対角」は、特定の比較マトリックスによって各々の完全なアミノ酸マッチに割り当てられるスコア又は数字である)及びギャップ伸長ペナルティ(これは、通常、ギャップ開始ペナルティの1/10倍である)、並びにPAM 250又はBLOSUM 62などの比較マトリックスが、該アルゴリズムとともに使用される。ある実施態様において、標準的な比較マトリックス(PAM 250比較マトリックスについては、Dayhoffらの文献(1978) Atlas of Protein Sequence and Structure 5:345-352; BLOSUM 62比較マトリックスについては、Henikoffらの文献(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:10915-10919を参照されたい)も、該アルゴリズムによって使用される。

【0138】

GAPプログラムを用いてポリペプチド又はヌクレオチド配列についてのパーセント同一性を決定するための例示的なパラメータは、以下のものである:(i)アルゴリズム: Needle

manらの文献、1970, J. Mol. Biol. 48:443-453;(ii)比較マトリックス: Henikoffらの文献、1992(上記)からのBLOSUM 62;(iii)ギャップペナルティ:12(ただし、末端のギャップについては、ペナルティなし)(iv)ギャップ長ペナルティ:4;及び(v)類似性の閾値:0。

【0139】

2つのアミノ酸配列を整列させるための特定のアラインメント方式では、結果として2つの配列の短い領域しかマッチングされない可能性があり、この整列された小さい領域は、2つの全長配列間に有意な関係がない場合でも、非常に高い配列同一性を有することがある。したがって、選択されたアラインメント法(例えば、GAPプログラム)は、そのように所望される場合、標的ポリペプチドのいくつかのアミノ酸、例えば、少なくとも50個の連続するアミノ酸にわたるアラインメントが結果として得られるように調整することができる。

10

【0140】

参照ポリペプチド配列に関する「パーセント(%)アミノ酸配列同一性」は、配列を整列させ、必要であれば、最大のパーセント配列同一性を達成するためにギャップを導入した後、配列同一性の部分としていかなる保存的置換も考慮に入れずに、参照ポリペプチド配列中のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセンテージとして定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定するためのアラインメントは、例えば、公的に利用可能なコンピュータソフトウェア、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGN、又はMegaalign(DNASTAR)ソフトウェアを用いて、当技術分野の技術の範囲内にある様々な方法で達成することができる。当業者は、比較されている配列の全長にわたって最大のアラインメントを達成するために必要とされる任意のアルゴリズムを含む、配列を整列させるための適当なパラメータを決定することができる。

20

【0141】

アミノ酸残基/位置の「修飾」は、出発アミノ酸配列と比較したときの一次アミノ酸配列の変化を指し、ここで、該変化は、該アミノ酸残基/位置を含む配列の改変によって生じる。例えば、典型的な修飾には、別のアミノ酸との残基の置換(例えば、保存的もしくは非保存的置換)、該残基/位置に近接した1以上(例えば、通常、5、4、もしくは3個未満)のアミノ酸の挿入、及び/又は該残基/位置の欠失が含まれる。

【0142】

「エピトープ」は、単一の抗体分子が結合する抗原分子の表面上の部位、例えば、抗体の1以上の抗原結合領域に結合することができる、及び動物、例えば、哺乳動物(例えば、ヒト)で抗原性又は免疫原性活性を有する、すなわち、免疫応答を誘発することができる、抗原、例えば、βクロトーポリペプチド、βクロトーポリペプチド断片、又はβクロトーエピトープの表面上の限局された領域である。免疫原性活性を有するエピトープは、動物で抗体応答を誘発するポリペプチドの部分である。抗原性活性を有するエピトープは、例えば、免疫アッセイによるものを含め、当技術分野で周知の任意に方法によって決定される、抗体が結合するポリペプチドの部分である。抗原性エピトープが必ずしも免疫原性である必要はない。エピトープは、多くの場合、アミノ酸又は糖側鎖などの化学的に活性のある表面分子団からなり、特異的な3次元構造特性及び特異的な電荷特性を有する。「エピトープ」という用語は、具体的には、線状エピトープ及び立体構造エピトープを含む。エピトープに寄与するポリペプチドの領域は、ポリペプチドの連続的なアミノ酸であってもよく、又はエピトープは、ポリペプチドの2以上の非連続的な領域から一体となったものであってもよい。エピトープは、抗原の3次元表面特徴であっても、そうでなくてもよい。ある実施態様において、βクロトーエピトープは、βクロトーポリペプチドの3次元表面特徴である。他の実施態様において、βクロトーエピトープは、βクロトーポリペプチドの線形特徴である。通常、抗原は、いくつかの又は多くの異なるエピトープを有しており、多くの異なる抗体と反応することができる。

30

40

【0143】

2つの抗体が3次元空間で同一の、重複する、又は隣接するエピトープを認識する場合、抗体は、「エピトープ」又は参照抗体と「本質的に同じエピトープ」又は「同じエピトープ

50

プ」に結合する。2つの抗体が3次元空間で同一の、重複する、又は隣接するエピトープに結合するかどうかを決定するための最も広く使用されかつ迅速な方法は、競合アッセイであり、これは、例えば、標識抗原又は標識抗体のどちらかを用いる、いくつかの異なるフォーマットで構成することができる。いくつかのアッセイでは、抗原を、96ウェルプレートに固定化するか、又は細胞表面上に発現させ、未標識抗体が標識抗体の結合を阻止する能力を、放射性標識、蛍光標識、又は酵素標識を用いて測定する。

【0144】

「エピトープマッピング」は、抗体の結合部位、又は、エピトープをその標的抗原上で同定するプロセスである。抗体エピトープは、線状エピトープ又は立体構造エピトープであり得る。線状エピトープは、タンパク質中の連続するアミノ酸配列によって形成される。立体構造エピトープは、タンパク質配列中では不連続であるが、タンパク質がその3次元構造へとフォールディングするときに寄せ集められるアミノ酸から形成される。誘導されるエピトープは、例えば、別のタンパク質又はリガンドの活性化又は結合(例えば、FCF受容体、例えば、FGFR1c、FGFR2c、FGFR3c、又はFGFR4cに対するβクロトローの結合)の後、タンパク質の3次元構造が変化した立体構造を取るときに、形成される。

【0145】

「エピトープビニング」は、抗体が認識するエピトープに基づいて抗体を分類するプロセスである。より具体的には、エピトープビニングは、様々な抗体のエピトープ認識特性を識別し、そのエピトープ認識特性に基づいて抗体をクラスタリングするための計算プロセスと組み合わせた競合アッセイを使用し、かつ異なる結合特異性を有する抗体を同定するための方法及びシステムを含む。

【0146】

「βクロトロー媒介疾患」及び「βクロトロー媒介障害」及び「βクロトロー媒介疾病」は互換的に使用されており、βクロトロー又はβクロトローとFGF受容体、例えば、FGFR1c、FGFR2c、FGFR3c、もしくはFGFR4との相互作用によって完全にもしくは部分的に引き起こされるか、又はその結果として生じるものである任意の疾患、障害、又は疾病、並びに/或いはその代わりに、FGF19及び/又はFGF21のインビボ作用を模倣又は強化することが望ましい任意の疾患、障害、又は疾病を指す。

【0147】

本明細書で使用される「治療的有効量」という用語は、所与の疾患、障害、もしくは疾病、及び/又はこれらに関連する症状の重症度及び/又は持続期間を低下させ及び/又は改善するのに十分である薬剤(例えば、本明細書に記載される抗体又は本明細書に記載される任意の他の薬剤)の量を指す。治療剤を含む、薬剤の治療的有効量は、(i)所与の疾患、障害、もしくは疾病の進展もしくは進行の低下もしくは改善、(ii)所与の疾患、障害、もしくは疾病の再発、発症、もしくは発生の低下もしくは改善、及び/又は(iii)別の療法(例えば、本明細書に提供される抗体の投与以外の療法)の予防もしくは治療効果の向上もしくは増強に必要な量であることができる。本開示の物質/分子/薬剤(例えば、抗βクロトロー抗体)の「治療的有効量」は、個体の病状、年齢、性別、及び重量、並びに該物質/分子/薬剤が個体において所望の応答を誘発する能力などの因子によって異なり得る。治療的有効量は、該物質/分子/薬剤の任意の毒性又は有害効果を治療的に有益な効果が上回る量を包含する。ある実施態様において、「治療的有効量」という用語は、対象又は哺乳動物の疾患、障害、又は疾病を「治療する」のに有効な抗体又は他の薬剤(例えば、又は薬物)の量を指す。

【0148】

「有効量」は、通常、症状の重症度及び/又は頻度を低下させ、症状及び/又は根本原因を排除し、症状の発生及び/又はその根本原因を予防し、並びに/或いは例えば、糖尿病、肥満、脂質異常症、心血管疾患、メタボリックシンドローム、又はFGF19及び/もしくはFGF21のインビボ作用を模倣もしくは増強することが望ましい広く任意の疾患、障害、もしくは疾病を含む、疾患、障害、又は疾病に起因又は関連する傷害を改善又は修正するのに十分な量である。いくつかの実施態様において、有効量は、治療的有効量又は予防的有効

量である。「治療的有効量」は、疾患、障害、又は疾病(例えば、2型糖尿病、肥満、脂質異常症、NASH、心血管疾患、メタボリックシンドローム、又はFGF19及び/もしくはFGF21のインビボ作用を模倣もしくは増強することが望ましい広く任意の疾患、障害、もしくは疾病)、或いは症状、特に、疾患、障害、もしくは疾病、又はそのような疾患、障害、もしくは疾病と関連する症状を改善するか、或いはさもないければ、該疾患、障害、もしくは疾病、又はそのような疾患、障害、もしくは疾病と関連する任意の他の望ましくない症状の進行を、どんな方法であれ、予防し、妨害し、遅延させ、又は反転させるのに十分な量である。「予防的有効量」は、対象に投与されたとき、例えば、糖尿病、肥満、又は脂質異常症の発生(又は再発)を予防し又は遅延させるか、或いは例えば、糖尿病、肥満、脂質異常症、心血管疾患、メタボリックシンドローム、又はFGF19及び/もしくはFGF21のインビボ作用を模倣もしくは増強することが望ましい広く任意の疾患、障害、もしくは疾病、或いは関連症状を含む、疾患、障害、もしくは疾病、又は関連症状の発生(又は再発)の可能性を低下させる、意図された予防効果を有する医薬組成物の量である。十分な治療又は予防効果は、1回の投与によって必ずしも生じるとは限らず、一連の投与を施した後に初めて生じる場合もある。したがって、治療的又は予防的有効量は、1回以上の投与で投与されてもよい。

10

【0149】

「予防的有効量」は、所望の予防結果を達成するために必要な投薬量で及び所望の予防結果を達成するために必要な期間にわたって有効な量を指す。一般に、予防用量は、疾患、障害、もしくは疾病の前に、又はその初期段階において、対象で使用されるので、予防的有効量は、治療的有効量よりも少ない可能性があるが、必ずしもそうであるとは限らない。

20

【0150】

「慢性的」投与は、長期間にわたって初回治療効果(活性)を維持するために、急性の様式ではなく、連続的な様式で(例えば、数日、数週間、数カ月、又は数年などの期間)、薬剤を投与することを指す。「間欠的」投与は、中断なしで連続的に行われるのではなく、むしろ本来は周期的な処置である。

【0151】

1以上のさらなる治療剤「と組み合わせた」投与には、同時(例えば、並行)投与と任意の順序での連続投与が含まれる。他の療法(例えば、他の薬剤)の投与との関連における「と組み合わせた」という用語は、複数の療法(例えば、1つの薬剤)の使用を含む。「と組み合わせた」という用語の使用は、療法が対象に投与される順序を制限するものではない。第1の療法(例えば、薬剤)を、 β クロトー媒介疾患を有していたか、該疾患を有しているか、又は該疾患に罹患しやすい対象への第2の療法(例えば、薬剤)の投与の前に(例えば、1分、15分、30分、45分、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、12時間、24時間、48時間、72時間、96時間、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、8週間、9週間、10週間、11週間、もしくは12週間前に)、該投与と並行して、又は該投与の後に(例えば、1分、15分、30分、45分、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、12時間、24時間、48時間、72時間、96時間、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、9週間、10週間、11週間、もしくは12週間後に)投与することができる。

30

40

【0152】

任意の追加の療法(例えば、薬剤)を、任意の順序で、他の追加の療法(例えば、薬剤)とともに投与することができる。ある実施態様において、抗体を、1以上の療法、例えば、薬剤(例えば、現在投与されている抗体ではない、薬剤を含む、療法)と組み合わせて投与して、 β クロトー媒介疾患を予防、治療、管理、及び/又は改善することができる。抗体と組み合わせて投与することができる療法(例えば、薬剤)の非限定的な例としては、例えば、鎮痛剤、麻酔剤、抗生物質、もしくは免疫調節剤、又は米国薬局方(U.S. Pharmacopeia)及び/もしくは医師の卓上参考書(Physician's Desk Reference)に記載されている任意の他の薬剤が挙げられる。併用療法で有用な薬剤の例としては、以下のもの:非ステロ

50

イド性抗炎症薬(NSAID)、例えば、アスピリン、イブプロフェン、並びに他のプロピオン酸誘導体(アルミノプロフェン、ベノキサプロフェン、ブクロキシ酸、カルプロフェン、フェンブフェン、フェノプロフェン、フルプロフェン、フルルビプロフェン、インドプロフェン、ケトプロフェン、ミロプロフェン、ナプロキセン、オキサプロジン、ピルプロフェン、プラノプロフェン、スプロフェン、チアプロフェン酸、及びチオキサプロフェン)、酢酸誘導体(インドメタシン、アセメタシン、アルクロフェナク、クリダナク、ジクロフェナク、フェンクロフェナク、フェンクロジン酸、フェンチアザク、フィロフェナク(furofenac)、イブフェナク、イソキセパク、オキシピナク、スリンダク、チオピナク、トルメチン、ジドメタシン、及びゾメピラク)、フェナム酸誘導体(フルフェナム酸、メクロフェナム酸、メフェナム酸、ニフルム酸、及びトルフェナム酸)、ビフェニルカルボン酸誘導体(ジフルニサル及びフルフェニサル)、オキシカム(イソオキシカム、ピロキシカム、スドキシカム、及びテノキシカン(tenoxicam))、サリチレート(アセチルサリチル酸、スルファサラジン)、並びにピラゾロン(アパゾン、ベズピペリロン(bezpiperylon)、フェプラゾン、モフェブタゾン、オキシフェンブタゾン、フェニルブタゾン)が挙げられるが、これらに限定されない。他の組合せとしては、シクロオキシゲナーゼ-2(COX-2)阻害剤が挙げられる。組合せ用の他の薬剤としては、プレドニゾロン、プレドニゾン、メチルプレドニゾロン、ベタメタゾン、デキサメタゾン、又はヒドロコルチゾンなどのステロイドが挙げられる。そのような組合せは、特に好都合であり得るが、それは、本抗体と組み合わせて患者を治療するときに必要とされるステロイド用量を漸減することにより、ステロイドの1以上の副作用を軽減し又は消失させることすらできるからである。組合せ用の薬剤のさらなる例としては、サイトカイン抑制性抗炎症薬(CSAID);他のヒトサイトカインもしくは成長因子、例えば、TNF、LT、IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-15、IL-16、IL-18、EMAP-II、GM-CSF、FGF、もしくはPDGFに対する抗体、又はこれらのアンタゴニストが挙げられる。薬剤の組合せとしては、キメラ、ヒト化、又はヒトTNF抗体、REMICADE、抗TNF抗体断片(例えば、CDP870)、及び可溶性p55又はp75 TNF受容体、これらの誘導体、p75TNFR1gG(ENBREL(登録商標))又はp55TNFR1gG(LENERCEPT(登録商標))、可溶性IL-13受容体(sIL-13)、さらには、TNF α 変換酵素(TACE)阻害剤のようなTNFアンタゴニストを挙げることができ;同様に、IL-1阻害剤(例えば、インターロイキン-1-変換酵素阻害剤)も有効であり得る。他の組合せとしては、インターロイキン11、抗P7、及びp-セレクトリン糖タンパク質リガンド(PSGL)が挙げられる。併用療法で有用な薬剤の他の例としては、インターフェロン- β 1a(AVONEX);インターフェロン- β 1b(BETASERON(登録商標));コパキソン;高圧酸素;静脈内免疫グロブリン;クラブリビン(clabribine);並びに他のヒトサイトカインもしくは成長因子に対する抗体又はこれら他のヒトサイトカインもしくは成長因子のアンタゴニスト(例えば、CD40リガンド及びCD80に対する抗体)が挙げられる。

【0153】

本明細書で使用される「担体」には、利用される投薬量及び濃度でそれに曝露されている細胞又は哺乳動物にとって無毒である医薬として許容し得る担体、賦形剤、又は安定化剤が含まれる。多くの場合、生理的に許容し得る担体は、水性pH緩衝溶液である。生理的に許容し得る担体の例としては、緩衝剤、例えば、リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸;アスコルビン酸を含む抗酸化剤;低分子量(例えば、約10アミノ酸残基未満)のポリペプチド;タンパク質、例えば、血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリン;親水性ポリマー、例えば、ポリビニルピロリドン;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、もしくはリジン;単糖、二糖、及びグルコース、マンノース、もしくはデキストリンを含む他の炭水化物;キレート化剤、例えば、EDTA;糖アルコール、例えば、マンニトールもしくはソルビトール;塩形成対イオン、例えば、ナトリウム;並びに/又は非イオン性界面活性剤、例えば、TWEEN(商標)、ポリエチレングリコール(PEG)、及びPLURONICS(商標)が挙げられる。「担体」という用語は、それとともに治療薬が投与される希釈剤、アジュバント(例えば、フロイントのアジュバント(完全もしくは不完全))、賦形剤、又はビヒクルを指すこともできる。医薬担体を含む、そのような担体は、滅菌液、例えば、水及び油であることができ、油には、石油、動物、植物、又は合成起源の

もの、例えば、ピーナッツ油、大豆油、鉱油、ゴマ油などが含まれる。水は、組成物(例えば、医薬組成物)が静脈内に投与されるときに例示的な担体である。食塩水溶液並びに水性デキストロース及びグリセロール溶液を、特に、注射用溶液のための液体担体として利用することもできる。好適な賦形剤(例えば、医薬賦形剤)としては、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、チョーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、脱脂粉乳、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールなどが挙げられる。組成物は、望ましい場合、微量の湿潤剤もしくは乳化剤、又はpH緩衝化剤を含有することもできる。組成物は、液剤、懸濁剤、乳剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、持続放出製剤などの形態を取ることができる。経口組成物は、製剤を含め、標準的な担体、例えば、医薬等級のマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどを含むことができる。好適な医薬担体の例は、レミントンの薬学(Remington's Pharmaceutical Sciences)(1990) Mack Publishing Co., Easton, PAに記載されている。医薬化合物を含む組成物は、予防的又は治療的有効量の抗 β クロトー抗体を、例えば、単離又は精製された形態で、対象(例えば、患者)への適切な投与のための形状を提供するための好適な量の担体と一緒に含有し得る。製剤は、投与様式に適するべきである。

10

【0154】

本明細書で使用される「医薬として許容し得る」という用語は、動物、より具体的にはヒトでの使用について、連邦政府もしくは州政府の規制当局に承認されているか、又は米

20

国薬局方、欧州薬局方、もしくは他の一般に認められた薬局方に記載されていることを意味する。

【0155】

「医薬製剤」という用語は、活性成分(例えば、抗 β クロトー抗体)の生物活性が有効であることを可能にするような形態であり、かつ製剤が投与される対象にとって許容し難いほど毒性がある追加の成分を含まない調製物を指す。そのような製剤は、滅菌性であってもよい。

【0156】

「滅菌」製剤は、無菌であるか又は全ての生きた微生物及びその孢子を含まない。

【0157】

本明細書で使用される「ポリクローナル抗体」は、多くのエピトープを有するタンパク質に対する免疫原性応答において生成され、そのため、タンパク質内の同じエピトープ及び異なるエピトープに対する様々な異なる抗体を含む、抗体集団を指す。ポリクローナル抗体の産生方法は当技術分野で公知である(例えば、第11章:分子生物学のショートプロトコル(Short Protocols in Molecular Biology)(2002)、第5版、Ausubelら編、John Wiley and Sons, New Yorkを参照されたい)。

30

【0158】

「単離された核酸」は、他のゲノムDNA配列、並びにネイティブ配列に自然に付随するタンパク質又は複合体、例えば、リボソーム及びポリメラーゼから実質的に分離されている核酸、例えば、RNA、DNA、又は混合ポリマーである。「単離された」核酸分子は、核酸分子の天然の源に存在する他の核酸分子から分離されている核酸分子である。さらに、「単離された」核酸分子、例えば、cDNA分子は、他の細胞物質、又は組換え技法によって産生される場合は、培養培地を実質的に含まないものであるか、又は化学合成される場合は、化学前駆物質もしくは他の化学物質を実質的に含まないものであることができる。具体的な実施態様において、本明細書に記載される抗体をコードする1以上の核酸分子は単離又は精製されている。この用語は、その天然の環境から除去された核酸配列を含み、組換えDNA単離体又はクローニングされたDNA単離体及び化学合成された類似体又は異種システムによって生合成された類似体を含む。実質的に純粋な分子には、該分子の単離された形態が含まれ得る。

40

【0159】

50

本明細書で互換的に使用される「ポリヌクレオチド」又は「核酸」は、任意の長さのヌクレオチドのポリマーを指し、これには、DNA及びRNAが含まれる。ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾ヌクレオチドもしくは塩基、及び/又はこれらの類似体、或いはDNAもしくはRNAポリメラーゼによるか又は合成反応によってポリマーに組み込むことができる任意の基質であることができる。ポリヌクレオチドは、修飾ヌクレオチド、例えば、メチル化ヌクレオチド及びその類似体を含み得る。本明細書で使用される「オリゴヌクレオチド」は一般に、短い、通常は一本鎖の、通常は合成されたポリヌクレオチドを指し、これは、通常、長さが約200ヌクレオチド未満であるが、必ずしもそうとは限らない。「オリゴヌクレオチド」及び「ポリヌクレオチド」という用語は、互いに排他的ではない。ポリヌクレオチドに関する上記の説明は、オリゴヌクレオチドにも同等かつ完全に適用可能である。本開示の抗βクロトー抗体を産生する細胞には、親ハイブリドーマ細胞、並びに該抗体をコードする核酸が導入されている細菌及び真核生物宿主細胞が含まれ得る。好適な宿主細胞は、以下に開示されている。

10

【0160】

別途指定されない限り、本明細書に開示される任意の一本鎖ポリヌクレオチド配列の左側の末端は5'末端であり；二本鎖ポリヌクレオチド配列の左側の方向は5'方向と呼ばれる。新生RNA転写物の5'から3'への付加の方向は転写方向と呼ばれ；RNA転写物の5'末端に対して5'側にあるRNA転写物と同じ配列を有するDNA鎖上の配列領域は「上流配列」と呼ばれ；RNA転写物の3'末端に対して3'側にあるRNA転写物と同じ配列を有するDNA鎖上の配列領域は「下流配列」と呼ばれる。

20

【0161】

「パッケージインサート」という用語は、治療製品のコマーシャルパッケージに通例含まれ、そのような治療製品の使用に関する適応症、用法、投薬量、投与、禁忌、及び/又は警告についての情報を含む説明書を指すために使用される。

【0162】

「予防する(prevent)」、「予防する(preventing)」、及び「予防(prevention)」という用語は、本明細書に提供される療法又は療法の組合せ(例えば、予防剤又は治療剤、例えば、本明細書に提供される抗体の組合せ)の投与によってもたらされる、βクロトー媒介疾患及び/又はそれに関連する症状の発症、再発、発生、又は拡大の完全な又は部分的な阻害を指す。

30

【0163】

「予防剤」という用語は、対象におけるβクロトー媒介疾患及び/又はそれに関連する症状の発症、再発、発生、又は拡大を完全に又は部分的に阻害することができる任意の薬剤を指す。ある実施態様において、「予防剤」という用語は、本明細書に記載される抗βクロトー抗体を指す。ある他の実施態様において、「予防剤」という用語は、本明細書に記載される抗βクロトー抗体以外の薬剤を指す。ある実施態様において、予防剤は、βクロトー媒介疾患、障害、もしくは疾病、及び/又はそれに関連する症状を予防し、或いはβクロトー媒介疾患、障害、もしくは疾病、及び/又はそれに関連する症状の発生、発症、進行、及び/又は重症度を妨害するために有用であることが知られているか、又はそのために使用されてきたか、又はそのために現在使用されている薬剤である。具体的な実施態様において、予防剤は、ヒト化抗βクロトー抗体、例えば、ヒト化抗βクロトーモノクローナル抗体である。

40

【0164】

ある実施態様において、「予防的に有効な血清力価」は、対象におけるβクロトー媒介疾患、障害、もしくは疾病、及び/又はそれに関連する症状の発症、再発、発生、又は拡大を完全に又は部分的に阻害する、対象、好ましくは、ヒトにおける血清力価である。

【0165】

ある実施態様において、「治療的に有効な血清力価」は、対象におけるβクロトー媒介疾患、障害、又は疾病と関連する重症度、持続期間、及び/又は症状を低下させる、対象、好ましくは、ヒトにおける血清力価である。

50

【0166】

「組換え抗体」という用語は、組換え手段によって調製、発現、作出、又は単離される抗体を指す。組換え抗体は、宿主細胞内にトランスフェクトされた組換え発現ベクターを用いて発現される抗体、組換えコンビナトリアル抗体ライブラリーから単離される抗体、ヒト免疫グロブリン遺伝子についてトランスジェニック及び/もしくはトランスクロモソーマルである動物(例えば、マウスもしくはウシ)から単離される抗体(例えば、Taylor, L. D.らの文献(1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295を参照されたい)、又は免疫グロブリン遺伝子配列の他のDNA配列へのスプライシングを伴う任意の他の手段によって調製、発現、作出、もしくは単離される抗体であることができる。そのような組換え抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来するものを含む、可変及び定常領域を有することができる(Kabat, E. A.らの文献(1991)、免疫学的に興味深いタンパク質の配列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)、第5版、U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242を参照されたい)。ある実施態様において、しかしながら、そのような組換え抗体は、インビトロ突然変異誘発(又はヒトIg配列についてトランスジェニックな動物を使用する場合は、インビボ体細胞突然変異誘発)を受けることがあり、そのため、該組換え抗体のVH及びVL領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖系列VH及びVL配列に由来し、かつこれに関連するが、インビボのヒト抗体生殖系列レパートリーに天然には存在しない可能性がある配列である。

10

【0167】

「血清力価」という用語は、複数の試料(例えば、現在のある時点もしくは複数の時点のもの)からの1人の対象における、又は少なくとも10人、例えば、少なくとも20人、もしくは少なくとも40人の対象、最大約100人、1000人、もしくはそれを上回る人数の集団における平均血清力価を指す。

20

【0168】

「副作用」という用語は、療法(例えば、予防剤又は治療剤)の望ましくない及び/又は有害な作用を包含する。望ましくない作用が必ずしも有害であるとは限らない。療法(例えば、予防剤又は治療剤)による有害な作用は、有害又は不快又は危険であり得る。副作用の例としては、下痢、咳、胃腸炎、喘鳴、吐き気、嘔吐、食欲不振、腹部痙攣、発熱、疼痛、体重の減少、脱水症、脱毛症、呼吸困難、不眠症、目眩、粘膜炎、神経筋効果、疲労、口内乾燥症、及び食欲不振、投与部位での発疹又は腫脹、インフルエンザ様症状、例えば、発熱、悪寒、及び疲労、消化管異常、並びにアレルギー反応が挙げられる。患者が経験するさらなる望ましくない作用は数多くあり、当技術分野で公知である。多くは、医師の卓上参考書(Physician's Desk Reference)(第68版、2014)に記載されている。

30

【0169】

「対象」及び「患者」という用語は、互換的に使用することができる。本明細書で使用されるように、ある実施態様において、対象は、哺乳動物、例えば、非霊長類(例えば、ウシ、ブタ、ウマ、ネコ、イヌ、ラットなど)又は霊長類(例えば、サル及びヒト)である。具体的な実施態様において、対象は、ヒトである。一実施態様において、対象は、βクロトー媒介疾患、障害、又は疾病を有する哺乳動物(例えば、ヒト)である。別の実施態様において、対象は、βクロトー媒介疾患、障害、又は疾病を発症するリスクがある哺乳動物(例えば、ヒト)である。

40

【0170】

「実質的に全て」は、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は約100%を指す。

【0171】

「治療剤」という用語は、βクロトー媒介疾患、障害、もしくは疾病の1以上の症状、及び/又はこれらに関連する症状の治療、予防、又は緩和においてを含め、疾患、障害、又は疾病を治療、予防、又は緩和する際に使用することができる任意の薬剤を指す。ある実施態様において、治療剤は、本明細書に記載される抗βクロトー抗体を指す。ある他の

50

実施態様において、治療剤は、本明細書に提供される抗体以外の薬剤を指す。ある実施態様において、治療剤は、 β クロトー媒介疾患、障害、もしくは疾病の1以上の症状、又はこれらに関連する症状の治療、予防、又は緩和に有用であることが知られているか、又はそのために使用されてきたか、又はそのために現在使用されている薬剤である。

【0172】

療法の組合せ(例えば、治療剤を含む、薬剤の使用)は、任意の2以上の単剤療法の相乗作用よりも効果的(例えば、相乗的)であり得る。相乗作用は予想不可能であり、予測することができない。例えば、治療剤の組合せの相乗作用は、 β クロトー媒介疾患を有する対象に対して、該薬剤のうちの1つもしくは複数のより少ない投薬量を使用し、及び/又は該薬剤をより低い頻度で投与することを可能にする。より少ない投薬量の治療的療法を利用し、及び/又はより低い頻度で該療法を投与する能力は、 β クロトー媒介疾患の1以上の症状の予防、治療、又は緩和における該療法の効力を低下させることなく、対象への療法の投与と関連する毒性を低下させる。さらに、相乗作用は、 β クロトー媒介疾患の1以上の症状の予防、治療、又は緩和における療法の効力の改善をもたらすことができる。最後に、療法(例えば、治療剤)の組合せの相乗作用は、任意の単剤療法の使用と関連する有害な又は望ましくない副作用を回避又は軽減することができる。

10

【0173】

「療法」という用語は、 β クロトー媒介疾患、障害、又は疾病の予防、管理、治療、及び/又は改善において使用することができる任意のプロトコル、方法、及び/又は薬剤を指す。ある実施態様において、「療法(therapies)」及び「療法(therapy)」という用語は、生物療法、支持療法、並びに/又は当業者、例えば、医療関係者に公知の、 β クロトー媒介疾患、障害、もしくは疾病の予防、管理、治療、及び/もしくは改善において有用な他の療法を指す。

20

【0174】

「検出可能なプローブ」という用語は、検出可能なシグナルを提供する組成物を指す。この用語は、限定するものではないが、その活性を介して検出可能なシグナルを提供する任意の蛍光団、発色団、放射性標識、酵素、抗体、又は抗体断片などを含む。

【0175】

「診断剤」という用語は、疾患、障害、又は疾病の診断を助ける、対象に投与される物質を指す。そのような物質を用いて、疾患誘発過程の局在を明らかにし、それを正確に示し、及び/又はそれを規定することができる。ある実施態様において、診断剤は、対象に投与するか又は対象由来の試料に接触させたときに β クロトー媒介疾患の診断を助ける、本明細書に記載される抗 β クロトー抗体にコンジュゲートされている物質を含む。

30

【0176】

「検出可能な薬剤」という用語は、試料又は対象中の所望の分子、例えば、本明細書に記載される抗 β クロトー抗体の存在(existence)又は存在(presence)を確認するために使用することができる物質を指す。検出可能な薬剤は、可視化されることができる物質又は別の方法で(例えば、定量によって)決定及び/もしくは測定される物質であることができる。

【0177】

「コードする」という用語又はその文法的同等語は、それが核酸分子に関して使用されるとき、そのネイティブな状態の、又は当業者に周知の方法によって操作される場合、後にポリペプチド及び/又はその断片に翻訳されるmRNAを産生するように転写されることができる、核酸分子を指す。アンチセンス鎖は、そのような核酸分子の相補体であり、コード配列は、それから推定することができる。

40

【0178】

「賦形剤」という用語は、希釈剤、ビヒクル、防腐剤、結合剤、又は安定化剤として一般に使用される不活性物質を指し、タンパク質(例えば、血清アルブミンなど)、アミノ酸(例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸、リジン、アルギニン、グリシン、ヒスチジンなど)、脂肪酸及びリン脂質(例えば、アルキルスルホネート、カプリレートなど)、界面

50

活性剤(例えば、SDS、ポリソルベート、非イオン性界面活性剤など)、糖類(例えば、スクロース、マルトース、トレハロースなど)、並びにポリオール(例えば、マンニトール、ソルビトールなど)を含むが、これらに限定されない。その全体が引用により本明細書中に組み込まれるレミントンの薬学(Remington's Pharmaceutical Sciences)(1990) Mack Publishing Co., Easton, PAも参照されたい。

【0179】

ペプチド又はポリペプチドとの関連において、本明細書で使用される「断片」という用語は、全長に満たないアミノ酸配列を含むペプチド又はポリペプチドを指す。そのような断片は、例えば、アミノ末端での切断、カルボキシ末端での切断、及び/又はアミノ酸配列からの残基の内部欠失によって生じ得る。断片は、例えば、選択的RNAスプライシングによるか又はインビボのプロテアーゼ活性によって生じ得る。ある実施態様において、βクロトー断片は、βクロトーポリペプチド又はβクロトーポリペプチドに結合する抗体のアミノ酸配列の少なくとも5個の連続するアミノ酸残基、少なくとも10個の連続するアミノ酸残基、少なくとも15個の連続するアミノ酸残基、少なくとも20個の連続するアミノ酸残基、少なくとも25個の連続するアミノ酸残基、少なくとも40個の連続するアミノ酸残基、少なくとも50個の連続するアミノ酸残基、少なくとも60個の連続するアミノ酸残基、少なくとも70個の連続するアミノ酸残基、少なくとも80個の連続するアミノ酸残基、少なくとも90個の連続するアミノ酸残基、少なくとも連続100個のアミノ酸残基、少なくとも125個の連続するアミノ酸残基、少なくとも150個の連続するアミノ酸残基、少なくとも175個の連続するアミノ酸残基、少なくとも200個の連続するアミノ酸残基、少なくとも250個、少なくとも300個、少なくとも350個、少なくとも400個、少なくとも450個、少なくとも500個、少なくとも550個、少なくとも600個、少なくとも650個、少なくとも700個、少なくとも750個、少なくとも800個、少なくとも850個、少なくとも900個、又は少なくとも950個の連続するアミノ酸残基のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。具体的な実施態様において、βクロトーポリペプチド又はβクロトー抗原に結合する抗体の断片は、該ポリペプチド又は抗体の少なくとも1つ、少なくとも2つ、もしくは少なくとも3つ、又はそれより多くの機能を保持する。

【0180】

「管理する(manage)」、「管理する(managing)」、及び「管理(management)」という用語は、対象が療法(例えば、予防剤又は治療剤)から得る有益な効果を指し、該療法は、疾患の治癒をもたらすものではない。ある実施態様において、疾患の進行又は悪化を予防するために、対象に、1以上の療法(例えば、予防剤又は治療剤、例えば、本明細書に提供される抗体)を投与して、βクロトー媒介疾患、その1以上の症状を「管理する」。

【0181】

「約(about)」又は「約(approximately)」という用語は、所与の値又は範囲の20%以内、15%以内、10%以内、9%以内、8%以内、7%以内、6%以内、5%以内、4%以内、3%以内、2%以内、もしくは1%以内、又はそれ未満を意味する。

【0182】

「投与する」又は「投与」は、体外に存在するがままの物質(例えば、本明細書に記載される抗βクロトー抗体)を、患者に、例えば、粘膜、皮内、静脈内、筋肉内送達、及び/又は本明細書に記載されるもしくは当技術分野で公知の任意の他の物理的送達方法によって注射するか又は別の方法で物理的に送達する行為を指す。疾患、障害、もしくは疾病、又はその症状が治療されているとき、該物質の投与は、通常、該疾患、障害、もしくは疾病、又はその症状の発症の後に行われる。疾患、障害、もしくは疾病、又はその症状が予防されているとき、該物質の投与は、通常、該疾患、障害、もしくは疾病、又はその症状の発症の前に行われる。

【0183】

ポリペプチドとの関連において、本明細書で使用される「類似体」という用語は、βクロトーポリペプチド、βクロトーポリペプチドの断片、もしくは抗βクロトー抗体と同様のもしくは同一の機能を保有するが、βクロトーポリペプチド、βクロトーポリペプチド

の断片、もしくは抗 β クロトー抗体の同様のもしくは同一のアミノ酸配列を必ずしも含むものではなく、 β クロトーポリペプチド、 β クロトーポリペプチドの断片、もしくは抗 β クロトー抗体の同様のもしくは同一の構造を保有するものでもないポリペプチドを指す。同様のアミノ酸配列を有するポリペプチドは、以下のうちの少なくとも1つを満たすポリペプチドを指す:(a)本明細書に記載される β クロトーポリペプチド(例えば、配列番号297)、 β クロトーポリペプチドの断片、又は抗 β クロトー抗体のアミノ酸配列と少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチド;(b)少なくとも5アミノ酸残基、少なくとも10アミノ酸残基、少なくとも15アミノ酸残基、少なくとも20アミノ酸残基、少なくとも25アミノ酸残基、少なくとも40アミノ酸残基、少なくとも50アミノ酸残基、少なくとも60アミノ酸残基、少なくとも70アミノ酸残基、少なくとも80アミノ酸残基、少なくとも90アミノ酸残基、少なくとも100アミノ酸残基、少なくとも125アミノ酸残基、又は少なくとも150アミノ酸残基の本明細書に記載される β クロトーポリペプチド、 β クロトーポリペプチドの断片、又は抗 β クロトー抗体(又はそのVHもしくはVL領域)をコードするヌクレオチド配列にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチド(例えば、Sambrookらの文献(2001)、分子クローニング:実験マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Maniatisらの文献(1982)、分子クローニング:実験マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)、Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NYを参照されたい);及び(c)本明細書に記載される β クロトーポリペプチド、 β クロトーポリペプチドの断片、又は抗 β クロトー抗体(又はそのVHもしくはVL領域)をコードするヌクレオチド配列と少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも99%同一であるヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチド。本明細書に記載される β クロトーポリペプチド、 β クロトーポリペプチドの断片、又は抗 β クロトー抗体と同様の構造を有するポリペプチドは、本明細書に記載される β クロトーポリペプチド、 β クロトーの断片、又は β クロトー抗体の同様の2次、3次、又は4次構造を有するポリペプチドを指す。ポリペプチドの構造は、限定されないが、X線結晶学、核磁気共鳴、及び結晶学的電子顕微鏡法を含む、当業者に公知の方法によって決定することができる。

【0184】

「組成物」という用語は、任意に、指定された量の、指定された成分(例えば、本明細書に提供される抗体)を含有する製品、及び任意に、指定された量の、指定された成分の組合せから、直接的又は間接的に得られる任意の製品を包含することが意図される。

【0185】

ポリペプチドとの関連において、本明細書で使用される「誘導体」という用語は、アミノ酸残基の置換、欠失、又は付加の導入によって改変されている、 β クロトーポリペプチド、 β クロトーポリペプチドの断片、又は β クロトーポリペプチドに結合する抗体のアミノ酸配列を含むポリペプチドを指す。本明細書で使用される「誘導体」という用語はまた、例えば、任意の種類の子のポリペプチドへの共有結合によって化学的に修飾されている、 β クロトーポリペプチド、 β クロトーポリペプチドの断片、又は β クロトーポリペプチドに結合する抗体を指す。例えば、限定するものではないが、 β クロトーポリペプチド、 β クロトーポリペプチドの断片、又は β クロトー抗体は、例えば、グリコシル化、アセチル化、ペグ化、リン酸化、アミド化、既知の保護基/遮断基による誘導体化、タンパク質分解的切断、細胞リガンド又は他のタンパク質への結合などによって化学的に修飾されていてもよい。誘導体は、結合している分子の種類又は位置のどちらかが天然に存在するペプチドもしくはポリペプチド又は出発ペプチドもしくはポリペプチドと異なるように修

飾される。誘導体は、ペプチド又はポリペプチド上に天然に存在する1以上の化学基の欠失をさらに含む。βクロトーポリペプチド、βクロトーポリペプチドの断片、又はβクロトー抗体の誘導体は、限定されないが、特異的な化学的切断、アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシンの代謝合成などを含む、当業者に公知の技法を用いる化学修飾によって化学的に修飾されていてもよい。さらに、βクロトーポリペプチド、βクロトーポリペプチドの断片、又はβクロトー抗体の誘導体は、1以上の非典型的アミノ酸を含有していてもよい。ポリペプチド誘導体は、本明細書に記載されるβクロトーポリペプチド、βクロトーポリペプチドの断片、又はβクロトー抗体と同様の又は同一の機能を保有する。

【0186】

(組成物及びその製造方法)

結合タンパク質、例えば、βクロトー(例えば、ヒト及び/又はカニクイザルβクロトー)に結合する抗体が提供される。本開示の抗体は、例えば、βクロトーの発現と関連する疾患、障害、又は疾病の診断又は治療に有用である。ある実施態様において、本開示の抗体は、疾患、障害、又は疾病、例えば、2型糖尿病、肥満、脂質異常症、NASH、心血管疾患、メタボリックシンドローム、又はFGF19及び/もしくはFGF21のインビボ作用を模倣もしくは増強することが望ましい広く任意の疾患、障害、もしくは疾病の診断又は治療に有用である。

【0187】

本明細書に提供されるのは、βクロトーポリペプチド、βクロトーポリペプチド断片、βクロトーペプチド、又はβクロトーエピトープに結合する抗体である。いくつかの実施態様において、抗βクロトー抗体は、βクロトーの細胞外ドメイン(ECD)に結合する。また提供されるのは、本明細書に提供される抗βクロトー抗体がβクロトーポリペプチドに結合するのを競合的に阻止する抗体である。本明細書に提供される抗βクロトー抗体は、診断剤、検出可能な薬剤、又は治療剤にコンジュゲートするか又は組換え融合させることもできる。さらに提供されるのは、βクロトー抗体を含む組成物である。

【0188】

また本明細書に提供されるのは、βクロトーポリペプチド、βクロトーポリペプチド断片、βクロトーペプチド、又はβクロトーエピトープに結合する抗βクロトー抗体の免疫グロブリン重鎖、軽鎖、VH領域、VL領域、VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2、及び/又はVL CDR3をコードする単離された核酸分子である。さらに提供されるのは、βクロトーポリペプチド、βクロトーポリペプチド断片、βクロトーペプチド、又はβクロトーエピトープに結合する抗βクロトー抗体をコードする核酸分子を含むベクター及び宿主細胞である。また提供されるのは、βクロトーポリペプチド、βクロトーポリペプチド断片、βクロトーペプチド、又はβクロトーエピトープに結合する抗体を作製する方法である。

【0189】

抗βクロトー抗体を使用する方法が提供される。該方法は、対象の疾患、障害、又は疾病の1以上の症状を治療、予防、又は緩和することを含め、疾患、障害、又は疾病を治療、予防、又は緩和することを含む。疾患、障害、又は疾病の非限定的な例としては、真性糖尿病(I型及び2型)、妊娠糖尿病、高血糖症、インスリン抵抗性、グルコース代謝の異常、「前糖尿病」(空腹時グルコース障害(IFG)もしくは耐糖能異常(IGT))を含む、グルコース利用障害及びそれと関連する後遺症、又は例えば、組織病理学的変化、例えば、膵β細胞破壊を含む、高血糖状態と関連する他の生理学的障害もしくは高血糖状態に起因する他の生理学的障害が挙げられる。例えば、治療を必要としている、疾患、障害、又は疾病を有する対象は、約100mg/dlを超える空腹時血漿グルコース(FPG)レベルを有し得る。他の高血糖関連障害としては、腎障害(例えば、尿細管障害又は腎症)、肝臓変性、眼の損傷(例えば、糖尿病性網膜症又は白内障)、及び糖尿病性足障害が挙げられる。疾患、障害、又は疾病のその他のものとしては、脂質異常症及びその後遺症、例えば、アテローム性動脈硬化症、冠動脈疾患、脳血管障害、及び同様の疾患など、又はメタボリックシンドロームと関連し得る疾患、障害、又は疾病のその他のもの、例えば、肥満及び体質量の上昇(

10

20

30

40

50

その合併疾患、例えば、限定されないが、非アルコール性脂肪肝疾患(NAFLD)、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)、及び多嚢胞性卵巣症候群(PCOS)を含む)、又は血栓症、凝固能亢進状態及び血栓準備状態(動脈及び静脈)、高血圧、心血管疾患、卒中、並びに心不全が挙げられる。これらの疾患、障害、又は疾病としては、アテローム性動脈硬化症、慢性炎症性腸疾患(例えば、クローン病及び潰瘍性大腸炎)、喘息、エリテマトーデス、関節炎、又は他の炎症性リウマチ障害が挙げられる。他の疾患、障害、又は疾病としては、脂肪細胞腫瘍、例えば、脂肪肉腫を含む、脂肪腫性癌、固形腫瘍、及び新生物が挙げられる。他の疾患、障害、又は疾病としては、神経変性疾患並びに/又は中枢及び末梢神経系の脱髄障害並びに/又は神経炎症過程を伴う神経学的疾患並びに/又はアルツハイマー病、多発性硬化症、パーキンソン病、進行性多巣性白質脳症、及びギラン・バレー症候群を含む他の末梢性神経障害が挙げられる。他の疾患、障害、又は疾病としては、皮膚及び皮膚科的障害並びに/又は紅斑性扁平上皮皮膚疾患を含む創傷治癒過程の障害が挙げられる。他の疾患、障害、又は疾病としては、シンドロームX、変形性関節症、及び急性呼吸窮迫症候群が挙げられる。本明細書で使用されるように、「高血糖症性」又は「高血糖症」という用語は、対象の疾患、障害、又は疾病との関連において使用されるとき、対象の血液中に存在する一過性又は慢性の異常に高いグルコースレベルを指す。該疾患、障害、又は疾病は、グルコースの代謝又は吸収の遅延によって引き起こされることがあり、その結果、対象は、正常対象では通常見られない(例えば、糖尿病を発症するリスクのあるグルコース不耐性の前糖尿病対象における、又は糖尿病対象における)グルコース不耐性又はグルコース上昇状態を示す。例えば、正常血糖の空腹時血漿グルコース(FPG)レベルは、約100mg/dl未満であり得、グルコース代謝障害の場合は、約100~126mg/dl、糖尿病の場合は、約126mg/dl超であり得る。(例えば、特定の障害に罹りやすい素因がある対象で)予防する方法は、肥満もしくは望ましくない体質量(例えば、同等の年齢、性別、人種などの適当なマッチ対象と比べて、正常を上回る体格指数、すなわち、「BMI」)の進行を遅延させ、減速させ、もしくは阻害し、その発症を遅延させ、減速させ、もしくは阻害し、又はそれを治療する(例えば、改善する)ことに関する。肥満又は望ましくない体質量(肥満の合併疾患、例えば、閉塞性睡眠時無呼吸、関節炎、癌(例えば、乳房、子宮内膜、及び結腸)、胆石、又は高血糖症を含む)を治療する方法は、結合タンパク質、例えば、本明細書に記載される抗βクロトー抗体を、肥満又は望ましくない体質量を治療するのに有効な量で接触させ又は投与することを含む。例えば、対象は、25を超える、例えば、25~30、30~35、35~40の、又は40を超える体格指数を有し得る。(例えば、特定の障害に罹りやすい素因がある対象で)予防する方法は、その全てが、単独で又は組合せで、例えば、プラーク形成、血管の狭窄又は閉塞、並びに高血圧、卒中、及び冠動脈疾患のリスクの増加を引き起こし得る、望ましくないレベルのもしくは異常に上昇した血清/血漿LDL、VLDL、トリグリセリド、もしくはコレステロールの進行を遅延させ、減速させ、もしくは阻害し、その発症を遅延させ、減速させ、もしくは阻害し、又はそれを治療することに関する。そのような疾患、障害、又は疾病は、例えば、遺伝的素因又は食事起因するものであり得る。

【0190】

(抗βクロトー抗体)

一実施態様において、本開示は、本明細書において治療剤としての使用を見出し得る抗βクロトー抗体を提供する。例示的な抗体としては、ポリクローナル、モノクローナル、ヒト化、ヒト、二重特異性、及びヘテロコンジュゲート抗体、並びに改善された親和性又は他の性質を有するこれらの変異体が挙げられる。

【0191】

いくつかの実施態様において、本明細書に提供されるのは、βクロトーポリペプチド、βクロトーポリペプチド断片、βクロトーペプチド、又はβクロトーエピトープを含む、βクロトーに結合する抗体である。いくつかの実施態様において、抗βクロトー抗体は、βクロトーポリペプチド、βクロトーポリペプチド断片、βクロトーペプチド、又はβクロトーエピトープを含む、βクロトーに結合するヒト化抗体(例えば、ヒト定常領域を含むもの)である。

10

20

30

40

50

【0192】

ある実施態様において、抗 β クロトー抗体は、本明細書に記載されるマウスモノクローナル抗体のいずれか1つのVH領域、VL領域、VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2、及び/又はVL CDR3、例えば、表1～10に示されるアミノ酸配列を含む。したがって、いくつかの実施態様において、本明細書に提供される単離された抗体又はその機能性断片は、表1～10に示されるような:(a)5H23と表記された抗体;(b)1C17と表記された抗体;(c)1D19と表記された抗体;(d)2L12と表記された抗体;(e)3L3と表記された抗体;(f)3N20と表記された抗体;(g)4P5と表記された抗体;(h)5C23と表記された抗体;(i)5F7と表記された抗体;(j)1G19と表記された抗体由来の1つ、2つ、及び/もしくは3つの重鎖CDR並びに/又は1つ、2つ、及び/もしくは3つの軽鎖CDRを含む。

10

【0193】

5H23と表記された抗体は、配列番号25であるVH配列及び配列番号26であるVL配列を含む。

【0194】

1C17と表記された抗体は、配列番号51であるVH配列及び配列番号52であるVL配列を含む。

【0195】

1D19と表記された抗体は、配列番号77であるVH配列及び配列番号78であるVL配列を含む。

【0196】

20

2L12と表記された抗体は、配列番号103であるVH配列及び配列番号104であるVL配列を含む。

【0197】

3L3と表記された抗体は、配列番号129であるVH配列及び配列番号130であるVL配列を含む。

【0198】

3N20と表記された抗体は、配列番号155であるVH配列及び配列番号156であるVL配列を含む。

【0199】

4P5と表記された抗体は、配列番号181であるVH配列及び配列番号182であるVL配列を含む。

30

【0200】

5C23と表記された抗体は、配列番号207であるVH配列及び配列番号208であるVL配列を含む。

【0201】

5F7と表記された抗体は、配列番号233であるVH配列及び配列番号234であるVL配列を含む。

【0202】

1G19と表記された抗体は、配列番号259であるVH配列及び配列番号260であるVL配列を含む。

40

表1: 抗体5H23 CDR配列

【表 2】

		例示的	IMGT	Kabat	Chothia	接触	AbM
VH CDR 配列	VH CDR1	GYTFTSYDIN (配列番号 : 1)	GYTFTSYD (配列番号 : 7)	SYDIN (配列番号 : 12)	GYTFTSY (配列番号 : 13)	TSYDIN (配列番号 : 18)	GYTFTSYDIN (配列番号 : 1)
	VH CDR2	WIYPGDGSTKYNEKFKG (配列番号 : 2)	IYPGDGST (配列番号 : 8)	WIYPGDGSTKYNEKFKG (配列番号 : 2)	PGDG (配列番号 : 14)	WIGWIYPGDGSTK (配列番号 : 19)	WIYPGDGSTK (配列番号 : 24)
	VH CDR3	SDYYGSRSFAY (配列番号 : 3)	ARSDYYGSRSFAY (配列番号 : 9)	SDYYGSRSFAY (配列番号 : 3)	DYYGSRSFAY (配列番号 : 15)	ARSDYYGSRSFAY (配列番号 : 20)	SDYYGSRSFAY (配列番号 : 3)
VL CDR 配列	VL CDR1	RASKSVSTSGYVYMH (配列番号 : 4)	KSVSTSGYVY (配列番号 : 10)	RASKSVSTSGYVYMH (配列番号 : 4)	SKSVSTSGYVY (配列番号 : 16)	STSGYVYMHWN (配列番号 : 21)	RASKSVSTSGYVYMH (配列番号 : 4)
	VL CDR2	LASYLES (配列番号 : 5)	LAS (配列番号 : 11)	LASYLES (配列番号 : 5)	LAS (配列番号 : 11)	LLIYLASYLE (配列番号 : 22)	LASYLES (配列番号 : 5)
	VL CDR3	QHSRDLTFF (配列番号 : 6)	QHSRDLTFF (配列番号 : 6)	QHSRDLTFF (配列番号 : 6)	SRDLTF (配列番号 : 17)	QHSRDLTFF (配列番号 : 23)	QHSRDLTFF (配列番号 : 6)
VH 配列 : QVQLQQSGPELVKPGALVKISCKASGYTFTSYDINWVKQRPQGQGLEWIGWIYPGDGSTKYNEKFKGKATLTADKSSRTAYMQLSSLTSENSAVYFCARSDYYGSRRS FAYWGQGTLVTVSA (配列番号 : 25)							
VL 配列 : DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSGYVYMHWNQQKPGQPPLLILASYLESQVPAFSGSGGTDFTLNHPVEEEDAAIYQCQHSRDLTFFPGGGTKL EIK (配列番号 : 26)							

表2: 抗体1C17 CDR配列

【表 3】

		例示的	IMGT	Kabat	Chothia	接触	AbM
VH CDR 配列	VH CDR1	GYSITSGYYWN (配列番号：27)	GYSITSGYY (配列番号：33)	SGYYWN (配列番号：38)	GYSITSGY (配列番号：39)	TSGYYWN (配列番号：44)	GYSITSGYYWN (配列番号：27)
	VH CDR2	YINYDGNSTNYTPSLKN (配列番号：28)	INYDGNS (配列番号：34)	YINYDGNSTNYTPSLKN (配列番号：28)	YDG (配列番号：40)	WMGYINYDGNSN (配列番号：45)	YINYDGNSN (配列番号：50)
	VH CDR3	KGAYYSNYDSFDV (配列番号：29)	ARKGAYYSNYDSFDV (配列番号：35)	KGAYYSNYDSFDV (配列番号：29)	GAYYSNYDSFD (配列番号：41)	ARKGAYYSNYDSFD (配列番号：46)	KGAYYSNYDSFDV (配列番号：29)
VL CDR 配列	VL CDR1	KASQDINSYLS (配列番号：30)	QDINSY (配列番号：36)	KASQDINSYLS (配列番号：30)	SQDINSY (配列番号：42)	NSYLSWV (配列番号：47)	KASQDINSYLS (配列番号：30)
	VL CDR2	RANRLVD (配列番号：31)	RAN (配列番号：37)	RANRLVD (配列番号：31)	RAN (配列番号：37)	TLIYRANRLV (配列番号：48)	RANRLVD (配列番号：31)
	VL CDR3	LQYDEFPFT (配列番号：32)	LQYDEFPFT (配列番号：32)	LQYDEFPFT (配列番号：32)	YDEFPF (配列番号：43)	LQYDEFPF (配列番号：49)	LQYDEFPFT (配列番号：32)
VH 配列： QVQLQESGPGLVKPSQSLTCSVTGYSITSGYYWNWIRQFPGNKLEWWMGYINYDGNSTNYTPSLKNRISITRDTSKNQFFLKLNSVTPEDTATYYCARKGAYYSNYD SFDVWGTTGTTTVSS (配列番号：51)							
VL 配列： DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLSWWQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGGQDYSLTISSEYEDMGIIYCLQYDEFPTFGSGTKLEIK (配列番号：52)							

【0203】
表3: 抗体1D19 CDR配列

10

20

30

40

50

【表 4】

		例示的	IMGT	Kabat	Chothia	接触	AbM
VH CDR 配列	VH CDR1	GYTFTRYDIN (配列番号：53)	GYTFTRYD (配列番号：59)	RYDIN (配列番号：64)	GYTFTRY (配列番号：65)	TRYDIN (配列番号：70)	GYTFTRYDIN (配列番号：53)
	VH CDR2	WIYPGDSSTKFNENFKD (配列番号：54)	IYPGDSST (配列番号：60)	WIYPGDSSTKFNENFKD (配列番号：54)	PGDS (配列番号：66)	WIGWIYPGDSSTK (配列番号：71)	WIYPGDSSTK (配列番号：76)
	VH CDR3	SDYYGSRSTY (配列番号：55)	ARSDYYGSRSTY (配列番号：61)	SDYYGSRSTY (配列番号：55)	DYYGSRST (配列番号：67)	ARSDYYGSRST (配列番号：72)	SDYYGSRSTY (配列番号：55)
VL CDR 配列	VL CDR1	RASKSVSTSGYSYMH (配列番号：56)	KSVSTSGYSY (配列番号：62)	RASKSVSTSGYSYMH (配列番号：56)	SKSVSTSGYSY (配列番号：68)	STSGYSYMHY (配列番号：73)	RASKSVSTSGYSYMH (配列番号：56)
	VL CDR2	LASNLES (配列番号：57)	LAS (配列番号：63)	LASNLES (配列番号：57)	LAS (配列番号：63)	LLIYLASNLE (配列番号：74)	LASNLES (配列番号：57)
	VL CDR3	QHSRELPTY (配列番号：58)	QHSRELPTY (配列番号：58)	QHSRELPTY (配列番号：58)	SRELPY (配列番号：69)	QHSRELPY (配列番号：75)	QHSRELPTY (配列番号：58)
VH 配列： QVQPQESGPVLKPGALVKISCKASGYTFTRYDINWMKRPQGQGLEWIGWIYPGDSSTKFNENFKDKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSENSTVYFCARSDYYGSR FTYWGGQGLVTVSA (配列番号：77)							
VL 配列： DVLTSQPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSYMHYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYQCQHSRELPTYFGGGTKL EIK (配列番号：78)							

表4: 抗体2L12 CDR配列

【表 5】

	例示的	IMGT	Kabat	Chothia	接触	AbM
VH CDR 配列	VH CDR1	GYTFTRYDIN (配列番号：79)	RYDIN (配列番号：90)	GYTFTRY (配列番号：91)	TRYDIN (配列番号：96)	GYTFTRYDIN (配列番号：79)
	VH CDR2	WIYPGDDSTKYNEKFKG (配列番号：80)	WIYPGDDSTKYNEKFKG (配列番号：80)	PGDD (配列番号：92)	WIGWIYPGDDSTK (配列番号：97)	WIYPGDDSTK (配列番号：102)
	VH CDR3	SDYYGSRSFVY (配列番号：81)	SDYYGSRSFVY (配列番号：81)	DYYGSRSFV (配列番号：93)	ARSDYYGSRSFV (配列番号：98)	SDYYGSRSFVY (配列番号：81)
VL CDR 配列	VL CDR1	RASKSVSTSGYSYLH (配列番号：82)	RASKSVSTSGYSYLH (配列番号：82)	SKSVSTSGYSY (配列番号：94)	STSGYSYLHWY (配列番号：99)	RASKSVSTSGYSYLH (配列番号：82)
	VL CDR2	LASNLES (配列番号：83)	LASNLES (配列番号：83)	LAS (配列番号：89)	LLIYLASNLE (配列番号：100)	LASNLES (配列番号：83)
	VL CDR3	QHSGELPYT (配列番号：84)	QHSGELPYT (配列番号：84)	SGELPY (配列番号：95)	QHSGELPY (配列番号：101)	QHSGELPYT (配列番号：84)
VH 配列：						
QVQLQQSGPELVKPGALVKISKASGYTFTRYDINWVKRPGQGLEWIGWIPGDDSTKYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSENSAVYFCARSDYYGSRSF						
VYWGGQGLVTYSA (配列番号：103)						
VL 配列：						
DIVLTQSPASLPVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSYLHWYQQKPGQPPLLIYASNLESGVPARFSGSGGTFTLNHPVEEEDAATYQCQHSSELPTYFGGGTKL						
EIK (配列番号：104)						

表5: 抗体3L3 CDR配列

10

20

30

40

【表 6】

		例示的	IMGT	Kabat	Chothia	接触	AbM
VH CDR 配列	VH CDR1	GYTFTSYDIN (配列番号：105)	GYTFTSYD (配列番号：111)	SYDIN (配列番号：116)	GYTFTSY (配列番号：117)	TSYDIN (配列番号：122)	GYTFTSYDIN (配列番号：105)
	VH CDR2	WIYPGDSGSPKYDEKFKG (配列番号：106)	IYPGDSGP (配列番号：112)	WIYPGDSGSPKYDEKFKG (配列番号：106)	PGDG (配列番号：118)	WIGWIYPGDSGSPK (配列番号：123)	WIYPGDSGSPK (配列番号：128)
	VH CDR3	SDYYGSRSFVY (配列番号：107)	ARSDYYGSRSFVY (配列番号：113)	SDYYGSRSFVY (配列番号：107)	DYYGSRSFV (配列番号：119)	ARSDYYGSRSFV (配列番号：124)	SDYYGSRSFVY (配列番号：107)
VL CDR 配列	VL CDR1	RASKSVSTSGYSYVH (配列番号：108)	KSVSTSGYSY (配列番号：114)	RASKSVSTSGYSYVH (配列番号：108)	SKSVSTSGYSY (配列番号：120)	STSGYSYVHWY (配列番号：125)	RASKSVSTSGYSYVH (配列番号：108)
	VL CDR2	LASNLES (配列番号：109)	LAS (配列番号：115)	LASNLES (配列番号：109)	LAS (配列番号：115)	LLIYLASNLE (配列番号：126)	LASNLES (配列番号：109)
	VL CDR3	QHSGELPYT (配列番号：110)	QHSGELPYT (配列番号：110)	QHSGELPYT (配列番号：110)	SGELPY (配列番号：121)	QHSGELPY (配列番号：127)	QHSGELPYT (配列番号：110)
VH 配列： QVQPQESGPVLKPGTLVKISCKASGYTFTSYDINWVKQRPQGQGLEWIGWIYPGDSGPKYDEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSENSAVYFCARSDYYGSRRS FVYWGQGTLVTVSA (配列番号：129)							
VL 配列： DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSYVHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGRSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSGELPYTFGGGTKL EIK (配列番号：130)							

表6: 抗体3N20 CDR配列

10

20

30

40

【表 7】

		例示的	IMGT	Kabat	Chothia	接触	AbM
VH CDR 配列	VH CDR1	GYIFTNYGIS (配列番号：131)	GYIFTNYG (配列番号：137)	NYGIS (配列番号：142)	GYIFTNY (配列番号：143)	TNYGIS (配列番号：148)	GYIFTNYGIS (配列番号：131)
	VH CDR2	EIYPRSGNTYYNEKFKG (配列番号：132)	IYPRSGNT (配列番号：138)	EIYPRSGNTYYNEKFKG (配列番号：132)	PRSG (配列番号：144)	WIGEIYPRSGNTY (配列番号：149)	EIYPRSGNTY (配列番号：154)
	VH CDR3	HWDGVLDFDY (配列番号：133)	ARHWDGVLDFDY (配列番号：139)	HWDGVLDFDY (配列番号：133)	WDGVLDFD (配列番号：145)	ARHWDGVLDFD (配列番号：150)	HWDGVLDFDY (配列番号：133)
VL CDR 配列	VL CDR1	KSSQSLNSGNQKNYLA (配列番号：134)	QSLNSGNQKNY (配列番号：140)	KSSQSLNSGNQKNYLA (配列番号：134)	SQSLNSGNQKNY (配列番号：146)	LNSGNQKNYLA (配列番号：151)	KSSQSLNSGNQKNYLA (配列番号：134)
	VL CDR2	GASTRES (配列番号：135)	GAS (配列番号：141)	GASTRES (配列番号：135)	GAS (配列番号：141)	LLIYGASTRE (配列番号：152)	GASTRES (配列番号：135)
	VL CDR3	LNDHSPFT (配列番号：136)	LNDHSPFT (配列番号：136)	LNDHSPFT (配列番号：136)	DHSPF (配列番号：147)	LNDHSPF (配列番号：153)	LNDHSPFT (配列番号：136)
VH 配列： QVQLQESGAELARPGASVKLSCKVSGYIFTNYGISWVKQRTGQGLEWIGEIYPRSGNTYYNEKFKGKATLTADMSSSTAYMDLRLTSEDSAVYFCARHWDGVLDFDYWG QGTSLTVSS (配列番号：155)							
VL 配列： DIVMTQSPSSLSVSAGEKVTMSCKSSQSLNSGNQKNYLA K (配列番号：156)							

表 7: 抗体 4P5 CDR 配列

10

20

30

40

【表 8】

	例示的	IMGT	Kabat	Chothia	接触	AbM
VH CDR 配列	VH CDR1	GYTFTRYDIN (配列番号：157)	RYDIN (配列番号：168)	GYTFTRY (配列番号：169)	TRYDIN (配列番号：174)	GYTFTRYDIN (配列番号：157)
	VH CDR2	WIYPGDDSTKYNEKFKG (配列番号：158)	WIYPGDDSTKYNEKFKG (配列番号：158)	PGDD (配列番号：170)	WIGWIYPGDDSTK (配列番号：175)	WIYPGDDSTK (配列番号：180)
	VH CDR3	SDYYGSRSFVY (配列番号：159)	SDYYGSRSFVY (配列番号：159)	DYYGSRSFV (配列番号：171)	ARSDYYGSRSFV (配列番号：176)	SDYYGSRSFVY (配列番号：159)
VL CDR 配列	VL CDR1	RASKSVSTSGYSYMH (配列番号：160)	RASKSVSTSGYSYMH (配列番号：160)	SKSVSTSGYSY (配列番号：172)	STSGYSYMHY (配列番号：177)	RASKSVSTSGYSYMH (配列番号：160)
	VL CDR2	LASNLES (配列番号：161)	LASNLES (配列番号：161)	LAS (配列番号：167)	LLIYLASNLE (配列番号：178)	LASNLES (配列番号：161)
	VL CDR3	HHSGELPYT (配列番号：162)	HHSGELPYT (配列番号：162)	SGELPY (配列番号：173)	HHSGELPY (配列番号：179)	HHSGELPYT (配列番号：162)
VH 配列：						
QVQLQQSGPELVKPGALVKISCKASGYTFTRYDINWVKRPGQGLEWIGWIYPGDDSTKYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSENSAVYFCARSDYYGSRSF						
VYWGGQGLTVTSA (配列番号：181)						
VL 配列：						
DILLTQSPASVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSYMHYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGRSGTDFTLNHPVEEEDAATYYCHHSGELPYTFGGGTKL						
EIK (配列番号：182)						

表8: 抗体5C23 CDR配列

【表 9】

		例示的	IMGT	Kabat	Chothia	接触	AbM
VH CDR 配列	VH CDR1	GYTFTRYDIN (配列番号：183)	GYTFTRYD (配列番号：189)	RYDIN (配列番号：194)	GYTFTRY (配列番号：195)	TRYDIN (配列番号：200)	GYTFTRYDIN (配列番号：183)
	VH CDR2	WIYPGDGSKYNEKFEG (配列番号：184)	IYPGDGST (配列番号：190)	WIYPGDGSKYNEKFEG (配列番号：184)	PGDG (配列番号：196)	WIGWIYPGDGSK (配列番号：201)	WIYPGDGSK (配列番号：206)
	VH CDR3	SDYYGSRSFVY (配列番号：185)	ARSDYYGSRSFVY (配列番号：191)	SDYYGSRSFVY (配列番号：185)	DYYGSRSFV (配列番号：197)	ARSDYYGSRSFV (配列番号：202)	SDYYGSRSFVY (配列番号：185)
VL CDR 配列	VL CDR1	RASKSVSTSGYSYMH (配列番号：186)	KSVSTSGYSY (配列番号：192)	RASKSVSTSGYSYMH (配列番号：186)	SKSVSTSGYSY (配列番号：198)	STSGYSYMHWY (配列番号：203)	RASKSVSTSGYSYMH (配列番号：186)
	VL CDR2	LASNLES (配列番号：187)	LAS (配列番号：193)	LASNLES (配列番号：187)	LAS (配列番号：193)	LLIYLASNLE (配列番号：204)	LASNLES (配列番号：187)
	VL CDR3	QHSRELPTY (配列番号：188)	QHSRELPTY (配列番号：188)	QHSRELPTY (配列番号：188)	SRELPTY (配列番号：199)	QHSRELPTY (配列番号：205)	QHSRELPTY (配列番号：188)
VH 配列：							
QVQPQESGPELVKPGALVKISKASGYTFTRYDINWVKRPGQGLEWIGWIYPGDGSKYNEKFEGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSENSAVYFCARSDYYGSRSF							
VYWGGQGLTVT/SA (配列番号：207)							
VL 配列：							
DIVLTQSPDSLTVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGGTFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSRELPTYFGGGTKL							
EIK (配列番号：208)							

表9: 抗体5F7 CDR配列

10

20

30

40

【表 1 0】

	例示的	IMGT	Kabat	Chothia	接触	AbM
VH CDR 配列	VH CDR1	GYTFTRYDIN (配列番号：209)	RYDIN (配列番号：220)	GYTFTRY (配列番号：221)	TRYDIN (配列番号：226)	GYTFTRYDIN (配列番号：209)
	VH CDR2	WIYPGDISTKYNEKFKG (配列番号：210)	WIYPGDISTKYNEKFKG (配列番号：210)	PGDI (配列番号：222)	WIGWIYPGDISTK (配列番号：227)	WIYPGDISTK (配列番号：232)
	VH CDR3	SDYYGSRSFVY (配列番号：211)	SDYYGSRSFVY (配列番号：211)	DYYGSRSFV (配列番号：223)	ARSDYYGSRSFV (配列番号：228)	SDYYGSRSFVY (配列番号：211)
VL CDR 配列	VL CDR1	RASKSVSTSGYSYMH (配列番号：212)	RASKSVSTSGYSYMH (配列番号：212)	SKSVSTSGYSY (配列番号：224)	STSGYSYMHWY (配列番号：229)	RASKSVSTSGYSYMH (配列番号：212)
	VL CDR2	LASNLES (配列番号：213)	LASNLES (配列番号：213)	LAS (配列番号：219)	LLIYLASNLE (配列番号：230)	LASNLES (配列番号：213)
	VL CDR3	QHSRELPTY (配列番号：214)	QHSRELPTY (配列番号：214)	SRELPY (配列番号：225)	QHSRELPTY (配列番号：231)	QHSRELPTY (配列番号：214)
VH 配列：						
QVQPQESGPPELVKPGALVKISKASGYTFTRYDINWVKQRPQGQGLEWIGWIYPGDISTKYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLNSLTSENSAVVFCARSDYYGSRSF						
VYWGGQGLTVTSA (配列番号：233)						
VL 配列：						
DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPLLIYASNLESVGPARGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSRELPTYFGGGTKV						
EIK (配列番号：234)						

表10: 抗体1G19 CDR配列

【表 1 1】

	例示的	IMGT	Kabat	Chothia	接触	AbM
VH CDR 配列	VH CDR1	GYSITSGYYWN (配列番号: 235)	SGYYWN (配列番号: 246)	GYSITSGY (配列番号: 247)	TSGYYWN (配列番号: 252)	GYSITSGYYWN (配列番号: 235)
	VH CDR2	YINYGGSNYNPSLKN (配列番号: 236)	YINYGGSNYNPSLKN (配列番号: 236)	YGG (配列番号: 248)	WMGYINYGGSN (配列番号: 253)	YINYGGSN (配列番号: 258)
	VH CDR3	RGAYYSNYDSFDV (配列番号: 237)	RGAYYSNYDSFDV (配列番号: 237)	GAYYSNYDSFD (配列番号: 249)	ARRGAYYSNYDSFD (配列番号: 254)	RGAYYSNYDSFDV (配列番号: 237)
VL CDR 配列	VL CDR1	KASQDINSYLS (配列番号: 238)	KASQDINSYLS (配列番号: 238)	SQDINSY (配列番号: 250)	NSYLSWF (配列番号: 255)	KASQDINSYLS (配列番号: 238)
	VL CDR2	RANRLVD (配列番号: 239)	RANRLVD (配列番号: 239)	RAN (配列番号: 245)	TLIYRANRLV (配列番号: 256)	RANRLVD (配列番号: 239)
	VL CDR3	LQYDEFPTY (配列番号: 240)	LQYDEFPTY (配列番号: 240)	YDEFPY (配列番号: 251)	LQYDEFPY (配列番号: 257)	LQYDEFPTY (配列番号: 240)
VH 配列:						
QVQLQESGPGLVKPSQSLTCSVTGYSITSGYYWNWIRFPGNKLEWMGYINYGGSNYNPSLKNRISITRDTSKNQFFLKLTSTTTEDTATYYCARRGAYYSNYD						
SFDVWGTTGTTTVSS (配列番号: 259)						
VL 配列:						
DIKMTQSPSSMYASLGERTITCKASQDINSYLSWFFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSPRFGSGGQDYSLTISSEYEMGIYCLQYDEFPTYFSGGKLEIK						
(配列番号: 260)						

【0204】

いくつかの実施態様において、本明細書に提供される抗体は、VH領域又はVHドメインを含む。他の実施態様において、本明細書に提供される抗体は、VL領域又はVL鎖を含む。い

10

20

30

40

50

くつかの実施態様において、本明細書に提供される抗体は、(i)VHドメインもしくはVH領域;及び/又は(ii)VLドメインもしくはVL領域の組合せを有する。

【0205】

いくつかの実施態様において、本明細書に提供される抗体は、表1~10で特定される6つのCDR、例えば、VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2、及び/もしくはVL CDR3を含む又は該CDRからなる。いくつかの実施態様において、本明細書に提供される抗体は、6つ未満のCDRを含むことができる。いくつかの実施態様において、該抗体は、表1~10で特定されるVH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2、及び/もしくはVL CDR3からなる群から選択される1つ、2つ、3つ、4つ、もしくは5つのCDRを含む又は該CDRからなる。いくつかの実施態様において、該抗体は、本明細書に記載される:(a)5H23と表記された抗体;(b)1C17と表記された抗体;(c)1D19と表記された抗体;(d)2L12と表記された抗体;(e)3L3と表記された抗体;(f)3N20と表記された抗体;(g)4P5と表記された抗体;(h)5C23と表記された抗体;(i)5F7と表記された抗体;(j)1G19と表記された抗体;からなる群から選択されるマウスモノクローナル抗体のVH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2、及び/もしくはVL CDR3からなる群から選択される1つ、2つ、3つ、4つ、もしくは5つのCDRを含む又は該CDRからなる。したがって、いくつかの実施態様において、該抗体は、表1~10で特定されるVH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2、及び/もしくはVL CDR3のうちのいずれか1つの1つ、2つ、3つ、4つ、もしくは5つのCDRを含む又は該CDRからなる。

【0206】

いくつかの実施態様において、本明細書に提供される抗体は、表1~10に記載される1以上の(例えば、1つ、2つ、又は3つの)VH CDRを含む。他の実施態様において、本明細書に提供される抗体は、表1~10に記載される1以上の(例えば、1つ、2つ、又は3つの)VL CDRを含む。また他の実施態様において、本明細書に提供される抗体は、表1~10に記載される1以上の(例えば、1つ、2つ、又は3つの)VH CDR及び表1~10に記載される1以上のVL CDRを含む。したがって、いくつかの実施態様において、該抗体は、配列番号1、7、12、13、18、27、33、38、39、44、53、59、64、65、70、79、85、90、91、96、105、111、116、117、122、131、137、142、143、148、157、163、168、169、174、183、189、194、195、200、209、215、220、221、226、235、241、246、247、及び252のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を有するVH CDR1を含む。いくつかの実施態様において、該抗体は、配列番号2、8、14、19、24、28、34、40、45、50、54、60、66、71、76、80、86、92、97、102、106、112、118、123、128、132、138、144、149、154、158、164、170、175、180、184、190、196、201、206、210、216、222、227、232、236、242、248、253、及び258のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を有するVH CDR2を含む。いくつかの実施態様において、該抗体は、配列番号3、9、15、20、29、35、41、46、55、61、67、72、81、87、93、98、107、113、119、124、133、139、145、150、159、165、171、176、185、191、197、202、211、217、223、228、237、243、249、及び254のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を有するVH CDR3を含む。いくつかの実施態様において、該抗体は、表1~10に示されるアミノ酸配列のうちのいずれか1つに示されるVH CDR1、VH CDR2、VH CDR3から独立に選択されるVH CDR1及び/又はVH CDR2及び/又はVH CDR3を含む。いくつかの実施態様において、該抗体は、配列番号4、10、16、21、30、36、42、47、56、62、68、73、82、88、94、99、108、114、120、125、134、140、146、151、160、166、172、177、186、192、198、203、212、218、224、229、238、244、250、及び255のいずれか1つのアミノ酸配列を有するVL CDR1を含む。別の実施態様において、該抗体は、配列番号5、11、22、31、37、48、57、63、74、83、89、100、109、115、126、135、141、152、161、167、178、187、193、204、213、219、230、239、245、及び256のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を有するVL CDR2を含む。いくつかの実施態様において、該抗体は、配列番号6、17、23、32、43、49、58、69、75、84、95、101、110、121、127、136、147、153、162、173、179、188、199、205、214、225、231、240、251、及び257のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を有するVL CDR3を含む。いくつかの実施態様において、該抗体は、表1~10に示されるアミノ酸配列のうちのいずれか1つに示されるVL CDR1、VL CDR2、VL CDR3から独立に選択されるVL CDR1及び/又

はVL CDR2及び/又はVL CDR3を含む。

【0207】

いくつかの実施態様において、本明細書に提供される抗体は:(1)(i)配列番号1、27、53、79、105、131、157、183、209、及びもしくは235、(ii)配列番号7、33、59、85、111、137、163、189、215、もしくは241、(iii)配列番号12、38、64、90、116、142、168、194、220、もしくは246、(iv)配列番号13、39、65、91、117、143、169、195、221、もしくは247、並びに(v)配列番号18、44、70、96、122、148、174、200、226、もしくは252:からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_H CDR1;(2):(i)配列番号2、28、54、80、106、132、158、184、210、及びもしくは236、(ii)配列番号8、34、60、86、112、138、164、190、216、もしくは242、(iii)配列番号14、40、66、92、118、144、170、196、222、もしくは248、(iv)配列番号19、45、71、97、123、149、175、201、227、もしくは253、並びに(v)配列番号24、50、76、102、128、154、180、206、232、もしくは258:からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_H CDR2;並びに(3)(i)配列番号 3、29、55、81、107、133、159、185、211、及びもしくは237、(ii)配列番号9、35、61、87、113、139、165、191、217、もしくは243、(iii)配列番号15、41、67、93、119、145、171、197、223、もしくは249、並びに(iv)配列番号20、46、72、98、124、150、176、202、228、もしくは254:からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_H CDR3を含む重鎖可変(VH)領域;並びに/又は:(1)(i)配列番号4、30、56、82、108、134、160、186、212、及びもしくは238、(ii)配列番号10、36、52、88、114、140、166、192、218、もしくは244、(iii)配列番号16、42、68、94、120、146、172、198、224、もしくは250、並びに(iv)配列番号21、47、73、99、125、151、177、203、229、もしくは255:からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_L CDR1;(2)(i)配列番号5、31、57、83、109、135、161、187、213、及びもしくは239、(ii)配列番号11、37、63、89、115、141、167、193、219、もしくは245、並びに(iii)配列番号22、48、74、100、126、152、178、204、230、もしくは256:からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_L CDR2;並びに(3)(i)配列番号6、32、58、84、110、136、162、188、214、及びもしくは240、(ii)配列番号17、43、69、95、121、147、173、199、225、もしくは251、並びに(iii)配列番号23、49、75、101、127、153、179、205、231、もしくは257:からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_L CDR3を含む軽鎖可変(VL)領域を含む。

【0208】

いくつかの実施態様において、本明細書に提供される抗体は:(1)(i)配列番号1、27、53、79、105、131、157、183、209、及び/又は235、(ii)配列番号7、33、59、85、111、137、163、189、215、又は241、(iii)配列番号12、38、64、90、116、142、168、194、220、又は246、(iv)配列番号13、39、65、91、117、143、169、195、221、又は247、並びに(v)配列番号18、44、70、96、122、148、174、200、226、又は252:からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_H CDR1;(2)(i)配列番号2、28、54、80、106、132、158、184、210、及び/又は236、(ii)配列番号8、34、60、86、112、138、164、190、216、又は242、(iii)配列番号14、40、66、92、118、144、170、196、222、又は248、(iv)配列番号19、45、71、97、123、149、175、201、227、又は253、並びに(v)配列番号24、50、76、102、128、154、180、206、232、又は258:からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_H CDR2;並びに(3)(i)配列番号 3、29、55、81、107、133、159、185、211、及び/又は237、(ii)配列番号9、35、61、87、113、139、165、191、217、又は243、(iii)配列番号15、41、67、93、119、145、171、197、223、又は249、並びに(iv)配列番号20、46、72、98、124、150、176、202、228、又は254:からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_H CDR3を含む重鎖可変(VH)領域を含む。

【0209】

いくつかの実施態様において、本明細書に提供される抗体は:(1)(i)配列番号4、30、56、82、108、134、160、186、212、及び/又は238、(ii)配列番号10、36、52、88、114、140、166、192、218、又は244、(iii)配列番号16、42、68、94、120、146、172、198、224、又は250、並びに(iv)配列番号21、47、73、99、125、151、177、203、229、又は255:か

10

20

30

40

50

5、191、197、202、211、217、223、228、237、243、249、及び254)並びにVL CDR3(配列番号6、17、23、32、43、49、58、69、75、84、95、101、110、121、127、136、147、153、162、173、179、188、199、205、214、225、231、240、251、及び257); VH CDR1(配列番号1、7、12、13、18、27、33、38、39、44、53、59、64、65、70、79、85、90、91、96、105、111、116、117、122、131、137、142、143、148、157、163、168、169、174、183、189、194、195、200、209、215、220、221、226、235、241、246、247、及び252)、VH CDR2(配列番号2、8、14、19、24、28、34、40、45、50、54、60、66、71、76、80、86、92、97、102、106、112、118、123、128、132、138、144、149、154、158、164、170、175、180、184、190、196、201、206、210、216、222、227、232、236、242、248、253、及び258)並びにVL CDR1(配列番号4、10、16、21、30、36、42、47、56、62、68、73、82、88、94、99、108、114、120、125、134、140、146、151、160、166、172、177、186、192、198、203、212、218、224、229、238、244、250、及び255); VH CDR1(配列番号1、7、12、13、18、27、33、38、39、44、53、59、64、65、70、79、85、90、91、96、105、111、116、117、122、131、137、142、143、148、157、163、168、169、174、183、189、194、195、200、209、215、220、221、226、235、241、246、247、及び252)、VH CDR2(配列番号2、8、14、19、24、28、34、40、45、50、54、60、66、71、76、80、86、92、97、102、106、112、118、123、128、132、138、144、149、154、158、164、170、175、180、184、190、196、201、206、210、216、222、227、232、236、242、248、253、及び258)並びにVL CDR2(配列番号5、11、22、31、37、48、57、63、74、83、89、100、109、115、126、135、141、152、161、167、178、187、193、204、213、219、230、239、245、及び256); VH CDR1(配列番号1、7、12、13、18、27、33、38、39、44、53、59、64、65、70、79、85、90、91、96、105、111、116、117、122、131、137、142、143、148、157、163、168、169、174、183、189、194、195、200、209、215、220、221、226、235、241、246、247、及び252)、VH CDR2(配列番号2、8、14、19、24、28、34、40、45、50、54、60、66、71、76、80、86、92、97、102、106、112、118、123、128、132、138、144、149、154、158、164、170、175、180、184、190、196、201、206、210、216、222、227、232、236、242、248、253、及び258)並びにVL CDR3(配列番号6、17、23、32、43、49、58、69、75、84、95、101、110、121、127、136、147、153、162、173、179、188、199、205、214、225、231、240、251、及び257); VH CDR2(配列番号2、8、14、19、24、28、34、40、45、50、54、60、66、71、76、80、86、92、97、102、106、112、118、123、128、132、138、144、149、154、158、164、170、175、180、184、190、196、201、206、210、216、222、227、232、236、242、248、253、及び258)、VH CDR3(配列番号3、9、15、20、29、35、41、46、55、61、67、72、81、87、93、98、107、113、119、124、133、139、145、150、159、165、171、176、185、191、197、202、211、217、223、228、237、243、249、及び254)、並びにVL CDR1(配列番号4、10、16、21、30、36、42、47、56、62、68、73、82、88、94、99、108、114、120、125、134、140、146、151、160、166、172、177、186、192、198、203、212、218、224、229、238、244、250、及び255)、VH CDR2(配列番号2、8、14、19、24、28、34、40、45、50、54、60、66、71、76、80、86、92、97、102、106、112、118、123、128、132、138、144、149、154、158、164、170、175、180、184、190、196、201、206、210、216、222、227、232、236、242、248、253、及び258)、VH CDR3(配列番号3、9、15、20、29、35、41、46、55、61、67、72、81、87、93、98、107、113、119、124、133、139、145、150、159、165、171、176、185、191、197、202、211、217、223、228、237、243、249、及び254)、及びVL CDR2(配列番号5、11、22、31、37、48、57、63、74、83、89、100、109、115、126、135、141、152、161、167、178、187、193、204、213、219、230、239、245、及び256); VH CDR2(配列番号2、8、14、19、24、28、34、40、45、50、54、60、66、71、76、80、86、92、97、102、106、112、118、123、128、132、138、144、149、154、158、164、170、175、180、184、190、196、201、206、210、216、222、227、232、236、242、248、253、及び258)、VH CDR3(配列番号3、9、15、20、29、35、41、46、55、61、67、72、81、87、93、98、107、113、119、124、133、139、145、150、159、165、171、176、185、191、197、202、211、217、223、228、237、243、249、及び254) 及び254

)、並びにVL CDR3(配列番号6、17、23、32、43、49、58、69、75、84、95、101、110、121、127、136、147、153、162、173、179、188、199、205、214、225、231、240、251、及び257); VH CDR1(配列番号1、7、12、13、18、27、33、38、39、44、53、59、64、65、70、79、85、90、91、96、105、111、116、117、122、131、137、142、143、148、157、163、168、169、174、183、189、194、195、200、209、215、220、221、226、235、241、246、247、及び252)、VL CDR1(配列番号4、10、16、21、30、36、42、47、56、62、68、73、82、88、94、99、108、114、120、125、134、140、146、151、160、166、172、177、186、192、198、203、212、218、224、229、238、244、250、及び255)並びにVL CDR2(配列番号5、11、22、31、37、48、57、63、74、83、89、100、109、115、126、135、141、152、161、167、178、187、193、204、213、219、230、239、245、及び256); VH CDR1(配列番号1、7、12、13、18、27、33、38、39、44、53、59、64、65、70、79、85、90、91、96、105、111、116、117、122、131、137、142、143、148、157、163、168、169、174、183、189、194、195、200、209、215、220、221、226、235、241、246、247、及び252)、VL CDR1(配列番号4、10、16、21、30、36、42、47、56、62、68、73、82、88、94、99、108、114、120、125、134、140、146、151、160、166、172、177、186、192、198、203、212、218、224、229、238、244、250、及び255)並びにVL CDR3(配列番号6、17、23、32、43、49、58、69、75、84、95、101、110、121、127、136、147、153、162、173、179、188、199、205、214、225、231、240、251、及び257); VH CDR1(配列番号1、7、12、13、18、27、33、38、39、44、53、59、64、65、70、79、85、90、91、96、105、111、116、117、122、131、137、142、143、148、157、163、168、169、174、183、189、194、195、200、209、215、220、221、226、235、241、246、247、及び252)、VL CDR2(配列番号5、11、22、31、37、48、57、63、74、83、89、100、109、115、126、135、141、152、161、167、178、187、193、204、213、219、230、239、245、及び256)、並びにVL CDR3(配列番号6、17、23、32、43、49、58、69、75、84、95、101、110、121、127、136、147、153、162、173、179、188、199、205、214、225、231、240、251、及び257); VH CDR2(配列番号2、8、14、19、24、28、34、40、45、50、54、60、66、71、76、80、86、92、97、102、106、112、118、123、128、132、138、144、149、154、158、164、170、175、180、184、190、196、201、206、210、216、222、227、232、236、242、248、253、及び258)、VL CDR1(配列番号4、10、16、21、30、36、42、47、56、62、68、73、82、88、94、99、108、114、120、125、134、140、146、151、160、166、172、177、186、192、198、203、212、218、224、229、238、244、250、及び255)、並びにVL CDR2(配列番号5、11、22、31、37、48、57、63、74、83、89、100、109、115、126、135、141、152、161、167、178、187、193、204、213、219、230、239、245、及び256); VH CDR2(配列番号2、8、14、19、24、28、34、40、45、50、54、60、66、71、76、80、86、92、97、102、106、112、118、123、128、132、138、144、149、154、158、164、170、175、180、184、190、196、201、206、210、216、222、227、232、236、242、248、253、及び258)、VL CDR1(配列番号4、10、16、21、30、36、42、47、56、62、68、73、82、88、94、99、108、114、120、125、134、140、146、151、160、166、172、177、186、192、198、203、212、218、224、229、238、244、250、及び255)、並びに VL CDR3(配列番号6、17、23、32、43、49、58、69、75、84、95、101、110、121、127、136、147、153、162、173、179、188、199、205、214、225、231、240、251、及び257); VH CDR2(配列番号2、8、14、19、24、28、34、40、45、50、54、60、66、71、76、80、86、92、97、102、106、112、118、123、128、132、138、144、149、154、158、164、170、175、180、184、190、196、201、206、210、216、222、227、232、236、242、248、253、及び258)、VL CDR2(配列番号5、11、22、31、37、48、57、63、74、83、89、100、109、115、126、135、141、152、161、167、178、187、193、204、213、219、230、239、245、及び256)、並びにVL CDR3(配列番号6、17、23、32、43、49、58、69、75、84、95、101、110、121、127、136、147、153、162、173、179、188、199、205、214、225、231、240、251、及び257); VH CDR3(配列番号3、9、15、20、29、35、41、46、55、61、67、72、81、87、93、98、107、113、119、124、133、139、145、150、159、165、171、176、185、191

、197、202、211、217、223、228、237、243、249、及び254)、VL CDR1(配列番号4、10、16、21、30、36、42、47、56、62、68、73、82、88、94、99、108、114、120、125、134、140、146、151、160、166、172、177、186、192、198、203、212、218、224、229、238、244、250、及び255)、並びにVL CDR2(配列番号5、11、22、31、37、48、57、63、74、83、89、100、109、115、126、135、141、152、161、167、178、187、193、204、213、219、230、239、245、及び256); VH CDR3(配列番号3、9、15、20、29、35、41、46、55、61、67、72、81、87、93、98、107、113、119、124、133、139、145、150、159、165、171、176、185、191、197、202、211、217、223、228、237、243、249、及び254)、VL CDR1(配列番号4、10、16、21、30、36、42、47、56、62、68、73、82、88、94、99、108、114、120、125、134、140、146、151、160、166、172、177、186、192、198、203、212、218、224、229、238、244、250、及び255)、並びにVL CDR3(配列番号6、17、23、32、43、49、58、69、75、84、95、101、110、121、127、136、147、153、162、173、179、188、199、205、214、225、231、240、251、及び257); VH CDR3(配列番号3、9、15、20、29、35、41、46、55、61、67、72、81、87、93、98、107、113、119、124、133、139、145、150、159、165、171、176、185、191、197、202、211、217、223、228、237、243、249、及び254)、VL CDR2(配列番号5、11、22、31、37、48、57、63、74、83、89、100、109、115、126、135、141、152、161、167、178、187、193、204、213、219、230、239、245、及び256)、並びにVL CDR3(配列番号6、17、23、32、43、49、58、69、75、84、95、101、110、121、127、136、147、153、162、173、179、188、199、205、214、225、231、240、251、及び257); VH CDR1(配列番号1、7、12、13、18、27、33、38、39、44、53、59、64、65、70、79、85、90、91、96、105、111、116、117、122、131、137、142、143、148、157、163、168、169、174、183、189、194、195、200、209、215、220、221、226、235、241、246、247、及び252)、VH CDR2(配列番号2、8、14、19、24、28、34、40、45、50、54、60、66、71、76、80、86、92、97、102、106、112、118、123、128、132、138、144、149、154、158、164、170、175、180、184、190、196、201、206、210、216、222、227、232、236、242、248、253、及び258)、VH CDR3(配列番号3、9、15、20、29、35、41、46、55、61、67、72、81、87、93、98、107、113、119、124、133、139、145、150、159、165、171、176、185、191、197、202、211、217、223、228、237、243、249、及び254)、並びにVL CDR1(配列番号4、10、16、21、30、36、42、47、56、62、68、73、82、88、94、99、108、114、120、125、134、140、146、151、160、166、172、177、186、192、198、203、212、218、224、229、238、244、250、及び255); VH CDR1(配列番号1、7、12、13、18、27、33、38、39、44、53、59、64、65、70、79、85、90、91、96、105、111、116、117、122、131、137、142、143、148、157、163、168、169、174、183、189、194、195、200、209、215、220、221、226、235、241、246、247、及び252)、VH CDR2(配列番号2、8、14、19、24、28、34、40、45、50、54、60、66、71、76、80、86、92、97、102、106、112、118、123、128、132、138、144、149、154、158、164、170、175、180、184、190、196、201、206、210、216、222、227、232、236、242、248、253、及び258)、VH CDR3(配列番号3、9、15、20、29、35、41、46、55、61、67、72、81、87、93、98、107、113、119、124、133、139、145、150、159、165、171、176、185、191、197、202、211、217、223、228、237、243、249、及び254)、並びにVL CDR2(配列番号5、11、22、31、37、48、57、63、74、83、89、100、109、115、126、135、141、152、161、167、178、187、193、204、213、219、230、239、245、及び256); VH CDR1(配列番号1、7、12、13、18、27、33、38、39、44、53、59、64、65、70、79、85、90、91、96、105、111、116、117、122、131、137、142、143、148、157、163、168、169、174、183、189、194、195、200、209、215、220、221、226、235、241、246、247、及び252)、VH CDR2(配列番号2、8、14、19、24、28、34、40、45、50、54、60、66、71、76、80、86、92、97、102、106、112、118、123、128、132、138、144、149、154、158、164、170、175、180、184、190、196、201、206、210、216、222、227、232、236、242、248、253、及び258)、VH CDR3(配列番号3、9、15、20、29、35、41、46、55、61、67、72、81、87、93、98、107、113、119、124、133、139、145、150、159、165、171、176、185、191、197、202、211、217、223、228、237、243、

249、及び254)、並びにVL CDR3(配列番号6、17、23、32、43、49、58、69、75、84、95、101、110、121、127、136、147、153、162、173、179、188、199、205、214、225、231、240、251、及び257); VH CDR1(配列番号1、7、12、13、18、27、33、38、39、44、53、59、64、65、70、79、85、90、91、96、105、111、116、117、122、131、137、142、143、148、157、163、168、169、174、183、189、194、195、200、209、215、220、221、226、235、241、246、247、及び252)、VH CDR2(配列番号2、8、14、19、24、28、34、40、45、50、54、60、66、71、76、80、86、92、97、102、106、112、118、123、128、132、138、144、149、154、158、164、170、175、180、184、190、196、201、206、210、216、222、227、232、236、242、248、253、及び258)、VL CDR1(配列番号4、10、16、21、30、36、42、47、56、62、68、73、82、88、94、99、108、114、120、125、134、140、146、151、160、166、172、177、186、192、198、203、212、218、224、229、238、244、250、及び255)、並びにVL CDR2(配列番号5、11、22、31、37、48、57、63、74、83、89、100、109、115、126、135、141、152、161、167、178、187、193、204、213、219、230、239、245、及び256); VH CDR1(配列番号1、7、12、13、18、27、33、38、39、44、53、59、64、65、70、79、85、90、91、96、105、111、116、117、122、131、137、142、143、148、157、163、168、169、174、183、189、194、195、200、209、215、220、221、226、235、241、246、247、及び252)、VH CDR2(配列番号2、8、14、19、24、28、34、40、45、50、54、60、66、71、76、80、86、92、97、102、106、112、118、123、128、132、138、144、149、154、158、164、170、175、180、184、190、196、201、206、210、216、222、227、232、236、242、248、253、及び258)、VL CDR1(配列番号4、10、16、21、30、36、42、47、56、62、68、73、82、88、94、99、108、114、120、125、134、140、146、151、160、166、172、177、186、192、198、203、212、218、224、229、238、244、250、及び255)、並びにVL CDR3(配列番号6、17、23、32、43、49、58、69、75、84、95、101、110、121、127、136、147、153、162、173、179、188、199、205、214、225、231、240、251、及び257); VH CDR1(配列番号1、7、12、13、18、27、33、38、39、44、53、59、64、65、70、79、85、90、91、96、105、111、116、117、122、131、137、142、143、148、157、163、168、169、174、183、189、194、195、200、209、215、220、221、226、235、241、246、247、及び252)、VH CDR2(配列番号2、8、14、19、24、28、34、40、45、50、54、60、66、71、76、80、86、92、97、102、106、112、118、123、128、132、138、144、149、154、158、164、170、175、180、184、190、196、201、206、210、216、222、227、232、236、242、248、253、及び258)、VL CDR2(配列番号5、11、22、31、37、48、57、63、74、83、89、100、109、115、126、135、141、152、161、167、178、187、193、204、213、219、230、239、245、及び256)、並びにVL CDR3(配列番号6、17、23、32、43、49、58、69、75、84、95、101、110、121、127、136、147、153、162、173、179、188、199、205、214、225、231、240、251、及び257); VH CDR1(配列番号1、7、12、13、18、27、33、38、39、44、53、59、64、65、70、79、85、90、91、96、105、111、116、117、122、131、137、142、143、148、157、163、168、169、174、183、189、194、195、200、209、215、220、221、226、235、241、246、247、及び252)、VH CDR3(配列番号3、9、15、20、29、35、41、46、55、61、67、72、81、87、93、98、107、113、119、124、133、139、145、150、159、165、171、176、185、191、197、202、211、217、223、228、237、243、249、及び254)、VL CDR1(配列番号4、10、16、21、30、36、42、47、56、62、68、73、82、88、94、99、108、114、120、125、134、140、146、151、160、166、172、177、186、192、198、203、212、218、224、229、238、244、250、及び255)、並びにVL CDR2(配列番号5、11、22、31、37、48、57、63、74、83、89、100、109、115、126、135、141、152、161、167、178、187、193、204、213、219、230、239、245、及び256); VH CDR1(配列番号1、7、12、13、18、27、33、38、39、44、53、59、64、65、70、79、85、90、91、96、105、111、116、117、122、131、137、142、143、148、157、163、168、169、174、183、189、194、195、200、209、215、220、221、226、235、241、246、247、及び252)、VH CDR3(配列番号3、9、15、20、29、35、41、46、55、61、67、72、81、87、93、98、107、113、119、124、133、139、145、150、159、165、171、176、185、191、197、202、211、217、223、228、237、243、249、及び254)

、249、及び254)、VL CDR1(配列番号4、10、16、21、30、36、42、47、56、62、68、73、82、88、94、99、108、114、120、125、134、140、146、151、160、166、172、177、186、192、198、203、212、218、224、229、238、244、250、及び255)、並びにVL CDR3(配列番号6、17、23、32、43、49、58、69、75、84、95、101、110、121、127、136、147、153、162、173、179、188、199、205、214、225、231、240、251、及び257); VH CDR1(配列番号1、7、12、13、18、27、33、38、39、44、53、59、64、65、70、79、85、90、91、96、105、111、116、117、122、131、137、142、143、148、157、163、168、169、174、183、189、194、195、200、209、215、220、221、226、235、241、246、247、及び252)、VH CDR3(配列番号3、9、15、20、29、35、41、46、55、61、67、72、81、87、93、98、107、113、119、124、133、139、145、150、159、165、171、176、185、191、197、202、211、217、223、228、237、243、249、及び254)、VL CDR2(配列番号5、11、22、31、37、48、57、63、74、83、89、100、109、115、126、135、141、152、161、167、178、187、193、204、213、219、230、239、245、及び256)、並びにVL CDR3(配列番号6、17、23、32、43、49、58、69、75、84、95、101、110、121、127、136、147、153、162、173、179、188、199、205、214、225、231、240、251、及び257); VH CDR2(配列番号2、8、14、19、24、28、34、40、45、50、54、60、66、71、76、80、86、92、97、102、106、112、118、123、128、132、138、144、149、154、158、164、170、175、180、184、190、196、201、206、210、216、222、227、232、236、242、248、253、及び258)、VH CDR3(配列番号3、9、15、20、29、35、41、46、55、61、67、72、81、87、93、98、107、113、119、124、133、139、145、150、159、165、171、176、185、191、197、202、211、217、223、228、237、243、249、及び254)、VL CDR1(配列番号4、10、16、21、30、36、42、47、56、62、68、73、82、88、94、99、108、114、120、125、134、140、146、151、160、166、172、177、186、192、198、203、212、218、224、229、238、244、250、及び255)、並びにVL CDR2(配列番号5、11、22、31、37、48、57、63、74、83、89、100、109、115、126、135、141、152、161、167、178、187、193、204、213、219、230、239、245、及び256); VH CDR2(配列番号2、8、14、19、24、28、34、40、45、50、54、60、66、71、76、80、86、92、97、102、106、112、118、123、128、132、138、144、149、154、158、164、170、175、180、184、190、196、201、206、210、216、222、227、232、236、242、248、253、及び258)、VH CDR3(配列番号3、9、15、20、29、35、41、46、55、61、67、72、81、87、93、98、107、113、119、124、133、139、145、150、159、165、171、176、185、191、197、202、211、217、223、228、237、243、249、及び254)、VL CDR1(配列番号4、10、16、21、30、36、42、47、56、62、68、73、82、88、94、99、108、114、120、125、134、140、146、151、160、166、172、177、186、192、198、203、212、218、224、229、238、244、250、及び255); VH CDR2(配列番号2、8、14、19、24、28、34、40、45、50、54、60、66、71、76、80、86、92、97、102、106、112、118、123、128、132、138、144、149、154、158、164、170、175、180、184、190、196、201、206、210、216、222、227、232、236、242、248、253、及び258)、VH CDR3(配列番号3、9、15、20、29、35、41、46、55、61、67、72、81、87、93、98、107、113、119、124、133、139、145、150、159、165、171、176、185、191、197、202、211、217、223、228、237、243、249、及び254)、VL CDR2(配列番号5、11、22、31、37、48、57、63、74、83、89、100、109、115、126、135、141、152、161、167、178、187、193、204、213、219、230、239、245、及び256)、並びにVL CDR3(配列番号6、17、23、32、43、49、58、69、75、84、95、101、110、121、127、136、147、153、162、173、179、188、199、205、214、225、231、240、251、及び257); VH CDR1(配列番号1、7、12、13、18、27、33、38、39、44、53、59、64、65、70、79、85、90、91、96、105、111、116、117、122、131、137、142、143、148、157、163、168、169、174、183、189、194、195、200、209、215、220、221、226、235、241、246、247、及び252)、VH CDR2(配列番号2、8、14、19、24、28、34、40、45、50、54、60、66、71、76、80、86、92、97、102、106、112、118、123、128、132、138、144、149、154、158、164、170、175、180、184、190、196、201、206、210、216、222、227、232、236、242、248、253、及び258)、VH

CDR3(配列番号3、9、15、20、29、35、41、46、55、61、67、72、81、87、93、98、107、113、119、124、133、139、145、150、159、165、171、176、185、191、197、202、211、217、223、228、237、243、249、及び254)、VL CDR1(配列番号4、10、16、21、30、36、42、47、56、62、68、73、82、88、94、99、108、114、120、125、134、140、146、151、160、166、172、177、186、192、198、203、212、218、224、229、238、244、250、及び255)、並びにVL CDR2(配列番号5、11、22、31、37、48、57、63、74、83、89、100、109、115、126、135、141、152、161、167、178、187、193、204、213、219、230、239、245、及び256); VH CDR1(配列番号1、7、12、13、18、27、33、38、39、44、53、59、64、65、70、79、85、90、91、96、105、111、116、117、122、131、137、142、143、148、157、163、168、169、174、183、189、194、195、200、209、215、220、221、226、235、241、246、247、及び252)、VH CDR2(配列番号2、8、14、19、24、28、34、40、45、50、54、60、66、71、76、80、86、92、97、102、106、112、118、123、128、132、138、144、149、154、158、164、170、175、180、184、190、196、201、206、210、216、222、227、232、236、242、248、253、及び258)、VH CDR3(配列番号3、9、15、20、29、35、41、46、55、61、67、72、81、87、93、98、107、113、119、124、133、139、145、150、159、165、171、176、185、191、197、202、211、217、223、228、237、243、249、及び254)、VL CDR1(配列番号4、10、16、21、30、36、42、47、56、62、68、73、82、88、94、99、108、114、120、125、134、140、146、151、160、166、172、177、186、192、198、203、212、218、224、229、238、244、250、及び255)、並びにVL CDR3(配列番号6、17、23、32、43、49、58、69、75、84、95、101、110、121、127、136、147、153、162、173、179、188、199、205、214、225、231、240、251、及び257); VH CDR1(配列番号1、7、12、13、18、27、33、38、39、44、53、59、64、65、70、79、85、90、91、96、105、111、116、117、122、131、137、142、143、148、157、163、168、169、174、183、189、194、195、200、209、215、220、221、226、235、241、246、247、及び252)、VH CDR2(配列番号2、8、14、19、24、28、34、40、45、50、54、60、66、71、76、80、86、92、97、102、106、112、118、123、128、132、138、144、149、154、158、164、170、175、180、184、190、196、201、206、210、216、222、227、232、236、242、248、253、及び258)、VH CDR3(配列番号3、9、15、20、29、35、41、46、55、61、67、72、81、87、93、98、107、113、119、124、133、139、145、150、159、165、171、176、185、191、197、202、211、217、223、228、237、243、249、及び254)、VL CDR2(配列番号5、11、22、31、37、48、57、63、74、83、89、100、109、115、126、135、141、152、161、167、178、187、193、204、213、219、230、239、245、及び256)、並びにVL CDR3(配列番号6、17、23、32、43、49、58、69、75、84、95、101、110、121、127、136、147、153、162、173、179、188、199、205、214、225、231、240、251、及び257); VH CDR1(配列番号1、7、12、13、18、27、33、38、39、44、53、59、64、65、70、79、85、90、91、96、105、111、116、117、122、131、137、142、143、148、157、163、168、169、174、183、189、194、195、200、209、215、220、221、226、235、241、246、247、及び252)、VH CDR2(配列番号2、8、14、19、24、28、34、40、45、50、54、60、66、71、76、80、86、92、97、102、106、112、118、123、128、132、138、144、149、154、158、164、170、175、180、184、190、196、201、206、210、216、222、227、232、236、242、248、253、及び258)、VL CDR1(配列番号4、10、16、21、30、36、42、47、56、62、68、73、82、88、94、99、108、114、120、125、134、140、146、151、160、166、172、177、186、192、198、203、212、218、224、229、238、244、250、及び255)、VL CDR2(配列番号5、11、22、31、37、48、57、63、74、83、89、100、109、115、126、135、141、152、161、167、178、187、193、204、213、219、230、239、245、及び256)、並びにVL CDR3(配列番号6、17、23、32、43、49、58、69、75、84、95、101、110、121、127、136、147、153、162、173、179、188、199、205、214、225、231、240、251、及び257); VH CDR1(配列番号1、7、12、13、18、27、33、38、39、44、53、59、64、65、70、79、85、90、91、96、105、111、116、117、122、131、137、142、143、148、157、163、168、169、174、183、189、194、195、200、209、215、220、221、226、235、241、246、247、及び252)、VH CDR3(配列番号3、9、15、20、29、35、41、46、55

、61、67、72、81、87、93、98、107、113、119、124、133、139、145、150、159、165、171、176、185、191、197、202、211、217、223、228、237、243、249、及び254)、VL CDR1(配列番号4、10、16、21、30、36、42、47、56、62、68、73、82、88、94、99、108、114、120、125、134、140、146、151、160、166、172、177、186、192、198、203、212、218、224、229、238、244、250、及び255)、VL CDR2(配列番号5、11、22、31、37、48、57、63、74、83、89、100、109、115、126、135、141、152、161、167、178、187、193、204、213、219、230、239、245、及び256)、並びにVL CDR3(配列番号6、17、23、32、43、49、58、69、75、84、95、101、110、121、127、136、147、153、162、173、179、188、199、205、214、225、231、240、251、及び257); VH CDR2(配列番号2、8、14、19、24、28、34、40、45、50、54、60、66、71、76、80、86、92、97、102、106、112、118、123、128、132、138、144、149、154、158、164、170、175、180、184、190、196、201、206、210、216、222、227、232、236、242、248、253、及び258)、VH CDR3(配列番号3、9、15、20、29、35、41、46、55、61、67、72、81、87、93、98、107、113、119、124、133、139、145、150、159、165、171、176、185、191、197、202、211、217、223、228、237、243、249、及び254)、VL CDR1(配列番号4、10、16、21、30、36、42、47、56、62、68、73、82、88、94、99、108、114、120、125、134、140、146、151、160、166、172、177、186、192、198、203、212、218、224、229、238、244、250、及び255)、VL CDR2(配列番号5、11、22、31、37、48、57、63、74、83、89、100、109、115、126、135、141、152、161、167、178、187、193、204、213、219、230、239、245、及び256)、又はこれらの任意の組合せを含む抗体である。

【0211】

また別の態様において、本明細書に開示されるCDRは、関連抗体の群に由来するコンセンサス配列を含む(例えば、表1~10を参照されたい)。本明細書に記載されるように、「コンセンサス配列」は、いくつかの配列間で共通の保存されたアミノ酸及び所与のアミノ酸配列内で異なる可変アミノ酸を有するアミノ酸配列を指す。提供されるCDRコンセンサス配列は、CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2、及び/又はCDRL3に対応するCDRを含む。抗βクロトー抗体のCDRのコンセンサス配列を図2に示す。

【0212】

ある実施態様において、本明細書に記載される抗体又はその断片は:(1)配列番号278、279、280、及び378からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するVH FR1;(2)配列番号281、282、及び283からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するVH FR2;(3)配列番号284、285、286、287、及び379~381からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するVH FR3;並びに/又は(4)配列番号288のアミノ酸を有するVH FR4を含むVH領域を含む。したがって、いくつかの態様において、ヒト化抗体は、配列番号278、279、280、及び378からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するVH FR1を含むVH領域を含む。いくつかの態様において、ヒト化抗体は、配列番号281、282、及び283からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するVH FR2を含むVH領域を含む。いくつかの態様において、ヒト化抗体は、配列番号284、285、286、287、及び379~381からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するVH FR3を含むVH領域を含む。いくつかの態様において、ヒト化抗体は、配列番号288のアミノ酸を有するVH FR4を含むVH領域を含む。

【0213】

ある実施態様において、本明細書に記載される抗体又はその断片は:(1)配列番号289、290、及び382~384からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するVL FR1;(2)配列番号291、292、及び385~392からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するVL FR2;(3)配列番号293、294、295、及び393~404からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するVL FR3;並びに/又は(4)配列番号296及び405~407のアミノ酸を有するVL FR4を含むVL領域を含む。したがって、いくつかの態様において、ヒト化抗体は、配列番号289、290、及び382~384からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するVL FR1を含むVL領域を含む。いくつかの態様において、ヒト化抗体は、配列番号291、292、及び385~392からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するVL FR2を含むVL領域を含む。いくつかの態様において、ヒト化

[illegible]

79～381)、VH FR4(配列番号288)、並びにVL FR1(配列番号289、290、及び382～384); VH
FR2(配列番号281、282、及び283)、VH FR3(配列番号284、285、286、287、及び379～381)
、VH FR4(配列番号288)、並びにVL FR2(配列番号291、292、及び385～392); VH FR2(配列
番号281、282、及び283)、VH FR3(配列番号284、285、286、287、及び379～381)、VH FR4
(配列番号288)、並びにVL FR3(配列番号293、294、295、及び393～404); VH FR2(配列番
号281、282、及び283)、VH FR3(配列番号284、285、286、287、及び379～381)、VH FR4(
配列番号288)、並びにVL FR4(配列番号296及び405～407); VH FR1(配列番号278、279、28
0、及び378)、VH FR2(配列番号281、282、及び283)、VL FR1(配列番号289、290、及び382
～384)、並びにVL FR2(配列番号291、292、及び385～392); VH FR1(配列番号278、279、2
80、及び378)、VH FR2(配列番号281、282、及び283)、VL FR1(配列番号289、290、及び38
2～384)、並びにVL FR3(配列番号293、294、295、及び393～404); VH FR1(配列番号278、
279、280、及び378)、VH FR2(配列番号281、282、及び283)、VL FR1(配列番号289、290、
及び382～384)、並びにVL FR4(配列番号296及び405～407); VH FR1(配列番号278、279、2
80、及び378)、VH FR3(配列番号284、285、286、287、及び379～381)、VL FR1(配列番号2
89、290、及び382～384)、並びにVL FR2(配列番号291、292、及び385～392); VH FR1(配
列番号278、279、280、及び378)、VH FR3(配列番号284、285、286、287、及び379～381)
、VL FR1(配列番号289、290、及び382～384)、並びにVL FR3(配列番号293、294、295、及
び393～404); VH FR1(配列番号278、279、280、及び378)、VH FR3(配列番号284、285、28
6、287、及び379～381)、VL FR1(配列番号289、290、及び382～384)、並びにVL FR4(配列
番号296及び405～407); VH FR1(配列番号278、279、280、及び378)、VH FR4(配列番号288
)、VL FR1(配列番号289、290、及び382～384)、並びにVL FR2(配列番号291、292、及び38
5～392); VH FR1(配列番号278、279、280、及び378)、VH FR4(配列番号288)、VL FR1(配
列番号289、290、及び382～384)、並びにVL FR3(配列番号293、294、295、及び393～404)
; VH FR1(配列番号278、279、280、及び378)、VH FR4(配列番号288)、VL FR1(配列番号28
9、290、及び382～384)、並びにVL FR4(配列番号296及び405～407); VH FR2(配列番号281
、282、及び283)、VH FR3(配列番号284、285、286、287、及び379～381)、VL FR1(配列番
号289、290、及び382～384)、並びにVL FR2(配列番号291、292、及び385～392); VH FR2(
配列番号281、282、及び283)、VH FR3(配列番号284、285、286、287、及び379～381)、VL
FR1(配列番号289、290、及び382～384)、並びにVL FR3(配列番号293、294、295、及び39
3～404); VH FR2(配列番号281、282、及び283)、VH FR3(配列番号284、285、286、287、
及び379～381)、VL FR1(配列番号289、290、及び382～384)、並びにVL FR4(配列番号296
及び405～407); VH FR2(配列番号281、282、及び283)、VH FR4(配列番号288)、VL FR1(配
列番号289、290、及び382～384)、並びにVL FR2(配列番号291、292、及び385～392); VH
FR2(配列番号281、282、及び283)、VH FR4(配列番号288)、VL FR1(配列番号289、290、及
び382～384)、並びにVL FR3(配列番号293、294、295、及び393～404); VH FR2(配列番号2
81、282、及び283)、VH FR4(配列番号288)、VL FR1(配列番号289、290、及び382～384)、
並びにVL FR4(配列番号296及び405～407); VH FR3(配列番号284、285、286、287、及び37
9～381)、VH FR4(配列番号288)、VL FR1(配列番号289、290、及び382～384)、並びにVL F
R2(配列番号291、292、及び385～392); VH FR3(配列番号284、285、286、287、及び379～
381)、VH FR4(配列番号288)、VL FR1(配列番号289、290、及び382～384)、並びにVL FR3(
配列番号293、294、295、及び393～404); VH FR3(配列番号284、285、286、287、及び379
～381)、VH FR4(配列番号288)、VL FR1(配列番号289、290、及び382～384)、並びにVL FR
4(配列番号296及び405～407);

VH FR1(配列番号278、279、280、及び378)、VH FR2(配列番号281、282、及び283)、VL FR
2(配列番号291、292、及び385～392)、並びにVL FR3(配列番号293、294、295、及び393～
404); VH FR1(配列番号278、279、280、及び378)、VH FR2(配列番号281、282、及び283)
、VL FR2(配列番号291、292、及び385～392)、並びにVL FR4(配列番号296及び405～407);
VH FR1(配列番号278、279、280、及び378)、VH FR3(配列番号284、285、286、287、及び
379～381)、VL FR2(配列番号291、292、及び385～392)、並びにVL FR3(配列番号293、294
、295、及び393～404); VH FR1(配列番号278、279、280、及び378)、VH FR3(配列番号284

[illegible]

289、290、及び382～384)、VL FR3(配列番号293、294、295、及び393～404)、並びにVL F
R4(配列番号296及び405～407); VH FR3(配列番号284、285、286、287、及び379～381)、V
L FR2(配列番号291、292、及び385～392)、VL FR3(配列番号293、294、295、及び393～40
4)、並びにVL FR4(配列番号296及び405～407); VH FR4(配列番号288)、VL FR1(配列番号2
89、290、及び382～384)、VL FR2(配列番号291、292、及び385～392)、並びにVL FR3(配
列番号293、294、295、及び393～404); VH FR4(配列番号288)、VL FR1(配列番号289、290
、及び382～384)、VL FR2(配列番号291、292、及び385～392)、並びにVL FR4(配列番号29
6及び405～407); VH FR4(配列番号288)、VL FR1(配列番号289、290、及び382～384)、VL
FR3(配列番号293、294、295、及び393～404)、並びにVL FR4(配列番号296及び405～407);
VH FR4(配列番号288)、VL FR2(配列番号291、292、及び385～392)、VL FR3(配列番号293
、294、295、及び393～404)、並びにVL FR4(配列番号296及び405～407); VH FR1(配列番
号278、279、280、及び378)、VH FR2(配列番号281、282、及び283)、VH FR3(配列番号284
、285、286、287、及び379～381)、VH FR4(配列番号288)、並びにVL FR1(配列番号289、2
90、及び382～384); VH FR1(配列番号278、279、280、及び378)、VH FR2(配列番号281、2
82、及び283)、VH FR3(配列番号284、285、286、287、及び379～381)、VH FR4(配列番号2
88)、並びにVL FR2(配列番号291、292、及び385～392); VH FR1(配列番号278、279、280
、及び378)、VH FR2(配列番号281、282、及び283)、VH FR3(配列番号284、285、286、287
、及び379～381)、VH FR4(配列番号288)、並びにVL FR3(配列番号293、294、295、及び39
3～404); VH FR1(配列番号278、279、280、及び378)、VH FR2(配列番号281、282、及び28
3)、VH FR3(配列番号284、285、286、287、及び379～381)、VH FR4(配列番号288)、並び
にVL FR4(配列番号296及び405～407); VH FR1(配列番号278、279、280、及び378)、VH FR
2(配列番号281、282、及び283)、VH FR3(配列番号284、285、286、287、及び379～381)、
VL FR1(配列番号289、290、及び382～384)、並びにVL FR2(配列番号291、292、及び385～
392); VH FR1(配列番号278、279、280、及び378)、VH FR2(配列番号281、282、及び283)
、VH FR3(配列番号284、285、286、287、及び379～381)、VL FR1(配列番号289、290、及
び382～384)、並びにVL FR3(配列番号293、294、295、及び393～404); VH FR1(配列番号2
78、279、280、及び378)、VH FR2(配列番号281、282、及び283)、VH FR3(配列番号284、2
85、286、287、及び379～381)、VL FR1(配列番号289、290、及び382～384)、並びにVL FR
4(配列番号296及び405～407); VH FR1(配列番号278、279、280、及び378)、VH FR2(配列
番号281、282、及び283)、VH FR3(配列番号284、285、286、287、及び379～381)、VL FR2
(配列番号291、292、及び385～392)、並びにVL FR3(配列番号293、294、295、及び393～4
04); VH FR1(配列番号278、279、280、及び378)、VH FR2(配列番号281、282、及び283)、
VH FR3(配列番号284、285、286、287、及び379～381)、VL FR2(配列番号291、292、及び3
85～392)、並びにVL FR4(配列番号296及び405～407); VH FR1(配列番号278、279、280、
及び378)、VH FR2(配列番号281、282、及び283)、VH FR3(配列番号284、285、286、287、
及び379～381)、VL FR3(配列番号293、294、295、及び393～404)、並びにVL FR4(配列番
号296及び405～407); VH FR1(配列番号278、279、280、及び378)、VH FR2(配列番号281、
282、及び283)、VH FR4(配列番号288)、VL FR1(配列番号289、290、及び382～384)、並び
にVL FR2(配列番号291、292、及び385～392); VH FR1(配列番号278、279、280、及び378)
、VH FR2(配列番号281、282、及び283)、VH FR4(配列番号288)、VL FR1(配列番号289、29
0、及び382～384)、並びにVL FR3(配列番号293、294、295、及び393～404); VH FR1(配列
番号278、279、280、及び378)、VH FR2(配列番号281、282、及び283)、VH FR4(配列番号2
88)、VL FR1(配列番号289、290、及び382～384)、並びにVL FR4(配列番号296及び405～40
7); VH FR1(配列番号278、279、280、及び378)、VH FR2(配列番号281、282、及び283)、V
H FR4(配列番号288)、VL FR2(配列番号291、292、及び385～392)、並びにVL FR3(配列番
号293、294、295、及び393～404); VH FR1(配列番号278、279、280、及び378)、VH FR2(
配列番号281、282、及び283)、VH FR4(配列番号288)、VL FR2(配列番号291、292、及び38
5～392)、並びにVL FR4(配列番号296及び405～407); VH FR1(配列番号278、279、280、及
び378)、VH FR2(配列番号281、282、及び283)、VH FR4(配列番号288)、VL FR3(配列番号2
93、294、295、及び393～404)、並びにVL FR4(配列番号296及び405～407); VH FR2(配列

10

20

30

40

50

[illegible]

[illegible]

[illegible]

、279、280、及び378)、VH FR2(配列番号281、282、及び283)、VL FR1(配列番号289、290、及び382～384)、VL FR2(配列番号291、292、及び385～392)、VL FR3(配列番号293、294、295、及び393～404)、並びにVL FR4(配列番号296及び405～407); VH FR1(配列番号278、279、280、及び378)、VH FR3(配列番号284、285、286、287、及び379～381)、VL FR1(配列番号289、290、及び382～384)、VL FR2(配列番号291、292、及び385～392)、VL FR3(配列番号293、294、295、及び393～404)、並びにVL FR4(配列番号296及び405～407); VH FR1(配列番号278、279、280、及び378)、VH FR4(配列番号288)、VL FR1(配列番号289、290、及び382～384)、VL FR2(配列番号291、292、及び385～392)、VL FR3(配列番号293、294、295、及び393～404)、並びにVL FR4(配列番号296及び405～407); VH FR2(配列番号281、282、及び283)、VH FR3(配列番号284、285、286、287、及び379～381)、VL FR1(配列番号289、290、及び382～384)、VL FR2(配列番号291、292、及び385～392)、VL FR3(配列番号293、294、295、及び393～404)、並びにVL FR4(配列番号296及び405～407); VH FR2(配列番号281、282、及び283)、VH FR4(配列番号288)、VL FR1(配列番号289、290、及び382～384)、VL FR2(配列番号291、292、及び385～392)、VL FR3(配列番号293、294、295、及び393～404)、並びにVL FR4(配列番号296及び405～407); VH FR3(配列番号284、285、286、287、及び379～381)、VH FR4(配列番号288)、VL FR1(配列番号289、290、及び382～384)、VL FR2(配列番号291、292、及び385～392)、VL FR3(配列番号293、294、295、及び393～404)、並びにVL FR4(配列番号296及び405～407); VH FR1(配列番号278、279、280、及び378)、VH FR2(配列番号281、282、及び283)、VH FR3(配列番号284、285、286、287、及び379～381)、VH FR4(配列番号288)、VL FR1(配列番号289、290、及び382～384)、VL FR2(配列番号291、292、及び385～392)、並びにVL FR3(配列番号293、294、295、及び393～404); VH FR1(配列番号278、279、280、及び378)、VH FR2(配列番号281、282、及び283)、VH FR3(配列番号284、285、286、287、及び379～381)、VH FR4(配列番号288)、VL FR1(配列番号289、290、及び382～384)、VL FR2(配列番号291、292、及び385～392)、並びにVL FR3(配列番号293、294、295、及び393～404); VH FR1(配列番号278、279、280、及び378)、VH FR2(配列番号281、282、及び283)、VH FR3(配列番号284、285、286、287、及び379～381)、VH FR4(配列番号288)、VL FR1(配列番号289、290、及び382～384)、VL FR2(配列番号291、292、及び385～392)、並びにVL FR3(配列番号293、294、295、及び393～404)、並びにVL FR4(配列番号296及び405～407); VH FR1(配列番号278、279、280、及び378)、VH FR2(配列番号281、282、及び283)、VH FR3(配列番号284、285、286、287、及び379～381)、VH FR4(配列番号288)、VL FR1(配列番号289、290、及び382～384)、VL FR2(配列番号291、292、及び385～392)、並びにVL FR3(配列番号293、294、295、及び393～404)、並びにVL FR4(配列番号296及び405～407); VH FR1(配列番号278、279、280、及び378)、VH FR2(配列番号281、282、及び283)、VH FR3(配列番号284、285、286、287、及び379～381)、VH FR4(配列番号288)、VL FR1(配列番号289、290、及び382～384)、VL FR2(配列番号291、292、及び385～392)、VL FR3(配列番号293、294、295、及び393～404)、並びにVL FR4(配列番号296及び405～407); VH FR1(配列番号278、279、280、及び378)、VH FR2(配列番号281、282、及び283)、VH FR3(配列番号284、285、286、287、及び379～381)、VH FR4(配列番号288)、VL FR1(配列番号289、290、及び382～384)、VL FR2(配列番号291、292、及び385～392)、VL FR3(配列番号293、294、295、及び393～404)、並びにVL FR4(配列番号296及び405～407); 又はこれらの任意の組合せを含む抗体である。

【0216】

また別の態様において、(i) β クロトー又は(ii) β クロトー並びにFGFR1c、FGFR2c、FGFR3c、及びFGFR4のうちの1つを含む複合体に対する結合を、例示された抗体又は機能性断片のうちの1つと競合する抗体が提供される。そのような抗体は、本明細書に例示された抗体のうちの1つと同じエピトープ、又は重複エピトープに結合することもできる。例示された抗体と同じエピトープと競合し又は該エピトープに結合する抗体及び断片は、類似の機能特性を示すと考えられる。例示された抗原結合タンパク質及び断片には、表1～10のものを含む、本明細書に提供されるVH及びVL領域、並びにCDRを有するものが含まれる。したがって、具体的な例として、提供される抗体には:(a)表1～10に記載された抗体について記載されたCDRのうちの1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、もしくは6つ全て;(b)表1～10に記載された抗体について、例えば、抗体5H23(表1)について記載されたVH及びVL領域から

選択されるVH及びVL、又は(c)表1～10に記載された抗体について指定されたVH及びVLを含む2つの軽鎖及び2つの重鎖を含む抗体と競合するものが含まれる。

さらにまた別の態様において、ヒトβクロトー又はカニクイザルβクロトーの領域(エピトープを含む)に結合する抗体が本明細書に提供される。例えば、いくつかの実施態様において、本明細書に提供される抗体は、配列番号297のアミノ酸残基509～1044を含むヒトβクロトーのKLB2ドメインに結合する。別の例として、いくつかの実施態様において、本明細書に提供される抗体は、配列番号297のアミノ酸残基517～967を含むヒトβクロトーのKLB2ドメインのグリコシルヒドロラーゼ1領域に結合する。また別の例として、いくつかの実施態様において、本明細書に提供される抗体は、配列番号297のアミノ酸残基657～703を含むヒトβクロトーの領域に結合する。さらに別の例として、いくつかの実施態様において、本明細書に提供される抗体は、配列番号299のアミノ酸残基657～703を含むカニクイザルβクロトーの領域に結合する。

10

【0217】

別の態様において、ヒトβクロトーの特異的なエピトープに結合する抗体が本明細書に提供される。例えば、いくつかの実施態様において、本明細書に提供される抗体は、ヒトβクロトー(配列番号297)のアミノ酸残基657、701、及び/又は703のうちの少なくとも1つを含むヒトβクロトーのエピトープに結合する。したがって、いくつかの実施態様において、本明細書に提供される抗体は、配列番号297の少なくともアミノ酸残基657を含むヒトβクロトーのエピトープに結合する。いくつかの実施態様において、本明細書に提供される抗体は、配列番号297の少なくともアミノ酸残基701を含むヒトβクロトーのエピトープに結合する。いくつかの実施態様において、本明細書に提供される抗体は、配列番号297の少なくともアミノ酸残基703を含むヒトβクロトーのエピトープに結合する。いくつかの実施態様において、本明細書に提供される抗体は、配列番号297の少なくともアミノ酸残基657及び701を含むヒトβクロトーのエピトープに結合する。いくつかの実施態様において、本明細書に提供される抗体は、配列番号297の少なくともアミノ酸残基657及び703を含むヒトβクロトーのエピトープに結合する。いくつかの実施態様において、本明細書に提供される抗体は、配列番号297の少なくともアミノ酸残基701及び703を含むヒトβクロトーのエピトープに結合する。いくつかの実施態様において、本明細書に提供される抗体は、配列番号297の少なくともアミノ酸残基657、701、及び703を含むヒトβクロトーのエピトープに結合する。上で提供されているそのような抗体は、いくつかの実施態様において、ヒトβクロトー及びFGF受容体を発現する細胞でFGF19様シグナル伝達及び/又はFGF21様シグナル伝達を誘導することができる。さらに、いくつかの実施態様において、該抗体は、ヒト化、ヒト、又はキメラ抗体である。

20

30

【0218】

(1. ポリクローナル抗体)

本開示の抗体は、ポリクローナル抗体を含み得る。ポリクローナル抗体を調製する方法は当業者に公知である。ポリクローナル抗体は、例えば、免疫剤及び望ましい場合、アジュバントの1回以上の注射によって哺乳動物で惹起することができる。通常、免疫剤及び/又はアジュバントは、複数回の皮下又は腹腔内注射によって哺乳動物に注射される。免疫剤には、βクロトーポリペプチド又はその融合タンパク質が含まれ得る。免疫剤を、免疫されている哺乳動物で免疫原性があることが知られているタンパク質にコンジュゲートするか、又は該タンパク質及び1以上のアジュバントで哺乳動物を免疫することが有用である場合がある。そのような免疫原性タンパク質の例としては、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシチログロブリン、及び大豆トリプシンインヒビターが挙げられるが、これらに限定されない。利用し得るアジュバントの例としては、Ribi、CpG、ポリIC、フロイントの完全アジュバント、及びMPL-TDMアジュバント(モノホスホリル脂質A、合成トレハロースジコリノミコレート)が挙げられる。免疫プロトコルは、過度の実験を行うことなく、当業者によって選択され得る。その後、哺乳動物から採血し、血清をβクロトー抗体力価についてアッセイすることができる。望ましい場合、抗体力価が上昇するか又はプラトーに達するまで、哺乳動物に追加免疫することができる。さらに又は代

40

50

わりに、リンパ球を、融合及び下記のようなハイブリドーマからのモノクローナル抗体の調製のために免疫動物から得てもよい。

【0219】

(2.モノクローナル抗体)

本開示の抗体は、代わりに、モノクローナル抗体を含み得る。モノクローナル抗体は、Kohlerら(Nature, 256:495(1975))によって最初に記載されたハイブリドーマ法を用いて作製されてもよく、又は組換えDNA法(例えば、米国特許第4,816,567号を参照されたい)によって作製されてもよい。

【0220】

ハイブリドーマ法では、マウス又は他の適切な宿主動物、例えば、ハムスターを上記のように免疫して、免疫に使用されたタンパク質に特異的に結合する抗体を産生する又は産生することができるリンパ球を誘発する。或いは、リンパ球をインビトロで免疫してもよい。免疫後、リンパ球を単離し、その後、好適な融合剤、例えば、ポリエチレングリコールを用いて骨髓腫細胞株と融合させて、ハイブリドーマ細胞を形成させる(Godingの文献、モノクローナル抗体:原理及び実践(Monoclonal Antibodies: Principles and Practice)、59~103ページ(Academic Press, 1986))。

【0221】

このように調製されたハイブリドーマ細胞を好適な培養培地中に播種し、その中で成長させ、この培地は、好ましくは、融合していない親骨髓腫細胞(融合パートナーとも呼ばれる)の成長又は生存を阻害する1以上の物質を含有する。例えば、親骨髓腫細胞が、ヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRT又はHPRT)という酵素を欠く場合、ハイブリドーマ用の選択的培養培地は、通常、ヒポキサンチン、アミノプテリン、及びチミジンを含み(HAT培地)、これらの物質は、HGPRT欠損細胞の成長を妨げる。

【0222】

好ましい融合パートナー骨髓腫細胞は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞による安定した高レベルの抗体産生を支持し、かつ融合していない親細胞に不利な選択をする選択培地に感受性がある細胞である。好ましい骨髓腫細胞株は、マウス骨髓腫株、例えば、SP-2及び派生物、例えば、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(American Type Culture Collection), Manassas, Virginia, USAから入手可能なX63-Ag8-653細胞、並びにソーック研究所細胞配布センター(Salk Institute Cell Distribution Center), San Diego, California USAから入手可能なMOPC-21及びMPC-11マウス腫瘍から派生したものである。ヒトモノクローナル抗体の産生のためのヒト骨髓腫及びマウス-ヒト異種骨髓腫細胞株も記載されている(Kozbor, J.の文献、Immunol., 133:3001(1984);及びBrodeurらの文献、モノクローナル抗体産生技法及び応用(Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications)、51~63ページ(Marcel Dekker社, New York, 1987))。

【0223】

ハイブリドーマ細胞が成長している培養培地は、抗原に対するモノクローナル抗体の産生についてアッセイされる。ハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降によるか、又はインビトロ結合アッセイ、例えば、放射免疫アッセイ(RIA)もしくは酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)によって決定される。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、Munsonらの文献、Anal. Biochem., 107:220(1980)に記載されているスキャッチャード解析によって決定することができる。

【0224】

ひとたび所望の特異性、親和性、及び/又は活性の抗体を産生するハイブリドーマ細胞が同定されれば、クローンを限界希釈法によってサブクローニングし、標準的な方法によって成長させることができる(Godingの文献、モノクローナル抗体:原理及び実践(Monoclonal Antibodies: Principles and Practice)、59~103ページ(Academic Press, 1986))。この目的のための好適な培養培地としては、例えば、D-MEM又はRPMI-1640培地が挙げられる。さらに、ハイブリドーマ細胞は、例えば、該細胞をマウスに腹腔内注射することにより、動物内の腹水腫瘍としてインビボで成長させることができる。

【0225】

サブクローンによって分泌されるモノクローナル抗体は、例えば、親和性クロマトグラフィー(例えば、プロテインAもしくはプロテインG-セファロースを使用するもの)又はイオン交換クロマトグラフィー、ハイドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析などの従来の抗体精製手順によって、培養培地、腹水液、又は血清から好適に分離される。

【0226】

モノクローナル抗体をコードするDNAは、従来の手順を用いて(例えば、マウス抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを使用することにより)、容易に単離され、シーケンシングされる。ハイブリドーマ細胞は、そのようなDNAの好ましい源としての役割を果たす。ひとたび単離されれば、DNAを発現ベクター中に入れることができ、これをその後、トランスフェクトされなければ抗体タンパク質を産生することはない、大腸菌(*E. coli*)細胞、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、又は骨髓腫細胞などの宿主細胞にトランスフェクトして、組換え宿主細胞内でのモノクローナル抗体の合成を得る。抗体をコードするDNAの細菌内での組換え発現に関する総説としては、Skerraらの文献、*Curr. Opinion in Immunol.*, 5:256-262(1993)及びPluckthunの文献、*Immunol. Revs.* 130:151-188(1992)が挙げられる。

【0227】

いくつかの実施態様において、 β クロトーエピトープに結合する抗体は、(1)ストリンジентな条件下(例えば、フィルターに結合したDNAへの、 $6\times$ 塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)中、約 45°C でのハイブリダイゼーションと、その後の、 $0.2\times$ SSC/ 0.1% SDS中、約 $50\sim 65^{\circ}\text{C}$ での1回以上の洗浄)、極めてストリンジентな条件下(例えば、フィルターに結合した核酸への、 $6\times$ SSC中、約 45°C でのハイブリダイゼーションと、その後の、 $0.1\times$ SSC/ 0.2% SDS中、約 68°C での1回以上の洗浄)、又は当業者に公知である他のストリンジентなハイブリダイゼーション条件下で、本明細書に記載されるVH及び/又はVLドメインのうちのいずれか1つをコードするヌクレオチド配列の相補体にハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされるVHドメインのアミノ酸配列及び/又はVLドメインのアミノ酸配列を含む(例えば、Ausubel, F.M.ら編、1989、分子生物学の最新プロトコル(*Current Protocols in Molecular Biology*), 第I巻、Green Publishing Associates社及びJohn Wiley & Sons社, New York、6.3.1～6.3.6及び2.10.3ページを参照されたい)。

【0228】

いくつかの実施態様において、 β クロトーエピトープに結合する抗体は、ストリンジентな条件下(例えば、フィルターに結合したDNAへの、 $6\times$ SSC中、約 45°C でのハイブリダイゼーションと、その後の、 $0.2\times$ SSC/ 0.1% SDS中、約 $50\sim 65^{\circ}\text{C}$ での1回以上の洗浄)、極めてストリンジентな条件下(例えば、フィルターに結合した核酸への、 $6\times$ SSC中、約 55°C でのハイブリダイゼーションと、その後の、 $0.1\times$ SSC/ 0.2% SDS中、約 68°C での1回以上の洗浄)、又は当業者に公知である他のストリンジентなハイブリダイゼーション条件下で、表1～10に示されたVH CDR及び/又はVL CDRのうちのいずれか1つをコードするヌクレオチド配列の相補体にハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされるVH CDRのアミノ酸配列又はVL CDRのアミノ酸配列を含む(例えば、Ausubel, F.M.ら編、1989、分子生物学の最新プロトコル(*Current Protocols in Molecular Biology*), 第I巻、Green Publishing Associates社及びJohn Wiley & Sons社, New York、6.3.1～6.3.6及び2.10.3ページを参照されたい)。

【0229】

さらなる実施態様において、モノクローナル抗体又は抗体断片を、例えば、抗体ファージディスプレイ:方法及びプロトコル(*Antibody Phage Display: Methods and Protocols*)、P.M. O'Brien及びR. Aitken編、Humana Press, Totawa N.J., 2002に記載されている技法を用いて作製される抗体ファージライブラリーから単離することができる。原理的には

、合成抗体クローンを、ファージコートタンパク質に融合した抗体可変領域(Fv)の様々な断片を提示するファージを含むファージライブラリーをスクリーニングすることにより選択する。そのようなファージライブラリーを所望の抗原に対してスクリーニングする。所望の抗原に結合することができるFv断片を発現するクローンを抗原に吸着させ、それにより、ライブラリー中の非結合クローンから分離する。その後、結合クローンを抗原から溶出させ、さらなる抗原吸着/溶出サイクルによってさらに濃縮することができる。

【0230】

可変ドメインを、例えば、Winterらの文献、Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455(1994)に記載されているように、VH及びVLが、短い柔軟性のあるペプチドを介して共有結合している単鎖Fv(scFv)断片としてか、又はVH及びVLが各々、定常ドメインに融合し、非共有結合的に相互作用しているFab断片としてかのいずれかで、ファージ上に機能的に提示させることができる。

【0231】

VH及びVL遺伝子のレパートリーをポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって別々にクローニングし、ファージライブラリー中でランダムに組み換えることができ、これをその後、Winterらの文献(上記)に記載されているように、抗原結合クローンについて探索することができる。免疫された源由来のライブラリーは、ハイブリドーマを構築する必要なしに、免疫原に対する高親和性抗体を提供する。或いは、ナイーブレパートリーをクローニングして、Griffithsら(EMBO J, 12: 725-734(1993))によって記載されているように、いかなる免疫も行わずに、幅広い非自己抗原及びまた自己抗原に対するヒト抗体の単一の供給源を提供することができる。最後に、ナイーブレパートリーは、例えば、Hoogenboom及びWinter(J. Mol. Biol., 227: 381-388(1992))によって記載されているように、幹細胞由来の再配列されていないV-遺伝子セグメントをクローニングし、ランダムな配列を含むPCRプライマーを用いて可変性の高いCDR3領域をコードさせ、インビトロでの再配列を達成することにより合成的に作製することもできる。

【0232】

ライブラリーのスクリーニングは、当技術分野で公知の様々な技法によって達成することができる。例えば、βクロトー(例えば、βクロトーポリペプチド、断片、又はエピトープ)を、吸着プレートのウェルをコーティングするために使用し、吸着プレートに固定されるかもしくは細胞選別で使用される宿主細胞上で発現させ、又はストレプトアビジンコーティングされたビーズによる捕捉のためにビオチンにコンジュゲートし、又はディスプレイライブラリーをパニングするための任意の他の方法を使用することができる。遅い解離反応速度(例えば、良好な結合親和性)を有する抗体の選択は、Bassらの文献、Proteins, 8: 309-314(1990)及びWO 92/09690号に記載されているような長い洗浄及び一価ファージディスプレイの使用、並びにMarksらの文献、Biotechnol., 10: 779-783(1992)に記載されているような抗原の低コーティング密度によって促進することができる。

【0233】

抗βクロトー抗体は、対象となるファージクローンについて選択するための好適な抗原スクリーニング手順を設計し、その後、対象となるファージクローン由来の、VH及び/もしくはVL配列(例えば、Fv配列)、又はVH及びVL配列由来の様々なCDR配列、及びKabatらの文献、免疫学的に興味深いタンパク質の配列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)、第5版、NIH Publication 91-3242, Bethesda MD(1991)、第1巻～第3巻に記載されている好適な定常領域(例えば、Fc)配列を用いて、全長抗βクロトー抗体クローンを構築することにより得ることができる。

【0234】

(3. 抗体断片)

本開示は、βクロトーに結合する抗体及び抗体断片を提供する。ある状況においては、全抗体よりもむしろ抗体断片を使用する利点がある。該断片のサイズがより小さいことにより、迅速なクリアランスが可能になり、細胞、組織、又は器官への接近の改善がもたらされ得る。特定の抗体断片の総説については、Hudsonらの文献(2003) Nat. Med. 9:129-1

10

20

30

40

50

34を参照されたい。

【0235】

抗体断片の産生のための様々な技法が開発されている。従来、これらの断片は、無傷抗体のタンパク質分解的消化によって得られた(例えば、Morimotoらの文献、Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117(1992);及びBrennanらの文献、Science, 229:81(1985)を参照されたい)。しかしながら、これらの断片は、現在、組換え宿主細胞によって直接産生させることができる。Fab、Fv、及びScFv抗体断片を全て、大腸菌又は酵母細胞で発現させ、そこから分泌させ、それにより、大量のこれらの断片の簡易産生を可能にすることができる。抗体断片は、上で論じられた抗体ファージライブラリーから単離することができる。或いは、Fab'-SH断片を大腸菌から直接回収し、化学的にカップリングさせて、F(ab')₂断片を形成させることができる(Carterらの文献、Bio/Technology 10:163-167(1992))。別の手法に従って、F(ab')₂断片を組換え宿主細胞培養物から直接単離することができる。サルベージ受容体結合エピトープ残基を含むインビボ半減期が延長されたFab及びF(ab')₂断片が、例えば、米国特許第5,869,046号に記載されている。抗体断片の産生のための他の技法が当業者に明白であろう。ある実施態様において、抗体は、単鎖Fv断片(scFv)である(例えば、WO 93/16185号;米国特許第5,571,894号;及び第5,587,458号を参照されたい)。Fv及びscFvは、定常領域を欠く無傷の結合部位を有し;そのため、これらは、インビボ使用時の非特異的結合の低下のために好適である可能性がある。scFv融合タンパク質は、scFvのアミノ末端又はカルボキシ末端のどちらかでのエフェクタータンパク質の融合を生じるように構築してもよい(例えば、抗体エンジニアリング(Antibody Engineering)、Borrebaeck編(上記)を参照されたい)。抗体断片はまた、例えば、上で引用されている参考文献に記載されているような、例えば、「直鎖抗体」であってもよい。そのような直鎖抗体は、単一特異性又は多重特異性、例えば、二重特異性であり得る。

【0236】

より小さい抗体由来結合構造は、単一可変ドメイン抗体(SdAb)とも呼ばれる個別的可変ドメイン(Vドメイン)である。ラクダ科動物及び軟骨魚類といった特定の種類の生物は、それらの免疫系の一部として、Fc相当ドメイン構造の上に取り付けられた高親和性単一V様ドメインを保有する(Woolvenらの文献、Immunogenetics 50: 98-101, 1999; Streltsovらの文献、Proc Natl Acad Sci USA. 101:12444-12449, 2004)。V様ドメイン(ラクダ科動物ではVhH、サメではV-NARと呼ばれる)は、通常、長い表面ループを提示し、これにより、標的抗原の空洞の貫通が可能になる。これらはまた、疎水性表面パッチをマスクすることにより、孤立したVHドメインを安定化する。

【0237】

これらのVhH及びV-NARドメインは、sdAbを人為的に作製するために使用されている。ヒトVドメイン変異体は、ファージライブラリーからの選択並びに安定な高結合性のVL及びVH由来ドメインを結果として生じさせている他の手法を用いて設計されている。

【0238】

本明細書に提供されるβクロトーに結合する抗体としては、合成抗体、モノクローナル抗体、組換え産生抗体、多重特異性抗体(二重特異性抗体を含む)、ヒト抗体、ヒト化抗体、ラクダ化抗体、キメラ抗体、イントラボディ、抗イディオタイプ(抗Id)抗体、及び上記のもののいずれかの機能性断片(例えば、βクロトー結合断片)が挙げられるが、これらに限定されない。機能性断片(例えば、βクロトーに結合する断片)の非限定的な例としては、単鎖Fv(scFv)(例えば、単一特異性、二重特異性などを含む)、Fab断片、F(ab')断片、F(ab)₂断片、F(ab')₂断片、ジスルフィド結合Fv(sdFv)、Fd断片、Fv断片、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、及びミニボディが挙げられる。

【0239】

本明細書に提供される抗体には、免疫グロブリン分子及び免疫グロブリン分子の免疫学的活性部分、例えば、βクロトーエピトープに結合する抗原結合部位を含む分子が含まれるが、これらに限定されない。本明細書に提供される免疫グロブリン分子は、免疫グロブリン分子の任意のタイプ(例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、及びIgY)、クラス(例えば

、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、及びIgA2)、又はサブクラスのものであることができる。

【0240】

抗体の変異体及び誘導体には、 β クロトーエピトープに結合する能力を保持する抗体機能性断片が含まれる。例示的な機能性断片としては、Fab断片(例えば、抗原結合ドメインを含有し、かつジスルフィド結合によって架橋された軽鎖と重鎖の一部とを含む抗体断片); Fab'(例えば、ヒンジ領域を介してFabと重鎖のさらなる部分とを含む単一の抗原結合ドメインを含有する抗体断片); F(ab')₂(例えば、重鎖のヒンジ領域で鎖間ジスルフィド結合によって接続された2つのFab'分子;該Fab'分子は、同じ又は異なるエピトープに対するものであり得る);二重特異性Fab(例えば、その各々が異なるエピトープに対するものであり得る2つの抗原結合ドメインを有するFab分子);可変領域を含む単鎖Fab鎖、別名、sFv(例えば、10~25個のアミノ酸の鎖によって連結された抗体の単一の軽鎖及び重鎖の可変の抗原結合決定領域);ジスルフィド結合Fv、又はdsFv(例えば、ジスルフィド結合によって連結された抗体単一の軽鎖及び重鎖の可変の抗原結合決定領域);ラクダ化VH(例えば、VH接触面のいくつかのアミノ酸が天然のラクダ抗体の重鎖に見出されるものである抗体の単一の重鎖の可変の抗原結合決定領域);二重特異性sFv(例えば、その各々が異なるエピトープに対するものであり得る2つの抗原結合ドメインを有するsFv又はdsFv分子);ダイアボディ(例えば、第1のsFvのVHドメインが第2のsFvのVLドメインと会合し、第1のsFvのVLドメインが第2のsFvのVHドメインと会合したときに形成される2量体化sFv;ダイアボディの2つの抗原結合領域は、同じ又は異なるエピトープに対するものであり得る);並びにトリアボディ(例えば、ダイアボディと同様の様式で形成されるが、単一の複合体中に3つの抗原結合ドメインが作り出される3量体化sFv; 3つの抗原結合ドメインは、同じ又は異なるエピトープに対するものであり得る)が挙げられる。抗体の誘導体には、抗体結合部位の1以上のCDR配列も含まれる。該CDR配列は、2以上のCDR配列が存在するとき、スクヤフォールド上で連結され得る。ある実施態様において、抗体は、単鎖Fv(「scFv」)を含む。scFvは、抗体のVH及びVLドメインを含む抗体断片であり、ここで、これらのドメインは、単一のポリペプチド鎖中に存在する。scFv ポリペプチドは、scFvが抗原結合のための所望の構造を形成するのを可能にするVHドメインとVLドメインの間のポリペプチドリッカーをさらに含み得る。scFvの総説については、Pluckthunの文献、モノクローナル抗体の薬理学(The Pharmacology of Monoclonal Antibodies)、第113巻、Rosenburg及びMoore編、Springer-Verlag, New York, 269~315ページ(1994)を参照されたい。

【0241】

(4. ヒト化抗体)

本開示は、ヒト及び/又はカニクイザル β クロトーを含む、 β クロトーに結合するヒト化抗体を提供する。本開示のヒト化抗体は、表1~10に示される1以上のCDRを含み得る。非ヒト抗体をヒト化するための様々な方法が当技術分野で公知である。例えば、ヒト化抗体は、非ヒトである源からそれに導入された1以上のアミノ酸残基を有することができる。これらの非ヒトアミノ酸残基は、しばしば「移入」残基と呼ばれ、これは、典型的には、「移入」可変ドメインから取得される。ヒト化は、例えば、Winter及び共同研究者らの方法(Jonesらの文献(1986) Nature 321:522-525; Riechmannらの文献(1988) Nature 332: 323-327; Verhoeyenらの文献(1988) Science 239:1534-1536)に従って、超可変領域配列をヒト抗体の対応する配列の代わりに用いることにより実施することができる。

【0242】

場合によっては、ヒト化抗体は、親非ヒト抗体(例えば、齧歯類)の6つの相補性決定領域(CDR)のアミノ酸配列がヒト抗体フレームワーク上に移植されるCDR移植によって構築される。例えば、Padlanら(FASEB J. 9:133-139, 1995)は、CDR中の残基の約3分の1しか実際に抗原と接触していないことを明らかにし、これらを「特異性決定残基」、又はSDRと命名した。SDR移植の技法では、SDR残基のみをヒト抗体フレームワーク上に移植する(例えば、Kashmiriらの文献、Methods 36: 25-34, 2005を参照されたい)。

【0243】

10

20

30

40

50

ヒト化抗体を作製する際に使用されることになる、軽鎖と重鎖の両方のヒト可変ドメインの選択は、抗原性を低下させるのに重要であり得る。例えば、いわゆる「最良適合」法に従って、非ヒト(例えば、齧歯類)抗体の可変ドメインの配列を既知のヒト可変ドメイン配列のライブラリー全体に対してスクリーニングする。齧歯類の配列に最も近いヒト配列をヒト化抗体用のヒトフレームワークとして選択することができる(Simsらの文献(1993) J. Immunol. 151:2296; Chothiaらの文献(1987) J. Mol. Biol. 196:901)。別の方法では、軽鎖又は重鎖の特定のサブグループの全てのヒト抗体のコンセンサス配列に由来する特定のフレームワークを使用する。同じフレームワークをいくつかの異なるヒト化抗体に使用することができる(Carterらの文献(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285; Prestaらの文献(1993) J. Immunol., 151:2623)。場合によっては、フレームワークは、最も大量に存在するヒトサブクラスであるV_L6サブグループI(V_L6I)及びV_HサブグループIII(V_H III)のコンセンサス配列に由来する。別の方法では、ヒト生殖系列遺伝子をフレームワーク領域の供給源として使用する。

10

【0244】

超ヒト化と呼ばれる、CDRの比較に基づく代替的なパラダイムでは、FRの相同性は重要ではない。この方法は、非ヒト配列と機能的ヒト生殖系列遺伝子レパートリーとの比較からなる。その後、マウス配列と同じ又は密接に関連する標準構造をコードする遺伝子を選択する。次に、非ヒト抗体と標準構造を共有する遺伝子の中で、CDR内での相同性が最も高いものをFRドナーとして選ぶ。最後に、非ヒトCDRをこれらのFR上に移植する(例えば、Tanらの文献、J. Immunol. 169: 1119-1125, 2002を参照されたい)。

20

【0245】

一般に、抗体は、抗原に対するその親和性及び他の有利な生物学的特性を保持したままヒト化されることがさらに望ましい。この目標を達成するために、1つの方法に従って、親配列及びヒト化配列の3次元モデルを用いた親配列及び様々な概念上のヒト化産物の解析のプロセスによってヒト化抗体を調製する。3次元の免疫グロブリンモデルは一般に利用可能であり、当業者にはよく知られている。選択された候補免疫グロブリン配列の可能性のある3次元立体構造を図示及び提示するコンピュータプログラムが利用可能である。これらには、例えば、WAM(Whitelegg及びReesの文献、Protein Eng. 13: 819-824, 2000)、Modeller(Sali及びBlundellの文献、J. Mol. Biol. 234: 779-815, 1993)、並びにSwiss PDB Viewer(Guex及びPeitschの文献、Electrophoresis 18: 2714-2713, 1997)が含まれる。これらの提示の検討により、候補免疫グロブリン配列の機能における残基の考えられる役割の解析、例えば、候補免疫グロブリンがその抗原に結合する能力に影響を及ぼす残基の解析が可能となる。このようにして、標的抗原に対する親和性の増大などの、所望の抗体特性が達成されるように、FR残基をレシピエント配列及び移入配列から選択し、組み合わせることができる。一般に、超可変領域残基は、抗原結合に影響を及ぼすことに直接的にかつ最も実質的に関与している。

30

【0246】

抗体のヒト化のための別の方法は、ヒトストリング含有量(HSC)と呼ばれる抗体のヒト性(humanness)の尺度に基づくものである。この方法は、マウス配列をヒト生殖系列遺伝子のレパートリーと比較し、その差異をHSCとしてスコア化する。その後、標的配列を、全体的な同一性尺度を用いるのではなく、そのHSCを最大化することによりヒト化して、複数の多様なヒト化変異体を作製する(Lazarらの文献、Mol. Immunol. 44: 1986-1998, 2007)。

40

【0247】

上記の方法に加えて、実験的な方法を用いて、ヒト化抗体を作製し、選択することができる。これらの方法には、ヒト化変異体の大規模ライブラリーの作製及び濃縮技術又はハイスループットスクリーニング法を用いた最良クローンの選択に基づくものが含まれる。抗体変異体は、ファージ、リボソーム、及び酵母ディスプレイライブラリーから並びに細菌コロニースクリーニングによって単離することができる(例えば、Hoogenboomの文献、Nat. Biotechnol. 23: 1105-1116, 2005; Dufnerらの文献、Trends Biotechnol. 24: 523-

50

529, 2006; Feldhausらの文献、Nat. Biotechnol. 21: 163-70, 2003; Schlapschyらの文献、Protein Eng. Des. Sel. 17: 847-60, 2004を参照されたい)。

【0248】

FRライブラリー法では、一群の残基変異体をFR中の特定の位置に導入し、その後、移植されたCDRを最も良好に支持するFRを選択するためのライブラリーの選択を行う。置換されることになる残基には、CDR構造に寄与する可能性があるものとして特定された「バーニア(Vernier)」残基の一部もしくは全て(例えば、Foote及びWinterの文献、J. Mol. Biol. 224: 487-499, 1992を参照されたい)、又はBacaら(J. Biol. Chem. 272: 10678-10684, 1997)によって特定されたより限定された標的残基のセット由来の一部もしくは全てが含まれ得る。

10

【0249】

FRシャッフリングでは、選択された残基変異体のコンビナトリアルライブラリーを作製する代わりに、FR全体を非ヒトCDRと組み合わせる(例えば、Dall'Acquaらの文献、Methods 36: 43-60, 2005を参照されたい)。このライブラリーを、最初にVLをヒト化し、その後、VHをヒト化する2段階選択プロセスにおいて、結合についてスクリーニングすることができる。或いは、1段階FRシャッフリングプロセスを使用することができる。そのようなプロセスは、結果として得られる抗体が、発現の増強、親和性及び熱安定性の増大を含む、生化学的及び物理化学的な特性の改善を示すので、2段階スクリーニングよりも効率的であることが示されている(例えば、Damschroderらの文献、Mol. Immunol. 44: 3049-60, 2007を参照されたい)。

20

【0250】

「ヒューマニアリング(humaneering)」法は、必須の最小特異性決定基(MSD)の実験的同定に基づくものであり、かつ非ヒト断片のヒトFRのライブラリーへの逐次的置き換え及び結合の評価に基づくものである。これは、非ヒトVH鎖及びVL鎖のCDR3の領域から開始され、非ヒト抗体の他の領域を、VHとVLの両方のCDR1及びCDR2を含む、ヒトFRへと徐々に置き換える。この方法は、通常、エピトープ保持及び異なるヒトVセグメントCDRを有する複数のサブクラスからの抗体の同定をもたらす。ヒューマニアリングは、ヒト生殖系列遺伝子抗体と91~96%相同である抗体の単離を可能にする(例えば、Alfenitoの文献、ケンブリッジ健康技術研究所主催第3回PEGS、タンパク質工学サミット2007(Cambridge Healthtech Institute's Third Annual PEPS, The Protein Engineering Summit, 2007)を参照されたい)。

30

【0251】

「ヒトエンジニアリング」法は、ヒトでの低下した免疫原性を有し、それにもかかわらず、もとの非ヒト抗体の望ましい結合特性を保持する修飾抗体を産生するように抗体のアミノ酸配列を特異的に変化させることにより、非ヒト抗体又は抗体断片、例えば、マウス又はキメラ抗体又は抗体断片を改変することを含む。一般に、この技法は、非ヒト(例えば、マウス)抗体のアミノ酸残基を、「低リスク」、「中リスク」、又は「高リスク」残基として分類することを含む。この分類は、(例えば、ヒトでの免疫原性のために)特定の置換を行うことの予測される利益を、該置換が結果として得られる抗体のフォールディングに影響を及ぼす及び/又はヒト残基と置換されるリスクとの対比で評価する全体的なリスク/報酬計算を用いて行われる。非ヒト(例えば、マウス)抗体配列の所与の位置(例えば、低又は中リスク)で置換されることになる特定のヒトアミノ酸残基は、非ヒト抗体の可変領域由来のアミノ酸配列を特異的又はコンセンサスヒト抗体配列の対応する領域と整列させることにより選択することができる。非ヒト配列中の低又は中リスク位置のアミノ酸残基を、アラインメントに従って、ヒト抗体配列中の対応する残基の代わりに用いることができる。ヒト人工タンパク質を作製する技法は、Studnickaらの文献、Protein Engineering, 7: 805-814(1994)、米国特許第5,766,886号、第5,770,196号、第5,821,123号、及び第5,869,619号、PCT出願公開WO 93/11794号により詳細に記載されている。

40

【0252】

(5. ヒト抗体)

50

ヒト抗 β クロトー抗体を、ヒト由来ファージディスプレイライブラリーから選択されるFvクローン可変ドメイン配列を既知のヒト定常ドメイン配列と組み合わせることにより構築することができる。或いは、本開示のヒトモノクローナル抗 β クロトー抗体をハイブリドーマ法によって作製することができる。ヒトモノクローナル抗体の産生のためのヒト骨髓腫及びマウス-ヒト異種骨髓腫細胞株は、例えば、Kozborの文献、J. Immunol., 133: 3001(1984); Brodeurらの文献、モノクローナル抗体産生技法及び応用(Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications)、51~63ページ(Marcel Dekker社、New York, 1987);及びBoernerらの文献、J. Immunol., 147: 86(1991)によって記載されている。

【0253】

10

免疫したときに、内在性免疫グロブリン産生の非存在下で、ヒト抗体の完全なレパートリー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)を作製することも可能である。ヒト抗体レパートリーを発現するトランスジェニックマウスは、多種多様な薬物標的候補に対する高親和性ヒト配列モノクローナル抗体を作製するために使用されている(例えば、Jakobovits, A.の文献、Curr. Opin. Biotechnol. 1995, 6(5):561-6; Bruggemann及びTaussingの文献、Curr. Opin. Biotechnol. 1997, 8(4):455-8; 米国特許第6,075,181号及び第6,150,584号;並びにLonbergらの文献、Nature Biotechnol. 23: 1117-1125, 2005を参照されたい)。

【0254】

20

或いは、ヒト抗体を、標的抗原に対する抗体を産生するヒトBリンパ球の不死化によって調製することができる(例えば、そのようなB細胞は、個体から回収されるものであってもよく、又はインビトロで免疫されたものであってもよい)(例えば、Coleらの文献、モノクローナル抗体及び癌療法(Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy)、Alan R. Liss, 77ページ(1985); Boernerらの文献、J. Immunol., 147(1):86-95(1991);及び米国特許第5,750,373号を参照されたい)。

【0255】

30

遺伝子シャッフリングを用いて、非ヒト、例えば、齧歯類の抗体からヒト抗体を得ることもでき、その場合、該ヒト抗体は、出発非ヒト抗体と同様の親和性及び特異性を有する。「エピトープインプリンティング」又は「ガイド選択(guided selection)」とも呼ばれるこの方法に従って、本明細書に記載されるファージディスプレイ法によって得られる非ヒト抗体断片の重鎖可変領域又は軽鎖可変領域のいずれかをヒトVドメイン遺伝子のレパートリーと置き換えて、非ヒト鎖/ヒト鎖のscFv又はFabキメラの集団を生成させる。抗原による選択によって、非ヒト鎖/ヒト鎖のキメラscFv又はFabの単離がもたらされ、その場合、該ヒト鎖は、1次ファージディスプレイクローン中の対応する非ヒト鎖を除去するときに破壊された抗原結合部位を回復する(例えば、エピトープが、ヒト鎖パートナーの選択をガイドする(刷り込む))。残りの非ヒト鎖を置き換えるために、このプロセスを反復すると、ヒト抗体が得られる(例えば、PCT WO 93/06213号;及びOsbornらの文献、Method s., 36, 61-68, 2005を参照されたい)。CDR移植による非ヒト抗体の従来のヒト化とは異なり、この技法では、非ヒト起源のFR残基もCDR残基も有しない、完全ヒト抗体が得られる。細胞表面抗原に対するマウス抗体をヒト化するためのガイド選択の例としては、卵巣癌細胞上に存在する葉酸結合タンパク質(例えば、Figiniらの文献、Cancer Res., 58, 991-996, 1998を参照されたい)及び肝細胞癌上で高度に発現されるCD147(例えば、Baoらの文献、Cancer Biol. Ther., 4, 1374-1380, 2005を参照されたい)が挙げられる。

40

【0256】

ガイド選択アプローチの潜在的な欠点は、一方の抗体鎖を、もう一方を不変に保持しながらシャッフリングすると、エピトープドリフトが生じる可能性があることである。非ヒト抗体によって認識されるエピトープを維持するために、CDR保持を適用することができる(例えば、Klimkaらの文献、Br. J. Cancer., 83, 252-260, 2000; VH CDR2 Beiboerらの文献、J. Mol. Biol., 296, 833-49, 2000を参照されたい)。この方法では、非ヒトVH CDR3が一般に保持されるが、それは、このCDRが抗原結合部位の中心にあり得、かつ抗原

50

認識のための最も重要な抗体領域であり得るからである。しかしながら、場合によっては、非ヒト抗体のVH CDR3及びVL CDR3、並びにVH CDR3、VL CDR3、及びVL CDR1が保持され得る。

【0257】

(6. 二重特異性抗体)

二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なる抗原に対する結合特異性を有するモノクローナル抗体である。ある実施態様において、二重特異性抗体は、ヒト又はヒト化抗体である。ある実施態様において、結合特異性のうちの一方は、 β クロトーに対するものであり、もう一方は、任意の他の抗原に対するものである。いくつかの実施態様において、結合特異性のうちの一方は、 β クロトーに対するものであり、もう一方は β クロトー及びFGF受容体(例えば、FGFR1c、FGFR2c、FGFR3c、FGFR4)を発現する細胞上で発現される別の表面抗原に対するものである。ある実施態様において、二重特異性抗体は、 β クロトーの2つの異なるエピトープに結合してもよい。二重特異性抗体は、全長抗体又は抗体断片(例えば、F(ab')₂二重特異性抗体)として調製することができる。

【0258】

二重特異性抗体を作製するための方法は当技術分野で公知であり、例えば、2つの重鎖が異なる特異性を有する2つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の共発現によるものなどがある(例えば、Milstein及びCuellarの文献、Nature, 305: 537(1983)を参照されたい)。二重特異性抗体の作製のさらなる詳細については、例えば、二重特異性抗体(Bispecific Antibodies)、Kontermann編、Springer-Verlag, Hiedelberg(2011)を参照されたい。

【0259】

(7. 多価抗体)

多価抗体は、抗体が結合する抗原を発現する細胞によって二価抗体よりも速く内在化(及び/又は異化)され得る。本開示の抗体は、3以上の抗原結合部位を有する(IgMクラスのもの以外である)多価抗体(例えば、四価抗体)であることができ、これは、抗体のポリペプチド鎖をコードする核酸の組換え発現によって容易に産生することができる。多価抗体は、二量体化ドメイン及び3以上の抗原結合部位を含むことができる。ある実施態様において、二量体化ドメインは、Fc領域もしくはヒンジ領域を含む(又はそれらからなる)。この状況では、抗体は、Fc領域及び該Fc領域のアミノ末端にある3以上の抗原結合部位を含むことになる。ある実施態様において、多価抗体は、3つ〜約8つの抗原結合部位を含む(又はそれらからなる)。1つのそのような実施態様において、多価抗体は、4つの抗原結合部位を含む(又はそれらからなる)。多価抗体は、少なくとも1つのポリペプチド鎖(例えば、2つのポリペプチド鎖)を含み、ここで、該ポリペプチド鎖は、2以上の可変ドメインを含む。例えば、該ポリペプチド鎖は、VD1-(X1)n-VD2-(X2)n-Fcを含むことができ、ここで、VD1は、第1の可変ドメインであり、VD2は、第2の可変ドメインであり、Fcは、Fc領域の1つのポリペプチド鎖であり、X1及びX2は、アミノ酸又はポリペプチドを表し、nは0又は1である。例えば、該ポリペプチド鎖は：VH-CH1-柔軟なリンカー-VH-CH1-Fc領域の鎖；又はVH-CH1-VH-CH1-Fc領域の鎖を含むことができる。本明細書における多価抗体は、少なくとも2つ(例えば、4つ)の軽鎖可変ドメインポリペプチドをさらに含むことができる。本明細書における多価抗体は、例えば、約2つ〜約8つの軽鎖可変ドメインポリペプチドを含むことができる。ここで想定される軽鎖可変ドメインポリペプチドは、軽鎖可変ドメインを含み、任意に、CLドメインをさらに含む。

【0260】

(8. Fcエンジニアリング)

β クロトーに対する抗体を、例えば、該抗体の抗原依存性細胞媒介性細胞傷害性(ADCC)及び/又は補体依存性細胞傷害性(CDC)を減少させ又は除去するために、エフェクター機能に関するものを含め、Fcエンジニアリングによって改変することが望ましい場合がある。これは、抗体のFc領域に1以上のアミノ酸置換を導入することにより達成することができる。例えば、位置233〜236のIgG2残基並びに位置327、330、及び331のIgG4残基を用いたヒトIgG1への置換は、ADCC及びCDCを大きく低下させることが示された(例えば、Armourら

の文献、Eur. J. Immunol. 29:(8):2613-24(1999); Shieldsらの文献、J. Biol. Chem. 276(9): 6591-604(2001)を参照されたい)。

【0261】

抗体の血清半減期を延長させるために、例えば、米国特許第5,739,277号に記載されているように、サルベージ受容体結合エピトープを抗体(特に、抗体断片)に組み込むことができる。「サルベージ受容体結合エピトープ」という用語は、IgG分子のインビボ血清半減期を延長させるのに関与するIgG分子(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、又はIgG4)のFc領域のエピトープを指す。

【0262】

(9.代替的な結合物質)

本開示は、本明細書に開示される抗 β クロトー抗体と同じエピトープに特異的に結合する非免疫グロブリン結合物質を包含する。いくつかの実施態様において、非免疫グロブリン結合物質は、競合結合アッセイにおいて本開示の抗 β クロトー抗体を置換するか又はそれによって置換される作用物質として同定される。これらの代替的な結合物質には、例えば、当技術分野で公知の人工タンパク質スキュフォールドのいずれかが含まれ得る。そのようなスキュフォールドは、表1~10に示される1以上のCDRを含み得る。そのようなスキュフォールドとしては、例えば、リガンド結合部位を形成する4つの超可変ループを支持する強固な β -バレルを特徴とするタンパク質構造であるリボカリンスキュフォールドを基にした、アンチカリンが挙げられる。新規の結合特異性は、機能的提示及びガイド選択と組み合わせた、ループ領域における標的ランダム突然変異誘発によって改変することができる(例えば、Skerraの文献(2008) FEBS J. 275: 2677-2683を参照されたい)。他の好適なスキュフォールドとしては、例えば、ヒトフィブロネクチンIIIの10番目の細胞外ドメインを基にしたアドネクチン又はモノボディ(例えば、Koide及びKoideの文献(2007) Methods Mol. Biol. 352: 95-109を参照されたい);ブドウ球菌プロテインAのZドメインを基にしたアフイボディ(例えば、Nygrenらの文献(2008) FEBS J. 275: 2668-2676)を参照されたい);アンキリンリピートタンパク質を基にしたDARPin(例えば、Stumppらの文献(2008) Drug. Discov. Today 13: 695-701を参照されたい);ヒトFynタンパク質キナーゼのSH3ドメインを基にしたフィノマー(Grabulovskiらの文献(2007) J. Biol. Chem. 282: 3196-3204);スルフォロバス・アシドラリウス(*Sulfolobus acidolaris*)由来のSac7dを基にしたアフイチン(例えば、Krehenbrinkらの文献(2008) J. Mol. Biol. 383: 1058-1068を参照されたい);ヒトy-B-クリスタリンを基にしたアフイリン(例えば、Ebersbachらの文献(2007) J. Mol. Biol. 372: 172-185を参照されたい);膜受容体タンパク質のAドメインを基にしたアビマー(例えば、Silvermanらの文献(2005) Biotechnol. 23: 1556-1561を参照されたい);システインリッチノッチンペプチド(例えば、Kolmar(2008) FEBS J. 275: 2684-2690を参照されたい);及び人工クニッツ型インヒビター(例えば、Nixon及びWoodの文献(2006) Curr. Opin. Drug. Discov. Dev. 9: 261-268を参照されたい)を挙げることができる。総説については、例えば、Gebauer及びSkerraの文献(2009) Curr. Opin. Chem. Biol. 13: 245-255を参照されたい。

【0263】

(抗体変異体)

いくつかの実施態様において、 β クロトーに結合する又は本明細書に記載される抗体のアミノ酸配列修飾が想定される。例えば、結合親和性及び/又は限定されないが、特異性、熱安定性、発現レベル、エフェクター機能、グリコシル化、低下した免疫原性、もしくは溶解性を含む、抗体の他の生物学的特性を改善することが望ましい場合がある。したがって、本明細書に記載される抗 β クロトー抗体に加えて、抗 β クロトー抗体変異体を調製することができることが想定される。例えば、抗 β クロトー抗体変異体は、コードするDNAに適切なヌクレオチド変化を導入することによって、及び/又は所望の抗体もしくはポリペプチドの合成によって調製することができる。当業者は、アミノ酸変化が、グリコシル化部位の数又は位置を変化させたり、又は膜アンカリング特性を改変したりするなどの、抗 β クロトー抗体の翻訳後プロセスを改変し得ることを認識しているであろう。

【0264】

いくつかの実施態様において、本明細書に提供される抗体を、例えば、該抗体への任意のタイプの分子の共有結合的結合によって化学的に修飾する。抗体誘導体には、例えば、グリコシル化、アセチル化、ペグ化、リン酸化、アミド化、既知の保護基/遮断基による誘導体化、タンパク質分解的切断、細胞リガンド又は他のタンパク質への結合などによって化学的に修飾されている抗体が含まれ得る。数多くの化学修飾はいずれも、限定されないが、特異的な化学的切断、アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシンの代謝合成などを含む、既知の技法によって実施することができる。さらに、該抗体は、1以上の非典型的アミノ酸を含有し得る。

【0265】

変異は、ネイティブ配列抗体又はポリペプチドと比較したときにアミノ酸配列の変化をもたらす抗体又はポリペプチドをコードする1以上のコドンの置換、欠失、又は挿入であり得る。アミノ酸置換は、ロイシンとセリンとの置換などの、あるアミノ酸を類似の構造的及び/又は化学的特性を有する別のアミノ酸と置き換える結果として生じるもの、例えば、保存的アミノ酸置換であることができる。挿入又は欠失は、任意に、約1~5アミノ酸の範囲のものであってもよい。ある実施態様において、置換、欠失、又は挿入は、もとの分子に対する25未満のアミノ酸置換、20未満のアミノ酸置換、15未満のアミノ酸置換、10未満のアミノ酸置換、5未満のアミノ酸置換、4未満のアミノ酸置換、3未満のアミノ酸置換、又は2未満のアミノ酸置換を含む。具体的な実施態様において、置換は、1以上の推定非必須アミノ酸残基で行われる保存的アミノ酸置換である。許容される変異は、配列中でアミノ酸の挿入、欠失、又は置換を系統的に行い、結果として得られる変異体を全長又は成熟ネイティブ配列によって示される活性について試験することにより決定することができる。

【0266】

アミノ酸配列挿入物としては、長さが1残基から100以上の残基を含有するポリペプチドまでの範囲に及ぶアミノ及び/又はカルボキシル末端融合体、並びに単一又は複数のアミノ酸残基の配列内挿入物が挙げられる。末端挿入物の例としては、N末端メチオニル残基を有する抗体が挙げられる。抗体分子の他の挿入変異体としては、抗体のN末端又はC末端と、抗体の血清半減期を延長させる酵素(例えば、抗体指向性酵素プロドラッグ療法用のもの)又はポリペプチドとの融合体が挙げられる。

【0267】

抗体の生物学的特性の実質的な修飾は、(a)置換領域内のポリペプチド骨格の、例えば、シート状もしくはらせん状立体構造としての構造、(b)標的部位での分子の電荷もしくは疎水性、又は(c)側鎖のかさの維持に対するその効果が顕著に異なる置換を選択することにより達成される。或いは、保存的な(例えば、類似の特性及び/又は側鎖を有するアミノ酸グループ内での)置換は、該特性を維持し、又はそれを著しくは変化させないように行うことができる。アミノ酸は、その側鎖の特性の類似性に従ってグループ分けすることができる(例えば、A. L. Lehningerの文献、Biochemistry、第2版、73~75ページ、Worth Publishers, New York(1975)を参照されたい):(1)非極性: Ala(A)、Val(V)、Leu(L)、Ile(I)、Pro(P)、Phe(F)、Trp(W)、Met(M);(2)非荷電極性: Gly(G)、Ser(S)、Thr(T)、Cys(C)、Tyr(Y)、Asn(N)、Gln(Q);(3)酸性: Asp(D)、Glu(E);及び(4)塩基性: Lys(K)、Arg(R)、His(H)。

【0268】

或いは、天然に存在する残基を、共通の側鎖特性に基づいてグループに分けることもできる:(1)疎水性: ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile;(2)中性親水性: Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;(3)酸性: Asp、Glu;(4)塩基性: His、Lys、Arg;(5)鎖の配向に影響を及ぼす残基: Gly、Pro;及び(6)芳香族: Trp、Tyr、Phe。

【0269】

非保存的置換は、これらのクラスのうちの1つのメンバーを別のクラスと交換することを伴う。そのような置換された残基を、保存的置換部位に、又は残りの(非保存的)部位に

導入することもできる。したがって、一実施態様において、 β クロトーエピトープに結合する抗体又はその断片は、本明細書に記載されるマウスモノクローナル抗体のアミノ酸配列と少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含む。一実施態様において、 β クロトーエピトープに結合する抗体又はその断片は、表1~10に示されるアミノ酸配列と少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含む。また別の実施態様において、 β クロトーエピトープに結合する抗体又はその断片は、表1~10に示されるVH CDRアミノ酸配列及び/又は表1~10に示されるVL CDRアミノ酸配列と少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも99%同一であるVH CDR及び/又はVL CDRアミノ酸配列を含む。変異は、当技術分野で公知の方法、例えば、オリゴヌクレオチド媒介(部位特異的)突然変異誘発、アラニンスキャニング、及びPCR突然変異誘発を用いて起こすことができる。部位特異的突然変異誘発(例えば、Carterらの文献、Nucl. Acids Res., 13: 4331(1986); Zollerらの文献、Nucl. Acids Res., 10:6487(1987)を参照されたい)、カセット突然変異誘発(例えば、Wellsらの文献、Gene, 34:315(1985)を参照されたい)、制限選択突然変異誘発(例えば、Wellsらの文献、Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317: 415(1986)を参照されたい)、又は他の公知の技法をクローニングされたDNAに対して実施して、抗 β クロトー抗体変異体DNAを産生することができる。

【0270】

抗 β クロトー抗体の適切な立体構造の維持に関与していない任意のシステイン残基を、例えば、別のアミノ酸、例えば、アラニン又はセリンと置換して、分子の酸化安定性を向上させ、異常な架橋を妨げることもできる。逆に、システイン結合を抗 β クロトー抗体に付加して、その安定性を向上させることができる(例えば、抗体が、Fv断片などの抗体断片である場合)。

【0271】

いくつかの実施態様において、本開示の抗 β クロトー抗体分子は、「脱免疫(de-immunized)」抗体である。「脱免疫」抗 β クロトー抗体は、それぞれのもとの非脱免疫抗体と比較して、そのアミノ酸配列中に抗体の免疫原性の低下をもたらす1以上の改変を有する、ヒト化又はキメラ抗 β クロトー抗体に由来する抗体である。そのような抗体突然変異体を作製するための手順の1つは、抗体分子のT細胞エピトープの同定及び除去を含む。最初の段階では、抗体分子の免疫原性を、いくつかの方法によって、例えば、当技術分野で公知であるような、インビトロでのT細胞エピトープの決定又はそのようなエピトープのインシリコ予測によって決定することができる。ひとたびT細胞エピトープ機能のための決定的に重要な残基が同定されてしまえば、免疫原性を除去し、かつ抗体活性を保持するように突然変異を起こすことができる。総説については、例えば、Jonesらの文献、Methods in Molecular Biology 525: 405-423, 2009を参照されたい。

【0272】

(1. インビトロ親和性成熟)

いくつかの実施態様において、親抗体と比較して、親和性、安定性、又は発現レベルなどの特性が改善された抗体変異体をインビトロ親和性成熟によって調製することができる。天然のプロトタイプと同様に、インビトロ親和性成熟は、突然変異及び選択の原理に基づく。抗体のライブラリーは、Fab、scFv、又はVドメイン断片として、生物(例えば、ファージ、細菌、酵母、もしくは哺乳動物細胞)の表面上に、又はそれらがコードするmRNAもしくはDNAと(例えば、共有結合的もしくは非共有結合的に)関連した状態で提示される。提示された抗体の親和性選択により、抗体をコードする遺伝情報を保有する生物又は複

合体の単離が可能になる。ファージディスプレイなどのディスプレイ法を用いた2回又は3回の突然変異及び選択により、通常、低ナノモル濃度の範囲の親和性を有する抗体断片が得られる。好ましい親和性成熟抗体は、標的抗原に対してナノモル濃度又はさらにはピコモル濃度の親和性を有する。

【0273】

ファージディスプレイは、抗体の提示及び選択のための広く普及している方法である。抗体を、バクテリオファージコートタンパク質との融合体として、Fd又はM13バクテリオファージの表面に提示させる。選択は、ファージに提示された抗体をその標的に結合させるための抗原への曝露を伴い、このプロセスは「パニング」と呼ばれる。抗原に結合したファージを回収し、細菌に感染させて、さらなる回数の選択のためのファージを産生させる。総説については、例えば、Hoogenboomの文献、Methods. Mol. Biol. 178: 1-37, 2002; Bradbury及びMarksの文献、J. Immuno. Methods 290: 29-49, 2004を参照されたい。

【0274】

酵母ディスプレイ系(例えば、Boderらの文献、Nat. Biotech. 15: 553-57, 1997; Chaoらの文献、Nat. Protocols 1:755-768, 2006を参照されたい)では、抗体を、重鎖及び軽鎖が柔軟なリンカーによって接続されている単鎖可変融合体(scFv)として提示させることができる。scFvを、Aga1pとのジスルフィド結合によって酵母細胞壁に付着している酵母凝集素タンパク質Aga2pの接着サブユニットに融合させる。Aga2pを介したタンパク質の提示により、該タンパク質が細胞表面から離れて突き出され、酵母細胞壁上の他の分子と相互作用する可能性が最小限に抑えられる。磁気分離及びフローサイトメトリーを用いて、ライブラリーをスクリーニングし、親和性又は安定性が向上した抗体について選択する。対象となる可溶性抗原に対する結合は、ビオチン化された抗原と蛍光団にコンジュゲートされたストレプトアビジンなどの2次試薬とによる酵母の標識によって決定される。抗体の表面発現の変動は、scFvに隣接する赤血球凝集素又はc-Mycエピトープタグのいずれかの免疫蛍光標識によって測定することができる。発現は、提示されたタンパク質の安定性と相関することが示されており、したがって、抗体を安定性及び親和性の向上について選択することができる(例えば、Shustaらの文献、J. Mol. Biol. 292: 949-956, 1999を参照されたい)。酵母ディスプレイのさらなる利点は、提示されたタンパク質が真核酵母細胞の小胞体でフォールディングされ、小胞体シャペロン及び品質管理機構を利用することである。ひとたび成熟が完了すると、抗体親和性を、酵母の表面に提示されたままで好都合に「漸増させ」、各々のクローンの発現及び精製の必要性をなくすることができる。酵母表面ディスプレイの理論的限界は、他のディスプレイ法よりも機能的なライブラリーのサイズが小さくなる可能性があることであるが;最近のアプローチは、酵母細胞の接合システムを用いて、 10^{14} のサイズであると推定される組み合わせ多様性を生み出してる(例えば、米国特許公開第2003/0186,374号; Blaiseらの文献、Gene 342: 211-218, 2004を参照されたい)。

【0275】

リボソームディスプレイでは、抗体-リボソーム-mRNA(ARM)複合体が無細胞系での選択のために作製される。抗体の特定のライブラリーをコードするDNAライブラリーを、終止コドンで欠くスペーサー配列と遺伝的に融合させる。このスペーサー配列は、翻訳されたとき、ペプチジルtRNAと付着したままで、リボソームトンネルを占有し、そのため、対象となるタンパク質がリボソームから突き出てフォールディングすることが可能になる。結果として生じるmRNA、リボソーム、及びタンパク質の複合体は、表面に結合したりリガンドに結合することができ、該リガンドによる親和性捕捉によって、抗体とそれをコードするmRNAの同時単離が可能になる。その後、リボソームに結合したmRNAを逆転写させてcDNAに戻し、これをその後、突然変異誘発に供して、次の選択で使うことができる(例えば、Fukudaらの文献、Nucleic Acids Res. 34, e127, 2006を参照されたい)。mRNAディスプレイでは、ピューロマイシンをアダプター分子として用いて、抗体とmRNAの共有結合が確立される(Wilsonらの文献、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 3750-3755, 2001)。

【0276】

これらの方法は全てインビトロで行われるので、それらは他の選択技術に優る2つの主な利点を提供する。第1に、ライブラリーの多様性は、細菌細胞の形質転換効率によってではなく、試験管内に存在するリボソーム及び様々なmRNA分子の数のみによって限定される。第2に、どの多様化段階の後にもライブラリーを形質転換する必要がないので、ランダムな突然変異を、各々の選択回の後に、例えば、非ブルーフリーディングポリメラーゼによって容易に導入することができる。

【0277】

多様性は、抗体ライブラリーのCDR又はV遺伝子全体に、狙った形で又はランダム導入によって導入することができる。前者のアプローチは、高レベル又は低レベルの突然変異誘発によって抗体のCDRの全てを逐次標的とするか、或いは体細胞超突然変異の孤立したホットスポット(例えば、Hoらの文献、J. Biol. Chem. 280: 607-617, 2005を参照されたい)又は実験的根拠もしくは構造的な理由から親和性に影響を及ぼすことが疑われる残基を標的とすることを含む。ランダム突然変異は、大腸菌突然変異誘発株、DNAポリメラーゼによるエラーを起こしやすい複製(例えば、Hawkinsらの文献、J. Mol. Biol. 226: 889-896, 1992を参照されたい)、又はRNAレプリカーゼを用いて、V遺伝子全体にわたって導入することができる。多様性は、DNAシャッフリング又は類似の技法による、天然に多様性のある領域の置換によって導入することもできる(例えば、Luらの文献、J. Biol. Chem. 278: 43496-43507, 2003; 米国特許第5,565,332号; 米国特許第6,989,250号を参照されたい)。代替的な技法は、フレームワーク領域残基に伸長している超可変ループを標的とするか(例えば、Bondらの文献、J. Mol. Biol. 348: 699-709, 2005を参照されたい)、CDRにおけるループの欠失及び挿入を利用するか、又はハイブリダイゼーションに基づく多様化を使用する(例えば、米国特許公開第2004/0005709号を参照されたい)。CDRにおける多様性を生じさせるさらなる方法は、米国特許第7,985,840号に開示されている。

【0278】

ライブラリーのスクリーニングは、当技術分野で公知の様々な技法によって達成することができる。例えば、 β クロトーを、固体支持体、カラム、ピン、もしくはセルロース/ポリ(フッ化ビニリデン)膜/他のフィルター上に固定化し、吸着プレートに固定されるか、もしくは細胞選別で使用される宿主細胞上で発現させ、又はストレプトアビジンコーティングされたビーズによる捕捉のためにビオチンにコンジュゲートし、又はディスプレイライブラリーをパニングするための任意の他の方法で 사용할 ことができる。

【0279】

インビトロ親和性成熟法の総説については、例えば、Hoogenboomの文献、Nature Biotechnology 23: 1105-1116, 2005、並びにQuiroz及びSinclairの文献、Revista Ingenieria Biomedica 4: 39-51, 2010、並びにそれらの中の参考文献を参照されたい。

【0280】

(2. 抗 β クロトー抗体の修飾)

抗 β クロトー抗体の共有結合的修飾は本開示の範囲内に含まれる。共有結合的修飾は、抗 β クロトー抗体の標的アミノ酸残基を、抗 β クロトー抗体の選択された側鎖又はN末端もしくはC末端残基と反応することができる有機誘導体化剤と反応させることを含む。他の修飾には、グルタミル残基及びアスパラギン残基の、それぞれ、対応するグルタミル残基及びアスパルチル残基への脱アミド化、プロリン及びリジンのヒドロキシル化、セリル残基又はトレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リジン、アルギニン、及びヒスチジン側鎖の α -アミノ基のメチル化(例えば、T.E. Creightonの文献、タンパク質: 構造及び分子特性(Proteins: Structure and Molecular Properties)、W.H. Freeman & Co., San Francisco, 79~86ページ(1983)を参照されたい)、N末端アミンのアセチル化、並びに任意のC末端カルボキシル基のアミド化が含まれる。

【0281】

本開示の範囲内に含まれる抗 β クロトー抗体の他のタイプの共有結合的修飾には、抗体又はポリペプチドのネイティブなグリコシル化パターンを改変すること(例えば、Beckらの文献、Curr. Pharm. Biotechnol. 9: 482-501, 2008; Walshの文献、Drug Discov. Tod

10

20

30

40

50

ay 15: 773-780, 2010を参照されたい)、及び抗体を、様々な非タンパク質性ポリマー、例えば、ポリエチレングリコール(PEG)、ポリプロピレングリコール、又はポリオキシアルキレンのうちの1つに、米国特許第4,640,835号;第4,496,689号;第4,301,144号;第4,670,417号;第4,791,192号、又は第4,179,337号に記載されている様式で連結することが含まれる。

【0282】

本開示の抗 β クロトー抗体を、抗 β クロトー抗体が、別の異種ポリペプチド又はアミノ酸配列、例えば、エピトープタグ(例えば、Terpeの文献、Appl. Microbiol. Biotechnol. 60: 523-533, 2003を参照されたい)又はIgG分子のFc領域(例えば、抗体融合タンパク質(Antibody Fusion Proteins)、S.M. Chamow及びA. Ashkenazi編、Wiley-Liss, New York, 1999、221~242ページのAruffoの文献、「免疫グロブリン融合タンパク質(Immunoglobulin fusion proteins)」を参照されたい)と融合したものを含むキメラ分子を形成するように修飾することもできる。

10

【0283】

また本明細書に提供されるのは、 β クロトー抗原に結合する本明細書に提供される抗体と異種ポリペプチドとを含む融合タンパク質である。いくつかの実施態様において、抗体を融合させる異種ポリペプチドは、該抗体を、細胞表面に発現した β クロトーを有する細胞に標的化するのに有用である。

【0284】

また本明細書に提供されるのは、 β クロトー抗原に結合する抗体のパネルである。具体的な実施態様において、抗体のパネルは、異なる会合速度定数、異なる解離速度定数、 β クロトー抗原に対する異なる親和性、及び/又は β クロトー抗原に対する異なる特異性を有する。いくつかの実施態様において、該パネルは、約10、約25、約50、約75、約100、約125、約150、約175、約200、約250、約300、約350、約400、約450、約500、約550、約600、約650、約700、約750、約800、約850、約900、約950、もしくは約1000個の抗体、又はそれより多くの抗体を含む、或いは該抗体からなる。抗体のパネルは、例えば、ELISAなどのアッセイのための、例えば、96ウェル又は384ウェルプレートで 사용할 ことができる。

20

【0285】

(抗 β クロトー抗体の調製)

抗 β クロトー抗体は、抗 β クロトー抗体をコードする核酸を含むベクターで形質転換又はトランスフェクトされた細胞を培養することにより産生することができる。本開示の抗体のポリペプチド成分をコードするポリヌクレオチド配列は、標準的な組換え技法を用いて得ることができる。所望のポリヌクレオチド配列をハイブリドーマ細胞などの抗体産生細胞から単離し、シークエンシングすることができる。或いは、ポリヌクレオチドを、ヌクレオチド合成装置又はPCR法を用いて合成することができる。ひとたび得られれば、ポリペプチドをコードする配列を、宿主細胞内で異種ポリヌクレオチドを複製及び発現することができる組換えベクター中に挿入する。当技術分野で入手可能でありかつ公知である多くのベクターを本開示の目的のために使用することができる。適切なベクターの選択は、主に、ベクター中に挿入される核酸のサイズ及びベクターで形質転換される具体的な宿主細胞に依存する。本開示の抗体を発現させるのに好適な宿主細胞としては、原核生物、例えば、グラム陰性又はグラム陽性生物を含む、古細菌(Archaeobacteria)及び真正細菌(Eubacteria)、真核微生物、例えば、糸状菌又は酵母、無脊椎動物細胞、例えば、昆虫細胞又は植物細胞、並びに脊椎動物細胞、例えば、哺乳動物宿主細胞株が挙げられる。宿主細胞を上記の発現ベクターで形質転換させて、プロモーターを誘導するか、形質転換体を選択するか、又は所望の配列をコードする遺伝子を増幅するために適宜修飾された従来の栄養培地中で培養する。宿主細胞によって産生された抗体は、当技術分野で公知の標準的なタンパク質精製法を用いて精製される。

30

40

【0286】

ベクターの構築、発現、及び精製を含む、抗体生産方法は、Pluckthunらの文献(1996)

50

、抗体エンジニアリング:大腸菌における抗体産生: PCRから発酵まで(Antibody Engineering: Producing antibodies in Escherichia coli: From PCR to fermentation)(McCafferty, J., Hoogenboom, H. R., 及びChiswell, D. J.編)、初版、203~252ページ、IRL Press, Oxford; Kwong, K. 及びRader, C. の文献、Fab抗体断片の大腸菌発現及び精製(E. coli expression and purification of Fab antibody fragments)、タンパク質科学の最新プロトコル編集委員会(Current protocols in protein science editorial board)、John E Coliganら、第6章、ユニット6.10(2009); Tachibana及びTakekoshiの文献、「大腸菌における抗体Fab断片の産生(Production of Antibody Fab Fragments in Escherichia coli)」、抗体発現及び産生(Antibody Expression and Production)、M. Al-Rubeai編、Springer, New York, 2011; 治療用モノクローナル抗体:ベンチから臨床まで(Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic)(Z. An編), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USAにさらに記載されている。 10

【0287】

当然ながら、当技術分野で周知である代替的な方法を利用して、抗βクロトー抗体を調製し得ることが想定される。例えば、適切なアミノ酸配列又はその部分を、固相法を用いた直接ペプチド合成によって産生することができる(例えば、Stewartらの文献、固相ペプチド合成(Solid-Phase Peptide Synthesis)、W.H. Freeman Co., San Francisco, CA(1969); Merrifieldの文献、J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154(1963)を参照されたい)。インビトロのタンパク質合成は、手作業の技法を用いて又は自動化によって行うことができる。抗βクロトー抗体の様々な部分を別々に化学合成し、化学的又は酵素的な方法を用いて組み合わせ、所望の抗βクロトー抗体を産生することができる。或いは、抗体を、例えば、米国特許第5,545,807号及び米国特許第5,827,690号に開示されているように、抗体を発現するよう改変されたトランスジェニック動物の細胞又は体液、例えば、乳から精製することができる。 20

【0288】

(免疫コンジュゲート)

本開示はまた、合成リンカーによって1以上の非抗体物質に共有結合された本開示の抗βクロトー抗体のいずれか1つを含むコンジュゲートを提供する。

【0289】

様々な放射性同位体が、放射性コンジュゲートされた抗体の産生のために利用可能である。例としては、 At^{211} 、I4、I4、Y4、Re4、Re4、Sm4、Bi4、P4、Pb4、及びLuの放射性同位体が挙げられる。コンジュゲートを検出用に使用する場合、それは、シンチグラフィ試験用の放射性原子、例えば、tc4もしくはI4、又は核磁気共鳴(NMR)画像法(別名、磁気共鳴画像法、MRI)用のスピン標識、例えば、この場合もヨウ素-123、ヨウ素-131、インジウム-111、フッ素-19、炭素-13、窒素-15、酸素-17、ガドリニウム、マンガン、もしくは鉄を含み得る。放射性同位体は、例えば、Reillyの文献、「モノクローナル抗体及びペプチドの放射化学(The radiochemistry of monoclonal antibodies and peptides)」、モノクローナル抗体及び癌のペプチド標的放射線療法(Monoclonal Antibody and Peptide-Targeted Radiotherapy of Cancer)、R.M. Reilly編、Wiley, Hoboken N.J., 2010に記載されているような公知の方法でコンジュゲート中に組み入れることができる。 30 40

【0290】

いくつかの実施態様において、本明細書に提供される抗体を、診断剤、検出可能な薬剤、もしくは治療剤、又は任意の他の分子にコンジュゲートするか又は組換えにより融合させる。コンジュゲートされているか又は組換えにより融合させられている抗体は、例えば、臨床試験手順の一部として、βクロトー媒介疾患の発生、発症、進行、及び/又は重症度をモニタリング又は予後予測する、例えば、特定の療法の効力を決定するのに有用であり得る。

【0291】

そのような診断及び検出は、例えば、抗体を検出可能な物質にカップリングさせることにより達成することができ、該検出可能な物質には、様々な酵素、例えば、限定されない 50

が、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、又はアセチルコリンエステラーゼ;補欠分子族、例えば、限定されないが、ストレプトアビジン/ビオチン及びアビジン/ビオチン;蛍光物質、例えば、限定されないが、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリド、又はフィコエリスリン;発光物質、例えば、限定されないが、ルミノール;生体発光物質、例えば、限定されないが、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、及びイクオリン;化学発光物質、例えば、限定されないが、アクリジニウム系化合物又はHALOTAG;放射性物質、例えば、限定されないが、ヨウ素(^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{123}I 、及び ^{121}I)、炭素(^{14}C)、硫黄(^{35}S)、トリチウム(^3H)、インジウム(^{115}In 、 ^{113}In 、 ^{112}In 、及び ^{111}In)、テクネチウム(^{99}Tc)、タリウム(^{201}Ti)、ガリウム(^{68}Ga 、 ^{67}Ga)、パラジウム(^{103}Pd)、モリブデン(^{99}Mo)、キセノン(^{133}Xe)、フッ素(^{18}F)、 ^{153}Sm 、 ^{177}Lu 、 ^{159}Gd 、 ^{149}Pm 、 ^{140}La 、 ^{175}Yb 、 ^{166}Ho 、 ^{90}Y 、 ^{47}Sc 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{142}Pr 、 ^{105}Rh 、 ^{97}Ru 、 ^{68}Ge 、 ^{57}Co 、 ^{65}Zn 、 ^{85}Sr 、 ^{32}P 、 ^{153}Gd 、 ^{169}Yb 、 ^{51}Cr 、 ^{54}Mn 、 ^{75}Se 、 ^{113}Sn 、並びに ^{117}Sn ;並びに様々な陽電子放射断層撮影法を用いる陽電子放射金属、並びに非放射性常磁性金属イオンが含まれるが、これらに限定されない。

【0292】

また本明細書に提供されるのは、治療的部分(又は1以上の治療的部分)にコンジュゲートされているか又は組換えにより融合させられている抗体、及びその使用である。該抗体を治療的部分にコンジュゲートするか又は組換えにより融合させることができ、該治療的部分には、細胞毒素、例えば、静細胞剤もしくは殺細胞剤、治療剤、又は放射性金属イオン、例えば、 α -放射体が含まれる。細胞毒素又は細胞毒性剤には、細胞に有害である任意の薬剤が含まれる。

【0293】

さらに、本明細書に提供される抗体を、所与の生物学的応答を修飾する治療的部分又は薬物部分にコンジュゲートするか又は組換えにより融合させることができる。治療的部分又は薬物部分は、古典的な化学的治療剤に限定されるものと解釈されるべきではない。例えば、薬物部分は、所望の生物活性を保有するタンパク質、ペプチド、又はポリペプチドであり得る。そのようなタンパク質としては、例えば、アブリン、リシンA、緑膿菌外毒素、コレラ毒素、もしくはジフテリア毒素などの毒素;腫瘍壊死因子、 γ -インターフェロン、 α -インターフェロン、神経成長因子、血小板由来成長因子、組織プラスミノゲン活性化因子、アポトーシス物質、例えば、TNF- γ 、TNF- γ 、AIM I(例えば、国際公開WO 97/33899号を参照されたい)、AIM II(例えば、国際公開WO 97/34911号を参照されたい)、Fasリガンド(例えば、Takahashiらの文献、1994, J. Immunol., 6:1567-1574を参照されたい)、及びVEGF(例えば、国際公開WO 99/23105号を参照されたい)などのタンパク質、例えば、アンギオスタチン、エンドスタチン、もしくは凝固経路の成分(例えば、組織因子)を含む、抗血管形成物質;又は例えば、リンホカイン(例えば、インターフェロン γ 、インターロイキン-1(「IL-1」)、インターロイキン-2(「IL-2」)、インターロイキン-5(「IL-5」)、インターロイキン-6(「IL-6」)、インターロイキン-7(「IL-7」)、インターロイキン-9(「IL-9」)、インターロイキン-10(「IL-10」)、インターロイキン-12(「IL-12」)、インターロイキン-15(「IL-15」)、インターロイキン-23(「IL-23」)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(「GM-CSF」)、及び顆粒球コロニー刺激因子(「G-CSF」))などの生物応答修飾物質、もしくは成長因子(例えば、成長ホルモン(「GH」))、もしくは凝固物質(例えば、カルシウム、ビタミンK、組織因子、例えば、限定されないが、ハーゲマン因子(第XII因子)、高分子量キニノーゲン(HMWK)、プレカリクレイン(PK)、凝固タンパク質—第II因子(プロトロンビン)、第V因子、第XIIa因子、第VIII因子、第XIIIa因子、第XI因子、第XIIa因子、第IX因子、第IXa因子、第X因子、リン脂質、及びフィブリンモノマー)を挙げることができる。

【0294】

また本明細書に提供されるのは、融合タンパク質を作製するために、異種タンパク質もしくはポリペプチド(又はこれらの断片、例えば、約10、約20、約30、約40、約50、約60

、約70、約80、約90、又は約100アミノ酸のポリペプチド)に組換えにより融合させられているか又は化学的にコンジュゲートされている(共有結合的もしくは非共有結合的コンジュゲーション)抗体、及びその使用である。特に、本明細書に提供されるのは、本明細書に提供される抗体の抗原結合断片(例えば、Fab断片、Fd断片、Fv断片、F(ab)₂断片、VHドメイン、VH CDR、VLドメイン、又はVL CDR)と異種タンパク質、ポリペプチド、又はペプチドとを含む融合タンパク質である。一実施態様において、抗体を融合させる異種タンパク質、ポリペプチド、又はペプチドは、該抗体を、特定の細胞型、例えば、βクロトー又はβクロトー受容体を発現する細胞に標的化するのに有用である。例えば、特定の細胞型(例えば、免疫細胞)によって発現される細胞表面受容体に結合する抗体を、本明細書に提供される修飾抗体に融合させるか又はコンジュゲートすることができる。

10

【0295】

さらに、本明細書に提供される抗体は、治療的部分、例えば、放射性金属イオン、例えば、α-放射体、例えば、²¹³Bi又は限定されないが、¹³¹In、¹³¹Lu、¹³¹Y、¹³¹Ho、¹³¹Smを含む、放射性金属イオンをポリペプチドにコンジュゲートするのに有用な大環状キレート剤にコンジュゲートすることができる。ある実施態様において、該大環状キレート剤は、1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-N,N',N'',N'''-四酢酸(DOTA)であり、これは、リンカー分子を介して抗体に結合させることができる。そのようなリンカー分子は当技術分野で一般に公知であり、例えば、Denardoらの文献、1998, Clin Cancer Res. 4(10):2483-90; Petersonらの文献、1999, Bioconjug. Chem. 10(4):553-7;及びZimmermanらの文献、1999, Nucl. Med. Biol. 26(8):943-50に記載されている。

20

【0296】

さらに、本明細書に提供される抗体を、マーカー又は「タグ」配列、例えば、精製を容易にするペプチドに融合させることができる。具体的な実施態様において、マーカー又はタグアミノ酸配列は、その多くが市販されている、ヘキサ-ヒスチジンペプチド、例えば、特に、pQEベクター(例えば、QIAGEN社を参照されたい)中に提供されているタグである。例えば、Gentzらの文献、1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824に記載されているように、ヘキサ-ヒスチジンは、融合タンパク質の好都合な精製をもたらす。精製に有用な他のペプチドタグとしては、インフルエンザ赤血球凝集素タンパク質に由来するエピトープに相当する赤血球凝集素(「HA」)タグ(Wilsonらの文献、1984, Cell 37:767)、及び「FLAG」タグが挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0297】

治療的部分(ポリペプチドを含む)を抗体に融合させ又はコンジュゲートする方法は、周知である(例えば、Arnonらの文献、「癌療法における薬物の免疫標的化用のモノクローナル抗体(Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy)」、モノクローナル抗体及び癌療法(Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy)、Reisfeldら(編)、243~56ページ(Alan R. Liss社、1985); Hellstromらの文献、「薬物送達用の抗体(Antibodies For Drug Delivery)」、制御薬物送達(Controlled Drug Delivery)(第2版)、Robinsonら(編)、623~53ページ(Marcel Dekker社、1987); Thorpeの文献、「癌療法における細胞毒性剤の抗体担体:総説(Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review)」、モノクローナル抗体84:生物学的及び臨床的用途(Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications)、Pincheraら(編)、475~506ページ(1985);「癌療法における放射性標識抗体の治療的使用の解析、結果、及び将来的展望(Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy)」、癌の検出及び治療用のモノクローナル抗体(Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy)、Baldwinら(編)、303~16ページ(Academic Press 1985)、Thorpeらの文献、1982, Immunol. Rev. 62:119-58;米国特許第5,336,603号、第5,622,929号、第5,359,046号、第5,349,053号、第5,447,851号、第5,723,125号、第5,783,181号、第5,908,626号、第5,844,095号、及び第5,112,946号; EP 307,434号; EP 367,166号; EP 394,827号; PCT公開WO 91/06570号、WO 96/04388号、WO 96/22024号、WO 97/34631号、及びWO 99/04813号; Ashkenaziらの文献、Proc. Natl. Acad. Sci.

40

50

USA, 88: 10535-10539, 1991; Trauneckerらの文献、Nature, 331:84-86, 1988; Zhengらの文献、J. Immunol., 154:5590-5600, 1995; Vilらの文献、Proc. Natl. Acad. Sci. US A, 89:11337-11341, 1992を参照されたい)。

【0298】

融合タンパク質は、例えば、遺伝子シャッフリング、モチーフシャッフリング、エキソンシャッフリング、及び/又はコドンシャッフリング(「DNAシャッフリング」と総称される)の技法によって作製することができる。DNAシャッフリングを利用して、例えば、より高い親和性及びより低い解離速度を有する抗体を含む、本明細書に提供される抗βクロトー抗体の活性を変化させることができる(例えば、米国特許第5,605,793号、第5,811,238号、第5,830,721号、第5,834,252号、及び第5,837,458号; Pattenらの文献、1997, Curr. Opinion Biotechnol. 8:724-33; Harayamaの文献、1998, Trends Biotechnol. 16(2):76-82; Hanssonらの文献、1999, J. Mol. Biol. 287:265-76;並びにLorenzo及びBlascoの文献、1998, Biotechniques 24(2):308-313を参照されたい)。抗体、又はコードされた抗体を、組換え前に、エラーを起こしやすいPCR、ランダムなヌクレオチド挿入、又は他の方法によるランダムな突然変異誘発に供することにより改変することができる。本明細書に提供される抗体をコードするポリヌクレオチドを、1以上の異種分子の1以上の成分、モチーフ、セクション、部分、ドメイン、断片などと組み換えることができる。

10

【0299】

本明細書に提供される抗体を第2の抗体にコンジュゲートして、例えば、米国特許第4,676,980号に記載されているような抗体ヘテロコンジュゲートを形成させることもできる。

20

【0300】

βクロトー(例えば、βクロトーポリペプチド、断片、エピトープ)に結合する本明細書に提供される抗体にコンジュゲートされているか又は組換えにより融合させられている治療的部分又は薬物は、所望の予防又は治療効果を達成するように選択されるべきである。ある実施態様において、該抗体は修飾抗体である。臨床医又は他の医療関係者は、例えば、どの治療的部分又は薬物を本明細書に提供される抗体にコンジュゲートし又は組換えにより融合させるべきかに関して決定するとき、以下のこと:疾患の性質、疾患の重症度、及び対象の状態を考慮することができる。

【0301】

本明細書に提供されるβクロトーに結合する抗体は、免疫アッセイ又は標的抗原の精製に特に有用である固体支持体に付着させることもできる。そのような固体支持体としては、ガラス、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、又はポリプロピレンが挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0302】

リンカーは、細胞内でのコンジュゲートされた薬剤の放出を容易にする「切断可能なリンカー」であってもよいが、非切断性リンカーも本明細書において想定される。本開示のコンジュゲートで使用するためのリンカーとしては、限定するものではないが、酸不安定性リンカー(例えば、ヒドラゾンリンカー)、ジスルフィド含有リンカー、ペプチダーゼ感受性リンカー(例えば、アミノ酸、例えば、バリン及び/又はシトルリンを含むペプチドリリンカー、例えば、シトルリン-バリン又はフェニルアラニン-リジン)、光不安定性リンカー、ジメチルリンカー(例えば、Chariらの文献、Cancer Research 52:127-131(1992); 米国特許第5,208,020号を参照されたい)、チオエーテルリンカー、又は多剤輸送体を介した耐性を回避するように設計された親水性リンカー(例えば、Kovtunらの文献、Cancer Res. 70: 2528-2537, 2010を参照されたい)が挙げられる。

40

【0303】

抗体と薬剤のコンジュゲートは、様々な二官能性タンパク質カップリング剤、例えば、BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、スルホ-EMCS、スルホ-GMBS、スルホ-KMUS、スルホ-MBS、スルホ-SIAB、スルホ-SMCC、及びスルホ-SMPB、並びにSVSB(スクシニミジル-(4-ビニルスルホン)ベンゾエート)を用いて作製することができる。本開示は、抗体と薬剤のコンジュゲートを、当技術分野で開示さ

50

れている任意の好適な方法(例えば、バイオコンジュゲート技法(Bioconjugate Techniques)、第2版、G.T. Hermanson編、Elsevier, San Francisco, 2008中のものを参照されたい)を用いて調製し得ることをさらに想定している。

【0304】

抗体及び薬剤の従来のコンジュゲーション戦略は、Lys残基の ϵ -アミノ基又はCys残基のチオール基が関与するランダムコンジュゲーション化学に基づいており、これは、不均一なコンジュゲートを結果として生じる。最近開発された技法は、抗体への部位特異的コンジュゲーションを可能にし、結果として、均一な装填が得られ、抗原結合又は薬物動態が改変されたコンジュゲート亜集団が回避される。これらには、反応性チオール基を提供し、かつ免疫グロブリンのフォールディング及びアセンブリを妨害することも抗原結合を改変することもない重鎖及び軽鎖上の位置でのシステイン置換を含む「チオマブ(thiomab)」の人為的作製が含まれる(例えば、Junutulaらの文献、J. Immunol. Meth. 332: 41-52 (2008); Junutulaらの文献、Nat. Biotechnol. 26: 925-932, 2008を参照されたい)。別の方法では、終止コドンUGAを終結からセレノシステイン挿入へとコードし直すことによって、セレノシステインが抗体配列中に共翻訳的に挿入され、他の天然アミノ酸の存在下でのセレノシステインの求核性セレノール基における部位特異的な共有結合的コンジュゲーションが可能になる(例えば、Hoferらの文献、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105: 12451-12456(2008); Hoferらの文献、Biochemistry 48(50): 12047-12057, 2009を参照されたい)。

【0305】

(医薬製剤)

本開示の抗 β クロトー抗体は、治療されることになる状態に適した任意の経路によって投与することができる。該抗体は、通常、非経口的に、例えば、注入、皮下、筋肉内、静脈内、皮内、髄腔内、及び硬膜外に投与される。抗体用量は、例えば、疾患の性質及び/又は重症度並びに対象の状態によって異なり、これには、1mg~100mgの用量が含まれ得る。用量には、1mg/kg~15mg/kgの用量も含まれ得る。いくつかの実施態様において、用量は、約5mg/kg~約7.5mg/kgである。いくつかの実施態様において、用量は、約5mg/kgである。いくつかの実施態様において、用量は、約7.5mg/kgである。フラット用量(Flat doses)は:(a) 2週間毎に375~400mg及び(b)3週間毎に550~600mgからなる群から選択される。いくつかの実施態様において、フラット用量は、2週間毎に375~400mgである。いくつかの実施態様において、フラット用量は、3週間毎に550~600mgである。いくつかの実施態様において、フラット用量は、2週間毎に400mgである。いくつかの実施態様において、フラット用量は、3週間毎に600mgである。逐次投与のいくつかの実施態様において、第1の用量及び第2の用量は、各々、1mg/kg~15mg/kgであり、第2の用量は、第1の用量から1~4週間後である。いくつかの実施態様において、第1の用量及び第2の用量は、各々、5mg/kg~7.5mg/kgであり、第2の用量は、第1の用量から2~3週間後である。いくつかの実施態様において、第1の用量及び第2の用量は、各々、5mg/kgであり、第2の用量は、第1の用量から2週間後である。いくつかの実施態様において、第1の用量及び第2の用量は、各々、7.5mg/kgであり、第2の用量は、第1の用量から3週間後である。

【0306】

疾患、障害、及び疾病を治療するために、抗体は、いくつかの実施態様において、静脈内注入を介して投与される。注入を介して投与される投薬量は、1回の投与当たり約1 μ g/m²~約10,000 μ g/m²の範囲にあり、通常、週1回の投与で、合計1回、2回、3回、又は4回の投与である。或いは、投薬量の範囲は、約1 μ g/m²~約1000 μ g/m²、約1 μ g/m²~約800 μ g/m²、約1 μ g/m²~約600 μ g/m²、約1 μ g/m²~約400 μ g/m²;或いは、約10 μ g/m²~約500 μ g/m²、約10 μ g/m²~約300 μ g/m²、約10 μ g/m²~約200 μ g/m²、及び約1 μ g/m²~約200 μ g/m²である。投与は、疾患、障害、又は疾病の症状を緩和する(relieve)又は緩和する(alleviate)ために、1日1回、週1回、週に複数回であるが1日1回未満、月に複数回であるが1日1回未満、月に複数回であるが週1回未満、月1回、又は間欠的に施し得る。投与は、治療されている疾患、障害、もしくは疾病の改善、又は該疾患、障害、もしくは疾病の症状

の改善まで、開示された間隔のいずれかで継続し得る。投与は、そのような寛解又は緩和がそのような継続投与によって延長される場合、症状の寛解又は緩和が達成された後に継続し得る。

【0307】

一態様において、本開示は、本開示の少なくとも1つの抗 β クロトー抗体を含む医薬製剤をさらに提供する。いくつかの実施態様において、医薬製剤は、(1)抗 β クロトー抗体、及び(2)医薬として許容し得る担体を含む。いくつかの実施態様において、医薬製剤は、(1)抗 β クロトー抗体及び/又はその免疫コンジュゲート、並びに任意に、(2)少なくとも1つの追加の治療剤を含む。

【0308】

抗体を含む医薬製剤は、所望の純度を有する抗体を、任意の生理的に許容し得る担体、賦形剤、又は安定化剤(例えば、レミントンの薬学(Remington's Pharmaceutical Sciences)、第16版、Osol, A.編(1980)を参照されたい)と混合することにより、水性溶液又は凍結乾燥製剤もしくは他の乾燥製剤の形態で保存用に調製される。本明細書における製剤は、治療されている具体的な適応症に必要なものとしての複数の活性化合物、好ましくは、互いに有害な影響を及ぼさない補完的な活性を有するものも含有し得る。例えば、抗 β クロトー抗体の他に、1つの製剤中に、追加の抗体、例えば、 β クロトーポリペプチド上の異なるエピトープに結合する第2の抗 β クロトー抗体、又はいくつかの他の標的に対する抗体を含めることが望ましい場合がある。代わりに、又はさらに、組成物は、例えば、化学療法剤、細胞毒性剤、サイトカイン、成長阻害剤、抗ホルモン剤、及び/又は心臓保護剤を含む、別の薬剤をさらに含み得る。いくつかの実施態様において、製剤は、アルキル化剤(例えば、クロラムブシル、ベンダムスチン塩酸塩、又はシクロホスファミド)、ヌクレオシド類似体(例えば、フルヅラビン(fludurabine)、ペントスタチン、クラドリビン、又はシタラビン)、コルチコステロイド(例えば、プレドニゾン、プレドニゾロン、又はメチルプレドニゾロン)、免疫調節剤(例えば、レナリドミド)、抗生物質(例えば、ドキシシリン、ダウノルビシン、イダルビシン、又はミトキシセントロン(mitoxentron))、合成フラボン(例えば、フラボピリドール)、Bcl2アンタゴニスト(例えば、オブリメルセン又はABT-263)、低メチル化剤(例えば、アザシチジン又はデシタビン)、FLT3阻害剤(例えば、ミドスタウリン、ソラフェニブ、及びAC220)を含む。そのような分子は、意図される目的に有効である量で好適に併存する。

【0309】

本開示の抗体は、標的細胞/組織への送達のための任意の好適な形態で、例えば、マイクロカプセルもしくはマクロエマルジョンとして(レミントンの薬学(Remington's Pharmaceutical Sciences)、第16版、Osol, A.編(1980); Parkらの文献、Molecules 10: 146-161(2005); Malikらの文献、Curr. Drug. Deliv. 4: 141-151(2007));持続放出製剤として(Putney及びBurkeの文献、Nature Biotechnol. 16: 153-157(1998))、又はリポソーム中に(Macleanらの文献、Int. J. Oncol. 11: 235-332(1997); Kontermannの文献、Curr. Opin. Mol. Ther. 8: 39-45(2006))、製剤化することができる。

【0310】

本明細書に提供される抗体は、例えば、コアセルベーション法によるか又は界面重合によって調製されたマイクロカプセル、例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロース又はゼラチンマイクロカプセル及びポリ-(メチルメタクリレート)マイクロカプセル中、コロイド状薬物送達系(例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マクロエマルジョン、ナノ粒子、及びナノカプセル)中、又はマクロエマルジョン中に封入することもできる。そのような技法は、例えば、レミントンの薬学(Remington's Pharmaceutical Sciences)(1990) Mack Publishing Co., Easton, PAに開示されている。

【0311】

様々な送達系が公知であり、かつ予防剤又は治療剤(例えば、本明細書に記載される β クロトーに結合する抗体)を投与するために使用することができ、該送達系には、リポソーム、微粒子、マイクロカプセルへの封入、抗体を発現することができる組換え細胞、受

10

20

30

40

50

容体媒介性エンドサイトーシス(例えば、Wu及びWuの文献、J. Biol. Chem. 262:4429-4432(1987)を参照されたい)、レトロウイルスもしくは他のベクターの部分としての核酸の構築などが含まれるが、これらに限定されない。別の実施態様において、予防剤もしくは治療剤又は本明細書に提供される組成物を制御放出又は持続放出系で送達することができる。一実施態様において、ポンプを用いて、制御又は持続放出を達成することができる(例えば、Langerの文献(上記); Seftonの文献、1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:20; Buchwaldらの文献、1980, Surgery 88:507; Saudekらの文献、1989, N. Engl. J. Med. 321:574を参照されたい)。別の実施態様において、ポリマー材料を用いて、予防剤もしくは治療剤(例えば、本明細書に記載される β クロトーに結合する抗体)又は本発明の組成物の制御又は持続放出を達成することができる(例えば、制御放出の医学的応用(Medical Applications of Controlled Release)、Langer及びWise(編)、CRC Pres., Boca Raton, Florida(1974); 薬物バイオアベイラビリティの制御、医薬品設計、及び性能(Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance)、Smolen及びBall(編)、Wiley, New York(1984); Ranger及びPeppasの文献、1983, J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61を参照されたい; Levyらの文献、1985, Science 228:190; Duringらの文献、1989, Ann. Neurol. 25:351; Howardらの文献、1989, J. Neurosurg. 71:105); 米国特許第5,679,377号; 米国特許第5,916,597号; 米国特許第5,912,015号; 米国特許第5,989,463号; 米国特許第5,128,326号; PCT公開WO 99/15154号; 及びPCT公開WO 99/20253号を参照されたい)。持続放出製剤で使用されるポリマーの例としては、ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)、ポリ(メタクリル酸メチル)、ポリ(アクリル酸)、ポリ(エチレン-2-酢酸ビニル)、ポリ(メタクリル酸)、ポリグリコリド(PLG)、ポリ無水物、ポリ(N-ビニルピロリドン)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリアクリルアミド、ポリ(エチレングリコール)、ポリラクチド(PLA)、ポリ(ラクチド-コ-グリコリド)(PLGA)、及びポリオルトエステルが挙げられるが、これらに限定されない。一実施態様において、持続放出製剤で使用されるポリマーは、不活性で、浸出性不純物を含まず、保存時に安定で、滅菌性で、かつ生体分解性である。

【0312】

また別の実施態様において、制御又は持続放出系を、治療標的、例えば、鼻孔又は肺の近くに配置することができ、したがって、全身用量のごく一部しか必要としない(例えば、Goodsonの文献、制御放出の医学的応用(Medical Applications of Controlled Release)、上記、第2巻、115~138ページ(1984)を参照されたい)。制御放出系は、例えば、Langer(1990, Science 249:1527-1533)によって論じられている。当業者に公知の任意の技法を用いて、本明細書に記載される β クロトーに結合する1以上の抗体を含む持続放出製剤を産生することができる(例えば、米国特許第4,526,938号、PCT公開WO 91/05548号、PCT公開WO 96/20698号、Ningらの文献、1996、「持続放出ゲルを用いたヒト結腸癌異種移植片の腫瘍内放射免疫療法(Intratumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel)」、Radiotherapy & Oncology 39:179-189、Songらの文献、1995、「長期循環エマルジョンの抗体媒介性肺標的化(Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions)」、PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397、Cleekらの文献、1997、「心血管用途のためのbFGF抗体用の生体分解性ポリマー担体(Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application)」、Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854、及びLamらの文献、1997、「局所送達のための組換えヒト化モノクローナル抗体のマイクロカプセル化(Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery)」、Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760を参照されたい)。

【0313】

(治療方法)

本開示の抗体は、例えば、インビトロ、エクスピボ、及びインビボの治療方法で使用する。一態様において、本開示は、インビボ又はインビトロのいずれかで、疾

患、障害、又は疾病を治療又は予防するための方法であって、細胞を抗 β クロトー抗体に曝露させることを含む、方法を提供する。

【0314】

一態様において、本開示の抗体を用いて、例えば、2型糖尿病、肥満、脂質異常症、NASH、心血管疾患、メタボリックシンドローム、又はFGF19及び/もしくはFGF21のインビボ作用を模倣もしくは増強することが望ましい広く任意の疾患、障害、もしくは疾病を含む、疾患、障害、又は疾病を治療又は予防する。

【0315】

一態様において、疾患、障害、又は疾病を治療する方法であって、抗 β クロトー抗体又はその断片の有効量を個体に投与することを含む、方法が提供される。ある実施態様において、疾患、障害、又は疾病を治療する方法は、抗 β クロトー抗体及び任意に、少なくとも1つの追加の治療剤、例えば、本明細書に提供されるものを含む医薬製剤の有効量を個体に投与することを含む。

【0316】

抗 β クロトー抗体又はその断片を治療目的でヒトに投与することができる。さらに、抗 β クロトー抗体又はその断片を、獣医学的な目的で又はヒト疾患の動物モデルとして、抗体が交差反応する β クロトーを発現する非ヒト哺乳動物(例えば、霊長類、ブタ、ラット、又はマウス)に投与することができる。後者に関して、そのような動物モデルは、本開示の抗体の治療効力の評価(例えば、投薬量及び投与の経時変化の試験)に有用である場合がある。

【0317】

本開示の抗体は、治療法において単独で又は他の組成物と組み合わせて使用することができる。例えば、本開示の抗 β クロトー抗体は、少なくとも1つの追加の治療剤及び/又はアジュバントと共投与することができる。いくつかの実施態様において、追加の化合物は、抗 β クロトー抗体以外の治療用抗体である。

【0318】

上述のそのような併用療法は、併用投与(この場合、2以上の治療剤が同じ又は別々の製剤に含まれる)、及び個別投与を包含し、この場合、本開示の抗 β クロトー抗体又はその断片の投与は、追加の治療剤及び/又はアジュバントの投与の前、それと同時に、及び/又はその後に行うことができる。本開示の抗体を、限定するものではないが、本明細書に記載されているものを含む、追加の治療レジメンと組み合わせて使用することもできる。

【0319】

本開示の抗体(及び任意の追加の治療剤又はアジュバント)は、非経口、皮下、腹腔内、肺内、及び鼻腔内、並びに局所治療にとって望ましい場合、病変内投与を含む、任意の好適な手段によって投与することができる。非経口的注入には、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内、又は皮下への投与が含まれる。さらに、抗体又はコンジュゲートは、特に漸減用量の抗体又はその断片を用いる、パルス注入によって好適に投与される。投与は、任意の好適な経路によるもの、例えば、注射、例えば、一つには、投与が短期間であるか又は持続的であるかによって、静脈内注射又は皮下注射によるものであってもよい。

【0320】

本開示の抗体は、医療実施基準(good medical practice)と一致する様式で製剤化され、投薬され、投与される。これに関連して考慮される因子としては、治療されている具体的な障害、治療されている具体的な哺乳動物、個々の患者の臨床状態、障害の原因、薬剤の送達部位、投与の方法、投与のスケジュール、及び医師に公知の他の因子が挙げられる。抗 β クロトー抗体は、必ずしもその必要はないが、任意に、当該の障害を予防又は治療するために現在使用されている1以上の薬剤とともに製剤化される。そのような他の薬剤の有効量は、製剤中に存在する抗体又は免疫コンジュゲートの量、障害又は治療の種類、及び上で考察した他の因子によって決まる。これらは、通常、本明細書に記載されているのと同じ投薬量及び投与経路で、又は本明細書に記載される投薬量の約1~99%で、又は適切であることが実験的/臨床的に明らかにされている任意の投薬量及び任意の経路で使

用される。

【0321】

疾患、障害、又は疾病の予防又は治療のために、本開示の抗βクロトー抗体の適切な投薬量は(単独で又は1以上の他の追加の治療剤、例えば、本明細書に記載される薬剤と組み合わせ使用される場合)、治療されることになる疾患、障害、又は疾病の種類、抗体の種類、疾患、障害、又は疾病の重症度及び経過、抗体が予防目的で投与されるのか、それとも治療目的で投与されるのかということ、薬歴、患者の既往歴及び抗体に対する応答、並びに担当医の裁量によって決まる。抗βクロトー抗体は、患者に対して、1回で又は一連の治療にわたって好適に投与される。疾患の種類及び重症度に応じて、約1μg/kg~100mg/kg(例えば、0.1mg/kg~20mg/kg、1mg/kg~15mg/kgなど)の抗体を、例えば、1回以上の個別投与によるものであれ、連続注入によるものであれ、患者への投与のための初回候補投薬量とすることができる。1つの典型的な1日投薬量は、上述の因子に応じて、約1μg/kg~100mg/kg又はそれを上回る範囲であり得る。数日間又はそれより長い期間にわたる反復投与については、状態に応じて、治療は、通常、疾患症状の所望の抑制が起こるまで持続される。抗体の例示的な投薬量は、約0.05mg/kg~約10.0mg/kgの範囲であり得る。したがって、0.5mg/kg、1.0mg/kg、2.0mg/kg、3.0mg/kg、4.0mg/kg、5.0mg/kg、6.0mg/kg、7.0mg/kg、8.0mg/kg、9.0mg/kg、又は10.0mg/kgのうちの1つ又は複数の用量(又はこれらの任意の組合せ)の抗体を患者に投与することができる。そのような用量は、間欠的に、例えば、週に1回又は3週に1回(例えば、患者が、約2~約20回、又は例えば、約6回の抗体の投与を受けるように)投与することができる。初回にはより高い負荷用量を、その後は1回以上のより低い用量を投与することができる。例示的な投与レジメンは、初回負荷用量の抗体を投与し、その後、維持用量(週1回)の抗体を投与することを含む。初回負荷用量は、維持用量より大きくてもよい。しかしながら、他の投与レジメンが有用である場合がある。この療法の進捗は、従来の技法及びアッセイによって容易にモニタリングされる。

【0322】

(診断方法及び検出方法)

一態様において、本開示の抗βクロトー抗体及びその断片は、生体試料中のβクロトーの存在を検出するのに有用である。そのような抗βクロトー抗体には、ヒト及び/又はカニクイザルβクロトーに結合するが、FGF19様シグナル伝達及び/又はFGF21様シグナル伝達活性を誘導しないものが含まれ得る。本明細書で使用される「検出する」という用語は、定量的又は定性的検出を包含する。ある実施態様において、生体試料は、細胞又は組織を含む。

【0323】

一態様において、本開示は、生体試料中のβクロトーの存在を検出する方法を提供する。ある実施態様において、本方法は、生体試料を、抗βクロトー抗体と、βクロトーに対する抗βクロトー抗体の結合が可能な条件下で接触させること、及び複合体が抗βクロトー抗体とβクロトーの間で形成されるかどうかを検出することを含む。

【0324】

一態様において、本開示は、βクロトーの発現と関連する障害を診断する方法を提供する。ある実施態様において、本方法は、試験細胞を抗βクロトー抗体と接触させること;βクロトーに対する抗βクロトー抗体の結合を検出することにより、試験細胞によるβクロトーの発現のレベルを(定量的又は定性的に)決定すること;及び試験細胞によるβクロトーの発現のレベルを対照細胞(例えば、試験細胞と同じ組織起源の正常細胞又はそのような正常細胞と同程度のレベルでβクロトーを発現する細胞)によるβクロトーの発現のレベルと比較することを含み、ここで、対照細胞と比較したときの試験細胞によるβクロトーの発現のより高いレベルは、βクロトーの発現の増加と関連する障害の存在を示す。ある実施態様において、試験細胞は、βクロトーの発現と関連する疾患、障害、もしくは疾病、又はFGF19及び/もしくはFGF21のインビボ作用を模倣もしくは強化することが望ましい疾患、障害、もしくは疾病を有する疑いのある個体から得られる。ある実施態様において、該疾患、障害、又は疾病は、例えば、2型糖尿病、肥満、脂質異常症、NASH、心血

管疾患、又はメタボリックシンドロームである。そのような例示的な疾患、障害、又は疾病は、本開示の抗 β クロトー抗体を用いて診断することができる。

【0325】

ある実施態様において、診断法又は検出法、例えば、上記のものは、細胞の表面に発現された又は β クロトーをその表面に発現する細胞から得られた膜調製物中の β クロトーに対する抗 β クロトー抗体の結合を検出することを含む。ある実施態様において、本方法は、細胞を、抗 β クロトー抗体と、 β クロトーに対する抗 β クロトー抗体の結合が可能な条件下で接触させること、及び複合体が細胞表面で抗 β クロトー抗体と β クロトーの間で形成されるどうかを検出することを含む。細胞の表面に発現された β クロトーに対する抗 β クロトー抗体の結合を検出するための例示的なアッセイは、「FACS」アッセイである。

10

【0326】

特定の他の方法を用いて、 β クロトーに対する抗 β クロトー抗体の結合を検出することができる。そのような方法としては、当技術分野で周知である抗原結合アッセイ、例えば、ウェスタンブロット、放射免疫アッセイ、ELISA(酵素結合免疫吸着アッセイ)、「サンドイッチ」免疫アッセイ、免疫沈降アッセイ、蛍光免疫アッセイ、プロテインA免疫アッセイ、及び免疫組織化学(IHC)が挙げられるが、これらに限定されない。

【0327】

ある実施態様において、抗 β クロトー抗体を標識する。標識には、直接的に検出される標識又は部分(例えば、蛍光標識、発色団標識、高電子密度標識、化学発光標識、及び放射性標識)、並びに間接的に、例えば、酵素反応又は分子相互作用を介して検出される、酵素又はリガンドなどの部分が含まれるが、これらに限定されない。例示的な標識としては、放射性同位体 ^{32}P 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 、及び ^{131}I 、蛍光団、例えば、希土類キレート又はフルオレセイン及びその誘導体、ローダミン及びその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロン、ルシフェラーゼ、例えば、ホタルルシフェラーゼ及び細菌ルシフェラーゼ(例えば、米国特許第4,737,456号を参照されたい)、ルシフェリン、2,3-ジヒドロフタラジンジオン、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、サッカリドオキシダーゼ、例えば、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、及びグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、過酸化水素を用いて色素前駆体を酸化する酵素、例えばHRP、ラクトペルオキシダーゼ、又はミクロペルオキシダーゼと共役した複素環オキシダーゼ、例えば、ウリカーゼ及びキサンチンオキシダーゼ、ビオチン/アビジン、スピン標識、バクテリオファージ標識、安定なフリーラジカルなどが挙げられるが、これらに限定されない。

20

30

【0328】

ある実施態様において、抗 β クロトー抗体を不溶性マトリックス上に固定化する。固定化は、抗 β クロトー抗体を、溶液中に遊離したまま残る β クロトーから分離することを必要とする。これは、従来通り、水不溶性のマトリックスもしくは表面への吸着によるもの(例えば、Bennichらの文献、U.S. 3,720,760号を参照されたい)、又は(例えば、グルタルアルデヒド架橋を用いた)共有結合によるもののよう、アッセイ手順の前に抗 β クロトー抗体を不溶化するか、或いは抗 β クロトー抗体と β クロトーの複合体の形成後に、例えば、免疫沈降によって、抗 β クロトー抗体を不溶化するかのいずれかによって達成される。

40

【0329】

診断又は検出の上記の実施態様はいずれも、抗 β クロトー抗体の代わりに又はそれに加えて、本開示の免疫コンジュゲートを用いて実施することができる。

【0330】

(アッセイ)

本開示の抗 β クロトー抗体は、当技術分野で公知の様々なアッセイによって、その物理的/化学的特性及び/又は生物活性について特徴付けることができる。

【0331】

(1. 活性アッセイ)

50

一態様において、生物活性を有するその抗 β クロトー抗体を同定するためのアッセイが提供される。生物活性には、例えば、グルコース及び/又は脂質代謝に対する効果を測定するアッセイが含まれ得る。例えば、血液グルコースアッセイを使用することができる。血液グルコース(例えば、マウス尻尾小片中又はヒト血液試料中)を、製造元の指示に従って、ACCU-CHEK Activeメーター(Roche Diagnostics, Indianapolis, IN)によって読み取られるACCU-CHEK Active試験ストリップを用いて測定することができる。さらに、例えば、脂質プロファイルアッセイを使用することができる。全血(例えば、マウス尻尾小片由来又はヒト血液試料由来)を無地キャピラリーチューブ(BD Clay Adams SurePrep, Becton Dickinson and Co. Sparks, MD)に回収することができる。このチューブをAutocrit Ultra 3(Becton Dickinson and Co. Sparks, MD)中でスピンすることによって、血清及び血液細胞を分離することができる。血清試料を、製造元の指示に従ってIntegra 400 Clinical Analyzer(Roche Diagnostics, Indianapolis, IN)を用いて、脂質プロファイル(トリグリセリド、総コレステロール、HDL、及び非HDL)についてアッセイすることができる。

【0332】

(2. 結合アッセイ及び他のアッセイ)

一態様において、抗 β クロトー抗体を、その抗原結合活性について試験する。例えば、ある実施態様において、抗 β クロトー抗体を、細胞の表面に発現される外因性又は内在性 β クロトーに結合するその能力について試験する。FACSアッセイをそのような試験に使用することができる。

【0333】

β クロトーに対して惹起されたモノクローナル抗体のパネルを、それらが認識するエピトープに基づいてグループ分けすることができ、この過程は、エピトープビニングとして知られる。エピトープビニングは、通常、抗体が別の抗体の存在下で抗原と結合する能力を評価する競合アッセイを用いて実施される。例示的な競合アッセイでは、固定化された β クロトーを、 β クロトーに結合する第1の標識抗体と、 β クロトーに対する結合を該第1の抗体と競合するその能力について試験されている第2の非標識抗体とを含む溶液中でインキュベートする。該第2の抗体は、ハイブリドーマ上清中に存在してもよい。対照として、固定化された β クロトーを、第1の標識抗体を含むが、第2の未標識抗体を含まない溶液中でインキュベートする。 β クロトーに対する第1の抗体の結合が可能な条件下でのインキュベーションの後に、過剰の未結合抗体を除去し、固定化された β クロトーと関連する標識の量を測定する。固定化された β クロトーと関連する標識の量が対照試料と比べて試験試料中で実質的に低下している場合、そのことは、第2の抗体が第1の抗体と β クロトーに対する結合を競合していることを示す。ある実施態様において、固定化された β クロトーは、細胞の表面に存在するか又はその表面に β クロトーを発現する細胞から得られた膜調製物中に存在する。

【0334】

ハイスループットなエピトープビニングの方法も当技術分野で公知である(例えば、モノクローナル抗体の特徴付けのための多重化競合抗体ビニングの方法を記載している、Jiaらの文献、J. Immunol. Methods 2004, 288(1-2):91-98;及び多重化対形成アッセイによるマウスモノクローナル抗体のエピトープビニングを記載している、Millerらの文献、J. Immunol. Methods 2011, 365(1-2):118-25を参照されたい)。

【0335】

(3. エピトープマッピング)

エピトープマッピングは、その標的タンパク質抗原上の抗体の結合部位、すなわち、エピトープを同定するプロセスである。抗体エピトープは、線状エピトープ又は立体構造エピトープであり得る。線状エピトープは、タンパク質中のアミノ酸の連続配列によって形成される。立体構造エピトープは、タンパク質配列中では不連続であるが、タンパク質がその3次元構造へとフォールディングしたときに寄せ集められるアミノ酸から形成される。

【0336】

標的タンパク質抗原上の抗体エピトープのマッピングのための様々な方法が当技術分野で公知である。これらには、突然変異誘発法、ペプチドスキャニング法、ディスプレイ法、質量分析及び構造決定を伴う方法が含まれる。

【0337】

部位特異的突然変異誘発法は、タンパク質配列に沿って系統的に置換を導入し、その後、抗体結合に対する各々の置換の効果を決定することによって決定的に重要なアミノ酸を同定する、標的化部位特異的突然変異誘発を含む。これは、例えば、Cunningham及びWellsら(1989) Science 244: 1081-1085によって記載された「アラニンスキャニング突然変異誘発」、又はヒトβクロトール中のアミノ酸残基の何らかの他の形態の点突然変異誘発によって行うことができる。しかしながら、突然変異誘発試験では、βクロトールの全体的な3次元構造には極めて重要であるが、抗体-抗原接触に直接的には関与しないアミノ酸残基が明らかになることもあり、したがって、この方法を用いて決定された機能的エピトープを確認するために、他の方法が必要となる場合もある。

【0338】

ショットガン突然変異誘発マッピングでは、標的遺伝子についての包括的プラスミド-突然変異ライブラリーが利用され、該ライブラリー中の各々のクローンは、特有のアミノ酸突然変異を有し、ライブラリー全体は、標的タンパク質中のあらゆるアミノ酸を網羅する。該突然変異ライブラリーを構成するクローンをマイクロプレートに個々に配置し、生きた哺乳動物細胞内で発現させて、対象となる抗体との免疫反応性について試験する。抗体エピトープにとって決定的に重要なアミノ酸を反応性の消失によって同定し、その後、それをタンパク質構造上にマッピングして、エピトープを視覚化する。この解析を自動化することにより、数日から数週間以内に新たなエピトープマップを導き出すことができる。これは、哺乳動物細胞内のタンパク質のネイティブ構造を使用するので、この技法により、線状エピトープ構造と立体構造エピトープ構造の両方を複合タンパク質上にマッピングすることが可能になる(例えば、Paesらの文献、J. Am. Chem. Soc. 131(20): 6952-6954(2009); Banik及びDoranzの文献、Genetic Engineering and Biotechnology News 3(2): 25-28(2010)を参照されたい)。

【0339】

抗βクロトール抗体によって結合されるエピトープを、ペプチドスキャニング法を用いて決定することもできる。ペプチドスキャニングでは、標的タンパク質であるβクロトールの重複するセグメントに由来する短いペプチド配列のライブラリーを、対象となる抗体に結合するその能力について試験する。ペプチドを合成し、「pepscan」法(例えば、WO 84/03564号; WO 93/09872号を参照されたい)と同様に、複数の固相スクリーニング法のうちのいずれかによって、例えば、ELISAもしくはBIACOREを用いて、又はチップ上で、結合についてスクリーニングする(例えば、Reinekeらの文献、Curr. Opin. Biotechnol. 12: 59-64, 2001を参照されたい)。そのようなペプチドスクリーニング法は、いくつかの不連続な機能的エピトープ、すなわち、βクロトールポリペプチド鎖の1次配列に沿って連続しているのではないアミノ酸残基を含む機能的エピトープを検出することができない可能性がある。

【0340】

CLIPS(スキャフォールド上へのペプチドの化学結合)と呼ばれる最近開発された技術を用いて、立体構造エピトープをマッピングすることができる。ペプチドの遊離末端を、スキャフォールド化されたペプチドが無傷タンパク質中の対応する配列と同じ空間構造を取り得るように、合成スキャフォールド上に取り付ける。抗体結合についてアッセイし得る立体構造エピトープを生成させるために、CLIPS技術を用いて、線状ペプチドを固定して環状構造にし(「単一ループ」形式)、タンパク質結合部位の様々な部分を寄せ集める(「二重ループ」形式、「三重ループ」形式など)(例えば、米国特許第7,972,993号を参照されたい)。

【0341】

本開示の抗体によって結合されるエピトープを、例えば、上記のようなファージディスプレイ

プレイ、微生物ディスプレイ、及びリボソーム/mRNAディスプレイを含むディスプレイ法を用いてマッピングすることもできる。これらの方法では、ペプチド断片のライブラリーをファージ又は細胞の表面に提示させる。その後、選択的結合アッセイを用いてこれらの断片に対するmAbをスクリーニングすることにより、エピトープをマッピングする。ファージディスプレイを用いて得られる線状の親和性選択ペプチドに基づく立体構造エピトープの予測を可能にするいくつかの計算ツールが開発されている(例えば、Mayroseらの文献、Bioinformatics 23: 3244-3246, 2007を参照されたい)。ファージディスプレイによる立体構造エピトープの検出のための方法も利用可能である。立体構造エピトープの同定のために、微生物ディスプレイシステムを用いて、適切にフォールディングされた抗原性断片を細胞表面上に発現させることもできる(例えば、Cochranらの文献、J. Immunol. Meth. 287: 147-158, 2004; Rockbergらの文献、Nature Methods 5: 1039-1045, 2008を参照されたい)。

10

【0342】

タンパク質分解及び質量分析を伴う方法を用いて、抗体エピトープを決定することもできる(例えば、Baerga-Ortizらの文献、Protein Sci. 2002 June; 11(6): 1300-1308を参照されたい)。限定的なタンパク質分解では、抗原を抗体の存在下及び非存在下で様々なプロテアーゼによって切断し、断片を質量分析によって同定する。エピトープは、抗体結合時にタンパク質分解から保護されるようになる抗原の領域である(例えば、Suckauらの文献、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:9848-9852, 1990を参照されたい)。タンパク質分解に基づくさらなる方法としては、例えば、選択的化学修飾(例えば、Fiedlerらの文献、Bioconjugate Chemistry 1998, 9(2): 236-234, 1998を参照されたい)、エピトープ切除(例えば、Van de Waterらの文献、Clin. Immunol. Immunopathol. 1997, 85(3): 229-235, 1997を参照されたい)、及び最近開発された水素-重水素(H/D)交換法(例えば、Flanagan, N.の文献、Genetic Engineering and Biotechnology News 3(2): 25-28, 2010を参照されたい)が挙げられる。

20

【0343】

本開示の抗体によって結合されるエピトープを、X線結晶構造決定(例えば、WO 2005/044853号を参照されたい)、分子モデリング、及び核磁気共鳴(NMR)分光法などの構造的な方法によって決定することもでき、これには、遊離している場合及び対象となる抗体との複合体中で結合している場合の不安定なアミド水素のH-D交換率のNMRによる決定が含まれる(

30

【0344】

本開示の抗体と同じエピトープに結合するさらなる抗体は、例えば、エピトープに対する結合についてβクロトーに対して惹起された抗体をスクリーニングすることによって、エピトープ配列を含むヒトβクロトーの断片を含むペプチドで動物を免疫することによって、又はエピトープ配列に対する結合についてファージディスプレイを用いて抗体を選択することによって得ることができる。同じ機能的エピトープに結合する抗体は、βクロトーの生物活性の遮断などの、類似の生物活性を示すと考えてもよく、そのような活性は抗体の機能アッセイによって確認することができる。

40

【0345】

(さらなる活性アッセイ)

一実施態様において、本開示の抗βクロトー抗体は、βクロトーの生物活性を阻害する拮抗性抗体である。本開示の抗βクロトー抗体をアッセイして、それらがβクロトーの生物活性を阻害するかどうかを決定することができる。

【0346】

一態様において、精製された抗βクロトー抗体を、限定されないが、N末端シーケンシング、アミノ酸分析、非変性サイズ排除高圧液体クロマトグラフィー(HPLC)、質量分析、イオン交換クロマトグラフィー、及びパパイソ消化を含む、一連のアッセイによってさらに特徴付けることができる。

50

【0347】

一実施態様において、本開示は、全てではないがいくつかのエフェクター機能を保有する改変された抗体を想定しており、該エフェクター機能によって、該抗体は、抗体のインビボでの半減期は重要であるが、特定のエフェクター機能(例えば、補体及びADCC)は不必要又は有害である多くの用途にとって望ましい候補になる。ある実施態様において、所望の特性だけが維持されていることを保証するために、抗体のFc活性を測定する。CDC及び/又はADCC活性の低下/枯渇を確認するために、インビトロ及び/又はインビボの細胞傷害性アッセイを実施することができる。例えば、抗体がFcγR結合を欠く(それゆえ、ADCC活性を欠く可能性が高い)が、FcRn結合能を保持することを保証するために、Fc受容体(FcR)結合アッセイを実施することができる。対象となる分子のADCC活性を評価するためのインビトロアッセイは、例えば、米国特許第5,500,362号又は第5,821,337号に記載されている。そのようなアッセイのための有用なエフェクター細胞には、末梢血単核細胞(PBMC)及びナチュラルキラー(NK)細胞が含まれる。代わりに、又はさらに、対象となる分子のADCC活性を、インビボで、例えば、動物モデル、例えば、Clynesらの文献、PNAS(USA) 95:652-656 (1998)に開示されている動物モデルで評価することができる。抗体がC1qに結合することができず、それゆえ、CDC活性を欠くことを確認するために、C1q結合アッセイを実施することもできる。補体活性化を評価するために、例えば、Gazzano-Santoroらの文献、J. Immunol. Methods 202: 163(1996)に記載されているようなCDCアッセイを実施することができる。FcRn結合及びインビボクリアランス/半減期の決定を、当技術分野で公知の方法を用いて実施することもできる。

10

20

【0348】

前述の本開示は、理解しやすいように例証及び例によってある程度詳細に説明されているが、この説明及び例は、本開示の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。本明細書に引用される全ての特許及び科学文献の開示は、引用によりその全体が明示的に組み込まれる。

【実施例】

【0349】

(実施例)

以下は、本開示の方法及び組成物の例である。

【0350】

(実施例1: βクロトーに対する抗体の作製)

βクロトーに対する抗体を、例えば、(i)ヒトβクロトー(HuKLB)及びFGF受容体1c(FGFR1c又はR1c)を発現する細胞で、並びに(ii)HuKLB及びカニクイザルβクロトー(カニクイザルKLB)タンパク質でマウスを免疫することにより作製した。

30

【0351】

例えば、βクロトー発現細胞を以下のように調製した。293EXPI(Invitrogen)細胞に、アミノ酸位置623に突然変異を有するFGFR1cの変異体をコードする核酸配列(例えば、配列番号308(ただし、突然変異D623N有する)を参照されたい)とHuKLB(配列番号297)とを一過性にコトランスフェクトした。細胞を、R1c及びHuKLBの発現について、それぞれの特異的抗体によってFACSにより解析した。細胞をPBS中で2回洗浄し、遠心分離によってペレット化し、免疫用に、個々のバイアル中、 6×10^7 細胞で凍結させた。129/B6動物を、アジュバント(Ribi、CpG、及びポリIC)とともに、 1×10^7 個の細胞で免疫した。動物を、好適な力価を誘導するのに必要な期間、2週間毎に追加免疫した。R1c及びHuKLBを過剰発現する293EXPI細胞で4回追加免疫した後、動物をHuKLB及びCyKLBタンパク質で追加免疫した。力価をELISA及びFACSにより決定した。リンパ球の単細胞懸濁液を動物の脾臓及び流入領域リンパ節から好適な力価で得た。細胞をSP2/0骨髓腫細胞と1:2の比で電気融合により融合させた。融合した細胞を、HAT選択の存在下、 24×384 ウェルプレートに、 $70 \mu\text{L}$ 中、プレート当たり 2.5×10^6 細胞でプレーティングした。7日後、 $50 \mu\text{L}$ の上清を除去し、新鮮なHAT含有培地と交換した。10~14日間培養した後、上清を回収し、R1c及びHuKLBを過剰発現する293EXPI細胞を用いたFACSによる又はHuKLBタンパク質を用いたBiacoreによるスクリ

40

50

ーニングに供して、結合を確認した。陽性クローンをさらに選択し、サブクローニングに供した。

【0352】

1回目の免疫及び融合キャンペーンでは、少なくとも25~30枚の384ウェルプレートにHuKLB(例えば、HuKLBタンパク質及び/又はHuKLBを発現する細胞)に対する結合についてスクリーニングした。2回目の免疫及び融合キャンペーンでは、同様の数のプレートを1回目のキャンペーンについて記載されているようにスクリーニングした。数千のクローンをスクリーニングし、数百のクローンを、実施例2及び3に記載されているような結合、親和性、及びエピトープ特異性についてのアッセイにおけるものを含め、さらなる試験のために選択した。数百のハイブリドーマ上清を、FGF受容体リガンドのFGF19及び/又はFGF21と類似したアゴニスト活性(例えば、FGF19様及び/又はFGF21様シグナル伝達活性)についてのも

10

【0353】

(実施例2: β クロトーに対する抗体のスクリーニング及び選択)

β クロトーに対する抗体を、例えば、実施例1に記載されているように、ハイブリドーマから作製した。ハイブリドーマ上清を、 β クロトー(例えば、ヒト及び/又はカニクイザル β クロトー)に対する結合について、FACSベース及び/又はBiacoreベースのアッセイでスクリーニングした。

【0354】

例えば、培養から2週間後、ハイブリドーマ上清を、ヒト β クロトーに対するモノクローナル抗体の結合について、FACSベースの結合スクリーンによってスクリーニングした。簡潔に説明すると、ハイブリドーマ上清を、ヒト β クロトー過剰発現細胞と、4℃で30分間、共インキュベートした。PBS/1%BSA/0.1%アジドで洗浄した後、ヒト β クロトー過剰発現細胞を、標識抗マウスFc(Jackson Immunoresearch)と、4℃で30分間共インキュベートした。PBS/1%BSA/0.1%アジドで洗浄した後、細胞をフローサイトメーター(FACS Calibur)で取得し、細胞数測定用の解析ソフトウェア(FlowJo)によって解析した。結合抗体は、標識抗マウスFcのみとインキュベートした細胞からのシフトを示す抗体である。

20

【0355】

例えば、培養から2週間後、ハイブリドーマ上清を、ヒト β クロトーに対するモノクローナル抗体の結合について、Biacoreベースの結合スクリーンによってスクリーニングした。簡潔に説明すると、抗マウスFc抗体(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)を、アミンカップリング試薬(GE Healthcare LifeSciences, Piscataway, NJ)を用いて、CM5チップの4つ全てのフローセルに固定化した。ハイブリドーマ上清をPBS-Pバッファー(0.005%P20を含むPBS)で3倍希釈し、フローセル2、3、及び4に30秒間注入して、抗体を捕捉した(フローセル1は参照として使用した)。この後、ヒト β クロトー(25nM、R&D Systems, Minneapolis, MN)を30 μ L/分の流量で短く60秒間注入して、各々のフローセル上の捕捉された抗体に対する結合について試験した。

30

【0356】

実施例1に記載されている2回の免疫及び融合キャンペーンから、50-60枚の384ウェルプレートのハイブリドーマ上清を、結合について、FACS及び/又はBiacoreによりアッセイした。これらのアッセイから、約250個の抗体をヒト β クロトーに対するバインダーとして同定した。これらの抗体を精製し、その後、ヒト β クロトー及びカニクイザル β クロトーに対するその結合親和性についてはBiacoreにより、及びその機能活性についてはレポーターアッセイにより、実施例3に記載されている通りに試験した。

40

【0357】

さらなるBiacoreベースの結合/スクリーニングアッセイにおいて、ヒト及びカニクイザル β クロトーに対する抗体の結合親和性を測定した。例えば、抗体を、Biacoreによる低分解能 K_D 測定によって、ヒト β クロトー及びカニクイザル β クロトーに対するその結合親和性に基づいて順位付けした。簡潔に説明すると、抗マウスFc抗体(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)を、アミンカップリング試薬(GE Healthcare LifeSciences, Piscataway, NJ)

50

を用いて、CM5チップの4つ全てのフローセル上に固定化した。精製抗体を、フローセル1を参照として用いて、フローセル2、3、及び4上で捕捉した(～100RU)。この後、ヒト又はカニクイザルβクロトー(PBS-Pバッファー中、25nM)を70 μL/分の流量で注入し、25℃での結合反応速度をモニタリングした。

【0358】

結合親和性測定をさらなるBiacoreベースのアッセイでも行った。例えば、平衡解離定数(K_D)測定を精製抗体を用いて実施して、ヒトβクロトー及びカニクイザルβクロトーに対するその結合を評価した。上述の通り、抗マウスFc抗体(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)を、アミンカップリング試薬(GE Healthcare LifeSciences, Piscataway, NJ)を用いて、CM5チップの4つ全てのフローセル上に固定化した。精製抗体を、フローセル1を参照として用いて、フローセル2、3、及び4上で捕捉した(～100RU)。この後、様々な濃度のヒト又はカニクイザルβクロトー(1.56nM～25nM、PBS-Pバッファー中の2倍希釈液)を70 μL/分の流量で注入し、結合反応速度を25℃で評価した。

【0359】

代表的な結果を下の表11に示すような K_D (nM)値として報告する。

表11

【表12】

親和性 (nM)		
	HuKLB	カニクイザルKLB
5H23	～pM	0.72
1C17	0.89	3.1
1D19	1.25	2.9
2L12	0.22	1.42
3L3	1.14	2.2
3N20	3.3	3.52
4P5	0.26	0.44
5F7	1.7	2.5
1G19	N/A	N/A
5C23	1.2	2.4

【0360】

(実施例3: βクロトーに対する抗体のスクリーニング及び選択)

例えば、実施例2に記載されているように、βクロトーに対する結合について選択された抗体を、競合結合アッセイ及びエピトープマッピング実験で評価した。

【0361】

例えば、FACS解析による競合結合アッセイのために、製造元の指示に従ってA488又はA647抗体標識キット(Invitrogen)のいずれかを用いて蛍光団にコンジュゲートされている抗体標準を調製した。コンジュゲートされた抗体標準の用量滴定をHuKLB過剰発現細胞を用いて評価した。抗体結合の最大シグナルのプラトーはEC=100であり、バックグラウンドシグナルはEC=0である。FACSによる蛍光団標識抗体に対する競合を、HuKLB過剰発現細胞をハイブリドーマ上清と室温で15分間ブレインキュベートすることにより実施した。洗浄しないで、EC=10濃度のA488又はA647標識抗体標準を添加した。個々の抗体のEC=10を、最大シグナルを(100%)として及びバックグラウンドシグナルを(0%)として用いて、シグナルの10%により決定した。4℃で30分後、細胞を洗浄し、FACSにより解析した。これらのアッセイにおいて、競合抗体は、5H23による競合と同程度のシグナルを示す抗体である。非競合抗体は、標識抗体のみと同等のシグナルを示す抗体である。部分競合抗体は、標識抗体のみとバックグラウンドの間のシグナルを示す1つの見本である。同じ標準抗体に対する完全な競合を示す抗体は、同じピンのものであるとみなされる。

【0362】

FACSによる例示的な競合結合実験において、抗体5H23又は3I13を、それぞれ、陽性対照(競合抗体)又は陰性対照(非競合抗体)用の抗体標準として使用した。代表的な結果を平均

蛍光強度(MFI)として報告されている下の表12に示す。これらの実験について、標識抗体のみと同程度のシグナルは非競合抗体であり、一方、5H23による競合と同程度のシグナルは競合抗体である。

表12

【表 1 3】

抗体	平均蛍光強度 (MFI)	
	5H23 – Alexa647	3I13 – Alexa488
5H23	2.3	29.8
1C17	2.4	26.7
1D19	2.5	30.6
2L12	3.1	30.9
3L3	4.2	28.7
3N20	2.4	30.5
4P5	2.4	30.1
5C23	2.4	29.3
5F7	2.3	28.5
1G19	2.2	29.0
3I13	9.4	7.4
標識抗体 のみ	10.8	32.4

10

20

【0363】

ヒトβクロトー上の抗体の結合部位をさらに評価するために、競合実験をBiacoreでも準備した。例えば、2つの抗体をCM5チップの2つのフローセル上に固定化した。ヒトβクロトー-抗体複合体を、様々な抗体(βクロトー濃度を5nMで一定に保ちながら、抗体濃度を0.1から50nMまで漸増させた)を用いて、96ウェルマイクロプレート中に調製し、抗体表面に注入した。測定されたシグナル(応答単位、RU)を溶液抗体濃度[nM]に対してプロットした。溶液中の抗体がチップ表面に固定化された抗体と同じエピトープを認識する場合、溶液中の抗体の濃度の増加に伴ってRUの減少が観察された(βクロトー上の結合部位をめぐる競合を示している)。しかしながら、溶液中の抗体が固定化された抗体と比べて異なるエピトープを認識する場合、RUの増加が観察された。後者の状況では、抗体-クロトー複合体は、固定化された抗体表面に結合することができ、観察されるシグナルの増加をもたらした。

30

【0364】

Biacoreによる例示的な競合結合実験において、抗体5H23は、HuKLBに対する結合をそれ自体と競合し、さらなる抗体1C17、1D19、2L12、3L3、3N20、4P5、5C23、5F7、及び1G19は、5H23と競合した。これらの抗体を5H23エピトープビンのメンバーとして指定した。これらのエピトープ関連抗体の配列を整列させ、図1及び2に示す。図2は、これらの関連抗体のCDRの保存されたアミノ酸配列も示している。

40

【0365】

(実施例4:機能アッセイ)

例えば、実施例1に記載されているように作製されたβクロトーに対する抗体を、その機能活性について、細胞ベースのレポーターアッセイで試験した。

【0366】

例えば、FGFR1c/βクロトーシグナル伝達を測定するELK1-ルシフェラーゼレポーターアッセイを、一過性にトランスフェクトされたHEK293、HEK293T、又はL6細胞(ATCC)を用いて実施した。トランスフェクトするプラスミドは、2つのレポータープラスミドGal4-Elk1及び5×UAS-Luc(Agilent Technologies PathDetect Elk1トランス-レポーターシステムCat# 219005)、並びにヒトβクロトー(GeneCopoeia Cat# EX-E1104-M02)又はカニクイ

50

ザル(cynomolgus monkey) β クロトー(カニクイザル(cyno) β クロトー)及びヒトFGFR1c(GeneCopoeia Cat# EX-A0260-M02)をコードするプラスミドからなっていた。これらのアッセイでは、組換え発現されたFGFR1c/ β クロトー受容体複合体の細胞内での活性化が細胞内シグナル伝達を誘導し、それにより、ERK、次いで、Elk1のリン酸化が引き起こされる。ひとたびGal4-Elk1がリン酸化されると、Gal4-Elk1は、5×UASプロモーター領域に結合し、ルシフェラーゼレポーター遺伝子転写をオンにする。その後、ルシフェラーゼの活性をルシフェラーゼ酵素アッセイで測定する。

【0367】

これらの実験のために、上述の4つのプラスミド(例えば、2つのレポータープラスミド、 β クロトー、R1c)を、新たに採取された懸濁細胞に、FuGene6又はFugene HDトランスフェクション試薬(Promega)を用いてトランスフェクトした。細胞密度及びトランスフェクション試薬量を各々の細胞型及び各々のFugeneバッチについて最適化した。トランスフェクションにおける β クロトーとFGFR1c DNAの比を各々の細胞株について最適化し、6:1~27:1の間で変化させた。トランスフェクトされた細胞を、通常の成長培地中で、96ウェル(30,000細胞/100 μ L/ウェル)又は384ウェルプレート(7500細胞/25 μ L/ウェル)に播種した。37℃で一晩インキュベートした後、 β クロトーに対する様々な抗体を添加した。該抗体と37℃で6時間インキュベートした後、等容量のBright-Glo試薬(Promega)を添加し、発光シグナルをEnspireリーダー(Perkin Elmer)を用いて読み取った。

【0368】

HEK 293細胞にトランスフェクトされたヒト β クロトー及びカニクイザル β クロトーを用いた代表的な結果を、それぞれ、下の表13及び表14に示されるようなEC50値として報告する。

表13

【表14】

	実験 - A	実験 - B
	HEK293 huKLB/R1cレポーター アッセイ EC50	HEK293 huKLB/R1cレポーター アッセイ EC50
mAb	(pM)	(pM)
対照 *	45.3	27.9
5H23	102	34.2
1D19	620	
2L12	373	
3L3	773	
3N20	527	
4P5	600	78.3
1G19	231	127

* 対照mAbは、配列番号358及び配列番号360を含む。

表14

【表 15】

	実験 - A	実験 - B
mAb	HEK293 カニクイザルKLB/R1c レポーターアッセイEC50 (pM)	HEK293 カニクイザルKLB/R1c レポーターアッセイEC50 (pM)
対照 *	108 178	227
5H23	165	218
1D19		954
2L12	260	410
3L3	3576	1672
3N20	2464	>10000
4P5	347	465
1G19	2354	2447

* 対照mAbは、配列番号358及び配列番号360を含む。

【0369】

L6細胞にトランスフェクトされたヒトβクロトーを用いた代表的な結果を、下の表15に示されるようなEC50値として報告する。

表15

【表 16】

mAb	L6 huKLB/R1c レポーターアッセイ EC50 (nM)	L6 huKLB/R2c レポーターアッセイ EC50 (nM)	L6 huKLB/R3c レポーターアッセイ EC50 (nM)	L6 huKLB/R4 レポーターアッセイ EC50 (nM)
対照	FGF19: 2.66	FGF19: 0.16	FGF19: 2.1	FGF19: 0.05
5H23	0.28	>67	>67	>67
2L12	4.65	>67	>67	>67
4P5	0.39	>67	>67	>67

【0370】

L6細胞は内在性受容体を欠いており、トランスフェクトされた様々なFGF受容体サブタイプに対する抗体特異性を調べるためにしばしば使用される。本開示の例示的な抗βクロトー抗体によるリガンド(例えば、FGF19(例えば、配列番号304)又はFGF21(例えば、配列番号429))の非存在下でのFGFR1c/βクロトーシグナル伝達を介した受容体の活性化は、FGFR1c(R1c)でトランスフェクトされたL6細胞で観察されたが、FGFR2c(R2c)、FGFR3c(R3c)、又はFGFR4(R4)でトランスフェクトされたL6細胞では観察されず、一方、FGF19対照による活性化は、R1c、R2c、R3c、及びR4でトランスフェクトされたL6細胞で観察された。

【0371】

(実施例5:さらなる機能アッセイ)

例えば、実施例1に記載されている通りに作製されたβクロトーに対する抗体を、その機能活性について、細胞ベースのアッセイ、例えば、内在性FGFR1c/βクロトーのシグナル伝達を測定する脂肪細胞アッセイで試験した。FGF19又はFGF21は、培養脂肪細胞でERKリン酸化を刺激し、グルコース取込みを増加させ、脂肪を分解する。脂肪細胞は、受容体リガンド又はリガンドの機能(例えば、リガンドによる受容体のシグナル伝達)を模倣するアゴニスト抗体の機能活性を立証するのに生理学的に適切であると考えられる。

【0372】

例えば、凍結ヒト前脂肪細胞(Lonza Cat# PT-5005)を1日目に解凍し、3日目に分化させ、実験前に約2週間、分化培地中で維持した(例えば、その後、17日目に飢餓状態にして、18日目にアッセイした)。播種培地は、1:1 DMEM/F12K+10%FBSであった。播種する細胞の密度は、96ウェルプレート中25,000細胞/100μL/ウェルであった。3日目に、培地をヒ

10

20

30

40

50

ト脂肪細胞分化培地(Cell Applications社)と交換した。それ以後、新鮮な分化培地を2～3日毎に細胞に添加した。17日目(アッセイ前日)に、細胞をDMEM/0.1%BSA(Sigma cat# A3803必須脂肪酸非含有BSA)で2回すすぎ、一晩放置した。翌日、新鮮なDMEM/0.1%BSA培地を1時間添加した後、細胞を試験抗βクロトー抗体で37℃で15分間処理した。製造元のプロトコルに従ってCis-bio Cellul'erkアッセイキット(Cat# 64ERKPEH)を用いて、ERKリン酸化レベルについてアッセイした。

【0373】

ヒト脂肪細胞を用いた代表的な結果を、下の表16に示すようなEC50値として報告する：
表16

【表17】

mAb	実験 - A hAdip pERK アッセイ	実験 - B hAdip pERK アッセイ EC50 (nM)
対照	+++	FGF19 5.49
5H23	+++	1.66
1C17	++	>>67
1D19	+++	>67
2L12	+++	1.23
3L3	+++	~30
3N20	+++	>67
4P5	+++	0.89
5F7	++	>67
5C23	++	>>67
1G19	+++	1.3

【0374】

(実施例6:リガンド競合)

リガンド(FGF19又はFGF21)競合アッセイを実施して、抗体-ヒトβクロトー相互作用が、βクロトーのその天然リガンドFGF19又はFGF21に対する結合に影響を及ぼすかどうかを評価した。

【0375】

例えば、FGF19(例えば、配列番号304)又はFGF21(例えば、配列番号429)を(Fc1を参照表面として用いて)CM5チップのフローセル(Fc2)上に固定化するBiacoreベースの競合アッセイを準備した。ヒトβクロトー-抗体複合体を、本開示の例示的な抗体、例えば、5H23(例えば、VH配列番号25及びVL配列番号26)又はヒト化5H23(例えば、VH配列番号271及びVL配列番号276))を用いて調製した。例えば、5H23及び対照抗体の濃度を、96ウェルマイクロプレート中で、βクロトー濃度を5nMで一定に保ちながら、0.1から67nMまで漸増させ、FGF19表面に注入した。別の例については、ヒト化5H23(例えば、VH配列番号271及びVL配列番号276)の濃度を、96ウェルマイクロプレート中で、βクロトー濃度を2.5nMで一定に保ちながら、0.001から67nMまで漸増させ、FGF21表面に注入した。測定されたシグナル(応答単位、RU)を溶液抗体濃度[nM]に対してプロットした。溶液中の抗体がチップ表面に固定化されたFGF19リガンド又はFGF21リガンドと同じエピトープを認識する場合、溶液中の抗体の濃度の増加に伴ってRUの減少が観察され、βクロトー上の結合部位をめぐるFGF19リガンド又はFGF21リガンドとの競合が示された。しかしながら、溶液中の抗体が固定化されたFGF19リガンド又はFGF21リガンドと比べて異なるエピトープを認識する場合、RUの増加が観察された。後者の状況では、抗体-クロトー複合体は、固定化されたFGF19リガンド表面又は固定化されたFGF21リガンド表面に結合することができ、観察されるシグナルの増加をもたらした。下の表17Aに示される例示的なデータにおいて、対照抗体は、FGF19リガンドと部分的に競合し、RUシグナルの顕著な低下をもたらし、その場合、5H23は、βクロトーに対する結合をFGF19リガンドと競合しなかった。下の表17Bに示される例示的な

データにおいて、対照抗体は、FGF21リガンドと競合し、RUシグナルの顕著な低下をもたらし、その場合、ヒト化5H23は、 β クロトーに対する結合をFGF21リガンドと競合しなかった。

表17A

【表 1 8】

実験 1	RU	% 変化	コメント
5nM β -クロトー (複合体ではない)のRUシグナル	127	100%	対照抗体 *
クロトー-対照抗体複合体の RUシグナル	60	47% 低下	β -クロトーに対する結合を めぐる対照抗体*と FGF19の間での 部分的競合
実験 1	RU	% 変化	コメント
5nM β -クロトー (複合体ではない)のRUシグナル	109	100%	対照抗体 *
クロトー-5H23複合体の RUシグナル	125	114% 増加	5H23-クロトー複合体は FGF19に結合する、したがって、 競合はない

* 対照抗体は、配列番号358及び配列番号360を含む。

表17B

【表 1 9】

実験 1	正規化された RU	% 変化	コメント
2.5nM β -クロトー (複合体ではない)のRUシグナル	1	100%	対照抗体 *
クロトー-FGF21複合体の RUシグナル	0.03	97% 低下	FGF21は β -クロトーに対する結合を それ自体と競合する
実験 1	正規化された RU	% 変化	コメント
2.5nM β -クロトー (複合体ではない)のRUシグナル	1	100%	対照抗体 *
クロトー-ヒト化5H23複合体の RUシグナル	1.1	110% 増加	ヒト化5H23-クロトー 複合体は、FGF21に 結合する、したがって、 競合はない

* 対照抗体は、配列番号358及び配列番号360を含む。

【0 3 7 6】

5H23及びヒト化5H23抗体は、内在性リガンド、例えば、FGF19及びFGF21と比較して、 β クロトーの異なるエピトープに結合するので、FGF21と5H23又はヒト化5H23抗体との間に相乗作用があるかどうかを試験するために、実験を行った。HEK293レポーターアッセイ(例えば、実施例4を参照されたい)において、FGF21とヒト化5H23抗体(例えば、VH配列番号271及びVL配列番号276)の組合せを1:1のモル比で試験するか、又は一方を固定し、もう一方の濃度を漸増させた。相乗作用の証拠は観察されず; FGF21の最大の作用は、ヒト化5H23抗体によって増強されず、逆も同じであった。

【0 3 7 7】

(実施例7: ヒト化)

ヒト化抗 β クロトー抗体を、例えば、実施例1~6に記載されているように選択された抗体から作製した。

【0 3 7 8】

いくつかの抗 β クロトー抗体をシーケンシング用を選択した。そのVH及びVL領域を、そのCDRを含め、表1~10並びに図1及び2に示す。例示的な抗 β クロトー抗体5H23をヒト化用を選択した。いくつかのヒト化方法を利用した。ヒト化抗体の一部について、ヒト化方法は経験的なものであり、一部、分子モデルを含む免疫グロブリン可変領域に関する構造

10

20

30

40

50

情報と抗体の構造的安定性の必要性とに基づくものであった(例えば、Ewertらの文献、2004, Methods 34:184-199; Honeggerの文献、2008, Handb. Exp. Pharmacol. 181:47-68; Kuglerらの文献、2009, Protein Eng. Des. Sel. 22: 135-147を参照されたい)。本方法は、一部、抗原接触残基及び/又はフレームワーク安定性残基の検討に基づくものでもあった。例えば、典型的な抗原接触残基の検討は、抗原、特に、抗原と接触することができるCDRの外側の残基のサイズ、上部コア、中心コア、及び下部コアの分割、VH:VL境界面残基、保存されたPro/Gly(正のφ角)、及びVHサブタイプ関連残基のマッチに左右される(例えば、Ewertらの文献(上記); Honegger(上記); Kuglerらの文献(上記)を参照されたい)。

【0379】

例えば、5H23 VHフレームワーク配列と相同なヒトVH配列を探索し、ヒト生殖系列IGHV1-3*01によってコードされるVH配列(例えば、Ehrenmannらの文献、2011, Cold Spring Harbor Protoc. G:737-749を参照されたい)をヒト化のためのアクセプターとして選んだ。ヒト化抗体の一部については、5H23 VHのCDR配列をIGHV1-3*01の対応する位置にまず移した。次に、5H23 VHのいくつかのアミノ酸残基を、個別に又は組み合わせて、対応するヒト残基の代わりに用いた。

【0380】

また、例えば、5H23 VLフレームワーク配列と相同なヒトVL配列を探索し、IGKV4-1*01によってコードされるヒトVk領域(例えば、Ehrenmannらの文献(上記)を参照されたい)をヒト化のためのアクセプターとして選んだ。ヒト化抗体の一部については、5H23 VLのCDR配列をIGKV4-1*01の対応する位置にまず移した。次に、5H23 VLのいくつかのアミノ酸残基を、個別に又は組み合わせて、対応するヒト残基の代わりに用いた。

【0381】

ヒト化抗体の一部については、ヒト化の方法は、マウス可変領域の3次元マップを構築するアルゴリズムを用いた。この方法は、CDR構造の形成に重要な又はβクロトーへの結合に必要なフレームワークアミノ酸及び残基も同定した。さらに、マウス配列に対する高い相同性を有するヒトVH及びVLアミノ酸配列をヒト化のための可能なフレームワーク配列用を選択した。上記のように、5H23抗体のCDR配列をそのような追加のヒトフレームワーク配列に移すことができる。生殖系列配列(例えば、IGHV1-3、IGHV1-46、IGHV1-69、IGKV4-1、IGKV1-39、又はIGKV3-20)及び成熟した個々の配列を含む、様々なヒトフレームワーク配列は、ヒト化の方法に好適であり得る。次に、5H23 VH及び/又は5H23 VLのいくつかのアミノ酸残基を、個別に又は組み合わせて、対応するヒト残基の代わりに用いることができる。

【0382】

ヒト化軽鎖の一部については、IG BLAST検索を用いて、5H23 VLと配列が緊密に一致しかつ/又は一般に使用される配列であるヒト生殖系列配列を同定した。これには、例えば、IGKV1-39及びIGKV3-20が含まれる。ヒト化軽鎖の一部については、5H23 VLのCDR配列をIGKV1-39又はIGKV3-20の対応する位置にまず移し、その後、特定のアミノ酸を置換用に経験的に選択した。

【0383】

得られたヒト化VH(vH1~vH9)並びにVL(vL1~vL5、v1-39a~v1-39p、及びv3-20a~v3-20j)配列のアミノ酸配列を5H23 VH及びVL配列とともに図3A~3Dに示す。例えば、この実施例に記載されている様々なヒト化方法を用いて、5H23 VH及びVLのいくつかのアミノ酸残基を対応するヒト残基の代わりに用いて、図3A~3Dに示されるヒト化配列を得た。

【0384】

ヒト化βクロトー抗体は、表18のCDR配列のいずれかを、表19のフレームワーク配列のいずれかと組み合わせて用いて調製することができる。

表18

ヒト化抗βクロトー抗体のCDR配列

10

20

30

40

【表 2 0】

VH CDR1
配列番号 : 1 GYTFTSYDIN
配列番号 : 27 GYSITSGYYWN
配列番号 : 53 GYTFTRYDIN
配列番号 : 79 GYTFTRYDIN
配列番号 : 105 GYTFTSYDIN
配列番号 : 131 GYIFTNYGIS
配列番号 : 157 GYTFTRYDIN
配列番号 : 183 GYTFTRYDIN
配列番号 : 209 GYTFTRYDIN
配列番号 : 235 GYSITSGYYWN
VH CDR2
配列番号 : 2 WIYPGDGSTKYNEKFKG
配列番号 : 28 YINYDGNSNYTPSLKN
配列番号 : 54 WIYPGDSSTKFNENFKD
配列番号 : 80 WIYPGDDSTKYNEKFKG
配列番号 : 106 WIYPGDGSPKYDEKFKG
配列番号 : 132 EIYPRSGNTYYNEKFKG
配列番号 : 158 WIYPGDDSTKYNEKFKG
配列番号 : 184 WIYPGDGSTKYNEKFEG
配列番号 : 210 WIYPGDISTKYNEKFKG
配列番号 : 236 YINYGGSNNYNPSLKN
VH CDR3
配列番号 : 3 SDYYGSRSFAY
配列番号 : 29 KGAYYSNYDSFDV
配列番号 : 55 SDYYGSRSFY
配列番号 : 81 SDYYGSRSFVY
配列番号 : 107 SDYYGSRSFVY
配列番号 : 133 HWDGVLDYFDY
配列番号 : 159 SDYYGSRSFVY
配列番号 : 185 SDYYGSRSFVY
配列番号 : 211 SDYYGSRSFVY
配列番号 : 237 RGAYYSNYDSFDV
VL CDR1
配列番号 : 4 RASKSVSTSGYVYMH
配列番号 : 30 KASQDINSYLS
配列番号 : 56 RASKSVSTSGYSYMH

10

20

30

配列番号 : 82 RASKSVSTSGYSYLH
配列番号 : 108 RASKSVSTSGYSYVH
配列番号 : 134 KSSQSLLNSGNQKNYLA
配列番号 : 160 RASKSVSTSGYSYMH
配列番号 : 186 RASKSVSTSGYSYMH
配列番号 : 212 RASKSVSTSGYSYMH
配列番号 : 238 KASQDINSYLS
VL CDR2
配列番号 : 5 LASYLES
配列番号 : 31 RANRLVD
配列番号 : 57 LASNLES
配列番号 : 83 LASNLES
配列番号 : 109 LASNLES
配列番号 : 135 GASTRES
配列番号 : 161 LASNLES
配列番号 : 187 LASNLES
配列番号 : 213 LASNLES
配列番号 : 239 RANRLVD
VL CDR3
配列番号 : 6 QHSRDLTFF
配列番号 : 32 LQYDEFPFT
配列番号 : 58 QHSRELPYT
配列番号 : 84 QHSGELPYT
配列番号 : 110 QHSGELPYT
配列番号 : 136 LNDHSYPFT
配列番号 : 162 HHSGELPYT
配列番号 : 188 QHSRELPYT
配列番号 : 214 QHSRELPYT
配列番号 : 240 LQYDEFPYT

10

20

表19

30

ヒト化抗 β クロトー抗体のフレームワーク配列

【表 2 1】

VH
フレームワーク 1 (FR1)
配列番号 : 278 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS
配列番号 : 279 QVQLQQSGAEVKKPGASVKVSCKAS
配列番号 : 280 QVQLVQSGPEVKKPGASVKVSCKAS
配列番号 : 378 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS
フレームワーク 2 (FR2)
配列番号 : 281 WVRQAPGQGLEWMG
配列番号 : 282 WVRQAPGQGLEWIG
配列番号 : 283 WVKQAPGQGLEWIG
フレームワーク 3 (FR3)
配列番号 : 284 RVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR
配列番号 : 285 KATITRDTASTAYMELSSLRSEDTAVYFCAR
配列番号 : 286 KATLTADTASTAYMELSSLRSENTAVYFCAR
配列番号 : 287 KATLTADKSARTAYMELSSLRSENTAVYFCAR
配列番号 : 379 RATLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR
配列番号 : 380 RATLTADKSTRTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR
配列番号 : 381 RATITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR

40

フレームワーク 4 (FR4)
配列番号 : 288 WGQGTLVTVSS
VL
フレームワーク 1 (FR1)
配列番号 : 289 DIVLTQSPDSLAVSLGERATINC
配列番号 : 290 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC
配列番号 : 382 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC
配列番号 : 383 DIQLTQSPSSLSASVGDRVITC
配列番号 : 384 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC
フレームワーク 2 (FR2)
配列番号 : 291 WNQQKPGQPPKLLIY
配列番号 : 292 WYQQKPGQPPKLLIY
配列番号 : 385 WYQQKPGKAPKLLIY
配列番号 : 386 WNQQKPGKAPKLLIY
配列番号 : 387 WYQQKPGKPPKLLIY
配列番号 : 388 WNQQKPGKPPKLLIY
配列番号 : 389 WYQQKPGQAPRLLIY
配列番号 : 390 WNQQKPGQAPRLLIY
配列番号 : 391 WYQQKPGQPPRLLIY
配列番号 : 392 WNQQKPGQPPRLLIY
フレームワーク 3 (FR3)
配列番号 : 293 GVPDRFSGSGSGTDFTLTISVQAEDAAIYYC
配列番号 : 294 GVPDRFSGSGSGTDFTLTISVQAEDVAVYYC
配列番号 : 295 GVPDRFSGSGSGTDFTLTISVQAEDVAIYYC
配列番号 : 393 GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYC
配列番号 : 394 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC
配列番号 : 395 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISVQPEDFATYYC
配列番号 : 396 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQEEDFATYYC
配列番号 : 397 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISVQEEDFATYYC
配列番号 : 398 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISVQEEDAATYYC
配列番号 : 399 GIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC
配列番号 : 400 GIPARFSGSGSGTDFTLTISRVEPEDFAVYYC
配列番号 : 401 GIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDAAVYYC
配列番号 : 402 GIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEEEDFAVYYC
配列番号 : 403 GIPARFSGSGSGTDFTLTISRVEEEDFAVYYC
配列番号 : 404 GIPARFSGSGSGTDFTLTISRVEEEDA VYYC
フレームワーク 4 (FR4)
配列番号 : 296 FGGGTKLEIK
配列番号 : 405 FGGGTKVEIK
配列番号 : 406 FGQGTKLEIK
配列番号 : 407 FGGQTKLEIK

10

20

30

40

50

【 0 3 8 5 】

例えば、ヒト化抗 β クロトー抗体は：FR1(例えば、配列番号278、279、280、もしくは378)；CDR1(例えば、配列番号1、27、53、79、105、131、157、183、209、235)；FR2(例えば、配列番号281、282、もしくは283)；CDR2(例えば、配列番号2、28、54、80、106、132、158、184、210、もしくは236)；FR3(例えば、配列番号284、285、286、287、379、380、もしくは381)；CDR3(例えば、配列番号3、29、55、81、107、133、159、185、211、もしくは237)；及び/又はFR4(例えば、配列番号288)を含む重鎖可変領域(VH)；並びに/或いは：FR1(例えば、配列番号289、290、382、383、もしくは384)；CDR1(例えば、配列番号4、30、56、82、108、134、160、186、212、もしくは238)；FR2(例えば、配列番号291、292、もしくは385-392)；CDR2(例えば、配列番号5、31、57、83、109、135、161、187、213、もしくは239)；FR3(例えば、配列番号293、294、295、もしくは393-404)；CDR3(例えば、配列番号6、32、58、84、110、136、162、188、214、240)；及び/又はFR4(例えば、配列

番号296、405、406、もしくは407)を含む軽鎖可変領域(VL)を含み得る。

【0386】

この実施例に記載されているように、作出された抗体5H23のVH領域の9種のヒト化変異体及び作出された抗体5H23のVL領域の31種のヒト化変異体を含む、ヒト化抗βクロトー抗体は経験的に設計され、βクロトー結合タンパク質として発現された。これらの例示的なヒト化5H23 VH及びVL領域の配列を図3A～3Dに示す。

【0387】

ヒト化抗体を、図3A～3Dに示される配列を有するヒト化VH及びヒト化VL領域を用いて調製した。例えば、図3A～3Dに示される配列を有する、IgG1(ala-ala)定常領域(配列番号316)及びカッパ定常領域(配列番号318)を用いて、vH1～6とvL1～3の18(6×3)の組合せ：vH1-VL1、vH1-vL2、vH1-vL3、vH2-vL1、vH2-vL2、vH2-vL3、vH3-vL1、vH3-vL2、vH3-vL3、vH4-vL1、vH4-vL2、vH4-vL3、vH5-vL1、vH5-vL2、vH5-vL3、vH6-vL1、vH6-vL2、vH6-vL3を構築した。さらに、図3A～3Dに示される配列を有する、例示的なヒト化VH領域(例えば、vH3)及び26種のヒト化VL領域(v1-39a～v1-39p及びv3-20a～v3-20j)を用いて、ヒト化抗体を構築した。

【0388】

ヒト化抗体を、その活性について、例えば、実施例2～6に記載されているものを含む、様々なアッセイで試験した。vL3又はv1-39cを含む軽鎖を有するヒト化抗体の発現は低く、これらの抗体はそれ以上試験しなかった。様々なヒト化抗βクロトー抗体についての例示的な結果を下の表20A及び20Bに示す。

表20A

【表22】

抗体	発現 (mg/L)	KD-huKLB (nM)	KD-cyKLB (nM)	EC50 レポーター アッセイ (nM)	EC50- 脂肪細胞 (nM)
対照 mAb		0.08	0.7	0.2,0.54	3.4
5H23		0.05	0.7	0.27,0.51	3.4
vL1					
vH1	80	1.5	≥ 50	2.7	ND
vH2	80	1.7	≥ 50	3.2	ND
vH3	50	0.43	≥ 50	1.1	ND
vH4	80	2.26	≥ 50	3.0	ND
vH5	20	0.81	≥ 50	8.2	ND
vH6				NA	
vL2					
vH1	200	0.21	0.95	NA	8.4
vH2	66	0.41	0.75	1.3	13.3
vH3	50-60	0.23	0.59	0.68	5.5
vH4	66	0.33	0.61	3.5	16.4
vH5	30	0.19	0.61	1.1	8.1
vH6	20	0.4	0.83	1.7	15.3

表20B

【表 2 3】

抗体	推定力価 (mg/L)	KD-huKLB (nM)	EC50 レポーター アッセイ (nM)	EC50 脂肪細胞 アッセイ (nM)
h5H23 (調製物 1)	--	0.64	--	--
h5H23 (調製物 2)	--	0.58	0.6	11.2
vH3				
VL v1-39a	50	0.90	--	--
VL v1-39b	50	0.53	1.03	--
VL v1-39c	10	--	--	--
VL v1-39d	50	0.73	1.49	--
VL v1-39e	>100	1.00	--	--
VL v1-39f	>100	0.28	0.80	21.4
VL v1-39g	>100	1.10	--	--
VL v1-39h	10	2.10	--	--
VL v1-39i	50	0.63	1.12	--
VL v1-39j	100	0.70	--	--
VL v1-39k	100	1.50	--	--
VL v1-39l	100	--	--	--
VL v1-39m	50	<0.1	--	--
VL v1-39n	>100	<0.1	--	--
VL v1-39o	25	0.36	--	--
VL v1-39p	10	0.36	--	--
VL v3-20a	25	0.64	--	--
VL v3-20b	50	1.90	--	--
VL v3-20c	0	1.60	--	--
VL v3-20d	50	--	--	--
VL v3-20e	50	1.60	--	--
VL v3-20f	10	1.80	--	--
VL v3-20g	--	--	--	--
VL v3-20h	25	1.50	--	--
VL v3-20i	10	--	--	--
VL v3-20j	10	--	--	--

調製物1＝LC変異体と同時に発現されたヒト化5H23抗体(例えば、VH配列番号271及びVL配列番号276)調製物;調製物2＝ヒト化5H23抗体(例えば、VH配列番号271及びVL配列番号276)精製調製物。対照抗体＝VH配列番号358及びVL配列番号360。

【0389】

さらなるアッセイ、例えば、実施例4に記載されているHEK293T細胞(ここで、該細胞は、マウスβクロトー(例えば、配列番号301)、ラットβクロトー(例えば、配列番号356)、ハムスターβクロトー(例えば、配列番号408)、ウサギβクロトー(例えば、配列番号410)、又はイヌβクロトー(例えば、配列番号412)をコードするプラスミドでトランスフェクトされ、かつそれぞれ、キメラマウスFGFR1-βIIIc受容体(例えば、配列番号416)、キメララットFGFR1-βIIIc受容体(例えば、配列番号419)、キメラハムスターFGFR1-βIIIc受容体(例えば、配列番号417)、キメラウサギFGFR1-βIIIc受容体(例えば、配列番号420)、又はイヌFGFR1-βIIIc受容体(例えば、配列番号418)をコードするプラスミドもトランスフェクトされている)を用いるレポーターアッセイにおいて、抗βクロトー抗体、例えば、ヒト化5H23抗体(例えば、VH配列番号271及びVL配列番号276)で処理したとき、それぞれ、キメラのマウス、ラット、ハムスター、ウサギ、又はイヌβクロトー-FGFR1c受容体複合体を活性化しなかった。本明細書に記載される抗βクロトー抗体は、5H23及びヒト化5H23抗体、並びに表1～10に示されるCDR配列を有する、5H23と競合する抗体(例えば、実施例3に記載される1C17、1D19、2L12、3L3、3N20、4P5、5C23、5F7、及び1G19)を含め、上

記のレポーターアッセイによって示されるように、ヒト及びカニクイザル β クロトール/FGF受容体複合体を活性化するが、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、又はイヌ β クロトール/FGF受容体複合体を活性化しない。抗 β クロトール抗体、例えば、ヒト化5H23抗体(例えば、VH配列番号271及びVL配列番号276)のパパイン消化から調製される抗 β クロトール抗体の一価Fabを、ヒトFGFR1c/KLB受容体複合体を活性化するその能力についてHEK293レポーターアッセイで試験したとき、該Fabが67nMまで抗体活性を示さなかったのに対し、ヒト化5H23抗体は、表20Bに示される活性と類似した低ナノモル濃度での活性を示した。

【0390】

(実施例8:動物試験)

抗 β クロトール抗体の効果を、カニクイザルを用いるものを含む、動物試験で評価する。

肥満カニクイザル試験において、ヒト β クロトール及びカニクイザル β クロトールに結合する例示的な抗 β クロトール抗体(例えば、抗体5H23もしくはそのヒト化変異体)、並びに表1に示される5H23のCDRのうちの1つもしくは複数を含む抗体、又はその代わりに、実施例3に記載されているように、5H23のヒト β クロトールに対する結合を競合する、表2~10に示される抗体もしくはそのヒト化変異体のCDRうちの1つもしくは複数を含む抗体を投与する。様々な代謝パラメータに対する効果を測定することができる。例示的なパラメータとしては、食物摂取量、体重、体格指数(BMI)、腹囲(AC)、皮下脂肪厚(SFT)、経口グルコース耐性試験(OGTT)、空腹時及び/又は摂食時(例えば、食後)血液(例えば、血清)グルコースレベル、インスリンレベル、及び/又はトリグリセリドレベルが挙げられる。

【0391】

実際の試験では、40以上の体格指数を有する20匹の自然発症肥満カニクイザルを選択し、ビヒクル群(n=10)と抗体処置群(n=10)に無作為に割り付ける。動物は、1及び14日目に、ビヒクル又は抗 β クロトール抗体のいずれかの皮下注射を受ける。各々の食事に関する食物摂取量を記録し、体重を週に1回測定する。血漿(或いは、血清)グルコース、インスリン、脂質、及び対象となるパラメータの測定のために、血液試料を、週に1回、7週間採取する。14、28、及び49日目に、経口グルコース耐性試験を実施する。

【0392】

例示的な処置効果としては、食物摂取量の低下、体重の減少、BMI、AC、及び/もしくはSFTの減少、グルコース耐性の改善、インスリンレベルの減少、空腹時及び/もしくは摂食時(例えば、食後)血漿(或いは、血清)グルコースレベル、インスリンレベルの減少、並びに/又はトリグリセリドレベルの低下を挙げることができる。これらの効果は、抗 β クロトール抗体での処置による代謝パラメータの改善を示す。

【0393】

例えば、20匹の雄カニクイザルを、そのBMI(>40)に基づいて、ヒト化5H23抗体(例えば、VH配列番号271及びVL配列番号276)又はビヒクル対照による処置用を選択し、椅子拘束、皮下注射、採血、及び経口強制飼養の訓練をした。ルーチンの給餌スケジュールを確立した。

【0394】

対象となる様々なパラメータのベースライン値を処置前に測定した。例えば、-7日目に、ベースライン体重、BMI、腹囲、及び皮下脂肪厚を測定し、二重エネルギーX線吸収(「DEXA」)スキャンをケタミン麻酔下のカニクイザルに対して実施して、骨ミネラル密度を測定した。血液試料を、-3日目に、一晚絶食の後で採取した。血清グルコース、インスリン、総コレステロール、LDL、HDL、トリグリセリドのベースラインレベル、並びに一連の血液及び臨床化学パラメータを測定し、解析した。ベースラインサンプリングのすぐ後に、4g/kgのグルコースの強制飼養を受けさせることによって、動物を経口グルコース耐性試験(OGTT)に供し、グルコース投与から5、15、30、60、120、及び180分後にサンプリングし、血清グルコース及びインスリンを測定した。ベースラインデータに基づいて、各々の群に動物10匹として(例えば、一方の群を抗体処置に、もう一方の群をビヒクル対照群として)、動物を2つの群に割り当て、様々なパラメータ、例えば、体重、BMI、並びに血清グルコース、インスリン、及びトリグリセリドのレベルの類似したベースラインレベルを

達成した。

【0395】

第0日から始めて、一方の群の動物(n=10)は、10mg/kgの抗 β クロトー抗体、例えば、ヒト化5H23抗体(例えば、VH配列番号271及びVL配列番号276)の皮下注射の投与を、4回の投与の間、隔週で(例えば、0、14、28、及び42日目に)受けた。ビヒクル対照群は、同じ日に対応するビヒクルを受けた。処置は、午前中、朝食の30分前に実施し、投与容量は0.1~0.2mL/kgとした。

【0396】

対象となるパラメータ、例えば、食物摂取量、体重、臨床化学、及びOGTTを、試験の全体を通してモニタリングした。例えば、食物摂取量を毎日測定した。体重、BMI、腹囲、及び皮下脂肪厚を、毎週、例えば、7、14、21、28、35、42、49、56、63、70、77、84、91、及び98日目に測定した。血液試料を、毎週、例えば、7、14、21、28、35、42、49、56、63、及び70日目に、一晚絶食の後に回収して、グルコース、インスリン、及び脂質、例えば、トリグリセリドを測定した。さらなる血液試料を、98日目に、一晚絶食の後に採取した。OGTTを、試験開始後、例えば、14、28、及び56日目に実施し、その場合、動物は、4g/kgのグルコースの強制飼養を受け、グルコース投与から5、15、30、60、120、及び180分後にサンプリングされ、血清グルコース及びインスリンが測定された。DEXAスキャンを30及び72日目に実施した。さらに、血液及び臨床化学パネルを28及び70日目に解析した。ビヒクル群の2匹の動物及び抗 β クロトー抗体群の2匹の動物を安楽死させ、安全性評価のために、剖検を50日目に実施した。試験中、全ての動物をその健康について入念にモニタリングした。

【0397】

この試験の例示的な結果を下の表21~25に示す。表21に示すように、ビヒクルで処置した動物の体重は一定のままであった(経過にわたって若干増加した)が;抗 β クロトー抗体で処置した動物の体重は徐々に減少し、体重は、第8週~第14週(例えば、回復期)の間に、ベースラインレベルに戻らなかった。同様に、表22に示すように、ビヒクルで処置した動物は、試験の全体を通して、比較的安定なBMIを示したが、抗 β クロトー抗体で処置した動物は、試験の経過にわたって、BMIのレベルの減少を示した。BMIレベルも(例えば、回復期の間に)ベースライン値に戻らなかった。これらの結果は、抗 β クロトー抗体処置が、脂肪質量の低下をもたらしたことを示唆している。

【0398】

表23に示すように、ビヒクルで処置した動物における血清インスリンレベルは試験の経過にわたって増加したが;抗 β クロトー抗体で処置した動物における血清インスリンレベルは有意に減少した。表24に示すように、血清グルコースレベルも抗 β クロトー抗体で処置した動物で低下した。同様に、表25に示すように、ビヒクルで処置した動物におけるトリグリセリドレベルは試験の経過にわたって増加したが;抗 β クロトー抗体で処置した動物におけるトリグリセリドレベルは有意に低下した。

【0399】

OGTTの結果は、処置の前、インスリンのベースラインレベルがビヒクル群と抗 β クロトー抗体群の間で有意差がないことを示した。対照的に、処置の後、グルコース低下の傾向があり、インスリンレベルは、ビヒクルで処置した動物と比較して、抗 β クロトー抗体で処置した動物で低下した。

【表 2 4】

表 21A: 体重 (kg)																	
	週	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
ビヒクル	平均	10.84	10.75	10.66	10.63	10.61	10.75	10.67	10.66	10.75	10.98	10.96	11.08	11.09	11.12	11.23	11.18
	sem	0.49	0.50	0.50	0.48	0.48	0.47	0.48	0.46	0.47	0.59	0.59	0.61	0.60	0.59	0.58	0.59
h5H23	平均	10.87	10.84	10.60	10.45	10.27	10.21	10.00	9.86	9.76	9.58	9.52	9.46	9.43	9.43	9.39	9.27
	sem	0.33	0.36	0.36	0.38	0.37	0.40	0.41	0.41	0.42	0.50	0.51	0.51	0.53	0.56	0.53	0.56

10

20

30

40

表 21B: 体重変化 (kg)																
	週	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
ビヒクル	平均	0.00	-0.09	-0.12	-0.14	0.00	-0.08	-0.09	0.00	0.14	0.13	0.24	0.26	0.28	0.39	0.34
	sem	0.00	0.05	0.07	0.09	0.09	0.09	0.10	0.10	0.12	0.13	0.13	0.14	0.17	0.18	0.17
h5H23	平均	0.00	-0.24	-0.39	-0.57	-0.63	-0.84	-0.98	-1.08	-1.07	-1.13	-1.19	-1.22	-1.22	-1.25	-1.38
	sem	0.00	0.05	0.08	0.10	0.13	0.15	0.17	0.19	0.26	0.27	0.28	0.31	0.34	0.31	0.34

10

20

30

40

表 22: BMI																	
	週	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
ビビクル	平均	57.59	57.06	56.59	56.44	56.33	57.08	56.63	56.59	57.06	58.27	58.17	58.76	58.86	59.00	59.60	59.33
	sem	2.41	2.45	2.45	2.33	2.31	2.28	2.30	2.23	2.25	2.55	2.52	2.60	2.60	2.53	2.46	2.51
h5H23	平均	57.52	57.32	56.03	55.24	54.28	53.95	52.82	52.07	51.54	48.85	48.56	48.24	48.09	48.07	47.94	47.28
	sem	2.53	2.61	2.50	2.51	2.44	2.50	2.52	2.54	2.48	2.29	2.30	2.32	2.44	2.54	2.46	2.60

10

20

30

40

【表 2 7】

表 23: インスリン (uU/mL)												
	週	-1 to 0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ビビクル	平均	114.85	100.09	91.06	124.79	187.36	159.20	226.53	145.78	186.75	204.96	181.32
	sem	32.75	19.94	26.33	37.48	62.09	51.60	130.94	34.74	39.85	52.63	52.28
h5H23	平均	89.18	34.73	36.19	38.11	46.75	48.28	35.42	37.95	57.29	63.23	55.30
	sem	9.51	4.91	4.14	7.24	6.54	6.80	4.98	5.03	12.99	12.43	13.62

10

20

30

40

表 24: グルコース (mg/dL)												
	週	-1 to 0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ビビクル	平均	90.81	93.69	95.41	90.21	94.51	98.31	97.70	95.78	94.73	93.53	90.06
	sem	10.00	9.07	9.73	7.93	9.17	10.46	13.12	10.21	11.62	12.09	12.49
h5H23	平均	90.85	87.37	83.19	84.92	85.62	80.52	80.97	79.60	81.90	78.20	76.60
	sem	11.67	6.61	6.92	8.02	6.75	5.67	6.32	4.30	4.97	7.07	5.49

10

20

30

40

【表 2 9】

表 25: トリグリセリド (mmol/L)												
	週	-1 to 0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ビヒクル	平均	0.93	0.76	0.92	0.70	1.36	0.90	1.15	1.20	1.54	1.35	1.26
	sem	0.25	0.08	0.16	0.10	0.27	0.14	0.38	0.22	0.35	0.38	0.37
h5H23	平均	1.05	0.65	0.65	0.59	0.70	0.59	0.56	0.70	0.90	0.73	0.71
	sem	0.17	0.09	0.12	0.08	0.10	0.05	0.07	0.12	0.13	0.08	0.10

別の例示的な試験において、40匹の雄の自然発症肥満カニクイザルを上記のように選択し、訓練し、給餌した。

【0401】

様々なパラメータのベースライン値を測定し、その後、上で論じたように処置した。例えば、ベースライン体重、BMI、腹囲、及び皮下脂肪厚を-4日目に測定し、ベースライン血液試料を、血清グルコース、インスリン、総コレステロール、LDL、HDL、及びトリグリセリドの測定用に、-3日目に、一晚絶食の後で採取した。これらのベースラインデータに基づいて、動物を5つの群(各々の群に8匹の動物)に割り当て、4つの群は、様々な用量の抗βクロトー抗体、例えば、ヒト化5H23抗体(例えば、VH配列番号271及びVL配列番号276)を受け、1つの群はビヒクル対照を受けた。

10

【0402】

0日目に、第1群の動物(n=8)は、0.1mg/kgの抗βクロトー抗体の皮下注射の単回投与を受け;第2群の動物(n=8)は、1mg/kgの抗βクロトー抗体の皮下注射の単回投与を受け、第3群の動物(n=8)は、10mg/kgの抗βクロトー抗体の皮下注射の単回投与を受けた。第0日から始めて、第4群の動物(n=8)は、4週間毎に1回、12週間、0.1mg/kgの抗βクロトー抗体の皮下注射の投与を受けた。対照として、第5群の動物(n=8)は、4週間毎に1回、12週間、ビヒクルの投与を受けた。処置を、午前中、朝食の30分前に実施し、投与容量を0.2mL/kgとした。

【0403】

対象となるパラメータを試験の全体を通してモニタリングした。例えば、食物摂取量を各々の食事について測定した。体重、BMI、腹囲、及び皮下脂肪厚を毎週測定した。血液試料を、例えば、投与から3、6、12、及び24時間、並びに3、4、7、10、14、21、28、35、42、49、56、63、70、77、84、及び112日後に採取し、対象となるパラメータ、例えば、血清グルコース、インスリン、総コレステロール、LDL、HDL、及びトリグリセリドを測定した。試験中、全ての動物を、その健康について上記のように入念にモニタリングした。

20

【0404】

この用量応答試験の例示的な結果を表26~29に示す。表26は、ビヒクルで処置した動物における体重変化と比較した、抗βクロトー抗体で処置した動物における相対的な体重変化を示している。示すように、0.1mg/kg、1mg/kg、もしくは10mg/kgの抗βクロトー抗体の皮下注射の単回投与、又は1mg/kgの抗βクロトー抗体の皮下注射の4回の投与は、体重を有意に低下させた。さらに、体重の低下は、ビヒクルと比較して、10mg/kgの抗βクロトー抗体の単回投与を受けている動物について、又は1mg/kgの抗βクロトー抗体の4回の投与を受けている動物について、112日目に維持されていた。

30

【0405】

表27に示すように、0.1mg/kg、1mg/kg、もしくは10mg/kgの抗βクロトー抗体の皮下注射の単回投与、又は1mg/kgの抗βクロトー抗体の皮下注射の4回の投与は、ビヒクル対照群と比較して、血清インスリンレベルを低下させた。さらに、表28に示すように、1mg/kgの抗βクロトー抗体の皮下注射の4回の投与は、血清グルコースレベルを有意に低下させた。さらに、表29に示すように、1mg/kgもしくは10mg/kgの抗βクロトー抗体の皮下注射の単回投与、又は1mg/kgの抗βクロトー抗体の皮下注射の4回の投与で処置した動物における血清トリグリセリドレベルは、ビヒクルで処置した動物と比較して低下した。

40

表26A 体重

【表 3 0】

ビヒクル	日	-4	4	10	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84	112
		平均	10.17	10.07	9.89	9.87	9.91	9.83	9.82	9.73	9.71	9.63	9.61	9.57	9.45	9.24
5H23 (0.1 mg/kg SD)	sem	0.78	0.80	0.77	0.79	0.81	0.81	0.82	0.82	0.83	0.83	0.83	0.83	0.83	0.83	0.81
	平均	10.00	9.92	9.70	9.62	9.52	9.47	9.37	9.28	9.27	9.36	9.34	9.27	9.34	9.34	9.21
5H23 (1 mg/kg SD)	sem	0.67	0.71	0.69	0.71	0.73	0.76	0.76	0.79	0.79	0.81	0.83	0.85	0.86	0.87	0.85
	平均	9.84	9.69	9.49	9.36	9.28	9.19	9.05	8.92	8.90	8.85	8.85	8.83	8.89	8.93	9.24
5H23 (10 mg/kg SD)	sem	0.54	0.55	0.54	0.53	0.54	0.55	0.55	0.55	0.55	0.54	0.55	0.55	0.55	0.55	0.56
	平均	10.07	9.95	9.73	9.61	9.49	9.33	9.20	9.07	8.98	8.88	8.80	8.73	8.74	8.67	8.51
5H23 (1 mg/kg q4w)	sem	0.58	0.56	0.57	0.57	0.59	0.59	0.58	0.58	0.56	0.56	0.58	0.55	0.55	0.54	0.50
	平均	10.05	9.86	9.66	9.51	9.40	9.31	9.14	8.92	8.84	8.74	8.63	8.53	8.45	8.41	8.29
	sem	0.42	0.45	0.43	0.42	0.44	0.44	0.43	0.43	0.42	0.41	0.42	0.40	0.40	0.39	0.38

表26B 体重変化 (kg)

10

20

30

40

50

【表 3 1】

ビヒクル	日	-4	4	10	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84	112
		平均	0.00	-0.09	-0.28	-0.30	-0.26	-0.34	-0.35	-0.44	-0.45	-0.53	-0.60	-0.64	-0.71	-0.93
5H23 (0.1 mg/kg SD)	sem	0.00	0.05	0.05	0.04	0.06	0.08	0.10	0.13	0.14	0.16	0.18	0.19	0.22	0.23	0.27
	平均	0.00	-0.08	-0.30	-0.38	-0.49	-0.54	-0.64	-0.72	-0.74	-0.65	-0.66	-0.74	-0.66	-0.66	-0.80
5H23 (1 mg/kg SD)	sem	0.00	0.08	0.06	0.09	0.11	0.15	0.17	0.20	0.22	0.24	0.26	0.28	0.30	0.31	0.28
	平均	0.00	-0.16	-0.35	-0.48	-0.56	-0.65	-0.79	-0.93	-0.95	-0.99	-1.00	-1.01	-0.95	-0.91	-0.60
5H23 (10 mg/kg SD)	sem	0.00	0.03	0.04	0.04	0.05	0.07	0.08	0.09	0.11	0.13	0.15	0.19	0.21	0.22	0.20
	平均	0.00	-0.12	-0.34	-0.47	-0.59	-0.74	-0.88	-1.00	-1.10	-1.20	-1.27	-1.35	-1.34	-1.40	-1.56
5H23 (1 mg/kg q4w)	sem	0.00	0.05	0.07	0.08	0.10	0.12	0.12	0.11	0.15	0.15	0.16	0.17	0.15	0.16	0.23
	平均	0.00	-0.18	-0.38	-0.54	-0.65	-0.74	-0.90	-1.13	-1.20	-1.30	-1.41	-1.52	-1.60	-1.64	-1.75
	sem	0.00	0.08	0.06	0.05	0.05	0.06	0.08	0.10	0.11	0.13	0.15	0.15	0.16	0.17	0.26

10

20

30

40

【表 3 2】

日		-3 d	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d	42 d	49 d	56 d	70 d	84 d	112 d
ビヒクル	平均	78.96	75.44	85.96	98.23	90.35	80.65	71.70	76.54	80.11	80.61	70.61	51.41
	sem	17.16	16.65	15.18	23.76	21.01	15.17	13.01	12.82	16.32	20.81	17.91	11.05
5H23 (0.1 mg/kg SD)	平均	118.28	64.70	65.09	65.83	61.15	62.26	84.34	68.17	85.20	82.99	95.31	57.32
	sem	62.16	20.06	22.84	20.26	22.41	19.93	37.61	24.82	41.19	45.77	46.91	20.74
5H23 (1 mg/kg SD)	平均	74.75	54.52	51.50	54.88	42.31	46.42	46.28	38.83	56.57	40.89	51.84	64.91
	sem	14.42	15.27	10.80	15.55	13.92	11.97	10.53	7.93	16.04	7.15	14.73	21.66
5H23 (10 mg/kg SD)	平均	84.03	51.57	46.50	54.45	53.42	38.67	37.25	34.70	32.83	25.49	33.33	22.38
	sem	18.06	10.75	7.19	14.43	15.43	7.95	5.16	5.04	6.61	3.18	7.10	2.46
5H23 (1 mg/kg q4w)	平均	133.82	52.88	61.67	109.20	49.94	38.83	37.60	47.85	40.18	32.42	30.58	22.14
	sem	57.35	18.45	14.30	40.07	13.96	9.93	12.32	13.85	11.96	8.21	10.73	4.17

10

20

30

40

表28 グルコース

【表 3 3】

ビヒクル	日	-3 d	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d	42 d	49 d	56 d	70 d	84 d	112 d
	平均	90.95	76.41	69.57	68.60	63.90	59.94	68.27	70.79	58.12	70.16	73.60	71.46
5H23 (0.1 mg/kg SD)	sem	8.29	9.37	5.55	7.89	6.31	3.46	6.14	7.93	4.42	7.37	7.52	11.33
	平均	92.54	72.59	67.10	63.23	54.14	58.19	62.37	62.53	62.46	64.24	79.27	73.80
5H23 (1 mg/kg SD)	sem	15.41	5.49	4.54	4.52	4.82	3.37	3.69	3.39	5.17	3.60	10.90	6.91
	平均	97.67	73.82	64.51	57.74	54.72	67.07	62.39	62.96	65.25	65.88	68.56	70.02
5H23 (10 mg/kg SD)	sem	11.08	4.64	2.69	3.29	4.38	4.98	3.91	2.36	2.59	8.34	5.21	6.84
	平均	89.71	73.24	68.74	61.13	58.93	60.55	66.49	61.11	63.14	59.11	69.59	66.49
5H23 (1 mg/kg q4w)	sem	11.76	5.56	3.10	5.11	1.92	2.68	2.14	3.56	2.21	2.52	3.98	3.11
	平均	130.01	87.28	81.11	77.56	71.89	67.82	67.79	66.98	65.34	63.23	72.56	69.50
	sem	21.21	15.15	10.15	13.41	6.83	7.05	7.56	4.99	6.98	3.75	6.66	4.98

10

20

30

40

表29 トリグリセリド

【表 3 4】

ビヒクル	日	-3 d	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d	42 d	49 d	56 d	70 d	84 d	112 d
	平均	0.90	0.61	1.00	1.45	1.04	1.51	1.03	1.30	0.99	1.10	1.12	0.79
5H23 (0.1 mg/kg SD)	sem	0.18	0.12	0.19	0.33	0.23	0.32	0.17	0.23	0.19	0.25	0.30	0.13
	平均	0.69	0.54	0.57	0.67	0.59	0.70	0.78	0.85	1.09	0.89	1.18	0.98
5H23 (1 mg/kg SD)	sem	0.13	0.10	0.11	0.17	0.15	0.14	0.22	0.20	0.40	0.25	0.39	0.27
	平均	1.27	0.58	0.76	0.91	0.73	0.59	0.59	0.72	0.83	0.95	1.33	1.61
5H23 (10 mg/kg SD)	sem	0.37	0.06	0.20	0.22	0.21	0.06	0.14	0.17	0.27	0.30	0.36	0.24
	平均	1.12	0.61	0.64	0.68	0.54	0.97	0.55	0.64	0.65	0.59	0.65	0.71
5H23 (1 mg/kg q4w)	sem	0.18	0.09	0.12	0.15	0.09	0.38	0.09	0.13	0.12	0.12	0.11	0.12
	平均	1.24	0.65	0.68	0.77	0.65	0.57	0.56	0.55	0.57	0.49	0.53	0.53
	sem	0.36	0.18	0.19	0.28	0.11	0.11	0.09	0.13	0.14	0.10	0.08	0.07

【0 4 0 6】

これらの動物試験の結果は、本明細書に提供される抗βクロトー抗体での処置による代謝パラメータの改善、例えば、体重、体格指数、腹囲、皮下脂肪厚、グルコース(例えば

10

20

30

40

50

、血清グルコース)、インスリン(例えば、血清インスリン)、及び/又はトリグリセリド(例えば、血清トリグリセリド)の減少などを示している。

【0407】

(実施例9:エピトープ及びドメインマッピング)

表1~10及び図1~3に示される配列を有する、実施例3に記載された5H23を含む、5H23エピトープピンの抗 β クロトー抗体、並びに5H23エピトープピンのヒト抗 β クロトー抗体、例えば、ヒト化5H23抗体(例えば、VH配列番号271及びVL配列番号276)のヒトKLB上に結合部位を位置付けるために、試験を実施した。例えば、ドメインマッピングのためのFACSベースの結合アッセイを、KLB:ヒト、マウス、カニクイザルの変異体、マウス-ヒトKLB(配列番号376)を作出するためにマウスKLB(M1-F506)のKL1ドメイン配列がヒトKLB(M1-F508)のKL1ドメインと置き換わっているキメラ型、及びヒト-マウスKLB(配列番号374)を作出するためにヒトKL1配列(M1-F508)がマウスKLB(M1-F506)のKL1ドメインと置き換わっている第2のキメラをコードするプラスミドが一過性にトランスフェクトされたExpi293細胞(Life Technologies, A14635)に対して実施した。さらに、KLB配列を有しない発現ベクターpYD7を陰性対照としてトランスフェクトした。

【0408】

いくつかの試験では、ヒト化5H23抗体(例えば、VH配列番号271及びVL配列番号276)の精製試料のKLB変異体に対する結合をFACS解析によって決定した。トランスフェクションから2日後、細胞を、 $1\mu\text{g/ml}$ までPBS/1%BSA/0.1%アジドに希釈した精製抗体:ヒト化5H23抗体(例えば、VH配列番号271及びVL配列番号276)、対照抗体(例えば、VH配列番号358及びVL配列番号360)、並びに陰性対照抗体(例えば、配列番号424及び425を含むコンストラクトから発現された抗キーホールリンペットヘモシニアン(KLH)抗体)と 4°C で30分間共インキュベートした。PBS/1%BSA/0.1%アジドで洗浄した後、トランスフェクトされた細胞を、次に、標識された抗ヒトFc(Jackson Immunoresearch)と 4°C で30分間共インキュベートした。PBS/1%BSA/0.1%アジドで洗浄した後、細胞をフローサイトメーター(FACS Calibur)で取得し、細胞数測定ソフトウェア(FlowJo)によって解析した。得られたデータを提示するために、細胞の数を蛍光強度の関数としてプロットしたグラフを作成し、蛍光強度中央値(MFI)を、各々の試料について、表30に示すように決定した。

表30

【表35】

抗体	マウス KLB	マウス- ヒト キメラ KLB	ヒト- マウス キメラ KLB	ヒト KLB	カニクイ ザルKLB	空 ベクター (一対照)
h5H23	14.2	26.1	9.29	865	1909	8.29
対照	10.6	5.6	71.9	620	1757	6.82
陰性対照	9.59	5.44	6.01	6.2	9.26	5.41

* FlowJo解析ソフトウェアを用いてFACSデータから計算された平均蛍光強度;陰性対照は抗KLH抗体である。

【0409】

抗KLH陰性対照抗体で処理した細胞と比較して高い蛍光強度を有する細胞の比率が大きいことによって示されるように、例示的なヒト化5H23抗体(例えば、VH配列番号271及びVL配列番号276)は、ヒトKLB及びカニクイザルKLBに結合したが、例示的なヒト化5H23抗体は、マウスKLBに結合しなかった。例示的なヒト化5H23抗体は、マウス-ヒトKLBキメラタンパク質にも結合したが、ヒト-マウスKLBキメラタンパク質には結合せず、これは、表1~10及び図1~3に示される配列を有する、実施例3に記載された5H23を含む、5H23エピトープピンの抗 β クロトー抗体、並びに5H23エピトープピンのヒト抗 β クロトー抗体、例えば、ヒト化5H23抗体(例えば、VH配列番号271及びVL配列番号276)がヒトKLBのKL2ドメインに結合することを示している。対照的に、マウス-ヒトKLBキメラタンパク質ではなく、ヒト-

マウスKLBキメラタンパク質でトランスフェクトされた細胞へのその結合によって示されるように、対照抗体は、ヒトKLBのKL1ドメインに結合した。

【0410】

ヒトβクロトールKL2ドメイン内の特異的結合残基をさらに同定するために、ショットガン突然変異誘発を用いて、ヒトβクロトールのKL2ドメインの個々の残基をアラニンへと個別に突然変異させた(例えば、残基F508A～L1008A)。結果として得られたβクロトール突然変異体タンパク質をHEK-293T細胞内で発現させ、蛍光活性化細胞選別(FACS)によって、表1～10及び図1～3に示される配列を有する、実施例3に記載された5H23を含む、5H23エピトープペプチドの抗βクロトール抗体、並びに5H23エピトープペプチドのヒト抗βクロトール抗体、例えば、ヒト化5H23抗体(例えば、VH配列番号271及びVL配列番号276)、又はヒト化5H23抗体の一価Fab断片に対する結合についてアッセイした。例えば、βクロトール突然変異体タンパク質のスクリーニングを、ヒト化5H23抗体については0.5μg/ml、Fab断片については1.0μg/ml、及び陽性対照ポリクローナル抗βクロトール抗体については2.0μg/mlの濃度で実施した。

【0411】

得られたマッピングにより、3つの特異的結合残基H657、Y701、及びR703が同定され、これらは、ヒト化5H23抗体による結合については陰性であったが、対照ポリクローナル抗βクロトール抗体については陽性であった。これらの残基は、その側鎖が表31に示される抗体-エピトープ相互作用に対してエネルギー的に最も大きく寄与するアミノ酸に相当した。同定された3つの残基の位置(色の濃い球)を、図6に示すような2つのタンパク質のBLASTアラインメントによって同定された、ヒト細胞質ゾルβ-グルコシダーゼ(PDB ID# 2JFE; Triboloらの文献、J. Mol. Biol. 370, 964-975(2007))上の相当する位置で示すことにより、該残基の位置をモデリングした。構造は、βクロトール残基521～963に相当するものを示している。Y701A及びR703A突然変異のヒト化5H23抗体とのより低い反応性は、Y701及びR703が、結合に対する主なエネルギー的寄与因子であることを示している。

表31

【表36】

結合反応性 (%WT)		
タンパク質突然変異	ヒト化 5H23 抗体	対照ポリクローナル抗体
H657A	16.88 (±11.93)	120.35 (±55.21)
Y701A	0.64 (±0.09)	43.37 (±5.78)
R703A	1.64 (±1.69)	131.59 (±19.98)

【0412】

したがって、本明細書に提供される抗βクロトール抗体は、5H23及び5H23エピトープペプチドの抗体を含め、残基H657、Y701、及び/又はR703を含むKLB2ドメイン中のエピトープを認識する。実施例3に記載されており、表1～10及び図1～3のCDR配列によって表され、かつ該CDR配列を含む、そのような抗体は、例えば、体重、食物摂取量、BMI、インスリン、グルコース、及び/又はトリグリセリドを低下させるためを含め、FGF19媒介性及び/又はFGF21媒介性シグナル伝達を誘導するためのアゴニスト抗体として有用である。

【0413】

さらに、本明細書に提供される抗βクロトール抗体は、互いにβクロトールの結合を競合するという共通の特徴を共有する(例えば、5H23エピトープペプチドの抗体に記載している実施例3を参照されたい)。この競合的阻害は、各々の抗体がβクロトールの同じ領域(例えば、同じエピトープ)に結合し、それにより、同様の作用を表すことを示している。本明細書にさらに例示されているように、抗βクロトール抗体には、表1～10又は図1～3に記載されるCDR配列を有する、5H23、1C17、1D19、2L12、3L3、3N20、4P5、5C23、5F7、及び/もしくは1G19に由来し又はこれらに基づく、ヒト化抗βクロトール抗体を含む、抗βクロトール抗体、例えば、ヒトβクロトールの特定のドメイン(例えば、上記のKL2(残基S509～S1044))に結合する、ヒト化抗βクロトール抗体を含む、抗βクロトール抗体が含まれる。さらに、その

ような結合は、大部分、本明細書に記載される抗 β クロトー抗体によって認識されるエピトープを含む、KL2領域内の特定のアミノ酸残基(例えば、上記のH657、Y701、及びR703)に起因するものであることができる。まとめると、これらの結果は、5H23に由来するかもしれない5H23に基づく抗 β クロトー抗体、又は表1~10もしくは図1~3に記載される1以上のCDRを有する抗体を含む、5H23エピトープピンの抗体について観察された作用を同じ又は類似のエピトープ特異性(例えば、同じ又は類似のCDR)を有する本明細書に記載される他の抗 β クロトー抗体に外挿することができることを示している。例えば、実施例4~7及び上に示す抗体のインビトロ活性、並びに例示的なヒト化抗 β クロトー抗体について実施例8で示されたインビボ作用は、本明細書に記載される抗 β クロトー抗体の活性及び作用を代表するものである。

10

【0414】

上記の本開示の実施態様は、単に例示的であることが意図されており、当業者は、本明細書に記載される具体的な手順の多くの等価物を認識するか、又はルーチンの実験だけを用いて、それらを確認することができるであろう。そのような等価物は全て、本開示の範囲内にあると考えられ、以下の特許請求の範囲によって包含される。さらに、本明細書及び特許請求の範囲で使用されるように、単数形の「a」、「an」、及び「the」は、文脈上明らかにそうでないことが示されない限り、複数形を含む。したがって、例えば、「抗体(an antibody)」に対する言及は、2以上のそのような抗体の混合物などを含み得る。さらに、当業者は、操作上の配列は、説明及び主張のためにある特定の順序で示されなければならないが、本開示は、そのような特定の順序を越えて様々な変化を想定していることを認識しているであろう。

20

【0415】

本明細書に記載される全ての参考文献の内容は、引用により本明細書中に組み込まれる。

【0416】

他の実施態様は、以下の特許請求の範囲の範囲内である。

【図 2 B - 1】

[illegible]

☒ 2B-1

【図 2 B - 2】

[illegible]

☒ 2B-2

【図 3 A - 1】

VI	トイ	1	10	22	31-35	40	50-a-----60---65
Kabat		1	10	22	31-35	40	50-a-----60---65
Abm		1	10	22	26-----35	40	50-a-----58 65
Chothia		1	10	22	26-----32	40	a-55 65
接核		1	10	22	30---35	40	47-----a-58 65
IMGT		1	23	27	27-----38	41	56-----65 74
Abc		1	23	27	32	42	57 74
5H23		1	QVLVQSGAEVLNPGALVSKSKAS	GIYFTSYDIN	WYKRPQGGLENG	WYIPGDOSTYINKEKFG	76
5H23v1-2		1	QVLVQSGAEVKKPGASVKVSKAS	GIYFTSYDIN	WYKRPQGGLENG	WYIPGDOSTYINKEKFG	
vH1		1	QVLVQSGAEVKKPGASVKVSKAS	GIYFTSYDIN	WYKRPQGGLENG	WYIPGDOSTYINKEKFG	
vH2		1	QVLVQSGAEVKKPGASVKVSKAS	GIYFTSYDIN	WYKRPQGGLENG	WYIPGDOSTYINKEKFG	
vH3		1	QVLVQSGAEVKKPGASVKVSKAS	GIYFTSYDIN	WYKRPQGGLENG	WYIPGDOSTYINKEKFG	
vH4		1	QVLVQSGAEVKKPGASVKVSKAS	GIYFTSYDIN	WYKRPQGGLENG	WYIPGDOSTYINKEKFG	
vH5		1	QVLVQSGAEVKKPGASVKVSKAS	GIYFTSYDIN	WYKRPQGGLENG	WYIPGDOSTYINKEKFG	
vH6		1	QVLVQSGAEVKKPGASVKVSKAS	GIYFTSYDIN	WYKRPQGGLENG	WYIPGDOSTYINKEKFG	
5H23v1-69		1	QVLVQSGAEVKKPGSSVKVSKAS	GIYFTSYDIN	WYKRPQGGLENG	WYIPGDOSTYINKEKFG	
vH7		1	QVLVQSGAEVKKPGSSVKVSKAS	GIYFTSYDIN	WYKRPQGGLENG	WYIPGDOSTYINKEKFG	
vH8		1	QVLVQSGAEVKKPGSSVKVSKAS	GIYFTSYDIN	WYKRPQGGLENG	WYIPGDOSTYINKEKFG	
vH9		1	QVLVQSGAEVKKPGSSVKVSKAS	GIYFTSYDIN	WYKRPQGGLENG	WYIPGDOSTYINKEKFG	
vH10		1	QVLVQSGAEVKKPGSSVKVSKAS	GIYFTSYDIN	WYKRPQGGLENG	WYIPGDOSTYINKEKFG	

3A-1

【図 3 A - 2】

[illegible]

☒ 3A-2

【図 3 B】

VL ドメイン

Kabat	1	10	20	24-27abcd-----34	40	50-----56
AbM	1	10	20	24-----30ab-----34	40	50-----56
ChoThia	1	10	20	26--30ab--32	40	50--
接軸	1	10	20	30ab-----36	40	46-----55
IMGT	1	23	27	30ab-----38	41	56-65 69
AhOn	1	23	42			58 72
5H23	1	23	42			58 72
5H23v4-1	1	23	42			58 72
VL1	1	23	42			58 72
VL2	1	23	42			58 72
VL3	1	23	42			58 72
VL4	1	23	42			58 72
VL5	1	23	42			58 72

【図 3 C - 1】

VL ドメイン

Kabat	1	10	20	24-27abcd-----34	40	50-----56
AbM	1	10	20	24-----30ab-----34	40	50-----56
ChoThia	1	10	20	26--30ab--32	40	50--
接軸	1	10	20	30ab-----36	40	46-----55
IMGT	1	23	27	30ab-----38	41	56-65 69
AhOn	1	23	42			58 72
5H23	1	23	42			58 72
5H23v1-39	1	23	42			58 72
VL1-39a	1	23	42			58 72
VL1-39b	1	23	42			58 72
VL1-39c	1	23	42			58 72
VL1-39d	1	23	42			58 72
VL1-39e	1	23	42			58 72
VL1-39f	1	23	42			58 72
VL1-39g	1	23	42			58 72
VL1-39h	1	23	42			58 72
VL1-39i	1	23	42			58 72
VL1-39j	1	23	42			58 72
VL1-39k	1	23	42			58 72
VL1-39l	1	23	42			58 72
VL1-39m	1	23	42			58 72
VL1-39n	1	23	42			58 72
VL1-39o	1	23	42			58 72
VL1-39p	1	23	42			58 72

図 3C-1

【図 3 C - 2】

VL ドメイン (続き)

Kabat	60	70	80	89-----97		
AbM	60	70	80	89-----97		
ChoThia	60	70	80	91-----96		
接軸	60	70	80	89-----96		
IMGT	70	89	107	105-----117		
AhOn	73	91	138			
5H23	73	91	138			
5H23v1-39	73	91	138			
VL1-39a	73	91	138			
VL1-39b	73	91	138			
VL1-39c	73	91	138			
VL1-39d	73	91	138			
VL1-39e	73	91	138			
VL1-39f	73	91	138			
VL1-39g	73	91	138			
VL1-39h	73	91	138			
VL1-39i	73	91	138			
VL1-39j	73	91	138			
VL1-39k	73	91	138			
VL1-39l	73	91	138			
VL1-39m	73	91	138			
VL1-39n	73	91	138			
VL1-39o	73	91	138			
VL1-39p	73	91	138			

図 3C-2

【図 3 D - 1】

VL ドメイン

Kabat	1	10	20	24-27abcd-----34	40	50-----56
AbM	1	10	20	24-----30ab-----34	40	50-----56
ChoThia	1	10	20	26--30ab--32	40	50--
接軸	1	10	20	30ab-----36	40	46-----55
IMGT	1	23	27	30ab-----38	41	56-65 69
AhOn	1	23	42			58 72
5H23	1	23	42			58 72
5H23v1-70	1	23	42			58 72
v3-20a	1	23	42			58 72
v3-20b	1	23	42			58 72
v3-20c	1	23	42			58 72
v3-20d	1	23	42			58 72
v3-20e	1	23	42			58 72
v3-20f	1	23	42			58 72
v3-20g	1	23	42			58 72
v3-20h	1	23	42			58 72
v3-20i	1	23	42			58 72
v3-20j	1	23	42			58 72

図 3D-1

【図 3 D - 2】

VL フォイン (縦)									
	Kabat	60	70	80	89-----97				
	AbM	60	70	80	89-----97				
	Chothia	60	70	80	91---96				
	精糖	60	70	80	89-----96				
	IMCT	70	89		105-----117				
	AHon	73	91	138					
	5H23	GVFAFSGSGGDTFTNHHVEEDAAIYVC QHSRLATFP FGSGFNLEIK (配列番号: 26)							
	5H23-3-20	GVFAFSGSGGDTFTNHHVEEDAAIYVC QHSRLATFP FGSGFNLEIK (配列番号: 354)							
	v3-20a	GVFAFSGSGGDTFTNHHVEEDAAIYVC QHSRLATFP FGSGFNLEIK (配列番号: 343)							
	v3-20b	GVFAFSGSGGDTFTNHHVEEDAAIYVC QHSRLATFP FGSGFNLEIK (配列番号: 344)							
	v3-20c	GVFAFSGSGGDTFTNHHVEEDAAIYVC QHSRLATFP FGSGFNLEIK (配列番号: 345)							
	v3-20d	GVFAFSGSGGDTFTNHHVEEDAAIYVC QHSRLATFP FGSGFNLEIK (配列番号: 346)							
	v3-20e	GVFAFSGSGGDTFTNHHVEEDAAIYVC QHSRLATFP FGSGFNLEIK (配列番号: 347)							
	v3-20f	GVFAFSGSGGDTFTNHHVEEDAAIYVC QHSRLATFP FGSGFNLEIK (配列番号: 348)							
	v3-20g	GVFAFSGSGGDTFTNHHVEEDAAIYVC QHSRLATFP FGSGFNLEIK (配列番号: 349)							
	v3-20h	GVFAFSGSGGDTFTNHHVEEDAAIYVC QHSRLATFP FGSGFNLEIK (配列番号: 350)							
	v3-20i	GVFAFSGSGGDTFTNHHVEEDAAIYVC QHSRLATFP FGSGFNLEIK (配列番号: 351)							
	v3-20j	GVFAFSGSGGDTFTNHHVEEDAAIYVC QHSRLATFP FGSGFNLEIK (配列番号: 352)							

図 3D-2

【図 4 A】

図 4A									
	ヒト	40	80						
	chMoHu	MFPGAGSPGNEWTFPSTDEITTYRNTMNGQSRVLSALITLRAVTFSGDGRAIKSNKPNFTPVNESQLFIYDT							
	chHuMo	MTGCAAGSPGNEWTFPSTDEITTYRNTMNGQSRVLSALITLRAVTFSGDGRAIKSNKPNFTPVNESQLFIYDT							
	マウス	MTGCAAGSPGNEWTFPSTDEITTYRNTMNGQSRVLSALITLRAVTFSGDGRAIKSNKPNFTPVNESQLFIYDT							
	ヒト	120	160						
	chMoHu	PFKNFHWGIGTGAFOVEGSKWKTDGROPSIWDHFIHTHLKAVSYSTNGSSDSYIFLEKDLALDFLGVSFYQFSISWPLFP							
	chHuMo	PFKNFHWGIGTGAFOVEGSKWKTDGROPSIWDHFIHTHLKAVSYSTNGSSDSYIFLEKDLALDFLGVSFYQFSISWPLFP							
	マウス	PFKNFHWGIGTGAFOVEGSKWKTDGROPSIWDHFIHTHLKAVSYSTNGSSDSYIFLEKDLALDFLGVSFYQFSISWPLFP							
	ヒト	260	240						
	chMoHu	DGIIVTANAGLOYSTLDAVLNRIEPIVTLVHMDLPLALOEKYGKWNDDTIIDIFNDVATYCYQFMGDRVYKWTIIT							
	chHuMo	NGTVAAVNAQGLRYRALLDSILNRIEPIVTLVHMDLPLALOEKYGKWNDDTIIDIFNDVATYCYQFMGDRVYKWTIIT							
	マウス	DGIIVTANAGLOYSTLDAVLNRIEPIVTLVHMDLPLALOEKYGKWNDDTIIDIFNDVATYCYQFMGDRVYKWTIIT							
	ヒト	280	320						
	chMoHu	NPYLVAHGYCTGMHAPGEGKGNLTAAYTVYGHNLKAKSKVWHTNDKFRPHQKWLSTITLSSHNIENFTNDMDVNLQ							
	chHuMo	NPYLVAHGYCTGMHAPGEGKGNLTAAYTVYGHNLKAKSKVWHTNDKFRPHQKWLSTITLSSHNIENFTNDMDVNLQ							
	マウス	NPYLVAHGYCTGMHAPGEGKGNLTAAYTVYGHNLKAKSKVWHTNDKFRPHQKWLSTITLSSHNIENFTNDMDVNLQ							
	ヒト	360	400						
	chMoHu	OSMVSVLGNFANPIHSDGDPGEGKGLFSLVLPFSEAEKHEMGTDADFPAPSPGNPKPLNTMAKQGNVSLNLRAL							
	chHuMo	OSMVSVLGNFANPIHSDGDPGEGKGLFSLVLPFSEAEKHEMGTDADFPAPSPGNPKPLNTMAKQGNVSLNLRAL							
	マウス	OSMVSVLGNFANPIHSDGDPGEGKGLFSLVLPFSEAEKHEMGTDADFPAPSPGNPKPLNTMAKQGNVSLNLRAL							
	ヒト	440	480						
	chMoHu	NMVTLVNDPRLITLANKGHTDSVKTEDTTALTMKNELSONTQALDEIRYVGYTAMSLLOGFEMODATYTRGLFY							
	chHuMo	NMVTLVNDPRLITLANKGHTDSVKTEDTTALTMKNELSONTQALDEIRYVGYTAMSLLOGFEMODATYTRGLFY							
	マウス	NMVTLVNDPRLITLANKGHTDSVKTEDTTALTMKNELSONTQALDEIRYVGYTAMSLLOGFEMODATYTRGLFY							

【図 4 B】

図 4B									
	ヒト	520	560						
	chMoHu	VDFNSQKQKPKKSAAHYKQIIQNGFSLKESTPDVQGFCDPSCNGVTESVLKPSVASSPQSDPHLYVWNAICNRL							
	chHuMo	VDFNSQKQKPKKSAAHYKQIIQNGFSLKESTPDVQGFCDPSCNGVTESVLKPSVASSPQSDPHLYVWNAICNRL							
	マウス	VDFNSQKQKPKKSAAHYKQIIQNGFSLKESTPDVQGFCDPSCNGVTESVLKPSVASSPQSDPHLYVWNAICNRL							
	ヒト	600	640						
	chMoHu	LHRVGVRLKTRPAQCTDFVNIKKQLEMLARKMVTIIRFALDMSAVLPTGNI SAVNQALRYRCVVYSBGLKGLISAMVT							
	chHuMo	LHRVGVRLKTRPAQCTDFVNIKKQLEMLARKMVTIIRFALDMSAVLPTGNI SAVNQALRYRCVVYSBGLKGLISAMVT							
	マウス	LHRVGVRLKTRPAQCTDFVNIKKQLEMLARKMVTIIRFALDMSAVLPTGNI SAVNQALRYRCVVYSBGLKGLISAMVT							
	ヒト	680	720						
	chMoHu	LYYPHTAHGLPEELHAGWLNFTAEAFQAYAGLCFDELGELVXKLWITINEPNRLSDIYNRSGNDTYGAHNLVYAH							
	chHuMo	LYYPHTAHGLPEELHAGWLNFTAEAFQAYAGLCFDELGELVXKLWITINEPNRLSDIYNRSGNDTYGAHNLVYAH							
	マウス	LYYPHTAHGLPEELHAGWLNFTAEAFQAYAGLCFDELGELVXKLWITINEPNRLSDIYNRSGNDTYGAHNLVYAH							
	ヒト	760	800						
	chMoHu	LAWRLYDRQPRPSQKGVSLSHADMAEPANFYADSHWAAERFLQFEIAMFAEFLFKTGDYPAAMREVIASKRRGLGS							
	chHuMo	LAWRLYDRQPRPSQKGVSLSHADMAEPANFYADSHWAAERFLQFEIAMFAEFLFKTGDYPAAMREVIASKRRGLGS							
	マウス	LAWRLYDRQPRPSQKGVSLSHADMAEPANFYADSHWAAERFLQFEIAMFAEFLFKTGDYPAAMREVIASKRRGLGS							
	ヒト	840	880						
	chMoHu	SALPRLTEARRLIKGTVDFOALNHFTFRVNHQLAGSYDSRDQFIQDIITRLSSPTRIAVIPMGVKLLRWVRNY							
	chHuMo	SALPRLTEARRLIKGTVDFOALNHFTFRVNHQLAGSYDSRDQFIQDIITRLSSPTRIAVIPMGVKLLRWVRNY							
	マウス	SALPRLTEARRLIKGTVDFOALNHFTFRVNHQLAGSYDSRDQFIQDIITRLSSPTRIAVIPMGVKLLRWVRNY							
	ヒト	920	960						
	chMoHu	GMDIYITASGIDDAEDRLRKYLKYLQFVILKAYILIDKVIKGYVAFKLAEEKSKPRPGFTSDPRAKSSIOFYNK							
	chHuMo	GMDIYITASGIDDAEDRLRKYLKYLQFVILKAYILIDKVIKGYVAFKLAEEKSKPRPGFTSDPRAKSSIOFYNK							
	マウス	GMDIYITASGIDDAEDRLRKYLKYLQFVILKAYILIDKVIKGYVAFKLAEEKSKPRPGFTSDPRAKSSIOFYNK							

【図 4 C】

図 4C									
	ヒト	1000	1040						
	chMoHu	VISSRGFPFENSRRCSQIQNTTECTVCLFLVQKKEIPLGCGCFSTIVLLLSIALFORQKRRKFKAKNLOHIPLRKGK							
	chHuMo	VISSRGFPFENSRRCSQIQNTTECTVCLFLVQKKEIPLGCGCFSTIVLLLSIALFORQKRRKFKAKNLOHIPLRKGK							
	マウス	VISSRGFPFENSRRCSQIQNTTECTVCLFLVQKKEIPLGCGCFSTIVLLLSIALFORQKRRKFKAKNLOHIPLRKGK							
	ヒト	-RVVS (配列番号: 297)							
	chMoHu	-RVVS (配列番号: 376)							
	chHuMo	SRVES (配列番号: 374)							
	マウス	SRVES (配列番号: 301)							

【配列表】

2017507652000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成28年10月28日(2016.10.28)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2017507652000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 15/12731																		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - G01N 33/53; C12N 5/07; A61K 39/395, 39/00; C07K 1/00 (2015.01) CPC - A61K 2039/505, 38/00, C07K 14/705 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																				
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) CPC: A61K 2039/505, 38/00, C07K 14/705 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC: A61K 2039/505, 38/00, C07K 14/705 (text search) USPC: 435/326, 7.1, 7.2; 424/130.1, 134.1; 530/350 (text search) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Electronic data bases: PatBase; Google Scholar; Google Patents; GenCore sequence search (AA) Search terms: beta klotho (synonyms: klotho beta, KLB), epitope, human KLB region AA 509-1044, glycosyl hydrolase 1 region (AA 519-967), AA 657 epitope, human, cynomolgous monkey, antibody, VH, VL, CDRL1-3, CDRH1-3, binding, FGF19 or FGF21 signalling																				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X — A</td> <td>2012/0328616 A1 (Li et al.) 27 December 2012 (27.12.2012). Especially para [0009], [0014], [0089], [0369], [0374], [0375], pgs 51-53 table 2A, pg 61 table 2B, pg 182 table 13, pg 182-183 table 14.</td> <td>135, 136, 147/(135, 136) 1, 6-8, 137-140, 147/(137-140)</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2012/0308580 A1 (BERTOLETTI et al.) 6 December 2012 (06.12.2012). Especially SEQ ID NO: 2</td> <td>1, 6-8</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2013/0122020 A1 (LIU et al.) 16 May 2013 (16.05.2013). Especially SEQ ID NO: 1</td> <td>1, 6-8</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>NCBI Reference Sequence: NP_783864.1: beta-klotho (Homo sapiens) [online]. 2 November 2013 [retrieved 28 March 2015]. Available on the internet: <URL: http://www.uniprot.org/uniprot/Q86Z14.txt?version=93>. Especially pg 4.</td> <td>135-137, 139, 140</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>GenBank EHH53620.1: Beta-klotho (Macaca fascicularis) [online]. 4 November 2011 [retrieved 28 March 2015]. Available on the internet: <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/355749221?sat=37&satkey=109028311>. Especially pg 2-3.</td> <td>138</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X — A	2012/0328616 A1 (Li et al.) 27 December 2012 (27.12.2012). Especially para [0009], [0014], [0089], [0369], [0374], [0375], pgs 51-53 table 2A, pg 61 table 2B, pg 182 table 13, pg 182-183 table 14.	135, 136, 147/(135, 136) 1, 6-8, 137-140, 147/(137-140)	A	US 2012/0308580 A1 (BERTOLETTI et al.) 6 December 2012 (06.12.2012). Especially SEQ ID NO: 2	1, 6-8	A	US 2013/0122020 A1 (LIU et al.) 16 May 2013 (16.05.2013). Especially SEQ ID NO: 1	1, 6-8	A	NCBI Reference Sequence: NP_783864.1: beta-klotho (Homo sapiens) [online]. 2 November 2013 [retrieved 28 March 2015]. Available on the internet: <URL: http://www.uniprot.org/uniprot/Q86Z14.txt?version=93 >. Especially pg 4.	135-137, 139, 140	A	GenBank EHH53620.1: Beta-klotho (Macaca fascicularis) [online]. 4 November 2011 [retrieved 28 March 2015]. Available on the internet: <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/355749221?sat=37&satkey=109028311 >. Especially pg 2-3.	138
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																		
X — A	2012/0328616 A1 (Li et al.) 27 December 2012 (27.12.2012). Especially para [0009], [0014], [0089], [0369], [0374], [0375], pgs 51-53 table 2A, pg 61 table 2B, pg 182 table 13, pg 182-183 table 14.	135, 136, 147/(135, 136) 1, 6-8, 137-140, 147/(137-140)																		
A	US 2012/0308580 A1 (BERTOLETTI et al.) 6 December 2012 (06.12.2012). Especially SEQ ID NO: 2	1, 6-8																		
A	US 2013/0122020 A1 (LIU et al.) 16 May 2013 (16.05.2013). Especially SEQ ID NO: 1	1, 6-8																		
A	NCBI Reference Sequence: NP_783864.1: beta-klotho (Homo sapiens) [online]. 2 November 2013 [retrieved 28 March 2015]. Available on the internet: <URL: http://www.uniprot.org/uniprot/Q86Z14.txt?version=93 >. Especially pg 4.	135-137, 139, 140																		
A	GenBank EHH53620.1: Beta-klotho (Macaca fascicularis) [online]. 4 November 2011 [retrieved 28 March 2015]. Available on the internet: <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/355749221?sat=37&satkey=109028311 >. Especially pg 2-3.	138																		
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐																				
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family																				
Date of the actual completion of the international search 20 June 2015 (20.06.2015)		Date of mailing of the international search report 10 JUL 2015																		
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774																		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 15/12731

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. ☒ forming part of the international application as filed:

☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

☐ on paper or in the form of an image file.

b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

GenCore ver 6.4.1 SEQ ID NOs: 1-6, 25, 26, 51, 52

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 15/12731

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 104-134 and 148-158
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
-----Go to Extra Sheet for continuation-----

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: claims 1, 6-17, 135-147 limited to SEQ ID NOs: 25, 26, and epitope SEQ 297

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 15/12731

-----Continuation of Box III (Lack of Unity of Invention)

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I+: Claims 1, 6-17, 135-147, drawn to an antibody or fragment thereof that binds to or competes with an antibody that binds to an epitope of human and cynomolgous monkey beta klotho defined by an antibody comprising a heavy chain variable (VH) region having a defined and specific amino acid sequence and a light chain variable (VL) region having a defined and specific amino acid sequence. The antibody that binds to human and cynomolgous monkey beta klotho will be searched to the extent that the antibody comprises the first named VH (SEQ ID NO: 25) and VL (SEQ ID NO: 26) (antibody 5H23) (claims 1 and 7) wherein said antibody binds to human beta klotho at amino acid residue 657 of SEQ ID NO: 297 (claim 139). It is believed that claims 1, 6-8, 135-140, 147 (in part) read on this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass VH and VL of SEQ ID NOs: 25, 26, respectively, and an epitope comprising amino acid residue 657 of SEQ ID NO: 297. Additional antibodies (indicated in claim 7) and epitopes will be searched upon payment of additional fees. Applicant must specify the claims that encompass any additional elected sequence(s) and epitope(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which read on the first named invention if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be: SEQ ID NOs: 51, 52 (antibody 1C17 in claim 7) and epitope comprising amino acid residue 701 of SEQ ID NO: 297 (claims 7, 9, 135-139, 141, 147 (in part)).

Group II+: Claims 2-5, 18-103, drawn to an antibody that binds to beta klotho comprising specific combinations of VHCDR1-3, VLCDR1-3, VH FR 1-4, VL FR 1-4.

Group II+ will be searched upon payment of additional fee(s). The VHCDR1-3, VLCDR1-3, VH FR 1-4, VL FR 1-4 combinations may be searched, for example, to the extent that the specific combination of CDRs comprises

VH CDR1 (SEQ ID NO: 1, 7, 12, 13, 18);

VH CDR2 (SEQ ID NO: 2, 8, 14, 19, 24);

VH CDR3 (SEQ ID NO: 3, 9, 15, 20);

VL CDR1 (SEQ ID NO: 4, 10, 16, 21);

VL CDR2 (SEQ ID NO: 5, 11, 22);

VL CDR3 (SEQ ID NO: 6, 17, 23);

VH FR1-4 (SEQ ID NO: 279, 282, 278, 288)

VL FR1-4 (SEQ ID NO: 289, 291, 293, 296)

[e.g., all part of antibody 5H23, see Table 1 of Instant Specification] for an additional fee and election as such. It is believed that claims 2-5, 18-23, 28-37 read on this exemplary invention. Additional combinations of VHCDR1-3, VLCDR1-3, VH FR 1-4, VL FR 1-4 will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must indicate, if applicable, which claims read on this named invention if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first named invention to be searched/examined. An exemplary election would be VH CDR 1-3 (SEQ ID NOs 27-29, 33-35, 38-41, 44-46, 50); VL CDR 1-3 (SEQ ID NO: 30-32, 36, 37, 42, 43, 47-49); VH FR 1-4 (SEQ ID NO: 279, 282, 287, 288); VL FR 1-4 (SEQ ID NO: 290, 292, 294, 296) [e.g., all part of antibody 1C17, see Table 2 of Instant Specification] (claims 2-5, 18-20, 24-26, 28-30, 38-44).

The inventions listed as Groups I+ and II+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features:

Group I+ has the specific technical feature of an antibody that binds to a defined epitope of human and cynomolgous monkey beta klotho, not required by Group II.

Group II+ has the specific technical feature of anti-beta klotho antibody comprising specific combination of VH CDR1-3 and/or VL CDR1-3.

Among the inventions listed as Groups I+ and II+ are the specific sequences recited therein. The inventions do not share a special technical feature, because no significant structural similarities can readily be ascertained among sequences.

-----continued on next sheet-----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 15/12731

continued from previous sheet

Common technical features:

Group I+ and Group II+ share the common technical feature of an anti-beta klotho antibody or antibody fragment.

However, said common technical features do not represent a contribution over the prior art, and is anticipated by US 2012/0328616 A1 (Li et al.) (hereinafter "Li"). Li teaches an anti-beta klotho antibody (para [0009]). "The instant disclosure provides antigen binding proteins that bind a complex comprising beta-klotho and at least one of (i) FGFR1c, (ii) FGFR2c and (iii) FGFR3c, including antigen binding proteins that induce FGF21-like signaling, as well as pharmaceutical compositions comprising antigen binding proteins that bind to a complex comprising beta-klotho and at least one of (i) FGFR1c, (ii) FGFR2c and (iii) FGFR3c, including antigen binding proteins that induce FGF21-like signaling"; para [0375] and pg 182-183 table 14; antibodies such as 49G3.3 or 67C10.1 with capacity to bind human beta klotho alone and cynomolgous beta klotho complexed with FGFR1c indicated) with sequences defined VH, VL, VH CDR1-3, VL CDR 1-3 (para [0009]; Tables 1A and 1B; representative variable region heavy chain and light chain sequences are provided in Tables 2A and 2B; coding sequences for the variable region of the heavy and light chains are provided in Tables 2C and 2D; Tables 3A and 3B provide CDR regions of the disclosed variable heavy and light chains, and Tables 3C and 3D provide coding sequences for the disclosed CDRs") VH FR1-4 and VL FR1-4 (para [0009]; para [0032]- Complementarity determining regions (CDRs) and framework regions (FR) of a given antibody can be identified using the system described by Kabat et al; para [0136]- "framework region (designated framework regions 1-4, FR1, FR2, FR3, and FR4").

Concerning Group I+, Li teaches an antibody or fragment thereof that binds to or competes with an antibody that binds to an epitope of human and cynomolgous monkey beta klotho (para [0375] and pg 182 table 14; para [0150]). "In one aspect, also provided is an antigen binding protein that specifically binds to a linear or three-dimensional epitope comprising one or more amino acid residues from beta-klotho"; pg 182 table 13; antibody 67C10.1 binds to human beta klotho region amino acids 506-1045), defined by an antibody comprising a heavy chain variable (VH) region having a defined and specific amino acid sequence (para [0009]) and a light chain variable (VL) region having a defined and specific amino acid sequence (para [0009]);

Concerning Group II+, Li teaches a specific combination of VHCDRs1-3, VLCDRs1-3 (para [0009]) bind to klotho (para [0134]); "In various embodiments, the antigen binding proteins disclosed herein can comprise polypeptides into which one or more CDRs are grafted, inserted and/or joined. An antigen binding protein can have 1, 2, 3, 4, 5 or 6 CDRs. An antigen binding protein thus can have, for example, one heavy chain CDR1 ("CDRH1"), and/or one heavy chain CDR2 ("CDRH2"), and/or one heavy chain CDR3 ("CDRH3"), and/or one light chain CDR1 ("CDRL1"), and/or one light chain CDR2 ("CDRL2"), and/or one light chain CDR3 ("CDRL3"); para [0375] and pg 182-183 table 14).

As the common technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered common special technical features that would otherwise unify the groups. The inventions lack unity with one another.

Therefore, Groups I+ and II+ lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

Note concerning item 4: Claims 104-134 and 148-158 are multiple dependent claims and are held unsearchable because the claims are not drafted according to PCT Rule 6.4(a).

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08	
C 0 7 K	14/00 (2006.01)	C 0 7 K	14/00	
C 0 7 K	14/47 (2006.01)	C 0 7 K	14/47	
C 1 2 N	15/02 (2006.01)	C 1 2 N	15/00	C
C 1 2 N	5/16 (2006.01)	C 1 2 N	5/16	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	D
A 6 1 P	3/08 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 P	3/10 (2006.01)	A 6 1 P	3/08	
A 6 1 P	5/50 (2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	1/18 (2006.01)	A 6 1 P	5/50	
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 P	1/18	
A 6 1 P	3/04 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 P	3/06 (2006.01)	A 6 1 P	3/04	
A 6 1 P	3/00 (2006.01)	A 6 1 P	3/06	
A 6 1 P	9/00 (2006.01)	A 6 1 P	3/00	
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	A 6 1 P	9/00	
		G 0 1 N	33/53	D

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

(72)発明者 ベティ チャン リ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94030 ミルブラエ ムルチソン ドライブ 220番
300

(72)発明者 ユ チェン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94404 フォスター シティ ルルライン ドライブ
893

(72)発明者 タルナ アロラ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94306 パロ アルト ウイトクレム ウェイ 291

(72)発明者 ヒューゴ マテルン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94403 サン マテオ ジョージ アベ 4番 416
5

(72)発明者 ウェンヤン シェン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94065 レッドウッド シティ キールソン サークル
569

Fターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 DA01 DA06 DA13
4B065 AA90X AA90Y AB01 AB04 AC14 BA08 CA25 CA44 CA46
4C084 AA19 MA66 NA14 ZA36 ZA70 ZB05 ZB09 ZB112 ZC032 ZC202
ZC211 ZC331 ZC351 ZC412
4C085 AA14 BB11 BB41 DD62 EE01 EE03 GG01
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 BA50 DA76 EA27 FA74