

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7141333号

(P7141333)

(45)発行日 令和4年9月22日(2022.9.22)

(24)登録日 令和4年9月13日(2022.9.13)

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 K 16/18 (2006.01)

C 0 7 K 16/18

Z N A

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395

N

A 6 1 P 1/18 (2006.01)

A 6 1 P 1/18

A 6 1 P 3/04 (2006.01)

A 6 1 P 3/04

A 6 1 P 3/06 (2006.01)

A 6 1 P 3/06

請求項の数 17 (全58頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-506347(P2018-506347)

(86)(22)出願日 平成28年8月4日(2016.8.4)

(65)公表番号 特表2018-525383(P2018-525383  
A)

(43)公表日 平成30年9月6日(2018.9.6)

(86)国際出願番号 PCT/US2016/045535

(87)国際公開番号 WO2017/027316

(87)国際公開日 平成29年2月16日(2017.2.16)

審査請求日 令和1年7月25日(2019.7.25)

審判番号 不服2021-2863(P2021-2863/J1)

審判請求日 令和3年3月4日(2021.3.4)

(31)優先権主張番号 62/202,366

(32)優先日 平成27年8月7日(2015.8.7)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

(73)特許権者 597160510

リジェネロン・ファーマシューティカル  
ズ・インコーポレイテッドREGENERON PHARMACE  
UTICALS, INC.

アメリカ合衆国10591-6707ニ

ューヨーク州タリータウン、オールド・

ソー・ミル・リバー・ロード777番

(74)代理人 100127926

弁理士 結田 純次

(74)代理人 100140132

弁理士 竹林 則幸

(72)発明者 ヴィクトリア・グサロヴァ

アメリカ合衆国ニューヨーク州1059

1. タリータウン・オールドソーミルリ

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗 - A N G P T L 8 抗体及びその使用

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

配列番号164に示されたアミノ酸配列を有するHCDR1、配列番号166に示されたアミノ酸配列を有するHCDR2、及び配列番号168に示されたアミノ酸配列を有するHCDR3を含む重鎖可変領域(HCVR)、並びに配列番号172に示されたアミノ酸配列を有するLCDR1、配列番号174に示されたアミノ酸配列を有するLCDR2、及び配列番号176に示されたアミノ酸配列を有するLCDR3を含む軽鎖可変領域(LCVR)を含む、アンジオポエチン様タンパク質8(ANGPTL8)に特異的に結合する抗体又はその抗原結合断片。

## 【請求項2】

配列番号162に示されたアミノ酸配列を有するHCVR及び配列番号170に示されたアミノ酸配列を有するLCVRを含む、請求項1に記載の抗体又はその抗原結合断片。

## 【請求項3】

抗体が、組換え産生したヒト抗体である、請求項1又は2に記載の抗体又はその抗原結合断片。

## 【請求項4】

請求項1～3の何れか1項に記載の抗体又はその抗原結合断片をコードする単離した核酸分子。

## 【請求項5】

請求項1～3の何れか1項に記載の抗体又はその抗原結合断片、及び医薬的に許容され

る担体又は希釈剤を含む医薬組成物。

【請求項 6】

それを必要とする患者において A N G P T L 8 の活性を阻害する方法で使用するのための、請求項 5 に記載の医薬組成物であって、前記方法は、前記医薬組成物を患者に投与することを含み、ここで、A N G P T L 8 の少なくとも 1 つの活性が低減又は消滅する、前記医薬組成物。

【請求項 7】

前記投与により、患者の血中におけるトリグリセリドのレベルの低下をもたらす、請求項 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

A N G P T L 8 活性の上昇したレベルに部分的に関連する疾患又は状態を治療する方法で使用するのための、請求項 5 に記載の医薬組成物であって、前記方法は、前記医薬組成物を投与することを含む、前記医薬組成物。

【請求項 9】

高レベルの血中トリグリセリドに関連するか若しくは部分的に特徴づけられる状態若しくは疾患、又はその状態若しくは疾患に関連する少なくとも 1 つの症状若しくは合併症を治療するための方法で使用するのための、請求項 5 に記載の医薬組成物であって、前記方法は、前記医薬組成物を、それを必要とする患者に、血中のトリグリセリドのレベルが低下するか、又はその状態若しくは疾患を媒介するように、又はその状態若しくは疾患に関連する少なくとも 1 つの症状若しくは合併症を軽減若しくは、頻度若しくは重症度が低減するように、投与することを含む、前記医薬組成物。

【請求項 10】

状態又は疾患が、高脂血症、高リポタンパク血症、脂質異常症（アテローム発生性異脂肪血症、糖尿病性異脂肪血症、混合脂質異常症）、高トリグリセリド血症、T G > 1 0 0 0 m g / d L を有する重症の高トリグリセリド血症及び関連する急性膵炎、高コレステロール血症、カイロミクロン血症、肥満、メタボリック症候群、糖尿病、A p o C 2 の変化、A p o E の欠損、A p o B の増加、極く低密度のリポタンパク質（V L D L）の産生の増加及び／又は消失の減少をもたらす、若しくは引起こす脂肪異常栄養症、非アルコール性脂肪性肝炎（N A S H）に起因する脂肪組織萎縮症、特定の薬物治療（例えば、グルココルチコイド治療誘発性脂質異常症）、及びトリグリセリド又は脂質の上昇をもたらす遺伝的な何れかの素因、食事、又は生活様式からなる群から選択される、請求項 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

状態又は疾患が、アテローム性動脈硬化症、動脈瘤、高血圧、狭心症、脳卒中、脳血管疾患、うっ血性心不全、冠状動脈疾患、心筋梗塞及び末梢血管疾患からなる群から選択される心血管疾患又は障害である、請求項 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

第 2 の治療薬と組み合わせて患者に投与するための、請求項 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 13】

第 2 の治療薬が、3 - ヒドロキシ - 3 - メチルグルタリル - 補酵素 A（H M G - C o A）レダクターゼ阻害剤、アポリポタンパク質 C - I I I 阻害剤、コレステロール摂取及び／又は胆汁酸再吸収の阻害剤、ナイアシン、フィブラート又は両親媒性カルボン酸、L X R 転写因子（例えば、2 2 - ヒドロキシコレステロール）の活性化剤、又は、固定組合せ（例えば、エゼチミブ + シンバスタチン）、胆汁酸（例えば、コレステラミン、コレステポール、コレセベラム）を有するスタチン、ナイアシン + スタチンの固定した組合せ（例えば、ナイアシンとロバスタチン）、及び他の脂質低下剤（例えば、オメガ - 3 - 脂肪酸エチルエステル）から成る群から選択される、請求項 1 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 14】

H M G - C o A レダクターゼ阻害剤が、セリバスタチン、アトルバスタチン、シンバスタチン、ピタバスタチン、ロスバスタチン、フルバスタチン、ロバスタチン、及びプラバ

10

20

30

40

50

スタチンから成る群から選択される、請求項 13 に記載の医薬組成物。

【請求項 15】

第 2 の治療薬が、アンジオポエチン様タンパク質 3 (ANGPTL3)、アンジオポエチン様タンパク質 4 (ANGPTL4)、アンジオポエチン様タンパク質 5 (ANGPTL5)、アンジオポエチン様タンパク質 6 (ANGPTL6)、及びヒトプロタンパク質コンバーゼスプチリシン / ケクシン 9 型 (PCSK9) に特異的に結合する単離した抗体又はその抗原結合断片からなる群から選択される、請求項 12 に記載の医薬組成物。

【請求項 16】

第 2 の治療薬が、インスリン、ビッグアニド (メトホルミン)、スルホニルウレア (例えばグリブライド、グリピズド)、PPARガンマアゴニスト (例えば、ピオグリタゾン、ロシグリタゾン) アルファグルコシダーゼ阻害剤 (例えば、アカルボース、ボグリボース)、グルカゴン様ペプチド 1 (GLP-1) アゴニスト (例えば、BYETTA (登録商標) (エクセナチド)、TRULICITY (登録商標) (ジュラグルチド)、VICTOZA (登録商標) (リラグルチド)、LYXUMIA (登録商標) (リキシセナチド)、TANZUM (登録商標) (アルビグルチド)、又は上記の何れかの類似体)、ジペプチジルペプチダーゼ IV (DPP-4) 阻害剤 (例えばサクサグリプチン (ONGLYZA (登録商標))、シタグリプチン (JANUVIA (登録商標)) 及びビルダグリプチン (GALVUS (登録商標)))、ナトリウム - グルコース共輸送体 2 (SGLT2) 阻害剤 (例えば、INVOKANA (登録商標) (カナグリフロジン)、FORXIGA (登録商標) (ダパグリフロジン)、エンパグリフロジン、イブラグリフロジン、トホグリフロジン)、SYMLIN (登録商標) (ブラムリンチド)、グルカゴン受容体アンタゴニスト、非スルホニルウレア分泌促進薬、インスリン類似体 (例えば、速効型リスプロ、アスパルト、グルリシン及び長期作用型インスリンデテミル、インスリンデグルデク、グラルジンインスリン)、エキセンディン - 4 ポリペプチド、3 アドレナリン受容体アゴニスト、コレステロール摂取および / または胆汁酸再吸収の阻害剤、LDL - コレステロールアンタゴニスト、コレステリルエステル伝達タンパク質アンタゴニスト (例えば、トルセトラピブ、アナセトラピブ、ダルセトラピブ、またはエバセトラピブ)、エンドセリン受容体アンタゴニスト、成長ホルモンアンタゴニスト、インスリン感作物質、アミリン模倣物またはアゴニスト、カンナビノイド受容体アンタゴニスト、メラノコルチン、メラニン凝集ホルモン受容体アゴニスト、SNRI、線維芽細胞増殖因子 21 (FGF21) 模倣物、線維芽細胞増殖因子受容体 1c (FGFR1c) アゴニスト、高度に糖化した最終生成物形成 (例えば、アミノグアニジン) の阻害剤、及びタンパク質チロシンホスファターゼ阻害剤からなる群から選択される、請求項 12 に記載の医薬組成物。

【請求項 17】

第 2 の治療薬が、鎮痛剤又は抗炎症剤である、請求項 12 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アンジオポエチン様タンパク質 (ANGPTL) 8 に特異的に結合する抗体及びその抗原結合断片、これらの抗体を含む組成物及びその使用方法に関する。

【背景技術】

【0002】

ANGPTL8 (あるいはTD26、RIFL、リパシン、C19orf80 及びBetatrophin と呼ばれる) は、トリグリセリド (TG) 及びグルコース代謝の両方に関与する新たに認識されたANGPTLファミリーメンバーである。主に肝臓及び脂肪組織で発現する循環タンパク質である。ANGPTL3 及びANGPTL4 とは異なり、ANGPTL8 は、C末端のフィブリノゲン様ドメインを欠除しているが、他のANGPTLファミリーメンバーと至極同様に、N末端コイルドコイルドメインを含む。系統発生分析から、ANGPTL8 はANGPTL3 及びANGPTL4 と共通の祖先を共有することが明らかにされた (非特許文献 1)。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 0 3 】

ANGPTL8の肝臓過剰発現は、高トリグリセリド血症に関連するが、Angptl8の不活性化は、血漿TGレベルの低下を引き起こす（非特許文献2、非特許文献3）。ANGPTL8が脂質調節に関与しているという共通の認識が有るにもかかわらず、このプロセスの原因となるメカニズムは依然として議論的となっている。提案された一つのメカニズムは、ANGPTL8がリポタンパク質リパーゼ（LPL）活性を阻害し、トリグリセリドの加水分解及び排出を減少させるというものである（非特許文献4）。

## 【 0 0 0 4 】

ANGPTL8は又インスリン受容体アンタゴニストS961により、インスリン抵抗性が誘発され、マウス内の細胞増殖及びベータ細胞塊に対してある役割を果たしていることが報告されている（非特許文献5）。然しながら、その後の研究により、ANGPTL8は細胞機能、即ちインスリン抵抗性に対するベータ細胞増殖応答には必要とされないことが明らかになった。更に、ANGPTL8の過剰発現は、ベータ細胞面積を増加させず、又は血糖コントロールを改善しない（非特許文献6）。

10

## 【 0 0 0 5 】

ANGPTL8による肝臓過剰発現は高トリグリセリド血症と関連し、しかも、Angptl8を不活性化すると血漿中のトリグリセリドレベルの低下をもたらすので、ANGPTL8の阻害剤若しくはアンタゴニストは、トリグリセリドレベルの上昇により、部分的に特徴付けられる疾患、である高トリグリセリド血症、これに限定する訳ではない、の治療に有効であり得ることが明らかにされた。

20

## 【 0 0 0 6 】

Zhangは、野生型マウスに腹腔内注射した場合、リパシンに対するモノクローナル抗体が血清トリグリセリドレベルを低下させることを報告した（非特許文献7）。然しながら、今日まで、高トリグリセリド血症等の高レベルのトリグリセリドにより特徴付けられる疾患若しくは状態を治療するための臨床的環境において使用し得る、ANGPTL8に特異的な完全ヒト抗体については記載はされていない。

## 【 0 0 0 7 】

従って、高トリグリセリド血症及び上昇したトリグリセリド及び脂質レベルに関連する他の障害又は状態にある患者を治療するために、この分野で、本明細書に記載する抗体等の新規なアンタゴニストであるANGPTL8の必要性が存在する。

30

## 【 先行技術文献 】

## 【 非特許文献 】

## 【 0 0 0 8 】

【文献】Fu、Z.ら、(2013)、Biochem. Biophys. Res. Commun. 430:1126-1131

Quagliarini、F.ら(2012)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109(48):19751-19756

Wang、Y.ら、(2013) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 110:16109-16114

Zhang、R.ら、(2012)、Biochem. Biophys. Res. 424:786-792

40

Yi、P.ら(2013)、Cell 153:747-758

Gusarova、V. et al. (2014) Cell 159:691-696

Zhang、R. (2015)、Endocrine Society's 97th Annual Meeting、Presentation No. OR13-6、March 5-8、San Diego、CA

## 【 発明の概要 】

## 【 課題を解決するための手段 】

## 【 0 0 0 9 】

本発明は、アンジオポエチン様タンパク質8（ANGPTL8）に結合する、抗体及び

50

その抗原結合断片を提供する。本発明の1つの態様は、ANGPTL8に結合/相互作用するヒト抗体及びその抗原結合断片を提供し、この結合及び/又は相互作用は、哺乳動物におけるトリグリセリドレベルの低下をもたらす。

【0010】

従って、第1の態様では、本発明は、ANGTPL8、特に、ヒトANGPTL8の、少なくとも1つの活性に特異的に結合し、中和し、阻害し、遮断し、排除し、低減し、又は妨害する完全ヒトモノクローナル抗体(mAbs)及びその抗原結合断片を提供する(GenBank受託番号NP\_061157.3のアミノ酸22-198及び配列番号340番のアミノ酸1-177を参照のこと)。本発明の抗体又はその抗原結合断片により、中和、阻害、遮断、抑止、低減又は妨害し得るANGPTL8の活性としては、LPL活性の阻害、又はインビボでのトリグリセリドレベルの低下等を挙げられるが、これに限定する訳ではない。

10

【0011】

一実施形態では、本発明は、ANGPTL8に特異的に結合し、ANGPTL8に関連する少なくとも1つの活性を中和し、又は阻害するモノクローナル抗体又はその抗原結合断片を提供するものであり、ここで、その抗体又はその抗原結合断片の有する1又はそれ以上の特徴を以下に示す。

a) 完全ヒトモノクローナル抗体である。

b) 配列番号337により定義されるヒトANGPTL8のN末端領域の線状エpitopeに特異的に結合する。

20

c) 配列番号337により定義されるヒトANGPTL8のN末端領域の線状エpitopeに結合しない。

d) 配列番号338のヒトANGPTL3ペプチドのN末端コイルドコイル領域に、又は配列番号339のヒトANGPTL4ペプチドのN末端コイルドコイル領域に結合しない。

e) 表面プラズモン共鳴により測定して、25°Cで約150pM未満のK<sub>D</sub>でヒトANGPTL8に結合し、25°Cで約90pM未満のK<sub>D</sub>でサルANGPTL8に結合する。

f) 約10mg/kgの用量で皮下投与した場合、哺乳動物のトリグリセリドレベルを約68%(最大)低下させる。

30

g) 用量範囲約5mg/kg~約25mg/kgで皮下投与すると、哺乳動物におけるトリグリセリドレベルを、約7日~21日の範囲の期間、低下させる。

h) 配列番号2、18、34、50、66、82、98、114、130、146、162、178、194、210、226、242、258、266、274、282、290、298、306、314及び330からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域(HCVR)を含む。

i) 配列番号10、26、42、58、74、90、106、122、138、154、170、186、202、218、234、250及び322からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域(LCVR)を含み、又は

j) 参照抗体と交差競合し、ここで参照抗体は、表1のHCVR及びLCVRアミノ酸配列の何れかからなる群から選択される重鎖可変領域(HCVR)及び軽鎖可変領域(LCVR)のアミノ酸配列を含む。

40

【0012】

一実施形態では、本発明の抗体又はその抗原結合断片は、hANGPTL8の標的化活性(例えば、ANGPTL8のLPL阻害活性)に直接関与するhANGPTL8のエpitopeに結合することによりhANGPTL8の活性を中和し、阻害し、遮断し、抑止し、低減し又は妨害出来る。

【0013】

別の実施形態において、本発明の抗体又はその抗原結合断片は、hANGPTL8の標的化活性(例えば、ANGPTL8のLPL阻害活性)に直接には関与しないhANGP

50

ＴＬ８のエピトープに結合することによりｈＡＮＧＰＴＬ８の活性を中和し、阻害し、遮断し、抑止し、低減し又は妨害出来る、然し、そこに結合した抗体又はその断片は、抗体-抗原接触表面とは異なる部位における立体的重複又はアロステリック効果のどちらかによりｈＡＮＧＰＴＬ８の標的化活性を阻害し、遮断し、抑止し、低減し又は妨害出来る。

【００１４】

別の実施形態では、本発明の抗体又はその断片は、ｈＡＮＧＰＴＬ８（即ち、非遮断抗体）の標的化活性（例えば、ＡＮＧＰＴＬ８のＬＰＬ阻害活性）に直接には関与しないｈＡＮＧＰＴＬ８のエピトープに結合するが、しかし、抗体又はその断片は、抗体又はその断片が存在しない下でのトリグリセリドレベルの低下と比較して、インビボでトリグリセリドレベルの低下をもたらす。

【００１５】

一実施形態では、本発明は、配列番号３４０（配列番号３３７としても示される）の残基１－３９のＮ末端領域内に位置するエピトープに結合する、単離した抗 ｈＡＮＧＰＴＬ８抗体又はその抗原結合性断片であることを特徴とする。

【００１６】

別の実施形態において、本発明は、配列番号３４０（配列番号３３７として示される）の残基１－３９のヒトＡＮＧＰＴＬ８のＮ末端領域内に位置するエピトープに結合するが、然し、ｈＡＮＧＰＴＬ３（配列番号３３８）のＮ末端コイルドコイル領域に、若しくは、ｈＡＮＧＰＴＬ４（配列番号３３９）のＮ末端コイルドコイル領域には結合しない単離した抗体又は抗原結合断片を提供する。

【００１７】

一実施形態では、本発明は、配列番号３４０のアミノ酸残基１－３９（配列番号３３７としても示される）により定義されるヒトＡＮＧＰＴＬ８の領域の外側（即ち配列番号３４０番のアミノ酸残基４０－１７７）に位置するエピトープに結合する単離した抗 ｈＡＮＧＰＴＬ８抗体又はその抗原結合断片を特徴とし、かつ、ｈＡＮＧＰＴＬ８の少なくとも１つの活性を中和し、阻害し、抑止し、低減し、又は妨害する。

【００１８】

一実施形態では、本発明は、ヒトＡＮＧＰＴＬ８（配列番号３４０のアミノ酸残基１～１７７、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＮＰ\_\_０６１１５７．３のアミノ酸残基２２～１９８もまた参照のこと）に結合するが、然し、ヒトＡＮＧＰＴＬ３（配列番号３４２のアミノ酸配列、配列番号３４３に示される核酸配列によりコードされる）、又はヒトＡＮＧＰＴＬ４（配列番号３４４のアミノ酸配列、配列番号３４５に示される核酸配列によりコードされる）などの関連タンパク質と交差反応しない単離した抗 ｈＡＮＧＰＴＬ８抗体又は抗原結合断片であることを特徴とする。

【００１９】

本発明の抗体は、完全長（例えば、ＩｇＧ１又はＩｇＧ４抗体）でも良く、又は抗原結合部分（例えば、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ'）<sub>2</sub>又はｓｃＦｖ断片）のみを含むこともあり得るし、又は、機能性に影響するように変性し、例えば、宿主における持続性を増加させても良く、又は残留エフェクター機能を排除しても良い（Ｒｅｄｄｙら、２０００、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６４：１９２５－１９３３）。特定の実施形態では、抗体は二重特異性でも良い。

【００２０】

本発明の代表的な抗 ｈＡＮＧＰＴＬ８抗体を、本明細書の表１及び２に列挙する。表１に、代表的な抗 ｈＡＮＧＰＴＬ８抗体の重鎖可変領域（ＨＣＶＲ）、軽鎖可変領域（ＬＣＶＲ）、重鎖相補性決定領域（ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２及びＨＣＤＲ３）、及び軽鎖相補性決定領域（ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２及びＬＣＤＲ３）のアミノ酸配列識別子を示す。表２には、例示的な抗 ｈＡＮＧＰＴＬ８抗体のＨＣＶＲ、ＬＣＶＲ、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２及びＬＣＤＲ３の核酸配列識別子を示す。

【００２１】

本発明は、表１に列挙したＨＣＶＲアミノ酸配列の何れかから選択するアミノ酸配列を

10

20

30

40

50

有し、又はその配列の少なくとも 90% 少なくとも 95%、少なくとも 98% 若しくは少なくとも 99% が同一である実質的に同類の配列を有する H C V R を含む抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0022】

本発明は、又、表 1 に列挙した L C V R アミノ酸配列の何れかから選択するアミノ酸配列を有し、又はその配列の少なくとも 90% 少なくとも 95%、少なくとも 98% 若しくは少なくとも 99% が同一である実質的に同類の配列を有する L C V R を含む抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0023】

本発明は又、表 1 に列挙した L C V R アミノ酸配列の何れかと対を形成する表 1 に列挙した H C V R アミノ酸配列の何れかを含む H C V R 及び L C V R アミノ酸配列対 ( H C V R / L C V R ) を含む抗体若しくはその抗原結合断片を提供する。

10

【0024】

一実施形態では、本発明は、A N G P T L 8 に関連する少なくとも 1 つの活性に特異的に結合するか、及び / 又は阻害する単離した抗体又はその抗原結合断片を提供し、ここで、抗体又は抗原結合断片は、配列番号が 2 / 10、18 / 26、34 / 42、50 / 58、66 / 74、82 / 90、98 / 106、114 / 122、130 / 138、146 / 154、162 / 170、178 / 186、194 / 202、210 / 218、226 / 234、242 / 250、258 / 250、266 / 250、274 / 250、282 / 250、290 / 250、306 / 250、314 / 322 及び 330 / 322 から成る群から選択された H C V R / L C V R アミノ酸配列対を含む。

20

【0025】

一実施形態では、本発明は、A N G P T L 8 に関連する少なくとも 1 つの活性に特異的に結合するか、及び / 又は阻害する単離した抗体又はその抗原結合断片を提供し、ここで抗体又は抗原結合断片は、配列番号が 66 / 74、162 / 170、194 / 202 及び 314 / 322 からなる群から選択された H C V R / L C V R アミノ酸配列対を含む。

【0026】

一実施形態では、本発明は、A N G P T L 8 に関連する少なくとも 1 つの活性に特異的に結合するか、及び / 又は阻害する単離した抗体又はその抗原結合断片を提供し、ここで、抗体又は抗原結合断片は、配列番号が 162 / 170 である H C V R / L C V R アミノ酸配列対を含む。

30

【0027】

一実施形態では、本発明は、A N G P T L 8 に関連する少なくとも 1 つの活性に結合するか、及び / 又は阻害する単離した抗体又はその抗原結合断片を提供し、ここで、抗体又は抗原結合断片は、( a ) 表 1 に示す重鎖可変領域 ( H C V R ) 配列の何れか 1 つに含まれる 3 つの重鎖相補性決定領域 ( C D R ) ( H C D R 1、H C D R 2 及び H C D R 3 ) 及び、( b ) 表 1 に示す軽鎖可変領域 ( L C V R ) 配列の何れか 1 つに含まれる 3 つの軽鎖 C D R ( L C D R 1、L C D R 2 及び L C D R 3 ) を含む。

【0028】

一実施形態では、本発明は、A N G P T L 8 に関連する少なくとも 1 つの活性に特異的に結合するか、及び / 又は阻害する単離した抗体又はその抗原結合断片を提供し、ここで、抗体又は抗原結合断片は、

40

( a ) 配列番号 4、20、36、52、68、84、100、116、132、148、164、180、196、212、228、244、260、268、276、284、292、300、308、316 及び 332 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する H C D R 1 ドメイン、

( b ) 配列番号 6、22、38、54、70、86、102、118、134、150、166、182、198、214、230、246、262、270、278、286、294、302、310、318、及び 334 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する H C D R 2 ドメイン、

50

(c) 配列番号 8、24、40、56、72、88、104、120、136、152、168、184、200、216、232、248、264、272、280、288、296、304、312、320 及び 336 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する HCDR3 ドメイン、

(d) 配列番号 12、28、44、60、76、92、108、124、140、156、172、188、204、220、236、252 及び 324 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する LCDR1 ドメイン、

(e) 配列番号 14、30、46、62、78、94、110、126、142、158、174、190、206、222、238、254、及び 326 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する LCDR2 ドメイン、及び

(f) 配列番号 16、32、48、64、80、96、112、128、144、160、176、192、208、224、240、256 及び 328 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する LCDR3 ドメイン、を含む。

#### 【0029】

本発明は又、表 1 に列挙した HCDR1 アミノ酸配列の何れかから選択するアミノ酸配列、又はその配列の少なくとも 90% 少なくとも 95%、少なくとも 98% 若しくは少なくとも 99% が同一である実質的に同類の配列を有する、重鎖 CDR1 (HCDR1) を含む抗体又はその抗原結合断片を提供する。

#### 【0030】

本発明は又、表 1 に列挙した HCDR2 アミノ酸配列の何れかから選択するアミノ酸配列、又はその配列の少なくとも 90% 少なくとも 95%、少なくとも 98% 若しくは少なくとも 99% が同一である実質的に同類の配列を有する、重鎖 CDR2 (HCDR2) を含む抗体又はその抗原結合断片を提供する。

#### 【0031】

本発明は又、表 1 に列挙した HCDR3 アミノ酸配列の何れかから選択するアミノ酸配列、又はその配列の少なくとも 90% 少なくとも 95%、少なくとも 98% 若しくは少なくとも 99% が同一である実質的に同類の配列を有する、重鎖 CDR3 (HCDR3) を含む抗体又はその抗原結合断片を提供する。

#### 【0032】

本発明は又、表 1 に列挙した LCDR1 アミノ酸配列の何れかから選択するアミノ酸配列、又はその配列の少なくとも 90% 少なくとも 95%、少なくとも 98% 若しくは少なくとも 99% が同一である実質的に同類の配列を有する、軽鎖 CDR1 (LCDR1) を含む抗体又はその抗原結合断片を提供する。

#### 【0033】

本発明は又、表 1 に列挙した LCDR2 アミノ酸配列の何れかから選択するアミノ酸配列、又はその配列の少なくとも 90% 少なくとも 95%、少なくとも 98% 若しくは少なくとも 99% が同一である実質的に同類の配列を有する、軽鎖 CDR2 (LCDR2) を含む抗体又はその抗原結合断片を提供する。

#### 【0034】

本発明は又、表 1 に列挙した LCDR3 アミノ酸配列の何れかから選択するアミノ酸配列、又はその配列の少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98% 若しくは少なくとも 99% が同一である実質的に同類の配列を有する、軽鎖 CDR3 (LCDR3) を含む抗体又はその抗原結合断片を提供する。

#### 【0035】

本発明は又、表 1 に列挙した LCDR3 アミノ酸配列の何れかと対を形成する表 1 に列挙した HCDR3 アミノ酸配列の何れかを有する、HCDR3 および LCDR3 アミノ酸配列対 (HCDR3 / LCDR3) を含む、抗体またはその抗原結合断片を提供する。特定の実施形態では、本発明は、表 1 に列挙した代表的な抗 ANGP TL8 抗体の何れかに含まれる HCDR3 / LCDR3 アミノ酸配列対を含む、抗体またはその抗原結合断片を提供する。特定の実施形態では、HCDR3 / LCDR3 アミノ酸配列対は、配列番号

10

20

30

40

50



72 / 80 (例えば、H4H15321P)、168 / 176 (例えば、H4H15341P)、200 / 208 (例えば、H4H15345P) 及び 320 / 328 (例えば、H4H15367P2) から成る群から選択される。一実施形態において、HCDR3 / LCDR3 アミノ酸配列対は、配列番号 168 / 176 (例えば、H4H15341P) である。

#### 【0036】

本発明は又、表 1 に列挙した代表的な抗-ANGPTL8 抗体の何れかに含まれる 6 つの CDR のセット (即ち、HCDR1 - HCDR2 - HCDR3 - LCDR1 - LCDR2 - LCDR3) を含む抗体又はその抗原結合断片を提供する。特定の実施形態において、HCDR1 - HCDR2 - HCDR3 - LCDR1 - LCDR2 - LCDR3 アミノ酸配列セットは、配列番号 68 - 70 - 72 - 76 - 78 - 80 (例えば、H4H15321P)、164 - 166 - 168 - 172 - 174 - 176 (例えば、H4H15341P)、196 - 198 - 200 - 204 - 206 - 208 (例えば、H4H15345P)、316 - 318 - 320 - 324 - 326 - 328 (例えば、H4H15367P2) からなる群から選択される。一実施形態では、HCDR1 - HCDR2 - HCDR3 - LCDR1 - LCDR2 - LCDR3 アミノ酸配列セットは、配列番号 164 - 166 - 168 - 172 - 174 - 176 (例えば、H4H15341P) である。

#### 【0037】

関連する実施形態では、本発明は、表 1 に列挙した代表的な抗-ANGPTL8 抗体の何れかにより定義される HCV R / LCV R アミノ酸配列対に含まれる 6 つの CDR のセット (即ち、HCDR1 - HCDR2 - HCDR3 - LCDR1 - LCDR2 - LCDR3) を含む抗体またはその抗原結合断片を提供する。例えば、本発明は、配列番号 66 / 74 (例えば、H4H15321P)、162 / 170 (例えば、H4H15341P)、194 / 202 (例えば、H4H15345P)、314 / 322 (例えば、H4H15367P2) から成る群から選択される HCV R / LCV R アミノ酸配列対に含まれる HCDR1 - HCDR2 - HCDR3 - LCDR1 - LCDR2 - LCDR3 アミノ酸配列セットを含む抗体またはその抗原結合断片を含む。HCV R 及び LCV R アミノ酸配列内の CDR を同定するための方法及び技術は、当技術分野で周知であり、本明細書に開示される特定の HCV R 及び / 又は LCV R アミノ酸配列内の CDR を同定するために使用しても良い。CDR の境界を同定するために使用し得る代表的な規約には、例えば、Kab 30  
a t の定義、Ch o t h i a の定義、及び A b M の定義を含む。一般論としては、K a b a t の定義は配列の可変性を基準とし、Ch o t h i a の定義は構造的なループ領域の位置を基準とし、A b M の定義は K a b a t と Ch o t h i a との考え方の間のである。K a b a t 、 “ S e q u e n c e s o f P r o t e i n s o f I m m u n o l o g i c a l I n t e r e s t , ” N a t i o n a l I n s t i t u t e s o f H e a l t h 、 B e t h e s d a , M d . ( 1 9 9 1 ) 、 A l - L a z i k a n i ら、J . M o l . B i o l . 2 7 3 : 9 2 7 - 9 4 8 ( 1 9 9 7 ) 、 及び M a r t i n ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 6 : 9 2 6 8 - 9 2 7 2 ( 1 9 8 9 ) を参照。公開データベースも又、抗体内の CDR 配列を同定するために利用可能である。

#### 【0038】

本発明は、変性したグリコシル化パターンを有する抗-ANGPTL8 抗体を含む。いくつかの実施形態では、望ましくないグリコシル化部位を除去する変性が有用であり得る、即ち、例えば抗体がオリゴ糖鎖上に存在するフコース部分を除去して、抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 機能を増加させる (Sh i e l d ら、( 2 0 0 2 ) J B C 2 7 7 : 2 6 7 3 3 を参照のこと)。他の応用では、ガラクトシル化の変性により、補体依存性細胞障害 (CDC) を変性させても良い。

#### 【0039】

本発明は又、HCV R の CDR 及び LCV R の CDR を含む参照抗体又はその抗原結合断片と ANGPTL8 への特異的結合を競合する抗体及びその抗原結合断片を提供し、ここで HCV R 及び LCV R は各々、表 1 に列挙した HCV R 及び LCV R 配列から選択さ 50

れるアミノ酸配列を有する。

【0040】

一実施形態では、本発明は、ANGPTL8への結合について、配列番号2/10、18/26、34/42、50/58、66/74、82/90、98/106、114/122、130/138、146/154、162/170、178/186、194/202、210/218、226/234、242/250、258/250、266/250、274/250、282/250、290/250、306/250、314/322、及び330/322からなる群から選択されるHCVR/LCVRアミノ酸配列対を含む参照抗体と、競合する単離したモノクローナル抗体又はその抗原結合断片を提供する。

10

【0041】

本発明は又、HCVRのCDR及びLCVRのCDRを含む参照抗体又はその抗原結合断片としてANGPTL8上の同じエピトープに結合する抗体及びその抗原結合断片を提供し、ここで、HCVR及びLCVRは、各々表1に列挙したHCVR及びLCVR配列から選択されるアミノ酸配列を有する。

【0042】

一実施形態では、本発明は、ANGPTL8上の同じエピトープに、配列番号2/10、18/26、34/42、50/58、66/74、82/90、98/106、114/122、130/138、146/154、162/170、178/186、194/202、210/218、226/234、242/250、258/250、266/250、274/250、282/250、290/250、306/250、314/322、及び330/322からなる群から選択されるHCVR/LCVRアミノ酸配列対を含む参照抗体として結合する単離したモノクローナル抗体又はその抗原結合断片を提供する。

20

【0043】

一実施形態では、ANGPTL8に関連する少なくとも1つの活性に対し、特異的に結合するか、及び/又は阻害する、単離した抗体は、組換え産生したヒトモノクローナル抗体である。

【0044】

一実施形態では、ANGPTL8に関連する少なくとも1つの活性に対し、特異的に結合するか、及び/又は阻害する、単離した抗体が、組換え産生したヒトモノクローナル抗体であり、表1にあるアミノ酸配列から選択されたHCVR及び/又はLCVR配列を有する。

30

【0045】

一実施形態では、ANGPTL8に関連する少なくとも1つの活性に対し、特異的に結合するか、及び/又は阻害する、単離した抗体が、組換え産生したヒトモノクローナル抗体であり、配列番号2/10、18/26、34/42、50/58、66/74、82/90、98/106、114/122、130/138、146/154、162/170、178/186、194/202、210/218、226/234、242/250、258/250、266/250、274/250、282/250、290/250、306/250、314/322、及び330/322から成る群から選択されたHCVR/LCVRアミノ酸配列対を有する。

40

【0046】

一実施形態では、本発明は、ANGPTL8活性を中和する完全ヒトモノクローナル抗体又はその抗原結合断片を提供し、ここで、その抗体またはその断片は、以下の特徴の1つ以上を示す。(i)配列番号2、18、34、50、66、82、98、114、130、146、162、178、194、210、226、242、258、266、274、282、290、298、306、314および330からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するHCVRを含む。(ii)配列番号10、26、42、58、74、90、106、122、138、154、170、186、202、218、234、

50

250、および322からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するLCVRを含む。  
 (iii) 配列番号が8、24、40、56、72、88、104、120、136、152、168、184、200、216、232、248、264、272、280、288、296、304、312、320および336からなる群から選択されるアミノ酸配列、又はその配列の少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%が同一性を有する実質的に同類の配列、を有するHC DR3ドメインと、配列番号が16、32、48、64、80、96、112、128、144、160、176、192、208、224、240、256および328からなる群から選択されるアミノ酸配列、又はその配列の少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%又は少なくとも99%が同一性を有する実質的に同類の配列、を有するLC DR3ドメインとを含む、(iv) 配列番号が4、20、36、52、68、84、100、116、132、148、164、180、196、212、228、244、260、268、276、284、292、300、308、316および332、から成る群から選択されるアミノ酸配列、又はその配列の少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%又は少なくとも99%が同一性を有する実質的に同類の配列を有するHC DR1ドメイン、配列番号が6、22、38、54、70、86、102、118、134、150、166、182、198、214、230、246、262、270、278、286、294、302、310、318、および334からなる群から選択されるアミノ酸配列、又はその配列の少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%又は少なくとも99%が同一性を有する実質的に同類の配列を有するHC DR2ドメイン、配列番号が12、28、44、60、76、92、108、124、140、156、172、188、204、220、236、252及び324から成る群から選択されるアミノ酸配列、又はその配列の少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%又は少なくとも99%が同一性を有する実質的に同類の配列を有するLC DR1ドメイン、及び配列番号が14、30、46、62、78、94、110、126、142、158、174、190、206、222、238、254、及び326からなる群から選択されるアミノ酸配列、又はその配列の少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%又は少なくとも99%が同一性を有する実質的に同類の配列を有するLC DR2ドメインを含む。(v) 配列番号337によって定義されるヒトANGPTL8のN末端領域に特異的に結合する。(vi) 配列番号337によって定義されるヒトANGPTL8のN末端領域に特異的に結合しない。(vii) 配列番号338のヒトANGPTL3ペプチドのN末端コイルドコイル領域に、又は配列番号339のヒトANGPTL4ペプチドのN末端コイルドコイル領域に結合しない。(viii) 表面プラズモン共鳴により測定したとき、ヒトANGPTL8に、25 で約150 pM未満のKDで結合し、サルANGPTL8に、25 で約90 pM未満のKDで結合する。(ix) 約10 mg/kgの用量で皮下投与した場合、哺乳動物のトリグリセリドレベルを約68% (最大) 低下させる。(x) 約5 mg/kg ~ 約25 mg/kgの範囲の用量で皮下投与した場合、約7日~21日の範囲の期間、哺乳動物のトリグリセリドレベルを低下させる。(xi) 参照抗体と交差競合し、ここで参照抗体は表1のHCVRおよびLCVRアミノ酸配列の何れかから成る群より選択される重鎖可変領域(HCVR)および軽鎖可変領域(LCVR)アミノ酸配列を含む。

#### 【0047】

第2の態様において、本発明は、又、抗-ANGPTL8抗体又はその一部をコードする核酸分子を提供する。例えば、本発明は、表1に列挙したHCVRアミノ酸配列の何れかをコードする核酸分子を提供する。特定の実施形態では、核酸分子は、表2に列挙したHCVR核酸配列の何れか、又はその配列の少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%又は少なくとも99%が同一性を有する実質的に同類の配列から選択されるポリヌクレオチド配列を含む。

#### 【0048】

本発明は又、表1に列挙したLCVRアミノ酸配列の何れかをコードする核酸分子を提

供する。特定の実施形態において、核酸分子は、表 2 に列挙した L C V R 核酸配列の何れかから選択されるポリヌクレオチド配列、又はその配列の少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 % 又は少なくとも 99 % が同一性を有する実質的に同類の配列を含む。

【0049】

本発明は又、表 1 に列挙した H C D R 1 アミノ酸配列の何れかをコードする核酸分子を提供する。特定の実施形態において、核酸分子は、表 2 に列挙した H C D R 1 核酸配列の何れかから選択されるポリヌクレオチド配列、又はその配列の少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 % 又は少なくとも 99 % が同一性を有する実質的に同類の配列を含む。

10

【0050】

本発明は又、表 1 に列挙した H C D R 2 アミノ酸配列の何れかをコードする核酸分子を提供する。特定の実施形態において、核酸分子は、表 2 に列挙した H C D R 2 核酸配列の何れかから選択されるポリヌクレオチド配列、又はその配列の少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 % 又は少なくとも 99 % が同一性を有する実質的に同類の配列を含む。

【0051】

本発明は又、表 1 に列挙した H C D R 3 アミノ酸配列の何れかをコードする核酸分子を提供する。特定の実施形態において、核酸分子は、表 2 に列挙した H C D R 3 核酸配列の何れかから選択されるポリヌクレオチド配列、又はその配列の少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 % 又は少なくとも 99 % が同一性を有する実質的に同類の配列を含む。

20

【0052】

本発明は又、表 1 に列挙した L C D R 1 アミノ酸配列の何れかをコードする核酸分子も提供する。特定の実施形態において、核酸分子は、表 2 に列挙した L C D R 1 核酸配列の何れかから選択されるポリヌクレオチド配列、又はその配列の少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 % 又は少なくとも 99 % が同一性を有する実質的に同類の配列を含む。

【0053】

本発明は又、表 1 に列挙した L C D R 2 アミノ酸配列の何れかをコードする核酸分子も提供する。特定の実施形態において、核酸分子は、表 2 に列挙した L C D R 2 核酸配列の何れかから選択されるポリヌクレオチド配列、又はその配列の少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 % 又は少なくとも 99 % が同一性を有する実質的に同類の配列を含む。

30

【0054】

本発明は又、表 1 に列挙した L C D R 3 アミノ酸配列の何れかをコードする核酸分子も提供する。特定の実施形態において、核酸分子は、表 2 に列挙した L C D R 3 核酸配列の何れかから選択されるポリヌクレオチド配列、又はその配列の少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 % 又は少なくとも 99 % が同一性を有する実質的に同類の配列を含む。

40

【0055】

本発明は又、H C V R をコードする核酸分子を提供し、ここで、H C V R は、3 つの C D R のセット（即ち、H C D R 1 - H C D R 2 - H C D R 3）を含み、H C D R 1 - H C D R 2 - H C D R 3 アミノ酸配列セットは、表 1 に列挙した代表的な抗 - A N G P T L 8 抗体の何れかにより定義される。

【0056】

本発明は又、L C V R をコードする核酸分子を提供し、ここで、L C V R は、3 つの C D R のセット（即ち、L C D R 1 - L C D R 2 - L C D R 3）を含み、L C D R 1 - L C D R 2 - L C D R 3 アミノ酸配列セットは、表 1 に列挙した代表的な抗 - A N G P T L 8 抗体の何れかにより定義される。

50

## 【 0 0 5 7 】

本発明は又、H C V R 及び L C V R の両方をコードする核酸分子を提供し、ここで、H C V R は、表 1 に列挙した H C V R アミノ酸配列の何れかのアミノ酸配列を含み、かつ L C V R は、表 1 に列挙した L C V R アミノ酸配列の何れかのアミノ酸配列を含む。特定の実施形態において、核酸分子は、表 2 に列挙した H C V R 核酸配列の何れかから選択されるポリヌクレオチド配列、又はその配列の少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 % 又は少なくとも 9 9 % が同一性を有する実質的に同類の配列を含み、及び、表 2 に列挙した L C V R 核酸配列の何れかから選択されるポリヌクレオチド配列、又はその配列の少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 % 又は少なくとも 9 9 % が同一性を有する実質的に同類の配列を含む。本発明のこの態様による特定の実施形態では、核酸分子は、H C V R 及び L C V R をコードし、ここで、H C V R 及び L C V R は、両方共に表 1 に列挙した同一抗 - A N G P T L 8 抗体に由来する。

10

## 【 0 0 5 8 】

本発明は又、抗 - A N G P T L 8 抗体の重鎖又は軽鎖可変領域を含むポリペプチドを発現する能力を有する組換え発現ベクターを提供する。例えば、本発明は、上記の核酸分子の何れかを含む組換え発現ベクター、即ち表 1 に記載の H C V R、L C V R、及び / 又は C D R 配列の何れかをコードする核酸分子を含む。又、本発明の範囲には、そのようなベクターが導入された宿主細胞、並びに抗体又は抗体断片の産生が可能となる条件下で宿主細胞を培養し、次いで、そのように産生した抗体及び抗体断片を回収する方法が含まれる。

20

## 【 0 0 5 9 】

一実施形態では、A N G P T L 8 に関連する少なくとも 1 つの活性に特異的に結合する、及び / 又は、阻害する単離した抗体は、組換えにより産生され、表 2 に示す核酸配列から選択された核酸配列によりコードされた H C V R 及び / 又は L C V R を有するヒトモノクローナル抗体である。

## 【 0 0 6 0 】

一実施形態では、本発明は、ヒト A N G P T L 8 に特異的に結合する抗体又はその断片をコードする単離した核酸分子を提供し、ここで、抗体又はその抗原結合断片は、( a ) 表 1 に示すアミノ酸配列を有する重鎖可変領域 ( H C V R ) の相補性決定領域 ( C D R ) 及び、( b ) 表 1 に示すアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域 ( L C V R ) の C D R を含む。

30

## 【 0 0 6 1 】

一実施形態では、本発明は、ヒト A N G P T L 8 に特異的に結合する抗体又はその抗原結合断片をコードする単離した核酸分子を提供し、ここで抗体又は抗原結合断片は、表 1 に示すアミノ酸配列からなる群から選択される H C V R、及び、表 1 に示すアミノ酸配列からなる群から選択される L C V R を含む。

## 【 0 0 6 2 】

第 3 の態様では、本発明は、A N G P T L 8 に特異的に結合する組換えヒトモノクローナル抗体又はその抗原結合断片と医薬的に許容し得る担体とを含む医薬組成物を提供する。

## 【 0 0 6 3 】

1 つの実施形態において、本発明は、表 1 に示す抗 - A N G P T L 8 抗体の何れかの抗体又はその抗原結合断片から選択されたヒト A N G P T L 8 に特異的な少なくとも 1 つの抗体、及び医薬的に許容し得る担体又は希釈剤を含む医薬組成物を提供する。

40

## 【 0 0 6 4 】

関連する局面において、本発明は、抗 - A N G P T L 8 抗体と第 2 の治療剤との組合わせである組成物を特徴とする。一実施形態では、第 2 の治療薬は、抗 - A N G P T L 8 抗体と有利に組合わせる何れかの薬剤である。

## 【 0 0 6 5 】

一実施形態では、第 2 の治療剤は、高トリグリセリド血症などの高トリグリセリドレベルを特徴とする疾患又は状態に罹患している患者において、トリグリセリドを低下させるか、又は少なくとも 1 つの症状を軽減できる薬剤でも良い。

## 【 0 0 6 6 】

50

特定の実施形態では、第2の治療剤は、抗体又は本発明の抗体の抗原結合断片に関連し得る副作用、万一そのような副作用が起こると仮定すれば、を中和又は軽減するのに役立つ薬剤でも良い。

【0067】

第2の治療剤は、小分子薬剤、タンパク質/ポリペプチド、抗体、アンチセンス分子などの核酸分子、又はsiRNAでも良い。第2の治療薬は、合成でも、天然由来でも良い。

【0068】

本発明の抗体及び医薬的に許容し得る組成物は、他の併用療法で使用出来る、即ち、抗体及び医薬的に許容し得る組成物を、1つ又はそれ以上の他の所望の治療又は医療処置と同時に、前に、又は後に投与しても良いことは理解されよう。併用レジメンで使用する特定の治療法（治療法又は手順）の組み合わせでは、所望の治療法及び/又は手順の適合性及び達成されるべき所望の治療効果を考慮に入れる。使用される療法は、同じ障害（例えば、抗体は同じ障害を治療するために使用される別の薬剤と同時に投与され得る）に対して所望の効果を達成し得ること、又はそれらが異なる効果（例えば、悪影響の何れをも抑制する）を達成することも理解し得よう。本明細書で治療される疾患又は状態に使用される追加治療薬は、特定の疾患又は状態を治療又は予防するために通常投与されるもので、適合している。

【0069】

関連する実施形態では、本発明は、本発明の特徴は抗体又はその抗原結合断片と、第2の治療剤とを組合せた組成物であり、第2の治療剤としては（1）3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル補酵素A（HMG-CoA）レダクターゼ阻害剤、例えば、セリバスタチン、アトルバスタチン、シンバスタチン、ピタバスタチン、ロスバスタチン、フルバスタチン、ロバスタチン、プラバスタチン等、（2）コレステロール摂取及び/又は胆汁酸の再吸収阻害剤、（3）リポタンパクの異化を増加させるナイアシン、（4）TGレベル、低密度リポタンパク質（LDL）のレベルを低下させ、高密度リポタンパク質（HDL）レベルを改善するフィブラート又は両親媒性カルボン酸、及び（5）22-ヒドロキシコレステロール、又はエゼチミブ+シンバスタチンのような固定された組み合わせ等の、コレステロール排除において役割を果たすLXR転写因子の活性化剤、胆汁レジン（例えば、コレスチラミン、コレスチポール、コレセバラム）を有するスタチン、ナイアシン+スタチン（例えば、ナイアシンとロバスタチン）の固定された組み合わせ、又はオメガ-3-脂肪酸エチルエステル（例えば、オマコール）のような他の脂質低下剤と組み合わせを挙げられる。

【0070】

更に、第2の治療剤はANGPTL8の1種又はそれ以上の他の阻害剤、同様に、ANGPTL3、ANGPTL4、ANGPTL5、ANGPTL6、アポリポタンパク質C-II（APOC3）及びプロタンパク質転換酵素サブチリシン/ケキシン型9（PCSK9）のような他の分子の阻害剤でも良く、これは、脂質代謝、特にコレステロール及び/又はトリグリセリドの恒常性に関連している。これらの分子の阻害剤には、小分子、アンチセンス分子、及びこれらの分子に特異的に結合し、その活性を遮断する抗体が含まれる。

【0071】

一実施形態では、本発明の抗-ANGPTL8抗体を糖尿病（例えば、2型糖尿病）等の疾患の治療に使用する場合、これらの抗体は、現在利用可能な以下の糖尿病のための治療の1つ又はそれ以上と組合わせて使用しても良い。それを以下に挙げると、インスリン、インスリン類似体（下記参照）、ビッグアナイド（メトホルミン）、スルホニルウレア（例えばグリブリド、グリピジド）、PPARガンマアゴニスト（例えばピオグリタゾン、ロシグリタゾン）、アルファグルコシダーゼ阻害剤（例えばアカルボース、ボグリボース）、グルカゴン様ペプチド1（GLP-1）アゴニスト（例えば、BYETTA（登録商標）（エクセナチド）、TRULICITY（登録商標）（ジュラグルチド）、VICTOZA（登録商標）（リラグルチド）、Lyxumia（登録商標）（リキシセナチド）

、T a n z e u m（登録商標）（アルビグルチド））、ジベプチジルペプチダーゼIV阻害剤（例えば、サキサグリブチン（O N G L Y Z A（登録商標））、シタグリブチン（J A N U V I A（登録商標））、及びビルダグリブチン（G A L V U S（登録商標））、ナトリウムグルコース共輸送体2（S G L T 2）阻害剤（例えば、I N V O K A N A（登録商標）（カナグリフロジン）、F O R X I G A（登録商標）ダバグリフロジン、エンパグリフロジン、イブラグリフロジン、トホグリフロジン）、S Y M L I N（登録商標）（プラムリンチド）、（例えば、米国特許第8545847号に記載されているような）グルカゴン受容体アンタゴニスト、およびグルカゴンアンタゴニストである。

【0072】

ある関連する実施形態では、組成物は、第2の薬剤を含んでも良く、それらは、非スルホニルウレア分泌促進物質、速効型（例えば、リスプロ、アスパルト、グルリスシン）及び遅効型（例えば、デテミ-ルインスリン、デグルデックインスリン、又はグラルギンインスリン）を含むインスリン類似体、エキセンディン-4ポリペプチド、ベータ3アドレナリン受容体アゴニスト、コレステロール摂取及び/又は胆汁酸再吸収の阻害剤、LDLコレステロールアンタゴニスト、コレステリルエステル移動タンパク質アンタゴニスト（例えばトルセトラピブ、アナセトラピブ、ダルセトラピブ又はエバセトラピブ）エンドセリン受容体アンタゴニスト、成長ホルモンアンタゴニスト、インスリン感作物質、アミリン模倣物またはアゴニスト、カンナビノイド受容体アンタゴニスト、グルカゴン様ペプチド-1受容体アゴニスト、メラノコルチン、メラニン凝集ホルモン受容体アゴニスト、S N R I、線維芽細胞増殖因子21（F G F 21）模倣物（例えば、米国特許公開第20110002845号及び米国特許公開第20080261236号を参照）、線維芽細胞増殖因子受容体1c（F G F R 1c）アゴニスト（例えば、米国特許公開第20110150901号を参照）、アミノグアニジンなどの高度糖化最終生成物の阻害剤、及びタンパク質チロシンホスファターゼ阻害剤等であるが、これに限定する訳ではない。

【0073】

関連する実施形態において、第2の治療剤は、鎮痛剤、C o x - 2阻害剤などの非ステロイド系抗炎症薬（N S A I D S）を含む抗炎症剤、等の1種又はそれ以上の他の治療剤でも良く、必要であれば、根底にある状態に付随する症状を寛解及び/又は軽減するように投与する。

【0074】

第4の態様では、本発明は、A N G P T L 8に関連する少なくとも1つの活性を、それを必要とする患者において中和し、阻害し、遮断し、抑止し、低減又は妨害する方法を提供するものであり、表1に示す本発明の抗体の何れかの1種又はそれ以上を、又は、これらの抗体の何れかの1種又はそれ以上を含む医薬組成物を、これらを必要とする患者に投与する方法を含み、ここでA N G P T L 8に関連する少なくとも1つの活性を低減するか消失させる。

【0075】

一実施形態では、本発明は、治療を必要とする被験者に、本発明の1種又はそれ以上の抗-h A N G P T L 8抗体又はその抗原結合断片を含む医薬組成物の治療有効量及び、場合により、1種又はそれ以上の上記の追加的治療剤、を投与することを含む治療方法を提供する。

【0076】

第5の態様において、本発明は、A N G P T L 8の上昇した発現及び/又は活性に部分的に関連する疾患又は状態を治療する方法を提供するものであり、その方法とはA N G P T L 8阻害剤/アンタゴニストを投与することを含み、ここでA N G P T L 8阻害剤/アンタゴニストは、A N G P T L 8に特異的である抗体又はその抗原結合断片である。一実施形態では、A N G P T L 8に特異的な抗体又はその抗原結合断片は、表1のアミノ酸配列からなる群から選択されるH C V R、及び表1のアミノ酸配列からなる群から選択されるL C V Rを含む。

【0077】

10

20

30

40

50

一実施形態では、本発明の方法によって治療可能な疾患または障害は、抗-h A N G P T L 8 抗体治療（例えば、A N G P T L 8 で媒介する疾患または障害）を伴わない場合と比較して、A N G P T L 8 活性を除去し、阻害し、低減し、またはそうでなければ妨害することにより、改善され、寛解され、阻害され、若しくは予防されるか、又は疾患に関連する少なくとも1つの症状発症の重症度、又は頻度が減少する疾患または障害の何れかである。本発明の方法により治療可能な疾患又は障害の例としては、これに限定する訳ではないが、脂質代謝を伴うもの、例えば、高脂血症、高リポ蛋白血症および異常脂質血症、例えば、アテローム発生性異脂肪血症、糖尿病性異脂肪血症等、T G > 1 0 0 0 m g / d L の重症高トリグリセリド血症およびこれに伴う急性膵炎を含む、高トリグリセリド血症、高コレステロール血症、カイロミクロン血症、混合異脂肪血症（肥満、メタボリック症候群、糖尿病など）脂肪栄養症、脂肪組織萎縮症、等が挙げられ、これらは、例えば、L P L 活性および/またはL P L 欠損の減少、A p o C 2 の変化、A p o E の欠損、A p o B の増加、超低密度リポタンパク質（V L D L ）の産生の増加および/または消失の減少、特定の薬物による治療（例えば、グルココルチコイド治療誘発性異常脂質血症）、遺伝的素因、食事、生活様式などの何れかを挙げられる。

10

#### 【0078】

本発明の方法は又、トリグリセリド血症、高トリグリセリド血症、高脂血症、高リポタンパク血症及び/又は、これらに限定する訳ではないが、心血管疾患または障害、例えば、アテローム性動脈硬化症、動脈瘤、高血圧、狭心症、脳卒中、脳血管疾患、うっ血性心不全、冠状動脈疾患、心筋梗塞、末梢血管疾患などを含む異常脂質血症、急性膵炎、非アルコール性脂肪性肝炎（N A S H ）、糖尿病などの血糖障害、肥満などに関連するか、又はそれらに起因する疾患又は障害を予防又は治療することも出来る。

20

#### 【0079】

一実施形態では、本発明の少なくとも1つの抗体又はその抗原結合断片は、メタボリック症候群に関連する異常脂質血症、肥満を治療するため、又は体重増加を予防するため、又は正常な体重を維持するために使用しても良い。

#### 【0080】

一実施形態では、本発明は、血中トリグリセリドレベルを低下させる方法、又は高血中トリグリセリドレベルに関連するか、若しくはその一部を特徴とする状態若しくは疾患、又はその状態若しくは疾患に関連する少なくとも1つの症状若しくは合併症を治療する方法を提供するものであり、その方法とは、表1のヒトA N G P T L 8 に特異的な1種又はそれ以上の抗体を含む医薬組成物を、それを必要とする患者に、血中トリグリセリドレベルを低下させる、又はその状態若しくは疾患を媒介させるか、又は少なくとも1つの症状、又は状態若しくは疾患に関連する合併症の、重症度を寛解又は軽減させるように投与することを含む。

30

#### 【0081】

一実施形態では、本発明の少なくとも1つの抗体又はその抗原結合断片は、単独で、又は第2若しくは第3の治療剤と組合わせて、高トリグリセリド血症又は高トリグリセリド血症に関連する少なくとも1つの症状を治療するために、又は、高トリグリセリド血症を発症する危険性のある患者、例えば、高トリグリセリド血症を発症する遺伝的素因を有する患者、例として、家族性高トリグリセリド血症若しくは家族性異常 リポタンパク血症、を治療するために使用しても良い。

40

#### 【0082】

他の状態では、患者が高レベルのトリグリセリドになりやすくする可能性がある。例えば、ベータ遮断薬、避妊薬、利尿薬、ステロイド、又はタモキシフェンの使用など、特定の薬物は、トリグリセリドのレベルの上昇をもたらし、その結果、患者は、高レベルのトリグリセリドに関連する状態または合併症例えば、アテローム性動脈硬化症、脳卒中、心臓発作、及び他の心臓病を発症する可能性が高まる可能性がある。

#### 【0083】

更に、ある種の他の状態は、肥満、制御不能な糖尿病、甲状腺機能低下症、腎臓疾患又

50



はアルコール摂取を含む、高レベルのトリグリセリドを誘引し得る。

【0084】

一実施形態において、抗体は、上昇した血中トリグリセリドレベルにより部分的には特徴付けられる疾患若しくは障害の発症を予防するため、又はそのような疾患若しくは障害を発症する可能性を防止するため、又は疾患若しくは障害の重篤度、又は、その疾患若しくは障害に関連する少なくとも1つの症状を緩和するために使用しても良い。本発明の抗体は、単独で、又は、他の薬剤若しくは、上昇した血中トリグリセリドレベルにより部分的に特徴付けられる、それに限定する訳ではないが、高トリグリセリド血症等の疾患又は状態を患っている患者を治療するための標準治療として知られる方法との補助療法として使用し得ることを想定している。このような標準的な療法は、流体投与、又は血液中中性脂肪又は脂質の低下に、又は体重減量のために有用な他の何れかの薬剤の投与を含み得る。

10

【0085】

一実施形態では、本明細書に記載の抗体の使用は、正常なレベルのトリグリセリドを達成するのに有効な手段であり、それにより、高トリグリセリドにより特徴付けられる疾患に関連する1つ以上の症状又は長期の合併症を寛解又は予防し得る。

【0086】

一実施形態では、本発明の抗体は上昇したレベルのトリグリセリドにより、部分的に特徴付けられる疾患又は障害の何れかを治療する際に使用するための医薬の調製に使用しても良い。

【0087】

本発明の抗体は、急性診療における短期療法として使用しても良く、又は慢性治療としての長期に亘る使用を想定しても良い。

20

【0088】

他の実施形態は、以下に示す詳細な説明の概要で明確になるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0089】

【図1】図1は、H4H15341Pを単回皮下投与したヒト化ANGPTL8マウスにおける血清トリグリセリド及び総コレステロール濃度の平均 $\pm$ 標準誤差を示す。投与用量は、試験の0日目に1、5、10又は25mg/kgであった。統計的比較は、対照Abとの差の2元分散分析(2-way ANOVA) \*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$ 、\*\*\*  $p < 0.001$ 、\*\*\*\*  $p < 0.0001$ により行った

30

【図2】図2は、1、5、10又は25mg/kgの用量でのH4H15341Pの単回の皮下投与の投与の後の循環抗ヒト抗体のレベルを示す。

【図3】図3は、対照抗体と比較した、ANGPTL8マウスにおける血清リポタンパク質リパーゼ(LPL)及び肝リパーゼに及ぼすH4H15341P mAbの効果を示す。統計は、対応のないStudentのt-検定により行った。\*  $p < 0.01$

【図4】図4は、ANGPTL8マウス中の脂質耐性試験におけるmAb H4H15341Pの効果を示す。H4H15341P mAbを投与して、対照抗体と比較した、急性脂肪負荷後のトリグリセリドレベルの低下について評価した。ボンフェローニ事後検定を用いた2元ANOVAにより統計を行った。\*\*\*\*  $p < 0.0001$

40

【発明を実施するための形態】

【0090】

本発明を記載する前に、本発明は、記載した特定の方法及び実験条件に限定する訳ではないので、その方法及び条件は変動し得ることは理解されたい。本明細書で使用する用語は、特定の実施形態のみを説明するためのものであり、かつ、限定することを意図している訳ではないことも理解されたい、なぜなら、本発明の範囲は添付の特許請求の範囲によってのみ限定されるべきであるからである。

【0091】

他に定義しない限り、本明細書で使用する技術用語及び科学用語は、全て、本発明が属する技術分野の当業者により通常に理解されているものと同じ意味を有する。本明細書で

50

「約」という用語を使用する場合、特定の列挙した数値に関して使用する時のその値は列挙した値から 1 % 以下だけ変動し得ることを意味する。例えば、本明細書で使用する表現「約 100」は、99 及び 101 並びにその間のすべての値（例えば、99.1、99.2、99.3、99.4 など）を含む。

【0092】

本明細書に記載した方法及び材料と類似又は等価な方法及び材料の何れも、本発明の実施又は試験において使用することができるが、ここに記載するのは好ましい方法及び材料である。本明細書で言及した全ての特許、出願、非特許刊行物は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0093】

〔定義〕

「アンジオポエチン様タンパク質 8」又は「ANGPTL8」は、タンパク質のアンジオポエチンファミリーの一種であり、たまに、TD26、RIFL、リパシン、C19orf80 及びベータトロフィンと呼ばれることがある。本明細書中で使用される場合、「ANGPTL8」は、配列番号 340 のアミノ酸残基 1 ~ 177 に示されるアミノ酸配列を含むヒト ANGPTL8 を指す。シグナル配列を含む完全長ヒト ANGPTL8 アミノ酸配列は、GenBank 寄託番号 NP\_061157.3 にも見出され、一方、ヒト ANGPTL8 をコードする完全長核酸配列は、GenBank 寄託番号 NM\_018687.6 に見出し得る。ヒト ANGPTL8 の N 末端コイルドコイルドメインは、配列番号 340 のアミノ酸残基 1 ~ 39 に及んでおり、又、配列番号 337 として示されている。本明細書のタンパク質、ポリペプチド及びタンパク質断片に対する全ての言及は、非ヒト種に由来するものとして明示的に指定されていない限り、それぞれのタンパク質、ポリペプチド又はタンパク質断片のヒトバージョンである。従って、表現「ANGPTL8」は、非ヒト種、例えば「マウス ANGPTL8」、「サル ANGPTL8」などからの由来であると特定されない限り、ヒト ANGPTL8 を意味する。

【0094】

本明細書で使用する「ヒトアンジオポエチン様タンパク質 3」又は「hANGPTL3」という用語は、配列番号 343 に示される核酸配列及び配列番号 342 のアミノ酸配列、又はその生物学的に活性な断片を有する ANGPTL3 を指す。ヒト ANGPTL3 の N 末端コイルドコイルドメインは、配列番号 338 として示される。

【0095】

本明細書で使用する「ヒトアンジオポエチン様タンパク質 4」又は「hANGPTL4」という用語は、配列番号 345 に示される核酸配列、及び配列番号 344 のアミノ酸配列、又はその生物学的に活性な断片を有する ANGPTL4 を指す。ヒト ANGPTL4 の N 末端コイルドコイルドメインは、配列番号 339 として示される。

【0096】

本発明の特定の実施形態、抗体又は抗体断片は、第 2 の ANGPTL8 アンタゴニストなどの治療的部分（「免疫複合体」）、又は、上昇したトリグリセリドレベルにより部分的に引き起こされる疾患又は状態を治療するのに有用な他の何れかの治療部分と複合し得る。

【0097】

本明細書中で使用される場合、「抗-ANGPTL8 抗体」という表現は、単一特異性を有する一価抗体、並びに ANGPTL8 に結合する第一アーム及び第二（標的）抗原に結合する第二アームを含む二重特異性抗体の両方を含み、抗-ANGPTL8 アームは、本明細書の表 1 に示される HCVR / LCVR 又は CDR 配列の何れかを含む。

【0098】

本明細書で使用する「抗体」という用語は、特定の抗原（例えば、ANGPTL8）に特異的に結合するか又は相互作用する少なくとも 1 つの相補性決定領域（CDR）を含む抗原結合分子又は分子複合体を意味する。用語「抗体」は、4 つのポリペプチド鎖、ジスルフィド結合により相互連結された 2 つの重（H）鎖及び 2 つの軽（L）鎖、並びにその多量体（例えば、IgM）を含む免疫グロブリン分子を含む。各重鎖は、重鎖可変領域

10

20

30

40

50

(本明細書ではH C V R又はV Hと略記する)及び重鎖定常領域を含む。重鎖定常領域は、3つのドメイン、C<sub>H</sub>1、C<sub>H</sub>2及びC<sub>H</sub>3を含む。各軽鎖は、軽鎖可変領域(本明細書ではL C V R又はV Lと略記する)及び軽鎖定常領域を含む。軽鎖定常領域は、1つのドメイン(C<sub>L</sub>1)を含む。V<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>領域は、より保存され、フレームワーク領域(F R)と呼ばれる領域が点在する相補性決定領域(C D R)と呼ばれる超可変領域に更に細分することができる。各V<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>は、F R 1、C D R 1、F R 2、C D R 2、F R 3、C D R 3、F R 4の順でアミノ末端からカルボキシ末端に配置された3つのC D R及び4つのF Rから構成される。本発明の異なる実施形態において、抗-ANGPTL8抗体(又はその抗原結合部分)のF Rは、ヒト生殖系列配列と同一でも良く、又は天然又は人工的に変性していても良い。アミノ酸コンセンサス配列は、2つ以上のC D Rの並列分析に基づいて定義され得る。

10

#### 【0099】

本明細書で使用する「抗体」という用語は、完全抗体分子の抗原結合断片も含む。本明細書中で使用される抗体の「抗原結合部分」、抗体の「抗原結合断片」等は、天然に存在し酵素的に入手可能な、合成した、又は遺伝子操作したポリペプチド又は、抗原に特異的に結合して複合体を形成する糖タンパク質を含む。抗体の抗原結合断片は、タンパク質可変消化、又は可変、場合により定常ドメインの抗体をコードするDNAの操作及び発現を含む組換え遺伝子工学技術等の適切な標準技術の何れかを用いて例えば、完全抗体分子から誘導し得る。このようなDNAは公知であり、及び/又は例えば商業的供給源、DNAライブラリー(例えばファージ-抗体ライブラリーを含む)から容易に入手可能であり、又は合成しても良い。DNAは、化学的に又は分子生物学技術を用いて配列決定及び操作してもよく良く、例えば、1つ又はそれ以上の可変及び/又は定常ドメインを適切な配置で並べ、又はコドンを導入し、システイン残基を作製し、アミノ酸を変性し、追加し又は削除しても良い。

20

#### 【0100】

抗原結合断片の非限定的な例としては、(i) F a b断片、(ii) F (a b')<sub>2</sub>断片、(iii) F d断片、(iv) F v断片(v)単鎖F v(s c F v)分子、(vi) d A b断片、及び(vii)抗体の超可変領域(例えば、C D R 3ペプチドのような単離した相補性決定領域(C D R))又は拘束性F R 3 - C D R 3 - F R 4ペプチドを模倣するアミノ酸残基から成る最小認識単位を挙げられる。ドメイン特異的抗体、単ドメイン抗体、ドメイン欠失抗体、キメラ抗体、C D R移植抗体、二重特異性抗体、ダイアボディ、(d i a b o d i e s)、トリアボディ(t r i a b o d i e s)、テトラボディ(t e t r a b o d i e s)、ミニボディ(m i n i b o d i e s)、ナノボディ(n a n o b o d i e s)(例えば、一価ナノボディ、二価ナノボディ等)小モジュラー免疫医薬(S M I P)、及びサメ可変I g N A Rドメインも又、本明細書で使用される「抗原結合断片」という表現に包含される。

30

#### 【0101】

抗体の抗原結合断片は、少なくとも1つの可変ドメインを含むのが通常である。可変ドメインは、どのような、サイズ又は、アミノ酸組成物でも良く、一般に、1つ又はそれ以上のフレームワーク配列を有するフレームに隣接して、又はフレーム内にある少なくとも1つのC D Rを含む。V<sub>L</sub>ドメインと会合したV<sub>H</sub>ドメインを有する抗原結合断片において、V<sub>H</sub>ドメイン及びV<sub>L</sub>ドメインは、適切ならば相互に如何なる位置でも配置しても良い。例えば、可変領域は二量体でも、V<sub>H</sub> - V<sub>H</sub>、V<sub>H</sub> - V<sub>L</sub>又は、V<sub>L</sub> - V<sub>L</sub>二量体を含んでも良い。或いは、抗体の抗原結合断片は、単量体V<sub>H</sub>又はV<sub>L</sub>ドメインを含んでも良い。

40

#### 【0102】

特定の実施形態では、抗体の抗原結合断片は、少なくとも1つの定常ドメインに共有結合した少なくとも1つの可変ドメインを含み得る。本発明の抗体の抗原結合断片内に見出され得る可変ドメイン及び定常ドメインの代表的な配置としては、これに限定する訳ではなく、以下の(i) V<sub>H</sub> - C<sub>H</sub>1、(ii) V<sub>H</sub> - C<sub>H</sub>2、(iii) V<sub>H</sub> - C<sub>H</sub>3、(iv) V<sub>H</sub> - C<sub>H</sub>1 - C<sub>H</sub>2、(v) V<sub>H</sub> - C<sub>H</sub>1 - C<sub>H</sub>2 - C<sub>H</sub>3、(vi) V<sub>H</sub> - C<sub>H</sub>2 - C<sub>H</sub>3

50

、(v i i) V<sub>H</sub>-C<sub>L</sub>、(v i i i) V<sub>L</sub>-C<sub>H1</sub>、(i x) V<sub>L</sub>-C<sub>H2</sub>、(x) V<sub>L</sub>-C<sub>H3</sub>、(x i) V<sub>L</sub>-C<sub>H1</sub>-C<sub>H2</sub>、(x i i) V<sub>L</sub>-C<sub>H1</sub>-C<sub>H2</sub>-C<sub>H3</sub>、(x i i i) V<sub>L</sub>-C<sub>H2</sub>-C<sub>H3</sub>、及び(x i v) V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>が含まれる。上記に列挙した代表的な構成の何れかを含む、可変ドメイン及び定常ドメインの何れかの構成において、可変ドメイン及び定常ドメインは、互いに直接連結されていてもよく、又は完全又は部分ヒンジ又はリンカー領域により連結していても良い。ヒンジ領域は、単一のポリペプチド分子中の隣接する可変ドメイン及び/又は定常ドメインの間で可撓性又は半可撓性の結合をもたらす少なくとも2つ(例えば、5、10、15、20、40、60又はそれ以上)のアミノ酸から成っていても良い。更に、本発明の抗体の抗原結合断片は、互に非共有結合的に会合して、及び/又は一種又はそれ以上の単量体V<sub>H</sub>又はV<sub>L</sub>ドメインと(例えば、ジスルフィド結合により)会合して、上記に列挙した可変及び定常ドメイン配置の何れかのホモ二量体又はヘテロ二量体(又は他の多量体)を含んでいても良い。

10

#### 【0103】

完全抗体分子と同様に、抗原結合断片は、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。抗体の多重特異性抗原結合断片は、通常少なくとも2つの異なる可変ドメインを含み、各可変ドメインは、別々の抗原に、又は同じ抗原上の異なるエпитープに特異的に結合することができる。本明細書中に開示した代表的な二重特異性抗体フォーマットを含む多重特異性抗体フォーマットの何れも、当該分野で利用可能な日常的な技術を使用して、本発明の抗体の抗原結合断片の文脈において使用するために適合させても良い。

20

#### 【0104】

本明細書で使用される用語「ヒト抗体」は、天然に存在しないヒト抗体を含むことを意図する。この用語は、非ヒト哺乳動物、又は非ヒト哺乳動物の細胞において組換え産生した抗体を含む。この用語は、ヒト被験体から単離した、又はヒト被験体において生成した抗体を含むことを意図していない。

#### 【0105】

本発明の抗体は、いくつかの実施形態では、組換えヒト抗体でも良い。用語「組換えヒト抗体」とは、本明細書中で使用する場合、組換え手段によって調製、発現、作製または単離する全てのヒト抗体を含むことを意図しており、その抗体とは、宿主細胞内にトランスフェクトした組換え発現ベクターを用いて発現した抗体(以下に更に記載する)、組換えコンビナトリアルヒト抗体ライブラリー(以下に更に記載する)から単離した抗体、ヒト免疫グロブリン遺伝子で遺伝子組換えした動物(例えば、マウス)から単離した抗体(例えば、Taylorら(1992)Nuc l . A c i d s R e s . 20:6287-6295を参照)又は、ヒト免疫グロブリン遺伝子配列を他のDNA配列へスプライシングしたものを含む他の何れかの手段により調製し、発現し、作製し又は単離した抗体等である。特定の実施形態では、そのような組換えヒト抗体は、インビトロ突然変異誘発(又は、ヒトIg配列の遺伝子組換え動物を使用する場合、インビボ体細胞突然変異誘発)に付し、従って、組換え抗体のV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖系列V<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>配列に関連はしながら、インビボでのヒト抗体生殖系列レパートリー内に天然には存在し得ない配列である。

30

40

#### 【0106】

ヒト抗体は、ヒンジ異質性に関連する2つの形態で存在し得る。1つの形態では、免疫グロブリン分子は、約150~160kDaの安定な4本鎖構築物を含み、ここで二量体は鎖間重鎖ジスルフィド結合により共に保持されている。第2の形態では、二量体は鎖間ジスルフィド結合を介して連結されず、軽鎖及び重鎖(半抗体)が共有結合した構成で、約75~80kDaの分子が形成される。これらの形態は、アフィニティ精製後でさえ、分離することが極めて困難であった。

#### 【0107】

様々な無処置のIgGアイソタイプにおける第2の形態の出現頻度は、抗体のヒンジ領域アイソタイプに関連する構造的差異に起因するが、これに限定する訳ではない。ヒトI

50

g G 4 ヒンジのヒンジ領域における単一のアミノ酸置換をすると、第 2 の形態 ( A n g a l ら ( 1 9 9 3 ) M o l e c u l a r I m m u n o l o g y 3 0 : 1 0 5 ) の出現は、ヒト I g G 1 ヒンジを用いて通常観察されるレベルまで顕著に低下させ得る。本発明は、ヒンジ、C<sub>H</sub>2 又は C<sub>H</sub>3 領域内に 1 箇所又はそれ以上の変異を有する抗体を包含し、生産上望ましく、例えば、所望の形態の抗体の収率を改善し得る。

【 0 1 0 8 】

本発明の抗体は、単離した抗体でも良い。本明細書で使用する「単離した抗体」とは、同定されたものであり、その自然環境の少なくとも 1 つの成分から、分離され及び / 又は回収された抗体を意味する。例えば、生命体の少なくとも 1 つの成分から、又は抗体が天然に存在するか又は天然に産生される組織又は細胞から分離又は除去された抗体は、本発明の目的のための「単離した抗体」である。単離した抗体は又、組換え細胞内のその場で抗体を含む。単離した抗体は、少なくとも 1 つの精製又は単離工程に供された抗体である。特定の実施形態によれば、単離した抗体は、他の細胞材料及び / 又は化学物質を実質的に含まないものとなり得る。

10

【 0 1 0 9 】

本明細書に開示する抗 - A N G P T L 8 抗体は、重鎖及び軽鎖可変ドメインのフレームワーク及び / 又は C D R 領域内に 1 つ又はそれ以上のアミノ酸の置換、挿入及び / 又は欠失を含み得る。そのような突然変異は、本明細書に開示されたアミノ酸配列を、例えば公的抗体配列データベースから入手可能な配列と比較することにより容易に確認することができる。1 つ又はそれ以上の突然変異を含む抗体及び抗原結合断片を一度得たならば、結合特異性の向上、結合親和性の増加、アンタゴニスト又はアゴニスト生物学的特性 ( 場合により ) の向上又は増強、免疫原性の低減など、の 1 つ又はそれ以上の所望する特性について、容易に試験することが出来る。この一般的方法で得られる抗体及び抗原結合断片は、本発明に包含される。

20

【 0 1 1 0 】

本発明は又、1 つ又はそれ以上の保存的置換を有する本明細書に開示した H C V R、L C V R、及び / 又は C D R アミノ酸配列の何れかの変異体を有する抗 - A N G P T L 8 抗体を含む。例えば、本発明は、例として、本明細書の表 1 に記載した H C V R、L C V R、及び / 又は C D R アミノ酸配列の何れかに関連する 1 0 個又はそれ未満、8 個又はそれ未満、6 個又は又はそれ未満、4 個又はそれ未満、等の保存的アミノ酸置換を備えた H C V R、L C V R、及び / 又は C D R アミノ酸配列を有する抗 - A N G P T L 8 抗体を含む。

30

【 0 1 1 1 】

本明細書で使用する「遮断抗体」又は「中和抗体」( 又は「A N G P T L 8 活性を中和する抗体」 ) とは、その抗体と A N G P T L 8 との結合及び / 又は相互作用が、A N G P T L 8 の少なくとも 1 つの生物活性の阻害をもたらすという意味を意図している。例えば、本発明の抗体は、A N G P T L 8 のリポタンパク質リパーゼ阻害活性を阻害し得るか、又は A N G P T L 8 の L P L 阻害活性の阻害を通じて行なう以外の機構により血漿トリグリセリドを低下させ得る。A N G P T L 8 の生物活性のこの阻害は、当技術分野で公知の数種の標準的なインビトロ又はインビボ試験の 1 種又はそれ以上による A N G P T L 8 の生物活性の 1 つ又はそれ以上の指標を測定することにより評価しても良い。活性が替わるのは、本発明の抗体に関連してトリグリセリドの活性を低下させるのである。

40

【 0 1 1 2 】

本明細書で使用する「表面プラズモン共鳴」又は「S P R」という用語は、バイオセンサーマトリックス内のタンパク質濃度の変化を検出することにより、生体分子相互作用の分析をリアルタイムで可能にする光学現象を意味し、例えば、B I A C O R E ( 登録商標 ) システム ( P h a r m a c i a B i o s e n s o r A B 社、U p p s a l a、S w e d e n 及び P i s c a t a w a y、N J ) 又は M A S S - 1 システム ( S i e r r a S e n s o r s 社、H a m b u r g、G e r m a n y 及び G r e e n v i l l e、R I ) を使用する。

【 0 1 1 3 】

50

本明細書で使用する「 $K_D$ 」という用語は、特定の抗体 - 抗原相互作用の平衡解離定数を意味することを意図している。

【0114】

「エピトープ」という用語は、パラトープとして知られる抗体分子の可変領域内の特異的抗原結合部位と相互作用する抗原決定基を意味する。単一の抗原は1個より多いエピトープを有し得る。従って、異なる抗体は、抗原上の異なる領域に結合し、異なる生物学的効果を有し得る。エピトープは、高次構造であるか又は線状のどちらでも良い。高次構造エピトープは、線状ポリペプチド鎖の異なるセグメントからのアミノ酸を空間的に並置することにより産生する。線状エピトープは、ポリペプチド鎖の中の隣接するアミノ酸残基により産生するエピトープである。特定の状況において、エピトープは、抗原上の糖、ホスホリル基又はスルホニル基の部分を含み得る。

10

【0115】

用語「実質的同一性」又は「実質的に同一の」は、核酸又はその断片に言及する場合、別の核酸（又はその相補鎖）と適切なヌクレオチド挿入又は欠失とを最適に整列する場合、例えば、以下で記述するが、FASTA、BLASTまたはGAP等の配列同一性についての周知のアルゴリズムの何れかによって測定されるように、ヌクレオチドを基準に少なくとも約95%、より好ましくは少なくとも約96%、97%、98%又は99%のヌクレオチド配列同一性があることを示す。参照とする核酸分子と実質的同一性を有する核酸分子は、ある場合には、参照核酸分子によりコードされたポリペプチドとして、同一又は実質的に類似のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードし得る。

20

【0116】

「実質的類似性」又は「実質的に類似」という用語は、ポリペプチドに適用する場合、2つのペプチド配列が、デフォルトのギャップ重量を用いるGAP又はBESTFITなどのプログラムにより最適に整列された場合、少なくとも95%の配列同一性、更により好ましくは少なくとも98%又は99%の配列同一性を有することを意味する。好ましくは、同一でない残基位置は、保存的アミノ酸置換により、異なる。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が、類似する化学的性質（例えば、電荷又は疎水性）を備えた側鎖（R基）を有する別のアミノ酸残基により置換されているものである。一般に、保存的アミノ酸置換は、タンパク質の機能的特性を実質的に変化させないものである。2つ又はそれ以上のアミノ酸配列が保存的置換により互いに異なる場合、配列同一性のパーセント又は類似性の程度を上方に調整して、置換の保存的性質を補正しても良い。この調整を行うための手段は、当業者に周知である。例えば、Pearson (1994) Methods Mol. Biol. 24: 307 - 331を参照のこと。これは参考として本明細書に取り込む。類似した化学的性質を備える側鎖を有するアミノ酸の群の例として、(1) 脂肪族側鎖であるグリシン、アラニン、バリン、ロイシン及びイソロイシン、(2) 脂肪族ヒドロキシル側鎖であるセリン及びスレオニン、(3) アミド含有側鎖であるアスパラギン及びグルタミン、(4) 芳香族側鎖であるフェニルアラニン、チロシン及びトリプトファン、(5) 塩基性側鎖であるリジン、アルギニン、及びヒスチジン、(6) 酸性側鎖であるアスパラギン酸塩及びグルタミン酸塩、及び(7) 硫黄含有側鎖としてはシステイン及びメチオニンを含む。好ましい保存的アミノ酸置換基は、バリン - ロイシン - イソロイシン、フェニルアラニン - チロシン、リジン - アルギニン、アラニン - バリン、グルタミン酸塩 - アスパラギン酸塩及びアスパラギン - グルタミンである。あるいは、保存的置換は、PAM250対数尤度（ゆうど）行列において正の値を有する任意の変化であり、Gonnetら、(1992) Science 256: 1443 - 1445、に開示されており、参考として本明細書に取り込む。「適度に保存的」な置換は、PAM250対数尤度行列において負ではない値を有する任意の変化である。

30

40

【0117】

ポリペプチドの配列類似性は、通常、配列分析ソフトを用いて測定する。タンパク質分析ソフトは、保存的アミノ酸置換を含む種々の置換、欠失及び他の変性に割り当てられた類似性の尺度を用いて類似の配列を比べる。例えば、GCGソフトは、デフォルトパラメ

50

ーターと共に使用出来るGAP及びBESTFITなどのプログラムを含み、異なる種の生物からの相同ポリペプチドのような密接に関連するポリペプチド間の、又は野生型タンパク質とその突然変異タンパク質の間の配列相同性又は配列同一性を決定する。例えば、GCGバージョン6.1を参照のこと。ポリペプチド配列も又、FASTAを使用して、デフォルト又は推奨のパラメーターと比較することができる。GCGバージョン6.1プログラムであるFASTA(例えば、FASTA2及びFASTA3)は、クエリー配列と検索配列(Pearson(2000)上掲)との間の最良重複領域の配列比較及びパーセント配列同一性を提供する。本発明の配列を、異なる生物からの多数の配列を含むデータベースと比較する場合の別の好ましいアルゴリズムは、デフォルトパラメータを使用するコンピュータプログラムBLAST、特にBLASTP又はTBLASTNである。例えば、Altschulら(1990)J. Mol. Biol. 215:403、410及び(1997)Nucleic Acids Res. 25:3389-402を参照のこと、その各々は参照として本明細書に取り込まれる。

10

#### 【0118】

語句「治療有効量」とは、それを投与するものに関して所望の効果を産み出す量を意味する。正確な量は、治療の目的に依存し、既知の技術(例えば、Lloyd(1999)The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compoundingを参照)を用いて当業者により確認し得るであろう。

#### 【0119】

20

本明細書で使用する「治療する」又は「治療」という用語は、有益な又は所望の臨床結果を得るための手法を意味する。本発明の一実施形態では、有益な又は所望の臨床結果としては、血中トリグリセリドレベルの改善、又は、高トリグリセリド血症等を含む、上昇したトリグリセリドレベルに関連するか、又はそれに起因する1つ又はそれ以上の状態、疾患又は症状の何れかの改善が含まれるが、これに限定される訳ではない。

#### 【0120】

##### pH依存性結合

本発明は、pH依存性の結合特性を有する抗-ANGPTL8抗体を含む。例えば、本発明の抗-ANGPTL8抗体は、中性のpHと比較したとき、酸性のpHではANGPTL8への結合の低下を示し得る。或いは、本発明の抗-ANGPTL8抗体は、中性のpHと比較して酸性のpHでのANGPTL8への結合の増強を示し得る。「酸性のpH」という表現は、約6.2未満のpH値、例えば、約6.0、5.95、5.9、5.85、5.8、5.75、5.7、5.65、5.6、5.55、5.5、5.45、5.4、5.35、5.3、5.25、5.2、5.15、5.1、5.05、5.0、又はそれ未満である。本明細書中で使用される表現「中性のpH」は、約7.0から約7.4のpHを意味する。「中性のpH」という表現は、約7.0、7.05、7.1、7.15、7.2、7.25、7.3、7.35、及び7.4のpH値を含む。

30

#### 【0121】

ある特定の例においては、「中性のpHと比較して酸性のpHでのANGPTL8への結合の低減」とは、酸性のpHでANGPTL8に結合する抗体のKD値と、中性のpHでANGPTL8に結合する抗体のKD値の比率の面から表現する(又はその逆)。例えば、抗体又はその抗原結合断片は、抗体又はその抗原結合断片の酸性/中性のKD比が約3.0又はそれ以上であるならば、本発明の目的のために「中性のpHと比較して酸性のpHではANGPTL8への結合が低減している」と見なし得る。特定の代表的な実施形態では、本発明の抗体又は抗原結合性断片の酸性/中性のKD比は、約3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0、10.5、11.0、11.5、12.0、12.5、13.0、13.5、14.0、14.5、15.0、20.0、25.0、30.0、40.0、50.0、60.0、70.0、100.0又はそれ以上である。

40

#### 【0122】

50

pH依存性結合特性を有する抗体は、例えば、中性のpHと比較して酸性のpHでの特定の抗原への結合を減少（又は増強）する抗体の集団をスクリーニングすることにより得ることができる。更に、アミノ酸レベルでの抗原結合ドメインの変性は、pH依存性特性を有する抗体を生じ得る。例えば、抗原結合ドメイン（例えば、CDR内）の1つ又はそれ以上のアミノ酸をヒスチジン残基で置換することにより、中性のpHに対して酸性のpHで抗原結合が低減する抗体を得ることができる。

#### 【0123】

Fc変異体を含む抗-ANGPTL8抗体

本発明の特定の実施形態によれば、FcRn受容体への抗体結合を、例えば中性のpHと比較して酸性のpHで増強又は低減する1つ又はそれ以上の突然変異を有するFcドメインを含む抗-ANGPTL8抗体を提供する。例えば、本発明は、FcドメインのCH2又はCH3領域に変異を有する抗-ANGPTL8抗体を含み、ここで変異は、酸性環境（例、pHは約5.5～約6.0の範囲にあるエンドソーム中）においてFcドメインのFcRnへの親和性を増加させる。そのような変異は、動物に投与した場合、抗体の血清半減期の増加をもたらす得る。そのようなFc変性の例としては、それに限定する訳ではないが、例えば、位置250での変性（例、E又はQ）、250及び428（例、L又はF）、252（例、L/Y/F/W又はT）、254（例、S又はT）、及び256（例、S/R/Q/E/D又はT）、位置428及び/又は433での変性（例、H/L/R/S/P/Q又はK）及び/又は434（例A、W、H、F又はY（N434A、N434W、N434H、N434F又はN434Y））、又は位置250及び/又は428での変性、又は位置307及び/又は308（例、308F、V308F）及び434位での変性を含む。一実施形態において、変性は、428L（例、M428L）及び434S（例、N434S）変性、428L、259I（例、V259I）及び308F（例、V308F）変性、433K（例、H433K）及び434（例、434Y）変性、252、254、及び256（例、252Y、254T、及び256E）の変性、250Q及び428L変性（例、T250Q及びM428L）、及び307及び/又は308の変性（例、308F又は308P）を含む。更に別の実施形態では、変性は、265A（例、D265A）及び/又は297A（例、N297A）変性を含む。

#### 【0124】

例えば、本発明は、250Q及び248L（例、T250Q及びM248L）252Y、254T、及び256E（例、M252Y、S254T及びT256E）、428L及び434S（例、M428L及びN434S）、257I及び311I（例、P257I及びQ311I）、257I及び434H（例、P257I及びN434H）、376V及び434H（例、D376V及びN434H）、307A、380A及び434A（例、T307A、E380A、及びN434A）、及び433K及び434F（例、H433K及びN434F）からなる群から選択される1つ又はそれ以上の対又は突然変異群を備えたFcドメインを有する抗-ANGPTL8抗体を含む。前述のFcドメイン突然変異、及び本明細書に開示した抗体可変ドメイン内の他の突然変異の可能な組み合わせは全て、本発明の範囲内であると企図している。

#### 【0125】

本発明は又、キメラ重鎖定常（CH）領域を有する抗-ANGPTL8抗体を含み、キメラCH領域は、1つより大きい免疫グロブリンアイソタイプのCH領域に由来するセグメントを含む。例えば、本発明の抗体は、ヒトIgG1、ヒトIgG2又はヒトIgG4分子に由来するCH2ドメインの一部又は全部を含むキメラCH領域を含み、ヒトIgG1、ヒトIgG2又はヒトIgG4分子由来のCH3ドメインの一部又は全部と組み合わせられている。特定の実施形態によれば、本発明の抗体は、キメラヒンジ領域を有するキメラCH領域を含む。例えば、キメラヒンジは、ヒトIgG1、ヒトIgG2又はヒトIgG4ヒンジ領域に由来する「下部ヒンジ」配列（EUナンバリングに従って228位～236位のアミノ酸残基）と組合せた、ヒトIgG1、ヒトIgG2又はヒトIgG4ヒンジ領域に由来する「上部ヒンジ」アミノ酸配列（EUナンバリングに従って216～227位の



アミノ酸残基)を含むことができる。特定の実施形態によれば、キメラヒンジ領域は、ヒトIgG1又はヒトIgG4上部ヒンジに由来するアミノ酸残基、及びヒトIgG2下部ヒンジに由来するアミノ酸残基を含む。特定の実施形態では、本明細書に記載のキメラC<sub>H</sub>領域を含む抗体は、抗体の治療的又は薬物動態学的特性に悪影響を及ぼすことなく、変性されたFcエフェクター機能を表すことができる。(例えば、2013年2月1日出願の米国仮特許出願第61/759、578号を参照のこと、この開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。

#### 【0126】

抗体の生物学的特性

本発明は、高い親和性でANGPTL8に結合する抗体及びその抗原結合断片を含む。例えば、本発明は、25又は37で表面プラズモン共鳴(SPR)による測定で約150nM未満のK<sub>D</sub>でヒト又はサルのANGPTL8に結合する抗-ANGPTL8抗体を含み、例えば、本明細書中の実施例3及び4に定義されている測定形式、又は実質的に類似の測定法を用いて、マウスIgG2a Fc C末端融合と共に組換えANGPTL8タンパク質を使用する。特定の実施形態によれば、ヒト又はサルのANGPTL8に結合する抗-ANGPTL8抗体を提供し、表面プラズモン共鳴(SPR)による測定により、例えば、本明細書中の実施例3及び4に定義されている測定形式、又は実質的に類似の測定形式で、そのK<sub>D</sub>は25又は37で約90nM未満、又は約50nM未満、約3nM未満、約2nM未満、約1nM未満、約900pM未満、約500pM未満、約300pM未満、約150pM未満、又は約90pM未満を有する。

#### 【0127】

本発明は又、ヒトANGPTL8のN末端領域に由来する配列番号337のペプチドに結合する抗体及びその抗原結合断片も含み、本明細書の実施例3で定義された測定形式又は実質的に同様の測定法を使用して、25又は37で表面プラズモン共鳴により測定したとき、約100分を超える解離半減期(t<sub>1/2</sub>)を有する。特定の実施形態によれば、ヒトANGPTL8のN末端領域に由来するペプチドと結合する抗-ANGPTL8抗体を提供し、本明細書の実施例3で定義された測定形式又は実質的に同様の測定法を使用して、25で表面プラズモン共鳴により測定したとき、そのt<sub>1/2</sub>は約110分と等しいか又はそれ以上、約120分超、約130分超、約200分超、約300分超、約400分超、約500分超、又はそれ以上を有する。

#### 【0128】

本発明は又、哺乳動物のトリグリセリドを低減する抗体及びその抗原結合断片を含み、皮下的に約0.1mg/kg、又は約1mg/kg、又は約10mg/kg、又は約25mg/kg、又は約50mg/kg、又は約100mg/kg、用量を投与したとき、その低減は、約20%、又は約30%、又は約40%、又は約50%、又は約60%又はそれ以上となる。本発明の抗体が血漿トリグリセリドの低減に及ぼす効果は、投与後少なくとも7日から投与後約3週間若しくは4週間、又はそれ以上持続し得る。

#### 【0129】

本発明の抗体は、配列番号が2、18、34、50、66、82、98、114、130、146、162、178、194、210、226、242、258、266、274、282、290、298、306、314及び330からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域(HCVR)を含み、及び、

配列番号が10、26、42、58、74、90、106、122、138、154、170、186、202、218、234、250、及び、322からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域(LCVR)を含み、又は参照抗体と交差競合しても良く、ここで、参照抗体は表1のHCVR及びLCVRアミノ酸配列の何れかからなる群から選択される重鎖可変領域(HCVR)及び軽鎖可変領域(LCVR)アミノ酸配列を含む。

#### 【0130】

本発明の抗体は、配列番号

2 / 10、18 / 26、34 / 42、50 / 58、66 / 74、82 / 90、98 / 106、114 / 122、130 / 138、146 / 154、162 / 170、178 / 186、194 / 202、210 / 218、226 / 234、242 / 250、258 / 250、266 / 250、274 / 250、282 / 250、290 / 250、306 / 250、314 / 322、及び330 / 322からなる群から選択されるH C V R / L C V R アミノ酸配列対を含み得る。

#### 【0131】

本発明の抗体は、

(a) 配列番号4、20、36、52、68、84、100、116、132、148、164、180、196、212、228、244、260、268、276、284、292、300、308、316及び332、からなる群から選択されるアミノ酸配を有するH C D R 1ドメイン、

10

(b) 配列番号6、22、38、54、70、86、102、118、134、150、166、182、198、214、230、246、262、270、278、286、294、302、310、318、及び334からなる群から選択されるアミノ酸配を有するH C D R 2ドメイン、

(c) 配列番号8、24、40、56、72、88、104、120、136、152、168、184、200、216、232、248、264、272、280、288、296、304、312、320及び336からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するH C D R 3ドメイン。

20

(d) 配列番号12、28、44、60、76、92、108、124、140、156、172、188、204、220、236、252及び324、からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するL C D R 1ドメイン、

(e) 配列番号14、30、46、62、78、94、110、126、142、158、174、190、206、222、238、254、及び326からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するL C D R 2ドメイン、及び

(f) 配列番号16、32、48、64、80、96、112、128、144、160、176、192、208、224、240、256及び328からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するL C D R 3ドメインを含む。

#### 【0132】

30

本発明の抗体は、前述の生物学的特性の1つ又はそれ以上、又はその組合わせの何れかを有し得る。本発明の抗体の生物学的特性の前述のリストは網羅的なものを意図してはいない。本発明の抗体の他の生物学的性は、本明細書の実施例を含む本開示の総説から当業者に明らかになるであろう。

#### 【0133】

エピトープマッピング及び関連技術

本発明の抗体が結合するエピトープは、ANGPTL8タンパク質の単一の連続する3個又はそれ以上(例、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20又はそれ以上)のアミノ酸配列を含む。或いは、エピトープは、ANGPTL8の複数の非連続アミノ酸(又はアミノ酸配列)からなり得る。

40

#### 【0134】

当業者に公知の様々な技術を用いて、抗体がポリペプチド又はタンパク質内の「1つ又はそれ以上のアミノ酸と相互作用する」か否かを決定することができる。代表的な技術としては、例えば抗体を記載する日常の交差遮断分析、Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press、Cold Spring Harb.、NY)、アラニンスキャニング変異分析、ペプチドプロット分析(Reineke、2004、Methods Mol Biol 248:443-463)、及びペプチド開裂分析が挙げられる。更に、抗原のエピトープ切除、エピトープ抽出及び化学変性などの方法を用いても良い(Tomer、2000、Protein Science 9:487-496)。抗体が相互作用するポリペプチド内のアミノ酸を同定するために用いるこ

50

とができる別の方法は、質量分析により検出する水素 / 重水素交換である。一般的に言えば、水素 / 重水素交換法は注目するタンパク質を重水素で標識し、続いて抗体を重水素標識タンパク質に結合させることを含む。次に、タンパク質 / 抗体複合体を水に移動し、抗体により保護された残基（重水素標識されたままである）を除くすべての残基で水素 - 重水素交換が起こるようにする。抗体が解離した後、標的タンパク質をプロテアーゼ切断及び質量分析にかけ、それにより抗体が相互作用する特異的のアミノ酸に対応する重水素標識残基を明らかにする。例えば、Ehring (1999) Analytical Biochemistry 267 (2) : 252 - 259、Engen及びSmith (2001) Anal. Chem. 73 : 256 A - 265 Aを参照のこと。

#### 【0135】

本発明は更に、本明細書に記載した特定の代表的な抗体（例えば、本明細書の表1に記載のアミノ酸配列の何れかを含む抗体）の何れかと同一のエピトープに結合する抗 - ANGP TL 8 抗体を含む。同様に、本発明は、ANGP TL 8 との結合について、本明細書に記載した特定の代表的な抗体（例えば、本明細書の表1に記載したアミノ酸配列の何れかを含む抗体）の何れかと競合する抗 - ANGP TL 8 抗体も含む。

#### 【0136】

当技術分野で公知であり本明細書に例示されている日常的な方法を使用することにより、抗体が参照抗 - ANGP TL 8 抗体と同じエピトープに結合するか、又はそれとの結合に競合するか否かを容易に決定することができる。例えば、試験抗体が本発明の参照抗 - ANGP TL 8 抗体と同一のエピトープに結合するかどうかを決定するために、参照抗体をANGP TL 8 タンパク質に結合させる。次に、試験抗体がANGP TL 8 分子に結合する能力を評価する。もし、試験抗体が、参照抗 - ANGP TL 8 抗体と飽和結合した後にANGP TL 8 に結合することが出来るならば、試験抗体は参照抗 - ANGP TL 8 抗体とは異なるエピトープに結合すると結論付けても良い。他方で、試験抗体が、参照抗 - ANGP TL 8 抗体と飽和結合した後にANGP TL 8 分子に結合することが出来ないならば、試験抗体は、本発明の参照抗 - ANGP TL 8 抗体により結合されたエピトープと同じエピトープに結合し得る。更なる日常的な実験（例えば、ペプチド変異および結合の分析）を、その後実施しても良く、試験抗体で観察された結合の欠如は、実際は、参照抗体と同じエピトープへの結合に起因するのか、又は立体的遮断（または別の現象）が観察された結合の欠如の原因であるかどうかを確認する。この種の実験は、ELISA、RIA、Biacore、フローサイトメトリー又は当技術分野で利用可能な他の何れかの定量的若しくは定性的抗体結合測定を用いて行うことができる。本発明の特定の実施形態によれば、もし、例えば、1つの抗体が1倍、5倍、10倍、20倍または100倍過剰で、競合的結合分析で測定したとき、他方の結合を少なくとも50%、然し好ましくは、75%、90%又は更に99%阻害するならば、2つの抗体は、同一の（または重複する）エピトープに結合している（例えば、Jung et al., Cancer Res. 50 : 1495 - 1502を参照のこと）。或いは、もし、片方の抗体の結合を低減又は排除する抗原中の本質的にすべてのアミノ酸変異が他方の抗体の結合を減少又は排除するならば、2つの抗体は同じエピトープに結合するとみなされる。1つの抗体の結合を低減又は排除するアミノ酸変異のサブセットのみが、他方の抗体の結合を減少又は排除するならば、2つの抗体は「重複エピトープ」を有するとみなされる。

#### 【0137】

抗体が参照抗 - ANGP TL 8 抗体との結合について競合する（又は結合について交差競合する）かどうかを決定するために、上記の結合方法論を2方向で実施する。第1の方向において、参照抗体を飽和条件下でANGP TL 8 タンパク質に結合し、続いて試験抗体のANGP TL 8 分子への結合の評価を行う。第2の方向において、試験抗体を飽和条件下でANGP TL 8 分子に結合し、続いて参照抗体のANGP TL 8 分子への結合の評価を行なう。両方向のうち、もし、第1（飽和）抗体のみがANGP TL 8 分子に結合する能力があるならば、試験抗体及び参照抗体はANGP TL 8 への結合について競合すると結論付けられる。当業者には理解されるように、参照抗体との結合について競合する抗

10

20

30

40

50

体は、必ずしも参照抗体と同じエピトープに結合する必要はないが、重複する若しくは近接するエピトープに結合することにより、参照抗体の結合を立体的に遮断し得る。

#### 【0138】

##### ヒト抗体の調製

本発明の抗-ANGPTL8抗体は、完全ヒト（非天然起源）抗体でも良い。完全ヒトモノクローナル抗体を含むモノクローナル抗体を生成する方法は、当技術分野で公知である。このような公知の方法の何れかを本発明の文脈中で使用して、ヒトANGPTL8に特異的に結合するヒト抗体を作製しても良い。

#### 【0139】

モノクローナル抗体を生成するための、VELOCIMMUNE（登録商標）技術（例えば、米国特許第6、596、541号、Regeneron Pharmaceuticals、VELOCIMMUNE（登録商標）を参照）または他の公知の何れかの方法を用いて、ヒト可変領域およびマウス定常領域を有するアレルゲンに対して高親和性のキメラ抗体を最初に単離する。VELOCIMMUNE（登録商標）技術は、抗原性刺激に応答したマウスが、ヒト可変領域およびマウス定常領域を有する抗体を産生するように、内因性マウス定常領域に作動可能に連結されたヒト重鎖および軽鎖可変領域を含むゲノムを有する遺伝子導入マウスの作製に関わる。次いで、完全ヒト抗体を発現可能な細胞中でDNAを発現させる。

10

#### 【0140】

一般に、VELOCIMMUNE（登録商標）マウスを注目する抗原に暴露し、抗体を発現したマウスからリンパ細胞（例えば、B細胞）を回収する。リンパ細胞をミエローマ細胞株と融合させて不死化ハイブリドーマ細胞株を調製しても良く、そのようなハイブリドーマ細胞株をスクリーニングし、選択し、注目する抗原に特異的な抗体を産生するハイブリドーマ細胞株を同定する。重鎖及び軽鎖の可変領域をコードするDNAを単離し、重鎖及び軽鎖の所望のアイソタイプ定常領域に連結しても良い。このような抗体タンパク質は、CHO細胞などの細胞内で産生しても良い。或いは、抗原特異的キメラ抗体又は軽鎖及び重鎖の可変ドメインをコードするDNAを、抗原特異的リンパ球から直接単離しても良い。

20

#### 【0141】

以下の実験の項に記載するように、ヒト可変領域及びマウス定常領域を有する高親和性のキメラ抗体を単離し、特性を決定し、親和性、選択性、エピトープ等の望ましい特性について選択する。次いで、マウス定常領域を所望のヒト定常領域と置き換えて、本発明の完全ヒト抗体、例えば野生型、即ち変性IgG1又はIgG4を生成させる。選択される定常領域は特定の用途に応じて変化し得るが、高親和性抗原結合及び標的特異特性は可変領域に存在する。

30

#### 【0142】

一般に、本発明の抗体は、固体相上に又は溶液相内の何れかの抗原に固定化される結合により測定するとき、非常に高い親和性を有し、通常、約 $10^{-12}$ から約 $10^{-9}$ Mの $K_D$ を有する。

#### 【0143】

##### 生物学的同等性

本発明の抗-ANGPTL8抗体および抗体断片は、アミノ酸配列を有するタンパク質を包含し、記述された抗体のものとは異なるが、ヒトANGPTL8に結合する能力を保持している。このような変異体抗体及び抗体断片は、親配列と比較してアミノ酸の1個又はそれ以上の付加、欠失又は置換を含むが、記載された抗体のものと本質的に同等の生物学的活性を示す。同様に、本発明の抗-ANGPTL8抗体をコードするDNA配列は、開示された配列と比較してヌクレオチドの1個又はそれ以上の付加、欠失又は置換を含むが、抗-ANGPTL8抗体又は抗体断片をコードする配列を包含し、それは、本発明の抗-ANGPTL8抗体又は抗体断片と本質的に生物学的に同等である。そのような変異体アミノ酸及びDNA配列の例は上記で議論した。

40

50

## 【 0 1 4 4 】

2種の抗原結合タンパク質又は抗体は、例えば、類似した実験条件下で同じモル用量で、単回用量か多数回用量のどちらかを、投与したとき、その吸収速度及び程度が顕著な差を示さず、医薬的等価物又は医薬的代替物であるならば、生物学的同等であると見做す。いくつかの抗体は、たとえ、吸収の程度は同等であるが、吸収速度は同等ではなくても、同等又は医薬的に代替的であると見做し、及び、その吸収速度の差異は意図的であり、標識に反映されていて、例えば慢性的な使用に対して、有効な身体薬物濃度の達成に必須ではなく、かつ、研究している特定の医薬製品について医学的に重要ではないとみなされるため、生物学的に同等であるとみなしても良い。

## 【 0 1 4 5 】

一実施形態では、2つの抗原結合タンパク質は、その安全性、純度、及び効力において臨床的に有意な差異がない場合、生物学的に同等である。

## 【 0 1 4 6 】

一実施形態において、患者が、切替えをしない継続的な治療と比較して、臨床的に顕著な免疫原性の変化又は有効性の低下等、予想される悪影響のリスクが増加することなく、参照生成物と生物学的生成物とを1回又はそれ以上の回数切替えることが出来るならば、2つの抗原結合タンパク質は、生物学的に同等である。

## 【 0 1 4 7 】

一実施形態では、もし、2つの抗原結合タンパク質の両方が、条件又は使用条件のために、共通のメカニズムまたは作用メカニズムによって、そのメカニズムで知られている程度迄、作用する場合、2つの抗原結合タンパク質は生物学的に同等である

## 【 0 1 4 8 】

生物学的同等性は、インビボ及びインビトロの方法により実証しても良い。生物学的同等性の測定には、例えば、(a)抗体またはその代謝産物の濃度を血液、血漿、血清または他の生物学的液体中で時間の関数として測定する、ヒトまたは他の哺乳動物におけるインビボ試験(b)ヒトインビボでの生物学的利用能のデータと相関し、かつ、合理的に予測するインビトロ試験；(c)抗体(またはその標的)の適切な急性薬理学的効果を時間の関数として測定するヒトまたは他の哺乳動物におけるインビボ試験、及び(d)抗体の安全性、有効性、または生物学的利用能または生物学的同等性を確立する、十分に制御された臨床試験などを含む。

## 【 0 1 4 9 】

本発明の抗-ANGPTL8抗体の生物学的同等変異体は、例えば、残基又は配列の種々の置換を作製することにより、又は生物学的活性に不必要な末端又は内部残基もしくは配列を欠失させることにより構築しても良い。例えば、生物学的活性にとって必須ではないシステイン残基を、欠失させ、又は他のアミノ酸で置き換えて、再生の際に不必要若しくは不正確な分子内ジスルフィド架橋の形成を防止しても良い。他の状況において、生物学的同等抗体は、抗体のグリコシル化特性を変性するアミノ酸変化、例えばグリコシル化を排除又は除去する変異を含む抗-ANGPTL8抗体変異体を含んでも良い。

## 【 0 1 5 0 】

## 多重特異性抗体

本発明の抗体は、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。多重特異性抗体は、1つの標的ポリペプチドの異なるエピトープに特異的であり得るか、又は一つより多い標的ポリペプチドに特異的な抗原結合ドメインを含み得る。多重特異性抗体は、1つの標的ポリペプチドの異なるエピトープに特異的であり得るか、又は一つより多い標的ポリペプチドに特異的な抗原結合ドメインを含み得る。例えば、Tuttlら、1991、J. Immunol. 147: 60-69、Kuferrら、2004、Trends Biotechnol. 22: 238-244を参照。本発明の抗-ANGPTL8抗体は、別の機能性分子、例えば、別のペプチド又はタンパク質に連結するか、又はそれらと同時発現させることができる。例えば、抗体又はその断片は、別の抗体又は抗体断片などの1つ又はそれより多い他の分子実体に機能的に(例えば、化学的カップリング、遺

10

20

30

40

50

伝子融合、非共有結合的会合又は他の方法により)結合されて、第二の結合特異性を有する二重特異性又は多重特異性抗体を産生する。

#### 【0151】

本発明は、免疫グロブリンの片方のアームがヒトANGPTL8に結合し、かつ、免疫グロブリンの他方のアームが第2の抗原に特異的である二重特異性抗体を含む。ANGPTL8結合アームは、本明細書の表1に記載のHCVR/LCVR又はCDRアミノ酸配列の何れかを含んでも良い。

#### 【0152】

本発明の文脈で使用出来る代表的な二重特異性抗体形式は、第1の免疫グロブリン(Ig)CH3ドメイン及び第2のIgC3ドメインの使用を含み、ここで第1及び第2のIgC3ドメインは互いに少なくとも1つのアミノ酸が異なり、かつ少なくとも1つのアミノ酸の差異が、アミノ酸の差異を欠いた二重特異性抗体と比較して、二重特異性抗体のタンパク質Aへの結合を低下させる。一実施形態では、第1のIgCH3ドメインはプロテインAに結合し、第2のIgCH3ドメインはH95R変性(エクソンナンバリングIMGT、EUNANバリングによるH435R)のようなプロテインA結合を低減又は消滅する変異を含む。第2のCH3は、更にY96F変性(IMGTによる、EUによるY436F)を含み得る。更に、第2のIgCH3ドメイン内で見出される変性としては、IgG1抗体の場合、D16E、L18M、N44S、K52N、V57M、及びV82I(IMGTによる、D356E、L358M、N384S、K392N、V397M、and V422I by EU)、IgG2抗体の場合、N44S、K52N、及びV82I(IMGTによる N384S、K392N、及びEUによるV422I)、IgG4抗体の場合、Q15R、N44S、K52N、V57M、R69K、E79Q、及びV82I(IMGTによる、Q355R、N384S、K392N、V397M、R409K、E419Q、及びEUによるV422I)を含む。上記の二重特異性抗体形式についての変形は、本発明の範囲内であると企図している。

#### 【0153】

本発明の文脈において使用出来る他の代表的な二重特異的形式としては、これに限定する訳ではないが、例えば、scFvベース又はダイアボディ二重特異性形式、IgG-scFv融合体、二重可変ドメイン(DVD)-Ig、四倍体(Quadroma)、ノブと穴(knobs-into-holes)、共通の軽鎖(例、ノブと穴等を有する共通の軽鎖等)CrossMab、CrossFab、(SEED)body、ロイシンジッパー、Duobody、IgG1/IgG2、二重作用Fab(DAF)-IgG、及び、Mab<sup>2</sup>二重特異的形式(例えば、Kleiner、2012、mAbs 4:6、1-11、および、前述の形式の総説のための引用文献を参照)。二重特異性抗体は、ペプチド/核酸複合体を用いて構築することも出来、ここで、例えば直交化学反応性を有する非天然アミノ酸を用いて、部位特異的抗体-オリゴヌクレオチド複合体を生成し、ついで、それを自己組織化して、所定の組成、価数及び幾何学的構造を有する多量体複合体とする。(例えば、Kazaneら、J. Am. Chem. Soc. [Epub: Dec. 4, 2012] 参照)

#### 【0154】

##### 治療上の製剤及び投与

本発明は、本発明の抗-ANGPTL8抗体又はその抗原結合断片を含む医薬組成物を提供する。本発明の医薬組成物は、適切な担体、賦形剤、及び移送、送達、耐用性などを改善して付与する他の薬剤と共に製剤する。適切な製剤の多くは、すべての医薬品化学者に知られている処方集、Remington's Pharmaceutical Sciences、Mack Publishing Company、Easton、PA、の中に見出すことができる。これらの製剤としては、例えば、粉末、ペースト、軟膏、ゼリー、ワックス、油、脂質、脂質(カチオン性又はアニオン性)含有小胞(LIPOFECTIN(登録商標)、Life Technologies社、Carlsbad、CA)、DNA複合体、無水吸収ペースト、水中油型及び油中水型エマルジョン、エマルジョ

10

20

30

40

50

ンカルボワックス（種々の分子量のポリエチレングリコール）、半固体ゲル及びカーボワックスを含有する半固体混合物が挙げられる。Powellら“Compendium of excipients for parenteral formulations” PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311。も参照のこと。

#### 【0155】

患者に投与される抗体の用量は、患者の年齢及び体格、標的疾患、状態、投与経路などに依存して変動し得る。好ましい用量は、通常、体重又は体表面積に従って計算される。成人患者では、本発明の抗体を、通常、単回用量で静脈内に、約0.01～約20mg/kg体重、より好ましくは約0.02～約7、約0.03～約5、又は約0.05～約3mg/kg体重を投与することが有利であり得る。状態の重症度に応じて、治療の頻度及び期間を調節しても良い。抗-ANGPTL8抗体を投与するための有効な投薬量及びスケジュールは経験的に決定して良く、例えば、患者の進行を定期的な評価により監視し、それに応じて用量を調整しても良い。更に、用量の種間スケールは、当該分野で周知の方法を用いて行っても良い（例、Mordentiら、1991、Pharmaceut. Res. 8:1351）。

10

#### 【0156】

様々な送達系が知られており、例えば、リボソームの中にカプセル化、微粒子、マイクロカプセル、突然変異ウイルスを発現し得る組換え細胞、受容体媒介エンドサイトーシス（例えば、Wuら、1987、J. Biol. Chem. 262:4429-4432参照のこと）。導入方法としては、真皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻腔内、硬膜外及び経口経路が挙げられるが、これらに限定する訳ではない。組成物は、好都合な何れかの経路、例えば、注入又は大量投与、上皮又は粘膜皮膚内層（例えば、口腔粘膜、直腸及び腸粘膜など）による吸収により投与することが出来、他の生物学的に活性な薬剤と共に投与することが出来る。投与は全身又は局所でも良い。

20

#### 【0157】

本発明の医薬組成物は、標準針及び注射器を用いて皮下又は静脈内に送達することができる。更に、皮下送達に関して、ペン型送達装置は、本発明の医薬組成物の送達に容易に適用できる。このようなペン型送達装置は、再使用可能又は使い捨て可能である。再使用可能なペン型送達装置は、一般に、医薬組成物を含んだ交換可能なカートリッジを使用する。カートリッジ内の医薬組成物の全てを一端、投与し、カートリッジが空になると、空のカートリッジの廃棄は容易であり、医薬組成物を含む新しいカートリッジと交換する。次いで、ペン型送達装置を再使用することができる。使い捨てペン型搬送装置には、交換可能なカートリッジはない。むしろ、使い捨てペン型送達デバイスは、デバイス内のリザーバに保持された医薬組成物が予め充填されて届く。リザーバの医薬組成物が空になると、装置全体を廃棄する。

30

#### 【0158】

多数の再使用可能なペン及び自己注入送達装置が、本発明の医薬組成物の皮下送達に適用される。例としては、AUTOPEN（登録商標）（Owen Mumford、Inc. Woodstock、UK）、DISETRONIC（登録商標）ペン（Disetronic Medical Systems、Bergdorf、Switzerland）、HUMALOG MIX75/25（登録商標）ペン、HUMALOG（登録商標）ペン、HUMALIN 70/30（登録商標）ペン（Eli Lilly and Co.、Indianapolis、IN）、NOVOPEN（登録商標）I、II及びIII（Novo Nordisk、Copenhagen、Denmark）、NOVOPEN JUNIOR（登録商標）（Novo Nordisk、コペンハーゲン、デンマーク）、BD（登録商標）ペン（Becton Dickinson、Franklin Lakes、NJ）、OPTIPEN（登録商標）、OPTIPENPRO（登録商標）、OPTIPENSTARLET（登録商標）、及びOPTICLIK（登録商標）（Sanofi-Aventis、Frankfurt、Germany）等を挙げられるが

40

50

、これらほんの少数の名称に限定する訳ではない。本発明の医薬組成物を皮下に送達するために適用する使い捨てペン型送達装置の例としては、SOLOSTAR（登録商標）ペン（Sanofi - Aventis）、FLEXPEN（登録商標）（NovoNordisk）、及びKWIKPEN（登録商標）（Eli Lilly）、SURECLICK（登録商標）Autoinjector（Amgen、Thousand Oaks、CA）、PENLET（登録商標）（Haselmeier、Stuttgart、Germany）、EPIPEN（Dey、LP）及びHUMIRA（登録商標）Pen（Abbott Labs、Abbott Park IL）等を挙げられるが、これらほんの少数の名称に限定する訳ではない。

#### 【0159】

ある状況では、医薬組成物は制御放出系で送達することができる。一実施形態では、ポンプを使用しても良い（Langer、上記、Sefton、1987、CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201参照）。別の実施形態では、ポリマー材料を使用しても良く、Medical Applications of Controlled Release、Langer and Wise (eds.)、1974、CRC Pres.、Boca Raton、Florida. を参照のこと。更に別の実施形態では、制御放出系を組成物が標的とする近傍に配置することができるので、全身投与量の一部しか必要としない（例えば、Goodson、1984、Medical Applications of Controlled Release、pp. 115 - 138参照）。他の制御放出系は、Langer、1990、Science 249:1527 - 1533の総説で議論されている。

#### 【0160】

注射可能な製剤は、静脈内、皮下、皮内及び筋肉内注射用、点滴剤等の剤形を含み得る。これらの注射用製剤は、公知の方法により調製し得る。例えば、注射用製剤は、上記記載の抗体又はその塩を、注射用に従来使用している滅菌水性媒体又は油性媒体に溶解し、懸濁し又は乳化することにより、調製し得る。注射用水性媒体としては、例えば、生理食塩水、グルコースを含有する等張化剤、その他の補助剤等が挙げられ、適当な可溶化剤、例えばアルコール（例、エタノール）、多価アルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）非イオン性表面活性剤（例、ポリソルベート80、HCO - 50（水添ヒマシ油のポリオキシエチレン（50モル）付加物）等が挙げられる。油性媒体としては、例えば、ゴマ油、大豆油等を用い、可溶化剤、例えば安息香酸ベンジル、ベンジルアルコール等と組合わせて使用しても良い。このようにして調製した注射剤は、適切なアンプルに充填するのが好ましい。

#### 【0161】

有利には、上記記載の経口又は非経口に使用するための医薬組成物は、有効成分の用量に適合するのに適した単位用量の剤形に調製される。単位用量の剤形としては錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、坐剤などが挙げられる。前記抗体の含有量は、単位用量中で剤形当たり、通常約5～約500mgであり、特に注射の形態では、上記の抗体は、約5～約100mg及び他の剤形については約10～約250mg含まれることが好ましい。

#### 【0162】

##### 免疫接合体

本発明は、血中トリグリセリドレベル又は脂質を低下させる能力を有する薬剤等の治療部分に接合したヒト抗 - ANGPTL8モノクローナル抗体（「免疫接合体」）を包含する。抗 - ANGPTL8抗体に接合し得る治療部分の型は、治療される状態及び達成すべき所望の治療効果を考慮する。例えば、高トリグリセリド血症、又はそれにより血中トリグリセリドを低下させること及び/又は正常な血中トリグリセリドレベルを維持することが望ましい他の何れかの状態を治療するために、薬剤をANGPTL8抗体に接合させても良い。或いは、所望する治療効果が、高トリグリセリド血症に関連する続発症若しくは病徴の治療、又は血中トリグリセリドレベルが高いか若しくは制御出来なくなっている



ことに起因する他の何れかの状態を治療することにある場合、状態の続発症又は病徴を治療するのに適する薬剤を接合させるのは有利であり得る。免疫接合体を形成するのに適した薬剤の例は、当該分野で公知であり、例えば、国際特許公開第05/103081号を参照されたい。

#### 【0163】

抗体の治療的使用

本発明の抗体は、例えば、高トリグリセリド血症を患う患者において、またANGPTL8の活性を阻害することが有益である状態及び障害の広範囲な治療のために、血中トリグリセリドレベルを低下させるのに有用である。従って、抗体は、例えば、内分泌系、中枢神経系、末梢神経系、心血管系、肺系、及び消化器管系の疾患又は状態又は付随する病徴若しくは後遺症を予防、治療、又は緩和するための使用を、現在の治療に伴う望ましくない副作用の1つ又はそれ以上を低減及び/又は排除しながら、見出し得る。

10

#### 【0164】

本発明の抗体を、疾患の治療又は予防に使用しても良く、例えば、これに限定する訳ではないが、脂質代謝を伴うもの、例えば、高脂血症、高リポ蛋白血症および異常脂質血症、例えば、アテローム発生性異脂肪血症、糖尿病性異脂肪血症等、TG > 1000 mg/dLの重症高トリグリセリド血症およびこれに伴う急性膵炎を含む、高トリグリセリド血症、高コレステロール血症、カイロミクロン血症、混合異脂肪血症（肥満、メタボリック症候群、糖尿病など）脂肪異栄養症、脂肪組織萎縮症、等が挙げられ、これらは、例えば、LPL活性および/またはLPL欠損の減少、ApoC2の変化、ApoEの欠損、ApoBの増加、超低密度リポタンパク質（VLDL）の産生の増加および/または消失の減少、特定の薬物による治療（例えば、グルココルチコイド治療誘発性異常脂質血症）、遺伝的素因、食事、生活様式などの何れかを挙げられる。

20

#### 【0165】

本発明の方法では又、トリグリセリド血症、高トリグリセリド血症、高脂血症、高リポタンパク血症及び/又は異常脂質血症に関連するか又はそれに起因する、動脈瘤、高血圧、狭心症、脳卒中、脳血管疾患、うっ血性心不全、冠動脈疾患、心筋梗塞、末梢血管疾患等の治療、急性膵炎、非アルコール性脂肪性肝炎（NAFLD）、糖尿病（例えば、II型糖尿病）のような血糖障害、肥満などを含む、疾患又は障害を予防又は治療することができ、これに限定する訳ではない。

30

#### 【0166】

一実施形態では、本発明の少なくとも1つの抗体又はその抗原結合断片は、メタボリック症候群に関連する異常脂質血症、肥満を治療するために、又は体重増加を予防するために、又は正常な体重を維持するために使用し得る。

#### 【0167】

一実施形態では、本発明は、血中トリグリセリドレベルを低下させるための、又は高血中トリグリセリドレベルに関連するか、又はその一部を特徴とする状態又は疾患、又はその状態又は疾患に関連する少なくとも1つの症状若しくは合併症を治療するための方法を提供し、その方法とは、表1のヒトANGPTL8に特異的な1つ又はそれ以上の抗体を含む医薬組成物を、それを必要とする患者に投与して、血中トリグリセリドレベルを低下させるか、又はその状態又は疾患が媒介させるか、又は、少なくとも1つの症状又は、状態若しくは疾患に関連する合併症の重症度が緩和又は軽減させることを含む。

40

#### 【0168】

一実施形態では、本発明の少なくとも1つの抗体又はその抗原結合断片は、単独で、又は第2若しくは第3の治療剤と組合わせて、高トリグリセリド血症又は高トリグリセリド血症に関連する少なくとも1つの症状を治療するために、又は、高トリグリセリド血症を発症する危険性のある患者、例えば、高トリグリセリド血症を発症する遺伝的素因を有する患者、例として、家族性高トリグリセリド血症若しくは家族性異常リポタンパク血症、を治療するために使用し得る。

#### 【0169】

50

他の状態では、患者を高レベルのトリグリセリドにかかりやすくする可能性がある。例えば、ベータ遮断薬、避妊薬、利尿薬、ステロイド、又はタモキシフェンの使用など、特定の薬物は、トリグリセリドのレベルの上昇をもたらし、その結果、患者は、高レベルのトリグリセリドに関連する状態または合併症例えば、アテローム性動脈硬化症、脳卒中、心臓発作、及び他の心臓病を発症する可能性が高まる可能性がある。

【0170】

更に、ある種の他の状態は、肥満、制御不能な糖尿病、甲状腺機能低下症、腎臓疾患又はアルコール摂取を含む、高レベルのトリグリセリドを誘引し得る。

【0171】

一実施形態において、抗体は、上昇した血中トリグリセリドレベルにより部分的に特徴付けられる疾患若しくは障害の発症を予防するため、又はそのような疾患若しくは障害を発症する可能性を防止するため、又は疾患若しくは障害の重篤度、又は、その疾患若しくは障害に関連する少なくとも1つの症状を緩和するために使用し得る。本発明の抗体は、単独で、又は、他の薬剤若しくは方法との補助療法として使用し得ることを想定しており、それに限定する訳ではないが、それは、上昇した血中トリグリセリドレベルにより部分的に特徴付けられる、高トリグリセリド血症等の疾患又は状態を患っている患者を治療するための標準治療として知られている。このような標準的な療法は、流体投与、又は血液中中性脂肪又は脂質の低下に、又は体重減量のために有用な他の何れかの薬剤の投与を含み得る。

【0172】

一実施形態では、本明細書に記載の抗体の使用は、正常なレベルのトリグリセリドを達成するために効果的な手段であり、それにより高トリグリセリドにより特徴付けられる疾患に関連する1つ以上の症状又は長期の合併症を寛解又は予防し得る。

【0173】

本発明の抗体は、急性診療（短期使用のため）又は長期（慢性）使用に使用され得ることが想定される。

【0174】

併用療法

併用療法は、本発明の抗-ANGPTL8抗体と、本発明の抗体と共に、又は本発明の抗体の生物学的に活性な断片と共に、組合わせて有利になり得る何れかの追加的添加薬剤とを含んでも良い。

【0175】

例えば、本発明の抗体が、高トリグリセリド血症のような上昇したトリグリセリドレベルにより部分的に特徴付けられる疾患又は状態を治療する際に使用することを企図する場合、第2の治療薬を用いて、トリグリセリドレベルのさらなる低下を補助し、又は高血中トリグリセリドレベルにより特徴付けられる疾患又は状態に罹患している患者における少なくとも1つの症状を軽減しても良い。このような第2の薬剤は、例えば、別のANGPTL8アンタゴニスト（例、別の異なる抗-ANGPTL8抗体又はANGPTL8の小分子阻害剤）から選択しても良いし、又は、トリグリセリド血症、又は上昇した血中トリグリセリドレベルに関連するか、若しくはそれに起因する他の疾患または状態の治療に有用な、他の治療部分、又は、上昇した及び/又は制御されていない血中トリグリセリドレベルに関連する長期の合併症の何れかの治療に有用な薬剤を含んでも良い。

【0176】

関連する実施形態では、本発明は、本発明の特徴は抗体又はその抗原結合断片と、第2の治療剤とを組合せた組成物であり、第2の治療剤としては

（1）3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル補酵素A（HMG-CoA）レダクターゼ阻害剤、例えば、セリバスタチン、アトルバスタチン、シンバスタチン、ピタバスタチン、ロスバスタチン、フルバスタチン、ロバスタチン、プラバスタチン等、

（2）コレステロール摂取及び/又は胆汁酸の再吸収阻害剤、

（3）リポタンパクの異化を増加させるナイアシン、

10

20

30

40

50

(4) 低密度リポタンパク質 (LDL) レベルを低下させ、高密度リポタンパク質 (HDL) 及び TG レベルを改善し、非致死性心臓発作の回数を低減するフィブラート又は両親媒性カルボン酸、及び

(5) 22-ヒドロキシコレステロール又は固定された組み合わせ、例えば、エゼチミブとシンバスタチン、スタチンと胆汁レジン (例、コレステラミン、コレステポール、コレセベラム)、ナイアシンとスタチン (例えば、ナイアシンとロバスタチン) の固定された組み合わせ、又はオメガ-3-脂肪酸エチルエステル (例えば、オマコール) のような他の脂質低下剤と組み合わせ等のコレステロール排除において、役割を果たす LXR 転写因子の活性化剤を挙げられる。

#### 【0177】

更に、第2の治療剤は、グルカゴンの1つ又はそれ以上の他の阻害剤/アンタゴニスト、又はグルカゴン受容体の阻害剤/アンタゴニスト、並びにANGPTL8の他の阻害剤のような他の分子の阻害剤、並びにANGPTL3、ANGPTL4、ANGPTL5、ANGPTL6、アポリポタンパク質C-III (APOC3とも称され、例えば米国特許第8530439号、米国特許第7750141号、米国特許第7598227号に記載されたAPOC3の阻害剤及びボラネソーセン、又、ISIS-APOCIII Rxとも称す) のような他の分子の阻害剤及び、脂質代謝、特にコレステロール及び/又はトリグリセリドの恒常性に関与するプロタンパク質転換酵素サブチリシン/ケキシнтаイプ9 (PCSK9) であっても良い。これらの分子の阻害剤には、小分子、アンチセンス分子、及びこれらの分子に特異的に結合し、その活性を遮断する抗体を含む。

#### 【0178】

一実施形態では、本発明の抗ANGPTL3抗体を糖尿病 (例えば、2型糖尿病) のような疾患の治療に使用する場合、これらの抗体は、現在入手可能な以下の糖尿病治療の1つ又はそれ以上と合わせて使用しても良い。それを以下に挙げると、インスリン、インスリン類似体 (下記参照)、ピグアニド (メトホルミン)、スルホニルウレア (例えばグリブライド、グリピジド)、PPARガンマアゴニスト (例えば、ピオグリタゾン、ロシグリタゾン) アルファグルコシダーゼ阻害剤 (例えば、アカルボース、ボグリボース)、グルカゴン様ペプチド1 (GLP-1) 受容体アゴニスト (例えば、BYETTA (登録商標) (エクセナチド)、TRULICITY (登録商標) (ジュラグルチド)、VICTOZA (登録商標) (リラグルチド)、LYXUMIA (登録商標) (リキシセナチド)、TANZEUM (登録商標) (アルピグルチド)、又は前記の何れかの類似体、ジペプチジルペプチダーゼIV (DPP-4) 阻害剤 (例えばサクサグリプチン (ONGLYZA (登録商標))、シタグリプチン (JANUVIA (登録商標)) 及びビルダグリプチン (GALVUS (登録商標))、ナトリウム-グルコース共輸送体2 (SGLT2) 阻害剤 (例えば、INVOKANA (登録商標) (カナグリフロジン)、FORXIGA (登録商標) (ダパグリフロジン) エンパグリフロジン、イブラグリフロジン、トホグリフロジン)、SYMLIN (登録商標) (プラムリンチド)、グルカゴン受容体アンタゴニスト (例えば、米国特許第8545847号に記載のような)、及びグルカゴンアンタゴニスト、である。

#### 【0179】

いくつかの関連する実施形態では、組成物は、非スルホニルウレア分泌促進薬、インスリン類似体 (例えば、速効型リスプロ、アスパルト、グルリシン及び長時間作用型インスリンデテミル、インスリンデグルデク、グラルジンインスリン)、エキセンディン-4ポリペプチド、3アドレナリン受容体アゴニスト、コレステロール摂取および/または胆汁酸再吸収の阻害剤、LDL-コレステロールアンタゴニスト、コレステリルエステル伝達タンパク質アンタゴニスト (例えば、トルセトラピブ、アナセトラピブ、ダルセトラピブ、またはエバセトラピブ)、エンドセリン受容体アンタゴニスト、成長ホルモンアンタゴニスト、インスリン感作物質、アミリン模倣物またはアゴニスト、カンナビノイド受容体アンタゴニスト、グルカゴン様ペプチド-1受容体アゴニスト、メラノコルチン、メラニン凝集ホルモン受容体アゴニスト、SNRI、線維芽細胞増殖因子21 (FGF21)

模倣物、(例えば、米国特許公開第20110002845号及び米国特許公開第20080261236号を参照)線維芽細胞増殖因子受容体1c(FGFR1c)アゴニスト(例えば、米国特許公開第20110150901号参照)、高度に糖化した最終生成物形成、限定する訳ではないが、例えば、アミノグアニジンの阻害剤、及びタンパク質チロシンホスファターゼ阻害剤、からなる群から選択した、第2の薬剤を含んでも良い。

【0180】

関連する実施形態では、第2の治療剤は、鎮痛剤、Cox-2阻害剤のような非ステロイド系抗炎症薬(NSAID)を含む抗炎症剤等、1つ又はそれ以上の他の治療剤で、必要に応じて、根底にある状態に随伴する症状を寛解及び/又は軽減しても良い。

【0181】

追加の治療活性成分は、本発明の抗-ANGPTL8抗体の投与前、投与と同時に、又は投与後に投与しても良い。本開示の目的にとり、そのような投与レジメンは、第2の治療有効成分と「組合わせた」抗-ANGPTL8抗体の投与と見なす。

【0182】

投与レジメン

本発明の特定の実施形態によれば、抗-ANGPTL8抗体(又は抗-ANGPTL8抗体と本明細書中に記載する追加的治療活性剤の何れかの組合わせを含む医薬組成物)の多数回用量では、規定の時間経過を超えて被験者に投与しても良い。本発明のこの態様による方法は、本発明の抗-ANGPTL8抗体を多数回用量で被験体に経時的に投与することを含む。本明細書中で使用する「順次に投与する」とは、抗-ANGPTL8抗体の各々の用量を、異なる時点、例えば、異なる別の日に所定の間隔(例えば、数時間、数日、数週間又は数ヶ月)で被験体に投与することを意味する。本発明は、患者に、順次に投与をする方法を含み、その方法とは抗-ANGPTL8抗体を初回に単回投与し、続いて、抗-ANGPTL8抗体を1回又はそれ以上、二次投与し、次いで場合により、抗-ANGPTL8抗体を1回又はそれ以上、3次投与することを含む。

【0183】

用語「初回用量」、「二次用量」及び「三次用量」とは、本発明の抗-ANGPTL8抗体の投与の時系列的な順序を指す。従って「初回用量」は、治療レジメンの開始時に投与する用量(「基準用量」とも称す)であり、「二次用量」は、初期用量後に投与される用量であり、次に「三次用量」は、二次用量後に投与される用量である。初期用量、二次用量及び三次用量は全て、同一量の抗-ANGPTL8抗体を含んでも良いが、一般的に、投与頻度という点では互いに異なっても良い。然しながら、特定の実施形態では、一連の治療の間に初回、二次及び三次用量に含まれる抗-ANGPTL8抗体の量は、互いに変動する(例えば、適切に上下に調整する)。特定の実施形態では、2回又はそれ以上の(例えば、2、3、4又は5回)用量を「負荷用量」として治療レジメンの開始時に投与し、次いで、より少ない頻度で(例えば、維持用量として)順次に投与を行なう。

【0184】

本発明の特定の代表的な実施形態では、二次及び/又は三次用量の各々は、直前の投与後、1~26(例えば、1、1<sup>1/2</sup>、2、2<sup>1/2</sup>、3、3<sup>1/2</sup>、4、4<sup>1/2</sup>、5、5<sup>1/2</sup>、6、6<sup>1/2</sup>、7、7<sup>1/2</sup>、8、8<sup>1/2</sup>、9、9<sup>1/2</sup>、10、10<sup>1/2</sup>、11、11<sup>1/2</sup>、12、12<sup>1/2</sup>、13、13<sup>1/2</sup>、14、14<sup>1/2</sup>、15、15<sup>1/2</sup>、16、16<sup>1/2</sup>、17、17<sup>1/2</sup>、18、18<sup>1/2</sup>、19、19<sup>1/2</sup>、20、20<sup>1/2</sup>、21、21<sup>1/2</sup>、22、22<sup>1/2</sup>、23、23<sup>1/2</sup>、24、24<sup>1/2</sup>、25、25<sup>1/2</sup>、26、26<sup>1/2</sup>、又はそれ以上)週に投与する。本明細書中で使用する語句「直前の用量」とは、多数回投与の順序において、直後の投与の前の順序に何も介在することなく抗-ANGPTL8抗体の用量を患者に投与することを意味する。

【0185】

本発明のこの態様による方法には、抗-ANGPTL8抗体の二次及び/又は三次用量を任意の回数で患者に投与することを含み得る。例えば、特定の実施形態では、患者に単一回の二次用量のみを投与する。他の実施形態では、2回又はそれ以上の(例えば、2、

10

20

30

40

50

3、4、5、6、7、8又はそれ以上の)二次用量を患者に投与する。同様に、特定の実施形態では、患者に単一回の三次用量のみを投与する。他の実施形態では、2回又はそれ以上(例えば、2、3、4、5、6、7、8又はそれ以上)の三次用量を患者に投与する。投与レジメンは、特定の被験体の生涯に亘り無期限に、又はそのような治療がもはや治療的に不必要になるか不利益になるまで、実施しても良い。

#### 【0186】

多数回の二次用量を含む実施形態において、二次用量の各々は、他の二次用量と同じ頻度で投与しても良い。例えば、二次用量の各々は、直前の投与の1~2週間又は1~2ヶ月後に患者に投与しても良い。同様に、多数回の三次用量を含む実施形態において、三次用量の各々は、他の三次用量と同じ頻度で投与しても良い。例えば、三次用量の各々は、直前の投与の2~12週間後に患者に投与しても良い。本発明の特定の実施形態では、二次及び/又は三次用量を患者に投与する頻度は、一連の治療レジメンの間に変動しても良い。投与頻度も又、臨床検査後の個々の患者の必要性に応じて、医師による一連の治療過程の間に調整しても良い。

#### 【0187】

##### 診断用抗体

本発明の抗-ANGPTL8抗体は又、例えば診断目的のために、試料中のANGPTL8を検出及び/又は測定するために使用しても良い。例えば、抗-ANGPTL8抗体又はその断片を使用して、ANGPTL8の異常な発現(例えば、過剰発現、過少発現、発現の欠如など)を特徴とする状態又は疾患を診断しても良い。ANGPTL8の代表的な診断検査は、例えば、患者から得た試料を本発明の抗-ANGPTL8抗体と接触させることを含み、ここで抗-ANGPTL8抗体は検出可能な標識若しくはレポーター分子で標識するか、又は捕獲リガンドとして使用し、患者の試料からANGPTL8タンパク質を選択的に単離する。又、標識していない抗-ANGPTL8抗体は、それ自体が検出可能に標識された第2の抗体と組合わせて診断用に使用しても良い。検出可能な標識又はレポーター分子は、<sup>3</sup>H、<sup>14</sup>C、<sup>32</sup>P、<sup>35</sup>S、又は<sup>125</sup>Iなどの放射性同位体、蛍光又は、フルオレセインイソチオシアネート又はローダミンなどの化学発光部分、又はアルカリホスファターゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ又はルシフェラーゼのような酵素でも良い。

#### 【0188】

試料中のANGPTL8を検出又は測定するために用いることができる特定の代表的な検査法としては、酵素結合免疫吸着検定(ELISA)、放射免疫検定(RIA)、及び蛍光標識細胞分取(FACS)が挙げられる。

#### 【0189】

本発明によるANGPTL8診断検査で使用する試料としては、正常又は病的条件下で患者から得られる、検出可能な量のANGPTL8タンパク質又はその断片を含む、組織又は体液試料の何れかが挙げられる。一般に、健常な患者(例、異常なANGPTL8レベル又は活性に関連する疾患又は状態に罹患していない患者)から得られた特定の試料中のANGPTL8のレベルを測定して、ANGPTL8の基準ライン又は標準レベルを最初に確立する。そこで、ANGPTL8のこの基準ラインレベルを、ANGPTL8に関連する疾患若しくは状態、又はそのような疾患若しくは状態に関連する症状、を有すると疑われる個体から得た試料中で測定したANGPTL8のレベルに対して比較することが出来る。

#### 【0190】

##### 実施例

本方法を記載する前に、本発明の方法及び条件は変動し得るため、記載してある特定の方法及び実験条件に限定される訳ではないことを理解されたい。本明細書で使用する用語は、特定の実施形態のみを説明するためのものであり、限定することを意図するものではないことも理解されたい、というのは本発明の範囲は添付した特許請求の範囲によってのみ限定するからである。使用した数値(例、量、温度など)に関して正確さを確実にする

ために努力はしたが、いくつかの実験誤差及び偏差は考慮すべきである。他に示さない限り、部は重量部であり、分子量は平均分子量であり、温度は摂氏であり、圧力は大気圧又はその近傍である。

【 0 1 9 1 】

他に定義しない限り、本明細書で使用する技術用語及び科学用語は、全て、本発明が属する技術分野の当業者により一般的に理解されているものと同じ意味を有する。本明細書で使用する場合、「約」という用語は、特定の列挙した数値に関して使用する場合、その値は列挙した値から 1 % 以下だけ変動し得ることを意味する。例えば、本明細書で使用する表現「約 1 0 0」は、9 9 及び 1 0 1 並びにその間のすべての値（例えば、9 9 . 1、9 9 . 2、9 9 . 3、9 9 . 4 など）を含む。

10

【 0 1 9 2 】

本明細書に記載した方法及び材料と類似又は等価な方法及び材料の何れも、本発明の実施又は試験において使用することができるが、ここに記載するのは好ましい方法及び材料である。本明細書で言及した全ての刊行物は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【 0 1 9 3 】

実施例 1 . 抗 - A N G P T L 8 抗体の産生

抗 - A N G P T L 8 抗体は、V E L O C I M M U N E（登録商標）マウス（即ち、ヒト免疫グロブリン重鎖及び 軽鎖可変領域をコードする D N A を含む改変マウス）を、C 末端マウス I g G 2 a タグで発現した組換えヒト A N G P T L 8 を含む免疫原で免疫化することにより得た（配列番号 3 4 0 参照）。抗体の免疫応答を、A N G P T L 8 特異的免疫測定法により監視した。所望する免疫応答が達成されたとき、数個の完全ヒト抗 - A N G P T L 8 抗体が、抗原陽性 B 細胞から産生したことが米国特許公開第 2 0 0 7 / 0 2 8 0 9 4 5 号に記載され、その全体は参照により本明細書に組込まれる。

20

【 0 1 9 4 】

この実施例の方法に従って産生した代表的な抗 - A N G P T L 8 抗体の特定の生物学的特性を下記の実施例に詳細に記載する。

【 0 1 9 5 】

実施例 2 . 重鎖及び軽鎖可変領域のアミノ酸及び核酸配列

表 1 は、重鎖及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列識別子並びに本発明の選択された抗 - A N G P T L 8 抗体の C D R を示す。対応する核酸配列識別子を表 2 に示す。

30

【 0 1 9 6 】

40

50

【表 1】

表 1 : アミノ酸配列識別子

抗体名称	配列番号							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H4H15314P2	2	4	6	8	10	12	14	16
H4H15316P	18	20	22	24	26	28	30	32
H4H15318P	34	36	38	40	42	44	46	48
H4H15319P	50	52	54	56	58	60	62	64
H4H15321P	66	68	70	72	74	76	78	80
H4H15323P	82	84	86	88	90	92	94	96
H4H15330P	98	100	102	104	106	108	110	112
H4H15331P	114	116	118	120	122	124	126	128
H4H15334P	130	132	134	136	138	140	142	144
H4H15335P	146	148	150	152	154	156	158	160
H4H15341P	162	164	166	168	170	172	174	176
H4H15343P	178	180	182	184	186	188	190	192
H4H15345P	194	196	198	200	202	204	206	208
H4H15346P	210	212	214	216	218	220	222	224
H4H15347P	226	228	230	232	234	236	238	240
H4H15350P2	242	244	246	248	250	252	254	256
H4H15353P2	258	260	262	264	250	252	254	256
H4H15354P2	266	268	270	272	250	252	254	256
H4H15355P2	274	276	278	280	250	252	254	256
H4H15357P2	282	284	286	288	250	252	254	256
H4H15361P2	290	292	294	296	250	252	254	256
H4H15362P2	298	300	302	304	250	252	254	256
H4H15363P2	306	308	310	312	250	252	254	256
H4H15367P2	314	316	318	320	322	324	326	328
H4H15369P2	330	332	334	336	322	324	326	328

【 0 1 9 7 】

【表 2】

表2：核酸配列識別子

抗体名称	配列番号							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H4H15314P2	1	3	5	7	9	11	13	15
H4H15316P	17	19	21	23	25	27	29	31
H4H15318P	33	35	37	39	41	43	45	47
H4H15319P	49	51	53	55	57	59	61	63
H4H15321P	65	67	69	71	73	75	77	79
H4H15323P	81	83	85	87	89	91	93	95
H4H15330P	97	99	101	103	105	107	109	111
H4H15331P	113	115	117	119	121	123	125	127
H4H15334P	129	131	133	135	137	139	141	143
H4H15335P	145	147	149	151	153	155	157	159
H4H15341P	161	163	165	167	169	171	173	175
H4H15343P	177	179	181	183	185	187	189	191
H4H15345P	193	195	197	199	201	203	205	207
H4H15346P	209	211	213	215	217	219	221	223
H4H15347P	225	227	229	231	233	235	237	239
H4H15350P2	241	243	245	247	249	251	253	255
H4H15353P2	257	259	261	263	249	251	253	255
H4H15354P2	265	267	269	271	249	251	253	255
H4H15355P2	273	275	277	279	249	251	253	255
H4H15357P2	281	283	285	287	249	251	253	255
H4H15361P2	289	291	293	295	249	251	253	255
H4H15362P2	297	299	301	303	249	251	253	255
H4H15363P2	305	307	309	311	249	251	253	255
H4H15367P2	313	315	317	319	321	323	325	327
H4H15369P2	329	331	333	335	321	323	325	327

## 【0198】

抗体は、通常、以下の命名法に従って参照する。Fcの接頭辞（例、「H1H」、「H1M」、「H2M」、「H4H」等）、続いて数値的識別子（例「15321」、「15341」、「15350」等）続いて、表1及び2に示すように、接尾辞「P」又は「N」が後に続く。従って、この命名法によれば、ある抗体は、本明細書では「H4H15321P」等として参照し得る。本明細書で使用する抗体名称上の接頭辞H4Hは、抗体の特定のFc領域アイソタイプを示す。例えば、「H4H」抗体はヒトIgG4Fcを有し、「H1M」抗体はマウスIgG1Fcを有し、「H2M」抗体はマウスIgG2Fcを有する（すべての可変領域は、抗体名称中では、第一番目の「H」で表示される完全ヒトである）。当業者には理解されるように、特定のFcアイソタイプを有する抗体は、異なるFcアイソタイプを有する抗体に変換することが出来るが、（例、マウスIgG1Fcを有する抗体は、ヒトIgG4を有する抗体に変換出来る、等）いずれの場合でも、表1及び表2に挙げた数値識別子により示される可変ドメイン（CDRを含む）は同じままであり、結合特性は同一であるか、又はFcドメインの性質に依らず実質的に類似していると予想される。

## 【0199】

実施例3：表面プラズモン共鳴（SPR）測定によるANGPTL8、ANGPTL3、及びANGPTL4ペプチドに結合するANGPTL8抗体の解離速度定数（kd）ANGPTL3（国際特許公開第2012/174178号、Leeら、（2009）



J B C、284:13735-13745)及びANGPTL4(Desaiら、(2007)PNAS、104:11766-11771)のN末端コイルドコイル領域に結合する抗体がANGPTLタンパク質のLPL阻害活性を遮断したことが、以前に実証されている。この実験は、ANGPTL8に対する抗体を、ANGPTL8のN末端領域からのペプチドへの結合について試験したものである。

#### 【0200】

ヒトANGPTL8ペプチド(hANGPTL8ペプチド、配列番号337)に結合するANGPTL8抗体の解離速度定数を、リアルタイム表面プラズモン共鳴に基づくMASS-1バイオセンサープラットフォームを使用して決定した。分析は、ANGPTL8抗体がセンサー表面上に捕捉され、ペプチドが抗体表面上に注入される形式を利用した。ヒトANGPTL3(hANGPTL3ペプチド、配列番号338)及びヒトANGPTL4(hANGPTL4ペプチド、配列番号339)のN末端コイルドコイル領域由来のペプチドも対照として含めた。又、ANGPTL4ペプチド及び陰性アイソタイプ対照抗体に結合する対照抗体(米国特許公開第2011/0159015号からのH4H268P)も含めた。結合の研究のすべてを、25℃でHEPES10mM pH7.4、NaCl150mM、EDTA3mM、及び界面活性剤Tween-20(HBS-ETランニングバッファ)0.05%v/v中で行った。HCAセンサー表面を、モノクローナルマウス抗ヒトFc抗体(GE、#BR-1008-39)へのアミンカップリングにより誘導体化し、この表面に約1000RUの各ANGPTL8抗体又は対照抗体を捕捉した。ペプチド原液をHBS-ETランニングバッファで500nMに希釈し、抗体捕捉表面上に流速30μL/分で4分間注入し、続いてHBS-ETランニングバッファ中で結合ペプチドを10分間解離した。

#### 【0201】

捕捉されたANGPTL8抗体に結合するペプチドの会合相は、1:1結合モデルに適合出来ず、従って、解離速度定数(kd)値のみを、スクラバー2.0c回帰分析ソフトを使用するリアルタイム結合センサーグラムを適合することにより計算した。解離半減期(t1/2)は、kdから以下のように計算した。

#### 【数1】

$$t_{1/2}(\text{min}) = \frac{\ln(2)}{60 \times kd}$$

#### 【0202】

捕捉されたANGPTL8抗体、対照ANGPTL4抗体、及びアイソタイプ対照抗体に結合するANGPTL8、ANGPTL3、及びANGPTL4 N末端領域ペプチドの結合パラメーターを表3~5に示した。

#### 【0203】

##### 結果

これらの実験条件下で、500nMのhANGPTL8、hANGPTL3、又はhANGPTL4ペプチドがブランク抗hFc表面に示す最大の非特異的結合シグナルは3RUであった。従って非特異的バックグラウンドである3RUの3倍を超える(即ち、9RU以上)シグナルを有する結合相互作用を、特異的結合相互作用と見做した。この基準に基づいて、9RU未満の抗体-ペプチド結合シグナルは非結合性であると見做した(表1のNB)。

#### 【0204】

この結合研究から、ANGPTL8抗体H4H15321P、H4H15367P2、及びH4H15345Pが、N末端領域ANGPTL8ペプチド(配列番号337)に特異的に結合することを示した。hANGPTL3(配列番号338)又はhANGPTL4(配列番号339)N末端領域ペプチドに結合したANGPTL8は全く無かった。

【 0 2 0 5 】

【 表 3 】

表 3 : 25℃における抗-ANGPTL8モノクローナル抗体のhANGPTL8ペプチドへの結合

mAb による捕獲	mAb 捕獲レベル (RU)*	500nM hANGPTL8 ペプチド結合 (RU)	kd (1/s)	t½ (min)
H4H15321P	1101 ± 6.1	61	8.29E-05	139
H4H15367P2	1116 ± 17.4	43	9.82E-05	118
H4H15345P	1096 ± 3.6	37	2.03E-05	570
H4H15361P2	1394 ± 12.3	4	NB	NB
H4H15347P	1554 ± 54.6	0	NB	NB
H4H15318P	1087 ± 31.5	0	NB	NB
H4H15350P2	1298 ± 30.7	0	NB	NB
H4H15363P2	1281 ± 13.7	0	NB	NB
H4H15346P	1277 ± 26.3	0	NB	NB
H4H15334P	1256 ± 5.3	0	NB	NB
H4H15335P	1625 ± 31	0	NB	NB
H4H15343P	1129 ± 19.8	0	NB	NB
H4H15357P2	1159 ± 13.1	0	NB	NB
H4H15353P2	1296 ± 8.5	0	NB	NB
H4H15341P	1023 ± 30.1	0	NB	NB
H4H15369P2	1196 ± 54.2	0	NB	NB
H4H15330P	1168 ± 20.1	0	NB	NB
H4H15362P2	1131 ± 15.5	0	NB	NB
H4H15319P	974 ± 3.5	0	NB	NB
H4H15316P	1107 ± 24.7	0	NB	NB
H4H15323P	1068 ± 16.4	0	NB	NB
H4H15354P2	1297 ± 8.5	0	NB	NB
H4H15355P2	1323 ± 25.4	0	NB	NB
H4H15314P2	1011 ± 3.4	0	NB	NB
H4H15331P	1264 ± 16.8	-1	NB	NB
(α-AngPTL4 Ab)	1281 ± 50.2	0	NB	NB
陰性アイソタイプ対照 Ab	1092 ± 41.5	0	NB	NB
ブランク α-hFc 表面	5 ± 0.3	3	NB	NB

\* この列には、ANGPTL8 への結合に使用される抗体表面密度の平均及び標準偏差を表示した。

【 0 2 0 6 】

10

20

30

40

50

【表 4】

表4 25℃での抗-ANGPTL8モノクローナル抗体のhANGPTL3シフトペプチドへの結合

mAb による捕獲	mAb 捕獲レベル (RU)*	500nM hANGPTL3 ペプチド結合 (RU)	kd (1/s)	t½ (min)
H4H15321P	1101 ± 6.1	0	NB	NB
H4H15367P2	1116 ± 17.4	0	NB	NB
H4H15345P	1096 ± 3.6	0	NB	NB
H4H15361P2	1394 ± 12.3	0	NB	NB
H4H15347P	1554 ± 54.6	-1	NB	NB
H4H15318P	1087 ± 31.5	0	NB	NB
H4H15350P2	1298 ± 30.7	0	NB	NB
H4H15363P2	1281 ± 13.7	0	NB	NB
H4H15346P	1277 ± 26.3	0	NB	NB
H4H15334P	1256 ± 5.3	0	NB	NB
H4H15335P	1625 ± 31	-1	NB	NB
H4H15343P	1129 ± 19.8	0	NB	NB
H4H15357P2	1159 ± 13.1	0	NB	NB
H4H15353P2	1296 ± 8.5	0	NB	NB
H4H15341P	1023 ± 30.1	0	NB	NB
H4H15369P2	1196 ± 54.2	0	NB	NB
H4H15330P	1168 ± 20.1	-1	NB	NB
H4H15362P2	1131 ± 15.5	0	NB	NB
H4H15319P	974 ± 3.5	0	NB	NB
H4H15316P	1107 ± 24.7	0	NB	NB
H4H15323P	1068 ± 16.4	0	NB	NB
H4H15354P2	1297 ± 8.5	0	NB	NB
H4H15355P2	1323 ± 25.4	0	NB	NB
H4H15314P2	1011 ± 3.4	0	NB	NB
H4H15331P	1264 ± 16.8	0	NB	NB
(α-AngPTL4 Ab)	1281 ± 50.2	0	NB	NB
陰性アイソタイプ対照 Ab	1092 ± 41.5	0	NB	NB
ブランク α-hFc 表面	5 ± 0.3	0	NB	NB

\*この列には、ANGPTL3 ペプチドへの結合に使用される抗体表面密度の平均及び標準偏差を表示した。

【 0 2 0 7 】

10

20

30

40

50

【表 5】

表 5 25℃での抗-ANGPTL8モノクローナル抗体のhAngPTL4ペプチドへの結合

mAb による捕獲	mAb 捕獲レベル (RU)*	500nM hAngPTL4 ペプチド結合 (RU)	kd (1/s)	t <sub>1/2</sub> (min)
H4H15321P	1101 ± 6.1	0	NB	NB
H4H15367P2	1116 ± 17.4	0	NB	NB
H4H15345P	1096 ± 3.6	0	NB	NB
H4H15361P2	1394 ± 12.3	0	NB	NB
H4H15347P	1554 ± 54.6	0	NB	NB
H4H15318P	1087 ± 31.5	0	NB	NB
H4H15350P2	1298 ± 30.7	0	NB	NB
H4H15363P2	1281 ± 13.7	0	NB	NB
H4H15346P	1277 ± 26.3	0	NB	NB
H4H15334P	1256 ± 5.3	1	NB	NB
H4H15335P	1625 ± 31	1	NB	NB
H4H15343P	1129 ± 19.8	0	NB	NB
H4H15357P2	1159 ± 13.1	0	NB	NB
H4H15353P2	1296 ± 8.5	0	NB	NB
H4H15341P	1023 ± 30.1	0	NB	NB
H4H15369P2	1196 ± 54.2	0	NB	NB
H4H15330P	1168 ± 20.1	0	NB	NB
H4H15362P2	1131 ± 15.5	0	NB	NB
H4H15319P	974 ± 3.5	0	NB	NB
H4H15316P	1107 ± 24.7	0	NB	NB
H4H15323P	1068 ± 16.4	0	NB	NB
H4H15354P2	1297 ± 8.5	0	NB	NB
H4H15355P2	1323 ± 25.4	0	NB	NB
H4H15314P2	1011 ± 3.4	1	NB	NB
H4H15331P	1264 ± 16.8	0	NB	NB
(α-AngPTL4 Ab)	1281 ± 50.2	23	1.02E-03	11
陰性アイソタイプ対照 Ab	1092 ± 41.5	0	NB	NB
ブランク α-hFc 表面	5 ± 0.3	0	NB	NB

\*この列には、ANGPTL4 ペプチドへの結合に使用される抗体表面密度の平均及び標準偏差を表示した。

## 【 0 2 0 8 】

実施例 4 表面プラズモン共鳴 (SPR) による完全長ヒト及びサル ANGPTL8 タンパク質への H4H15341P 結合についての動力学的結合パラメータの決定。

完全長ヒト及びカニクイザル ANGPTL8 タンパク質に結合する ANGPTL8 抗体 H4H15341P の平衡解離定数 (KD) を、リアルタイム表面プラズモン共鳴に基づく MASS - 1 バイオセンサープラットフォームを使用して決定した。分析のために、H4H15341P を、ヒト又はサルの ANGPTL8 タンパク質が固定化されたセンサー表面上に注入した。すべての結合研究は、25 で HEPES 10 mM pH 7.4、NaCl 150 mM、EDTA 3 mM、及び界面活性剤 Tween - 20 0.05 %

v / v ( H B S - E T ランニングバッファ ) 中で行った。H C A センサー表面を、アミンカップリングヤギ抗マウス I g G 2 a ポリクローナル抗体 ( S o u t h e r n B i o t e c h 社、# 1 0 8 0 - 0 1 ) で最初に誘導体化し、次いで、C 末端マウス I g G 2 a F c タグ ( h A N G P T L 8 - m F c ; 配列番号 3 4 0 ) で発現したヒト A N G P T L 8、又は C 末端マウス I g G 2 a F c タグ ( M f A N G P T L 8 - m F c、配列番号 3 4 1 ) で発現したサル A N G P T L 8、の約 3 0 R U ( 結合単位 ) を捕捉した。異なる濃度の A N G P T L 8 m A b を先ず H B S - E T ランニングバッファ ( 3 0 0 n M ~ 1 . 2 3 n M、3 倍連続希釈 ) 中で調製し、次に A N G P T L 8 - m F c 捕捉表面上に 4 分間 3 0 μ L / 分の流速で注入した後、H B S - E T ランニングバッファ中で結合した m A b を 1 0 分間の解離する。

10

## 【 0 2 0 9 】

スクリーパー 2 . 0 c 回帰分析ソフトを使用して、マストランスポートリミテーションを有する 1 : 1 結合モデルにリアルタイム結合センサーグラムを適合させることにより、動力学的会合 ( k a ) 及び解離 ( k d ) 速度定数を決定した。結合解離平衡定数 ( K D ) 及び解離半減期 ( t 1 / 2 ) を、速度定数から以下のように計算した :

## 【 数 2 】

$$K_D (M) = \frac{k_d}{k_a}, \quad \text{及び} \quad t_{1/2} (min) = \frac{\ln(2)}{60 \times k_d}$$

20

## 【 0 2 1 0 】

2 5 における h A N G P T L 8 - m F c 及び M f A N G P T L 8 - m F c に結合する抗 - A N G P T L 8 m A b の動力学的結合パラメーターを表 6 に示す。

## 【 0 2 1 1 】

## 結果

抗体 H 4 H 1 5 3 4 1 は、センサー表面に固定化されたヒト及びサル A N G P T L 8 タンパク質の両方に結合し、かつ、解離相を記録している間に、測定可能な解離を示さなかった。結合親和性の推定値を得るために、解離速度定数 k d を、実験条件下における検出上限値を 1 . 0 E - 0 5 1 / s に固定した。h A N G P T L 8 - m F c 及び M f A N G P T L 8 - m F c に結合する H 4 H 1 5 3 4 1 P の平衡解離定数 ( K D ) 値を、それぞれ 1 1 7 p M 及び 8 6 p M 以下であると推定した。

30

## 【 0 2 1 2 】

## 【 表 6 】

表 6 2 5 ° C における h A N G P T L 8 - m F c 及び M f A N G P T L 8 - m F c への H 4 H 1 5 3 4 1 P 結合の結合動力学パラメータ。

捕獲表面	k <sub>a</sub> (1/Ms)	k <sub>d</sub> (1/s)	K <sub>D</sub> (M)	t <sub>1/2</sub> (min)
hANGPTL8-mFc	8.50E+04	1.00E-05*	≤ 1.17E-10	≥ 1155
MfANGPTL8-mFc	1.16E+05	1.00E-05*	≤ 8.60E-11	≥ 1155

40

\*本実験条件下で抗 - A N G P T L 8 m A b の解離は全く観察されず、従って、k<sub>d</sub> の値は検出上限値である 1.00E-05s<sup>-1</sup> に固定した。

## 【 0 2 1 3 】

実施例 5 バイオレイヤー干渉法 ( B L I ) によるヒト及びサル A N G P T L 8 結合特

50

## 異性の決定

ヒト及びサルANGPTL8タンパク質に対するANGPTL8抗体の結合を、Octet HTXバイオセンサープラットフォーム(ForteBio、Pall Life SciencesのADivision)を備えたバイオレイヤー干渉法を用いて調査した。すべての実験は、反応マルチウェルプレート(1000rpmで攪拌しながら、HEPES 10mM pH7.4、NaCl 150mM、界面活性剤Tween-20 0.05% v/v及びBSA 1mg/ml中、25℃で実施した。C末端マウスIgG2a Fcタグ(hANGPTL8-mFc、配列番号340)で産生したヒトANGPTL8、又はC末端マウスIgG2a Fcタグ(MfANGPTL8-mFc、配列番号341)を用いて産生したカニクイザルANGPTL8(約1.6nmを、各タンパク質10µg/mlを含むウェル内にセンサーを4分間浸漬することにより、抗mFc(AMC)オクテットバイオセンサー上に捕捉した。同一条件下で、同一のmFcタグ(hDLR-mFc)を有する陰性対照タンパク質もAMCセンサーに結合させた。次いで、全部で4つのセンサー、タンパク質を結合させた3つとブランク一つ、を異なるANGPTL8モノクローナル抗体100nM又は対照のアイソタイプを含むウェルに、4分間浸漬した。4分の結合工程後に観察される結合シグナルを表7に作表した。

## 【0214】

## 結果：

本研究で試験した25種のANGPTL8 mAbのうち、24種の抗体が、無関係の対照センサーチップ上の最大結合シグナルより高い結合シグナルを示した(0.03nm、この値はバックグラウンドを超える倍数として結合シグナルを計算するために使用した)。24種のヒトANGPTL8結合体の中で、20種がサルANGPTL8タンパク質に陽性結合を示した。サルANGPTL8タンパク質に結合しなかった4種の抗体も又、ヒトANGPTL8タンパク質に対して低い結合シグナル、バックグラウンド結合シグナルの1~2倍の値、を示した。ヒトANGPTL8タンパク質に結合する24種の抗体について、4種の抗体(H4H15362P2、H4H15321P、H4H15330P、H4H15367P2)は、バックグラウンドの10倍超の結合シグナルを示した。別の群の12種の抗体は、上記バックグラウンドより5~10倍高い結合シグナルを示した。残りの抗体は、バックグラウンドレベルより1~5倍高い結合シグナルでヒトANGPTL8タンパク質に結合した。

## 【0215】

10

20

30

40

50

【表 7】

表7 Octetバイオセンサー上に捕捉されたヒト及びサルANGPTL8-mFcに対するANGPTL8モノクローナル抗体100nMの結合特異性

mAb PID#	mAb 結合応答性 (nm)			
	hANGPTL8.mFc 捕獲表面	MfANGPTL8.mFc 捕獲表面	無関係の対照 (hLDLR.mFc) 捕獲表面	ブランク AMC センサー
H4H15362P2	0.39	0.36	0.03	0.01
H4H15321P	0.36	0.51	0.01	0.00
H4H15330P	0.34	0.39	0.02	0.01
H4H15367P2	0.32	0.33	0.01	0.00
H4H15363P2	0.25	0.26	0.01	0.02
H4H15347P	0.25	0.29	0.01	0.03
H4H15345P	0.25	0.31	0.00	0.01
H4H15319P	0.22	0.26	-0.01	0.00
H4H15361P2	0.20	0.21	0.01	0.02
H4H15318P	0.19	0.20	0.01	0.01
H4H15323P	0.18	0.15	0.00	0.00
H4H15350P2	0.17	0.20	0.00	-0.01
H4H15343P	0.17	0.20	-0.01	0.01
H4H15331P	0.16	0.21	0.01	0.01
H4H15355P2	0.15	0.13	0.02	0.03
H4H15353P2	0.15	0.11	0.02	0.02
H4H15369P2	0.14	0.17	0.00	0.01
H4H15357P2	0.13	0.08	0.01	0.02
H4H15341P	0.12	0.10	0.02	0.03
H4H15346P	0.07	0.01	0.00	-0.01
H4H15335P	0.06	0.04	0.01	0.01
H4H15354P2	0.05	0.03	0.01	0.02
H4H15334P	0.05	0.01	0.00	0.03
H4H15314P2	0.04	0.01	0.01	0.00
H4H15316P	0.03	0.02	0.02	0.02
陰性アイソタイプ 対照Ab	0.01	0.00	0.01	0.01

## 【 0 2 1 6 】

実施例 6 ヒト化ANGPTL8マウスにおける循環トリグリセリドレベルに及ぼすIgG4抗-hANGPTL8抗体のインビボ効果

血清トリグリセリド(TG)レベルに及ぼす抗hANGPTL8抗体の効果を、ヒト化ANGPTL8マウスにおいて測定した。実験の7日前にマウスを事前採血し、各抗体について試験するため各々5匹のマウスのグループに分けた。試験の0日目に、抗体10mg/kg用量(抗hANGPTL8及び無関係の特異性を有するアイソタイプ適合(hIgG4)対照)を皮下注射により投与した。抗体注射の後、毎日連続して、マウスから採血(非絶食)し、血清中のTGレベルをADVIA(登録商標)1800SerumCh

chemistry Analyzer (Siemens社) . により測定した。試験した全抗体の各時点について平均値を計算した。血清TG濃度の(平均値±標準誤差)として表した結果を表8～13に示した。循環抗 hANGPTL8 (血清Ab) のレベルも又、標準的なELISA分析法を用いて測定した。簡潔に述べると、プレートをやぎ抗ヒトFc抗体 (Sigma - Aldrich) で被覆して、血清Abを捕捉した。次に血清をプレートに添加し、捕捉した抗体を西洋ワサビダーゼ (HRP) 結合ヤギ抗ヒトIgG抗体 (Sigma - Aldrich) を用いて化学発光により検出した。結果を(平均±標準誤差)として表14～19に示す。

対照：アイソタイプが一致した対照Abを受け取ったマウス

【0217】

循環TGレベルに及ぼす25種のmAbのhANGPTL8に対する効果を、ヒト化ANGPTL8マウスにおいて試験した。抗体H4H15341Pは、投与後(対照mAbと比較して)、循環TGの有意な低下(平均68%まで)をもたらした。

【0218】

【表8】

表8 試験1、血清トリグリセリド(mg/dL)

注射後 日数	抗体									
	対照		H4H15321P		H4H15331P		H4H15343P		H4H15367P2	
	平均値	標準 誤差	平均値	標準 誤差	平均値	標準 誤差	平均値	標準 誤差	平均値	標準 誤差
-7	205.4	14.20	203.8	19.68	206.6	16.20	205.2	12.13	203.6	14.21
1	233.6	16.93	239.4	28.61	259.8	35.52	196.8	16.05	222.0	27.41
4	210.4	12.79	233.2	26.19	244.4	33.83	175.2	10.32	234.8	27.28
7	261.0	19.66	235.6	33.82	241.8	55.74	201.8	23.50	203.2	27.79

【0219】

【表9】

表9. 試験2、血清トリグリセリド(mg/dL)

注射後 日数	抗体							
	対照		H4H15341P		H4H15319P		H4H15318P	
	平均値	標準 誤差	平均値	標準 誤差	平均値	標準 誤差	平均値	標準 誤差
-7	214.8	20.08	211.4	21.67	213.6	20.50	212.8	20.00
1	255.4	25.18	82.0	3.35	217.4	26.92	235.2	24.62
4	228.6	33.43	93.6	7.69	195.0	29.93	270.6	34.28
7	197.0	21.22	90.8	7.68	235.4	35.70	209.6	31.88
14	223.0	14.98	126.4	21.75	185.2	29.94	166.0	24.58

表9 (続き)

注射後 日数	抗体			
	H4H15355P2		H4H15345P	
	平均値	標準誤差	平均値	標準誤差
-7	214.4	19.18	213.0	20.34
1	248.2	45.93	228.8	37.97
4	221.2	30.30	195.80	23.87
7	254.2	37.93	252.60	25.24
14	219.4	36.69	190.60	13.13

【0220】



## 【表 1 0】

表 1 0. 試験 3、血清トリグリセリド (mg/dL)

注射後 日数	抗体									
	対照		H4H15350P2		H4H15314P2		H4H15330P		H4H15361P2	
	平均値	標準 誤差	平均値	標準 誤差	平均値	標準 誤差	平均値	標準 誤差	平均値	標準 誤差
-7	247.8	23.88	242.8	21.60	244.0	26.34	243.2	22.29	242.4	25.29
1	214.6	20.37	206.6	21.60	228.2	35.33	206.6	25.44	215.4	20.20
4	222.4	13.78	198.2	22.61	192.4	17.25	216.6	15.84	200.0	15.89
7	288.8	35.41	274.6	45.48	238.6	21.21	244.4	14.61	247.4	37.93

10

## 【 0 2 2 1】

## 【表 1 1】

表 1 1 試験 4、血清トリグリセリド (mg/dL)

注射後 日数	抗体									
	対照		H4H15357P2		H4H15363P2		H4H15347P		H4H15369P	
	平均値	標準 誤差	平均値	標準 誤差	平均値	標準 誤差	平均値	標準 誤差	平均値	標準 誤差
-7	197.0	18.29	201.6	25.18	201.6	26.15	200.4	24.71	198.8	22.43
1	227.6	46.41	221.6	37.35	189.4	5.963	194.6	28.33	217.0	39.68
6	194.0	18.06	211.2	35.96	190.6	20.21	248.2	16.12	223.0	25.61

20

## 【 0 2 2 2】

## 【表 1 2】

表 1 2 試験 5、血清トリグリセリド (mg/dL)

注射後 日数	抗体							
	対照		H4H15353P2		H4H15323P		H4H15362P2	
	平均値	標準 誤差	平均値	標準 誤差	平均値	標準 誤差	平均値	標準 誤差
-7	199.2	26.68	197.4	27.02	199.8	30.33	200.8	27.55
2	217.2	16.09	184.4	28.67	179.8	35.99	166.6	26.76
8	161.8	18.58	185.4	24.78	187.0	38.76	180.2	18.22
14	227.2	33.70	216.4	11.74	212.4	31.29	173.2	17.75

30

表 1 2 (続き)

注射後日数	抗体			
	H4H15334P		H4H15354P2	
	平均値	標準誤差	平均値	標準誤差
-7	199.8	26.25	200.0	26.33
2	183.0	16.93	169.8	23.14
8	160.0	16.56	162.6	20.50
14	167.6	18.73	197.4	34.20

40

## 【 0 2 2 3】

50

## 【表 1 3】

表 1 3 試験 6、血清トリグリセリド (mg/dL)

注射後 日数	抗体							
	対照		H4H15316P		H4H15335P		H4H15346P	
	平均値	標準誤差	平均値	標準誤差	平均値	標準誤差	平均値	標準誤差
-7	232.0	24.94	232.0	28.26	232.4	23.88	232.8	30.30
2	211.0	23.19	248.2	35.35	203.2	6.785	197.2	20.42
7	256.8	32.02	249.6	35.72	248.0	17.28	234.8	66.74

10

## 【 0 2 2 4】

## 【表 1 4】

表 1 4 試験 1、血清 A b (mg/dL)

注射後 日数	抗体									
	対照		H4H15321P		H4H15331P		H4H15343P		H4H15367P2	
	平均値	標準誤差	平均値	標準誤差	平均値	標準誤差	平均値	標準誤差	平均値	標準誤差
1	64.1	9.0	76.4	8.6	9.8	2.0	74.4	8.5	113.0	9.6
4	55.8	6.3	66.5	4.6	3.3	0.7	68.3	4.4	101.4	11.3

20

## 【 0 2 2 5】

## 【表 1 5】

表 1 5. 試験 2、血清 A b (mg/dL)

注射後 日数	抗体							
	対照		H4H15341P		H4H15319P		H4H15318P	
	平均値	標準誤差	平均値	標準誤差	平均値	標準誤差	平均値	標準誤差
1	50.8	3.9	104.0	18.7	81.8	8.2	74.4	8.5
4	51.2	9.5	70.6	23.6	59.1	9.6	68.3	4.4
7	40.9	5.4	50.7	13.3	46.8	8.9	68.3	4.4
14	32.2	3.1	8.2	4.6	24.1	8.7	68.3	4.4

30

表 1 5 (続き)

注射後 日数	抗体			
	H4H15355P2		H4H15345P	
	平均値	標準誤差	平均値	標準誤差
1	68.4	3.8	59.3	3.6
4	58.4	3.0	46.3	16.2
7	35.7	6.6	50.1	3.9
14	3.1	0.8	35.9	4.6

40

## 【 0 2 2 6】

50

## 【表 16】

表 16. 試験 3、血清 A b (μg/mL)

注射後 日数	抗体									
	対照		H4H15350P2		H4H15314P2		H4H15330P		H4H15361P2	
	平均値	標準 誤差	平均値	標準 誤差	平均値	標準 誤差	平均値	標準 誤差	平均値	標準 誤差
1	47.3	7.0	57.2	23.4	89.9	13.0	38.3	14.7	50.0	13.6
4	50.6	13.4	66.1	22.6	69.9	12.9	35.4	0.9	57.4	10.1
7	38.8	9.2	39.9	14.7	48.6	17.3	30.0	5.1	38.7	11.1

10

## 【0227】

## 【表 17】

表 17 試験 4、血清 A b (μg/mL)

注射後 日数	抗体									
	対照		H4H15357P2		H4H15363P2		H4H15347P		H4H15369P	
	平均値	標準 誤差	平均値	標準 誤差	平均値	標準 誤差	平均値	標準 誤差	平均値	標準 誤差
1	100.9	100.9	78.4	26.7	93.2	10.1	53.6	7.5	99.7	15.6
6	84.0	84.0	56.9	14.8	62.0	7.6	9.5	2.9	68.0	12.0

20

## 【0228】

## 【表 18】

表 18. 試験 5、血清 A b (μg/mL)

注射後 日数	抗体							
	対照		H4H15353P2		H4H15323P		H4H15362P2	
	平均値	標準誤差	平均値	標準誤差	平均値	標準誤差	平均値	標準誤差
2	93.7	14.4	63.5	17.6	99.9	34.5	91.0	24.6
8	79.8	8.7	42.8	11.1	50.3	9.7	50.8	10.3
14	55.1	11.4	18.2	14.0	32.3	10.0	29.5	20.9

30

表 18. (続き)

注射後日数	抗体			
	H4H15334P		H4H15354P2	
	平均値	標準誤差	平均値	標準誤差
2	64.4	15.0	71.3	7.2
8	38.7	7.1	46.0	15.4
14	8.6	4.6	30.1	26.6

## 【0229】

## 【表 19】

表 19. 試験 6、血清 A b (μg/mL)

注射後 日数	抗体							
	対照		H4H15316P		H4H15335P		H4H15346P	
	平均値	標準誤差	平均値	標準誤差	平均値	標準誤差	平均値	標準誤差
2	87.4	9.2	79.3	18.5	66.9	17.5	61.1	22.8
7	97.4	23.0	77.9	12.8	78.6	16.2	56.7	23.7

50

## 【0230】

実施例 7：ヒト化 A N G P T L 8 マウスにおける h A N G P T L 8 抗体 H 4 H 1 5 3 4 1 P の用量応答

血清トリグリセリド ( T G ) に及ぼす異なる用量の h A N G P T L 8 m A b、H 4 H 1 5 3 4 1 P の効果を、ヒト化 A N G P T L 8 マウスで評価した。実験の 7 日前にマウスを事前採血し、試験する各用量について、各 5 匹のマウスのグループに分けた。H 4 H 1 5 3 4 1 P を 1、5、10 及び 25 m g / k g で投与し、無関係の特異性を有するものとして、アイソタイプ適合 ( h I g G 4 ) 対照を 10 m g / k g で、試験の 0 日目に単回皮下注射により投与した。抗体注入後 2、7、14 及び 21 日目にマウスより採血し ( 非絶食 )、血清中の T G レベルを A D V I A ( 登録商標 ) 1800 C h e m i s t r y S y s t e m ( S i e m e n s ) で測定した。各時点について平均値を計算した。血清 T G 濃度の ( 平均 ± 標準誤差 ) として表した結果を図 1 に示す。

10

【 0 2 3 1 】

循環抗 - ヒト抗体 ( 血清 A b ) のレベルを、標準的な E L I S A 分析法を用いて測定した。簡潔に述べると、プレートをやぎ抗ヒト F c 抗体 ( S i g m a - A l d r i c h ) で被覆して、血清 A b を捕捉した。次に血清をプレートに添加し、捕捉した抗体を西洋ワサビダーゼ ( H R P ) 結合やぎ抗ヒト I g G 抗体 ( S i g m a - A l d r i c h ) を用いて化学発光により検出した。結果を ( 平均 ± 標準誤差 ) として図 2 に示す。

対照 A b は、アイソタイプ適合対照 A b を接受したマウスを指す。

【 0 2 3 2 】

結果：

20

循環 T G 及びコレステロールレベルに及ぼす異なる 4 つの用量の H 4 H 1 5 3 4 1 P ( 抗 h A N G P T L 8 ) の効果を、ヒト化 A N G P T L 8 マウスで試験した。H 4 H 1 5 3 4 1 P は、用量依存的に血清 T G が顕著に持続的な減少をもたらした ( 対照 m A b と比較して平均 66 % まで ) 5 m g / k g が最も低量で有効な用量である。総コレステロールレベルについては何の効果も観察されなかった。

【 0 2 3 3 】

実施例 8 ヒト化 A N G P T L 8 マウスにおける h A N G P T L 8 m A b 治療後のリボタンパク質リパーゼ ( L P L ) 活性の評価

ヒト化 A N G P T L 8 マウスで、L P L 活性に及ぼす h A N G P T L 8 m A b ( H 4 H 1 5 3 4 1 P ) 投与の効果を評価した。実験の 7 日前にマウスを事前採血し、試験する各用量について、各 5 匹のマウスのグループに分けた。H 4 H 1 5 3 4 1 P 及び対照 A b を、試験の 0 日目に単回皮下注射により 10 m g / k g で投与した。試験の 4 日目に、尾静脈を介した静脈内注射によりヘパリン 250 U / k g をマウスに投与し、血管内皮表面から L P L を放出させた。5 分後、マウスの眼窩後洞から採血し、ヘパリン後血漿を収集し、分画して、ヘパリン - セファロースクロマトグラフィーを用いて肝性リパーゼから L P L を分離した。ヘパリン後血漿を、G E A k t a P r i m e により制御したヘパリン - セファロース H i T r a p カラム ( G E H e a l t h c a r e ) 1.0 m l 上に充填し、N a C l 0.25 M、グリセロール 20 %、B S A 1 %、リン酸ナトリウム 10 m M、p H 6.5 で平衡化した。カラムを平衡化緩衝液 10 m l で洗浄し、N a C l 30 m l の勾配 ( グリセロール 20 %、B S A 1 %、リン酸ナトリウム 10 m M、p H 6.5 中 0.25 ~ 1.5 M ) で溶離した。得られた画分を肝性リパーゼ及び L P L ピークによりプールし、リパーゼ活性を I n v i t r o g e n E n z c h e k L i p a s e 基質 ( カタログ番号 E 33955 ) を用いて分析した。動力学的反応を、M o l e c u l a r D e v i c e s S p e c t r a M a x i 3 プレートリーダーにより励起 482 n m / 発光 518 n m で読み取った。相対蛍光単位 ( R F U ) ( 平均値 ± 標準誤差 ) として表した結果を図 3 に示した。対照 A b は、アイソタイプが一致する陰性対照 A b を接受したマウスを指す。

30

40

【 0 2 3 4 】

結果

結果は、ヒト化 A N G P T L 8 マウスへの H 4 H 1 5 3 4 1 P ( 抗 h A N G P T L 8 )

50

の投与が L P L 活性の有意な増加をもたらし、肝臓リパーゼ活性に影響を及ぼさないことを示した。

#### 【0235】

実施例 9 . h A N G P T L 8 m A b H 4 H 1 5 3 4 1 P で治療したヒト化 A N G P T L 8 マウスにおける脂質耐性試験

トリグリセリド排出能に対する m A b H 4 H 1 5 3 4 1 P による A N G P T L 8 阻害の効果を、急性脂肪負荷により評価した。ヒト化 A N G P T L 8 マウスを実験の 8 日前に予め採血し、試験した各 m A b について 6 匹のマウスのグループに分けた。H 4 H 1 5 3 4 1 P 及びアイソタイプ適合対照 A b を、試験の第 0 日に単回皮下注射により 10 m g / k g で投与した。試験の 4 日目に、体重 1 g あたり 2 . 5  $\mu$  l の 20 % イントラリピッド ( B a x t e r H e a l t h c a r e , I L ) の静脈内投与後、マウスを 4 時間絶食させた。その後の時点で尾静脈から採取した血液中の T G レベルを評価した。T G 濃度の ( 平均  $\pm$  標準誤差 ) として表した結果を図 4 に示す。対照 A b は、アイソタイプが一致した陰性対照 A b を受けたマウスを指す。

#### 【0236】

##### 結果

ヒト化 A N G P T L 8 マウスへの H 4 H 1 5 3 4 1 P ( 抗 h A N G P T L 8 ) の投与は、対照抗体と比較して急性脂肪負荷後の T G レベルの有意な低下をもたらす。これらのデータは、H 4 H 1 5 3 4 1 P が、A N G P T L 8 を遮断することにより、循環からの T G の排出能を促進することを示唆している。

#### 【0237】

実施例 10 . アンジオポエチン様タンパク質 8 の H i S e n s e 線形エピトープマッピング

H i S e n s e 線状ペプチドを用いたペプスキャン分析を用いて、抗体 H 4 H 1 5 3 4 1 P 及び H 4 H 1 5 3 6 7 P 2 の線状エピトープを確立した。この試験は P e p s c a n P r e s t o B V ( Z u i d e r s l u i s w e g 2 , 8 2 4 3 R C , L e l y s t a d , T h e N e t h e r l a n d s ) で実施した。すべての P e p s c a n データは、社内で開発した P o s t g r e S Q L ストレージバックエンドで構築された独自のデータベースアプリケーションである P e p l a b <sup>TM</sup> ソフトウェアパッケージに格納されている。

#### 【0238】

##### ペプチドの合成

標的分子のエピトープを再構築するために、ペプチドのライブラリーを合成した。アミノ官能化ポリプロピレン支持体は、独自の親水性ポリマー配合物をグラフト化し、続いて N ヒドロキシベンゾトリアゾール ( H O B t ) を有するジシクロヘキシルカルボジイミド ( D C C ) を用いて t - ブチルオキシカルボニル - ヘキサメチレンジアミン ( B o c H M D A ) と反応させ、続いてトリフルオロ酢酸 ( T F A ) を用いて B o c 基を切断する。標準的な F m o c ペプチド合成を使用して、カスタム変性した J A N U S 液体処理ステーション ( P e r k i n E l m e r ) によりアミノ官能化固体支持体上のペプチドを合成した。

#### 【0239】

##### アレイ上へのアンジオポエチン様タンパク質 8 の結合

標的タンパク質を、陽性対照としてミニカード上に結合させた。アンジオポエチン様タンパク質 8 ( h A N G P T L 8 - m F c ) をアレイに結合させるために、m - マレイミドベンゾイル - N - ヒドロキシスクシンイミドエステル ( M B S ) 及びグルタルアルデヒド ( G D A ) の 2 種類の架橋剤を使用した。M B S については、h A N G P T L 8 - m F c 40  $\mu$  l を M B S ( 2 m g / m l ) 1  $\mu$  l と混合し、室温で 45 分間インキュベートし、次いでリンカーモチーフ C G G C G G ( 配列番号 346 ) を含む位置でアレイ上に適用した。G D A 連結のために、リン酸緩衝液 ( p H 5 . 0 ) 中の 0 . 05 % G D A をアレイ上に適用し、室温で 4 時間インキュベートし、次にリン酸緩衝液 p H 8 . 0 中濃度 5 又は 2

0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の h A N G P T L 8 - m F c を G l y のみを含むアレイ上の位置に添加し遊離 N 末端へのカップリングを可能にする。

#### 【0240】

##### E L I S A スクリーニング

合成ペプチドの各々への抗体の結合を、P E P S C A N ベースの E L I S A で試験した。ペプチドアレイを一次抗体溶液（4 で一晩）と共にインキュベートした。洗浄後、ペプチドアレイを、適切な抗体ペルオキシダーゼコンジュゲート（ヤギ抗ヒト H R P コンジュゲート、S o u t h e r n B i o t e c h、カタログ番号 2 0 1 0 - 0 5）の 1 / 1 0 0 0 希釈液とともに 2 5 で 1 時間インキュベートした。洗浄後、ペルオキシダーゼ基質 2、2'-アジノ-ジ-3-エチルベンズチアゾリンスルホネート（A B T S）2 0  $\mu\text{l}$  /  $\text{ml}$  となるように 3 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  を添加した。1 時間後、発色を測定した。発色は、電荷結合素子（C C D）カメラ及び画像処理システムで定量化した。

#### 【0241】

##### スクリーニングの詳細

抗体結合は、抗体の濃度、及び E L I S A 緩衝液中の競合タンパク質の量及び性質を含む因子の組み合わせに依存する。又、プレコート条件（実験サンプルによるインキュベーション前のペプチドアレイの特異的処理）は結合に影響を与える。これらの詳細を以下に要約する。

#### 【表 2 0】

ラベル	希釈	サンプル緩衝液	前処理
H4H15341P	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	100% SQ	100% SQ
H4H15367P2	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	100% SQ	100% SQ
陰性アイソタイプ対照	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	100% SQ	100% SQ

P e p s c a n B u f f e r 及び P r e c o n d i t i o n i n g ( S Q ) に関する数値は競合タンパク質（ウマ血清とオボアルブミンの組み合わせ）の相対量を示す。

#### 【0242】

##### 情報処理

C C D カメラから得られた値は、標準 9 6 ウェルプレート E L I S A リーダーと同様に 0 ~ 3 0 0 0 m A U の範囲である。結果は定量化され、P e p l a b データベースに保存した。場合により、ウェルに気泡が含まれているため、偽陽性の値があり、カードを手動で検査し、気泡に起因する値は何れも 0 として記録される。

#### 【0243】

##### 合成の品質管理

合成されたペプチドの品質を確認するために、陽性対照ペプチド及び陰性対照ペプチドを別々のセットとして並行して合成した。これらを抗体 5 7 . 9 でスクリーニングした（P o s t h u m u s、ら、1 9 9 0 J V i r o l 6 4 : 3 3 0 4 - 3 3 0 9）。

#### 【0244】

##### 結果

##### ペプチドの設計

以下のペプチドセットを標的配列上で合成した：

ヒト A N G P T L 8、成熟配列、N P \_ 0 6 1 1 5 7 . 3 由来のアミノ酸 2 2 - 1 9 8  
 1 A P M G G P E L A Q H E E L T L L F H G T L Q L G Q A L N G V Y R T T E  
 G R L T K A R N S L G L Y G 5 0  
 5 1 R T I E L L G Q E V S R G R D A A Q E L R A S L L E T Q M E E D I L Q  
 L Q A E A T A E V L G E V A Q 1 0 0

1 0 1 A Q K V L R D S V Q R L E V Q L R S A W L G P A Y R E F E V L K A H  
A D K Q S H I L W A L T G H V Q 1 5 0

1 5 1 R Q R R E M V A Q Q H R L R Q I Q E R L H T A A L P A 1 7 7 ( 配列番  
号 3 4 7 )

【 0 2 4 5 】

抗体を、A N G P T L 8 の全配列をカバーする一連の 1 5 - m e r ペプチドへの結合について試験し、各ペプチドは次のアミノ酸から 1 アミノ酸分オフセットした。より精密なエピトープ分析のために一連の試験用ペプチド内の二重アラニン ( 「 A A 」 ) 置換も含めた。

セット 1 模倣体：線形 タイプ：L I N

10

説明 1 残基のオフセットを有するアンジオポエチン様タンパク質 8 の標的配列に由来する長さ 1 5 のペプチド。

配列 ( 最初の 1 0 個 )

A P M G G P E L A Q H E E L T ( 配列番号 3 4 8 )

P M G G P E L A Q H E E L T L ( 配列番号 3 4 9 )

M G G P E L A Q H E E L T L L ( 配列番号 3 5 0 )

G G P E L A Q H E E L T L L F ( 配列番号 3 5 1 )

G P E L A Q H E E L T L L F H ( 配列番号 3 5 2 )

P E L A Q H E E L T L L F H G ( 配列番号 3 5 3 )

E L A Q H E E L T L L F H G T ( 配列番号 3 5 4 )

20

L A Q H E E L T L L F H G T L ( 配列番号 3 5 5 )

A Q H E E L T L L F H G T L Q ( 配列番号 3 5 6 )

Q H E E L T L L F H G T L Q L ( 配列番号 3 5 7 )

セット 2 模倣体：線形 タイプ：L I N . A A

説明 セット 1 のペプチドであるが、1 0 位及び 1 1 位の残基が A l a で置換されている。未変性の A l a が何れかの位置に存在する場合、それは G l y に置き換えられる。このセットのペプチドの順序は無作為である。アレイ上の実際の順序を表示した。

配列 ( 最初の 1 0 個 )

T A E V L G E V A A G Q K V L ( 配列番号 3 5 8 )

V Y R T T E G R L A A A R N S ( 配列番号 3 5 9 )

30

G V Y R T T E G R A A K A R N ( 配列番号 3 6 0 )

V Q R L E V Q L R A G W L G P ( 配列番号 3 6 1 )

L T G H V Q R Q R A A M V A Q ( 配列番号 3 6 2 )

V L K A H A D K Q A A I L W A ( 配列番号 3 6 3 )

L R D S V Q R L E A A L R S A ( 配列番号 3 6 4 )

R R E M V A Q Q H A A R Q I Q ( 配列番号 3 6 5 )

V S R G R D A A Q A A R A S L ( 配列番号 3 6 6 )

A Y R E F E V L K G A A D K Q ( 配列番号 3 6 7 )

【 0 2 4 6 】

スクリーニングした E L I S A の結果を未処理でプロットに供し、( ボックスプロット、データは非表示 ) 各データセットを描示し、各データセット内の平均 E L I S A シグナル、分布及び異常値を示した。実験条件 ( 抗体の量、遮断強度等 ) に依存して、E L I S A データの異なる分布を得た。

40

【 0 2 4 7 】

抗体 H 4 H 1 5 3 6 7 P 2

高ストリンジェンシー条件下で試験した場合、抗体 H 4 H 1 5 3 6 7 P 2 は、配列 1 A P M G G P E L A Q H E E L T 1 5 ( 配列番号 3 4 8 ) からなる 1 つの線状ペプチドのみに貪欲に結合した。このサンプルを同じ条件下で 2 回試験し、同じ結果を繰り返し得た。抗体 H 4 H 1 5 3 6 7 P 2 は又、陽性対照としてアレイに結合したアンジオポエチン様タンパク質 8 に強く結合した。興味深いことに、G D A 結合と比較した場合、M B S を用い

50

て結合した標的タンパク質では幾分弱い結合が得られた。

#### 【 0 2 4 8 】

抗体 H 4 H 1 5 3 4 1 P

高ストリンジエンシー条件下で試験すると、抗体 H 4 H 1 5 3 4 1 P は、共通配列<sub>150</sub>Q R Q R R E M V A Q<sub>159</sub>（配列番号 3 6 8）を含む一連の線状ペプチドに貪欲に結合した。セット 1（未変性線状エピトープ模倣体）及びセット 2（二重 A l a 変異体）に記録された強度特性を比較すると、残基 R 1 5 4、E 1 5 5 及び Q 1 5 9 が抗体結合に必須であることを示した。抗体 H 4 H 1 5 3 4 1 P は又、固定化にかかわらず、陽性対照としてアレイに結合したアンジオポエチン様タンパク質 8 に強く結合した。

#### 【 0 2 4 9 】

陰性アイソタイプ対照

陰性アイソタイプ対照は、アレイ上に存在するいずれのペプチドにも結合しなかった。

更に、陽性対照としてアレイに結合したアンジオポエチン様タンパク質 8 に関する記録には、検出可能な結合は全くなかった。陰性アイソタイプ対照を、P e p s c a n E L I S A 中で使用し、ヤギ抗ヒト二次コンジュゲートで更に試験した。この二次コンジュゲートにより抗体を認識出来た。

#### 【 0 2 5 0 】

結論

この試験のために供した 3 種の抗体を H i S e n s e ペプチドアレイ上で試験した。

2 種の抗体については暫定的線状エピトープを確立することが可能であった。インキュベーションを繰り返したにもかかわらず、抗体陰性アイソタイプ対照はアレイに結合しなかった。この試験で同定されたコア暫定エピトープを以下に列挙した。

#### 【表 2 1】

抗体

コアエピトープ

H4H15341P

<sub>150</sub>Q R Q R R E M V A Q<sub>159</sub> (配列番号 368)

H4H15367P2

<sub>1</sub>APMGGPELAQHEELT<sub>15</sub> (配列番号 348)

陰性アイソタイプ対照

—

#### 【 0 2 5 1 】

従って、抗体 H 4 H 1 5 3 4 1 P 及び H 4 H 1 5 3 6 7 P 2 は、それぞれ C 末端及び N 末端内の明確な線状配列を認識する。M B S とカップリングした抗体 H 4 H 1 5 3 6 7 P 2 について得られたシグナルが、G D A とのカップリングよりも、少ないという事実は、それが N 末端上に極端に偏在することと共に、N 末端アミン自体がエピトープの一部であり得ることを示した。更に、抗体 H 4 H 1 5 3 4 1 P については、二重アラニン変異体が、結合に重要な残基（上記、明灰色の陰影を付けた残基）を特定するのに役立っていた。

#### 【 0 2 5 2 】

抗体 H 4 H 1 5 3 4 1 P はアンジオポエチン様タンパク質 8 の C 末端領域を標的とするが、H 4 H 1 5 3 6 7 P 2 はまさしく N 末端を標的とする。抗体陰性アイソタイプ対照はアレイに結合しなかった。

10

20

30

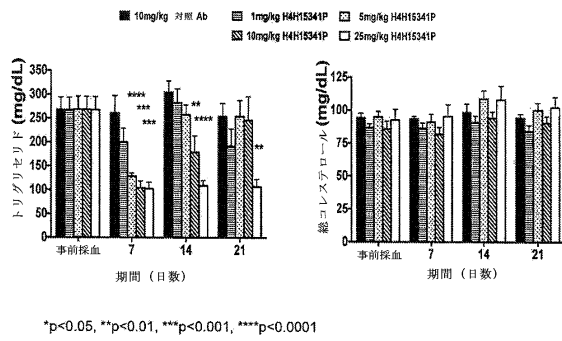
40

50

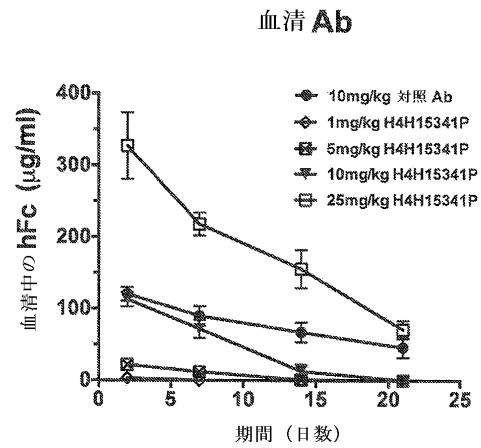


【図面】

【図 1】

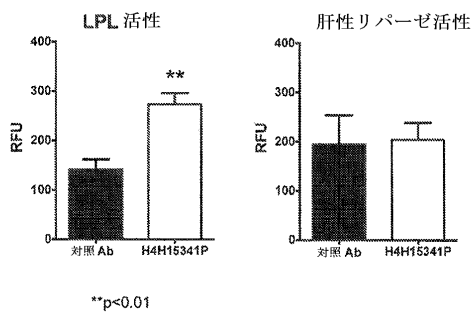


【図 2】

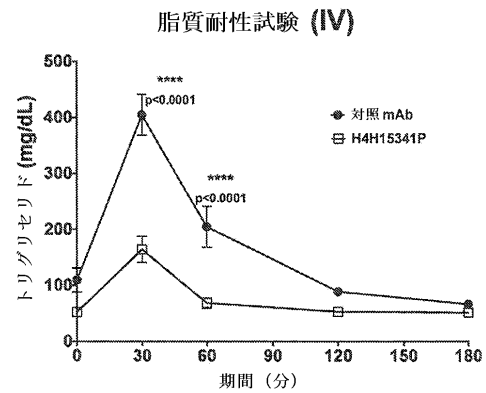


10

【図 3】



【図 4】



30

【配列表】

[0007141333000001.app](#)

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

F I

A 6 1 P	3/10 (2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	9/04 (2006.01)	A 6 1 P	9/04	
A 6 1 P	9/10 (2006.01)	A 6 1 P	9/10	
A 6 1 P	9/12 (2006.01)	A 6 1 P	9/10	1 0 1
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	A 6 1 P	9/12	
		C 1 2 N	15/13	

バーロード 7 7 7 . リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド

(72)発明者 ジェスパー・グロマーダ

アメリカ合衆国ニューヨーク州 1 0 5 9 1 . タリータウン . オールドソーミルリバーロード 7 7 7  
. リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド

(72)発明者 アンドリュー・ジェイ・マーフィー

アメリカ合衆国ニューヨーク州 1 0 5 9 1 . タリータウン . オールドソーミルリバーロード 7 7 7  
. リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド

(72)発明者 デーヴィッド・アール・バックラー

アメリカ合衆国ニューヨーク州 1 0 5 9 1 . タリータウン . オールドソーミルリバーロード 7 7 7  
. リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド

## 合議体

審判長 長井 啓子

審判官 川合 理恵

審判官 高堀 栄二

(56)参考文献 特表 2 0 1 4 - 5 1 6 5 1 8 ( J P , A )

Zhang , R . A , Endocrine Society ' s 97th Annual M  
eeting and Expo , 2015 . 3 . 8 , OR13 - 6Purified anti - Betatrophin (ANGPTL8) Antibody , 2014 . 7 . 25 , retrieved from the Internet , r  
etrieved on 2020 . 7 . 15 , <URL : https : // www . bi  
olegend . com / en - us / global - elements / pdf - po  
pup / purified - anti - betatrophin - angptl8 - an  
tibody - 10113 >

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C12N 15/00-15/90

C07K 16/00-16/46

JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 ( J Dream I I I )

CAPLus / REGISTRY ( STN )