(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2017-512457
(P2017-512457A)
(43)公表日　平成29年5月25日(2017.5.25)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B064
C07K 19/00	(2006.01)	C07K	19/00		4B065
C07K 16/18	(2006.01)	C07K	16/18		4C076
C07K 14/575	(2006.01)	C07K	14/575		4C084
C12P 21/02	(2006.01)	C12P	21/02	C	4C085

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 133 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2016-544406 (P2016-544406)
(86)(22)出願日　平成27年2月20日 (2015.2.20)
(85)翻訳文提出日　平成28年7月1日 (2016.7.1)
(86)国際出願番号　PCT/US2015/016911
(87)国際公開番号　WO2015/127273
(87)国際公開日　平成27年8月27日 (2015.8.27)
(31)優先権主張番号　61/944,550
(32)優先日　平成26年2月25日 (2014.2.25)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　61/943,300
(32)優先日　平成26年2月21日 (2014.2.21)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　504333972
メディミューン，エルエルシー
アメリカ合衆国　２０８７８　メリーランド州，ゲイサーズバーグ，ワン　メディミューン　ウェイ
(71)出願人　506042265
メディミューン　リミテッド
イギリス国　シービー２１　６ジーエイチ　ケンブリッジシャー，ケンブリッジ，グランタ　パーク，ミルステイン　ビルディング
(74)代理人　100091096
弁理士　平木　祐輔
(74)代理人　100118773
弁理士　藤田　節

最終頁に続く

(54)【発明の名称】抗ＰＣＳＫ９～ＧＬＰ－１融合物および使用方法

(57)【要約】
本願は、抗ＰＣＳＫ９－ＧＬＰ－１融合物および使用のための方法を提供する。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ＧＬＰ－１ペプチドに安定に融合された抗ＰＣＳＫ９抗体を含む糖尿病を治療するための二重活性融合分子であって、ここで前記抗ＰＣＳＫ９抗体はＰＣＳＫ９ポリペプチドに結合し、また前記ＧＬＰ－１ペプチドはＧＬＰ－１受容体に結合する、二重活性融合分子。
【請求項２】
前記ＧＬＰ－１ペプチドが、前記ＰＣＳＫ９抗体にペプチドリンカーを介して融合される、請求項１に記載の融合分子。
【請求項３】
前記ペプチドリンカーが、前記ＧＬＰ－１ペプチドのＣ末端に融合される、請求項２に記載の融合分子。
【請求項４】
前記ＧＬＰ－１ペプチドが、配列番号３６のアミノ酸配列を含む、請求項１～３のいずれか一項に記載の融合分子。
【請求項５】
前記ＧＬＰ－１ペプチドが、配列番号３のアミノ酸配列を含む、請求項１～３のいずれか一項に記載の融合分子。
【請求項６】
前記ＧＬＰ－１ペプチドのＣｙｓ１８が、前記ＧＬＰ－１ペプチドのＣ末端とジスルフィド架橋を形成する、請求項５に記載の融合分子。
【請求項７】
動物において、グルコースを調節し、および／またはＬＤＬを低下させる、請求項１～６のいずれか一項に記載の融合分子。
【請求項８】
前記動物がヒトである、請求項７に記載の融合分子。
【請求項９】
配列番号３のアミノ酸配列を含むＧＬＰ－１ペプチドに安定に融合された抗ＰＣＳＫ９抗体を含む糖尿病を治療するための二重活性融合分子であって、ここで前記ＧＬＰ－１ペプチドのＣ末端は、前記抗ＰＣＳＫ９抗体にペプチドリンカーを介して融合され、また前記抗ＰＣＳＫ９抗体はＰＣＳＫ９ポリペプチドに結合し、かつ前記ＧＬＰ－１ペプチドはＧＬＰ－１受容体に結合する、二重活性融合分子。
【請求項１０】
前記ＧＬＰ－１ペプチドが、前記抗ＰＣＳＫ９抗体の軽鎖にペプチドリンカーを介して融合される、請求項９に記載の二重活性融合分子。
【請求項１１】
前記ＧＬＰ－１ペプチドが、前記抗ＰＣＳＫ９抗体の重鎖にペプチドリンカーを介して融合される、請求項９に記載の二重活性融合分子。
【請求項１２】
配列番号３のアミノ酸配列を含むＧＬＰ－１ペプチドに安定に融合された抗体を含む二重活性融合分子であって、ここで前記ＧＬＰ－１ペプチドのＣ末端は、前記抗体にペプチドリンカーを介して融合され、また前記抗体は標的ポリペプチドに結合し、かつ前記ＧＬＰ－１ペプチドはＧＬＰ－１受容体に結合する、二重活性融合分子。
【請求項１３】
前記抗体が抗ＰＣＳＫ９抗体である、請求項１２に記載の二重活性融合分子。
【請求項１４】
前記ＧＬＰ－１ペプチドが、前記抗ＰＣＳＫ９抗体の軽鎖にペプチドリンカーを介して融合される、請求項１３に記載の二重活性融合分子。
【請求項１５】
前記ＧＬＰ－１ペプチドが、前記抗ＰＣＳＫ９抗体の重鎖にペプチドリンカーを介して

融合される、請求項１３に記載の二重活性融合分子。
【請求項１６】
前記抗ＰＣＳＫ９抗体の軽鎖が、配列番号２のアミノ酸配列と少なくとも９０％同一である、請求項１０または１４に記載の二重活性融合分子。
【請求項１７】
前記抗ＰＣＳＫ９抗体の軽鎖が、配列番号２のアミノ酸配列を含む、請求項１６に記載の二重活性融合分子。
【請求項１８】
前記抗ＰＣＳＫ９抗体の重鎖が、配列番号１のアミノ酸配列と少なくとも９０％同一である、請求項１１または１５に記載の二重活性融合分子。
【請求項１９】
前記抗ＰＣＳＫ９抗体の重鎖が、配列番号１のアミノ酸配列を含む、請求項１８に記載の二重活性融合分子。
【請求項２０】
前記ペプチドリンカーが、配列番号４のアミノ酸配列を含む、請求項１２～１９のいずれか一項に記載の二重活性融合分子。
【請求項２１】
前記二重活性融合分子が糖尿病の治療を目的とする、請求項１２～２０のいずれか一項に記載の二重活性融合分子。
【請求項２２】
前記ＧＬＰ－１ペプチドの前記Ｃｙｓ１８が、前記ＧＬＰ－１ペプチドのＣ末端とジスルフィド架橋を形成する、請求項１２～２１のいずれか一項に記載の二重活性融合分子。
【請求項２３】
動物において、グルコースを調節し、および／またはＬＤＬを低下させる、請求項１２～２２のいずれか一項に記載の二重活性融合分子。
【請求項２４】
前記動物がヒトである、請求項２３に記載の二重活性融合分子。
【請求項２５】
配列番号２８または配列番号２９のアミノ酸配列を含むＧＬＰ－１ペプチドと比べて、前記ヒトＧＬＰ－１受容体で低下した効力を有するＧＬＰ－１ペプチドに安定に融合された抗ＰＣＳＫ９抗体を含む、糖尿病を治療するための二重活性融合分子であって、ここで前記ＧＬＰ－１ペプチドのＣ末端は、ペプチドリンカーを介して前記抗ＰＣＳＫ９抗体に融合され、また前記抗ＰＣＳＫ９抗体はＰＣＳＫ９ポリペプチドに結合し、かつ前記ＧＬＰ－１ペプチドはＧＬＰ－１受容体に結合する、二重活性融合分子。
【請求項２６】
配列番号２８または配列番号２９のアミノ酸配列を含む前記ＧＬＰ－１ペプチドは、配列番号４を含むリンカーを用いて、配列番号４１６を含むアミノ酸配列に融合される、請求項２５に記載の二重活性融合分子。
【請求項２７】
前記ヒトＧＬＰ－１受容体での前記効力は、配列番号２８または配列番号２９のアミノ酸配列を含むＧＬＰ－１ペプチドと比べて３０～６０倍低下する、請求項２５または２６に記載の二重活性融合分子。
【請求項２８】
２型糖尿病を治療する方法であって、それを必要とする被験者に、請求項１～２７のいずれか一項に記載の融合分子を投与するステップを含む、方法。
【請求項２９】
被験体におけるグルコースを調節する方法であって、それを必要とする被験者に、請求項１～２７のいずれか一項に記載の融合分子を投与するステップを含む、方法。
【請求項３０】
被験体における低密度リポタンパク質（ＬＤＬ）を低減する方法であって、それを必要

とする被験者に、請求項１～２７のいずれか一項に記載の融合分子を投与するステップを含む、方法。
【請求項３１】
被験体におけるグルコースを調節し、かつＬＤＬを低下させる方法であって、それを必要とする被験者に、請求項１～２７のいずれか一項に記載の融合分子を投与するステップを含む、方法。
【請求項３２】
被験体における体重減少を促進し、グルコースを調節し、かつＬＤＬを低下させる方法であって、それを必要とする被験者に、請求項１～２７のいずれか一項に記載の融合分子を投与するステップを含む、方法。
【請求項３３】
前記被験体が２型糖尿病を有する、請求項２８～３２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３４】
前記被験体がメタボリックシンドロームを有する、請求項２８～３２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３５】
請求項１～２７のいずれか一項に記載の融合分子をコードする単離されたポリヌクレオチド。
【請求項３６】
請求項３５に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。
【請求項３７】
請求項３５に記載のポリヌクレオチドまたは請求項３６に記載のベクターを含む宿主細胞。
【請求項３８】
請求項１～２７のいずれか一項に記載の融合分子を作成する方法であって、請求項３５に記載の宿主細胞を前記融合分子の発現を可能にする条件下で培養するステップと、前記融合分子を回収するステップと、を含む、方法。
【請求項３９】
請求項１～２７のいずれか一項に記載の融合分子、および担体を含む医薬組成物。
【請求項４０】
請求項３９に記載の組成物を含むキット。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
抗ＰＣＳＫ９～ＧＬＰ－１融合物および使用方法。
【背景技術】
【０００２】
糖尿病は、心血管罹患率および死亡率の増加に関連している。高血圧、高脂血症、および糖尿病は、独立的に心血管疾患リスクの増大に関連している。２型糖尿病を有する被験体は、糖尿病を有しない場合と比べて心血管疾患リスクが２～４倍増大する。
【０００３】
グルカゴン様ペプチド－１（ＧＬＰ－１）は、代謝および心血管における便益を有する多面ペプチドとして公知である。それは、グルカゴン、グルカゴン様ペプチド－１（ＧＬＰ－１）、グルカゴン様ペプチド－２（ＧＬＰ－２）およびオキシントモジュリン（ＯＸＭ）を含む多数の異なるプログルカゴン由来ペプチドを形成するように異なる組織内で処理される１５８アミノ酸前駆体ポリペプチドのプレプログルカゴンに由来し、グルコースホメオスタシス、インスリン分泌、胃排出、および腸管成長、ならびに食物摂取の調節を含む、多種多様な生理学的機能に関与する。ＧＬＰ－１は、プログルカゴンのアミノ酸７２～１０８（プレプログルカゴンの９２～１２８）に対応する３７アミノ酸ペプチドとして生成される。主要な生物活性形態は、食事後腸内で生成され、豊富に存在する内因性プ

ロテアーゼ－ＤＰＰ４によって迅速に分解される３０アミノ酸ペプチドホルモン（ＧＬＰ－１（７－３７）酸）である。Ｂａｇｇｉｏ，Ｌ．ａｎｄ　Ｄｒｕｃｋｅｒ，Ｄ．，Ｇａｓｔｅｒｏｅｎｔｅｒｏｌｏｇｙ，１３２：２１３１－２１５７（２００７）。

【０００４】

ＧＬＰ－１受容体で作動薬として作用するＧＬＰ－１およびＧＬＰ－１類似体は、例えば２型糖尿病での有効な低血糖コントロールであることが示されている。例えば、リラグルチド（Ｎｏｖｏ　Ｎｏｒｄｉｓｋ製のＶｉｃｔｏｚａ（登録商標））、デュラグルチド（Ｅｌｉ　Ｌｉｌｌｙ）、ビデュリオン（ＡＺ／ＢＭＳ）、アルビグルチド（ＧＳＫ）およびエキセナチド（Ｅｌｉ　Ｌｉｌｌｙ／Ａｍｙｌｉｎ製のＢｙｅｔｔａ（登録商標））を含む特定のＧＬＰ－１類似体は、２型糖尿病の治療用に販売されているかまたは開発中である。

【０００５】

ＧＬＰ－１療法の開始後の主な副作用の一つは、胃腸副作用、特に悪心である。この副作用は、一過性であり、経時的に消散し、用量増加により軽減され得る。しかし、治療は、胃腸副作用を許容することができる患者に制限される。

【０００６】

ＰＣＳＫ９は、ＬＤＬコレステロールの低下のための非酵素的な標的であり、ＰＣＳＫ９の突然変異は、ＬＤＬコレステロールおよび冠動脈心疾患の低下に相関する。Ｃｏｈｅｎ　ＪＣ，Ｎ　Ｅｎｇｌ　Ｊ　Ｍｅｄ，３５４：１２６４（２００６）。ＰＣＳＫ９抗体は、スタチン治療患者においてＬＤＬコレステロールを低下させることが示されており、また複数の候補が臨床的レビューを受けている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【０００７】

【非特許文献１】Ｂａｇｇｉｏ，Ｌ．ａｎｄ　Ｄｒｕｃｋｅｒ，Ｄ．，Ｇａｓｔｅｒｏｅｎｔｅｒｏｌｏｇｙ，１３２：２１３１－２１５７（２００７）

【非特許文献２】Ｃｏｈｅｎ　ＪＣ，Ｎ　Ｅｎｇｌ　Ｊ　Ｍｅｄ，３５４：１２６４（２００６）

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００８】

糖尿病および心血管疾患に対して複数の個別治療が存在する一方、単一の医薬組成物が両方の病態（および糖尿病と心血管疾患との間の関係）に対処するという必要性が存在する。二重の活性を有する単一の医薬化合物を提供することは、副作用、患者のコンプライアンスに伴う困難を低減し、また個々の患者に対する有益なアウトカムを増大させ、また医療システムによって負担されるコストを低減することになる。

【課題を解決するための手段】

【０００９】

本説明に従って開示されるのは、ＧＬＰ－１ペプチドに安定に融合された抗ＰＣＳＫ９抗体を含む、糖尿病を治療するための二重活性融合分子であって、ここで抗ＰＣＳＫ９抗体はＰＣＳＫ９ポリペプチドに結合し、かつＧＬＰ－１ペプチドはＧＬＰ－１受容体に結合する、二重活性融合分子である。

【００１０】

一態様では、ＧＬＰ－１ペプチドは、リンカーペプチドを介してＰＣＳＫ９抗体に融合される。

【００１１】

さらなる方法では、リンカーペプチドは、ＧＬＰ－１ペプチドのＣ末端に融合される。

【００１２】

一実施形態では、ＧＬＰ－１ペプチドは、配列番号３６のアミノ酸配列を含む。

【００１３】

一実施形態では、ＧＬＰ－１ペプチドは、配列番号３のアミノ酸配列を含む。

【００１４】

一方法では、ＧＬＰ－１分子のＣｙｓ１８は、リンカーペプチドと、またはＧＬＰ－１ペプチド自体とジスルフィド架橋を形成する。

【００１５】

一態様では、融合分子は、動物において、グルコースを調節し、および／またはＬＤＬを低下させる。動物はヒトであってもよい。

【００１６】

また開示されるのは、配列番号３のアミノ酸配列を含むＧＬＰ－１ペプチドに安定に融合された抗ＰＣＳＫ９抗体を含む糖尿病を治療するための二重活性融合分子であって、ここでＧＬＰ－１ペプチドのＣ末端は、ペプチドリンカーを介して抗ＰＣＳＫ９抗体の軽鎖に融合され、またここで抗ＰＣＳＫ９抗体はＰＣＳＫ９ポリペプチドに結合し、かつＧＬＰ－１ペプチドはＧＬＰ－１受容体に結合する、二重活性融合分子である。

【００１７】

開示される別の実施形態は、２型糖尿病を治療する方法であって、それを必要とする被験者に、本明細書に記載の融合分子を投与するステップを含む、方法である。

【００１８】

さらなる態様は、それを必要とする被験者に、本明細書に記載の融合分子を投与するステップを含む。

【００１９】

一方法では、被験体における低密度リポタンパク質（ＬＤＬ）を低減する方法は、それを必要とする被験者に、本明細書に記載の融合分子を投与するステップを含む。

【００２０】

別の態様は、被験体において、グルコースを調節し、かつＬＤＬを低下させる方法であって、それを必要とする被験者に、本明細書に記載の融合分子を投与するステップを含む、方法を包含する。

【００２１】

別の態様は、被験体において、体重減少を促進し、かつＬＤＬを低下させる方法であって、それを必要とする被験者に、本明細書に記載の融合分子を投与するステップを含む、方法を包含する。

【００２２】

一実施形態では、被験体は２型糖尿病を有する。

【００２３】

別の実施形態では、被験体はメタボリックシンドロームを有する。

【００２４】

さらなる態様は、配列番号３のアミノ酸配列を含むＧＬＰ－１ペプチドに安定に融合された抗体を含み、ここでＧＬＰ－１ペプチドのＣ末端は、ペプチドリンカーを介して抗体の軽鎖に融合され、またここで抗体は標的ポリペプチドに結合し、かつＧＬＰ－１ペプチドはＧＬＰ－１受容体に結合する、二重活性融合分子である。

【００２５】

さらなる態様は、配列番号３６のアミノ酸配列を含むＧＬＰ－１ペプチドに安定に融合された抗体を含む二重活性融合分子であり、ここでＧＬＰ－１ペプチドのＣ末端は、ペプチドリンカーを介して抗体の軽鎖に融合され、またここで抗体は標的ポリペプチドに結合し、かつＧＬＰ－１ペプチドはＧＬＰ－１受容体に結合する。

【００２６】

一部の態様では、ＧＬＰ－１分子は、配列番号３６のアミノ酸配列を含む。一部の態様では、抗体は抗ＰＣＳＫ９抗体である。

【００２７】

特定の方法では、抗ＰＣＳＫ９抗体の軽鎖は、配列番号２のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％同一である。他の方法では、抗ＰＣＳＫ９抗体の軽鎖は、配列番号２のアミ

ノ酸配列を含む。さらなる方法では、抗ＰＣＳＫ９抗体の重鎖は、配列番号１のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％同一である。一部の態様では、抗ＰＣＳＫ９抗体の重鎖は、配列番号１のアミノ酸配列を含む。

【００２８】

一部の実施形態では、ペプチドリンカーは、配列番号４のアミノ酸配列を含む。二重活性融合分子の一部の実施形態では、ＧＬＰ－１分子のＣｙｓ１８は、ＧＬＰ－１ペプチドのＣ末端とジスルフィド架橋を形成する。

【００２９】

一部の実施形態では、二重活性融合分子は、糖尿病を治療することを目的とする。一部の実施形態では、二重活性融合分子は、動物において、グルコースを調節し、および／またはＬＤＬを低下させる。

【００３０】

一部の方法では、動物はヒトである。

【００３１】

一部の実施形態は、糖尿病を治療するための二重活性融合分子であって、ヒトＧＬＰ－１受容体で、配列番号２９のアミノ酸配列を含むＧＬＰ－１ペプチドと比べて効力が低下しているＧＬＰ－１ペプチドに安定に融合された抗ＰＣＳＫ９抗体を含み、ここでＧＬＰ－１ペプチドのＣ末端は、ペプチドリンカーを介して抗ＰＣＳＫ９抗体に融合され、またここで抗ＰＣＳＫ９抗体はＰＣＳＫ９ポリペプチドに結合し、かつＧＬＰ－１ペプチドはＧＬＰ－１受容体に結合する、二重活性融合分子を含む。一部の実施形態では、配列番号２８または配列番号２９のアミノ酸配列を含むＧＬＰ－１ペプチドは、配列番号４を含むリンカーを用いて、配列番号４１６を含むアミノ酸配列に融合される。さらなる実施形態では、請求項２５または２６に記載の二重活性融合分子であって、ヒトＧＬＰ－１受容体での効力は、配列番号２８または配列番号２９のアミノ酸配列を含むＧＬＰ－１ペプチドと比べて３０～６０倍低下する、二重活性融合分子。

【００３２】

一部の実施形態は、本明細書に記載の融合分子をコードする単離されたポリヌクレオチドを含む。

【００３３】

特定の方法では、包含されるのは、本明細書に記載のポリヌクレオチドを含むベクターである。他の方法では、宿主細胞は、本明細書に記載のポリヌクレオチドまたはベクターを含む。

【００３４】

一部の実施形態では、融合分子を作成する方法は、宿主細胞を融合分子の発現を可能にする条件下で培養するステップと、融合分子を回収するステップと、を含む。

【００３５】

一部の方法では、医薬組成物は、本明細書に記載の融合分子および担体を含む。一部の方法では、キットは、本明細書に記載の組成物を含む。

【００３６】

さらなる目的および利点は、一部には以下に続く説明中に示されることになり、また一部には説明から自明となるか、または実行によって学習され得る。対象および利点は、特に添付の特許請求の範囲にて指摘される要素および組み合わせにより、実現され、達成されることになる。

【００３７】

前述の一般的説明および以下の詳細な説明の双方があくまで典型的かつ説明的なものであり、また特許請求の範囲を限定するものではないことは理解されるべきである。

【００３８】

添付の図面は、本明細書に組み込まれ、その一部を構成するものであり、１つの（いくつかの）実施形態を図示し、その記述とともに、本明細書に記載の原則を説明するのに役立つ。

【図面の簡単な説明】
【００３９】
【図１Ａ】本明細書に記載される通りの二重作用融合分子における模式図である。
【図１Ｂ－Ｄ】抗体－ペプチド融合分子の特定の実施形態の模式図を示す。
【図１Ｅ－Ｆ】図１Ｅは、生殖系列配列１－４６（ＤＰ－７）とともにＰＣ９＃２可変重鎖を数で付番して用いた整列化を示す。不一致は黒色を背景とした白色で示される。図１Ｆは、生殖系列配列ＶＫ１Ｏ１８Ｏ８（ＤＰＫ１）とともにＰＣ９＃２可変軽鎖を数で付番して用いた整列化を示す。不一致は黒色を背景とした白色で示される。
【図２Ａ－Ｂ】重鎖Ｎ末端での抗ＰＣＳＫ９抗体／ＧＬＰ－１ペプチド融合物による抗ＰＣＳＫ９　ｍＡｂへのヒトＰＣＳＫ９の結合の阻害を示す。
【図２Ｃ－Ｄ】重鎖Ｎ末端での抗ＰＣＳＫ９抗体／ＧＬＰ－１ペプチド融合物による抗ＰＣＳＫ９　ｍＡｂへのヒトＰＣＳＫ９の結合の阻害を示す。
【図２Ｅ－Ｆ】重鎖Ｎ末端での抗ＰＣＳＫ９抗体／ＧＬＰ－１ペプチド融合物による抗ＰＣＳＫ９　ｍＡｂへのヒトＰＣＳＫ９の結合の阻害を示す。
【図２Ｇ】重鎖Ｎ末端での抗ＰＣＳＫ９抗体／ＧＬＰ－１ペプチド融合物による抗ＰＣＳＫ９　ｍＡｂへのヒトＰＣＳＫ９の結合の阻害を示す。
【図３Ａ－Ｂ】軽鎖Ｎ末端での抗ＰＣＳＫ９抗体／ＧＬＰ－１ペプチド融合物による抗ＰＣＳＫ９　ｍＡｂへのヒトＰＣＳＫ９の結合の阻害を示す。
【図３Ｃ－Ｄ】軽鎖Ｎ末端での抗ＰＣＳＫ９抗体／ＧＬＰ－１ペプチド融合物による抗ＰＣＳＫ９　ｍＡｂへのヒトＰＣＳＫ９の結合の阻害を示す。
【図３Ｅ－Ｆ】軽鎖Ｎ末端での抗ＰＣＳＫ９抗体／ＧＬＰ－１ペプチド融合物による抗ＰＣＳＫ９　ｍＡｂへのヒトＰＣＳＫ９の結合の阻害を示す。
【図３Ｇ】軽鎖Ｎ末端での抗ＰＣＳＫ９抗体／ＧＬＰ－１ペプチド融合物による抗ＰＣＳＫ９　ｍＡｂへのヒトＰＣＳＫ９の結合の阻害を示す。
【図４Ａ－Ｂ】抗体重鎖での抗ＰＣＳＫ９抗体／ＧＬＰ－１ペプチドＮ末端融合物によるヒトＧＬＰ１－受容体の活性化を示す。
【図５Ａ】対照抗体ＮＩＰ２２８との重鎖融合物中のＧＬＰ－１類似体におけるラットでの安定性を示す。
【図５Ｂ】抗ＰＣＳＫ９抗体ＰＣ９＃２との軽鎖融合物中のＥｘｅｎｄｉｎ－４　ＧＬＰ－１類似体におけるラットでの安定性を示す。
【図５Ｃ】ヒトＩｇＧ４　Ｆｃ断片との融合物中のＧＬＰ－１類似体におけるマウスでの安定性を示す。
【図５Ｄ】抗ＰＣＳＫ９抗体ＰＣ９＃２との軽鎖融合物中のＧＬＰ－１類似体におけるマウスでの安定性を示す。
【図６】ＰＣＳＫ９の親和性およびＧＬＰ－１の効力を導くための有望な目標特性を示す。
【図７Ａ－Ｂ】図７Ａは、組み込まれたＮ－グリコシル化共通モチーフを有する８つの化合物におけるペプチドおよびリンカーアミノ酸配列を提供する。図７Ｂは、ジスルフィド架橋を組み込んだ３つの化合物におけるペプチドアミノ酸配列を提供する。
【図８Ａ－Ｂ】ＰＣ９＃２＿ＧＬＰ１分子ならびにベンチマーク対照として用いられる抗ＰＣ９＃２抗体およびＧＬＰ－１Ｆｃ（Ｇ４）の視覚的表現を示す。
【図９】対照抗体ＮＩＰ２２８）との重鎖融合物中のＧＬＰ－１類似体であるＮＩＰ２２８＿ＧＬＰ１＿ＶＨのラットでの安定性を示す。
【図１０】抗ＰＣＳＫ９抗体ＰＣ９＃２との軽鎖融合物中のＧＬＰ－１類似体であるＰＣ９＃２＿ＧＬＰ－１＿ＶＬのマウスでの安定性を示す。
【図１１】抗ＰＣＳＫ９抗体ＰＣ９＃２との軽鎖融合物中のＥｘｅｎｄｉｎ－４類似体ＤＳＢ＃３であるＰＣ９＃２＿ＤＳＢ＃３のマウスでの安定性を示す。
【図１２】抗ＰＣＳＫ９抗体ＰＣ９＃２との軽鎖融合物中のＧＬＰ－１類似体ＮＧＳ＃７であるＰＣ９＃２＿ＮＧＳ＃７のマウスでの安定性を示す。
【図１３Ａ】抗ＰＣＳＫ９抗体ＰＣ９＃２との軽鎖融合物中のＧＬＰ－１類似体ＮＧＳ＃

７のマウスでの安定性を図示する。
【図１３Ｂ】抗ＰＣＳＫ９抗体ＰＣ９＃２との軽鎖融合物中のＥｘｅｎｄｉｎ－４類似体ＤＳＢ＃１のマウスでの安定性を示す。
【図１３Ｃ】抗ＰＣＳＫ９抗体ＰＣ９＃２との軽鎖融合物中のＥｘｅｎｄｉｎ－４類似体ＤＳＢ＃３のマウスでの安定性を図示する。
【図１４Ａ】ベンチマーク化合物ＧＬＰ－１－Ｆｃ融合物におけるマウスでの安定性を示す。白四角：血清中の試験分子の経時的濃度；白菱形：同試料における（ＧＬＰ－１活性による測定としての）「活性」試験分子の経時的濃度。
【図１４Ｂ】抗ＰＣＳＫ９抗体ＰＣ９＃２との軽鎖融合物中のＥｘｅｎｄｉｎ－４類似体ＤＳＢ＃１におけるマウスでの安定性を示す。白四角：血清中の試験分子の経時的濃度；白菱形：同一試料における（ＧＬＰ－１活性による測定としての）「活性」試験分子の経時的濃度。
【図１５Ａ】初期プロテインＡ精製後の抗ＰＣＳＫ９抗体ＰＣ９＃２との軽鎖融合物中のＥｘｅｎｄｉｎ－４類似体ＤＳＢ＃１における分取ＳＥＣクロマトグラムを提供する。
【図１５Ｂ】初期プロテインＡ精製後の抗ＰＣＳＫ９抗体ＰＣ９＃２との軽鎖融合物中のＥｘｅｎｄｉｎ－４類似体ＤＳＢ＃３における分取ＳＥＣクロマトグラムを提供する。
【図１６】初期プロテインＡ精製後の抗ＰＣＳＫ９抗体ＰＣ９＃２との軽鎖融合物中のＥｘｅｎｄｉｎ－４類似体ＤＳＢ＃１の分析用ＳＥＣ－ＨＰＬＣ特性を示す。
【図１７】システイン架橋を組み込んだ付加的なＥｘｅｎｄｉｎ－４変異体ペプチドのアミノ酸配列を示す。システイン残基が黒色で示され、他の突然変異残基が下線で示され、Ｃ末端キャップでの付加的なグリシン残基が灰色で示される。
【図１８】初期プロテインＡ精製後の抗ＰＣＳＫ９抗体ＰＣ９＃２との軽鎖融合物中のＥｘｅｎｄｉｎ－４類似体ＤＳＢ＃７における分取ＳＥＣクロマトグラムを提供する。
【図１９】初期プロテインＡ精製後の抗ＰＣＳＫ９抗体ＰＣ９＃２との軽鎖融合物中のＥｘｅｎｄｉｎ－４類似体ＤＳＢ＃９における分取ＳＥＣクロマトグラムを提供する。
【図２０】抗ＰＣＳＫ９抗体ＰＣ９＃２との軽鎖融合物中のＥｘｅｎｄｉｎ－４類似体ＤＳＢ＃７におけるラットでの安定性を示す。
【図２１】抗ＰＣＳＫ９抗体ＰＣ９＃２との軽鎖融合物中のＥｘｅｎｄｉｎ－４類似体ＤＳＢ＃９におけるラットでの安定性を図示する。
【図２２Ａ】ＰＣＳＫ９抑制用のインパクト（ｉｍｐａｃｔ）ＰＣＳＫ９／ＧＬＰ－１融合物のヒトでのシミュレーションを示す。
【図２２Ｂ】ＰＣＳＫ９／ＧＬＰ－１融合分子のデュラグルチドと比べてのＧＬＰ－１アゴニズム活性におけるヒトでのシミュレーションを図示する。
【図２３】ＰＣ９＿２＿ＤＳＢ＃７についての改善された単量体特性を示す。
【図２４】ラットでのペプチド／抗体分子の単回静脈内注射後の薬物動態学的特性を図示する。
【図２５】競合ＥＬＩＳＡを用いてのヒトＰＣＳＫ９のＬＤＬ受容体への結合の阻害を示す。
【図２６】ＨｅｐＧ２細胞でのＬＤＬ取り込みのヒトＰＣＳＫ９依存性低下の阻害を示す。
【図２７】ヒトＧＬＰ－１受容体での改変された効力の低下を示す。
【図２８Ａ】抗ＰＣＳＫ９抗体ＨＳ９との軽鎖融合物中のＥｘｅｎｄｉｎ－４　ＧＬＰ－１類似体ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａに対するヒトＧＬＰ１ｒ　ｃＡＭＰアッセイを示す。
【図２８Ｂ】抗ＰＣＳＫ９抗体ＨＳ９との軽鎖融合物中のＥｘｅｎｄｉｎ－４　ＧＬＰ－１類似体ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａにおけるラットでの安定性を図示する。
【図２９Ａ－Ｄ】ｃＡＭＰアッセイによって測定された、ＧＬＰ－１受容体に対する融合分子ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９の特異性を示す。
【図３０Ａ】より優れたグルコース調節を、投与後７日目を含んで経時的に示す。
【図３０Ｂ】より優れた体重減少を、投与後７日目を含んで経時的に示す。
【図３１】異なるリンカーを用いるＧＬＰ－１類似体ペプチドＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａとの融

合物中のＨＳ９抗ＰＣＳＫ９抗体のヒトＰＣＳＫ９への結合を示す。
【図３２】異なるリンカーを用いる抗ＰＣＳＫ９抗体ＨＳ９との融合物中のＧＬＰ－１類似体ペプチドＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａを用いたヒトＧＬＰ－１受容体の活性化を示す。
【図３３】ＧＬＰ－１類似体ペプチドＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａとの融合物中の抗ＰＣＳＫ９抗体のヒトＰＣＳＫ９への結合を図示する。
【図３４】抗ＰＣＳＫ９抗体との融合物中のＧＬＰ－１類似体ペプチドＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａを用いたヒトＧＬＰ－１受容体の活性化を図示する。
【図３５】ＧＬＰ－１類似体ペプチドＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａとの融合物中の抗Ｂ７－Ｈ１抗体２．７Ａ４のヒトＢ７－Ｈ１への結合を示す。
【図３６】抗Ｂ７－Ｈ１抗体２．７Ａ４との融合物中のＧＬＰ－１類似体ペプチドＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａを用いたヒトＧＬＰ－１受容体の活性化を示す。
【図３７】融合分子ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａにおける６０、３０または１０ｍｇ／ｋｇでの単回静脈内注射後のラットでの安定性を記載する。
【図３８】ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａにおける６０、３０、または１０ｍｇ／ｋｇでの単回静脈内注射後のラットでの遊離ＰＣＳＫ９濃度を示す。
【図３９】ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａにおける６０ｍｇ／ｋｇでの単回皮下注射後のラットにおける全化合物、ＧＬＰ－１受容体での活性化合物および遊離ＰＣＳＫ９濃度を示す。
【図４０Ａ】経口グルコース負荷試験からの結果（０日目）を提供し、ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａの単回皮下投与の能力が確認された。
【図４０Ｂ】経口グルコース負荷試験からの結果（２日目）を提供し、ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａの単回皮下投与の能力が確認された。
【図４０Ｃ】経口グルコース負荷試験からの結果（７日目）を提供し、ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａの単回皮下投与の能力が確認された。
【図４１】図４０Ａ～Ｃの経口グルコース負荷試験における経時的体重変化を示す。
【図４２Ａ】経口グルコース負荷試験からの結果（０日目）を図示する。
【図４２Ｂ】経口グルコース負荷試験からの結果（２日目）を図示する。
【図４２Ｃ】経口グルコース負荷試験からの結果（７日目）を図示する。
【図４３】図４２Ａ～Ｃの経口グルコース負荷試験における経時的体重変化を提供する。
【図４４】腹腔内グルコース負荷試験における体重変化を示す。
【図４５】４時間空腹時血糖において、腹腔内グルコース負荷試験における溶媒対照と比べて週毎のＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａが用量依存性の低下を呈したことを示す。
【図４６】試験２２日目でのＩＰＧＴＴによる評価として、週毎に投与されたＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａが耐糖能における用量依存性の改善を呈したことを示す。
【図４７Ａ－Ｂ】食餌誘発性肥満マウスモデルにおける血糖レベルを示す。
【図４８Ａ－Ｂ】食餌誘発性肥満マウスモデルにおける体重（グラム）（Ａ）および体重の％変化（Ｂ）を示す。
【図４９】ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａを用いた複数回用量試験における経時的体重変化を示す。
【図５０Ａ－Ｂ】ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９ＡのＧＬＰ－１成分の血糖調節に対する効果を、週毎の投与設定による供給グルコースの測定（Ａ）および終了時空腹時血糖の測定（Ｂ）で示す。
【発明を実施するための形態】
【００４０】
配列の説明
表１は、本実施形態中で参照される特定の配列のリストを提供する。
【００４１】

【表１】

表1		
記述	配列	配列番号
	グループA	
抗PCSK9抗体重鎖(HS9_VH)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT**SYYMH**WVRQAPGQGLEWMG**EISPSGGSTSYNQKFQG**RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR**ERPLYASDL**WGQGTTVTVSS	1.
抗PCSK9抗体軽鎖(HS9_Vk)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**QASQDVKTAVA**WYQQKPGKAPKLLIY**SASYRYT**GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYC**QQRYSLWRT**FGQGTKLEIK	2.
システイン架橋および二重変異を有するGLP-1部分 リンカーに対するシステイン架橋を指定する*とともに、 効力を低減し、CDTPに一致させるための点突然変異を指定する^(悪心副作用を伴わない最大効力)、 およびシスルフィド結合を最適化し、凝集を低減するための点突然変異を指定する#	*^ HGEGTFTSDLSKQMEEE**CA**RLFIEWLKNGGPSSGAPPP**G**CG # リンカー	3.
リンカー	GGGGSGGGGSGGGGSA	4.

【００４２】

【表２】

抗PCSK9 抗体重鎖の pH依存性 バージョン (PC9#2_FG _VH)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT**SYYMH**WVRQAPGQGLEWMG**EIHPSGGSTSYNQKFQG**RVTMTRDT STSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR**ERPLYASDL**WGQGTTVTVSS	5.
抗PCSK9 抗体軽鎖の pH依存性 バージョン (PC9#2_FG _Vk)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**QASQDVHTAVA**WYQQKPGKAPKLLIY**HASYRYT**GVPSRFSGSGSGTDFTFT ISSLQPEDIATYYC**QQRYSLWRT**FGQGTKLEIK	6.
リンカーに 対して ジスルフィド 架橋を 作成するための システイン 変異を有する GLP-1 部分	* HGEGTFTSDLSKQMEE**C**VRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSCG	7.
抗体A pH 依存性 重鎖 (PC9_2_VH)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT**SYYMH**WVRQAPGQGLEWMG**EIHPSGGRTNYNEKFKS**RVTMTRDT STSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR**ERPLYASDL**WGQGTTVTVSS	8.

【００４３】

【表３】

抗体A pH依存性軽鎖 (PC9_2_Vk)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**KASQDVHTAVA**WYQQKPGKAPKLLIY**HASYRYT**GVPSRFSGSGSGTDFTFT ISSLQPEDIATYYC**QQRYSLWRT**FGQGTKLEIK	9.
抗体B 非pH依存性重鎖 (PC9_1_VH)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT**SYYMH**WVRQAPGQGLEWMG**EISPFGGRTNYNEKFKS**RVTMTRDT STSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR**ERPLYASDL**WGQGTTVTVSS	10.
抗体B 非pH依存性軽鎖 (PC9_1_Vk)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQGISSALA**WYQQKPGKAPKLLIY**SASYRYT**GVPSRFSGSGSGTDFTFT ISSLQPEDIATYYC**QQRYSLWRT**FGQGTKLEIK	11.
GLP-1部分(エキセナチド(Exe4))	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS	12.
リンカーを有するGLP-1部分DSB#7 (PC9_HS9_DSB#7)	HGEGTFTSDLSKQMEEECVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPGCGGGGSGGGGSGGGGSA	13.
抗PCSK9抗体重鎖CDR1 (PC9_2_HS9)	**SYYMH**	14.

【００４４】

【表４】

抗PCSK9 抗体 重鎖 CDR2 (PC9_2_HS9_VH)	**EISPSGGSTSYNQKFQG** 15.
抗PCSK9 抗体 重鎖 CDR2 (PC9#2_FG_VH)	**EIHPSGGSTSYNQKFQG** 16.
抗PCSK9 抗体 重鎖 CDR2 (PC9_2_VH)	**EIHPSGGRTNYNEKFKS** 17.
抗PCSK9 抗体 重鎖 CDR2 (PC9_1_VH)	**EISPFGGRTNYNEKFKS** 18.
抗PCSK9 抗体 重鎖 CDR3	**ERPLYASDL** 19.
抗PCSK9 抗体 軽鎖 CDR1 (PC9_2_HS9_Vk)	**QASQDVKTAVA** 20.

【００４５】

【表５】

抗PCSK9 抗体 軽鎖 CDR1 (PC9#2_FG_Vk)	QASQDVHTAVA
21.	
抗PCSK9 抗体 軽鎖 CDR1 (PC9_2_Vk)	KASQDVHTAVA
22.	
抗PCSK9 抗体 軽鎖 CDR1 (PC9_1_Vk)	RASQGISSALA
23.	
抗PCSK9 抗体 軽鎖 CDR2 (PC9_2_HS9_Vk) (PC9_1_Vk)	SASYRYT
24.	
抗PCSK9 抗体 軽鎖 CDR2 (PC9#2_FG_Vk) (PC9_2_Vk)	HASYRYT
25.	
抗PCSK9 抗体 軽鎖 CDR3	QQRYSLWRT
26.	

【００４６】

【表６】

リンカーリピート	GGGGS	27.
デュラグルチド からの GLP-1部分 (GLP-1 L)	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGG	28.
ヒト GLP-1 (7-37)	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG	29.
ジスルフィド 架橋 (DSB) #1 DSB#1を 有するGLP-1	HGEGTFTS**C**LSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGGGGGGGGG**C**GG	30.
DSB#2を 有するGLP-1	HGE**C**TFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGGGGGGGGG**C**G	31.
DSB#3を 有するGLP-1	HGEGTFTSDLSKQMEEE**C**VRLFIEWLKNGGPSSGAPPG**C**	32.
DSB#4を 有するGLP-1	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVR**C**FIEWLKNGGPSSGAGG**C**S	33.
DSB#5を 有するGLP-1	HGEGTFTS**C**LSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGGGGGGG**C**GG	34.
DSB#6を 有するGLP-1	HGEGTFTS**C**LSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGGGGGGGG**C**GGG	35.
DSB#7を 有するGLP-1	HGEGTFTSDLSKQMEEE**C**VRLFIEWLKNGGPSSGAPPPG**C**G	36.
DSB#8を 有するGLP-1	HGEGTFTSDLSKQMEEE**C**VRLFIEWLKNGGPSSGAPPGG**C**G	37.
DSB#9を 有するGLP-1	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVR**C**FIEWLKNGGPSSGAPP**C**GG	38.
DSB#10を 有するGLP-1	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVR**C**FIEWLKNGGPSSGAPPG**C**G	39.
DSB#11を 有するGLP-1	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIE**C**LKNGGPSSGA**C**GGS	40.

【００４７】

【表７】

DSB#12を有するGLP-1	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIE**C**LKNGGPSSGAP**C**PS	41.
DSB#13を有するGLP-1	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIE**C**LKNGGPSSGAPP**C**S	42.
下線が引かれた配列番号40のリンカーを伴うPC9#2_GLP1 VL (PC9_2_GLP1とも称される)	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGSGGGGSGGGGSADIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**K**ASQ DVHTAVAWYQQKPGKAPKLLIYHASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYY**C**QQRYSLWRTFGQG TKLEIKR	43.
DSB#7変異体G2V	H**V**EGTFTSDLSKQMEEE**C**VRLFIEWLKNGGPSSGAPPP**GCG**	44.
DSB#7変異体E15A	HGEGTFTSDLSKQM**A**EE**C**VRLFIEWLKNGGPSSGAPPP**GCG**	45.
DSB#7変異体L26I	HGEGTFTSDLSKQMEEE**C**VRLFIEW**I**KNGGPSSGAPPP**GCG**	46.
HS9_DSB7_V19A VL	***HGEGTFTSDLSKQMEEECARLFIEWLKNGGPSSGAPPPGCG***GGGSGGGGSGGGGSADIQMTQSPSSLSASVGD RVTITC**QASQDVKTAVA**WYQQKPGKAPKLLIY**SASYRYT**GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYC**QQR** **YSLWRT**FGQGTKLEIK	47.
PC9_2_DSB #1 VL	***HGEGTFTSCLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGGGGGGGGGCGG***GGGSGGGGSGGGGSADIQMT QSPSSLSASVGDRVTITC**KASQDVHTAVA**WYQQKPGKAPKLLIY**HASYRYT**GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQ PEDIATYYC**QQRYSLWRT**FGQGTKLEIKR	48.
PC9_2_DSB #3 VL	***HGEGTFTSDLSKQMEEECVRLFIEWLKNGGPSSGAPPGC***GGGGSGGGGSGGGGSADIQMTQSPSSLSASVGDRV TITC**KASQDVHTAVA**WYQQKPGKAPKLLIY**HASYRYT**GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYC**QQRYS** **LWRT**FGQGTKLEIKR	49.
PC9_2_NGS #7 VL	***HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIANLSKGGG***GGGSGGGGSGGGGSADIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**KASQ** **DVHTAVA**WYQQKPGKAPKLLIY**HASYRYT**GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYC**QQRYSLWRT**FGQG TKLEIKR	50.

【００４８】

【表８】

PC9_2_DSB #7 VL	***HGEGTFTTSDLSKQMEEECVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPGCG***GGGGSGGGGSGGGGSADIQMTQSPSSLSASVGD RVTITC**KASQDVHTAVA**WYQQKPGKAPKLLIY**HASYRYT**GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYC**QQR** **YSLWRT**FGQGTKLEIKR	51.
HS9_DSB#7 VL	***HGEGTFTTSDLSKQMEEECVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPGCG***GGGGSGGGGSGGGGSADIQMTQSPSSLSASVGD RVTITC**QASQDVKTAVA**WYQQKPGKAPKLLIY**SASYRYT**GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYC**QQR** **YSLWRT**FGQGTKLEIK	52.

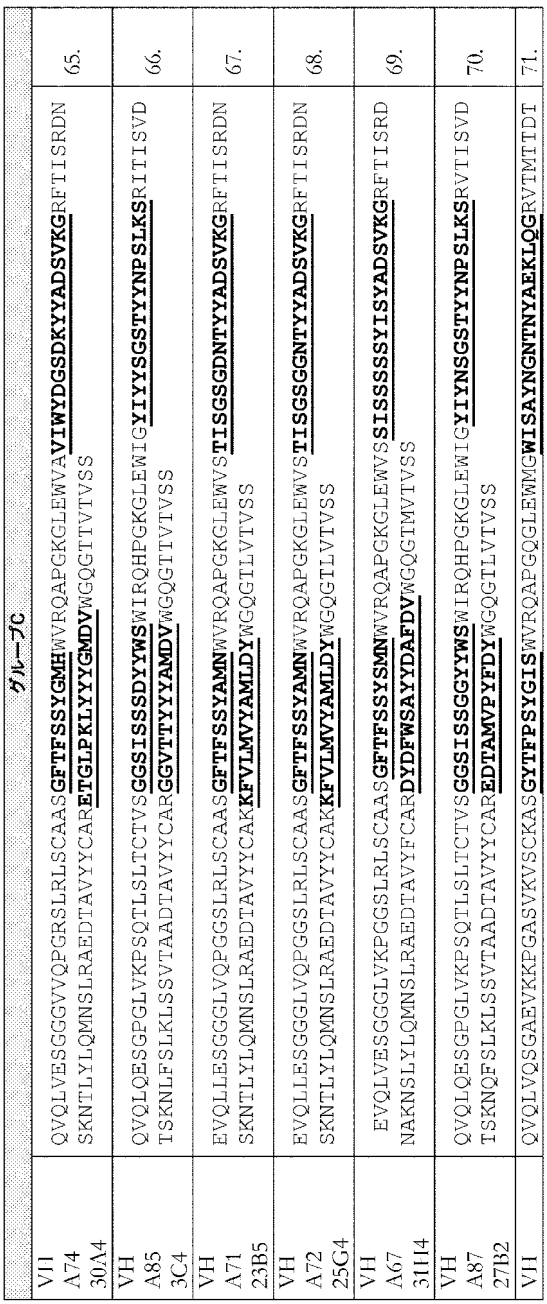
【００４９】

【表９】

グループB		
VH AB1 (pH-Dep)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT**SYYMH**WVRQAPGQGLEWMG**EIHPSGGRTNYNEKFKS**RVTMTRDT STSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR**ERPLYASDL**WGQGTTVTVSS	53.
VL AB1 (pH-Dep)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**KASQDVHTAVA**WYQQKPGKAPKLLIY**HASYRYT**GVPSRFSGSGSGTDFTFT ISSLQPEDIATYYC**QQRYSLWRT**FGQGTKLEIK	54.
VH AB2 1.11.3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS**GYTFTSY**YMHWVRQAPGQGLEWMGEI**SPFGGR**TNYNEKFKSRVTMTRDT STSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR**ERPLYASDL**WGQGTTVTVSS	55.
VL AB2 L1L3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQGISSALA**WYQQKPGKAPKLLIY**SASYRYT**GVPSRFSGSGSGTDFTFT ISSLQPEDIATYYC**QQRYSLWRT**FGQGTKLEIK	56.
VH AB3 4A5	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKAS**GYTFTDYYMN**WVKQSHGKSLEWIGDI**NPNNGG**TTYNQKFKGKATLTVDK SYSTAYMELRSLTSEDSAVYYCAR**WLLFAY**WGQGTLVTVSA	57.
VL AB3 4A5	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC**KASQNVGTNVA**WYQQKPGQSPKALIY**SASYRY**SGVPDRFTGSGSGTDFTLT ISNVLSEDLAEYFC**QQFYSYPYT**FGGGTKLEIKR	58.
VH AB4 5A10	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKAS**GYTFTSY**WMHWVKQRPGQGLEWIGEI**NPSNGR**TNYNEKFKSKATLTVDK SSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARER**PLYAMDY**WGQGTSVTVSS	59.
VL AB4 5A10	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITC**KASQDVSTAVA**WYQQKPGQSPKLLIY**SASYRY**TGVPDRFTGSGSGTDFTFT ISSVQAEDLAVYYC**QQRYSTPRT**FGGGTKLEIKR	60.
VH AB4 6F6	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKAS**GYTFTDY**YMNWVKQSHGKSLEWIGDI**NPNNGG**TSYNQKFKGKATLTVDK SSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCAGG**GIYYRYDRNYFDY**WGQGTTLTVSS	61.
VL AB4 6F6	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISC**SASQGISNYLN**WYQQKPDGTVKLLIY**YTSSLHS**GVPSRFSGSGSGTDYSLT ISNLEPEDIATYYC**QQYSKLPFT**FGSGTKLEIK	62.
VH AB4 7D4	EVKLVESEGGLVQPGSSMKLSCTASGFTF**SDYYMA**WVRQVPEKGLEWVA**NINYDGSNT**SYLDSLKSRFIISRDN AKNILYLQMSSLKSEDTATYYCAREKFA**AMDY**WGQGTSVTVSS	63.
VL AB4 7D4	DIVMTQSHKFMSTSFGDRVSITC**KASQDVSNALA**WYQQKPGHSPKLLIF**SASYRYT**GVPDRFTGSGSGTDFTFT ISSVQAEDLAVYYC**QQHYSTPWT**FGGGTKLEIKR	64.

【００５０】

【表１０】



グループC		
VH A74 30A4	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS**GFTFSSYGMH**WVRQAPGKGLEWVA**VIWYDGSDKYYADSVKG**RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**ETGLPKLYYYGMDV**WGQGTTVTVSS	65.
VH A85 3C4	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS**GGSISSSDYYWS**WIRQHPGKGLEWIG**YIYYSGSTYYNPSLKS**RITISVD TSKNLFSLKLSSVTAADTAVYYCAR**GGVTTYYYAMDV**WGQGTTVTVSS	66.
VH A71 23B5	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTFSSYAMN**WVRQAPGKGLEWVS**TISGSGDNTYYADSVKG**RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK**KFVLMVYAMLDY**WGQGTLVTVSS	67.
VH A72 25G4	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTFSSYAMN**WVRQAPGKGLEWVS**TISGSGGNTYYADSVKG**RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK**KFVLMVYAMLDY**WGQGTLVTVSS	68.
VH A67 31I4	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFSSYSMN**WVRQAPGKGLEWVS**SISSSSSYISYADSVKG**RFTISRD NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYFCAR**DYDFWSAYYDAFDV**WGQGTMVTVSS	69.
VH A87 27B2	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS**GGSISSGGYYWS**WIRQHPGKGLEWIG**YIYNSGSTYYNPSLKS**RVTISVD TSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR**EDTAMVFYFDY**WGQGTLVTVSS	70.
VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS**GYTFPSYGIS**WVRQAPGQGLEWMG**WISAYNGNTNYAEKLQG**RVTMTTDT	71.

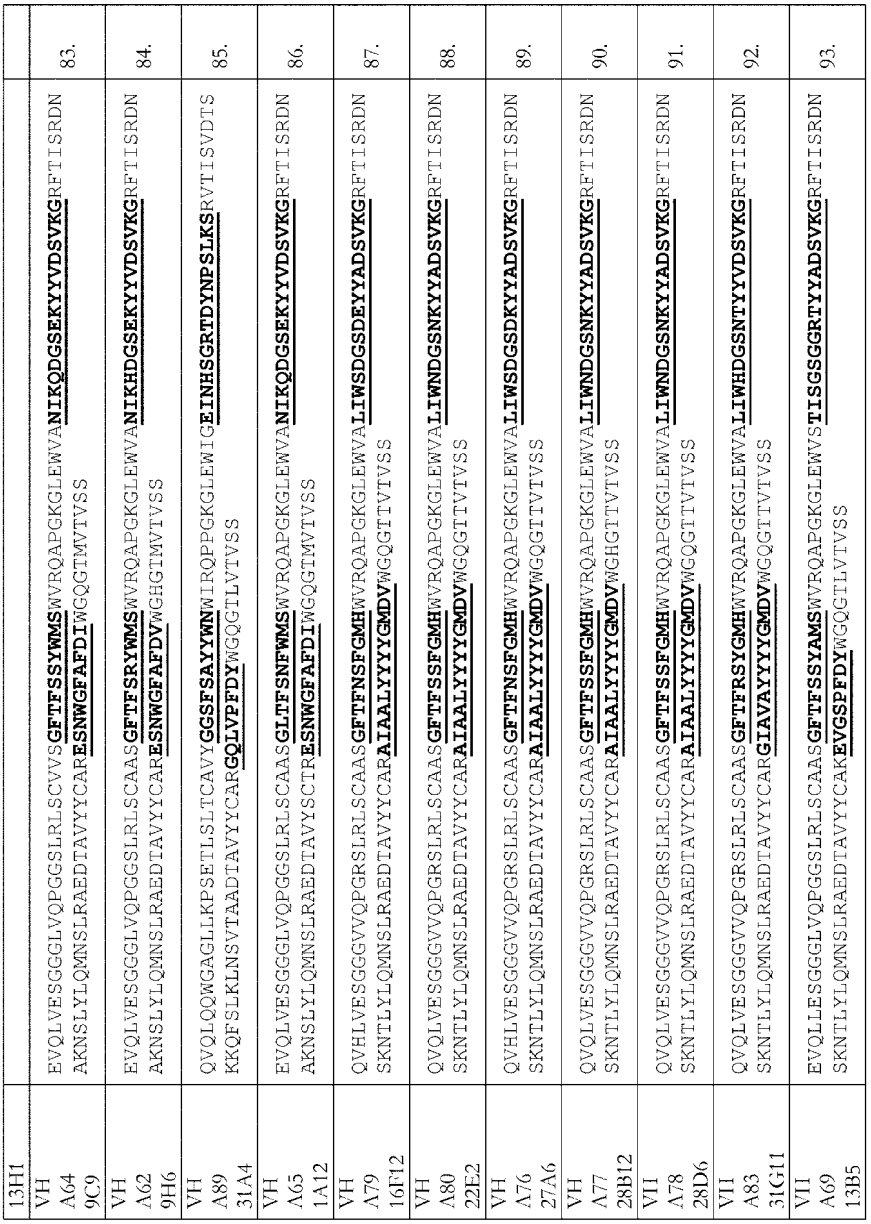
【００５１】

【表１１】

A58 25A7	STSTAYMEVRSLRSDDTAVFYCAR**GYVMDV**WGQGTTVTVSS	
VH A52 27H5	QVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKAS**GYTLTSYGIS**WVRQAPGQGLEWMG**WISVYNGNTNYAQKVQG**RVTMTTDT STSTVYMELRSLSSDDTAVYYCAR**GYGMDV**WGQGTTVTVSS	72.
VH A51 26H5	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS**GYTLTSYGIS**WVRQAPGQGLEWMG**WISFYNGNTNYAQKVQG**RVTMTTDT STSTVYMELRSLRSDDTAVYYCAR**GYGMDV**WGQGTTVTVSS	73.
VH A53 31D1	QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS**GYTLTSYGIS**WVRQAPGQGLEWMG**WISFYNGNTNYAQKVQG**RVTMTTDT STSTVYMELRSLRSDDTAVYFCAR**GYGMDV**WGQGTTVTVSS	74.
VH A48 20D10	QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS**GYPLTSYGIS**WVRQAPGQGLEWMG**WISAYNGNTNYAQKVQG**SVTMTTDT STSTVYMELRSLRSDDTAVYYCAR**GYGMDV**WGQGTTVTVSS	75.
VH A54 27E7	QVQLVQSGAEVKKPGASLKVSCKAS**GYSLTSYGIS**WVRQAPGQGLEWMG**WISAYNGNTNYAQKVQG**RVTMTTDT STSTVYMEVRSLRSDDTAVYYCAR**GYGMDV**WGQGTTVTVSS	76.
VH A55 30B9	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS**GYPLTSYGIS**WVRQAPGQGLEWMG**WISAYNGNTNYAQKVQG**RVTMTTDT STSTVYMELRSLRSDDTAVYYCAR**GYGMDV**WGQGTTVTVSS	77.
VH A56 19H9	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS**GYALTSYGIS**WVRQAPGQGLEWMG**WISAYNGNTNYAQKVQG**RVTMTTDT STSTVYMELRSLRSDDTAVYYCAR**GYGMDV**WGQGTTVTVSS	78.
VH A49 21B12	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS**GYTLTSYGIS**WVRQAPGQGLEWMG**WVSFYNGNTNYAQKLQG**RGTMTTDP STSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR**GYGMDV**WGQGTTVTVSS	79.
VH A57 17C2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS**GYSFTSYGIS**WVRQAPGQGLEWMG**WVSAYNGNTNYAQKFQG**RVTMTTDT STSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR**GYVMDV**WGQGTTVTVSS	80.
VH A50 23G1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS**GYTLTSYGIS**WVRQAPGQGLEWMG**WVSFYNGNTNYAQKLQG**RGTMTTDP STSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR**GYGMDV**WGQGTTVTVSS	81.
VH A91	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAIS**GDSVSSNSAAWN**WIRQSPSRGLEWLG**RTYYRSKWYKNYSVSVKS**RITIN PDTSKNQFSLQLNSVTPGDTAVYYCAR**GGPTAAFDY**WGQGTLVTVSS	82.

【００５２】

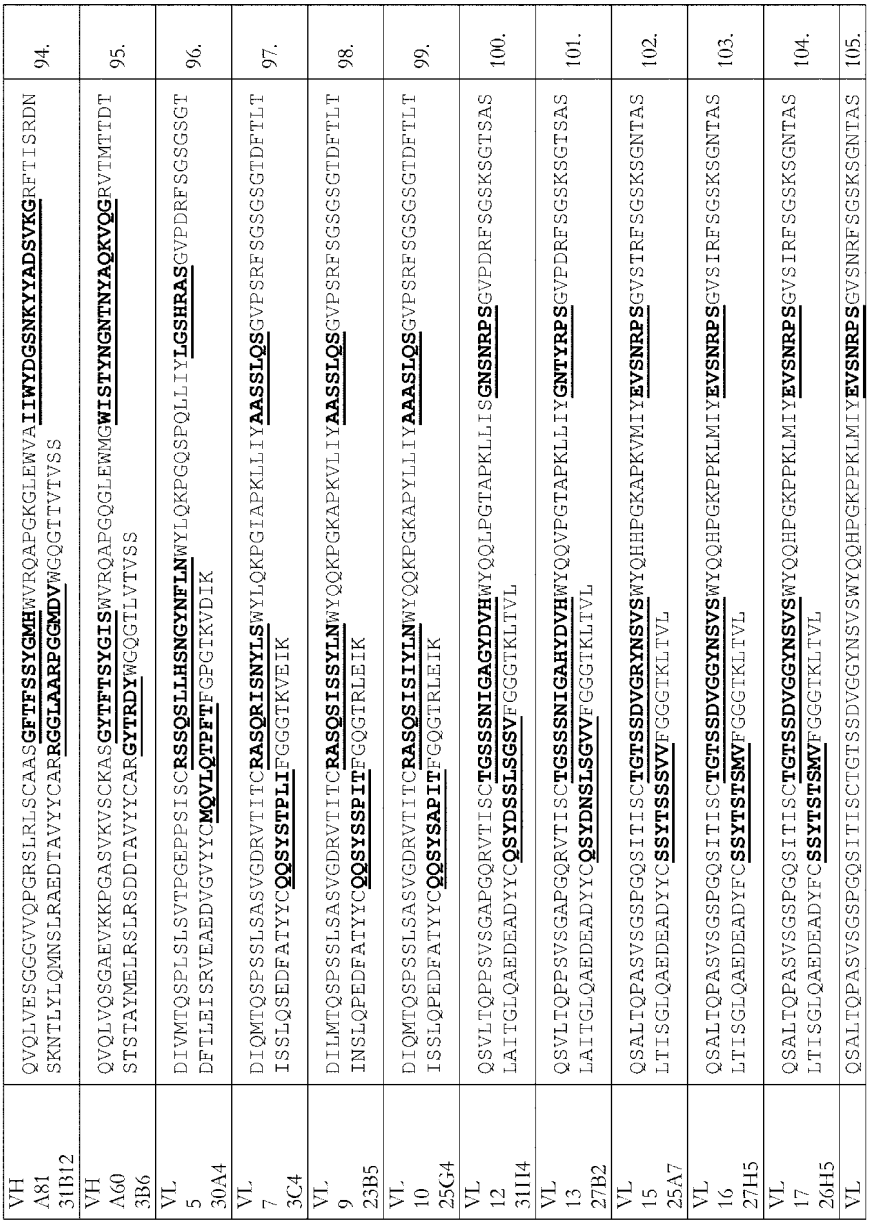
【表１２】



13H1		
VH A64 9C9	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVVS**GFTFSSYWMS**WVRQAPGKGLEWVA**NIKQDGSEKYYVDSVKG**RFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**ESNWGFAFDI**WGQGTMVTVSS	83.
VH A62 9H6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTFSRYWMS**WVRQAPGKGLEWVA**NIKHDGSEKYYVDSVKG**RFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**ESNWGFAFDV**WGHGTMVTVSS	84.
VH A89 31A4	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY**GGSFSAYYWN**WIRQPPGKGLEWIG**EINHSGRTDYNPSLKS**RVTISVDTS KKQFSLKLNSVTAADTAVYYCAR**GQLVPFDY**WGQGTLVTVSS	85.
VH A65 1A12	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GLTFSNFWMS**WVRQAPGKGLEWVA**NIKQDGSEKYYVDSVKG**RFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYSCTR**ESNWGFAFDI**WGQGTMVTVSS	86.
VH A79 16F12	QVHLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS**GFTFNSFGMH**WVRQAPGKGLEWVA**LIWSDGSDEYYADSVKG**RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**AIAALYYYYGMDV**WGQGTTVTVSS	87.
VH A80 22E2	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS**GFTFSSFGMH**WVRQAPGKGLEWVA**LIWNDGSNKYYADSVKG**RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**AIAALYYYYGMDV**WGQGTTVTVSS	88.
VH A76 27A6	QVHLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS**GFTFNSFGMH**WVRQAPGKGLEWVA**LIWSDGSDKYYADSVKG**RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**AIAALYYYYGMDV**WGQGTTVTVSS	89.
VH A77 28B12	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS**GFTFSSFGMH**WVRQAPGKGLEWVA**LIWNDGSNKYYADSVKG**RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**AIAALYYYYGMDV**WGHGTTVTVSS	90.
VII A78 28D6	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS**GFTFSSFGMH**WVRQAPGKGLEWVA**LIWNDGSNKYYADSVKG**RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**AIAALYYYYGMDV**WGQGTTVTVSS	91.
VII A83 31G11	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS**GFTFRSYGMH**WVRQAPGKGLEWVA**LIWHDGSNTYYVDSVKG**RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**GIAVAYYYYGMDV**WGQGTTVTVSS	92.
VII A69 13B5	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTFSSYAMS**WVRQAPGKGLEWVS**TISGSGGRTYYADSVKG**RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK**EVGSPFDY**WGQGTLVTVSS	93.

【００５３】

【表１３】



VH A81 31B12	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS**GFTFSSYGMH**WVRQAPGKGLEWVA**IIWYDGSNKYYADSVKG**RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**RGGLAARPGGMDV**WGQGTTVTVSS	94.
VH A60 3B6	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS**GYTFTSYGIS**WVRQAPGQGLEWMG**WISTYNGNTNYAQKVQG**RVTMTTDT STSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR**GYTRDY**WGQGTLVTVSS	95.
VL 5 30A4	DIVMTQSPLSLSVTPGEPPSISC**RSSQSLLHSNGYNFLN**WYLQKPGQSPQLLIY**LGSHRAS**GVPDRFSGSGSGT DFTLEISRVEAEDVGVYYC**MQVLQTPFT**FGPGTKVDIK	96.
VL 7 3C4	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQRISNYLS**WYLQKPGIAPKLLIY**AASSLQS**GVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQSEDFATYYC**QQSYSTPLI**FGGGTKVEIK	97.
VL 9 23B5	DILMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQSISSYLN**WYQQKPGKAPKVLIY**AASSLQS**GVPSRFSGSGSGTDFTLT INSLQPEDFATYYC**QQSYSSPIT**FGQGTRLEIK	98.
VL 10 25G4	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQSISIYLN**WYQQKPGKAPYLLIY**AAASLQS**GVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYC**QQSYSAPIT**FGQGTRLEIK	99.
VL 12 31I4	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISC**TGSSSNIGAGYDVH**WYQQLPGTAPKLLIS**GNSNRPS**GVPDRFSGSKSGTSAS LAITGLQAEDEADYYC**QSYDSSLSGSV**FGGGTKLTVL	100.
VL 13 27B2	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISC**TGSSSNIGAHYDVH**WYQQVPGTAPKLLIY**GNTYRPS**GVPDRFSGSKSGTSAS LAITGLQAEDEADYYC**QSYDNSLSGVV**FGGGTKLTVL	101.
VL 15 25A7	QSALTQPASVSGSPGQSITISC**TGTSSDVGRYNSVS**WYQHHPGKAPKVMIY**EVSNRPS**GVSTRFSGSKSGNTAS LTISGLQAEDEADYYC**SSYTSSSVV**FGGGTKLTVL	102.
VL 16 27H5	QSALTQPASVSGSPGQSITISC**TGTSSDVGGYNSVS**WYQQHPGKPPKLMIY**EVSNRPS**GVSIRFSGSKSGNTAS LTISGLQAEDEADYFC**SSYTSTSMV**FGGGTKLTVL	103.
VL 17 26H5	QSALTQPASVSGSPGQSITISC**TGTSSDVGGYNSVS**WYQQHPGKPPKLMIY**EVSNRPS**GVSIRFSGSKSGNTAS LTISGLQAEDEADYFC**SSYTSTSMV**FGGGTKLTVL	104.
VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNSVSWYQQHPGKPPKLMIY**EVSNRPS**GVSNRFSGSKSGNTAS	105.

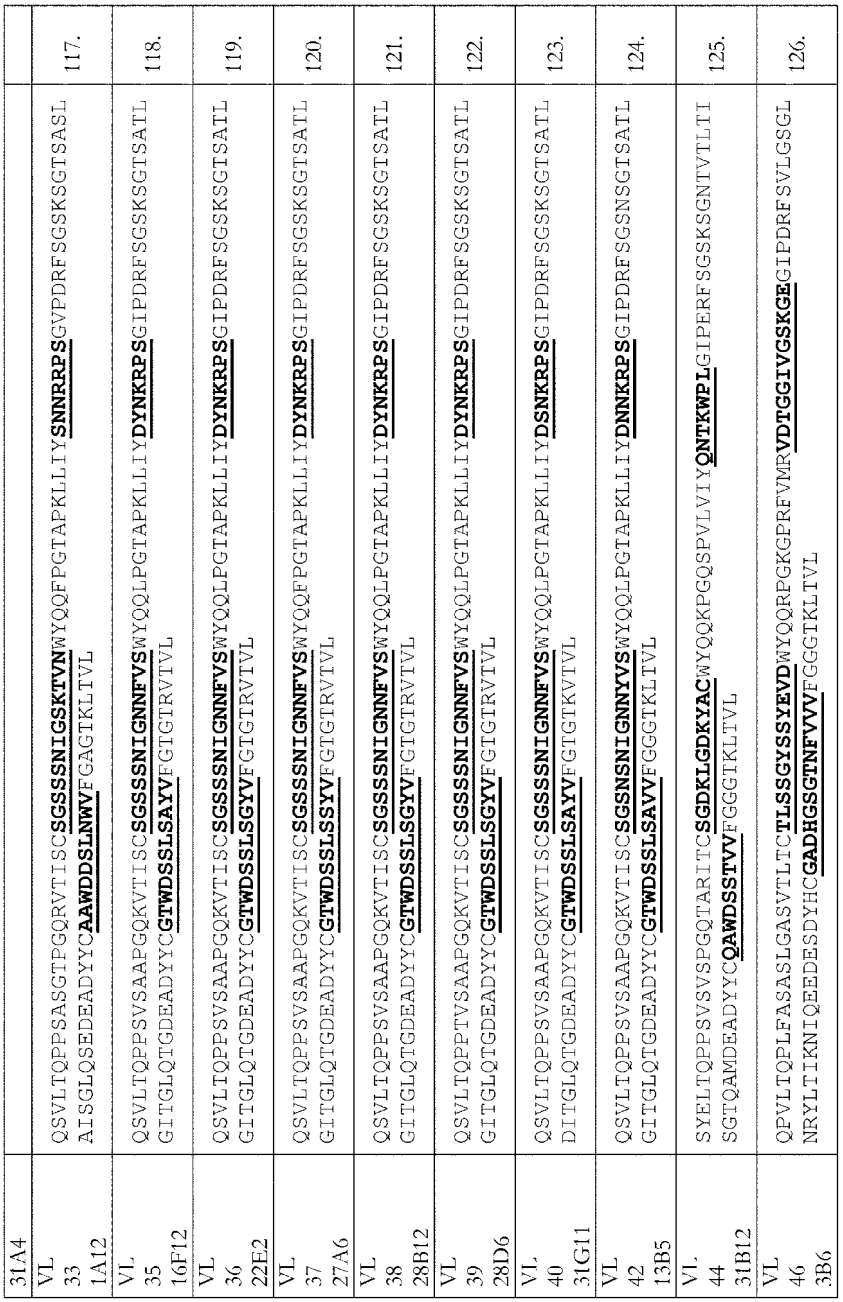
【００５４】

【表１４】

18 31D1	LTISGLQAEDEADYFC**SSYTSTSMV**FGGGTKLAVL	
VL 19 20D10	QSALTQPASVSGSPGQSITISC**TGTSSDVGGYNSVS**WYQQYPGKPPKLKIY**EVSNRPS**GVSNRFSGSKSGNTAS LTISGLQAEDEADYFC**SSYTSTSMV**FGGGTKLTVL	106.
VL 20 27E7	QSALTQPASVSGSPGQSITISC**TGTSSDVGGYNSVS**WYQQHPGKPPKLMIY**EVSNRPS**GVSNRFSGSKSGNTAS LTISGLQAEDEADYFC**SSYTSTSMV**FGGGTKLTVL	107.
VL 21 30B9	QSALTQPASVSGSPGQSITISC**TGTSSDVGGYNSVS**WYQQHPGKPPKLMIY**EVSNRPS**GVSNRFSGSKSGNTAS LTISGLQAEDEADYFC**SSYTSTSMV**FGGGTKLTVL	108.
VL 22 19H9	QSALTQPASVSGSPGQSITISC**TGTNSDVGGYNSVS**WYQQHPGKPPKLMIY**EVSNRPS**GISNRFSGSKSGNTAS LTISGLQAEDEADYFC**SSYTSTSMV**FGGGTKLTVL	109.
VL 23 21B12	QSALTQPASVSGSPGQSITISC**TGTSSDVGGYNSVS**WYQQHPGKAPKLMIY**EVSNRPS**GVSNRFSGSKSGNTAS LTISGLQAEDEADYYC**NSYTSTSMV**FGGGTKLTVL	110.
VL 24 17C2	QSALTQPASVSGSPGQSITISC**TGTSSDVGAYNSVS**WYQQHPGKAPKRMIY**EVSNRPS**GVSNRFSGSKSGNTAS LTISGLQAEDEADYYC**SSYTSTNMV**FGGGTKLTVL	111.
VL 26 23G1	QSALTQPASVSGSPGQSITISC**TGTSSDVGGYNSVS**WYQQHPGKAPKLMIY**EVTNRPS**GVSNRFSGSKSGNTAS LTISGLQAEDEADYYC**NSYTSTSMV**FGGGTKLTVL	112.
VL 28 13H1	LSALTQPASVSGSPGQSITISC**TGTSSDVGNYNLVS**WYQQYSGKAPKLMIY**EVSKRPS**GVSNRFSGSKSGNTAS LTISGLQAEDEADYYC**CSYAGSSTLV**FGGGTKLTVL	113.
VL 30 9C9	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISC**SGSSSNIGSKTVN**WYQQVPGTAPKLLIY**RNNQRPL**GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLQSEDEADYYC**AAWDDSLNWV**FGGGTKLTVL	114.
VL 31 9H6	QSVLTQPPSASGPPGQRVTISC**SGSSSNIGSNTVN**WYQQLPGTAPKLLIY**SNNRRPS**GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLQSEDEADYYC**AAWDDSLNWV**FGGGTKLTVL	115.
VL 32	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISC**SGSSSNIGSNTVN**WYQQLPGTAPKLLIY**SNNQRPS**GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLQSEDEADYYC**AVWDDSLNGWV**FGGGTKLTVL	116.

【００５５】

【表１５】



31A4		
VL 33 1A12	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISC**SGSSSNIGSKTVN**WYQQFPGTAPKLLIY**SNNRRPS**GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLQSEDEADYYC**AAWDDSLNWV**FGAGTKLTVL	117.
VL 35 16F12	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISC**SGSSSNIGNNFVS**WYQQLPGTAPKLLIY**DYNKRPS**GIPDRFSGSKSGTSATL GITGLQTGDEADYYC**GTWDSSLSAYV**FGTGTRVTVL	118.
VL 36 22E2	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISC**SGSSSNIGNNFVS**WYQQLPGTAPKLLIY**DYNKRPS**GIPDRFSGSKSGTSATL GITGLQTGDEADYYC**GTWDSSLSGYV**FGTGTRVTVL	119.
VL 37 27A6	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISC**SGSSSNIGNNFVS**WYQQFPGTAPKLLIY**DYNKRPS**GIPDRFSGSKSGTSATL GITGLQTGDEADYYC**GTWDSSLSSYV**FGTGTRVTVL	120.
VL 38 28B12	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISC**SGSSSNIGNNFVS**WYQQLPGTAPKLLIY**DYNKRPS**GIPDRFSGSKSGTSATL GITGLQTGDEADYYC**GTWDSSLSGYV**FGTGTRVTVL	121.
VL 39 28D6	QSVLTQPPTVSAAPGQKVTISC**SGSSSNIGNNFVS**WYQQLPGTAPKLLIY**DYNKRPS**GIPDRFSGSKSGTSATL GITGLQTGDEADYYC**GTWDSSLSGYV**FGTGTRVTVL	122.
VL 40 31G11	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISC**SGSSSNIGNNFVS**WYQQLPGTAPKLLIY**DSNKRPS**GIPDRFSGSKSGTSATL DITGLQTGDEADYYC**GTWDSSLSAYV**FGTGTKVTVL	123.
VL 42 13B5	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISC**SGSNSNIGNNYVS**WYQQLPGTAPKLLIY**DNNKRPS**GIPDRFSGSNSGTSATL GITGLQTGDEADYYC**GTWDSSLSAVV**FGGGTKLTVL	124.
VL 44 31B12	SYELTQPPSVSVSPGQTARITC**SGDKLGDKYAC**WYQQKPGQSPVLVIY**QNTKWPL**GIPERFSGSKSGNTVTLTI SGTQAMDEADYYC**QAWDSSTVV**FGGGTKLTVL	125.
VL 46 3B6	QPVLTQPLFASASLGASVTLTC**TLSSGYSSYEVD**WYQQRPGKGPRFVMR**VDTGGIVGSKGE**GIPDRFSVLGSGL NRYLTIKNIQEEDESDYHC**GADHGSGTNFVVV**FGGGTKLTVL	126.

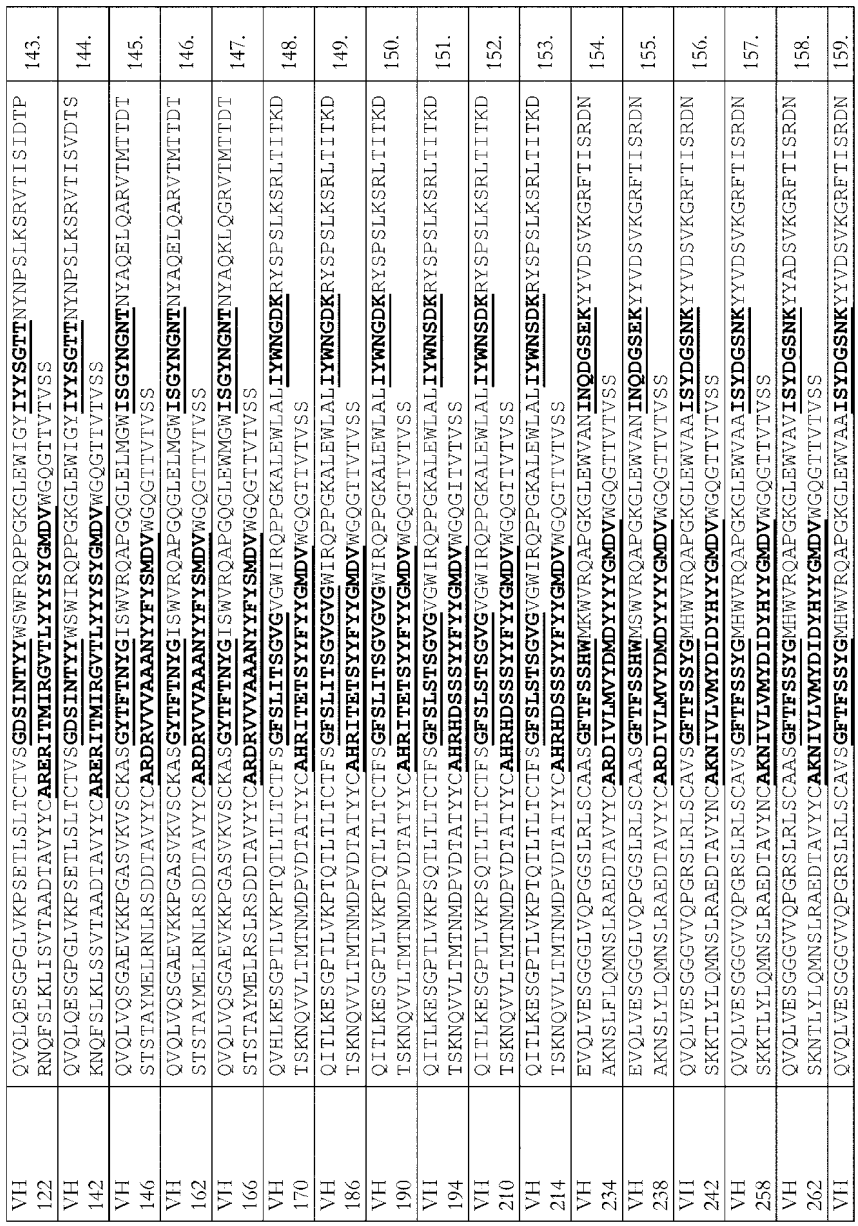
【００５６】

【表１６】

グループD			
VH 66	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAFIGFDGSNIYYGDSVRGRIIISRDN SENTLYLEMNSLRAEDTAVYYCAREKGLDWGQGTLVTVSS	127.
VH 90 H1H316P	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNYAMNWVRQAPGKGLDWVSTISGSGGTTNYADSVKGRFIISRDS SKHTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDSNWGNFDLWGRGTLVTVSS	128.
VH 138	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGDSINTYYWSWFRQPPGKGLEWIGYIYYSGTTNYNPSLKSRVTISIDTP RNQFSLKLISVTAADTAVYYCARERITMIRGVTLYYYSYGMDVWGQGTTVTVSS	129.
VH 218 H1M300N	EMQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHWMKWVRQAPGKGLEWVANINQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDN AKNSLFLQMNSLRAEDTAVYYCARDIVLMVYDMDYYYYGMDVWGQGTTVTVSS	130.
VH 2	QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSSYDMHWVRQSTGKGLEWVSAIGSTGDTYYPGSVKGRFTITREKA KNSVYLQMNSLRAGDTAVYYCVREGWEVPFDYWGQGTLVTVSS	131.
VH 18	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSSYDMHWVRQSTGKGLEWVSAIGSTGDTYYPGSVKGRFTITREKA KNSVYLQMNSLRAGDTAVYYCVREGWEVPFDYWGQGTLVTVSS	132.
VH 22	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSSYDMHWVRQATGKGLEWVSAIGSTGDTYYPGSVKGRFTISRENA KNSLYLQMNSLRAGDTAVYYCVREGWEVPFDYWGQGTLVTVSS	133.
VH 26	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAFIGFDGSNIHYGDSVRGRIIISRDN SENTLYLEMNSLRAEDTAMYYCAREKGLDWGQGTTVTVSS	134.
VH 42	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAFIGFDGSNIHYGDSVRGRIIISRDN SENTLYLEMNSLRAEDTAMYYCAREKGLDWGQGTLVTVSS	135.
VH 46	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIGFDGSNIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREKGLDWGQGTLVTVSS	136.
VH 50	QVQLQESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAFIGFDGSNIYYGDSVRGRIIISRDN SENTLYLEMNSLRAEDTAVYYCAREKGLDWGQGTLVTVSS	137.
VH 70	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIGFDGSNIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREKGLDWGQGTLVTVSS	138.
VH 94	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGTTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDSNWGNFDLWGRGTLVTVSS	139.
VH 98	QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTLSSYDMHWVRQPTGKGLEWVSAIGSTGDTYYPGSVKGRFTISRENA KNSLYLQMNSLRAGDTAVYYCAREGWDVPFDFWGQGTLVTVSS	140.
VH 114	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTLSSYDMHWVRQPTGKGLEWVSAIGSTGDTYYPGSVKGRFTISRENA KNSLYLQMNSLRAGDTAVYYCAREGWDVPFDFWGQGTLVTVSS	141.
VH 118	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSSYDMHWVRQATGKGLEWVSAIGSTGDTYYPGSVKGRFTISRENA KNSLYLQMNSLRAGDTAVYYCAREGWDVPFDFWGQGTLVTVSS	142.

【００５７】

【表１７】



VH 122	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS**GDSINTYY**WSWFRQPPGKGLEWIGY**IYYSGTT**NYNPSLKSRVTISIDTP RNQFSLKLISVTAADTAVYYC**ARERITMIRGVTLYYYSYGMDV**WGQGTTVTVSS	143.
VH 142	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS**GDSINTYY**WSWIRQPPGKGLEWIGY**IYYSGTT**NYNPSLKSRVTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYC**ARERITMIRGVTLYYYSYGMDV**WGQGTTVTVSS	144.
VH 146	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS**GYTFTNYG**ISWVRQAPGQGLELMGW**ISGYNGNT**NYAQELQARVTMTTDT STSTAYMELRNLRSDDTAVYYC**ARDRVVVAAANYYFYSMDV**WGQGTTVTVSS	145.
VH 162	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS**GYTFTNYG**ISWVRQAPGQGLELMGW**ISGYNGNT**NYAQELQARVTMTTDT STSTAYMELRNLRSDDTAVYYC**ARDRVVVAAANYYFYSMDV**WGQGTTVTVSS	146.
VH 166	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS**GYTFTNYG**ISWVRQAPGQGLEWMGW**ISGYNGNT**NYAQKLQGRVTMTTDT STSTAYMELRSLRSDDTAVYYC**ARDRVVVAAANYYFYSMDV**WGQGTTVTVSS	147.
VH 170	QVHLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFS**GFSLITSGVG**VGWIRQPPGKALEWLAL**IYWNGDK**RYSPSLKSRLTITKD TSKNQVVLTMTNMDPVDTATYYC**AHRITETSYYFYYGMDV**WGQGTTVTVSS	148.
VH 186	QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFS**GFSLITSGVGVG**WIRQPPGKALEWLAL**IYWNGDK**RYSPSLKSRLTITKD TSKNQVVLTMTNMDPVDTATYYC**AHRITETSYYFYYGMDV**WGQGTTVTVSS	149.
VH 190	QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFS**GFSLITSGVG**VGWIRQPPGKALEWLAL**IYWNSDK**RYSPSLKSRLTITKD TSKNQVVLTMTNMDPVDTATYYC**AHRITETSYYFYYGMDV**WGQGTTVTVSS	150.
VII 194	QITLKESGPTLVKPSQTLTLTCTFS**GFSLSTSGVG**VGWIRQPPGKALEWLAL**IYWNSDK**RYSPSLKSRLTITKD TSKNQVVLTMTNMDPVDTATYYC**AHRHDSSSYYFYYGMDV**WGQGTTVTVSS	151.
VII 210	QITLKESGPTLVKPSQTLTLTCTFS**GFSLSTSGVG**VGWIRQPPGKALEWLAL**IYWNSDK**RYSPSLKSRLTITKD TSKNQVVLTMTNMDPVDTATYYC**AHRHDSSSYYFYYGMDV**WGQGTTVTVSS	152.
VH 214	QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFS**GFSLSTSGVG**VGWIRQPPGKALEWLAL**IYWNSDK**RYSPSLKSRLTITKD TSKNQVVLTMTNMDPVDTATYYC**AHRHDSSSYYFYYGMDV**WGQGTTVTVSS	153.
VH 234	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTFSSHW**MKWVRQAPGKGLEWVAN**INQDGSEK**YYVDSVKGRFTISRDN AKNSLFLQMNSLRAEDTAVYYC**ARDIVLMVYDMDIYYYYGMDV**WGQGTTVTVSS	154.
VH 238	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTFSSHW**MSWVRQAPGKGLEWVAN**INQDGSEK**YYVDSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC**ARDIVLMVYDMDIYYYYGMDV**WGQGTTVTVSS	155.
VII 242	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAVS**GFTFSSYG**MHWVRQAPGKGLEWVAA**ISYDGSNK**YYVDSVKGRFTISRDN SKKTLYLQMNSLRAEDTAVYNC**AKNIVLVMYDIDYHYYGMDV**WGQGTTVTVSS	156.
VH 258	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAVS**GFTFSSYG**MHWVRQAPGKGLEWVAA**ISYDGSNK**YYVDSVKGRFTISRDN SKKTLYLQMNSLRAEDTAVYNC**AKNIVLVMYDIDYHYYGMDV**WGQGTTVTVSS	157.
VH 262	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS**GFTFSSYG**MHWVRQAPGKGLEWVAV**ISYDGSNK**YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC**AKNIVLVMYDIDYHYYGMDV**WGQGTTVTVSS	158.
VII	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAVS**GFTFSSYG**MHWVRQAPGKGLEWVAA**ISYDGSNK**YYVDSVKGRFTISRDN	159.

【００５８】

【表１８】

266	SKKTLYLQMNSLRAEDTAVYNC**AKNTVLVMYDIDYHYYGMDV**WGQGTTVTVSS	
VH 282	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAVS**GFTFSSYG**MHWVRQAPGKGLEWVAA**ISYDGSNK**YYVDSVKGRFTISRDN	160.
VH 286	SKKTLYLQMNSLRAEDTAVYNC**AKNTVLVMYDIDYHYYGMDV**WGQGTTVTVSS	
VH 290	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS**GFTFSSYG**MHWVRQAPGKGLEWVAV**ISYDGSNK**YYADSVKGRFTISRDN	161.
VH 286	SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC**AKNIVLVMYDIDYHYYGMDV**WGQGTTVTVSS	
VH 290	QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFS**GFSLSASGVG**VGWFRQPPGKALEWLAL**IYWNDDK**RYSPSLKNSLTITKD	162.
VH 290	TSKNQVVLTMTNMDPVDTATYYC**AHRIHLWSYFYYGMDV**WGQGTTVTVSS	
VH 306	QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFS**GFSLSASGVG**VGWFRQPPGKALEWLAL**IYWNDDK**RYSPSLKSNLTITKD	163.
VH 306	TSKNQVVLTMTNMDPVDTATYYC**AHRIHLWSYFYYGMDV**WGQGTTVTVSS	
VH 310	QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFS**GFSLSASGVG**VGWIRQPPGKALEWLAL**IYWNDDK**RYSPSLKSRLTITKD	164.
VH 310	TSKNQVVLTMTNMDPVDTATYYC**AHRIHLWSYFYYGMDV**WGQGTTVTVSS	
VH 314	QVQLVQSGPEVKNPGASVKVSCKAS**GYTFTTYG**ISWVRQAPGQGLEWMGW**ISGYNGKT**NDAQKFQDRVAMTTDT	165.
VH 314	STSTAYMELRSLRSDDTAIYYC**SRDRLVVPPALNYSYYVMDV**WGQGTTVTVSS	
VH 330	QVQLVQSGPEVKNPGASVKVSCKAS**GYTFTTYG**ISWVRQAPGQGLEWMGW**ISGYNGKT**NDAQKFQDRVAMTTDT	166.
VH 330	STSTAYMELRSLRSDDTAIYYC**SRDRLVVPPALNYSYYVMDV**WGQGTTVTVSS	
VH 334	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS**GYTFTTYG**ISWVRQAPGQGLEWMGW**ISGYNGKT**NYAQKLQGRVTMTTDT	167.
VH 334	STSTAYMELRSLRSDDTAVYYC**SRDRLVVPPALNYSYYVMDV**WGQGTTVTVSS	
VH 338	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFSSYS**MDWVRQAPGKGLEWVSS**ISSSSSYI**YYADSVKGRFTISRDT	168.
VH 338	AKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYC**AREGSSRLFDY**WGQGTLVTVSS	
VH 354	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFSSYS**MDWVRQAPGKGLEWVSS**ISSSSSYI**YYADSVKGRFTISRDT	169.
VH 354	AKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYC**AREGSSRLFDY**WGQGTLVTVSS	
VII 358	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFSSYS**MNWVRQAPGKGLEWVSS**ISSSSSYI**YYADSVKGRFTISRDN	170.
VII 358	AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC**AREGSSRLFDY**WGQGTLVTVSS	
VH 362	QVHLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFSDHY**MSWIRQAPGKGLEWISY**ISNDGGTK**YYVDSVEGRFIISRDN	171.
VH 362	AKNSLYLHMNSLRADDTAVYYC**ARDQGYIGYDSYYYYSYGMDV**WGQGTTVTVAS	
VH 378	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFSDHY**MSWIRQAPGKGLEWISY**ISNDGGTK**YYVDSVEGRFIISRDN	172.
VH 378	AKNSLYLHMNSLRADDTAVYYC**ARDQGYIGYDSYYYYSYGMDV**WGQGTTVTVSS	
VH 382	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFSDHY**MSWIRQAPGKGLEWVSY**ISNDGGTK**YYADSVKGRFTISRDN	173.
VH 382	AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC**ARDQGYIGYDSYYYYSYGMDV**WGQGTTVTVSS	
VH 386	EVQKVESGGGLVKPGGSLRLSCTAS**GFTFSTYN**MNWVRQAPGKGLEWVSS**IRSSSNYI**YYADSVKGRFTISRDN	174.
VH 386	AKNSLYLQMNSLRADDTAVYYC**ARDGSSWYDYSDY**WGQGTLVTVSS	
VH 402	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCTAS**GFTFSTYN**MNWVRQAPGKGLEWVSS**IRSSSNYI**YYADSVKGRFTISRDN	175.
VH 402	AKNSLYLQMNSLRADDTAVYYC**ARDGSSWYDYSDY**WGQGTLVTVSS	

【００５９】

【表１９】



VH 406	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFSTYN**MNWVRQAPGKGLEWVSS**IRSSSNYI**YYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC**ARDGSSWYDYSDY**WGQGTLVTVSS	176.
VH 410	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCTAS**GFTFSTYN**MNWVRQAPGKGLEWVSS**IRSSSNYI**YYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRADDTAVYYC**ARDGSSWYDYSDY**WGQGTLVTVSS	177.
VH 426	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFSTYN**MNWVRQAPGKGLEWVSS**IRSSSNYI**YYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC**ARDGSSWYDYSDY**WGQGTLVTVSS	178.
VH 430	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFSTYN**MNWVRQAPGKGLEWVSS**IRSSSNYI**YYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC**ARDGSSWYDYSDY**WGQGTLVTVSS	179.
VH 434	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCTAS**GFTFSTYN**MNWVRQAPGKGLEWVSS**IRSSSNYI**YYADSVKGRFTISRDN AKSSLYLQMNSLRAEDTAVYYC**ARDGSSWYDYSDY**WGQGTLVTVSS	180.
VH 450	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCTAS**GFTFSTYN**MNWVRQAPGKGLEWVSS**IRSSSNYI**YYADSVKGRFTISRDN AKSSLYLQMNSLRAEDTAVYYC**ARDGSSWYDYSDY**WGQGTLVTVSS	181.
VH 454	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFSTYN**MNWVRQAPGKGLEWVSS**IRSSSNYI**YYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC**ARDGSSWYDYSDY**WGQGTLVTVSS	182.
VH 458	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCTAS**GFTFSTYN**MNWVRQAPGKGLEWVSS**IRSSSNYI**YYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRADDTAVYYC**ARDGSSWYDYSDY**WGQGTLVTVSS	183.
VII 474	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCTAS**GFTFSTYN**MNWVRQAPGKGLEWVSS**IRSSSNYI**YYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRADDTAVYYC**ARDGSSWYDYSDY**WGQGTLVTVSS	184.
VII 478	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFSTYN**MNWVRQAPGKGLEWVSS**IRSSSNYI**YYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC**ARDGSSWYDYSDY**WGQGTLVTVSS	185.
VH 482	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVVS**GFTFGDYD**MHWVRQATGRGLEWVSG**IAPAGDT**SYTGSVKGRFTISRENA KNSLHLQMNSLTTGDTAIYYC**AREDIAVPGFDY**WGQGTLVTVSS	186.
VH 498	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVVS**GFTFGDYD**MHWVRQATGRGLEWVSG**IAPAGDT**SYTGSVKGRFTISRENA KNSLHLQMNSLTTGDTAIYYC**AREDIAVPGFDY**WGQGTLVTVSS	187.
VH 502	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTFGDYD**MHWVRQATGKGLEWVSA**IAPAGDT**YYPGSVKGRFTISRENA KNSLYLQMNSLRAGDTAVYYC**AREDIAVPGFDY**WGQGTLVTVSS	188.
VII 506	QILLVQSGPEVKEPGASVKVSCKAS**GYTFTNYA**ISWVRQVPGQGLEWMGW**VSAYNGHT**NYAHEVQGRVTMTTDT STTAYMELRSLRSDDTAMYYC**ARGGVVVPVAPHFYNGMDV**WGQGTTVTVSS	189.
VH 522	QVQLVQSGPEVKEPGASVKVSCKAS**GYTFTNYA**ISWVRQVPGQGLEWMGW**VSAYNGHT**NYAHEVQGRVTMTTDT STTAYMELRSLRSDDTAMYYC**ARGGVVVPVAPHFYNGMDV**WGQGTTVTVSS	190.
VH 526	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS**GYTFTNYA**ISWVRQAPGQGLEWMGW**VSAYNGHT**NYAQKLQGRVTMTTDT STSTAYMELRSLRSDDTAVYYC**ARGGVVVPVAPHFYNGMDV**WGQGTTVTVSS	191.
VII	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTLSSYD**MHWVRQATGKGLEWVSA**IGSTGDT**YYTGSVMGRFTISRDAA	192.

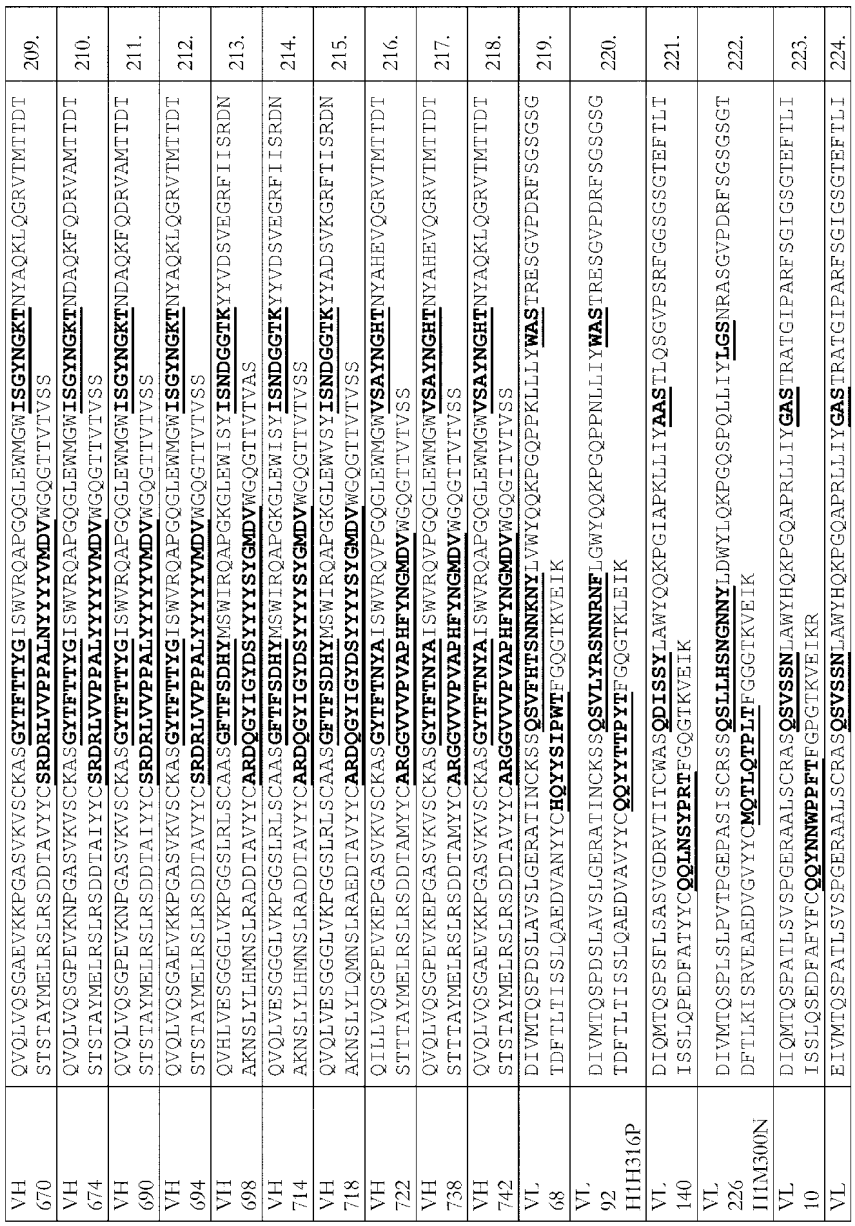
【００６０】

【表２０】

530	KNSFYLEMNSLRVGDTAVYYC**AREGIRTPYDY**WGQGARVTVSS	
VH 546	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTLSSYD**MHWVRQATGKGLEWVSA**IGSTGDT**YYTGSVMGRFTISRDAA KNSFYLEMNSLRVGDTAVYYC**AREGIRTPYDY**WGQGTLVTVSS	193.
VH 550	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTLSSYD**MHWVRQATGKGLEWVSA**IGSTGDT**YYPGSVKGRFTISRENA KNSLYLQMNSLRAGDTAVYYC**AREGIRTPYDY**WGQGTLVTVSS	194.
VH 554	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTLSSYD**MHWVRQATGKGLEWVSA**IGSTGDT**YYTGSVMGRFTISRDAA KNSFYLEMNSLRVGDTAVYYC**AREGIRTPYDY**WGQGARVTVSS	195.
VH 570	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTLSSYD**MHWVRQATGKGLEWVSA**IGSTGDT**YYTGSVMGRFTISRDAA KNSFYLEMNSLRVGDTAVYYC**AREGIRTPYDY**WGQGTLVTVSS	196.
VH 574	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTLSSYD**MHWVRQATGKGLEWVSA**IGSTGDT**YYPGSVKGRFTISRENA KNSLYLQMNSLRAGDTAVYYC**AREGIRTPYDY**WGQGTLVTVSS	197.
VH 578	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAAS**GFTFDDYA**MHWVRQAPGKGLEWVSG**INWNSGSI**GYADSVKGRFTISRDN AKHSLYLQMNSLRPEDTALYYC**VKEVTTGYYYGMDV**WGQGTTVTVSS	198.
VH 594	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAAS**GFTFDDYA**MHWVRQAPGKGLEWVSG**INWNSGSI**GYADSVKGRFTISRDN AKHSLYLQMNSLRPEDTALYYC**VKEVTTGYYYGMDV**WGQGTTVTVSS	199.
VH 598	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAAS**GFTFDDYA**MHWVRQAPGKGLEWVSG**INWNSGSI**GYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTALYYC**VKEVTTGYYYGMDV**WGQGTTVTVSS	200.
VH 602	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTFSSYA**MNWVRQAPGKGLDWVSG**ISGNGGST**YYADSVKGRFTISRDI SKNTLYVQMHSLRVEDTAVYYC**AKARYYDFWGGNFDL**WGRGTQVTVSS	201.
VH 618	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTFSSYA**MNWVRQAPGKGLDWVSG**ISGNGGST**YYADSVKGRFTISRDI SKNTLYVQMHSLRVEDTAVYYC**AKARYYDFWGGNFDL**WGRGTLVTVSS	202.
VII 622	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTFSSYA**MSWVRQAPGKGLEWVSA**ISGNGGST**YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC**AKARYYDFWGGNFDL**WGRGTLVTVSS	203.
VH 626	QVQLVQSGPEVKNPGASVKVSCKAS**GYTFTTYG**ISWVRQAPGQGLEWMGW**ISGYNGKT**NDAQKFQDRVAMTTDT STSTAYMELRSLRSDDTAIYYC**SRDRLVVPPALYYSYYVMDV**WGQGTTVTVSS	204.
VH 642	QVQLVQSGPEVKNPGASVKVSCKAS**GYTFTTYG**ISWVRQAPGQGLEWMGW**ISGYNGKT**NDAQKFQDRVAMTTDT STSTAYMELRSLRSDDTAIYYC**SRDRLVVPPALYYSYYVMDV**WGQGTTVTVSS	205.
VH 646	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS**GYTFTTYG**ISWVRQAPGQGLEWMGW**ISGYNGKT**NYAQKLQGRVTMTTDT STSTAYMELRSLRSDDTAVYYC**SRDRLVVPPALYYSYYVMDV**WGQGTTVTVSS	206.
VH 650	QVQLVQSGPEVKNPGASVKVSCKAS**GYTFTTYG**ISWVRQAPGQGLEWMGW**ISGYNGKT**NDAQKFQDRVAMTTDT STSTAYMELRSLRSDDTAIYYC**SRDRLVVPPALNYYYYVMDV**WGQGTTVTVSS	207.
VII 666	QVQLVQSGPEVKNPGASVKVSCKAS**GYTFTTYG**ISWVRQAPGQGLEWMGW**ISGYNGKT**NDAQKFQDRVAMTTDT STSTAYMELRSLRSDDTAIYYC**SRDRLVVPPALNYYYYVMDV**WGQGTTVTVSS	208.

【００６１】

【表２１】



VH 670	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS**GYTFTTYG**ISWVRQAPGQGLEWMGW**ISGYNGKT**NYAQKLQGRVTMTTDT STSTAYMELRSLRSDDTAVYYC**SRDRLVVPPALNYYYYVMDV**WGQGTTVTVSS	209.
VH 674	QVQLVQSGPEVKNPGASVKVSCKAS**GYTFTTYG**ISWVRQAPGQGLEWMGW**ISGYNGKT**NDAQKFQDRVAMTTDT STSTAYMELRSLRSDDTAIYYC**SRDRLVVPPALYYYYYVMDV**WGQGTTVTVSS	210.
VH 690	QVQLVQSGPEVKNPGASVKVSCKAS**GYTFTTYG**ISWVRQAPGQGLEWMGW**ISGYNGKT**NDAQKFQDRVAMTTDT STSTAYMELRSLRSDDTAIYYC**SRDRLVVPPALYYYYYVMDV**WGQGTTVTVSS	211.
VH 694	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS**GYTFTTYG**ISWVRQAPGQGLEWMGW**ISGYNGKT**NYAQKLQGRVTMTTDT STSTAYMELRSLRSDDTAVYYC**SRDRLVVPPALYYYYYVMDV**WGQGTTVTVSS	212.
VH 698	QVHLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFSDHY**MSWIRQAPGKGLEWISY**ISNDGGTK**YYVDSVEGRFIISRDN AKNSLYLHMNSLRADDTAVYYC**ARDQGYIGYDSYYYSYGMDV**WGQGTTVTVAS	213.
VH 714	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFSDHY**MSWIRQAPGKGLEWISY**ISNDGGTK**YYVDSVEGRFIISRDN AKNSLYLHMNSLRADDTAVYYC**ARDQGYIGYDSYYYSYGMDV**WGQGTTVTVSS	214.
VH 718	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFSDHY**MSWIRQAPGKGLEWVSY**ISNDGGTK**YYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC**ARDQGYIGYDSYYYSYGMDV**WGQGTTVTVSS	215.
VH 722	QILLVQSGPEVKEPGASVKVSCKAS**GYTFTNYA**ISWVRQVPGQGLEWMGW**VSAYNGHT**NYAHEVQGRVTMTTDT STTAYMELRSLRSDDTAMYYC**ARGGVVVPVAPHFYNGMDV**WGQGTTVTVSS	216.
VH 738	QVQLVQSGPEVKEPGASVKVSCKAS**GYTFTNYA**ISWVRQVPGQGLEWMGW**VSAYNGHT**NYAHEVQGRVTMTTDT STTAYMELRSLRSDDTAMYYC**ARGGVVVPVAPHFYNGMDV**WGQGTTVTVSS	217.
VH 742	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS**GYTFTNYA**ISWVRQAPGQGLEWMGW**VSAYNGHT**NYAQKLQGRVTMTTDT STSTAYMELRSLRSDDTAVYYC**ARGGVVVPVAPHFYNGMDV**WGQGTTVTVSS	218.
VL 68	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS**QSVFHTSNNKNY**LVWYQQKPGQPPKLLIY**WAS**TRESGVPDRFSGSGSG TDFTLTISSLQAEDVANYYC**HQYYSIPWT**FGQGTKVEIK	219.
VL 92 H1H3316P	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS**QSVLYRSNNRNF**LGWYQQKPGQPPNLLIY**WAS**TRESGVPDRFSGSGSG TDFTLTISSLQAEDVAVYYC**QQYYTTPYT**FGQGTKLEIK	220.
VL 140	DIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCWAS**QDISSY**LAWYQQKPGIAPKLLIY**AAS**TLQSGVPSRFGGSGSGTEFTLT ISSLQPEDFATYYC**QQLNSYPRT**FGQGTKVEIK	221.
VL 226 H1M300N	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSS**QSLLHSNGNNY**LDWYLQKPGQSPQLLIY**LGS**NRASGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYC**MQTLQTPLT**FGGGTKVEIK	222.
VL 10	DIQMTQSPATLSVSPGERAALSCRAS**QSVSSN**LAWYHQKPGQAPRLLIY**GAS**TRATGIPARFSGIGSGTEFTLI ISSLQSEDFAFYFC**QQYNNWPPFT**FGPGTKVEIKR	223.
VL	EIVMTQSPATLSVSPGERAALSCRAS**QSVSSN**LAWYHQKPGQAPRLLIY**GAS**TRATGIPARFSGIGSGTEFTLI	224.

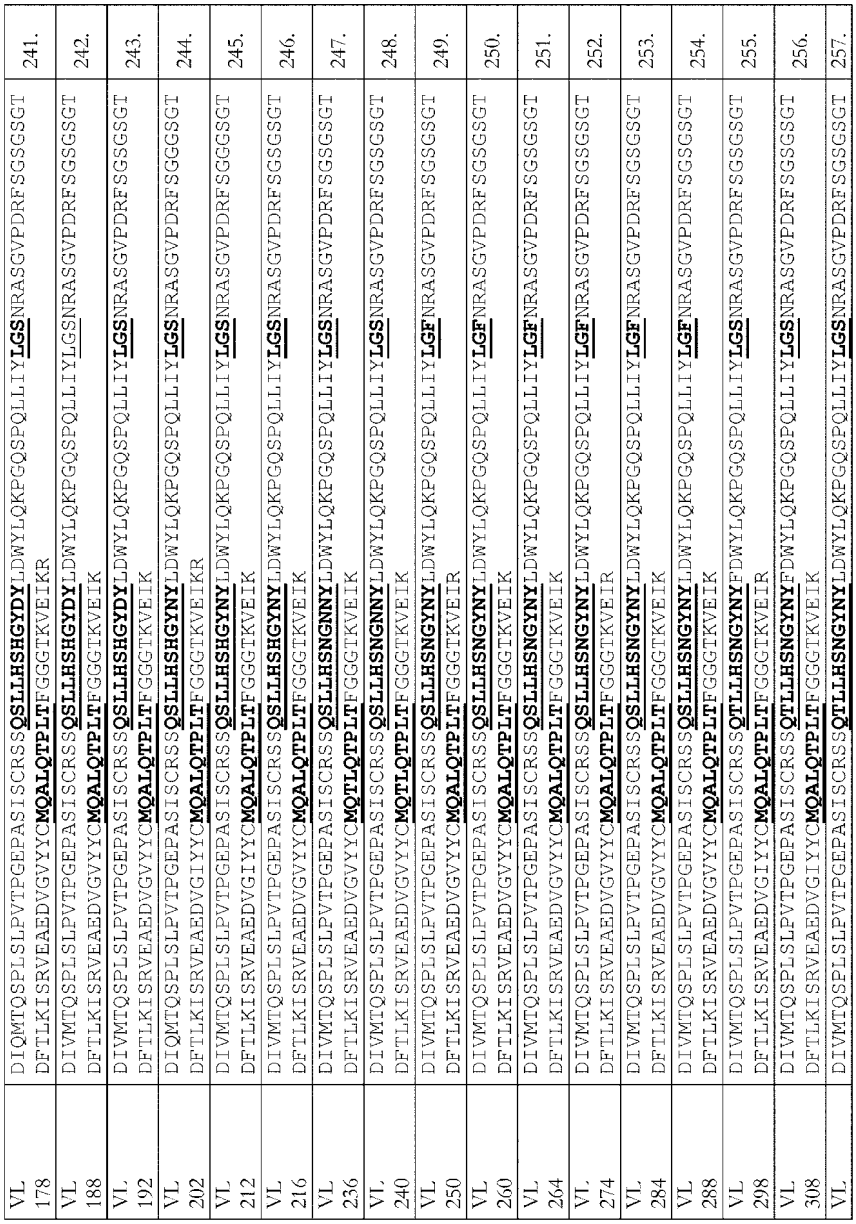
【００６２】

【表２２】

20	ISSLQSEDFAFYFC**QQYNNWPPFT**FGPGTKVDIK	
VL 24	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRAS**QSVSSN**LAWYQQKPGQAPRLLIY**GAS**TRATGIPARFSGSGSGTEFTLT ISSLQSEDFAVYYC**QQYNNWPPFT**FGPGTKVDIK	225.
VL 34	AIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRAS**QSISSW**LAWYQQKPGKAPKLLIY**KAS**SLESGVPSRFSGSGSGTEFTLT ISSLQPDDFATYYC**QQYNSYYT**FGQGTKVEIKR	226.
VL 44	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRAS**QSISSW**LAWYQQKPGKAPKLLIY**KAS**SLESGVPSRFSGSGSGTEFTLT ISSLQPDDFATYYC**QQYNSYYT**FGQGTKLEIK	227.
VL 48	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRAS**QSISSW**LAWYQQKPGKAPKLLIY**KAS**SLESGVPSRFSGSGSGTEFTLT ISSLQPDDFATYYC**QQYNSYYT**FGQGTKLEIK	228.
VL 58	AIQMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS**QSVFHTSNNKNY**LVWYQQKPGQPPKLLLY**WAS**TRESGVPDRFSGSGSG TDFTLTISSLQAEDVANYYC**HQYYSIPWT**FGQGTKVEIKR	229.
VL 72	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS**QSVFHTSNNKNY**LAWYQQKPGQPPKLLIY**WAS**TRESGVPDRFSGSGSG TDFTLTISSLQAEDVAVYYC**HQYYSIPWT**FGQGTKVEIK	230.
VL 82	DIQMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS**QSVLYRSNNRNF**LGWYQQKPGQPPNLLIY**WAS**TRESGVPDRFSGSGSG TDFTLTISSLQAEDVAVYYC**QQYYTTPYT**FGQGTKVEIKR	231.
VL 96	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS**QSVLYRSNNRNF**LAWYQQKPGQPPKLLIY**WAS**TRESGVPDRFSGSGSG TDFTLTISSLQAEDVAVYYC**QQYYTTPYT**FGQGTKLEIK	232.
VL 106	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS**QDIRND**LGWYQQKPGKAPKLLIY**AAS**SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYC**LQDYNYPWT**FGQGTKVEIKR	233.
VL 116	AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS**QDIRND**LGWYQQKPGKAPKLLIY**AAS**SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYC**LQDYNYPWT**FGQGTKVEIK	234.
VL 120	AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS**QDIRND**LGWYQQKPGKAPKLLIY**AAS**SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYC**LQDYNYPWT**FGQGTKVEIK	235.
VL 130	DIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCWAS**QDISSY**LAWYQQKPGIAPKLLIY**AAS**TLQSGVPSRFGGSGSGTEFTLT ISSLQPEDFATYYC**QQLNSYPRT**FGQGTKVEIKR	236.
VL 144	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS**QDISSY**LGWYQQKPGKAPKRLIY**AAS**SLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLT ISSLQPEDFATYYC**QQLNSYPRT**FGQGTKVEIK	237.
VL 154	AIQMTQSPLSLSVTLGQPASISCRSS**QSLVYSDGDTY**LNWFQQRPGQSPRRLIY**KVS**NRDSGVPDRFSGSGSGT AFTLKISGVEAEDVGVYYC**MQATHWPRT**FGQGTKVEIKR	238.
VL 164	DVVMTQSPLSLSVTLGQPASISCRSS**QSLVYSDGDTY**LNWFQQRPGQSPRRLIY**KVS**NRDSGVPDRFSGSGSGT AFTLKISGVEAEDVGVYYC**MQATHWPRT**FGQGTKVEIK	239.
VL 168	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSS**QSLVYSDGDTY**LNWFQQRPGQSPRRLIY**KVS**NRDSGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYC**MQATHWPRT**FGQGTKVEIK	

【００６３】

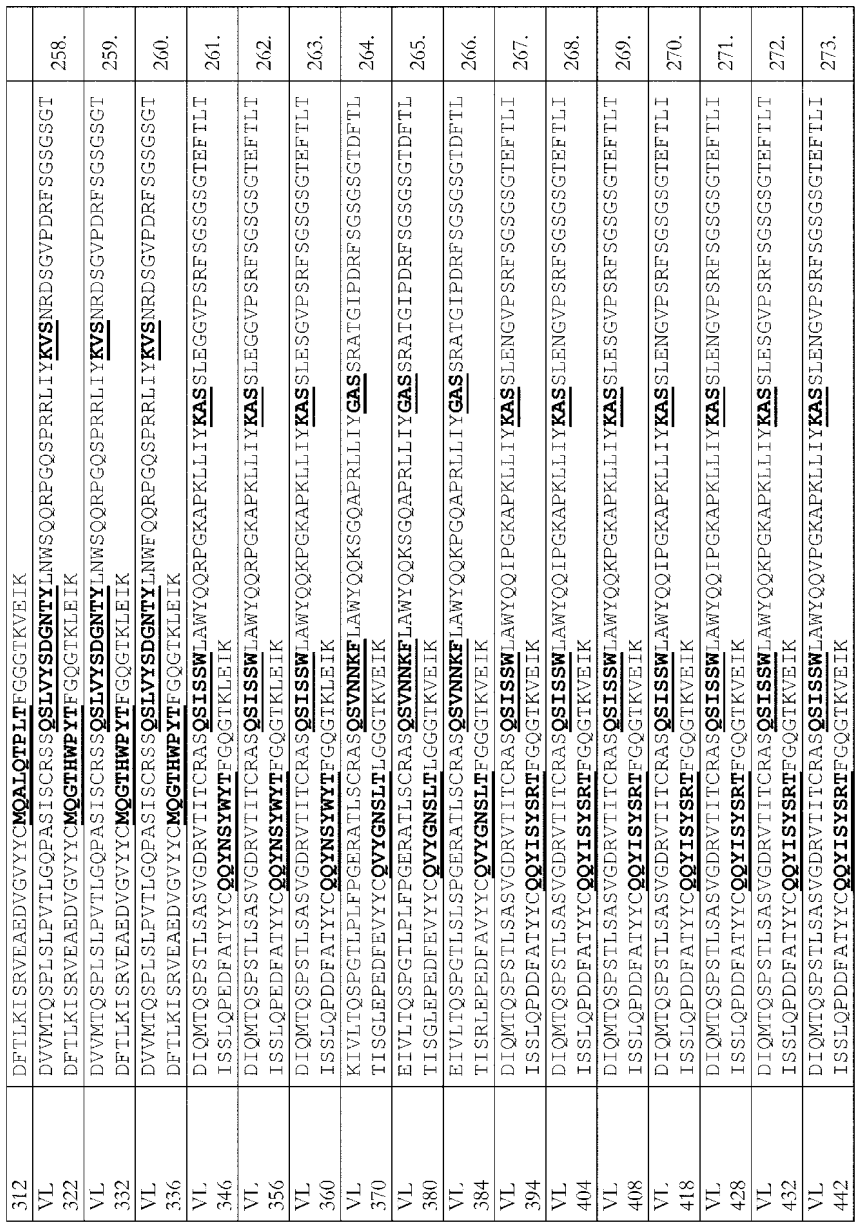
【表２３】



VL 178	DIQMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSS**QSLLHSHGYDY**LDWYLQKPGQSPQLLIY**LGS**NRASGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYC**MQALQTPLT**FGGGTKVEIKR	241.
VL 188	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSS**QSLLHSHGYDY**LDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYC**MQALQTPLT**FGGGTKVEIK	242.
VL 192	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSS**QSLLHSHGYDY**LDWYLQKPGQSPQLLIY**LGS**NRASGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYC**MQALQTPLT**FGGGTKVEIK	243.
VL 202	DIQMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSS**QSLLHSHGYNY**LDWYLQKPGQSPQLLIY**LGS**NRASGVPDRFSGGGSGT DFTLKISRVEAEDVGIYYC**MQALQTPLT**FGGGTKVEIKR	244.
VL 212	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSS**QSLLHSHGYNY**LDWYLQKPGQSPQLLIY**LGS**NRASGVPDRFSGGGSGT DFTLKISRVEAEDVGIYYC**MQALQTPLT**FGGGTKVEIK	245.
VL 216	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSS**QSLLHSHGYNY**LDWYLQKPGQSPQLLIY**LGS**NRASGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYC**MQALQTPLT**FGGGTKVEIK	246.
VL 236	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSS**QSLLHSNGNNY**LDWYLQKPGQSPQLLIY**LGS**NRASGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYC**MQTLQTPLT**FGGGTKVEIK	247.
VL 240	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSS**QSLLHSNGNNY**LDWYLQKPGQSPQLLIY**LGS**NRASGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYC**MQTLQTPLT**FGGGTKVEIK	248.
VL 250	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSS**QSLLHSNGYNY**LDWYLQKPGQSPQLLIY**LGF**NRASGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYC**MQALQTPLT**FGGGTKVEIR	249.
VL 260	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSS**QSLLHSNGYNY**LDWYLQKPGQSPQLLIY**LGF**NRASGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYC**MQALQTPLT**FGGGTKVEIK	250.
VL 264	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSS**QSLLHSNGYNY**LDWYLQKPGQSPQLLIY**LGF**NRASGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYC**MQALQTPLT**FGGGTKVEIK	251.
VL 274	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSS**QSLLHSNGYNY**LDWYLQKPGQSPQLLIY**LGF**NRASGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYC**MQALQTPLT**FGGGTKVEIR	252.
VL 284	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSS**QSLLHSNGYNY**LDWYLQKPGQSPQLLIY**LGF**NRASGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYC**MQALQTPLT**FGGGTKVEIK	253.
VL 288	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSS**QSLLHSNGYNY**LDWYLQKPGQSPQLLIY**LGF**NRASGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYC**MQALQTPLT**FGGGTKVEIK	254.
VL 298	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSS**QTLLHSNGYNY**FDWYLQKPGQSPQLLIY**LGS**NRASGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGIYYC**MQALQTPLT**FGGGTKVEIR	255.
VL 308	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSS**QTLLHSNGYNY**FDWYLQKPGQSPQLLIY**LGS**NRASGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGIYYC**MQALQTPLT**FGGGTKVEIK	256.
VL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSS**QTLLHSNGYNY**LDWYLQKPGQSPQLLIY**LGS**NRASGVPDRFSGSGSGT	257.

【００６４】

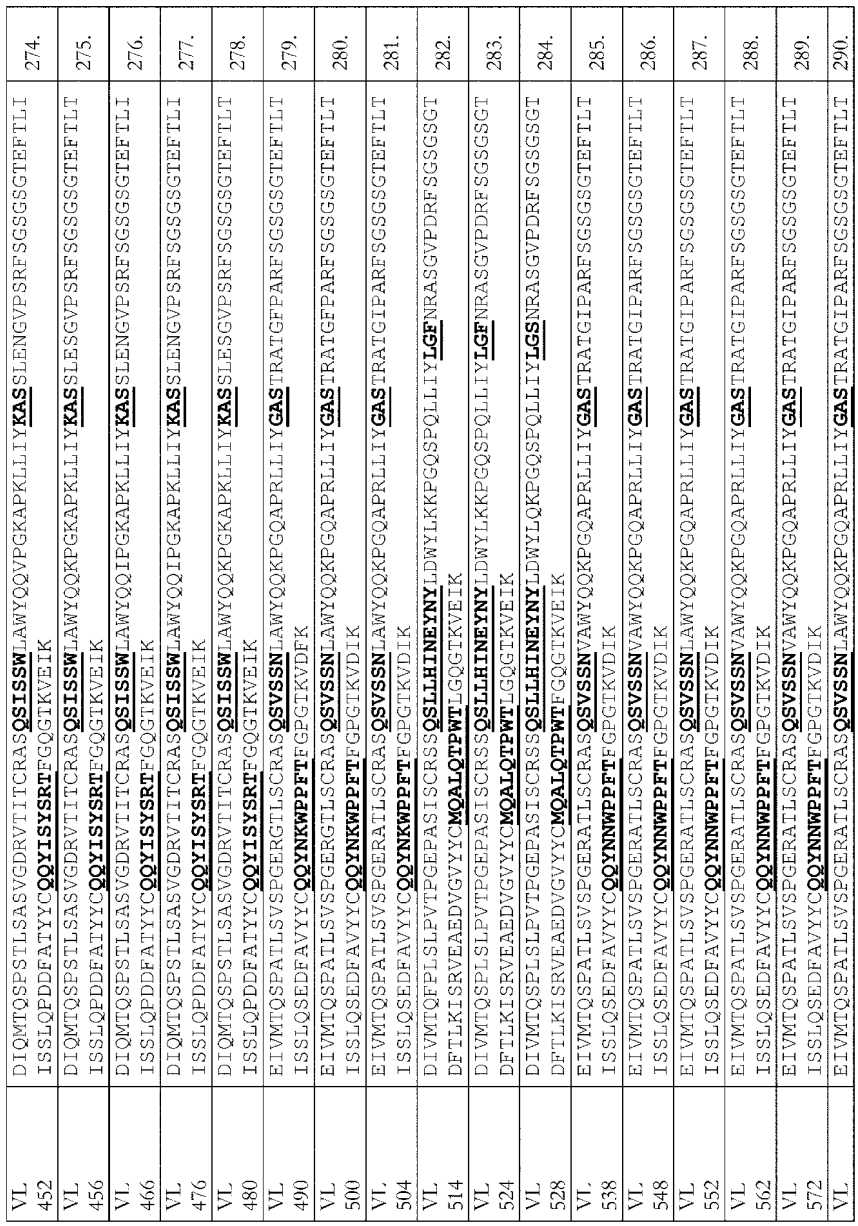
【表２４】



312	DFTLKISRVEAEDVGVYYC**MQALQTPLT**FGGGTKVEIK	
VL 322	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSS**QSLVYSDGNTY**LNWSQQRPGQSPRRLIY**KVS**NRDSGVPDRFSGSGSGT	258.
VL 332	DFTLKISRVEAEDVGVYYC**MQGTHWPYT**FGQGTKLEIK	
VL 336	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSS**QSLVYSDGNTY**LNWSQQRPGQSPRRLIY**KVS**NRDSGVPDRFSGSGSGT	259.
VL 346	DFTLKISRVEAEDVGVYYC**MQGTHWPYT**FGQGTKLEIK	
VL 356	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSS**QSLVYSDGNTY**LNWFQQRPGQSPRRLIY**KVS**NRDSGVPDRFSGSGSGT	260.
VL 360	DFTLKISRVEAEDVGVYYC**MQGTHWPYT**FGQGTKLEIK	
VL 370	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRAS**QSISSW**LAWYQQRPGKAPKLLIY**KAS**SLESGVPSRFSGSGSGTEFTLT	261.
VL 380	ISSLQPEDFATYYC**QQYNSYWYT**FGQGTKLEIK	
VL 384	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRAS**QSISSW**LAWYQQKPGKAPKLLIY**KAS**SLESGVPSRFSGSGSGTEFTLT	262.
VL 394	ISSLQPDDFATYYC**QQYNSYWYT**FGQGTKLEIK	
VL 404	KIVLTQSPGTLPLFPGERATLSCRAS**QSVNNKF**LAWYQQKSGQAPRLLIY**GAS**SRATGIPDRFSGSGSGTDFTL	263.
VL 408	TISGLEPEDFEVYYC**QVYGNSLT**LGGGTKVEIK	
VL 418	EIVLTQSPGTLPLFPGERATLSCRAS**QSVNNKF**LAWYQQKSGQAPRLLIY**GAS**SRATGIPDRFSGSGSGTDFTL	264.
VL 428	TISGLEPEDFEVYYC**QVYGNSLT**LGGGTKVEIK	
VL 432	EIVLTQSPGTLPLFPGERATLSCRAS**QSVNNKF**LAWYQQKSGQAPRLLIY**GAS**SRATGIPDRFSGSGSGTDFTL	265.
VL 442	TISGLEPEDFEVYYC**QVYGNSLT**LGGGTKVEIK	
VL 384	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRAS**QSVNNKF**LAWYQQKPGQAPRLLIY**GAS**SRATGIPDRFSGSGSGTDFTL	266.
VL 394	TISRLEPEDFAVYYC**QVYGNSLT**FGGGTKVEIK	
VL 394	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRAS**QSISSW**LAWYQQIPGKAPKLLIY**KAS**SLENGVPSRFSGSGSGTEFTLI	267.
VL 404	ISSLQPDDFATYYC**QQYISYSRT**FGQGTKVEIK	
VL 404	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRAS**QSISSW**LAWYQQIPGKAPKLLIY**KAS**SLENGVPSRFSGSGSGTEFTLI	268.
VL 408	ISSLQPDDFATYYC**QQYISYSRT**FGQGTKVEIK	
VL 418	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRAS**QSISSW**LAWYQQKPGKAPKLLIY**KAS**SLESGVPSRFSGSGSGTEFTLT	269.
VL 428	ISSLQPDDFATYYC**QQYISYSRT**FGQGTKVEIK	
VL 418	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRAS**QSISSW**LAWYQQIPGKAPKLLIY**KAS**SLENGVPSRFSGSGSGTEFTLI	270.
VL 428	ISSLQPDDFATYYC**QQYISYSRT**FGQGTKVEIK	
VL 428	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRAS**QSISSW**LAWYQQIPGKAPKLLIY**KAS**SLENGVPSRFSGSGSGTEFTLI	271.
VL 432	ISSLQPDDFATYYC**QQYISYSRT**FGQGTKVEIK	
VL 432	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRAS**QSISSW**LAWYQQKPGKAPKLLIY**KAS**SLESGVPSRFSGSGSGTEFTLT	272.
VL 442	ISSLQPDDFATYYC**QQYISYSRT**FGQGTKVEIK	
VL 442	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRAS**QSISSW**LAWYQQVPGKAPKLLIY**KAS**SLENGVPSRFSGSGSGTEFTLI	273.
VL 442	ISSLQPDDFATYYC**QQYISYSRT**FGQGTKVEIK	

【００６５】

【表２５】



VL 452	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRAS**Q**SISSW**L**AWYQQVPGKAPKLLIY**KAS**SLENGVPSRFSGSGSGTEFTLI ISSLQPDDFATYYC**QQYISYSRT**FGQGTKVEIK	274.
VL 456	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRAS**Q**SISSW**L**AWYQQKPGKAPKLLIY**KAS**SLESGVPSRFSGSGSGTEFTLT ISSLQPDDFATYYC**QQYISYSRT**FGQGTKVEIK	275.
VL 466	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRAS**Q**SISSW**L**AWYQQIPGKAPKLLIY**KAS**SLENGVPSRFSGSGSGTEFTLI ISSLQPDDFATYYC**QQYISYSRT**FGQGTKVEIK	276.
VL 476	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRAS**Q**SISSW**L**AWYQQIPGKAPKLLIY**KAS**SLESGVPSRFSGSGSGTEFTLI ISSLQPDDFATYYC**QQYISYSRT**FGQGTKVEIK	277.
VL 480	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRAS**Q**SISSW**L**AWYQQKPGKAPKLLIY**KAS**SLESGVPSRFSGSGSGTEFTLT ISSLQPDDFATYYC**QQYISYSRT**FGQGTKVEIK	278.
VL 490	EIVMTQSPATLSVSPGERGTLSCRAS**Q**SVSSN**L**AWYQQKPGQAPRLLIY**GAS**TRATGFPARFSGSGSGTEFTLT ISSLQSEDFAVYYC**QQYNKWPPFT**FGPGTKVDFK	279.
VL 500	EIVMTQSPATLSVSPGERGTLSCRAS**Q**SVSSN**L**AWYQQKPGQAPRLLIY**GAS**TRATGFPARFSGSGSGTEFTLT ISSLQSEDFAVYYC**QQYNKWPPFT**FGPGTKVDIK	280.
VL 504	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRAS**Q**SVSSN**L**AWYQQKPGQAPRLLIY**GAS**TRATGIPARFSGSGSGTEFTLT ISSLQSEDFAVYYC**QQYNKWPPFT**FGPGTKVDIK	281.
VL 514	DIVMTQFPLSLPVTPGEPASISCRSS**Q**SLLHINEYNY**L**DWYLKKPGQSPQLLIY**LGF**NRASGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYC**MQALQTPWT**LGQGTKVEIK	282.
VL 524	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSS**Q**SLLHINEYNY**L**DWYLKKPGQSPQLLIY**LGF**NRASGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYC**MQALQTPWT**LGQGTKVEIK	283.
VL 528	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSS**Q**SLLHINEYNY**L**DWYLQKPGQSPQLLIY**LGS**NRASGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYC**MQALQTPWT**FGQGTKVEIK	284.
VL 538	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRAS**Q**SVSSN**V**AWYQQKPGQAPRLLIY**GAS**TRATGIPARFSGSGSGTEFTLT ISSLQSEDFAVYYC**QQYNNWPPFT**FGPGTKVDIK	285.
VL 548	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRAS**Q**SVSSN**V**AWYQQKPGQAPRLLIY**GAS**TRATGIPARFSGSGSGTEFTLT ISSLQSEDFAVYYC**QQYNNWPPFT**FGPGTKVDIK	286.
VL 552	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRAS**Q**SVSSN**L**AWYQQKPGQAPRLLIY**GAS**TRATGIPARFSGSGSGTEFTLT ISSLQSEDFAVYYC**QQYNNWPPFT**FGPGTKVDIK	287.
VL 562	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRAS**Q**SVSSN**V**AWYQQKPGQAPRLLIY**GAS**TRATGIPARFSGSGSGTEFTLT ISSLQSEDFAVYYC**QQYNNWPPFT**FGPGTKVDIK	288.
VL 572	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRAS**Q**SVSSN**V**AWYQQKPGQAPRLLIY**GAS**TRATGIPARFSGSGSGTEFTLT ISSLQSEDFAVYYC**QQYNNWPPFT**FGPGTKVDIK	289.
VL	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRAS**Q**SVSSN**L**AWYQQKPGQAPRLLIY**GAS**TRATGIPARFSGSGSGTEFTLT	290.

【００６６】

【表２６】

576	ISSLQSEDFAVYYC**QQYNNWPPFT**FGPGTKVDIK	
VL 586	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCWAS**QGISSY**LAWYQKKPGKAPNLLIY**DAS**TLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLT LSSLQPEDFATYYC**QQLNIYPFT**FGPGTKVDIK	291.
VL 596	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCWAS**QGISSY**LAWYQKKPGKAPNLLIY**DAS**TLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLT LSSLQPEDFATYYC**QQLNIYPFT**FGPGTKVDIK	292.
VL 600	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRAS**QGISSY**LAWYQQKPGKAPKLLIY**DAS**TLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLT ISSLQPEDFATYYC**QQLNIYPFT**FGPGTKVDIK	293.
VL 610	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRAS**QSVSIRY**LAWYQQKPGQAPRLLIY**GAS**SRATGIPDRFSVSVSGTDFTL TITRLEPEDFAVYYC**QQYGSSPLT**FGGGTKVEIK	294.
VL 620	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRAS**QSVSIRY**LAWYQQKPGQAPRLLIY**GAS**SRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TITRLEPEDFAVYYC**QQYGSSPLT**FGGGTKVEIK	295.
VL 624	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRAS**QSVSIRY**LAWYQQKPGQAPRLLIY**GAS**SRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYC**QQYGSSPLT**FGGGTKVEIK	296.
VL 634	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSS**QSLVYSDGNTY**LNWFQQRPGQSPRRLIY**KVS**NRDSGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYC**MQGTHWPYT**FGQGTKLEIK	297.
VL 644	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSS**QSLVYSDGNTY**LNWFQQRPGQSPRRLIY**KVS**NRDSGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYC**MQGTHWPYT**FGQGTKLEIK	298.
VL 648	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSS**QSLVYSDGNTY**LNWFQQRPGQSPRRLIY**KVS**NRDSGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYC**MQGTHWPYT**FGQGTKLEIK	299.
VL 658	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSS**QSLVYSDGNTY**LNWFQQRPGQSPRRLIY**KVS**NRDSGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYC**MQGTHWPYT**FGQGTKLEIK	300.
VL 668	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSS**QSLVYSDGNTY**LNWFQQRPGQSPRRLIY**KVS**NRDSGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYC**MQGTHWPYT**FGQGTKLEIK	301.
VL 672	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSS**QSLVYSDGNTY**LNWFQQRPGQSPRRLIY**KVS**NRDSGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYC**MQGTHWPYT**FGQGTKLEIK	302.
VL 682	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSS**QSLVYSDGNTY**LNWFQQRPGQSPRRLIY**KVS**NRDSGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYC**MQGTHWPYT**FGQGTKLEIK	303.
VL 692	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSS**QSLVYSDGNTY**LNWFQQRPGQSPRRLIY**KVS**NRDSGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYC**MQGTHWPYT**FGQGTKLEIK	304.
VL 696	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSS**QSLVYSDGNTY**LNWFQQRPGQSPRRLIY**KVS**NRDSGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYC**MQGTHWPYT**FGQGTKLEIK	305.
VL 706	KIVLTQSPGTLPLFPGERATLSCRAS**QSVNNKF**LAWYQQKSGQAPRLLIY**GAS**SRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISGLEPEDFEVYYC**QVYGNSLT**FGGGTKVEIK	306.

【００６７】

【表２７】

VL 716	EIVLTQSPGTLPLFPGERATLSCRAS**QSVNNKF**LAWYQQKSGQAPRLLIY**GAS**SRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISGLEPEDFEVYYC**QVYGNSLT**FGGGTKVEIK	307.
VL 720	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRAS**QSVNNKF**LAWYQQKPGQAPRLLIY**GAS**SRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYC**QVYGNSLT**FGGGTKVEIK	308.
VL 730	DIVMTQFPLSLPVTPGEPASISCRSS**QSLLHINEYNY**LDWYLKKPGQSPQLLIY**LGF**NRASGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYC**MQALQTPWT**FGQGTKVEIK	309.
VL 740	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSS**QSLLHINEYNY**LDWYLKKPGQSPQLLIY**LGF**NRASGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYC**MQALQTPWT**FGQGTKVEIK	310.
VL 744	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSS**QSLLHINEYNY**LDWYLQKPGQSPQLLIY**LGS**NRASGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYC**MQALQTPWT**FGQGTKVEIK	311.

【００６８】

【表２８】

	グループE	
VH 508.20	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTFTGYAIH**WVRQAPGKGLEWVG**RISPANGNTNYADSVKG**RFTISADT SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**WIGSRELYIMDY**WGQGTLVTVSS	312.
VH 508.04	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTFTGYAIH**WVRQAPGKGLEWVG**RISPANGNTNYADSVKG**RFTISADT SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**WIGSRELYIMDY**WGQGTLVTVSS	313.
VH 508.06	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTFTGYAIH**WVRQAPGKGLEWVG**RISPANGNTNYADSVKG**RFTISADT SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**WIGSRELYIMDY**WGQGTLVTVSS	314.
VH 508.28	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTFTRHTIH**WVRQAPGKGLEWVG**RISPANGNTNYADSVKG**RFTISADT SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**WIGSRELYIMDY**WGQGTLVTVSS	315.
VH 508.33	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTFSSTAIH**WVRQAPGKGLEWVG**RISPANGNTNYADSVKG**RFTISADT SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**WIGSRELYIMDY**WGQGTLVTVSS	316.
VH 508.84	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTFTGYAIH**WVRQAPGKGLEWVG**RISPANGNTNYADSVKG**RFTISADT SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**WIGSRELYIMDY**WGQGTLVTVSS	317.
VL 508.20	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQDVSSAVA**WYQQKPGKAPKLLIY**SASSLYS**GVPSRFSGSRSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYC**QQSYTTPPT**FGQGTKVEIKR	318.
VL 508.04	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQDVSSAVA**WYQQKPGKAPKLLIY**SASSLYS**GVPSRFSGSRSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYC**QQSYPAPAT**FGQGTKVEIKR	319.
VL 508.06	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQDVSSAVA**WYQQKPGKAPKLLIY**SASSLYS**GVPSRFSGSRSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYC**QQSYPSPAT**FGQGTKVEIKR	320.
VL 508.28	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQDVSSAVA**WYQQKPGKAPKLLIY**SASSLYS**GVPSRFSGSRSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYC**QQSYRIQPT**FGQGTKVEIKR	321.
VL 508.33	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQDVSSAVA**WYQQKPGKAPKLLIY**SASSLYS**GVPSRFSGSRSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYC**QQSYPALHT**FGQGTKVEIKR	322.
VL 508.84	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQDVSSAVA**WYQQKPGKAPKLLIY**SASSLYS**GVPSRFSGSRSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYC**QQSYPAPST**FGQGTKVEIKR	323.

【００６９】

【表２９】

グループF		
VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFPFSKLGMV**WVRQAPGKGLEWVS**TISSGGGYTYYPDSVKG**RFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**EGISFQGGTYTYVMDY**WGQGTLVTVSS	324.
VL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC**RSSKSLLHRNGITYSY**WYLQKPGQSPQLLIY**QLSNLAS**GVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYC**YQNLELPLT**FGQGTKVEIK	325.

【００７０】

【表３０】

グループG	
VH IB20	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGS**GYSFTNYWIS**WVRQMPGKGLE**WMGIIYPGDSYTNYSPSFQG**QVTISADK	326.
	SISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR**DYWYKPLFDI**WGQGTLVTVSS	
VL IB20	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC**RSSQSVLYSSNNKNYL**AWYQQKPGQPPK**LLIYWASTRES**GVPDRFSGSGSG	327.
	TDFTLTISSLQAEDVAVYYC**QQYSSFPI**TFGQGTKVEIKR	
IB20 変異体 HC CDR1	GYSFTX$_1$YX$_2$IX$_3$ X$_1$=N または D X$_2$=W または Y	328.
IB20 変異体 HC CDR2	WMGX$_1$IYPGDSX$_2$TX$_3$YX$_4$X$_5$X$_6$FQG X$_1$ = I, R, W, L, または M X$_2$ = Y または D X$_3$ = N, R, H, S, K, Q X$_4$ = S または N X$_5$ = P, Q, H X$_6$ = S, K, N, または R	329.
IB20 変異体 HC CDR3	DX$_1$X$_2$X$_3$X$_4$X$_5$X$_6$X$_7$DX$_8$ X$_1$ = Y, R, または H X$_2$ = W, Y, G, A, または F X$_3$ = Y または S X$_4$ = K, R, T, G, S, D, E, H, または N	330.

【００７１】

【表３１】

	X_5 = P, S, G, D, A, H, R, または Y X_6 = L, Y, F, A, D, H, P, または S X_7 = F または S X_8 = I, V, Y, F, または N	331.
IB30 変異体 VH CDR2	WMGX$_1$TYPGDSYTX$_2$YSX$_3$SFQG X_1 = I または R X_2 = N, R, H, または S X_3 = P または Q	
IB30 変異体 VH CDR3	DYWYX$_1$X$_2$X$_3$FDX$_4$ X_1 = K, G, R, S, D, E, H, N, または Q X_2 = P, G, D, S, A, H, R, または Y X_3 = L, A, Y, D, F, H, P, S, または V X_4 = I, Y, F, または N	332.
IB20 変異体 LC CDR1	X_1 Ser Ser Gln Ser Val X_2 X_3 Ser X_4 X_5 X_6 Lys Asn X_7 Leu X_3 X_1 = Arg, Lys, His, Asn, Gln または Ser X_2 = Leu または Phe X_3 = Tyr または His X_4 = Ser, Arg または Gly X_5 = Asn または Thr X_6 = Asn, Arg, His または Ser X_7 = Tyr または Phe X_8 = Ala または Thr	333.
IB20 変異体 LC CDR2	LLIYX$_1$X$_2$SX$_3$RX$_4$X$_5$ X_1 = Trp, Phe または Leu X_2 = Ala または Thr X_3 = Thr, Ile, Ala または Val X_4 = Glu, Ala または Lys X_5 = Ser または Thr	334.
IB20 変異体 LC CDR3	QQYX$_1$X$_2$X$_3$PX$_4$	335.

【００７２】

【表３２】

	X_1 = Ser または Tyr X_2 = Ser または Thr X_3 = Phe, Tyr, Leu, Thr, His, Ile, Asn, Pro または Ser X_4 = Ile, Arg, Val, Tyr, Asp, Phe, Gly, His, Leu, Asn または Ser	
1B20 抗体 変異体VL CDR1 配列	RSSQSVLYSSNNKNX$_1$LX$_2$ X_1 = Tyr または Phe X_2 = Ala または Thr	336.
1B20 抗体 変異体VL CDR2 配列	LLIYX$_1$ASTRX$_2$X$_3$ X_1 = Trp, Phe または Leu X_2 = Glu または Lys X_3 = Ser または Thr	337.
1B20 抗体 変異体VL CDR3 配列	QQYSSX$_1$PX$_2$ X_1 = Phe, Tyr, Thr, Ile, Asn または Ser X_2 = Ile, Tyr, Arg, Phe, His, Leu, Asn または Ser	338.
VH;1B20 変異体 配列	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTX$_1$YX$_2$IX$_3$WVRQMPGKGLEWMGX$_4$IYPGDSX$_5$TX$_6$YX$_7$X$_8$X$_9$F QGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARDX$_{10}$X$_{11}$X$_{-2}$X$_{13}$X$_{14}$X$_{-5}$X$_{16}$DX$_{17}$WGQGTLVTVSS X_1 = Asn または Asp X_2 = Trp または Tyr X_3 = Ser, Thr または Ala X_4 = Ile, Arg, Trp, Leu または Met X_5 = Tyr または Asp X_6 = Asn, Arg, His, Ser, Lys または Gln X_7 = Ser または Asn X_8 = Pro, Gln または His X_9 = Ser, Lys, Asn または Arg X_{10} = Tyr, Arg または His X_{11} = Trp, Tyr または Gly X_{12} = Tyr または Ser	339.

【００７３】

【表３３】

	X_{13} = Lys, Arg, Thr, Gly, Ser, Asp, Glu, His, Asn または Gln X_{14} = Pro, Ser, Gly, Asp, Ala, His, Arg または Tyr X_{15} = Leu, Tyr, Phe, Ala, Asp, His, Pro, Ser または Val X_{16} = Phe または Ser X_{17} = Ile, Val, Tyr, Phe または Asn	
VH; 1B20 変異体 配列	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTX$_1$YX$_2$IX$_3$WVRQMPGKGLEWMGX$_4$IYPGDSYTX$_5$YSX$_6$SFQGQ VTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARDWYWX$_7$X$_8$X$_9$FDX$_{10}$WGQGTLVTVSS X_1 = Asn または Asp X_2 = Trp または Tyr X_3 = Ser, Thr または Ala X_4 = Ile または Arg X_5 = Asn, Arg, His, Ser, Lys または Gln X_6 = Pro または Gln X_7 = Lys, Gly, Arg, Ser, Asp, Glu, His, Asn または Gln X_8 = Pro, Gly, Asp, Ser, Ala, His, Arg または Tyr X_9 = Leu, Ala, Tyr, Asp, Phe, His, Pro, Ser または Val X_{10} = Ile, Tyr, Phe または Asn	340.
VL; 1B20 変異体 配列	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCX$_1$SSQSVX$_2$X$_3$SX$_4$X$_5$X$_6$KNX$_7$LX$_8$WYQQKPGQPPKLLIYX$_9$X$_{10}$SX$_{11}$RX$_{12}$ X$_{13}$GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYX$_{14}$X$_{15}$X$_{16}$PX$_{17}$TFGQGTKVEIKR X_1 = Arg, Lys, His, Asn, Gln または Ser X_2 = Leu または Phe X_3 = Tyr または His X_4 = Ser, Arg または Gly X_5 = Asn または Thr X_6 = Asn, Arg, His または Ser X_7 = Tyr または Phe X_8 = Ala または Thr X_9 = Trp, Phe または Leu X_{10} = Ala または Thr X_{11} = Thr, Ile, Ala または Val X_{12} = Glu, Ala または Lys X_{13} = Ser または Thr	341.

【００７４】

【表３４】

	X_{14} = Ser または Tyr X_{15} = Ser または Thr X_{16} = Phe, Tyr, Leu, Thr, His, Ile, Asn, Pro または Ser X_{17} = Ile, Arg, Val, Tyr, Asp, Phe, Gly, His, Leu, Asn または Ser	
VL; 1B20 変異体 配列	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSVLYSSNNKNX$_1$LX$_2$WYQQKPGQPPKLLIYX$_3$ASTRX$_4$X$_5$GVPDRFSGS GSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYSSX$_6$PX$_7$TFGQGTKVEIKR X_1 = Y または F X_2 = A または T X_3 = W, F, または L X_4 = E または K X_5 = S または T X_6 = F, Y, T, I, N, または S X_7 = I, Y, R, F, H, L, N, または S	342.
VH; 1B20 変異体 配列 F120	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYYISWVRQMPGKGLEWMGLIYPGDSYTRY NPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARDYYSRPFSDIWGQGTLVTVSS	343.
VH; 1B20 変異体 配列 F116	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYYISWVRQMPGKGLEWMGLIYPGDSYTRY NFKFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARDYYSRPYSDVWGQGTLVTVSS	344.
VH; 1B20 変異体 配列 F119	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYYISWVRQMPGKGLEWMGLIYPGDSYTRY SPNFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARDHGYRPYSDIWGQGTLVTVSS	345.
VH; 1B20 変異体 配列 F113	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYYISWVRQMPGKGLEWMGLIYPGDSYTNY NPNFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARDHYSTPFFDVWGQGTLVTVSS	346.
VH; 1B20 変異体 配列E2	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYYISWVRQMPGKGLEWMGLIYPGDSYTRY NRKFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARDYYSRPLSDVWGQGTLVTVSS	347.

【００７５】

【表３５】

VH; 1B20 変異体 配列G4	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYYISWVRQMPGKGLEWMGLIYPGDSYTRY SPRFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARDHGYKPYSDIWGQGTLVTVSS	348.
VH; 1B20 変異体 配列F4	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYYISWVRQMPGKGLEWMGLIYPGDSYTRY SPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARDYYSKPLFDVWGQGTLVTVSS	349.
VH; 1B20 変異体 配列B9	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYYISWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSYIHY NQNFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARDYYSRPFSDIWGQGTLVTVSS	350.
VH; 1B20 変異体 配列C3	QVKLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYYIAWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSYTHY NPKFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARDHGYKPFSDIWGQGTLVTVSS	351.
VH; 1B20 変異体 配列F2	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYYIAWVRQMPGKGLEWMGVIYPGDSYTRY NPKFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARDYWSRPYFDIWGQGTLVTVSS	352.
VH; 1B20 変異体 配列F7	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYYIAWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSYTHY NPKFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARDHWSRPFSDVWGQGTLVTVSS	353.
VH; 1B20 変異体 配列A7	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYYISWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSYTRY NPNFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARDYWSKPLSDVWGQGTLVTVSS	354.
VH; 1B20 変異体 配列G8	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYYISWVRQMPGKGLEWMGLIYPGDSYTHY NPNFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARDHWSKPYFDVWGQGTLVTVSS	355.
VH; 1B20 変異体 配列H4	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYYITWVRQMPGRGLEWMGIIYPGDSYTRY NPKFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARDHWSKPFSDVWGQGTLVTVSS	356.

【００７６】

【表３６】

VH; 1B20 変異体 配列D5	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYYITWVRQMPGKGLEWMGLIYPGDSYTRY SPRFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARDHWSRPYSDVWGQGTLVTVSS	357.
VH; 1B20 変異体 配列D4	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYYIAWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSYTRY NPKFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARDYWSRPFSDVWGQGTLVTVSS	358.
VH; 1B20 変異体 配列B4	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYYISWVRQMPGKGLEWMGLIYPGDSYTHY NPNFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARDYWSKPLFDVWGQGTLVTVSS	359.
VH; 1B20 変異体 配列H1	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYYIAWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSYTRY NFRFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARDYWSKPLSDIWGQGTLVTVSS	360.
VH; 1B20 変異体 配列G2	QVKLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYYISWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSYTHY NPKFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARDRWSKPLFDVWGQGTLVTVSS	361.
VH; 1B20 変異体 配列A1	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYYISWVRQMPGKGLEWMGLIYPGDSYTRY NPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARDYWSKPLSDIWGQGTLVTVSS	362.
VH; 1B20 変異体 配列A4	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYYISWVRQMPGKGLEWMGSIYPGDSYTHY SHKFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAIYYCARDHWSRPFFDVWGQGTLVTVSS	363.
VH; 1B20 変異体 配列C2	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYYIAWVRQMPGKGLEWMGLIYPGDSYISY NPRFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARDYWSTPYFDIWGQGTLVTVSS	364.
VH; 1B20 変異体 配列H5	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYYISWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSYTSY SPRFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARDYWSRPLFDVWGQGTLVTVSS	365.
VH; 1B20 変異体 配列F6	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYYISWVRQMPGKGLEWMGLIYPGDSYTHY NPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARDHWYKPFSDIWGQGTLVTVSS	366.
VH; 1B20	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYYISWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSYTNY	367.

【００７７】

【表３７】

変異体配列IB6	NPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARDYWYRPFSDIWGQGTLVTVSS	
VH; 1B20 変異体 配列IB1	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYYISWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSYTHY SPNFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARDYWYTPFFDVWGQGTLVTVSS	368.
VH; 1B20 変異体 配列IF1	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYYISWVRQMPGKGLEWMGLIYPGDSYTNY SPKFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARDHWSKPLSDVWGQGTLVTVSS	369.
VH; 1B20 変異体 配列IA8	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYYISWVRQMPGKGLEWMGMIYPGDSYTHY SPNFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARDYWSKPYFDVWGQGTLVTVSS	370.
VH; 1B20 変異体 配列IB3	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYYISWVRQMPGKGLEWMGMIYPGDSYTSY NPKFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARDHWSKPYFDIWGQGTLVTVSS	371.
VH; 1B20 変異体 配列IF8	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYYISWVRQMPGKGLEWMGMIYPGDSYTNY NQKFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARDYWSRPYSDIWGQGTLVTVSS	372.
VH; 1B20 変異体 配列IH8	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYYISWVRQMPGKGLEWMGMIYPGDSYTHY SQNFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARDHWSRPFFDVWGQGTLVTVSS	373.
VH; 1B20 変異体 配列IB5	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYYISWVRQMPGKGLEWMGMIYPGDSYTRY SPSFQGQVTISADKSISTAYLQSSSLKASDTAMYYCARDYWYKPFSDVWGQGTLVTVSS	374.
VH; 1B20 変異体 配列IE1	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYYISWVRQMPGKGLEWMGMIYPGDSYTSY NPNFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARDHWSKPFFDIWGQGTLVTVSS	375.
VH; 1B20 変異体	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYYITWVRQMPGKGLEWMGMIYPGDSYTRY SPKFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARDHWSKPLSDVWGQGTLVTVSS	376.

【００７８】

【表３８】

配列E8		
VH; 1B20 変異体 配列C1	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYYISWVRQMPGKGLEWMGMIYPGDSYTRY SPKFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARDHWYRPYSDIWGQGTLVTVSS	377.
VH; 1B20 変異体 配列H3	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYYITWVRQMPGKGLEWMGMIYPGDSYTHY SQRFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAIYYCARDHWSRPLFDVWGQGTLVTVSS	378.
VH; 1B20 変異体 配列A9	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYYISWVRQMPGKGLEWMGMIYPGDSYTRY SPKFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARDHWYRPYSDIWGQGTLVTVSS	379.
VH; 1B20 変異体 配列G7	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYYISWVRQMPGKGLEWMGWIYPGDSYTHY SPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARDHWSKPYFDVWGQGTLVTVSS	380.
VH; 1B20 変異体 配列C6	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYYITWVRQMPGKGLEWMGMIYPGDSYTHY NPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARDHWYKPLFDIWGQGTLVTVSS	381.
VH; 1B20 変異体 配列G6	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYYINWVRQMPGKGLEWMGMIYPGDSYTNY NPKFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAIYYCARDHWSRPFSDVWGQGTLVTVSS	382.
VH; 1B20 変異体 配列E4	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYYISWVRQMPGKGLEWMGWIYPGDSYTSY NQKFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARDYWSKPYSDVWGQGTLVTVSS	383.
VH; 1B20 変異体 配列F5	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYYITWVRQMPGKGLEWMGMIYPGDSYTNY RHNFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARDYWSRPYFDIWGQGTLVTVSS	384.
VH; 1B20 変異体 配列C7	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYYISWVRQMPGKGLEWMGWIYPGDSYTHY SHNFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARDHWSRPFSDVWGQGTLVTVSS	385.
VH; 1B20 変異体	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYYISWVRQMPGKGLEWMGMIYPGDSYTSY SPRFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARDYWYRPFSDIWGQGTLVTVSS	386.

【００７９】

【表３９】

配列E3		
VH; 1B20 変異体 配列D3	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYYITWVRQMPGKGLEWMGMIYPGDSYTRY SPKFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARDYWSKPFFDVWGQGTLVTVSS	387.
VH; 1B20 変異体 配列D8	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYYISWVRQMPGKGLEWMGMIYPGDSYTHY SQSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARDHWYRPLFDIWGQGTLVTVSS	388.
VH; 1B20 変異体 配列C8	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYYIAWVRQMPGKGLEWMGMIYPGDSYTSY SHRFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARDHWYRPYFDIWGQGTLVTVSS	389.
VH; 1B20 変異体 配列E5	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYYISWVRQMPGKGLEWMGWIYPGDSYTHY NPNFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARDRWSTPYFDVWGQGTLVTVSS	390.
VH; 1B20 変異体 配列B8	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYYISWVRQMPGKGLEWMGMIYPGDSYTHY SPNFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARDYWSKPYFDVWGQGTLVTVSS	391.
VH; 1B20 変異体 配列H7	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYYISWVRQMPGKGPEWMGMIYPGDSYTRY SQKFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAIYYCARDHWSRPLSDIWGQGTLVTVSS	392.
VH; 1B20 変異体 配列A5	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYYISWVRQMPGKGLEWMGWIYPGDSYTHY NPMFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARDRWSRPYFDIWGQGTLVTVSS	393.
VH; 1B20 変異体 配列A3	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYYISWVRQMPGKGLEWMGMIYPGDSYTRY SPNFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARDHWYRPLSDIWGQGTLVTVSS	394.
1B20 抗体 変異体VH 配列 N59K	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYWISWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSYTKY SPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARDYWYKPLFDIWGQGTLVTVSS	395.
1B20 抗体	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYWISWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSYIQY SPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARDYWYKPLFDIWGQGTLVTVSS	396.

【００８０】

【表４０】

変異体VH配列 N59Q	397.
1B20抗体変異体VH配列 N59R	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYWISWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSYTRY SPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARDYWYKPLFDIWGQGTLVTVSS
1B20抗体変異体VH配列 W101A	398.
	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYWISWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSYTNY SPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARDYAYKPLFDIWGQGTLVTVSS
1B20抗体変異体VH配列 W101F	399.
	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYWISWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSYTNY SPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARDYFYKPLFDIWGQGTLVTVSS
1B20抗体変異体VH配列 W101Y	400.
	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYWISWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSYTNY SPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARDYYYKPLFDIWGQGTLVTVSS

【００８１】

【表４１】

グループH		
リンカー配列(DSB#1中で用いられる)	GGGGGGGGGGGCGG	401.
リンカー配列(DSB#2中で用いられる)	GGGGGGGGGGGCG	402.
リンカー	GGGGSGGGGS	403.

【００８２】

【表４２】

グループ1		
PC9#3 可変 重鎖	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNYAMNWVRQAPGKGLDWVSTISGSGGTTNYADSVKGRFIISRDS SKHTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDSNWGNFDLWGRGTLVTVSS	404.
PC9#3 可変 軽鎖	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYRSNNRNFLGWYQQKPGQPPNLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSG TDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYTTPYTFGQGTKLEIK	405.
PC9#4 可変 重鎖	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYISYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYFCARDYDFWSAYYDAFDVWGQGTMVTVSS	406.
PC9#4 可変 軽鎖	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLISGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSAS LAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLSGSVFGGGTKLTVL	407.
PC9#5 可変 重鎖	EMQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHWMKWVRQAPGKGLEWVANINQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDN AKNSLFLQMNSLRAEDTAVYYCARDIVLMVYDMDYYYYGMDVWGQGTTVTVSS	408.
PC9#5 可変 軽鎖	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGNNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYCMQTLQTPLTFGGGTKVEIK	409.
PC9#6 可変 重鎖	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFNSHAISWVRQAPGQGLEWMGGINPILGIANYAQKFQGRVTITADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARHYEIQIGRYGMNVYYLMYRFASWGQGTLVTVSS	410.
PC9#6 可変 軽鎖	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRSALNWYQQKPGKAPKLLIYNGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFAVYYCQQFDGDPTFGQGTKVEIK	411.
PC9#7 可変 重鎖	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYWISWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSYTNYSPSFQGQVTISADK SISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARDYWYKPLFDIWGQGTLVTVSS	412.
PC9#7 可変 軽鎖	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSG TDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYSSFPITFGQGTKVEIK	413.
NIP228	QVNLRESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGEGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN	414.

【００８３】

【表４３】

可変 重鎖	SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRFGEFAFDIWGRGTTVTVSS	
NIP228 可変 軽鎖	AIRMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIK	415.
ヒトIgG4 Fc 断片	ESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSLG	416.
ヒト 生殖系列 1-46 (DP-7)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDT STSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARD	417.
ヒト 生殖系列 VK1 O18 O8 (DPK1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFT ISSLQPEDIATYYCQQ	418.
HS9_DSB7_ V19A_L2	HGEGTFTSDLSKQMEEECARLFIEWLKNGGPSSGAPPPGCGGGGSGGGGSADIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CQASQDVKTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQRYSLWR TFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	419.
HS9_DSB7_ V19A_L1	HGEGTFTSDLSKQMEEECARLFIEWLKNGGPSSGAPPPGCGGGGSADIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQ DVKTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQRYSLWRTFGQG TKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	420.
HS9_DSB7_ V19A_L0	HGEGTFTSDLSKQMEEECARLFIEWLKNGGPSSGAPPPGCGADIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDVKTA VAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQRYSLWRTFGQGTKLEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	421.
2.7A4_VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSGDYIYYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLVTSMVAFDYWGQGTLVTVSS	422.
2.7A4_VL	SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDALPQKYVFWYQQKSGQAPVLVIYEDSKRPSGIPERFSGSSSGTMATLTI SGAQVEDEADYYCYSTDRSGNHRVFGGGTKLTVL	423.

【００８４】

【表４４】

グループ1		
HS1_VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGEIKPSGGSTSYNQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARERPLYASDLWGQGTTVTVSS	424.
IIS1_VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDVYTAVAWYQQKPGKAPKLLIYYASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQRYSLWRTFGQGTKLEIK	425.
HS2_VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGEIKPSGGSTSYNQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARERPLYASDLWGQGTTVTVSS	426.
HS2_VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDVYTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQRYSLWRTFGQGTKLEIK	427.
HS3_VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGEIKPSGGSTSYNQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARERPLYASDLWGQGTTVTVSS	428.
HS3_VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDVKTAVAWYQQKPGKAPKLLIYYASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQRYSLWRTFGQGTKLEIK	429.
HS4_VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGEIKPSGGSTSYNQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARERPLYASDLWGQGTTVTVSS	430.
IIS4_VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDVKTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQRYSLWRTFGQGTKLEIK	431.
HS5_V	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGEIKPSGGSTSYNQKFQGRVTMTRDTSTST	432.

【００８５】

【表４５】

H	VYMELSSLRSEDTAVYYCARERPLYASDLWGQGTTVTVSS	
HS5_VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDV**S**TAVAWYQQKPGKAPKLLIY**S**ASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSL QPEDIATYYCQQRYSLWRTFGQGTKLEIK	433.
HS6_VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGEI**S**PSGGSTSYNQKFQGRVTMTRDTSTST VYMELSSLRSEDTAVYYCARERPLYASDLWGQGTTVTVSS	434.
HS6_VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDV**Y**TAVAWYQQKPGKAPKLLIY**Y**ASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSL QPEDIATYYCQQRYSLWRTFGQGTKLEIK	435.
HS7_VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGEI**S**PSGGSTSYNQKFQGRVTMTRDTSTST VYMELSSLRSEDTAVYYCARERPLYASDLWGQGTTVTVSS	436.
HS7_VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDV**Y**TAVAWYQQKPGKAPKLLIY**S**ASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSL QPEDIATYYCQQRYSLWRTFGQGTKLEIK	437.
HS8_VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGEI**S**PSGGSTSYNQKFQGRVTMTRDTSTST VYMELSSLRSEDTAVYYCARERPLYASDLWGQGTTVTVSS	438.
HS8_VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDV**K**TAVAWYQQKPGKAPKLLIY**Y**ASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSL QPEDIATYYCQQRYSLWRTFGQGTKLEIK	439.
HS9_VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGEI**S**PSGGSTSYNQKFQGRVTMTRDTSTST VYMELSSLRSEDTAVYYCARERPLYASDLWGQGTTVTVSS	440.
HS9_VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDV**K**TAVAWYQQKPGKAPKLLIY**S**ASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSL QPEDIATYYCQQRYSLWRTFGQGTKLEIK	441.

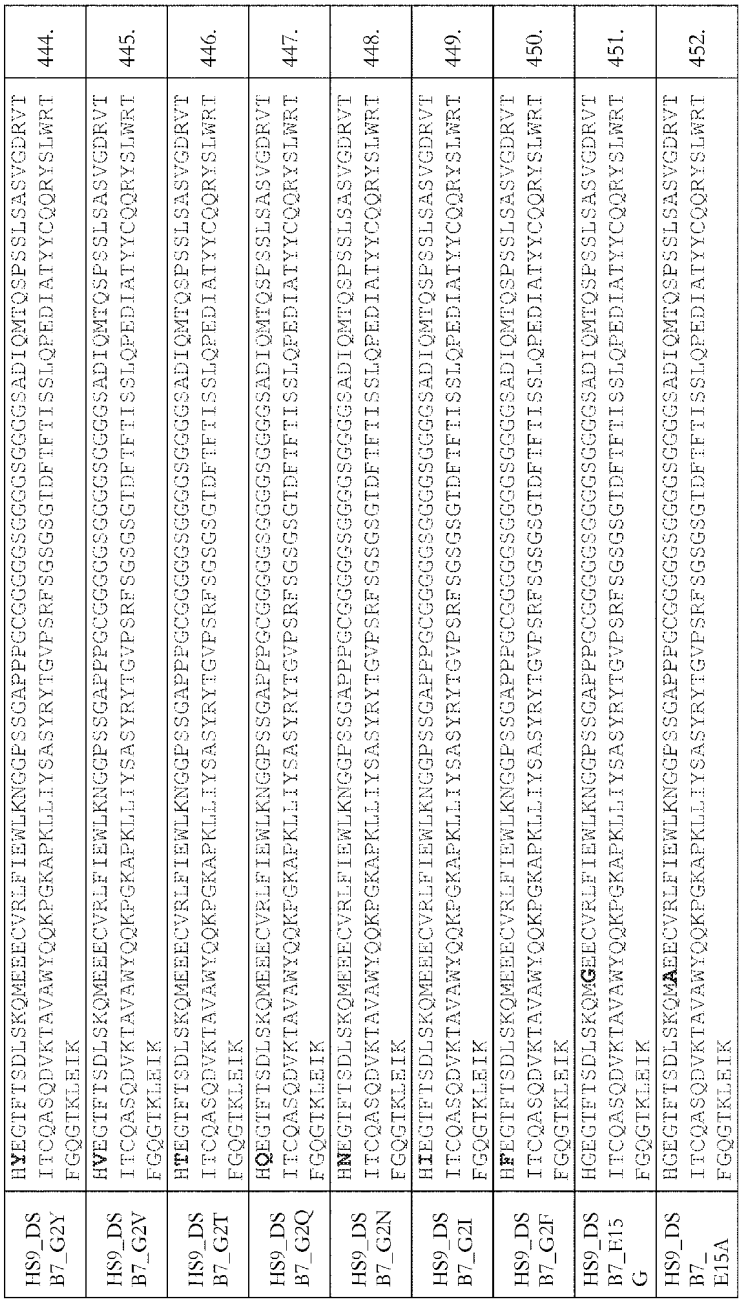
【００８６】

【表４６】

1IS10_VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGEI**S**PSGGSTSYNQKFQGRVTMTRDTSTST VYMELSSLRSEDTAVYYCARERPLYASDLWGQGTTVTVSS	442.
1IS10_VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIY**S**ASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSL QPEDIATYYCQQRYSLWRTFGQGTKLEIK	443.

【００８７】

【表４７】



HS9_DS B7_G2Y	HYEGTFTSDLSKQMEECVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPGCGGGGSGGGGSGGGGSADIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCQASQDVKTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQRYSLWRT FGQGTKLEIK	444.
HS9_DS B7_G2V	HVEGTFTSDLSKQMEECVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPGCGGGGSGGGGSGGGGSADIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCQASQDVKTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQRYSLWRT FGQGTKLEIK	445.
HS9_DS B7_G2T	HTEGTFTSDLSKQMEECVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPGCGGGGSGGGGSGGGGSADIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCQASQDVKTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQRYSLWRT FGQGTKLEIK	446.
HS9_DS B7_G2Q	HQEGTFTSDLSKQMEECVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPGCGGGGSGGGGSGGGGSADIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCQASQDVKTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQRYSLWRT FGQGTKLEIK	447.
HS9_DS B7_G2N	HNEGTFTSDLSKQMEECVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPGCGGGGSGGGGSGGGGSADIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCQASQDVKTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQRYSLWRT FGQGTKLEIK	448.
HS9_DS B7_G2I	HIEGTFTSDLSKQMEECVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPGCGGGGSGGGGSGGGGSADIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCQASQDVKTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQRYSLWRT FGQGTKLEIK	449.
HS9_DS B7_G2F	HFEGTFTSDLSKQMEECVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPGCGGGGSGGGGSGGGGSADIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCQASQDVKTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQRYSLWRT FGQGTKLEIK	450.
HS9_DS B7_E15G	HGEGTFTSDLSKQMGEECVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPGCGGGGSGGGGSGGGGSADIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCQASQDVKTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQRYSLWRT FGQGTKLEIK	451.
HS9_DS B7_E15A	HGEGTFTSDLSKQMAEECVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPGCGGGGSGGGGSGGGGSADIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCQASQDVKTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQRYSLWRT FGQGTKLEIK	452.

【００８８】

【表４８】

HS9_DS B7_V19T	HGEGTFTSDLSKQMEEECTRLFIEWLKNGGPSSGAPPPGCGGGGSGGGGSGGGGSADIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCQASQDVKTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQRYSLWRT FGQGTKLEIK	453.
HS9_DS B7_V19S	HGEGTFTSDLSKQMEEECSRLFIEWLKNGGPSSGAPPPGCGGGGSGGGGSGGGGSADIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCQASQDVKTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQRYSLWRT FGQGTKLEIK	454.
HS9_DS B7_V19G	HGEGTFTSDLSKQMEEECGRLFIEWLKNGGPSSGAPPPGCGGGGSGGGGSGGGGSADIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCQASQDVKTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQRYSLWRT FGQGTKLEIK	455.
HS9_DS B7_V19A	HGEGTFTSDLSKQMEEECARLFIEWLKNGGPSSGAPPPGCGGGGSGGGGSGGGGSADIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCQASQDVKTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQRYSLWRT FGQGTKLEIK	456.
HS9_DS B7_I23T	HGEGTFTSDLSKQMEEECVRLFTEWLKNGGPSSGAPPPGCGGGGSGGGGSGGGGSADIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCQASQDVKTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQRYSLWRT FGQGTKLEIK	457.
HS9_DS B7_I23S	HGEGTFTSDLSKQMEEECVRLFSEWLKNGGPSSGAPPPGCGGGGSGGGGSGGGGSADIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCQASQDVKTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQRYSLWRT FGQGTKLEIK	458.
HS9_DS B7_I23G	HGEGTFTSDLSKQMEEECVRLFGEWLKNGGPSSGAPPPGCGGGGSGGGGSGGGGSADIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCQASQDVKTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQRYSLWRT FGQGTKLEIK	459.
HS9_DS B7_I23A	HGEGTFTSDLSKQMEEECVRLFAEWLKNGGPSSGAPPPGCGGGGSGGGGSGGGGSADIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCQASQDVKTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQRYSLWRT FGQGTKLEIK	460.
HS9_DS B7_L26T	HGEGTFTSDLSKQMEEECVRLFIEWTKNGGPSSGAPPPGCGGGGSGGGGSGGGGSADIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCQASQDVKTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQRYSLWRT FGQGTKLEIK	461.

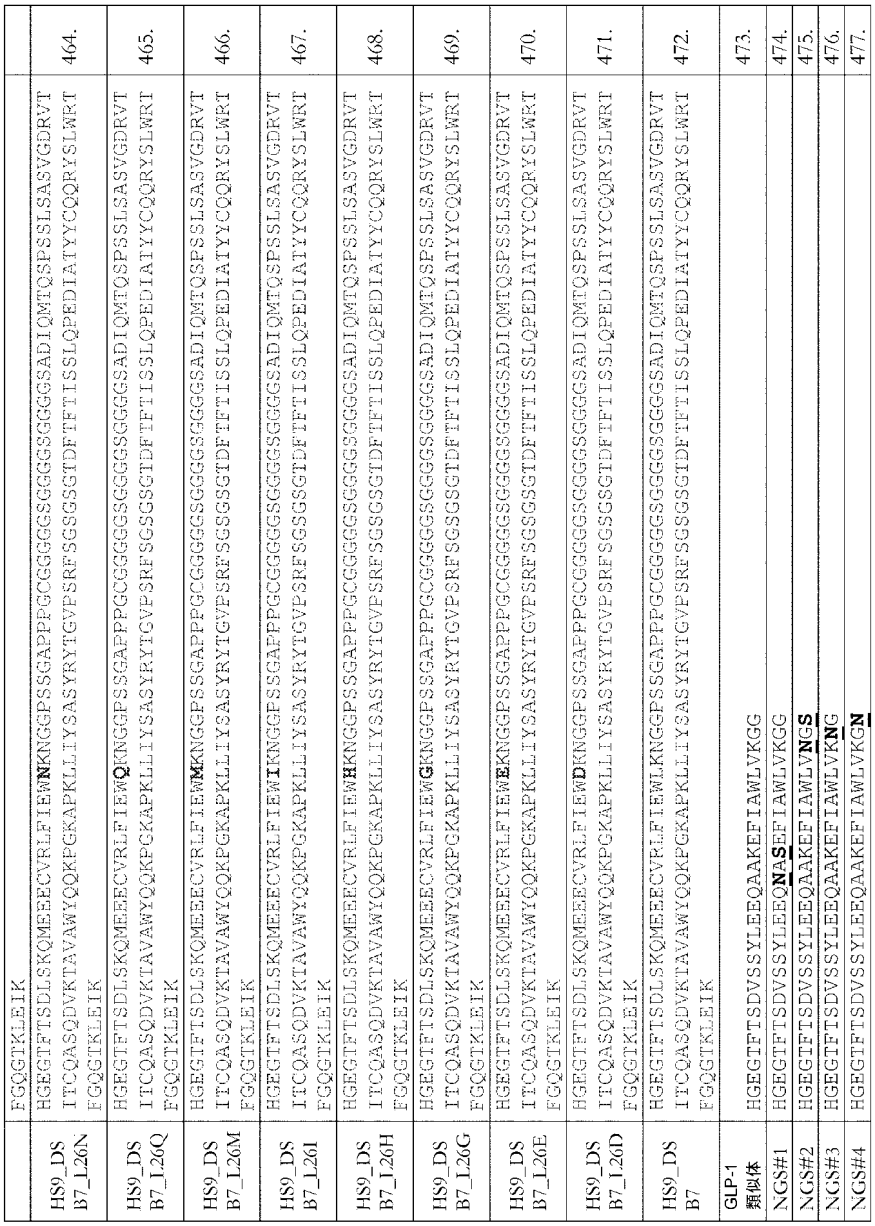
【００８９】

【表４９】

HS9_DS B7_L26S	HGEGTFTSDLSKQMEEECVRLFIEW**S**KNGGPSSGAPPPGCGGGGSGGGGSGGGGSADIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCQASQDVKTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQRYSLWRT FGQGTKLEIK	462.
HS9_DS B7_L26P	HGEGTFTSDLSKQMEEECVRLFIEW**P**KNGGPSSGAPPPGCGGGGSGGGGSGGGGSADIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCQASQDVKTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQRYSLWRT	463.

【００９０】

【表５０】



	FGQGTKLEIK	
HS9_DS B7_L26N	HGEGTFTSDLSKQMEEECVRLFIEWNKNGGPSSGAPPPGCGGGGSGGGGSGGGGSADIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCQASQDVKTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQRYSLWRT FGQGTKLEIK	464.
HS9_DS B7_L26Q	HGEGTFTSDLSKQMEEECVRLFIEWQKNGGPSSGAPPPGCGGGGSGGGGSGGGGSADIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCQASQDVKTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQRYSLWRT FGQGTKLEIK	465.
HS9_DS B7_L26M	HGEGTFTSDLSKQMEEECVRLFIEWMKNGGPSSGAPPPGCGGGGSGGGGSGGGGSADIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCQASQDVKTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQRYSLWRT FGQGTKLEIK	466.
HS9_DS B7_L26I	HGEGTFTSDLSKQMEEECVRLFIEWIKNGGPSSGAPPPGCGGGGSGGGGSGGGGSADIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCQASQDVKTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQRYSLWRT FGQGTKLEIK	467.
HS9_DS B7_L26H	HGEGTFTSDLSKQMEEECVRLFIEWHKNGGPSSGAPPPGCGGGGSGGGGSGGGGSADIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCQASQDVKTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQRYSLWRT FGQGTKLEIK	468.
HS9_DS B7_L26G	HGEGTFTSDLSKQMEEECVRLFIEWGKNGGPSSGAPPPGCGGGGSGGGGSGGGGSADIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCQASQDVKTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQRYSLWRT FGQGTKLEIK	469.
HS9_DS B7_L26E	HGEGTFTSDLSKQMEEECVRLFIEWEKNGGPSSGAPPPGCGGGGSGGGGSGGGGSADIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCQASQDVKTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQRYSLWRT FGQGTKLEIK	470.
HS9_DS B7_L26D	HGEGTFTSDLSKQMEEECVRLFIEWDKNGGPSSGAPPPGCGGGGSGGGGSGGGGSADIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCQASQDVKTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQRYSLWRT FGQGTKLEIK	471.
HS9_DS B7	HGEGTFTSDLSKQMEEECVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPGCGGGGSGGGGSGGGGSADIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCQASQDVKTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQRYSLWRT FGQGTKLEIK	472.
GLP-1 類似体	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGG	473.
NGS#1	HGEGTFTSDVSSYLEEQNASEFIAWLVKGG	474.
NGS#2	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVNGS	475.
NGS#3	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKNG	476.
NGS#4	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGN	477.

【００９１】

【表５１】

NGS#5	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGG	478.
NGS#6	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGG	479.
NGS#7	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIA**N**L**S**KGG	480.
NGS#8	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIA**N**L**T**KGG	481.
リンカー	GGGGGSGGGGSGGGGSA	482.
リンカー	**S**GGGGSGGGGSGGGGSA	483.
リンカー	G**S**GGGSGGGGSGGGGSA	484.
リンカー	**N**G**S**GGSGGGGSGGGGSA	485.
リンカー	G**N**G**S**GSGGGGSGGGGSA	486.
PC9_2_DSB#1 VL (バージョンB)(可変軽鎖の末端にKを有する)	***HGEGTFTSCLSKQMEEEAVRLIFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGGGGGGGGGCGG***GGGGSGGGGSGGGGSADIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**KASQDVH**TAVAWYQQKPGKAPKLLIY**HASYRYT**GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYC**QQRYSLWRT**FGQGTKLEIK	487.
PC9_2_DSB#3 VL (バージョンB)(可変軽鎖の末端にKを有する)	***HGEGTFTSDLSKQMEEECVRLIFIEWLKNGGPSSGAPPGC***GGGGSGGGGSGGGGSADIQMTQSPSSLSASVGDRVTIIC**KASQDVH**TAVAWYQQKPGKAPKLLIY**HASYRYT**GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYC**QQRYSLWRT**FGQGTKLEIK	488.
PC9_2_NGS#7 VL (バージョンB)(可変	***HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIANLSKGGG***GGGGSGGGGSGGGGSADIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**KASQDVH**TAVAWYQQKPGKAPKLLIY**HASYRYT**GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYC**QQRYSLWRT**FGQGTKLEIK	489.

【００９２】

【表５２】

軽鎖の末端にKを有する)		
PC9_2_DSB#7 VL (バージョンB) (可変軽鎖の末端にKを有する)	***HGEGTFTSDLSKQMEECVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPGCG***GGGSGGGGSGGGGSADIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITC**KASQDVHTAVA**WYQQKPGKAPKLLIY**HASYRYT**GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYC**QQRYSLWRT** FGQGTKLEIK	490.
改変されたPCSK9抗体VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFPFSKLGMVWVRQAPGKGLEWVSTISSGGGYTYYPDSVKGRFTISRDNAKN SLY LQMNSLRAEDTAVYYCAREGISFQGGTYTYVMDYWGQGTLVTVSS	491.
改変されたPCSK9抗体VL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHRNGITYSYWYLQKPGQSPQLLIYQLSNLASGVPDRFSGSGSGTDFT LKI SRVEAEDVGVYYCYQNLELPLTFGQGTKVEIK	492.
改変されたPCSK9抗体VH CDR1	GFPFSKLGMV	493.
改変されたPCSK9抗体VH	TISSGGGYTYYPDSVK	494.

【００９３】

【表５３】

	495.	
CDR2		
改変されたPCSK9抗体VH CDR3	EGISFQGGTYTYVMDY	
	496.	
改変されたPCSK9抗体VL CDR1	RSSKSLLHRNGITYSY	
	497.	
改変されたPCSK9抗体VL CDR2	QLSNLAS	
	498.	
改変されたPCSK9抗体VL CDR3	YQNLELPLT	

【００９４】
実施形態の説明
Ｉ．抗ＰＣＳＫ９～ＧＬＰ－１融合分子
本開示は、抗体（例えば、抗ＰＣＳＫ９抗体またはその抗原結合断片）とＧＬＰ－１部分との融合を対象とする。
【００９５】
一実施形態では、融合は、
ＧＬＰ－１部分－リンカー－抗体軽鎖
または
ＧＬＰ－１部分－リンカー－抗体重鎖
として構築される。
【００９６】
融合タンパク質は、遺伝子融合として構築され得る。あるいは、融合タンパク質は、化学的コンジュゲートとして、例えばシステイン：システインジスルフィド結合を通じて構築してもよい。

【００９７】
ＧＬＰ－１部分および抗体部分の他の配列もまた、本明細書の範囲内に含まれる。
【００９８】
Ａ．抗体およびその抗原結合断片
１．抗ＰＣＳＫ９部分
抗体部分は、抗ＰＣＳＫ９抗体またはその抗原結合断片であってもよい。一実施形態では、抗ＰＣＳＫ９部分は、ＬＤＬｃ（悪玉コレステロール）低下効果を提供する。
【００９９】
一実施形態では、抗ＰＣＳＫ９　ＶＬ部分は、配列番号２（ＰＣ９＿２＿ＨＳ９）であってもよい。別の実施形態では、抗ＰＣＳＫ９　ＶＬ部分は、配列番号２の抗原結合部分であってもよい。一実施形態では、抗ＰＣＳＫ９　ＶＬ部分は、配列番号２の６つすべてのＣＤＲを含んでもよい。一実施形態では、抗ＰＣＳＫ９　ＶＨ部分は、配列番号５に示されるように、抗体のｐＨ依存性バージョンであってもよい。
【０１００】
一実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、抗体の抗原への結合がｐＨ依存性であるように、ｐＨ依存性であってもよい。これは、抗体および／または抗原の半減期を変更するため、用いることができる。一実施形態では、抗体半減期を変更することは、半減期を延長することを意味する。一実施形態では、抗体半減期を変更することは、半減期を短縮することを意味する。一実施形態では、抗体半減期は、その融合パートナー（すなわちＧＬＰ－１）の安定性を最大化するため、変更（延長または短縮）してもよい。また、抗原半減期を変更することは、抗原抗体複合体が、例えば、抗体媒介性の分解（半減期を短縮すること）を通じて、または抗原を典型的な分解過程から保護すること（半減期を延長すること）により、抗原の半減期を変化させ得ることを意味し得る。一例では、ｐＨ５／５／ｐＨ７．４またはｐＨ６．０／ｐＨ７．２でのK_D比が２以上であるように、抗体は、エンドソームｐＨ（すなわちｐＨ５．５～６．０）と比べて、ｐＨ７．４で抗原に対してより高い親和性を有し得る。ｐＨ依存性抗体を改変する方法は、米国特許出願公開第２０１１／０２２９４８９号明細書および米国特許出願公開第２０１４／００４４７３０号明細書（参照により本明細書中に援用される）中に記載されている。
【０１０１】
一実施形態では、抗ＰＣＳＫ９部分は、遊離ＰＣＳＫ９の持続的抑制を提供する。一実施形態では、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、または９９％の抑制が提供される。
【０１０２】
一実施形態では、ＰＣＳＫ９に特異的に結合することが可能な抗ＰＣＳＫ９抗体またはその抗原結合断片は、
ａ．配列番号１、５、８、または１０に対して少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％同一である配列を含む重鎖可変領域；および
ｂ．配列番号２、６、９または１１に対して少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％同一である配列を含む軽鎖可変領域
を含む。
【０１０３】
一実施形態では、ＰＣＳＫ９に特異的に結合することが可能な抗ＰＣＳＫ９抗体またはその抗原結合断片は、
ａ．配列番号１４と比べて１つの突然変異を有する配列を含む重鎖可変領域ＣＤＲ１配列；
ｂ．配列番号１５、１６、１７、または１８と比べて１つまたは２つの突然変異を有する配列を含む重鎖可変領域ＣＤＲ２配列；
ｃ．配列番号１９と比べて１つの突然変異を有する配列を含む重鎖可変領域ＣＤＲ３配

列.
ｄ．配列番号２０、２１、２２、または２３と比べて１つまたは２つの突然変異を有する配列を含む軽鎖可変領域ＣＤＲ１配列；
ｅ．配列番号２４または２５と比べて１つの突然変異を有する配列を含む軽鎖可変領域ＣＤＲ２配列；および
ｆ．配列番号２６と比べて１つの突然変異を有する配列を含む軽鎖可変領域ＣＤＲ３配列
を含む。
【０１０４】
一実施形態では、ＰＣＳＫ９に特異的に結合することが可能な抗ＰＣＳＫ９抗体またはその抗原結合断片は、
ａ．配列番号１４を含む重鎖可変領域ＣＤＲ１配列；
ｂ．配列番号１５、１６、１７、または１８を含む重鎖可変領域ＣＤＲ２配列；
ｃ．配列番号１９を含む重鎖可変領域ＣＤＲ３配列.
ｄ．配列番号２０、２１、２２、または２３を含む軽鎖可変領域ＣＤＲ１配列；
ｅ．配列番号２４または２５を含む軽鎖可変領域ＣＤＲ２配列；および
ｆ．配列番号２６を含む軽鎖可変領域ＣＤＲ３配列
を含む。
【０１０５】
別の実施形態では、抗ＰＣＳＫ９部分は、米国特許第８，０３０，４５７号明細書、米国特許第８，０６２，６４０号明細書、米国特許第８，３５７，３７１号明細書、米国特許第８，１６８，７６２号明細書、米国特許第８，５６３，６９８号明細書、米国特許第８，８２９，１６５号明細書、米国特許第８，８５９，７４１号明細書、米国特許第８，１８８，２３３号明細書、国際公開第２０１２／０８８３１３号パンフレット、米国特許出願公開第２０１２／０１９５９１０号明細書、米国特許第８，５３０，４１４号明細書、米国特許出願公開第２０１３／０１８９２７８号明細書、米国特許第８，３４４，１４４号明細書、米国特許出願公開第２０１１／００３３４６５号明細書、米国特許第８，１８８，２３４号明細書、米国特許第８，０８０，２４３号明細書、米国特許出願公開第２０１１／０２２９４８９号明細書、米国特許出願公開第２０１０／０２３３１７７号明細書、米国特許出願公開第２０１３／３１５９２７号明細書および米国特許出願公開第２０１３／００７１４０５号明細書のいずれかに記載される通りの抗ＰＣＳＫ９抗体または抗原結合断片を含んでもよい。これらの参考文献の各々は、抗ＰＳＣＫ９抗体およびその抗原結合断片の配列および説明について参照により援用される。
【０１０６】
一実施形態では、抗ＰＣＳＫ９部分は、上の表１のグループＢ中の配列から選択される重鎖および軽鎖可変領域を含んでもよい。あるいは、抗ＰＣＳＫ９部分は、上の表１のグループＢからの重鎖および軽鎖可変領域と同一のＣＤＲを有する重鎖および軽鎖可変領域を含んでもよい。加えて、抗ＰＣＳＫ９部分は、配列番号５３、５５、５７、５９、６１、または６３から選択される重鎖可変領域および配列番号５４、５６、５８、６０、６２、または６４から選択される軽鎖可変領域を含んでもよい。あるいは、抗ＰＣＳＫ９部分は、配列番号５３、５５、５７、５９、６１、または６３のいずれか１つからの重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３、ならびに配列番号５４、５６、５８、６０、６２、または６４のいずれか１つからの軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３を含んでもよい。
【０１０７】
一実施形態では、抗ＰＣＳＫ９部分は、上の表１のグループＣ中の配列から選択される重鎖および軽鎖可変領域を含んでもよい。あるいは、抗ＰＣＳＫ９部分は、上の表１のグループＣからの重鎖および軽鎖可変領域と同一のＣＤＲを有する重鎖および軽鎖可変領域を含んでもよい。加えて、抗ＰＣＳＫ９部分は、配列番号６５～９５から選択される重鎖可変領域および配列番号９６～１２６から選択される軽鎖可変領域を含んでもよい。ある

いは、抗ＰＣＳＫ９部分は、配列番号６５～９５のいずれか１つからの重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３、ならびに配列番号９６～１２６のいずれか１つからの軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３を含んでもよい。

【０１０８】

一実施形態では、抗ＰＣＳＫ９部分は、上の表１のグループＤ中の配列から選択される重鎖および軽鎖可変領域を含んでもよい。あるいは、抗ＰＣＳＫ９部分は、上の表１のグループＤからの重鎖および軽鎖可変領域と同一のＣＤＲを有する重鎖および軽鎖可変領域を含んでもよい。加えて、抗ＰＣＳＫ９部分は、配列番号１２７～２１８から選択される重鎖可変領域および配列番号２１９～３１１から選択される軽鎖可変領域を含んでもよい。あるいは、抗ＰＣＳＫ９部分は、配列番号１２７～２１８のいずれか１つからの重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３、ならびに配列番号２１９～３１１のいずれか１つからの軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３を含んでもよい。

【０１０９】

一実施形態では、抗ＰＣＳＫ９部分は、上の表１のグループＥ中の配列から選択される重鎖および軽鎖可変領域を含んでもよい。あるいは、抗ＰＣＳＫ９部分は、上の表１のグループＥからの重鎖および軽鎖可変領域と同一のＣＤＲを有する重鎖および軽鎖可変領域を含んでもよい。加えて、抗ＰＣＳＫ９部分は、配列番号３１２～３１７から選択される重鎖可変領域および配列番号３１８～３２３から選択される軽鎖可変領域を含んでもよい。あるいは、抗ＰＣＳＫ９部分は、配列番号３１２～３１７のいずれか１つからの重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３、ならびに配列番号３１８～３２３のいずれか１つからの軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３を含んでもよい。

【０１１０】

一実施形態では、抗ＰＣＳＫ９部分は、上の表１のグループＦ中の配列から選択される重鎖および軽鎖可変領域を含んでもよい。あるいは、抗ＰＣＳＫ９部分は、上の表１のグループＦからの重鎖および軽鎖可変領域と同一のＣＤＲを有する重鎖および軽鎖可変領域を含んでもよい。加えて、抗ＰＣＳＫ９部分は、配列番号３２４から選択される重鎖可変領域および配列番号３２５から選択される軽鎖可変領域を含んでもよい。あるいは、抗ＰＣＳＫ９部分は、配列番号３２４のいずれか１つからの重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３、ならびに配列番号３２５のいずれか１つからの軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３を含んでもよい。

【０１１１】

一実施形態では、抗ＰＣＳＫ９部分は、上の表１のグループＧ中の配列から選択される重鎖および軽鎖可変領域を含んでもよい。あるいは、抗ＰＣＳＫ９部分は、上の表１のグループＧからの重鎖および軽鎖可変領域と同一のＣＤＲを有する重鎖および軽鎖可変領域を含んでもよい。加えて、抗ＰＣＳＫ９部分は、配列番号３２６、３３９、３４０、または３４３～４００から選択される重鎖可変領域および配列番号３２７、３４１、または３４２から選択される軽鎖可変領域を含んでもよい。あるいは、抗ＰＣＳＫ９部分は、配列番号３２６、３３９、３４０、または３４３～４００のいずれか１つからの重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３、ならびに配列番号３２７、３４１、または３４２のいずれか１つからの軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３を含んでもよい。さらに、抗ＰＣＳＫ９部分は、配列番号３２８（ＨＣ　ＣＤＲ１）、３２９（ＨＣ　ＣＤＲ２）、３３１（ＨＣ　ＣＤＲ２）、３３０（ＨＣ　ＣＤＲ３）、３３２（ＨＣ　ＣＤＲ３）からの重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３、ならびに配列番号３３３（ＬＣ　ＣＤＲ１）、３３４（ＬＣ　ＣＤＲ２）、３３５（ＬＣ　ＣＤＲ３）、３３６（ＬＣ　ＣＤＲ１）、３３７（ＬＣ　ＣＤＲ２）、および３３８（ＬＣ　ＣＤＲ３）からの軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３を含んでもよい。一実施形態では、抗ＰＣＳＫ９部分は、配列番号４９１のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号４９２のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含んでもよい。あるいは、抗ＰＣＳＫ９部分は、配列番号４９３～４９５からの重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３および配列番号４９６～４９８からの軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３を含んでもよい。

【０１１２】
他の実施形態では、抗体部分は、抗ＰＣＳＫ９抗体以外の抗体（例えば、抗Ｂ７－Ｈ１抗体）を含んでもよい。一実施形態では、抗Ｂ７－Ｈ１抗体は、配列番号４２２のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号４２３のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含んでもよい。
【０１１３】
２．抗体または抗原結合断片
本明細書で使用されるとき、抗体またはその抗原結合断片という用語は、最も広義に用いられる。それは、従来のハイブリドーマ技術、組換え技術によって産生されるモノクローナル抗体（ｍＡｂ）および／またはその機能断片などの人工物であってもよい。それは、インタクトな免疫グロブリン分子、例えば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体（ｍＡｂ）、単一特異性抗体、二重特異性抗体、多特異性抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、動物抗体（例えばラクダ科動物抗体）、キメラ抗体、ならびにそれらの部分、断片、領域、ペプチドおよび誘導体（任意の公知の技術、例えば限定はされないが、酵素切断、ペプチド合成、または組換え技術によって提供される）、例えば、軽鎖が欠損した免疫グロブリン、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆｖ、ｓｃＦｖ、抗体断片、ダイアボディー、Ｆｄ、ＣＤＲ領域、あるいは抗原またはエピトープに結合することが可能な抗体の任意の部分またはペプチド配列などをいずれも含んでもよい。一実施形態では、機能的部分は、一本鎖抗体、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、Ｆａｂ断片、またはＦ（ａｂ’）$_2$断片である。
【０１１４】
抗体または機能的部分は、分子と特異的に反応し、それにより分子を抗体に結合させることが可能な場合、分子に「結合することが可能」であると言える。抗体断片または部分は、インタクトな抗体のＦｃ断片が欠如し、より迅速に循環系から排除される場合があり、またインタクトな抗体よりも低い非特異性組織結合を有し得る。抗体の例が、当該技術分野で周知の方法を用いて、例えば（Ｆａｂ断片を産生するための）パパインまたは（Ｆ（ａｂ’）$_2$断片を産生するための）ペプシンなどの酵素を用いたタンパク質分解切断により、インタクトな抗体から産生され得る。抗体の部分は、上記の方法のいずれかによって作成するか、または組換え分子の一部分を発現させることによって作成してもよい。例えば、組換え抗体の１つもしくは複数のＣＤＲ領域は、単離し、適切な発現ベクターにサブクローン化してもよい。
【０１１５】
一実施形態では、抗体または機能的部分はヒト抗体である。ヒト治療におけるヒト抗体の使用は、非ヒト配列に対するヒト個体における免疫学的反応に起因する副作用の機会を減少させ得る。別の実施形態では、抗体または機能的部分はヒト化である。別の実施形態では、抗体または機能的部分はキメラ抗体である。この方法、目的の配列、例えば目的の結合部位などは、抗体または機能的部分に含めることができる。
【０１１６】
一実施形態では、抗体は、ＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＭ、またはＩｇＥアイソタイプを有し得る。一実施形態では、抗体はＩｇＧである。一態様では、抗ＰＣＳＫ９抗体またはその抗原結合断片は、ＩｇＧ１であり得る。
【０１１７】
３．定常ドメインに対する変更
一実施形態では、抗ＰＣＳＫ９抗体または抗原結合断片はＦｃ領域を含む。本明細書で使用されるＦｃ領域が、第１の定常領域免疫グロブリンドメインを除く、抗体の定常領域を含むポリペプチドを含むことが理解されるであろう。したがって、Ｆｃは、ＩｇＡ、ＩｇＤ、およびＩｇＧの最後の２つの定常領域免疫グロブリンドメイン、ならびにＩｇＥおよびＩｇＭの最後の３つの定常領域免疫グロブリンドメイン、ならびにこれらのドメインに対する可動性ヒンジＮ末端を示す。ＩｇＡおよびＩｇＭについては、ＦｃはＪ鎖を含み得る。ＩｇＧについては、Ｆｃは、免疫グロブリンドメインＣガンマ２およびＣガンマ３

（Ｃγ２およびＣγ３）、ならびにＣガンマ１（Ｃγ１）とＣガンマ２（Ｃγ２）との間のヒンジを含む。Ｆｃ領域の境界は変動し得るが、ヒトＩｇＧ重鎖Ｆｃ領域は通常、そのカルボキシル末端に残基Ｃ２２６またはＰ２３０を含むと定義され、ここで付番は、Ｋａｂａｔらなどの ＥＵインデックスに従う（１９９１，ＮＩＨ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ ９１－３２４２，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｔｅｃｈｎｉｃａｌ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ Ｓｅｒｖｉｃｅ，Ｓｐｒｉｎｇｆｉｅｌｄ，ＶＡ）。「Ｋａｂａｔで示されるＥＵインデックス」は、Ｋａｂａｔら、上記に記載される通りのヒトＩｇＧ１ＥＵ抗体の残基付番を示す。Ｆｃは、単離におけるこの領域、あるいは抗体、抗体断片、またはＦｃ融合タンパク質と関連したこの領域を示し得る。

【０１１８】

一実施形態では、抗ＰＣＳＫ９抗体またはその抗原結合部分は、低下したエフェクター機能（例えば、低下したＡＤＣＣおよび／またはＣＤＣ）を有する変異体Ｆｃ領域を有する。一実施形態では、Ｆｃ領域は、検出可能なエフェクター機能を有さない。一実施形態では、Ｆｃ領域は、Ｋａｂａｔに記載のＥＵインデックスによって付番されたものとして、２３４、２３５、および３３１から選択される１つ以上の位置に少なくとも１つの非天然アミノ酸を含む。具体的な実施形態では、本発明は、Ｆｃ変異体を提供し、ここでＦｃ領域は、Ｋａｂａｔに記載のＥＵインデックスによって付番されたものとして、２３４Ｆ、２３５Ｆ、２３５Ｙ、および３３１Ｓから選択される少なくとも１つの非天然アミノ酸を含む。さらなる具体的な実施形態では、本発明のＦｃ変異体は、Ｋａｂａｔに記載のＥＵインデックスによって付番されたものとして、２３４Ｆ、２３５Ｆ、および３３１Ｓアミノ酸残基を含む。別の具体的な実施形態では、本発明のＦｃ変異体は、Ｋａｂａｔに記載のＥＵインデックスによって付番されたものとして、２３４Ｆ、２３５Ｙ、および３３１Ｓアミノ酸残基を含む。特定の実施形態では、抗ＰＣＳＫ９抗体またはその抗原結合部分は、変異体Ｆｃ領域を有し、ここで変異体は、Ｋａｂａｔに記載のＥＵインデックスによって付番されたものとして、位置２３４にフェニルアラニン（Ｆ）残基、位置２３５にフェニルアラニン（Ｆ）残基またはグルタミン酸（Ｅ）残基、および位置３３１にセリン（Ｓ）残基を含む。かかる突然変異の組み合わせは以降、三重突然変異体（ＴＭ）と称される。

【０１１９】

Ｋａｂａｔに記載のＥＵインデックスによって付番されたものとして、セリン２２８プロリン突然変異（Ｓ２２８Ｐ）（以降、Ｐ突然変異と称される）は、特定のＩｇＧ４分子の安定性を高めることが報告されている（Ｌｕ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ ９７（２）：９６０－９６９，２００８）。Ｌｕ ｅｔ ａｌ．では、その中で彼らはＫａｂａｔに記載の「ＥＵインデックス」ではなくＫａｂａｔ付番システムを用いることから、それは位置２４１と称される。

【０１２０】

このＰ突然変異は、ＡＤＣＣをさらにノックアウトするため、Ｌ２３５Ｅと組み合わせてもよい。突然変異のこの組み合わせは以降、二重突然変異（ＤＭ）と称される。

【０１２１】

Ｂ．ＧＬＰ－１部分

融合分子は、ＧＬＰ－１部分を含む。ＧＬＰ－１では、異名のグルカゴン様ペプチド－１をも参照され得る。ＧＬＰ－１では、ＧＬＰ－１類似体であるＥｘｅｎｄｉｎ－４をも参照される。一実施形態では、ＧＬＰ－１部分は、グルコース調節および／または体重減少の恩恵をもたらす。

【０１２２】

一実施形態では、完全長ＧＬＰ－１分子は、融合タンパク質中で用いてもよい。別の実施形態では、ＧＬＰ－１の断片は、融合タンパク質中のＧＬＰ－１部分として用いてもよい。

【０１２３】

一実施形態では、ＧＬＰ－１部分は、ジスルフィド架橋を可能にするシステイン残基対

を有する。一実施形態では、システインは、親配列と比べて操作されたシステインである。一実施形態では、システインはＥ１８Ｃ突然変異である。

【０１２４】

一実施形態では、ＧＬＰ－１の効力は、ヒトＧＬＰ－１受容体で、野生型ＧＬＰ－１（例えば配列番号２９）またはＧＬＰ－１類似体（例えば配列番号１２）と比べて低下する。別の実施形態では、ヒトＧＬＰ－１受容体でのＧＬＰ－１の効力は、野生型ＧＬＰ－１またはＧＬＰ－１類似体よりも少なくとも約１０倍、２０倍、３０倍、４０倍、５０倍、６０倍、１００倍、１２５倍、１５０倍、１７５倍、２００倍、または２２５倍低い。別の実施形態では、効力はデュラグルチドと比べてほぼ同量低下する。ＧＬＰ－１の効力は、副作用を低減しながらＰＣＳＫ９の飽和を可能にする程度に低下し得る。一実施形態では、ＧＬＰ－１部分は、ＧＬＰ－１部分の効力を低減する少なくとも１つの突然変異を有し得る。一実施形態では、これは、限定はされないが悪心を含む副作用を低減するという恩恵をもたらす。一実施形態では、突然変異は点突然変異である。一実施形態では、点突然変異は、Ｅｘｅｎｄｉｎ－４についてはＶ１９Ａ、Ｇ２Ｖ、Ｅ１５Ａ、またはＬ２６Ｉから選択される。

【０１２５】

一実施形態では、ＧＬＰ－１部分は、配列番号３、７、１２、１３、または２８～４２のいずれかを含む。別の実施形態では、ＧＬＰ－１部分は、少なくとも１０、１５、２０、または２５アミノ酸を含む、配列番号３、７、１２、１３、または２８～４２のいずれかの断片である。さらなる実施形態では、ＧＬＰ－１部分は、配列番号３、７、１２、１３、または２８～４２のいずれかに対して少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％同一である配列を含む。さらなる実施形態では、ＧＬＰ－１部分は、配列番号３、７、１２、１３、または２８～４２のいずれかと比べて１、２、３、４、５、または６つの突然変異を有する配列を含む。

【０１２６】

Ｃ．融合およびリンカー

一実施形態では、ＧＬＰ－１部分は、抗ＰＣＳＫ９抗体の軽鎖または抗原結合断片に直接的または間接的に融合される。別の実施形態では、ＧＬＰ－１部分は、抗ＰＣＳＫ９抗体の重鎖または抗原結合断片に直接的または間接的に融合される。

【０１２７】

一実施形態では、リンカーは、抗ＰＣＳＫ９抗体または抗原結合断片とＧＬＰ－１部分との融合物を構築するため、用いてもよい。別の実施形態では、抗ＰＣＳＫ９抗体または抗原結合断片は、ＧＬＰ－１部分に直接的にコンジュゲートしてもよい。

【０１２８】

リンカーが用いられる場合、リンカーは、融合タンパク質に対する任意の好適なリンカーから選択してもよい。一実施形態では、リンカーは、単独でまたは他のアミノ酸と組み合わせて、１、２、３、または４セットのリピートのいずれかとして、ＧＧＧＧＳ（配列番号２７）リピートを含んでもよい。一実施形態では、リンカーは、単独でまたは他のアミノ酸と組み合わせて、ＧおよびＳの他の組み合わせを含んでもよい。一部の実施形態では、リンカーは、Ｃ末端アラニン（Ａ）を有する。

【０１２９】

一実施形態では、具体的なリンカーは、ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＡ（配列番号４）から選択してもよい。一実施形態では、リンカーは、抗体部分の場合には該当しないが、ＧＬＰ－１部分のＣ末端とＧＬＰ－１分子の別の部分との間にジスルフィド架橋の形成を可能にする。かかる例において、柔軟性が制限されたリンカーは、抗体部分への望ましくないジスルフィド架橋を阻止し得る。

【０１３０】

一実施形態では、リンカーは、配列番号４に対して少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％同一である。

【０１３１】

一実施形態では、システイン：システインジスルフィド架橋は、ＧＬＰ－１部分においてシステイン置換変異を作成することによって形成される。一実施形態では、突然変異はＥ１８Ｃである。

【０１３２】

ＩＩ．融合分子をコードする核酸

本実施形態は、上のセクションＩに記載の融合分子のいずれかをコードする単離、合成、または組換え核酸配列をさらに提供する。かかる核酸は、本明細書に示される重鎖および軽鎖配列をコードする。あるいは、かかる核酸は、ＧＬＰ－１部分に部分的に融合された抗ＰＣＳＫ９抗体または抗原結合部分を含む。核酸コードの縮重によって複数の核酸が同じアミノ酸をコードすることになり、すべては本明細書中に包含される。

【０１３３】

ＩＩＩ．融合分子、製剤、および医薬組成物を作成する方法

一実施形態は、融合分子を生成するように核酸が発現される条件下で宿主細胞を培養し、その後融合分子を回収することにより、融合分子を生成する方法を含む。融合分子を発現するため、限定はされないが哺乳類細胞株を含む種々の細胞株を用いてもよい。一実施形態では、細胞株はヒトであってもよい。別の実施形態では、細菌または昆虫細胞株を用いてもよい。一実施形態では、細胞株は、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、ＣＨＯ細胞（例えばＤＧ４４）の変異体、２９３細胞、およびＮＳ０細胞を含む。別の実施形態では、細胞株は、ＶＥＲＹ、ＢＨＫ、Ｈｅｌａ、ＣＯＳ、ＭＤＣＫ、２９３Ｆ、２９３Ｔ、３Ｔ３、Ｗ１３８、ＢＴ４８３、Ｈｓ５７８Ｔ、Ｓｐ２／０、ＨＴＢ２、ＢＴ２Ｏ、Ｔ４７Ｄ、ＣＲＬ７Ｏ３Ｏ、およびＨｓＳ７８Ｂｓｔ細胞を含む。

【０１３４】

組換え発現では、融合分子をコードするポリヌクレオチドを有する発現ベクターの構築が用いられる。一旦ポリヌクレオチドが得られていれば、融合分子を生成するためのベクターは、当該技術分野で周知の組換えＤＮＡ技術により生成してもよい。発現ベクターは、適切な転写および翻訳制御シグナルを含んでもよい。これは、インビトロ組換えＤＮＡ技術、合成技術、およびインビボ遺伝的組換えを用いて行ってもよい。一実施形態では、複製可能なベクターは、異種プロモーターに作動可能に連結された抗体または機能的部分をコードする核酸配列を含む。

【０１３５】

種々の宿主－発現ベクター系は、米国特許第５，８０７，７１５号明細書中に記載されるように融合分子を発現するために用いてもよい。例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞（ＣＨＯ）などの哺乳類細胞は、ヒトサイトメガロウイルス（ｃｙｔｏｍｅｇａｌｏｖｉｒｕｓ）由来の主要な中間体初期遺伝子プロモーター要素などのベクターと併用すると、抗体のための有効な発現系である（Ｆｏｅｃｋｉｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ，４５：１０１（１９８６）；およびＣｏｃｋｅｔｔ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，８：２（１９９０））。さらに、挿入された配列の発現を調節するか、または所望される特異的な様式で遺伝子産物を修飾し、プロセシングする宿主細胞株を選択してもよい。タンパク質産物のかかる修飾（例えばグリコシル化）およびプロセシング（例えば切断）は、タンパク質の機能にとって重要であり得る。種々の宿主細胞は、タンパク質および遺伝子産物の翻訳後プロセシングおよび修飾における特徴および特異的機構を有する。適切な細胞株または宿主系は、本発明のタンパク質の正確な修飾およびプロセシングを保証するように選択することができる。この目的のため、遺伝子産物の一次転写、グリコシル化、およびリン酸化の適切なプロセシングのための細胞機構を有する真核宿主細胞を用いてもよい。

【０１３６】

細菌系においては、いくつかの発現ベクターは、融合分子が発現されることを意図した用途に応じて選択してもよい。例えば、融合分子を含む医薬組成物の作成を目的として大量のかかる融合分子の生成が意図される場合、容易に精製される高レベルの融合タンパク質産物の発現を誘導するベクターが望ましい場合がある。かかるベクターとして、限定は

されないが、融合タンパク質が生成されるようにコード配列が個別にｌａｃ Ｚコード領域とフレームを揃えてベクターに連結可能である大腸菌（Ｅ．Ｃｏｌｉ）発現ベクターｐＵＲ２７８（Ｒｕｔｈｅｒ ｅｔ ａｌ．，ＥＭＢＯ，１２：１７９１（１９８３））；ｐＩＮベクター（Ｉｎｏｕｙｅ ＆ Ｉｎｏｕｙｅ，１９８５，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１３：３１０１－３１０９（１９８５）；Ｖａｎ Ｈｅｅｋｅ ＆ Ｓｃｈｕｓｔｅｒ，１９８９，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２４：５５０３－５５０９（１９８９））などが挙げられる。ｐＧＥＸベクターもまた、外来ポリペプチドをグルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）との融合タンパク質として発現するように用いてもよい。一般に、かかる融合タンパク質は、可溶性であり、グルタチオン－アガロース親和性マトリックスへの吸着および結合、その後の遊離グルタチオンの存在下での溶出により、溶解細胞から容易に精製することができる。ｐＧＥＸベクターは、クローン化標的遺伝子産物がＧＳＴ部分から放出され得るように、トロンビンおよび／または第Ｘａ因子プロテアーゼ切断部位を発現されるポリペプチドに導入するように設計される。

【０１３７】

昆虫系では、オートグラファカリフォルニカ（Ａｕｔｏｇｒａｐｈａ ｃａｌｉｆｏｒｎｉｃａ）核多角体病ウイルス（ＡｃＮＰＶ）は、外来遺伝子を発現するためのベクターとして用いられる。ウイルスは、ツマジロクサヨトウ（Ｓｐｏｄｏｐｔｅｒａ ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａ）細胞内で成長する。タンパク質コード配列は、ウイルスの非必須領域（例えばポリヘドリン遺伝子）に個別にクローン化され、ＡｃＮＰＶプロモーター（例えば、ポリヘドリンプロモーター）の制御下に置くことができる。

【０１３８】

哺乳類宿主細胞では、いくつかのウイルスに基づく発現系を用いてもよい。アデノウイルスが発現ベクターとして用いられる場合、目的のコード配列は、アデノウイルス転写／翻訳制御複合体、例えば後期プロモーターおよび三部分リーダー配列（ｔｒｉｐａｒｔｉｔｅ ｌｅａｄｅｒ ｓｅｑｕｅｎｃｅ）に連結してもよい。次に、このキメラ遺伝子は、インビトロまたはインビボ組換えにより、アデノウイルスゲノムに挿入してもよい。ウイルスゲノムの非必須領域（例えば領域Ｅ１またはＥ３）への挿入は、生存可能でかつ感染宿主内で抗体または機能的部分を発現可能な組換えウイルスを生じることになる（例えば、Ｌｏｇａｎ ＆ Ｓｈｅｎｋ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８１：３５５－３５９（１９８４）を参照）。特異的な開始シグナルはまた、挿入された抗体または機能的部分のコード配列の効率的翻訳に要求される場合がある。これらのシグナルは、ＡＴＧ開始コドンおよび隣接配列を含む。さらに、開始コドンは、全挿入物の翻訳を保証するには、一般に、所望されるコード配列のリーディングフレームとフレームを揃える必要がある。これらの外因性翻訳制御シグナルおよび開始コドンは、天然および合成の双方で種々の起源を有し得る。発現の効率は、適切な転写エンハンサー要素、転写ターミネーターなどを含めることにより、高めることができる（例えば、Ｂｉｔｔｎｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌ．，１５３：５１－５４４（１９８７）を参照）。

【０１３９】

安定的発現は、組換えタンパク質の長期にわたる高収量の生成のため、用いることができる。例えば、融合分子を安定的に発現する細胞株は作成可能である。宿主細胞は、発現制御要素（例えば、プロモーター、エンハンサー、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位など）を含む適切に操作されたベクターおよび選択可能マーカー遺伝子を用いて形質転換することができる。外来ＤＮＡの導入後、細胞は、強化培地中で１～２日間成長させておいてもよく、次に選択培地に変更される。組換えプラスミド中の選択可能マーカーは、選択に耐性を与え、プラスミドを染色体に安定的に組み込んだ細胞が成長し、フォーカスを形成することを可能にし、それは次いで細胞株にクローン化し、拡張することができる。融合分子をコードするプラスミドは、遺伝子／ｃＤＮＡを、培養液中での生成に適した任意の細胞株に導入するため、用いることができる。

【０１４０】

いくつかの選択系を用いてもよく、例えば限定はされないが、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（Ｗｉｇｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ，１１：２２３（１９７７））、ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（Ｓｚｙｂａｌｓｋａ ＆ Ｓｚｙｂａｌｓｋｉ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，４８：２０２（１９９２））、およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（Ｌｏｗｙ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ，２２：８－１７（１９８０））遺伝子は各々、ｔｋ－、ｈｇｐｒｔ－またはａｐｒＴ－細胞において用いることができる。また、代謝拮抗物質耐性は、以下の遺伝子、すなわち、メトトレキサートに対する耐性を与えるｄｈｆｒ（Ｗｉｇｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，７７：３５７（１９８０）；Ｏ’Ｈａｒｅ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，７８：１５２７（１９８１））；ミコフェノール酸に対する耐性を与えるｇｐｔ（Ｍｕｌｌｉｇａｎ ＆ Ｂｅｒｇ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，７８：２０７２（１９８１））；アミノグリコシドＧ－４１８に対する耐性を与えるｎｅｏ（Ｗｕ ａｎｄ Ｗｕ，Ｂｉｏｔｈｅｒａｐｙ ３：８７－９５（１９９１）；Ｔｏｌｓｔｏｓｈｅｖ，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｔｏｘｉｃｏｌ．３２：５７３－５９６（１９９３）；Ｍｕｌｌｉｇａｎ，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２６０：９２６－９３２（１９９３）；およびＭｏｒｇａｎ ａｎｄ Ａｎｄｅｒｓｏｎ，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．６２：１９１－２１７（１９９３）；Ｍａｙ，ＴＩＢ ＴＥＣＨ １１（５）：１５５－２１５（１９９３））；ならびにハイグロマイシンに対する耐性を与えるｈｙｇｒｏ（Ｓａｎｔｅｒｒｅ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ，３０：１４７（１９８４））の選択における基盤として用いることができる。組換えＤＮＡ技術に関する一般的に当該技術分野で公知の方法は、所望される組換えクローンを選択するため、ルーチン的に適用してもよく、かかる方法は、例えば、Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．（ｅｄｓ．），Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，ＮＹ（１９９３）；Ｋｒｉｅｇｌｅｒ，Ｇｅｎｅ Ｔｒａｎｓｆｅｒ ａｎｄ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ，Ａ Ｌａｂｏｌａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｓｔｏｃｋｔｏｎ Ｐｒｅｓｓ，ＮＹ（１９９０）；およびｉｎ Ｃｈａｐｔｅｒｓ １２ ａｎｄ １３，Ｄｒａｃｏｐｏｌｉ ｅｔ ａｌ．（ｅｄｓ．），Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，ＮＹ（１９９４）；Ｃｏｌｂｅｒｒｅ－Ｇａｒａｐｉｎ ｅｔ ａｌ．，１９８１，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，１５０：１に記載されている。

【０１４１】

融合分子は、組換え発現によって生成されている場合、精製についての当該技術分野で公知の任意の方法により、例えばクロマトグラフィー（例えば、イオン交換、親和性、特に特異的抗原のプロテインＡまたはプロテインＧに対する親和性によるもの、およびサイジングカラムクロマトグラフィー）、遠心分離、示差溶解度（ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｌ ｓｏｌｕｂｉｌｉｔｙ）により、またはタンパク質精製用の任意の他の標準的技法により、精製してもよい。

【０１４２】

さらに、提供されるのは、代謝疾患、例えば２型糖尿病の治療用に配合された、本明細書に提供される有効量の二重活性融合分子を含有する組成物、例えば医薬組成物である。

【０１４３】

本開示の組成物は、公知の方法に従って配合することができる。好適な調製方法が、例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，１９ｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ａ．Ｒ．Ｇｅｎｎａｒｏ，ｅｄ．，Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏ．，Ｅａｓｔｏｎ，ＰＡ（１９９５）（その全体が参照により本明細書中に援用される）に記載されている。組成物は、種々の形態、例えば限定はされないが、水溶液、乳濁液、ゲル、懸濁液、凍結乾燥形態、または当該技術分野で公知の任意の他の形態であり得る。さらに、組成物は、例えば、希釈剤、結合剤、安定剤、および防腐剤を含む、薬学的に許容できる添加剤を含有し得る。一旦配合されると、本開示の組成物は、被験

体に直接的に投与することができる。

【０１４４】

本開示の組成物で使用可能な担体は、当該技術分野で周知であり、限定はされないが、例えば、甲状腺グロブリン、ヒト血清アルブミンなどのアルブミン、破傷風トキソイド、およびポリアミノ酸、例えば、ポリＬ－リジン、ポリＬ－グルタミン酸、インフルエンザ、Ｂ型肝炎ウイルスコアタンパク質などを含む。種々の水性担体、例えば、水、緩衝化水、０．８％生理食塩水、０．３％グリシン、ヒアルロン酸などは使用可能である。組成物は、従来の周知される滅菌技法により滅菌可能か、または濾過滅菌可能である。得られた組成物は、そのまま用いるためにパッケージングするか、または凍結乾燥することができ、凍結乾燥調製物は投与前に滅菌溶液と結合されている。組成物は、生理的状態に近づけるのに必要とされる薬学的に許容できる助剤物質、例えばｐＨ調整剤および緩衝剤、等張化剤、浸潤剤など、例えば、酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、ソルビタンラウリン酸モノエステル、トリエタノールアミンオレアート（ｔｒｉｅｔｈａｎｏｌａｍｉｎｅｏｌｅａｔｅ）などを含有し得る。

【０１４５】

ＩＶ．抗ＰＣＳＫ９～ＧＬＰ－１融合分子を使用するための方法およびキット

抗ＰＣＳＫ９～ＧＬＰ－１融合物は、糖尿病またはＴ２型糖尿病を治療するため、用いてもよい。一実施形態では、患者はＴ２型糖尿病を有する。一実施形態では、患者は、高い心血管リスク特性を有する。別の実施形態では、患者は、Ｔ２型糖尿病と高心血管リスク特性の双方を有する。高心血管リスク特性は、患者が、１つ以上の要素、すなわち、高コレステロール、高ＬＤＬコレステロール、低ＨＤＬコレステロール、高血圧、アテローム動脈硬化症、肥満、先行的な心血管イベント（狭心症、心臓発作、一過性脳虚血発作、脳卒中などを含む）、心血管イベントの家族歴、喫煙、高トリグリセリド、身体活動性の不足、調節不良の血糖などに起因し、より高い心血管イベントリスクを有することを意味する。

【０１４６】

他の実施形態では、抗ＰＣＳＫ９～ＧＬＰ－１融合物は、限定はされないが、ＮＡＳＨ、肥満、高コレステロール血症、および主要な有害な心血管イベント（ＭＡＣＥ）、例えば限定はされないが、急性冠症候群（ＡＣＳ）、脳卒中、心不全、および悪性リズム障害を含む他の疾患を治療するため、用いてもよい。

【０１４７】

一実施形態では、融合分子は、投与時、安定性が高まっている。一実施形態では、安定性の高まりは、マウスへのインビボ投与において、それをベンチマーク対照化合物のデュラグルチド、Ｆｃ断片と融合されたＧＬＰ－１類似体と比較することによって示される。

【０１４８】

一実施形態では、融合分子は、ＧＬＰ－１受容体で増強された効力を有する。一実施形態では、効力の低下は、ベンチマーク対照化合物デュラグルチドおよび／または野生型ＧＬＰ－１にわたりヒトＧＬＰ－１受容体で示される。

【０１４９】

一部の実施形態では、融合分子は、被験体において体重減少を促進する。

【０１５０】

一実施形態では、融合分子は、注射により投与される。

【０１５１】

他の実施形態では、本開示は、本明細書に記載の方法を実施するために用いることができる、二重活性融合分子を含むキットを提供する。特定の態様では、キットは、１つ以上の容器内に本明細書に開示される二重活性融合分子を含む。本明細書に提供されるキットは、併用療法のための追加的な組成物を含み得る。当業者は、開示される二重活性融合分子を当該技術分野で周知の確立されたキット形式の一つに容易に組み込むことができることを容易に理解するであろう。

【０１５２】

ここでは本例示的実施形態が詳細に参照されることになり、その例は添付の図面において図示される。同じ参照番号は、可能な限り、同一または同様の部分を指すように図面全体を通じて用いられることになる。他の実施形態は、本明細書に開示される明細書および実行の考察から当業者に明らかであろう。本実施形態は、以下の実施例においてさらに説明される。これらの実施例は、特許請求の範囲の範囲を限定することはなく、単に特定の実施形態を明らかにするのに役立つ。本明細書および実施例があくまで例示的なものとして解釈され、真の範囲および精神が以下の特許請求の範囲によって示されるように意図されている。

【実施例】

【０１５３】

実施例１　抗体最適化

抗ＰＣＳＫ９抗体ＰＣ９＃２（可変重鎖および軽鎖に対して各々、配列番号８および９）は次のように最適化されている。

１＿ＰＣＳＫ９抗原への結合に有意に影響することなく、アミノ酸を最も近いヒト生殖系列配列に対応するものに復帰させることにより、免疫原性リスクを低減する。

２＿ヒスチジン残基ＶＨ＿５２、ＶＬ＿３０およびＶＬ＿５０（Ｋａｂａｔ付番）を突然変異させることにより、ＰＣＳＫ９へのｐＨ依存性結合を除去する。

３＿ＰＣＳＫ９／ＧＬＰ－１ペプチド抗体融合分子の投与後、標的と効率的に会合させ、十分な遊離ＰＣＳＫ９の抑制を達成するため、生理学的ｐＨでヒトＰＣＳＫ９に対する親和性を改善する。

【０１５４】

Ａ）生殖系列化（Ｇｅｒｍｌｉｎｉｎｇ）

抗ＰＣＳＫ９抗体ＰＣ９＃２のＶＨおよびＶＬドメインのアミノ酸配列をＶＢＡＳＥデータベース内の公知のヒト生殖系列配列に整列し（Ｔｏｍｌｉｎｓｏｎ，１９９７；ｈｔｔｐ：／／ｖｂａｓｅ．ｍｒｃ－ｃｐｅ．ｃａｍ．ａｃ．ｕｋ／）、配列類似性により、最も近いヒト生殖系列が、可変重鎖および軽鎖に対して各々、１－４６（ＤＰ－７）（配列番号４１７）およびＶＫ１Ｏ１８Ｏ８（ＤＰＫ１）（配列番号４１８）であることが同定された。図１Ｅおよび１Ｆは、ＰＣ９＃２可変ドメインとその生殖系列配列との整列化を示している。

【０１５５】

ヒトＰＣＳＫ９抗原と複合した抗ＰＣＳＫ９　ＰＣ９＃２抗体の構造モデルが、ＰＣ９＃２可変ドメインの一次アミノ酸配列を用いて作成され、別の抗ＰＣＳＫ９抗体と複合したヒトＰＣＳＫ９の先行的に記載された結晶構造が、ＰＢＤ　ＩＤコード３ＳＱＯを用いて、タンパク質データバンク（Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｄａｔａ　Ｂａｎｋ）に寄託されている（Ｌｉａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，２０１２，Ｊ．Ｐｈａｒｍ．Ｅｘｐ．Ｔｈｅｒ．，Ｖｏｌ．３４０，ｐ２２８－２３６）。

【０１５６】

その構造モデルを用いて、以下の残基、すなわち可変重鎖におけるＡｒｇ５６、Ａｓｎ５８、Ｇｌｕ６１、Ｌｙｓ６４およびＳｅｒ６５、ならびに可変軽鎖におけるＡｒｇ２４（Ｋａｂａｔ付番）が、ＰＣＳＫ９抗原と非接触であるにもかかわらず溶媒に曝露されたものとして同定された。それらの残基が最も近い生殖系列配列と異なり、溶媒に曝露され得ることから、それらはいくつかの免疫原性リスクを呈し得る。理論に縛られることはないが、それらの残基の突然変異は、同残基が抗体とその抗原との間の相互作用ネットワークに寄与しないものであることから、抗体がＰＣＳＫ９に強力に結合する能力に有意に影響するものではない。

【０１５７】

次に、可変重鎖および軽鎖の各々に対する配列番号５および６の抗体ＰＣ９＃２＿ＦＧを作成するため、標準の分子生物学技術を用いて、突然変異Ｒ５６Ｓ、Ｎ５８Ｓ、Ｅ６１Ｑ、Ｋ６４ＱおよびＳ６５ＧをＰＣ９＃２重鎖配列に、またＫ２４Ｑを軽鎖に導入した。

【０１５８】

抗ＰＣＳＫ９のＰＣ９＃２およびＰＣ９＃２＿ＦＧを、実施例２に記載のようにヒトＩｇＧ１－ＴＭ抗体として生成し、実施例１７に記載のようにＢｉａｃｏｒｅを用いてヒトＰＣＳＫ９への結合について特徴づけた。それらの化合物におけるｐＨ７．４での動態パラメータを表２にまとめる。両抗体は、ヒトＰＣＳＫ９に対して類似のオンレート、オフレートおよび親和性を呈し、これは生殖系列化突然変異誘発が抗原結合に対して影響を有しなかったことを示す。

【０１５９】

【表５４】

表2:PC9#2抗体の生殖系列化および非生殖系列化バージョンの生理学的pHでのヒトPCSK9に対する動態パラメータ

化合物	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
PC9#2	2.70E+05	5.10E-04	1.89E-09
PC9#2_FG	3.03E+05	5.40E-04	1.78E-09

【０１６０】

Ｂ）ｐＨ依存性結合を除去し、ヒトＰＣＳＫ９に対する親和性を改善すること

抗ＰＣＳＫ９抗体のＰＣ９＃２およびＰＣ９＃２＿ＦＧは、生理学的ｐＨでヒトＰＣＳＫ９抗原に強力に結合するが、酸性ｐＨでその標的から迅速に解離することから、ｐＨ依存性の結合特性を呈する。その特徴は、抗体が、リソソームに送られて分解されるのでなく、細胞表面で再利用されるように、エンドソームの酸性区画内でＰＣＳＫ９から解離することを可能にするものとする。この場合、インビボ半減期がより長い抗体に最終的に翻訳されるはずである。

【０１６１】

表３は、以下の修飾ではなく、実施例１７に記載のようにＢｉａｃｏｒｅによって測定されたｐＨ７．４（生理学的）およびｐＨ６．０（酸性）でのヒトＰＣＳＫ９とのそれら２つの化合物のオフレート（ｋｄ）を比較したものである。ＣＭ５チップ上への抗体捕捉後、ランニングバッファーｐＨ７．４（１０ｍＭリン酸ナトリウム、ｐＨ７．４、１５０ｍＭ塩化ナトリウム、１ｍｇ／ｍＬ　ＢＳＡ、０．０５％ツイーン２０）中、１ｎＭ～２００ｎＭの範囲の濃度に希釈されたヒトＰＣＳＫ９抗原を１０分間注射した。会合段階後、ｐＨ７．４またはｐＨ６．０でのランニングバッファーを１０分の解離段階にわたり注射した。全体的な解離速度を、１：１の結合動力学的モデルを用いて算出した。

【０１６２】

【表５５】

表3:PC9#2抗体の生殖系列化および非生殖系列化バージョンの生理学的pHおよび酸性pHでの解離定数(kd)

化合物	kd (1/s) pH7.4	kd (1/s) pH6.0	kd 比
PC9#2	5.10E-04	3.24E-03	6.4
PC9#2_FG	5.40E-04	6.47E-03	12

【０１６３】

インビボ半減期が長い抗体は、ＰＣＳＫ９に結合できるが、ＧＬＰ－１類似体ペプチド中で分解され、ひいてはＧＬＰ－１受容体を活性化することができない、薬物代謝産物の蓄積をもたらし得ることから、ＰＣＳＫ９／ＧＬＰ－１融合分子にとって望ましくない。

【０１６４】

さらに、抗ＰＣＳＫ９　ＰＣ９＃２の軽鎖に面するＧＬＰ－１類似体ペプチドの遺伝子融合は、実施例５、表１１に示すように、ＰＣ９＃２抗体（７ｎＭ）と比べて、ヒトＰＣ

ＳＫ９（１９ｎＭ）に対する化合物の親和性に少し影響していた。次に、ＰＣ９＃２＿ＦＧの親和性成熟は、ヒトＰＣＳＫ９抗原に対する親和性に対するＧＬＰ－１類似体の軽鎖融合の負の影響を均衡させるため、必要とされた。

【０１６５】

ｐＨ依存性結合を除去するため、重鎖の位置５２ならびに軽鎖の位置３０および５０におけるヒスチジン残基は、突然変異を受ける必要がある。上記の構造モデルおよびその後のヒトＰＣＳＫ９と複合したＰＣ９＃２の分析に基づき、以下の突然変異、すなわち重鎖Ｈ５２ＫまたはＨ５２Ｓ、軽鎖Ｈ３０Ｙ、Ｈ３０ＫまたはＨ３０Ｓおよび軽鎖Ｈ５０ＹまたはＨ５０Ｓが、ＰＣＳＫ９への抗体結合にとって潜在的に有利なものとして同定され、親和性の改善をもたらすことができた。

【０１６６】

最適化された抗体を産生するため、ＰＣ９＃２＿ＦＧの配列内でのそれらすべての突然変異の組み合わせを、標準の分子生物学技術を用いて作成した。表４は、組み合わせ実験から得られた種々の化合物をまとめたものである。

【０１６７】

【表５６】

表4.最適化された抗体を作成するためのPC9#2_FG突然変異

#	VH_H52	VL_H30	VL_H50	抗体名	配列番号
1	K	Y	Y	HS1	424 および 425
2	K	Y	S	HS2	426 および 427
3	K	K	Y	HS3	428 および 429
4	K	K	S	HS4	430 および 431
5	K	S	Y	/	
6	K	S	S	HS5	432 および 433
7	S	Y	Y	HS6	434 および 435
8	S	Y	S	HS7	436 および 437
9	S	K	Y	HS8	438 および 439
10	S	K	S	HS9	1 および 2
11	S	S	Y	/	
12	S	S	S	HS10	442 および 443

【０１６８】

ＰＣ９＃２＿ＦＧ軽鎖におけるＨ３０ＳおよびＨ５０Ｙ突然変異の組み合わせは機能できず、その後、化合物＃５および＃１１は作成されていない。

【０１６９】

抗体は、実施例２に記載のようにヒトＩｇＧ１－ＴＭとして生成し、実施例３に記載されるようにエピトープ競合アッセイを用いて、ＰＣ９＃２のヒトＰＣＳＫ９への結合を遮断するその能力について試験した。データは、表５にまとめ、ＨＳ７、ＨＳ９およびＨＳ１０が親抗体ＰＣ９＃２＿ＦＧと比べて少なくとも１０倍低いIC_{50}を有することを示し

、これはそれら抗体がＰＣＳＫ９に対してＰＣ９＃２＿ＦＧより有意に優れた親和性を有し得ることを示唆する。

【０１７０】

【表５７】

表5.競合試薬として抗PCSK9抗体を用いる、PC9#2のヒトPCSK9への結合の阻害

抗体	IC50 (M)	PC9#2_FGにわたる比
HS1	5.6E-10	1.3
HS2	9.3E-11	7.8
HS3	7.0E-10	1.0
HS4	1.2E-10	6.1
HS5	2.2E-10	3.3
HS6	1.7E-10	4.3
HS7	6.3E-11	11.6
HS8	1.6E-10	4.6
HS9	6.6E-11	11.1
HS10	7.0E-11	10.4
PC9#2_FG	7.3E-10	1.0

【０１７１】

抗体ＨＳ９は、実施例１７に記載のように、Ｂｉａｃｏｒｅにより、生理学的ｐＨでのヒトＰＣＳＫ９に対するその結合パラメータについてさらに特徴づけ、親抗体ＰＣ９＃２＿ＦＧと比較している。表６に示すように、操作された抗ＰＣＳＫ９抗体ＨＳ９は、主にオフレート（ｋｄ）の低下に起因し、生理学的ｐＨでのヒトＰＣＳＫ９に対する親和性について、ＰＣ９＃２＿ＦＧと比べて３倍の改善を示す。

【０１７２】

【表５８】

表6.PC9#2_FGと比べての改変された抗体HS9の生理学的pHでのヒトPCSK9に対する動態パラメータ

抗体	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
PC9#2_FG	3.09E+05	6.57E-04	2.13E-09
HS9	3.81E+05	2.57E-04	6.75E-10

【０１７３】

別々の実験において、ＨＳ９抗ＰＣＳＫ９抗体のｐＨ依存性結合を、上記のようにＢｉａｃｏｒｅを用いてＰＣ９＃２＿ＦＧと比較している。表７は、それら２つの化合物についての生理学的ｐＨおよび酸性ｐＨでの解離定数（ｋｄ）を示している。ｐＨ６．０ではｐＨ７．４でよりも迅速に解離するＰＣ９＃２＿ＦＧに対して、ＨＳ９は、酸性ｐＨで生理学的ｐＨでよりも低いｋｄを示し、これはＨＳ９がｐＨ６．０ではｐＨ７．４でよりも緩徐にＰＣＳＫ９から解離することを示す。

【０１７４】

【表５９】

表7.PC9#2_FGと比べての改変された抗体HS9の生理学的pHおよび酸性pHでの解離定数 (kd)

抗体	kd (1/s) pH7.4	kd (1/s) pH6.0	kd 比
PC9#2_FG	6.50E-04	7.40E-03	11.4
HS9	2.04E-04	9.82E-05	0.5

【０１７５】

実施例２　二重作用融合分子の調製

二重作用融合分子は、ＧＬＰ－１部分－リンカー－抗体軽鎖についての図１Ａで示される大規模構造に従って作成した。配列番号３をＧＬＰ－１部分として用い、配列番号４をリンカーとして用い、また配列番号１および２を各々、重鎖および軽鎖として用いた。

【０１７６】

この実施形態では、ＧＬＰ－１受容体を最も効率的に会合させ、活性化するため、ＧＬＰ－１類似体ペプチドのＮ末端を遊離させ、ペプチドを抗体可変ドメインのＮ末端に融合した。ペプチドおよび／または抗体の活性に対する融合の影響を最小化するため、リンカー配列を、ペプチドの末端と可変ドメインの開始点との間の多数の構築物において用いた。１つの融合分子あたり２つのペプチド部分を得るため、ペプチドは抗体の重鎖または軽鎖のいずれかで融合した。かかる融合物の大規模構造は、図１Ｂ（重鎖融合）および図１Ｃ（軽鎖融合）に示す。一部の実施形態では、ペプチドは、（図１Ｄ中に予測的に示す）１つの融合分子あたり４つのペプチド部分を呈するように、重鎖および軽鎖の双方に融合してもよい。

【０１７７】

抗体可変ドメインとの融合物中のＧＬＰ－１類似体ペプチドをコードする遺伝子は、標準的方法を用いて重複ＰＣＲにより構築した。固有の制限部位は、発現ベクター中でのクローニングを可能にするため、ＤＮＡ断片の５’および３’末端に組み込んだ。

【０１７８】

ＶＨドメインは、ペプチド／リンカー融合の有無にかかわらず、哺乳類細胞内で全ＩｇＧ１三重突然変異体（ＩｇＧ１－ＴＭ）重鎖を発現するように、ヒト重鎖定常ドメインおよび調節エレメントを有するベクターにクローン化した。ＩｇＧ１－ＴＭ形式は、ヒトＩｇＧ１に類似しているが、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性および補体依存性細胞傷害性を誘発するその能力を低減するように、Ｆｃ配列に突然変異Ｌ２３４Ｆ、Ｌ２３５ＥおよびＰ３３１Ｓを組み入れている（Ｏｇａｎｅｓｙａｎ　Ｖ．ｅｔ　ａｌ．，２００８，Ａｃｔａ　Ｃｒｙｓｔ．，Ｄ６４：７００_７０４）。ＶＬドメインは、ペプチド／リンカー融合の有無にかかわらず、哺乳類細胞内で全ＩｇＧ軽鎖を発現するように、ヒト軽鎖定常ドメインおよび調節エレメントの発現用ベクターにクローン化した。ＯｒｉＰ断片は、ＣＨＯ細胞での使用を促進する、またエピソーム複製を可能にするように、重鎖および軽鎖発現ベクター中に含めた。

【０１７９】

ＩｇＧおよびペプチド抗体融合物を得るため、重鎖および軽鎖を発現するベクターを、３０ｍＬ（小規模）または４００ｍＬ（中規模）のＣＨＯ哺乳類細胞に一過性にトランスフェクトした。表８は、ペプチド／リンカー融合の有無にかかわらず、重鎖および軽鎖を発現するベクターの同時トランスフェクションによって得られ得る種々の生成物をまとめている。

【０１８０】

【表６０】

表 8: 重鎖および軽鎖ベクターの同時トランスフェクションを用いるときの生成物の説明			
#	重鎖ベクター	軽鎖ベクター	生成物
1	ペプチド融合を有しない VH	ペプチド融合を有しない VL	IgG
2	ペプチド融合を有する VH	ペプチド融合を有しない VL	ペプチド/抗体 VH 融合物 (図 1B)
3	ペプチド融合を有しない VH	ペプチド融合を有する VL	ペプチド/抗体 VL 融合物 (図 1C)
4	ペプチド融合を有する VH	ペプチド融合を有する VL	ペプチド/抗体 VH+VL (図 1D 中に予測的に示される)

【０１８１】

化合物は、発現させ、培地に分泌させた。回収物をプールし、プロテインＡクロマトグラフィーを用いる化合物精製前に濾過した。培養上清を適切なサイズのＭａｂＳｅｌｅｃｔＳｕｒｅ（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）のカラムに負荷し、１×ＤＰＢＳ（Ｇｉｂｃｏ）で洗浄した。結合化合物は、０．１Ｍクエン酸ナトリウムｐＨ３．０を用いてカラムから溶出させ、ｐＨ９．０でのトリス－ＨＣｌの添加により中和した。小規模トランスフェクションにおいては、溶出材料に対して、ＰＤ１０カラム（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を用いて１×ＤＰＢＳに緩衝液交換を行った。中規模トランスフェクションにおいては、溶出材料は、最大５ｍｌの試料容積に対するＨｉＬｏａｄ １６／６００ Ｓｕｐｅｒｄｅｘ ２００プレップグレードカラム（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）または最大１２ｍｌの試料容積に対するＨｉＬｏａｄ ２６／６００ Ｓｕｐｅｒｄｅｘ ２００カラム（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）のいずれかを用いて、サイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）により、さらに精製した。ランニングバッファーとして１×ＤＰＢＳを用いて、定組成溶離を実施した。

【０１８２】

化合物濃度を、Ｍａｃｈ，Ｈ．ｅｔ ａｌ．，Ｓｔａｔｉｓｔｉｃａｌ ｄｅｔｅｒｍｉｎａｔｉｏｎ ｏｆ ｔｈｅ ａｖｅｒａｇｅ ｖａｌｕｅｓ ｏｆ ｔｈｅ ｅｘｔｉｎｃｔｉｏｎ ｃｏｅｆｆｉｃｉｅｎｔｓ ｏｆ ｔｒｙｐｔｏｐｈａｎ ａｎｄ ｔｙｒｏｓｉｎｅ ｉｎ ｎａｔｉｖｅ ｐｒｏｔｅｉｎｓ，Ａｎａｌ Ｂｉｏｃｈｅｍ，２００（１）：７４－８０（１９９２）におけるプロトコルによるアミノ酸配列に基づく吸光係数を用いて、分光光度的に測定した。精製した化合物を、ＳＥＣ－ＨＰＬＣおよびＳＤＳ－ＰＡＧＥを用いて、凝集および分解について分析した。ＳＥＣ－ＨＰＬＣを、１ｍＬ／分の流速およびランニングバッファーとしてｐＨ６．８での０．１Ｍ無水二塩基性リン酸ナトリウム＋０．１Ｍ硫酸ナトリウムを用いて、７０μＬの試料をＴＳＫｇｅｌ Ｇ３０００ＳＷＸＬ ７．８ｍｍ×３００ｍｍカラム（Ｔｏｓｏｈ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）に負荷することにより実施した。ＳＤＳ－ＰＡＧＥは、１×Ｎｕ ＰＡＧＥ（登録商標）ＭＥＳ ＳＤＳランニングバッファー（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いて、２μｇのタンパク質をＮｕ ＰＡＧＥ（登録商標）４％～１２％ビス－トリス（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）に負荷することにより実行する。中規模のトランスフェクションからの化合物を、エレクトロスプレーイオン化質量分析（ＥＳＩ－ＭＳ）により、完全性についてさらに特徴づけ、カブトガニ血球抽出成分（ＬＡＬ）Ｋｉｎｅｔｉｃ－ＱＣＬ（Ｌｏｎｚａ）を用いて、内生毒素レベルについて試験した。ＥＳＩ－ＭＳ分析においては、試料をｐＨ８．０の１０ｍＭトリス－ＨＣｌ中、１ｍｇ／ｍＬで調製した。分析前、１０ｍＭ ＤＴＴを用いて３７℃で３０分の還元を実施した。データは、Ｗａｔｅｒｓ ＳＹＮＡＰＴ Ｇ１ ＱＴＯＦ質量分析計と連結されたＷａｔｅｒｓ ＡＣＱＵＩＴＹ ＵＰＬＣ（登録商標）Ｉ－Ｃｌａｓｓシステムを用いて得て、ＭａｓｓＬｙｎｘソフトウェアを用いて操作した。用いた移動相は、高度精製水＋０．０１％トリフルオロ酢酸（ＴＦＡ）、０．１％ギ酸（Ａ）およびアセトニトリル＋０．０１％ＴＦＡ、０．１％ＦＡ（Ｂ）であった。重

鎖と軽鎖の分離は、６０℃で加熱した２．１ｍｍ×５０ｍｍのＷａｔｅｒｓ　ＢＥＨ３００　Ｃ４カラムを用いて行った。流速は０．３ｍＬ／分に設定し、全実行時間は２２分であった。試料（１０ｐｍｏｌ）をカラムに注入し、ＭＳデータは、以下のエレクトロスプレーソースパラメータ、すなわち、キャピラリー電圧：３．４ｋＶ、ソース温度：８１℃、脱溶媒和温度：２４℃を用いて、正のイオンモードで得た。データは、５００～４５００Ｄａの間で得た。

【０１８３】

実施例３　抗ＰＣＳＫ９抗体との遺伝子融合物中のＧＬＰ－１類似体のインビトロ特徴づけ

ＧＬＰ－１受容体作動薬ペプチドと抗ＰＣＳＫ９抗体との間の遺伝子融合によって二重活性分子を作成する実現可能性を評価するため、配列番号２８のＧＬＰ－１類似体ペプチドを、配列番号４のリンカーを用いて、７つの異なる予め同定された抗ＰＣＳＫ９抗体の重鎖または軽鎖可変ドメインに融合した。

【０１８４】

１＿配列番号１０の抗体可変重鎖および配列番号１１の抗体可変軽鎖を有するＰＣ９＃１。

【０１８５】

２＿配列番号８の抗体可変重鎖および配列番号９の抗体可変軽鎖を有するＰＣ９＃２。

【０１８６】

３＿配列番号４０４の抗体可変重鎖および配列番号４０５の抗体可変軽鎖を有するＰＣ９＃３。

【０１８７】

４＿配列番号４０６の抗体可変重鎖および配列番号４０７の抗体可変軽鎖を有するＰＣ９＃４。

【０１８８】

５＿配列番号４０８の抗体可変重鎖および配列番号４０９の抗体可変軽鎖を有するＰＣ９＃５。

【０１８９】

６＿配列番号４１０の抗体可変重鎖および配列番号４１１の抗体可変軽鎖を有するＰＣ９＃６。

【０１９０】

７＿配列番号４１２の抗体可変重鎖および配列番号４１３の抗体可変軽鎖を有するＰＣ９＃７。

【０１９１】

各ペプチド－抗体融合物のＰＣＳＫ９活性は、均一時間分解蛍光（ＨＴＲＦ）エピトープ競合アッセイを用いて評価した。これらのアッセイでは、蛍光共鳴エネルギー伝達（ＦＲＥＴ）複合体は、ストレプトアビジンクリプテート、ビオチン化ＰＣＳＫ９および蛍光（ＤｙＬｉｇｈｔ６５０）標識抗ＰＣＳＫ９抗体の間で形成される。ＰＣＳＫ９の同じまたは重複エピトープに結合する非標識ペプチド－抗体融合物は、蛍光標識抗体によって結合される場合、競合し、ＦＲＥＴシグナルの低下を生じることになる。

【０１９２】

抗ＰＣＳＫ９抗体の標識は、ＤｙＬｉｇｈｔ－６５０（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　８４５３６）を用いて、製造業者の使用説明書に従って実施した。アッセイにおいては、すべての試料および試薬は、１×リン酸塩緩衝生理食塩水、０．１％ＢＳＡ（Ｓｉｇｍａ　Ａ９５７６）および０．４Ｍフッ化カリウムを含有するアッセイ緩衝液で調製した。ペプチド－抗体融合物または対照抗体の試験試料を、３倍連続希釈により、３８４ウェルのポリプロピレンプレート内で調製した。試料（５μｌ）またはアッセイ緩衝液（全結合対照ウェル）を、３８４ウェルのアッセイプレート（Ｃｏｓｔａｒ３６７６）に移し、２０μｌの全アッセイ容積中、１ｎＭのストレプトアビジンクリプテート（Ｃｉｓｂｉｏ　６１ＳＡＸＬＢ）、０．０５～０．５ｎＭのビオチン化ＰＣＳＫ９および０．１～

２ｎＭのＤｙ６５０標識抗ＰＣＳＫ９抗体とともに、室温で４時間インキュベートした。非特異的結合（ＮＳＢ）対照ウェルは、ビオチン化ＰＣＳＫ９を省いて設定した。６６５ｎｍおよび６２０ｎｍでの時間分解蛍光発光は、Ｐｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ Ｅｎｖｉｓｉｏｎを用いて３２０ｎｍでの励起後に測定した。６６５ｎｍカウント／６２０ｎｍカウントの比を算出し、１００００を乗じてＨＴＲＦカウントを得た。次に、デルタＦ％は以下の方程式を用いて算出した。

【数１】

$$\text{デルタF\%} = \left(\frac{\text{試料HTRFカウント-NSBHTRFカウント}}{\text{NSB HTRFカウント}} \right) \times 100$$

【０１９３】

結果は、以下の方程式に従う％特異的結合として表した。

【数２】

$$\text{\%特異的結合} = \left(\frac{\text{(試料デルタF\%-NSBデルタF\%)}}{\text{(全結合デルタF\%-NSBデルタF\%)}} \right) \times 100$$

【０１９４】

図２Ａ～Ｇおよび図３Ａ～Ｇは各々、非標識の重鎖または軽鎖ペプチド抗体融合物の適定を用いての、ヒトＰＣＳＫ９の抗ＰＣＳＫ９抗体への結合の阻害を示す。アイソタイプ適合無関係抗体ＮＩＰ２２８　ＩｇＧ１－ＴＭの単独（対照＃１）または配列番号４のリンカーを用いての重鎖（対照＃２）または軽鎖（対照＃３）と配列番号２８のＧＬＰ－１類似体ペプチドとの融合物を負の対照として用いた。

【０１９５】

各ペプチド抗体融合物のヒトＧＬＰ－１受容体での効力は、ｃＡＭＰ産生アッセイを用いて評価した。ヒトＧＬＰ－１受容体を発現する安定な細胞株は、標準的方法により、ＣＨＯ細胞において作成した。試験化合物によるＧＬＰ－１受容体の活性化は、機能的活性アッセイで測定可能であるｃＡＭＰ二次メッセンジャーの下流生成をもたらすことになる。低いタンパク質結合性の３８４ウェルプレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ）を、アッセイ培地（０．５ｍＭ　ＩＢＭＸ（Ｓｉｇｍａ）を含有するＨａｎｋｓ平衡食塩水（ＧＩＢＣＯまたはＳｉｇｍａ）中、０．１％ウシ血清アルブミン）中で作成した試験化合物の１：４の連続希釈を１１回行うために用いた。すべての試料の希釈物は、二通りに作成した。ヒトＧＬＰ－１受容体を発現する細胞の凍結クライオバイアルを、水槽中で迅速に解凍し、予め温めたアッセイ培地に移し、２４０×ｇで５分間回転させた。次に、細胞を、1×10^5細胞／ｍＬの最適化濃度でアッセイ緩衝液に再懸濁し、黒色の浅いウェルのＵ底３８４ウェルプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ）に５ｕＬ／ウェルで分注した。５μＬの試験化合物を、希釈プレートから細胞板へ移し、室温で３０分間インキュベートした。ｃＡＭＰレベルは、製造業者の推奨通り、２ステップのプロトコルに従い、ｃＡＭＰ　ｄｙｎａｍｉｃ　２ＨＴＲＦキット（Ｃｉｓｂｉｏ）で測定した。つまり、抗ｃＡＭＰクリプテート（ドナーフルオロフォア）およびｃＡＭＰ－ｄ２（アクセプターフルオロフォア）を、キット中に提供されるコンジュゲートおよび溶解用緩衝液で各々１／２０に希釈することにより、別々に作成した。５ｕＬの抗ｃＡＭＰクリプテートを、アッセイプレートのすべてのウェルに添加し、５ｕＬのｃＡＭＰ－ｄ２を、非特異的結合ウェルを除くすべてのウェルに添加した（コンジュゲートおよび溶解用緩衝液のみを添加）。プレートは、室温で１時間インキュベートし、次に３２０ｎｍの励起波長ならびに６２０ｎｍおよび６６５ｎｍの放射波長を用いて、Ｅｎｖｉｓｉｏｎ（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）で読み取った。データは、製造業者のガイドラインに記載のように％デルタＦに変換し、制約のないデータの４パラメータロジスティックフィット、曲線中点によって分析し、EC_{50}を判定した。

【０１９６】

重鎖（Ａ）または軽鎖（Ｂ）ペプチド抗体融合物によるヒトＧＬＰ－１受容体の活性化を各々、図４Ａ～Ｂに示す。遊離ヒトＧＬＰ－１ペプチド（Ｂａｃｈｅｍ）およびペプチ

ドを有しない無関係アイソタイプ適合ＮＩＰ２２８ヒトＩｇＧ１－ＴＭを各々、正の対照および負の対照として用いた。

【０１９７】

結論として、すべての試験融合物がヒトＰＣＳＫ９への結合ならびにヒトＧＬＰ－１受容体の活性化に対して抗ＰＣＳＫ９抗体と競合することができた。ＧＬＰ－１類似体ペプチドと異なる抗ＰＣＳＫ９抗体との間の融合分子は、二重活性を呈し、また複合薬理（ｃｏｍｂｉｎｅｄ　ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ）をもたらすように用いることができる。

【０１９８】

実施例４　抗体融合物中に存在するＧＬＰ－１類似体のインビボ安定性

標的媒介性排除を伴わず、ヒトＩｇＧは、ヒトで約２１日の長い循環半減期を有する。これは特に、ＦｃＲｎ受容体による内在化抗体の救済に起因する。細胞による非特異的取り込み後、抗体は、エンドソームの酸性環境下でＦｃＲｎに結合し、細胞表面に誘導され、リソソームで分解されることなく循環に戻され得る。

【０１９９】

抗ＰＣＳＫ９抗体分子との融合物中のＧＬＰ－１類似体ペプチドは、最大の有効性を得るためには、ペプチドおよび抗体部分によって各々媒介されるＧＬＰ－１受容体の活性化およびＰＣＳＫ９の抑制の双方に対して、十分なインビボ活性半減期を呈する必要がある。例えば、ペプチドが注射後に迅速に不活性化される場合、生成物の大半はＰＣＳＫ９の抑制に対してのみ機能的となり、投与期間を通じて効率的なグルコース調節を提供するように長期間ＧＬＰ－１受容体に適切に会合することはない。

【０２００】

抗体融合物中の場合に存在するＧＬＰ－１類似体ペプチドのインビボ安定性を評価するため、以下の融合物を作成した。

１：配列番号２８のＧＬＰ－１類似体ペプチドを、配列番号４のリンカーを用いて、配列番号４１４および４１５の無関係ＮＩＰ２２８ヒトＩｇＧ１－ＴＭ抗体の重鎖に融合させた（化合物ＮＩＰ２２８＿ＧＬＰ－１＿ＶＨ）。

２：配列番号１２のアメリカドクトカゲ（Ｇｉｌａ　ｍｏｎｓｔｅｒ）の唾液由来のＧＬＰ－１類似体であるＥｘｅｎｄｉｎ－４ペプチドを、配列番号４のリンカーを用いて、配列番号９の抗ＰＣＳＫ９抗体ＰＣ９＃２の軽鎖に融合させた（化合物ＰＣ９＃２＿Ｅｘｅ４＿ＶＬ）。

３：配列番号２８のＧＬＰ－１類似体ペプチドを、配列番号４のリンカーを用いて、配列番号４１６のヒトＩｇＧ４　Ｆｃ断片に融合させた（化合物ＧＬＰ－１－Ｆｃ）。

４：配列番号２８のＧＬＰ－１類似体ペプチドを、配列番号４のリンカーを用いて、配列番号９の抗ＰＣＳＫ９抗体ＰＣ９＃２の軽鎖に融合させた（化合物ＰＣ９＃２＿ＧＬＰ－１＿ＶＬ）。

【０２０１】

すべての化合物は、インビトロでヒトＧＬＰ－１受容体で活性があり、実施例３に記載のｃＡＭＰアッセイにおいて、EC_{50}、すなわち、ＮＩＰ２２８＿ＧＬＰ－１＿ＶＨ、ＰＣ９＃２＿Ｅｘｅ４＿ＶＬ、ＧＬＰ－１－ＦｃおよびＰＣ９＃２＿ＧＬＰ－１＿ＶＬに対して各々、２．０８Ｅ－１０Ｍ、１．１２Ｅ－１０Ｍ、１．１２Ｅ－１０Ｍおよび１．０３Ｅ－１０Ｍを呈する。

【０２０２】

化合物ＮＩＰ２２８＿ＧＬＰ－１＿ＶＨおよびＰＣ９＃２＿Ｅｘｅ４＿ＶＬをラットの静脈内に注射し、血清または血漿試料を注射後のいくつかの時点で採取した。血清または血漿中の化合物濃度（曝露）およびＧＬＰ－１活性に対する活性化合物の濃度を、各試料について測定した。全化合物（曝露）およびＧＬＰ－１受容体での活性化合物の経時的低下の間の比較は、抗体融合物中のＧＬＰ－１類似体ペプチドにおけるインビボ安定性の評価を提供する。

【０２０３】

ラット血漿または血清中の全ヒトＩｇＧ１抗体のレベルは、Ｇｙｒｏｌａｂプラットフ

ォーム（Ｇｙｒｏｓ　ＡＢ）を用いて、一般的なサンドイッチ酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）法により定量化した。ヒトＩｇＧ１は、１００ｕｇ／ｍＬのビオチン化モノクローナル抗ヒトＩｇＧ１抗体（クローンＪＤＣ－１０、Ｓｏｕｔｈｅｒｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈ（血漿試料用）または内製クローンＴＭ４４６（血清試料用））により捕捉し、Ｇｙｒｏｌａｂ　Ｂｉｏａｆｆｙ　２００ＣＤ上の２５ｎＭ（ＢＤ　ＰｈａｒｍｉｎｇｅｎクローンＧ１８－１４５（血漿試料用））または１０ｎＭ（結合部位ＡＵ００３ＣＵＳ０１（血清試料用））でのＡｌｅｘａ標識モノクローナル抗ヒトＩｇＧ１抗体により検出した。標準、対照、血漿または血清試料、洗浄溶液、捕捉および検出抗体を、Ｇｙｒｏｌａｂ法に従い、０．２ｍＬの９６ウェルＰＣＲプレート（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）に添加し、ＣＤ２００プレートを備えた装置に負荷した。全試料を２通りに分析した。各ヒトＩｇＧ標準の平均応答を濃度に対してプロットし、Ｇｙｒｏｌａｂ　Ｅｖａｌｕａｔｏｒソフトウェアを用いて、５パラメータ加重ロジスティックモデルを用いて点を適合させた。

【０２０４】

ラット試料中のヒトＧＬＰ－１受容体での活性のあるペプチド－抗体融合物の濃度を、エクスビボｃＡＭＰの細胞に基づくアッセイを用いて評価した。参照化合物を、標準として用いられるべき既知の濃度でナイーブラット血清または血漿に添加した。全試料をアッセイ培地で連続希釈し、血清試料について実施例３に記載のようにｃＡＭＰ　ｄｙｎａｍｉｃ　２　ＨＴＲＦキット（Ｃｉｓｂｉｏ）を用いるか、または血漿試料についてＬＡＮＣＥ（登録商標）Ｕｌｔｒａ　ｃＡＭＰ検出キット（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）を用いて試験した。

【０２０５】

試験試料を、等価な参照として同じ最高濃度を用いてプロットした。次に、得られたEC_{50}値を、試料比（試料EC_{50}／参照化合物EC_{50}）と、次に活性ＧＬＰ－１化合物の評価濃度（ラット血漿または血清に添加された参照化合物の公知の最高濃度／試料比）とを算出するのに用いることができた。ラット血清または血漿は単独で、クリプテートドナーシグナルに対してクエンチング効果を有し、希釈することが可能なｃＡＭＰの濃度依存性活性化をもたらす。したがって、任意の試験化合物は、活性アッセイにおいて観察可能な効果を有するように、ラット血清または血漿ベースラインの場合を超えるｃＡＭＰ活性（検出の限界と称される）を有する必要がある。

【０２０６】

化合物ＮＩＰ２２８＿ＧＬＰ－１＿ＶＨをウィスターラット（Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ）３匹に２ｍｇ／ｋｇで注射し、各動物における血液試料を、注射から２分、１時間、２４時間、４８時間、１２０時間、１６８時間および２１６時間経過後、ｄＰＰ４阻害剤を含有するＥＤＴＡ管に採取した。ラット血漿中の全化合物および活性ＧＬＰ－１化合物の経時的濃度を、図５Ａおよび図９に示す。４８時間後に採取した試料中の活性化合物の濃度は、アッセイの定量の下限を下回ったことから測定不能である。

【０２０７】

化合物ＰＣ９＃２＿Ｅｘｅ４＿ＶＬをＣＤラット（Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ）３匹に１ｍｇ／ｋｇで注射し、血液試料を、注射から３０分、６時間、２４時間、４８時間、９６時間、２４０時間および３３６時間経過後、ｄＰＰ４阻害剤を含有する簡単な管に採取した。血清試料を、管をベンチ上に３０分間放置し、その後１３０００ｒｐｍで２分間遠心分離することにより調製した。ラット血清中の曝露および活性ＧＬＰ－１化合物における経時的濃度を図５Ｂに示す。４８時間後に採取した試料中の活性化合物の濃度は、アッセイの定量の下限を下回ったことから正確に測定できない。

【０２０８】

ＮＩＰ２２８＿ＧＬＰ－１＿ＶＨおよびＰＣ９＃２＿Ｅｘｅ４＿ＶＬの曝露およびＧＬＰ－１受容体での活性化合物の双方についてのラットでのインビボ半減期を表９に示す。

【０２０９】

【表６１】

表 9: 抗体融合物中に存在する GLP-1 類似体の化合物および活性 GLP-1 のラットでのインビボ半減期			
化合物	実験計画	化合物のインビボ半減期 (h)	活性 GLP-1 のインビボ半減期 (h)
NIP228_GLP-1_VH	Wistar ラットに 2mg/kg IV	63	7.4
PC9_2_Exe4_VL	CD ラットに 1mg/kg IV	88	5.7

【０２１０】

ＮＩＰ２２８＿ＧＬＰ－１＿ＶＨおよびＰＣ９＃２＿Ｅｘｅ４＿ＶＬ化合物の双方においては、ＧＬＰ－１受容体での活性は、化合物自体よりもはるかに迅速に失われ、これはインビボでのペプチドの不安定性を示している。

【０２１１】

化合物ＧＬＰ－１－ＦｃおよびＰＣ９＃２＿ＧＬＰ－１＿ＶＬを、健常Ｃ５７／Ｂ６マウス（７～８週齢、雌、Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ）に静脈内注射し、血漿試料をいくつかの時点で採取した。血漿中の化合物濃度（曝露）およびＧＬＰ－１活性における活性化合物の濃度を、上記の各試料に対して測定した。

【０２１２】

ＧＬＰ－１－Ｆｃを１ｍｇ／ｋｇで注射した。マウス３匹の群を、以下の時点、すなわち、注射前、注射から２分、１時間、６時間、２４時間、４８時間、７２時間および９６時間経過後の各々で屠殺した。各動物における血液は、ｄＰＰ４阻害剤を含有するＥＤＴＡ管に採取した。次に、血漿試料は、摂氏４度、１４０００ｒｐｍで５分間遠心分離し、次の分析用に－８０℃で貯蔵した。

【０２１３】

ＰＣ９＃２＿ＧＬＰ－１＿ＶＬを５ｍｇ／ｋｇで注射し、マウスを、以下の時点、すなわち注射前、注射から５分、６．５時間、２４時間、７２時間および１６８時間経過後の各々で屠殺した。試料は上記のように処理した。

【０２１４】

ＧＬＰ－１－Ｆｃにおけるマウス血漿中の経時的な曝露および活性ＧＬＰ－１化合物の濃度を図５Ｃおよび図１４Ａに示し、ＰＣ９＃２＿ＧＬＰ－１＿ＶＬについては各々、図５Ｄおよび図１０に示す。

【０２１５】

曝露および活性ＧＬＰ－１の双方について、ＧＬＰ－１－ＦｃおよびＰＣ９＃２＿ＧＬＰ－１＿ＶＬにおけるマウスでのインビボ半減期を表１０に示す。

【０２１６】

【表６２】

表 10: 抗体または Fc 融合物中に存在する GLP-1 類似体の化合物および活性 GLP-1 のマウスでのインビボ半減期			
化合物	実験計画	化合物の*インビボ*半減期 (h)	活性 GLP-1 の*インビボ*半減期 (h)
GLP-1-Fc	C57/B6 マウスに 1mg/kg	約 100	16
PC9#2_GLP-1_VL	C57/B6 マウスに 5mg/kg	約 100	18

【０２１７】

ラットでのＮＩＰ２２８＿ＧＬＰ－１＿ＶＨおよびＰＣ９＃２＿Ｅｘｅ４＿ＶＬについての観察によると、マウスへの注射後、ＧＬＰ－１－ＦｃおよびＰＣ９＃２＿ＧＬＰ－１＿ＶＬの双方におけるＧＬＰ－１受容体での活性は、化合物自体よりも迅速に失われ、これはインビボでのペプチドの不安定性を示している。

【０２１８】

配列番号２８および配列番号１２のＧＬＰ－１類似体双方における迅速な不活性化は、ＰＣＳＫ９／ＧＬＰ－１融合分子における効率的なグルコース調節に影響することになり、より優れたインビボ安定性を有するＧＬＰ－１類似体ペプチドを操作する必要がある。

【０２１９】

実施例５　ｈｕＰＣＳＫ９に対する親和性

ＰＣＳＫ９抗体をベンチマーク対照として用いた。データは表１１に示し、ＰＣ９＃２＿ＧＬＰ１分子およびベンチマーク対照として用いた抗ＰＣ９＃２抗体の視覚的表現を図８に示す。ＰＣＳＫ９の親和性およびＧＬＰ－１の効力を示す可視化した有望な目標特性を図６に提供する。

【０２２０】

ＰＣＳＫ９結合に対する会合（ｋａまたはｋｏｎ）、解離（ｋｄまたはｋｏｆｆ）および平衡解離定数（ＫＤ）は、Ｂｉａｃｏｒｅ　２０００バイオセンサー（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を用いて、表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）により、摂氏２５度で測定した。

【０２２１】

まずプロテインＧ表面をＣＭ５センサーチップ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）上に作成した。次に、種々の濃度のヒト、カニクイザルまたはラットＰＣＳＫ９を注射する前に、ヒト抗体をチップ表面上に捕捉した。まず全体的な解離速度を、その後全体的なオン速度を、いずれも１：１の結合動力学的モデルを用いて算出した。

【０２２２】

【表６３】

表 11: huPCSK9 に対する親和性(Biacore)

試験化合物	Kd (nM)	k_{on} ($M^{-1}.s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})
PC9#2 (配列番号 8 および 9)	7	7.8E+04	5.5E-04
PC9#2_GLP1 (配列番号 8, 9, 4,および 28) (配列番号 43 の軽鎖融合物を有する)	19	2.7E+04	5.0E-04
倍数変化	2.7	2.9	0.9

【０２２３】

これは、融合物がＰＣＳＫ９結合にあくまでわずかに影響していることを示す。

【０２２４】

加えて、二重作用融合分子ＨＳ９＿ＤＳＢ７を、そのヒトＰＣＳＫ９への親和性を測定するため、実施例１７に記載のようにＢｉａｃｏｒｅアッセイで試験した。ＰＣＳＫ９抗体単独（重鎖および軽鎖の各々に対する配列番号１および２のＰＣ９＿２＿ＦＧ＿ＨＳ＃９）をベンチマーク対照として用いた。表１２はデータを提供する。このデータは、融合物が種（ヒト（Ｈｕ）、カニクイザルサル（Ｃｙ）およびラット）を通じてＰＣＳＫ９結合にあくまでわずかに影響していることを示す。

【０２２５】

【表６４】

表 12: huPCSK9, CyPCSK9, および RatPCSK9 に対する親和性(Biacore)									
概要	Hu			Cy			ラット		
	ka ($M^{-1}.s^{-1}$)	kd (s^{-1})	KD (M)	ka ($M^{-1}.s^{-1}$)	kd (s^{-1})	KD (M)	ka ($M^{-1}.s^{-1}$)	kd (s^{-1})	KD (M)
PC9_2_FG_HS#9	3.47E+05	3.65E-04	1.05E-09	3.19E+05	3.74E-04	1.17E-09	9.69E+05	3.45E-04	3.56E-10
HS9_DSB7	1.46E+05	2.87E-04	1.97E-09	9.49E+04	2.84E-04	2.99E-09	5.07E+05	2.67E-04	5.27E-10

【０２２６】

実施例６　ｃＡＭＰの細胞に基づくアッセイにおけるＧＬＰ－１の効力

ＰＣ９＃２＿ＧＬＰ－１を、実施例３に記載のように、その効力を測定するため、ｃＡＭＰの細胞に基づくアッセイで試験した。ＧＬＰ１ペプチド単独を対照として用い、ＧＬＰ－１Ｆｃをベンチマークとして用いた。データは表１３に示し、ＰＣ９＃２＿ＧＬＰ１分子およびベンチマーク対照として用いたＧＬＰ－１　Ｆｃの視覚的表現を図８に示す。

【０２２７】

【表６５】

表 13: cAMP の細胞に基づくアッセイでの GLP-1 の効力		
試験化合物	EC50 (pm)	倍数変化
PC9#2_GLP1 (配列番号 8, 9, 4,および 28)	290	2.4
GLP1-Fc (	120	1
GLP1 ペプチド (配列番号 29)	15	0.1

【０２２８】

このデータは、ＧＬＰ－１類似体ペプチドと抗ＰＣＳＫ９抗体ＰＣ９＃２の軽鎖との融合後、ＧＬＰ－１の効力に、ベンチマーク分子のＧＬＰ－１－Ｆｃと比べて有意な低下がなかったことを示す。

【０２２９】

実施例７　デュラグルチド：ベンチマーク分子

図１４Ａは、ＧＬＰ－１－Ｆｃベンチマークのラットでの安定性を提供する。ベンチマーク分子は、図１４Ａに示すように、ＧＬＰ－１部分の抗体のＦｃ部分への融合物である。

【０２３０】

化合物ＧＬＰ－１－Ｆｃを、健常Ｃ５７／Ｂ６マウス（７～８週齢、雌、Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ）に静脈内注射し、血漿試料を注射後のいくつかの時点で採取した。血漿中の化合物濃度（曝露）およびＧＬＰ－１活性についての活性化合物の濃度を、実施例４に記載のように各試料に対して測定した。

【０２３１】

ＧＬＰ－１－Ｆｃを１ｍｇ／ｋｇで注射した。マウス３匹の群を、以下の時点、すなわち、注射前、注射から２分、１時間、６時間、２４時間、４８時間、７２時間および９６時間経過後の各々で屠殺した。各動物における血液は、ｄＰＰ４阻害剤を含有するＥＤＴＡ管に採取した。次に、血漿試料は、摂氏４度、１４０００ｒｐｍで５分間遠心分離し、次の分析用に－８０℃で貯蔵した。

【０２３２】

ＧＬＰ－１活性は、化合物よりも迅速な速度で失われ、これはペプチドの不安定性を示す。四角を伴う線は、ＧＬＰ－１－Ｆｃの血清濃度に対応し、丸を伴う線は、同一試料におけるＧＬＰ－１－Ｆｃの活性に対応する。図１４Ａを参照のこと。

【０２３３】
実施例８　増強されたインビボ安定性特性を有する融合分子
Ａ）増強されたインビボ安定性特性を有する抗体融合物中のＧＬＰ－１類似体ペプチドを評価すること
抗体融合分子のペプチドのインビボ安定性を改善するため、ペプチドを、分解から保護するようにその周辺の立体障害を改変した。これは巨大な糖モチーフを導入するか、または分子間ジスルフィド架橋を改変するかのいずれかにより行った。
【０２３４】
Ｎ－グリコシル化共通モチーフの付加がインビボ安定性およびタンパク質の作用持続時間を増加させ得ることは実証されている（Ｅｌｌｉｏｔｔ　Ｓ．ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．，２００３，２１，４１４_４２１）。ペプチドのＣ末端にまたはペプチドと抗体との間のリンカー中に、余分なＮ－グリコシル化モチーフのＮｘＳまたはＮｘＴ（ここでｘは、プロリン以外の任意のアミノ酸であり得る）を組み込んだＧＬＰ－１類似体ペプチドは、抗ＰＣＳＫ９抗体ＰＣ９＃２の軽鎖（抗体軽鎖、配列番号９）との融合物中で改変されている。それら化合物のうちの８つにおけるペプチドおよびリンカーのアミノ酸配列（Ｎ－グリコシル化部位はＮＧＳと命名）は、図７Ａに示す。グリコシル化モチーフを作成するためのアミノ酸変化は、太字下線で示す。
【０２３５】
それら８つの化合物の中でＰＣ９＿２＿ＧＬＰ－１＿ＮＧＳ＃７のみが、ＳＤＳ－ＰＡＧＥによると、高いグリコシル化収率を示す。これは、グリコシル化共通配列を含まない対照化合物と比べての軽鎖の分子量増加によって検出され、非グリコシル化軽鎖生成物に対応するより低分子のバンドは認められなかった。ＰＣ９＿２＿ＧＬＰ－１＿ＮＧＳ＃７におけるグリコシル化は、ＥＳＩ質量分析により、さらに確認された。
【０２３６】
分子間ジスルフィド結合を導入することが、遊離ペプチドとしてのＧＬＰ－１類似体のインビボ安定性を改善するための優れた手法であり得ることもまた示されている（ＬｉＹ．ｅｔ　ａｌ．，Ｐｅｐｔｉｄｅｓ，２０１１，２１，１３０３_１３１２）。
【０２３７】
ジスルフィド架橋を形成するための２つのシステイン残基、また適切な場合、その結合を促進するためのグリシンＣ末端キャップを組み込んだＥｘｅｎｄｉｎ－４ペプチド変異体を、抗ＰＣＳＫ９抗体ＰＣ９＃２の軽鎖（配列番号９）に融合した。最初に作成した３つの化合物におけるペプチドアミノ酸配列（ジスルフィド架橋はＤＳＢと命名）は、（配列番号３０～３２として）図７Ｂに示す。システイン残基は黒色で示し、他の突然変異残基は下線で示し、またＣ末端キャップでの付加的なグリシン残基は灰色で示す。
【０２３８】
ＤＳＢ＃１変異体においては、最初のシステインは、位置９でアスパラギン酸の代わりに改変されたものであり、配列：ＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＣＧＧ（配列番号４０１）のＣ末端キャップは、第２のシステインを組み込んで用いた。
【０２３９】
ＤＳＢ＃２変異体においては、最初のシステインは、位置４でグリシンの代わりに改変されたものであり、配列：ＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＣＧ（配列番号４０２）のＣ末端キャップは、第２のシステインを組み込んで用いた。
【０２４０】
ＤＳＢ＃３変異体においては、最初のシステインは、位置１８でアラニンの代わりに改変されたものであり、Ｃ末端キャップは用いなかった。第２のシステインは、セリンの代わりにＥｘｅｎｄｉｎ－４配列の位置３９に導入した。ジスルフィド架橋の形成を促進するため、Ｅｘｅｎｄｉｎ－４のトリプトファンケージ中でより柔軟性が出るように、プロリン３８をグリシンに改変した。
【０２４１】
軽鎖融合物中のＰＣ９＿２＿Ｅｘｅ４＿ＤＳＢ＃２は、哺乳類細胞内で有意に発現する

ことはなく、さらなる特徴づけは行わなかったが、十分な量のＰＣ９＿２＿Ｅｘｅ４＿ＤＳＢ＃１およびＰＣ９＿２＿Ｅｘｅ４＿ＤＳＢ＃３が得られた。融合物の完全性および同一性は、インビボ実験前のＥＳＩ質量分析により確認された。

【０２４２】

ＰＣ９＿２＿ＧＬＰ－１＿ＮＧＳ＃７、ＰＣ９＿２＿Ｅｘｅ４＿ＤＳＢ＃１およびＰＣ９＿２＿Ｅｘｅ４＿ＤＳＢ＃３のインビボ安定性を、実施例４に記載のように、経時的な化合物の曝露および活性ＧＬＰ－１における濃度の双方をフォローすることにより、マウスにおいて評価した。

【０２４３】

健常Ｃ５７／Ｂ６マウス（７～８週齢、雌、Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ）は、４０ｍｇ／ｋｇでのＰＣ９＿２＿ＧＬＰ－１＿ＮＧＳ＃７、１０．８ｍｇ／ｋｇでのＰＣ９＿２＿Ｅｘｅ４＿ＤＳＢ＃１または５ｍｇ／ｋｇでのＰＣ９＿２＿Ｅｘｅ４＿ＤＳＢ＃３を、１単回静脈内（ＩＶ）用量で受けた。マウス３匹の群を、以下の時点、すなわち、注射前、注射から５分、６時間、２４時間、７２時間および１６８時間経過後の各々で屠殺し、各動物における血液は、ｄＰＰ４阻害剤を含有するＥＤＴＡ管に採取した。次に、血漿試料は、摂氏４度、１４０００ｒｐｍで５分間遠心分離し、次の分析用に－８０℃で貯蔵した。

【０２４４】

３つすべての化合物は、インビトロでヒトＧＬＰ－１受容体で活性があるが、ｃＡＭＰアッセイにおいて、異なるEC_{50}、すなわち、ＰＣ９＿２＿ＧＬＰ－１＿ＮＧＳ＃７、ＰＣ９＿２＿Ｅｘｅ４＿ＤＳＢ＃１およびＰＣ９＿２＿Ｅｘｅ４＿ＤＳＢ＃３の各々に対して、1.94^{-8}Ｍ、5.25^{-9}Ｍおよび3.25^{-10}Ｍを呈する。有意な期間にわたる活性ＧＬＰ－１化合物の濃度を算出するため、用量を、ｃＡＭＰエクスビボアッセイにおける定量の下限を超えるシグナルを生成するような効力に基づき、可能な限り調整した。

【０２４５】

経時的なマウス血漿中の曝露および活性ＧＬＰ－１化合物の濃度は各々、ＰＣ９＿２＿ＧＬＰ－１＿ＮＧＳ＃７では図１２および図１３Ａに示し、ＰＣ９＿２＿Ｅｘｅ４＿ＤＳＢ＃１では図１３Ｂおよび図１４Ｂに示し、またＰＣ９＿２＿Ｅｘｅ４＿ＤＳＢ＃３融合分子では図１１および図１３Ｃに示す。

【０２４６】

曝露および活性ＧＬＰ－１の双方におけるＰＣ９＿２＿ＧＬＰ－１＿ＮＧＳ＃７、ＰＣ９＿２＿Ｅｘｅ４＿ＤＳＢ＃１およびＰＣ９＿２＿Ｅｘｅ４＿ＤＳＢ＃３のインビボ半減期を表１４に示す。

【０２４７】

【表６６】

表 14: 抗体融合物中の改変された GLP-1 類似体の化合物および活性 GLP-1 の *インビボ* 半減期

化合物	実験計画	化合物 *インビボ* 半減期 (h)	活性 GLP-1 *インビボ* 半減期 (h)
PC9_2_GLP-1_NGS#7	C57/B6 マウスに 40 mg/kg IV	約 100	76
PC9_2_Exe4_DSB#1	C57/B6 マウスに 10.8 mg/kg IV	約 100	約 100
PC9_2_Exe4_DSB#3	C57/B6 マウスに 5 mg/kg IV	約 100	36

【０２４８】

親分子ＮＩＰ２２８＿ＧＬＰ－１＿ＶＨおよびＰＣ９＃２＿Ｅｘｅ４＿ＶＬ（表９）と比べて、３つすべての化合物は、ＧＬＰ－１活性において改善されたインビボ安定性を有し、ＰＣ９＿２＿ＧＬＰ－１＿ＮＧＳ＃７、ＰＣ９＿２＿Ｅｘｅ４＿ＤＳＢ＃１およびＰＣ９＿２＿Ｅｘｅ４＿ＤＳＢ＃３における半減期は各々、７６時間、約１００時間および３６時間である。

【０２４９】
かなり興味深いことに、ＰＣ９＿２＿Ｅｘｅ４＿ＤＳＢ＃１は、マウスにおいて最大７日間十分な安定性を呈し、化合物曝露と比べた場合、ＧＬＰ－１活性の低下は認められない（図１３Ｂ）。
【０２５０】
かかるデータは、ＧＬＰ－１類似体周辺に立体障害を作成することで、抗体融合物中のペプチドのインビボ活性半減期を増加させ得ることを示唆している。
【０２５１】
Ｂ）増強されたインビボ安定性特性を有する融合分子を評価すること
実施例４および８Ａで考察したプロトコルは、様々な化合物をマウスに投与すること、また血漿中の化合物の濃度を経時的にプロットすることに従う。ヒトＧＬＰ－１受容体での化合物の効力（ＥＣ５０）は、実施例３に記載のように、ｃＡＭＰアッセイを用いて測定した。
【０２５２】
融合分子の最適化は、インビボＰＫ／安定性の評価を通じて導かれた。図１４Ａ、図１１および図１２に示すように、ペプチドを改変することにより、増強されたインビボ安定性特性を有する融合分子が生成された。ＧＬＰ－１受容体での効力への影響が最小で活性の保持が延長される場合のジスルフィド架橋の安定化とともに、利点が認められた。ＮＧＳ＃７はまた、改善された安定性特性を有するが、ＤＳＢ＃３（３４０ｐＭ）と比べて低い効力（１９ｎＭ）を有する。
【０２５３】
図１４Ａは、１００ｐｍのＥＣ$_{50}$を有するＧＬＰ－１－Ｆｃベンチマーク分子を示す。
【０２５４】
図１１は、３４０ｐＭのＥＣ$_{50}$を有するジスルフィド架橋変異体（ＰＣ９＿２＿ＤＳＢ＃３）（配列番号４９および配列番号８）を示す。
【０２５５】
図１２は、１９ｎＭのＥＣ$_{50}$を有するｎ－グリコシル化変異体（ＰＣ９＿２＿ＮＧＳ＃７）（配列番号５０および配列番号８）を示す。
【０２５６】
それらの化合物におけるインビボ半減期を表１５に示す。
【０２５７】
【表６７】

表 15: 抗体融合中の改変された GLP-1 類似体の化合物および活性 GLP-1 の *インビボ*半減期

化合物	実験計画	化合物の *インビボ* 半減期 (h)	活性 GLP-1 の *インビボ*半減期 (h)
GLP-1-Fc	C57/B6 マウスに 1mg/kg	約 100	16
PC9_2_Exe4_DSB#3	C57/B6 マウスに 5 mg/kg IV	約 100	36
PC9_2_GLP-1_NGS#7	C57/B6 マウスに 40 mg/kg IV	約 100	76

【０２５８】
実施例９　ＰＣＳＫ９／ＧＬＰ－１融合物は理想的な安定性／活性特性を示す
二重作用融合分子を、マウスモデルにおけるＦｃ－曝露およびＧＬＰ－１活性について評価した。用量は静脈内へ１０．８ｍｇ／ｋｇであり、インビトロ効力は５２００ｐＭであった。プロトコルは実施例８に記載の通りであった。データは、静脈内へ１ｍｇ／ｋｇの用量でかつ１００ｐＭのインビトロ効力を有するＧＬＰ－１　Ｆｃベンチマーク分子と比べた。ここでは類似のプロトコルを実施例４に記載の通りに用いた。結果は、図１４Ａ（デュラグルチド）および図１４Ｂ（ＰＣＳＫ９／ＧＬＰ－１融合物ＰＣ９＿２＿ＤＳＢ＃１）（配列番号４８および配列番号８）に示す。最大７日間、マウスにおけるＧＬＰ－１活性の低下はなかった。

【０２５９】
実施例１０　分子内ジスルフィド架橋を有する早期ＧＬＰ－１類似体ペプチド抗体融合物の産生および精製
　多くの凝集体がＳＥＣ－ＨＰＬＣにより検出されたように、中規模バッチからのプロテインＡ精製後の材料の品質は、ＰＣ９＿２＿Ｅｘｅ４＿ＤＳＢ＃１およびＰＣ９＿２＿Ｅｘｅ４＿ＤＳＢ＃３において不良であった。次に、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ　２００プレップグレードカラムを用いる分取サイズ排除クロマトグラフィーを、実施例２に記載のように、化合物をさらに精製するために用いた。
【０２６０】
　ＰＣ９＿２＿Ｅｘｅ４＿ＤＳＢ＃１およびＰＣ９＿２＿Ｅｘｅ４＿ＤＳＢ＃３における分取ＳＥＣクロマトグラムを各々、図１５Ａおよび図１５Ｂに示す。材料の有意な割合（２５～４０％）が、早期の保持時間での追加的なピークによって示されるように凝集する。インビボ試験に用いられる材料を得るため、単量体化合物を含有する画分を採取した。実施例８および９を参照のこと。
【０２６１】
　さらに、ＰＣ９＿２＿Ｅｘｅ４＿ＤＳＢ＃１産生のスケーラビリティを、ｗａｖｅｂａｇ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）に一過性にトランスフェクトされた４８．２ＬのＣＨＯ哺乳類細胞により評価した。化合物を、プロテインＡカラムを用いて精製し、その後、２つの追加的な精製ステップを、混合モード樹脂を用いて行った。
【０２６２】
　採取物中に高レベルの凝集（＞２５％）を検出し、単量体生成物の効率的精製が特に困難であった。生成物をＳＥＣ－ＨＰＬＣにより９５．９％の純度で生成するには、３つのクロマトグラフィーステップが必要であった。これは精製収率にとって極めて有害であり、全体的回復は約３．４％であった。さらに、採取物中の滴定量は、類似の発現系を用いて、モノクローナル抗体と比べて低い１０４ｍｇ／Ｌであった。抗ＰＣＳＫ９抗体ＨＳ９の軽鎖（配列番号２）との融合物中のＤＳＢ＃１ジスルフィド架橋ＧＬＰ－１類似体の生成により、酷似した結果がもたらされた。
【０２６３】
実施例１１　凝集
　二重作用融合分子（ＰＣＳＫ９／ＧＬＰ－１融合物ＰＣ９＿２＿ＤＳＢ＃１）（配列番号４８）は凝集の可能性を有し、一部の実施形態では、単量体を選択することが所望される。実施例２に記載のようにプロテインＡ精製後の分析用ＳＥＣ－ＨＰＬＣの間に検出された凝集体を図１６に示す。したがって、一部の実施形態では、単量体特性を改善するため、さらなる改変が所望され得る。
【０２６４】
実施例１２　増強された単量体特性を有する抗体融合物中のＧＬＰ－１類似体ペプチド
　ペプチド抗体分子の産生中の単量体特性を改善するため、ＰＣ９＃２の軽鎖（配列番号９）との融合物中の付加的なＥｘｅｎｄｉｎ－４ジスルフィド架橋ペプチド（ＤＳＢ）を作成した。ジスルフィド結合の形成を促進し、おそらくはジスルフィドスクランブリングに起因する産生中の凝集を最終的に低減するため、システイン架橋の様々な位置ならびにグリシンリッチＣ末端キャップの長さおよびＥｘｅｎｄｉｎ－４ペプチドのＣ末端での様々なグリシン点突然変異を改変した。ペプチド改変作業は、Ｅｘｅｎｄｉｎ－４の三次元ＮＭＲ構造を用いて導かれた（Ｎｅｉｄｉｇｈ，ＪＷ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，２００１，４０，１３１８８－２００）。
【０２６５】
　合計で１０のＤＳＢペプチド抗ＰＣＳＫ９融合物を、小規模に生成し、ＳＥＣ－ＨＰＬＣにより、改善された単量体特性についてスクリーニングした。ペプチド配列は図１７に記載する。ＰＣ９＿２＿Ｅｘｅ４＿ＤＳＢ＃４は、有意に発現することがなく、さらなる特徴づけをしなかった。
【０２６６】

プロテインＡ精製後、分析用ＳＥＣ－ＨＰＬＣによって測定された、ＰＣ９＿２＿Ｅｘｅ４＿ＶＬおよびＰＣ９＿２＿Ｅｘｅ４＿ＤＳＢ＃１と比べての９つの融合物における凝集体の百分率は、表１６に記載する。

【０２６７】

【表６８】

表 16. PCSK9 抗体 PC9_2 の軽鎖との融合物中のジスルフィド架橋 exendin-4 変異体に対するプロテイン A 精製後の凝集体の百分率

#	化合物	分析用 SEC による%凝集体
1	PC9_2_Exe4_VL	2.9
2	PC9_2_Exe4_DSB#1	26.5
3	PC9_2_Exe4_DSB#5	20.5
4	PC9_2_Exe4_DSB#6	23.3
5	PC9_2_Exe4_DSB#7	5.1
6	PC9_2_Exe4_DSB#8	51.1
7	PC9_2_Exe4_DSB#9	7.8
8	PC9_2_Exe4_DSB#10	7.3
9	PC9_2_Exe4_DSB#11	7.6
10	PC9_2_Exe4_DSB#12	20.1
11	PC9_2_Exe4_DSB#13	17.1

【０２６８】

試験した９つの中の４つの化合物、すなわちＰＣ９＿２＿Ｅｘｅ４＿ＤＳＢ＃７、ＰＣ９＿２＿Ｅｘｅ４＿ＤＳＢ＃９、ＰＣ９＿２＿Ｅｘｅ４＿ＤＳＢ＃１０およびＰＣ９＿２＿Ｅｘｅ４＿ＤＳＢ＃１１が、１０％未満の凝集体百分率を達成している。ＰＣ９＿２＿Ｅｘｅ４＿ＤＳＢ＃７は、初期融合物ＰＣ９＿２＿Ｅｘｅ４＿ＤＳＢ＃１における２６．５％と比べて５．１％の最低の凝集体百分率を有する。ジスルフィド架橋を有しないＥｘｅｎｄｉｎ－４抗体融合物のＰＣ９＿２＿Ｅｘｅ４＿ＶＬは、２．９％の凝集体を示す。

【０２６９】

ＰＣ９＿２＿Ｅｘｅ４＿ＤＳＢ＃７およびＰＣ９＿２＿Ｅｘｅ４＿ＤＳＢ＃９の生成は、インビボ安定性実験を実施するのに十分な量で材料を供給するため、スケールアップさせた。図１８および図１９は、実施例２に記載される通りの初期プロテインＡ精製後のＰＣ９＿２＿Ｅｘｅ４＿ＤＳＢ＃７およびＰＣ９＿２＿Ｅｘｅ４＿ＤＳＢ＃９各々の分取ＳＥＣクロマトグラムを示す。その精製ステップの間、ＰＣ９＿２＿Ｅｘｅ４＿ＤＳＢ＃１およびＰＣ９＿２＿Ｅｘｅ４＿ＤＳＢ＃３（図１５ＡおよびＢ）と異なり、有意な割合の凝集体は検出されなかった。

【０２７０】

改善された単量体特性を有する最適化されたＤＳＢペプチド抗体融合物が、Ｅｘｅｎｄｉｎ－４抗体融合物と比べてより優れたインビボ安定性を確かに呈することをチェックするため、ＰＣ９＿２＿Ｅｘｅ４＿ＤＳＢ＃７およびＰＣ９＿２＿Ｅｘｅ４＿ＤＳＢ＃９を、各化合物につき各々１０ｍｇ／ｋｇおよび１ｍｇ／ｋｇで、ＣＤラット３匹に静脈内注射した。各動物における血清試料を、注射から３０分、６時間、２４時間、４８時間、９６時間、２４０時間および３３６時間経過後、採取した。化合物曝露および活性ＧＬＰ－１の濃度を、実施例４に記載のように経時的に測定した。

【０２７１】

両化合物は、ｃＡＭＰアッセイにおいてヒトＧＬＰ－１受容体で活性を示し、EC_{50}は、ＰＣ９＿２＿Ｅｘｅ４＿ＤＳＢ＃７では９．４５Ｅ－１０Ｍであり、ＰＣ９＿２＿Ｅｘｅ４＿ＤＳＢ＃９では１．２４Ｅ－１０Ｍである。ＰＣ９＿２＿Ｅｘｅ４＿ＤＳＢ＃７は、効力がＰＣ９＿２＿Ｅｘｅ４＿ＤＳＢ＃９より約８倍低く、これは、有意な期間にわた

り、ｃＡＭＰエクスビボアッセイにおける定量の下限を超えるシグナルを生成するため、１０倍高い用量が注射されているためである。

【０２７２】

ＰＣ９＿２＿Ｅｘｅ４＿ＤＳＢ＃７およびＰＣ９＿２＿Ｅｘｅ４＿ＤＳＢ＃９融合分子における経時的なラット血清中の曝露および活性ＧＬＰ－１化合物の濃度を各々、図２０および２１に示す。活性ＧＬＰ－１の濃度は、分析を簡略化するため、最初の時点（３０分）で曝露に対して正規化した。

【０２７３】

ＰＣ９＿２＿Ｅｘｅ４＿ＤＳＢ＃７およびＰＣ９＿２＿Ｅｘｅ４＿ＤＳＢ＃９は、ＧＬＰ－１活性における半減期として、親Ｅｘｅｎｄｉｎ－４融合分子ＰＣ９＿２＿Ｅｘｅ４＿ＶＬに対する５．７時間と比べて各々、４４．２時間および１２．５時間を有する（表９を参照））。９６時間後に採取したＰＣ９＿２＿Ｅｘｅ４＿ＤＳＢ＃９試料に対する活性化合物の濃度は、アッセイの定量の下限を下回ったことから測定することができない。

【０２７４】

それらのデータは、ＰＣ９＿２＿Ｅｘｅ４＿ＤＳＢ＃７およびＰＣ９＿２＿Ｅｘｅ４＿ＤＳＢ＃９の双方は、抗体融合物中に存在する場合、親融合分子と比べて、ＧＬＰ－１類似体ペプチドの改善されたインビボ活性半減期を有することを示している。

【０２７５】

上記のように、ペプチド改変により、凝集特性を管理することができる。突然変異をペプチドおよび組成物の中のシステイン架橋の位置に設けるとともに、ＧＬＰ－１部分のペプチド／Ｃ末端の長さを改変した。

【０２７６】

プロトコルは上記のとおりである。

【０２７７】

ＰＣＳＫ９／ＧＬＰ－１融合物（ＰＣ９＿２＿ＤＳＢ＃７）（配列番号５１および配列番号８）では、小規模バッチ内でのＳＥＣ－ＨＬＰＣにより、＞９０％の単量体が得られた。凝集体は中規模バッチ内でも検出されたが、ＰＣＳＫ９／ＧＬＰ－１融合物ＰＣ９＿２＿ＤＳＢ＃１（配列番号４８および配列番号８）よりもはるかに低い広がりであった。

【０２７８】

結果を図１５Ａ、図１８、図２３および表１６に示す。

【０２７９】

実施例１３　抗ＰＣＳＫ９抗体との融合物中のＧＬＰ－１類似体ペプチドの薬物動態学および薬力学モデリング

ＰＣＳＫ９／ＧＬＰ－１融合分子を設計に導くため、薬物動態学（ＰＫ）－薬力学（ＰＤ）モデルを、診療所において試験されたＰＣＳＫ９の抑制と抗ＰＣＳＫ９抗体の親和性との間の関係に関する先行データ、ならびに認可されたＧＬＰ－１受容体作動薬分子のリラグルチドおよびデュラグルチドに関するデータを用いて開発している。

【０２８０】

抗ＰＣＳＫ９抗体との融合物中のＧＬＰ－１類似体ペプチドの効力は、市販薬と同等のＧＬＰ－１活性を生じることになる最適範囲を同定するため、十分なＰＣＳＫ９抑制をもたらすことができる用量を用いて精査した。シミュレーションを、デュラグルチドの薬物動態、血漿タンパク質結合、および受容体親和性特性を用いて、その化合物の経時的な効力－正規化されたＧＬＰ－１活性を得るために実施した。ＰＣＳＫ９／ＧＬＰ－１融合分子においては、ＰＫ特性は、ＰＣＳＫ９に特異的な典型的なヒト抗体のものであると仮定し、その情報は診療所内の化合物から得た。これらのシミュレーションによると、ヒトＰＣＳＫ９に対して３．９ｎＭの親和性を有するＰＣＳＫ９／ＧＬＰ－１融合物の皮下への６０ｍｇの１週用量が、定常状態で投与期間にわたって９０％を超えるＰＣＳＫ９抑制を生じるはずであることが示される（図２２Ａ）。

【０２８１】

その投与計画を用いたシミュレーションによると、ヒトＧＬＰ－１受容体でのＰＣＳＫ

９／ＧＬＰ－１融合分子の効力が、既存の分子と比べて類似のＧＬＰ－１活性を得るには、３～５ｎＭの範囲内である必要があることが示される（図２２Ｂ）。それらのシミュレーションにおけるデュラグルチドの効力は８０ｐＭに設定し、これは、ＰＣＳＫ９／ＧＬＰ１融合分子の効力が、ＧＬＰ－１受容体作動薬分子に伴う悪心副作用をＰＣＳＫ９を効率的に抑制するのに必要とされる用量で管理するように、デュラグルチドよりも約３０～６０倍低い必要があることを示唆する。

【０２８２】

実施例１４　ヒトＧＬＰ－１受容体で効力が低下したＧＬＰ－１類似体ペプチド

ＧＬＰ－１ペプチドまたはＧＬＰ－１類似体の効力を低減するための方法は、例えば、ペプチド中の主要な残基で非天然アミノ酸を突然変異させるかまたは導入するものとして当該技術分野で周知である。ＧＬＰ－１ペプチドの受容体への結合および活性における重要な残基がアラニン走査により同定されたことは注目すべきである（Ａｄｅｌｈｏｒｓｔ，Ｋ．ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏ．Ｃｈｅｍ．，１９９４，２６９，６２７６－６２７８）。

【０２８３】

ＧＬＰ－１受容体での効力を低減することの実現可能性をさらに実証するため、７～３６のＧＬＰ－１配列を用いての位置２または３に突然変異または非天然アミノ酸を有するＧＬＰ－１類似体のパネルは、遊離ペプチドとして合成し、実施例３に記載のようにｃＡＭＰインビトロアッセイにおいて、ヒトＧＬＰ－１受容体での活性について試験した。データは、下の表１７にまとめる。Ａｉｂは２－アミノイソ酪酸に対応し、Ｏｒｎはオルニチンに対応する。

【０２８４】

【表６９】

表 17. GLP-1 点突然変異ペプチドの cAMP アッセイにおけるヒト GLP-1R での効力

#	ペプチド	修飾	cAMP アッセイにおける huGLP-1R での効力 (nM)	GLP-1 に対する EC50 の倍数変化
1	GLP-1	/	0.10	/
2	g769	E3D	0.10	1
3	g766	A2Aib	0.11	1.1
4	g770	A2P	0.15	1.5
5	g767	E3Q	0.28	2.8
6	g762	A2S	0.29	2.9
7	g755	A2H	0.32	3.2
8	g752	A2V	0.56	5.6
9	g749	A2G	0.63	6.3
10	g768	E3N	0.68	6.8
11	g751	A2I	1.78	17.8
12	g765	A2Q	2.98	29.8
13	g763	A2T	4.30	43
14	g753	A2F	4.30	43
15	g756	A2W	5.46	54.6
16	g754	A2Y	14.4	144
17	g764	A2N	21.0	210
18	g750	A2L	80.0	800
19	g761	A2Orn	86.4	864
20	g757	A2E	103.3	1033
21	g758	A2D	>100	>1000
22	g760	A2R	>80	>800
23	g759	A2K	>100	>1000

【０２８５】

それらのデータは、ＧＬＰ－１類似体ペプチドのＥＣ$_{50}$が、規定された効力低下を得るように調節可能であることを示す。

【０２８６】

実施例１５　ヒトＧＬＰ－１受容体での効力が低下した抗体融合物中のＧＬＰ－１類似体ペプチド

抗ＰＣＳＫ９抗体ＨＳ９の軽鎖（配列番号２）との融合物中のＤＳＢ＃７ＧＬＰ－１類似体ペプチド（配列番号１３）の効力を低減するため、標準の分子生物学技術を用いて、ペプチド中の位置Ｇ２、Ｅ１５、Ｖ１９、Ｉ２３またはＬ２６に点突然変異を導入した。ペプチド抗体融合分子の全部で２８の突然変異体を生成し、実施例３に記載のようにｃＡＭＰアッセイを用いてヒトＧＬＰ－１受容体での活性について試験した。化合物のリストおよび活性データを表１８に示す。

【０２８７】

【表７０】

表 18. PCSK9 抗体 HS9 の軽鎖融合物中の DSB#7 点突然変異体の GLP-1 と比べてのヒト GLP-1R での効力および最大活性化百分率

#	化合物	cAMP アッセイにおける huGLP-1R での効力 (M)	%最大効果	GLP1-Fc に対する EC50 の倍数変化	配列番号
1	HS9_DSB7_G2Y	1.7E-08	10	603	444
2	HS9_DSB7_G2V	1.2E-09	93	43	445
3	HS9_DSB7_G2T	6.3E-09	73	227	446
4	HS9_DSB7_G2Q	1.2E-08	86	436	447
5	HS9_DSB7_G2N	1.9E-08	31	685	448
6	HS9_DSB7_G2I	2.3E-09	87	81	449
7	HS9_DSB7_G2F	5.8E-09	69	209	450
8	HS9_DSB7_E15G	6.8E-09	91	243	451
9	HS9_DSB7_E15A	1.2E-09	92	42	452
10	HS9_DSB7_V19T	4.0E-10	95	14	453
11	HS9_DSB7_V19S	2.7E-09	94	95	454
12	HS9_DSB7_V19G	1.3E-08	93	479	455
13	HS9_DSB7_V19A	1.3E-09	96	46	456
14	HS9_DSB7_I23T	不活性	不活性	/	457
15	HS9_DSB7_I23S	不活性	不活性	/	458
16	HS9_DSB7_I23G	5.6E-07	82	2.0E+04	459
17	HS9_DSB7_I23A	6.1E-07	67	2.2E+04	460
18	HS9_DSB7_L26T	1.3E-07	87	4.7E+03	461
19	HS9_DSB7_L26S	不活性	不活性	/	462
20	HS9_DSB7_L26P	1.4E-06	60	5.1E+04	463
21	HS9_DSB7_L26N	4.3E-06	44	1.5E+05	464
22	HS9_DSB7_L26Q	5.9E-06	34	2.1E+05	465
23	HS9_DSB7_L26M	5.3E-08	90	1.9E+03	466
24	HS9_DSB7_L26I	7.4E-10	96	27	467
25	HS9_DSB7_L26H	8.0E-08	87	2.9E+03	468
26	HS9_DSB7_L26G	2.8E-06	81	1.0E+05	469
27	HS9_DSB7_L26E	不活性	不活性	/	470
28	HS9_DSB7_L26D	不活性	不活性	/	471
29	HS9_DSB7	2.1E-10	96	8	472
30	GLP1	1.9E-11	100	0.7	
31	GLP1-Fc	2.8E-11	99	1	

【０２８８】

２８中５つの構築物が不活性である。それ以外の化合物は、ヒトＧＬＰ１受容体で、ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ｔにおける４００ｐＭからＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｌ２６Ｑにおける約６ｕＭにかけての範囲で非常に多様な効力を呈する。さらに、ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｇ２ＹまたはＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｌ２６Ｑのような一部の化合物は、部分作動薬であり、ＧＬＰ－１ペプチドと比べて、飽和用量で同じレベルの活性化をもたらすことはない。

【０２８９】

実施例１３におけるＰＫＰＤモデリングに基づき、二重活性のある抗ＰＣＳＫ９抗体ＧＬＰ－１受容体作動薬分子は、ＰＣＳＫ９抗原を効率的に抑制するのに必要とされる用量で悪心を管理するため、ＧＬＰ－１－Ｆｃベンチマークと比べて約３０～６０倍のヒトＧＬＰ－１受容体での効力低下を有する必要がある。

【０２９０】

４つのペプチド抗体融合物（ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｇ２Ｖ、ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｅ１５Ａ

、ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９ＡおよびＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｌ２６Ｉ）は、ベンチマークＧＬＰ１－Ｆｃと比べて２５～５０倍の低下に対応する７００ｐＭ～１．４ｎＭの間の効力を呈する。それら４つすべての化合物は、ＧＬＰ－１ペプチドと比べて９０％を超える最大活性化の百分率を有する、ヒトＧＬＰ－１受容体での完全作動薬である。

【０２９１】

実施例１６　抗ＰＣＳＫ９抗体との融合物中のＧＬＰ－１類似体ペプチドの特徴づけ

Ａ）抗ＰＣＳＫ９抗体との融合物中のＧＬＰ－１類似体ペプチドの開発可能性（Ｄｅｖｅｌｏｐａｂｉｌｉｔｙ）評価

さらなる特徴づけを支援するため、所望されるヒトＧＬＰ－１Ｒでの効力から選択した４つのペプチド抗体融合物（ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｇ２Ｖ、ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｅ１５Ａ、ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９ＡおよびＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｌ２６Ｉ）を大規模に生成させた。化合物が生成中に凝集する傾向を評価するため、プロテインＡ精製後の試料を、分析用ＳＥＣ－ＨＰＬＣにより試験した。データを表１９にまとめる。

【０２９２】

【表７１】

表 19. プロテイン A 精製後のペプチド/抗体リード分子の SEC-HPLC 分析

#	化合物	%凝集体	% 単量体	% 切断
1	HS9_DSB7_G2V	25.08	74.64	0.28
2	HS9_DSB7_E15A	21.04	78.6	0.36
3	HS9_DSB7_V19A	4.33	95.43	0.24
4	HS9_DSB7_L26I	5.96	93.81	0.23

【０２９３】

４つの中の２つの融合物のみ（ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９ＡおよびＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｌ２６Ｉ）が、プロテインＡ精製後に９０％を超える単量体の百分率を達成している。ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａは、９５％を超える単量体を伴う最良の特性を呈する。ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｇ２ＶおよびＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｅ１５Ａは、有意に生成中に凝集する傾向があり、凝集体の百分率はＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａにおける５％未満に対して２０％を超える。

【０２９４】

精製化合物は、デフォルトの調製用緩衝液中で５０ｍｇ／ｍＬの目標濃度を達成するため、３０ｋＤａの分子量カットオフを有する遠心スピン濃縮器を用いて濃縮した。さらなる容積低下がタンパク質濃度の低下をもたらすことが認められたことから、ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｇ２ＶおよびＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｅ１５Ａの濃縮は各々、３８．７および３３．７ｍｇ／ｍＬで停止させた。かかる問題は、ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９ＡおよびＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｌ２６Ｉの濃縮ステップの間、認められなかった。

【０２９５】

次に、貯蔵安定性を評価するため、試料を摂氏５度または摂氏４０度で４週間インキュベートし、その後分析用ＳＥＣ－ＨＰＬＣを施した。結果を表２０にまとめる。

【０２９６】

【表７２】

表 20. 精製ペプチド/抗体リード分子における 5℃または 40℃での 4 週間のインキュベーション後の純度および凝集パラメータ

#	化合物	[C] mg/mL	5℃で 4 週間後の純度(%)	40℃で 4 週間後の純度(%)	5℃での 1 か月あたりの凝集割合 (%)	40℃での 1 か月あたりの凝集割合(%)
1	HS9_DSB7_G2V	38.7 *	88.6	77.9	1.4	9.2
2	HS9_DSB7_E15A	33.7 *	93.9	80.8	0.81	13.2
3	HS9_DSB7_V19A	52	98.7	90.1	0.3	6.3
4	HS9_DSB7_L26I	47.2	97	87.6	0.32	7.1

【０２９７】

ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９ＡおよびＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｌ２６Ｉの双方は、ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｇ２ＶおよびＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｅ１５Ａよりも優れた安定性パラメータを呈する。例えば、最初の２つは、摂氏５度で、ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｅ１５ＡおよびＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｇ２Ｖ各々における０．８％および１．４％と比べて、約０．３％の１か月あたりの凝集割合を有する。

【０２９８】

Ｂ）抗ＰＣＳＫ９抗体との融合物中のＧＬＰ－１類似体ペプチドのラットにおける単回静脈内用量での薬物動態

所望されるヒトＧＬＰ－１Ｒでの効力から選択した４つのペプチド抗体融合物の薬物動態学的特性を、ＣＤラット３匹へのＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｇ２Ｖ、ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｅ１５Ａ、ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９ＡおよびＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｌ２６Ｉ各々に対する６０、５３、５８．５および６０ｍｇ／ｋｇでの単回静脈内ボーラス後、実施例４に記載のように評価した。標的媒介性の薬物動態成分を全く伴うことなく、ＰＣＳＫ９シンク（ｓｉｎｋ）を有意な期間飽和させ、線形位相の間でのＰＫパラメータを測定するため、高用量の化合物（５０ｍｇ／ｋｇ超）を用いた。

【０２９９】

血液試料は、注射から３０分、６時間、２４時間、４８時間、９６時間、１６８時間、２４０時間および３３６時間経過後に採取した。４つの化合物における経時的濃度を図２４に示し、半減期データを表２１にまとめる。

【０３００】

【表７３】

表 21. 単回静脈内注射後のラットでのペプチド/抗体リード分子のインビボ半減期

#	化合物	設計	曝露半減期 (h)
1	HS9_DSB7_G2V	CD ラットに 60 mg/kg 静脈内	48
2	HS9_DSB7_E15A	CD ラットに 53 mg/kg 静脈内	41
3	HS9_DSB7_V19A	CD ラットに 58.5 mg/kg 静脈内	128
4	HS9_DSB7_L26I	CD ラットに 60 mg/kg 静脈内	39

【０３０１】

４つの融合分子は、配列が酷似しており、同じ抗体骨格を共有するにもかかわらず、有意な異なる特性を有する。ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａは、４つの融合物の中で、例えばＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｌ２６Ｉに対するわずか３９時間と比べて、１２８時間の最長のインビボ半減期を有する。

【０３０２】

実施例１７　抗ＰＣＳＫ９抗体との融合物中のＧＬＰ－１類似体ペプチドの種間でのＰＣ

ＳＫ９に対する親和性および動態パラメータの測定

ヒト、カニクイザルおよびラットＰＣＳＫ９のＧＬＰ－１類似体抗ＰＣＳＫ９融合物ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９ＡヒトＩｇＧ１－ＴＭへの結合における会合（ｋａ）、解離（ｋｄ）および平衡解離定数（K_D）を、本質的にはＫａｒｌｓｓｏｎら（Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ（１９９１），ｖｏｌ．１４５，ｐ．Ｄｅａｒ２２９－４０）に記載のように、Ｂｉａｃｏｒｅ ２０００バイオセンサー（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を用いて、表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）により、摂氏２５度で測定した。抗ＰＣＳＫ９抗体ＰＣ９＃３ヒトＩｇＧ１－ＴＭはベンチマークとして用いた（配列番号４０４の可変重鎖および配列番号４０５の可変軽鎖。

【０３０３】

まず、マウス抗ヒトＩｇＧモノクローナル抗体表面を、ヒト抗体捕捉キットおよびＣＭ５センサーチップ（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を用いて作成した。ヒト抗体化合物は、１０μＬ／分の流速で３分間捕捉した。組換えヒトＡｖｉ＿ＰＣＳＫ９＿Ｆｌａｇ＿Ｈｉｓ（社内）、カニクイザルＡｖｉ＿ＰＣＳＫ９＿Ｆｌａｇ＿Ｈｉｓ（社内）およびＨｉｓタグ化ラットＰＣＳＫ９（ＳｉｎｏＢｉｏｌｏｇｉｃａｌ）を、ランニングバッファー（１０ｍＭリン酸ナトリウム、ｐＨ７．４、１５０ｍＭ塩化ナトリウム、１ｍｇ／ｍＬのＢＳＡ、０．０５％ツイーン２０）で１ｎＭ～２００ｎＭの範囲の濃度に希釈し、チップ表面上に１０分間注射し、その後わずか１０分間の解離段階にランニングバッファーを供した。チップの表面を、各抗体適用の間、３Ｍ塩化マグネシウムを用いて再生させた。まず全体的な解離速度を、その後全体的なオン速度を、いずれも１：１の結合動力学的モデルを用いて算出した。

【０３０４】

結果は表２２に示す。

【０３０５】

【表７４】

表 22: 抗 PCSK9 抗体 PC9#3 と比べての、ヒト, カニクイザルおよびラットの PCSK9 に対するペプチド/抗体リード分子 HS9_DSB7_V19A の Biacore によって測定された動態パラメータ

ヒト PCSK9			
動態パラメータ	**ka (1/Ms)**	**kd (1/s)**	**KD (M)**
PC9#3	6.4E+05	4.4E-04	7.0E-10
HS9_DSB7_V19A	1.9E+05	1.1E-04	6.0E-10
カニクイザル PCSK9			
動態パラメータ	**ka (1/Ms)**	**kd (1/s)**	**KD (M)**
PC9#3	4.2E+05	4.2E-04	1.0E-09
HS9_DSB7_V19A	1.1E+05	1.9E-04	1.7E-09
ラット PCSK9			
動態パラメータ	**ka (1/Ms)**	**kd (1/s)**	**KD (M)**
PC9#3	9.0E+05	4.7E-03	5.2E-09
HS9_DSB7_V19A	3.7E+05	2.1E-04	5.7E-10

【０３０６】

融合分子ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａは、６００ｐＭのヒトＰＣＳＫ９に対するｐＨ７．４での親和性を有し、ベンチマーク抗ＰＣＳＫ９抗体ＰＣ９＃３と酷似している。興味深いことに、４倍低い解離定数を有するＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａは、ＰＣ９＃３と比べてヒトＰＣＳＫ９から解離する傾向がより低い。

【０３０７】

さらに、ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａは、生理学的ｐＨでカニクイザルおよびラットＰＣＳＫ９に強力に結合することができ、平衡解離定数はヒトＰＣＳＫ９値に近い（各々、

１．７ｎＭおよび５７０ｐＭ）。
【０３０８】
実施例１８　抗ＰＣＳＫ９抗体との融合物中のＧＬＰ－１類似体ペプチドと密に関連したヒトタンパク質と比べてのＰＣＳＫ９に対する特異性
　ＧＬＰ－１類似体抗ＰＣＳＫ９融合物ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９ＡヒトＩｇＧ１－ＴＭと関連したヒトタンパク質と比べてのＰＣＳＫ９に対する特異性は、解離増強ランタニド蛍光免疫測定法による時間分解蛍光（ＤＥＬＦＩＡ　ＴＲＦアッセイ、ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ）により測定した。組換えヒトＡｖｉ＿ＰＣＳＫ９＿Ｆｌａｇ＿Ｈｉｓ（社内）、ＧＳＴタグ化ヒトＰＣＳＫ７（Ａｂｎｏｖａ）、ＧＳＴタグ化ヒトＭＢＴＰＳ１（Ａｂｎｏｖａ）およびＦｌａｇ／Ｈｉｓタグ化ヒトＣＤ８６（社内）を、ＰＢＳ中、１０μｇ／ｍＬで９６ウェル免疫測定用プレートにコーティングした。洗浄後、ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａを、２５μｇ／ｍＬの濃度で、抗原でコーティングしたウェルに添加した。プレートを、徹底洗浄前に室温で２時間インキュベートした。結合されたＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９ＡヒトＩｇＧ１－ＴＭを、二次ユウロピウム標識抗ヒトＩｇＧ抗体（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ）を用いて検出した。プレートへの抗原のコーティングは、マウス抗ＧＳＴＩｇＧ（Ａｂｃａｍ）を一次として、またユウロピウム標識抗マウスＩｇＧ（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ）をヒトＰＣＳＫ７およびヒトＭＢＴＰＳ１に対する検出として用いることによって評価した。ヒトＰＣＳＫ９およびヒトＣＤ８６のコーティングは、ユウロピウム標識抗Ｈｉｓ　ＩｇＧ（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ）を用いて直接的に評価した。
【０３０９】
　結果によると、ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９ＡヒトＩｇＧ１－ＴＭが、ヒトＰＣＳＫ７、ヒトＭＢＴＰＳ１（ＰＣＳＫ８）またはヒトＣＤ８６ではなく（データは示さず）、ヒトＰＣＳＫ９に強力に結合することが示された。
【０３１０】
実施例１９　抗ＰＣＳＫ９抗体との融合物中のＧＬＰ－１類似体ペプチドを用いたヒトＰＣＳＫ９のＬＤＬ受容体への結合の遮断
　ＧＬＰ－１類似体抗ＰＣＳＫ９融合物ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９ＡがヒトＰＣＳＫ９のヒトＬＤＬ受容体への結合を遮断する能力を、ＥＬＩＳＡ競合アッセイを用いて評価した。抗ＰＣＳＫ９抗体ＨＳ９および無関係アイソタイプ一致ＮＩＰ２２８ヒトＩｇＧ１－ＴＭを各々、正の対照および負の対照として用いた。
【０３１１】
　１×リン酸塩緩衝生理食塩水、３％スキムミルク中、５ｕｇ／ｍＬでのビオチン化ヒトＰＣＳＫ９（社内）の、１０ｕｇ／ｍＬで９６ウェルＭａｘｉＳｏｒｂプレート（ＮＵＮＣ）上に一晩コーティングしたヒトＬＤＬ－Ｒ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）への結合を、Ｄｅｌｆｉａバッファー（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）中、１００ｎｇ／ｍＬで希釈したクリプテート標識ストレプトアビジン（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）を用いて、ＥＬＩＳＡにより検出した。その相互作用は、ＬＤＬ受容体でコーティングしたウェル内のビオチン化ＰＣＳＫ９試薬とともに室温で２時間同時インキュベートした化合物の１００ｕｇ／ｍＬで開始する３倍連続希釈を用いて負荷した。蛍光シグナルは、３４０ｎｍの励起および６２０ｎｍの放射を用いて、Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ　Ｅｎｖｉｓｉｏｎ装置で読み取った。特異的結合の百分率は、ＬＤＬ受容体をプレート上にコーティングしない場合に得られるバックグラウンドシグナルを減算し、競合化合物を伴わない場合に得られる最大特異的結合シグナルからバックグラウンドレベルを減算して正規化することによって算出した。
【０３１２】
　ＰＣＳＫ９のＬＤＬ受容体への結合の生化学的阻害を図２５に示す。
【０３１３】
　融合分子ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａは、ビオチン化ヒトＰＣＳＫ９の、正の対照の抗ＰＣＳＫ９抗体ＨＳ９における３．５Ｅ～８ＭのＩＣ$_{50}$と比べて類似の４．３Ｅ～８のＩＣ$_{50}$を有する組換えＬＤＬ受容体への結合を遮断し得る。

【０３１４】
実施例２０　抗ＰＣＳＫ９抗体との融合物中のＧＬＰ－１類似体ペプチドで処置されたＨＥＰＧ２細胞によるＬＤＬ取り込み
　ＧＬＰ－１類似体抗ＰＣＳＫ９融合物ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９ＡがＰＣＳＫ９活性を遮断し、ＬＤＬ取り込みを回復させる能力は、以下のようにＨｅｐＧ２肝細胞内で試験した。抗ＰＣＳＫ９抗体ＰＣ９＃２および無関係アイソタイプ一致ＮＩＰ２２８ヒトＩｇＧ１－ＴＭを各々、正の対照および負の対照として用いた。
【０３１５】
　ヒトＨｅｐＧ２細胞を、１０％リポタンパク質欠損血清（Ｓｉｇｍａ）を添加したＤＭＥＭ培地（Ｇｉｂｃｏ）中、2×10^{4}細胞／ウェルの濃度で、黒色の清澄な底の９６ウェルＧｒｅｉｎｅｒプレートに播種し、摂氏３７度（５％CO_2）で一晩インキュベートした。ＰＣＳＫ９を試験化合物と複合させるため、４５ｎＭのヒトＡｖｉ＿ＰＣＳＫ９＿ＦＬＡＧ＿Ｈｉｓ（社内）を、試験化合物を伴う場合と伴わない場合に、ＤＭＥＭ＋１０％ＬＰＤＳ中、様々な濃度、室温で１時間インキュベートした。すべての培地を細胞板から除去し、ＰＣＳＫ９／化合物の混合物をプレートに移し、１時間インキュベートした。次に、ＤＭＥＭ＋１０％ＬＰＤＳで５０ｎＭの最終濃度まで希釈したＢｏｄｉｐｙ－ＬＤＬ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ）を細胞に移し、プレートを摂氏３７度（５％CO_2）で5時間インキュベートした。細胞をＰＢＳで完全に洗浄し、核色素Ｈｏｅｓｃｈｔで染色し、３．７％（ｖ／ｖ）の最終濃度でホルムアルデヒドを用いて固定した。アッセイプレートは、Ｃｅｌｌｏｍｉｃｓ　ＡｒｒａｙＳｃａｎ　ＶＴｉハイコンテントイメージングシステムを用いて、細胞結合蛍光について読み取った。Ｈｏｅｓｃｈｔ染色は、ＢＧＲＦＲ＿３８６＿２３フィルターを用いてチャンネル１で、またＢｏｄｉｐｙ－ＬＤＬは、ＢＧＲＦＲ＿４８５＿２０フィルターを用いてチャンネル２で測定した。画像は、Ｃｏｍｐａｒｔｍｅｎｔａｌ　Ａｎａｌｙｓｉｓ　ｖ４アルゴリズムを用いて分析した。
【０３１６】
　ＨｅｐＧ２細胞によるＬＤＬ取り込みのＰＣＳＫ９依存性低下の阻害を図２６に示す。
【０３１７】
　融合分子ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａは、正の対照の抗ＰＣＳＫ９抗体ＰＣ９＃２における３．１Ｅ～８ＭのIC_{50}と比べて類似の２．５Ｅ～８のIC_{50}を有するヒトＰＣＳＫ９で処置したＨｅｐＧ２細胞により、ＬＤＬ取り込みを回復させ得る。
【０３１８】
実施例２１　抗ＰＣＳＫ９抗体との融合物中のＧＬＰ－１類似体ペプチドの種間でのＧＬＰ－１受容体での効力
　ヒト、カニクイザル、マウスおよびラットＧＬＰ－１受容体でのＧＬＰ－１類似体抗ＰＣＳＫ９融合物ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａの交差反応性を、目的の受容体を過剰発現する安定な細胞株を用いることによって、前述のようにｃＡＭＰ産生アッセイで試験した。ＧＬＰ１－Ｆｃ融合物（社内）およびＧＬＰ－１ペプチドを、正の対照として用いた。
【０３１９】
　異なるＧＬＰ－１受容体での効力を表２３にまとめる。
【０３２０】
【表７５】

表 23. 種間の GLP-1 受容体でのリード分子 HS9_DSB7_V19A の効力

#	化合物	種間の cAMP アッセイにおける GLP-1R での効力 (M)			
		ヒト	カニクイザル	マウス	ラット
1	HS9_DSB7_V19A	3.73E-09	5.83-10	5.75-10	3.83E-11
2	GLP1-Fc (ガンマ 4)	7.72E-11	1.09E-11	8.98E-11	8.92E-12
3	GLP-1 ペプチド	1.61E-11	1.03E-11	2.69E-11	9.31E-11

【０３２１】
融合分子ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａは、４つすべての試験種間でＧＬＰ－１受容体を活性化し得る。
【０３２２】
実施例２２　いくつかの化合物はヒトＧＬＰ－１受容体での効力を低減することによって同定された
ＤＳＢ７の効力を低減するため、ペプチド中の特定の残基を突然変異させた。所望される効力での配列番号４のリンカーを用いた配列番号２に対するペプチド抗体融合物（ここで緑色三角形で示される）を、ヒトＧＬＰ１－Ｒでの特異性および種交差反応についてさらに分析した。図２７を参照のこと。
【０３２３】
変異体は、ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｇ２Ｖ（Gly_2－＞Ｖａｌ）（配列番号４４および配列番号１）；ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｅ１５Ａ（Glu_{15}－＞Ａｌａ）（配列番号４５および配列番号１）；ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａ（Val_{19}－＞Ａｌａ）（配列番号４７および配列番号１）；ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｌ２６Ｉ（Leu_{26}－＞Ｉｌｅ）（配列番号４６および配列番号１）（Val_{19}－＞Ａｌａ（配列番号３）と比較）として示す。これら４つの変異体は、最終的な特徴づけに選択した。結果を図２７に示す。
【０３２４】
実施例２３　効力が低下した融合分子
ＰＣＳＫ９／ＧＬＰ－１融合分子は、図２８Ａに示すように、ＧＬＰ－１受容体に対して所望される効力を示す。この化合物の効力は、悪心を最小限にするように低減されている。表２４は、ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａがデュラグルチドに対して５７．７倍低下した効力を有することを示す。この操作された効力の低下は、悪心や他の有害作用を低減するような所望される効果をもたらす。
【０３２５】
【表７６】

表 24:効力が低下した融合分子			
試料 ID	平均 EC50 (M)	ベンチマークを通じての倍数変化	最大活性化 (%)
HS9_DSB7_V19A (配列番号 1 の重鎖および配列番号 47 の軽鎖融合物)	4.4E-09	57.7	98
GLP-1 (配列番号 29)	1.6E-11	0.2	100
GLP1-Fc(G4) (デュラグルチド)	7.7E-11	1.0	100

【０３２６】
実施例１のＰＣＳＫ９／ＧＬＰ－１融合物は、例えば図２８Ｂに示すように、週毎の投与を可能にするのに十分な抗体曝露／ＧＬＰ－１活性特性を示す。ラットでのｐＫ安定性試験では、５８．５ｍｇ／ｋｇのＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａをラットに注射した。融合化合物の濃度は、血清中で経時的に測定する。ラットから採取した試料は、血清中の試験化合物の活性と試験化合物の濃度の双方について分析する。ＧＬＰ－１活性部分から得たデータは、「活性」化合物の濃度について再計算するために用いる。黒丸を伴う線は、ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａの濃度であり、黒四角を伴う線は、同一試料における活性ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａ（すなわちＧＬＰ－１活性を有する）の濃度である。
【０３２７】
実施例２４　抗ＰＣＳＫ９抗体との融合物中のＧＬＰ－１類似体ペプチドと密に関連したヒト受容体と比べてのＧＬＰ－１受容体に対する特異性
ＧＬＰ－１受容体に対するＧＬＰ－１類似体抗ＰＣＳＫ９融合物ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ

１９Ａの関連のヒト受容体と比べての特異性を、目的の受容体、すなわち、グルカゴン、ＧＩＰ、ＧＬＰ－２およびセクレチン受容体を過剰発現する安定な細胞株を用いることによって、前述のようにｃＡＭＰ産生アッセイで試験した。４つの受容体の各々に対して特異的な作動薬ペプチドを正の対照として用いた。

【０３２８】

データは、図２９Ａ～Ｄ（Ａ：グルカゴン受容体、Ｂ：ＧＩＰ受容体、Ｃ：ＧＬＰ－２受容体、Ｄ：セクレチン受容体）に示す。

【０３２９】

融合分子ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａは、ＧＬＰ－１受容体に対して特異的であり、４つの試験対象の密に関連した受容体のいずれも活性化しない。

【０３３０】

実施例２５　融合分子のさらなる特徴づけにより好ましいインビボ特性が示される

実施例２のＰＣＳＫ９／ＧＬＰ－１融合分子（ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａ（配列番号１の重鎖および配列番号４７の軽鎖融合物））は、投与後７日目を含み、経時的なより優れたグルコース調節および体重減少を示す。データは、デュラグルチドならびにＰＣ９＿２＿ＶＨおよびＶＬ（配列番号８および９）に対して示す。動物に０日目に化合物を投与し、次にそれらの体重を経時的に測定し、体重変化を測定した。

【０３３１】

融合分子は、高親和性に精製ＰＣＳＫ９に結合し、ＨＥＰＧ２細胞内でのＬＤＬｃ取り込みを回復させ、ＧＬＰ－１Ｒを所望される効力で刺激し、体重減少を促進し、また週毎の投与および持続的なＧＬＰ－１のインビボ活性を支援するようなラットＰＫでの好ましい曝露／活性特性を示すことを示している。

【０３３２】

結果を図３０Ａ～Ｂに提供する。

【０３３３】

実施例２６　抗ＰＣＳＫ９抗体との融合物中のＧＬＰ－１類似体ペプチドの活性に対するリンカーの影響

化合物ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａは、ペプチド部分と抗体軽鎖との間に３回リピートするGly_4Serモチーフに対応する配列番号４のリンカーを有する。抗ＰＣＳＫ９抗体ＨＳ９の軽鎖（軽鎖：配列番号２および重鎖：配列番号１）と融合される場合のＧＬＰ－１類似体ペプチドＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａ（配列番号３）との間のリンカー長の影響を検討するため、リンカー長が短縮された３つの融合物、すなわち、Gly_4Serモチーフの２回リピートに対応するリンカー（リンカー：配列番号４０３）を有するＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａ＿Ｌ２（配列番号４１９）、Gly_4Serモチーフの１回リピートに対応するリンカー（配列番号２７）を有するＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａ＿Ｌ１（配列番号４２０）、およびペプチドと抗体軽鎖との間にリンカーを有しないＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａ＿Ｌ０（配列番号４２１）を作成した。

【０３３４】

化合物は、ＥＬＩＳＡによる組換えヒトＰＣＳＫ９に対する結合と、実施例４に記載のようにｃＡＭＰアッセイの細胞に基づくアッセイを用いるヒトＧＬＰ－１受容体での活性との双方について試験した。

【０３３５】

結合ＥＬＩＳＡを、１×リン酸塩緩衝生理食塩水中、１０ｕｇ／ｍＬでヒトＰＣＳＫ９（社内）をコーティングすることによって実施した。プレートを１×リン酸塩緩衝生理食塩水、３％スキムミルクでブロッキング後、化合物を、ＰＢＳ中、１００ｕｇ／ｍＬで添加し、洗浄前に室温で２時間インキュベートした。結合化合物は、Ｄｅｌｆｉａバッファー（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）中、１００ｎｇ／ｍＬで希釈したクリプテート標識Ｆｃに特異的な抗ヒトＩｇＧ（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）を用いて検出した。蛍光シグナルは、３４０ｎｍの励起および６２０ｎｍの放射を用いて、Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ　Ｅｎｖｉｓｉｏｎ装置で読み取った。ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａを正の対照として用い、

無関係アイソタイプ一致ＮＩＰ２２８を、バックグラウンドレベルを測定するのに用いた。

【０３３６】

ＰＣＳＫ９結合およびＧＬＰ－１受容体活性化のデータは各々、図３１および図３２に示す。

【０３３７】

すべての追加的な融合分子は、ヒトＰＣＳＫ９に、ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａと比べて類似のレベルまで結合することができる。試験融合分子はまた、ｃＡＭＰの細胞に基づくアッセイにおいてヒトＧＬＰ－１受容体を活性化することができるが、リンカー長を低減することは、化合物の効力に対して負の影響を有することである。そのアッセイでは、ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａ、ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａ＿Ｌ２、ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａ＿Ｌ１およびＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａ＿Ｌ０におけるEC_{50}は各々、５．０ｎＭ、１５．６ｎＭ、６８．７ｎＭおよび５３７ｎＭである。

【０３３８】

実施例２７　抗ＰＣＳＫ９抗体との融合物中の安定なＧＬＰ－１類似体ペプチドのインビトロ特徴づけ

配列番号３）のＧＬＰ－１類似体ペプチドＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａを、配列番号４のリンカーを用いて、ＨＳ９以外の抗ＰＣＳＫ９抗体の軽鎖に融合した。

１＿配列番号１０の抗体可変重鎖および配列番号１１の抗体可変軽鎖を有するＰＣ９＃１

２＿配列番号４０４の抗体可変重鎖および配列番号４０５の抗体可変軽鎖を有するＰＣ９＃３

３＿配列番号４０６の抗体可変重鎖および配列番号４０７の抗体可変軽鎖を有するＰＣ９＃４

４＿配列番号４０８の抗体可変重鎖および配列番号４０９の抗体可変軽鎖を有するＰＣ９＃５

５＿配列番号４１０の抗体可変重鎖および配列番号４１１の抗体可変軽鎖を有するＰＣ９＃６

６＿配列番号４１２の抗体可変重鎖および配列番号４１３の抗体可変軽鎖を有するＰＣ９＃７

【０３３９】

融合物は、実施例２６に記載のようにＥＬＩＳＡによる組換えヒトＰＣＳＫ９に対する結合と、実施例４に記載のようにｃＡＭＰの細胞に基づくアッセイを用いるヒトＧＬＰ－１受容体での活性との双方について試験した。ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９ＡおよびＮＩＰ２２８アイソタイプ一致を各々、正の対照および負の対照として用いた。

【０３４０】

ＰＣＳＫ９結合およびＧＬＰ－１受容体活性化のデータは各々、図３３および図３４に示す。

【０３４１】

ヒトＧＬＰ－１受容体ｃＡＭＰアッセイで試験した７つすべての化合物が、受容体を活性化することができる。パネルの中の効力は、ＰＣ９＃６＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９ＡおよびＰＣ９＃５＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａの各々において１～３５０ｎＭの範囲である。ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａは、そのアッセイにおいて５ｎＭの効力を有する。

【０３４２】

さらに、すべての試験融合物はまた、ＥＬＩＳＡによると、ヒトＰＣＳＫ９に、結合が弱いＰＣ９＃７＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａおよび結合しないＰＣ９＃６＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａを例外として、強力に結合することができる。

【０３４３】

実施例２８　抗Ｂ７－Ｈ１抗体との融合物中の安定なＧＬＰ－１類似体ペプチドのインビトロ特徴づけ

配列番号３のＧＬＰ－１類似体ペプチドＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａは、配列番号４のリンカーを用いて、特許の国際公開第２０１１０６６３８９号パンフレットに記載の抗Ｂ７－Ｈ１抗体２．７Ａ４の軽鎖に融合させた。抗Ｂ７－Ｈ１抗体２．７Ａ４は、配列番号４２２の可変重鎖および配列番号４２３の可変軽鎖を有する。

【０３４４】

融合物は、ＥＬＩＳＡによる組換えヒトＢ７－Ｈ１に対する結合と、実施例４に記載のようにｃＡＭＰアッセイの細胞に基づくアッセイを用いるヒトＧＬＰ－１受容体での活性との双方について試験した。

【０３４５】

結合ＥＬＩＳＡを、１×リン酸塩緩衝生理食塩水中、５ｕｇ／ｍＬでヒトＢ７－Ｈ１（社内）をコーティングすることによって実施した。プレートを１×リン酸塩緩衝生理食塩水、３％スキムミルクでブロッキング後、化合物を、ＰＢＳ中、１０ｕｇ／ｍＬで添加し、洗浄前に室温で２時間インキュベートした。結合化合物は、実施例２５に記載のように、クリプテート標識Ｆｃに特異的な抗ヒトＩｇＧ（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）を用いて検出した。抗Ｂ７－Ｈ１抗体２．７Ａ４および無関係アイソタイプ一致ＮＩＰ２２８を各々、正の対照および負の対照として用いた。

【０３４６】

Ｂ７－Ｈ１結合およびＧＬＰ－１受容体活性化のデータは各々、図３５および図３６に示す。

【０３４７】

融合物２．７Ａ４＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａは、ヒトＢ７－Ｈ１に、正の対照の２．７Ａ４抗体と類似のレベルまで結合することができる。融合物はまた、ｃＡＭＰの細胞に基づくアッセイにおいて、ヒトＧＬＰ－１受容体をＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａにおける５ｎＭと比べて１００ｎＭの効力で活性化することができる。

【０３４８】

実施例２９　単回静脈内投与後の抗ＰＣＳＫ９抗体との融合物中のＧＬＰ－１類似体ペプチドのラットでの薬物動態学および薬力学

ＣＤラットにおける単回静脈内ボーラス後のペプチド抗体融合ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９ＡについてのＰＫＰＤ試験は、そのインビボ安定性を化合物曝露および活性ＧＬＰ－１の濃度の双方を測定することによって、また標的会合を遊離ラットＰＣＳＫ９の濃度を測定することによって評価するために実施した。

【０３４９】

融合分子を１０、３０および６０ｍｇ／ｋｇで注射した。抗ＰＣＳＫ９　ｍＡｂ　ＨＳ９は、それにペプチドが結合することがなく、対照として用い、６０ｍｇ／ｋｇで注射した。血液試料は次のように採取した。

１：１０ｍｇ／ｋｇ治療群に対して、投与前－０．５時間－６時間－２４時間－４８時間－９６時間および１６８時間；

２：３０ｍｇ／ｋｇ治療群に対して、投与前－０．５時間－２４時間－４８時間－９６時間－１６８時間および２４０時間；および

３：６０ｍｇ／ｋｇ治療群に対して、投与前－０．５時間－２４時間－７２時間－１６８時間－３３６時間および５０４時間

【０３５０】

ラット血清試料中の全ヒトＩｇＧ１抗体（曝露）の濃度および活性ＧＬＰ－１化合物の濃度を、実施例４に記載のように定量化した。

【０３５１】

３つの試験用量（１０、３０および６０ｍｇ／ｋｇ）に対するラット血清中の全および活性ＧＬＰ－１化合物のＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａの経時的濃度を図３７に示す。

【０３５２】

全化合物および活性ＧＬＰ－１の双方における曲線下面積（ＡＵＣ）は、表２５にもまとめる。活性ＧＬＰ－１および全化合物のＡＵＣ間の比を算出することは、インビボ安定

性を評価するための一方法である。１つの比は、試験条件下での完全に安定な化合物に対応している。

【０３５３】

抗ＰＣＳＫ９　ｍＡｂ　ＰＣ９＃２との軽鎖融合物中のＥｘｅｎｄｉｎ－４を含む親融合分子ＰＣ９＃２＿Ｅｘｅ４（実施例４を参照）におけるデータもまた、比較のために含めている。

【０３５４】

【表７７】

表 25. 親融合分子 PC9#2_Exe4 と比べての融合分子 HS9_DSB7_V19A の単回静脈内注射後の全および活性 GLP-1 の AUC0-t

化合物	設計	AUC0-t 全 (日·nmol)	AUC0-t 活性 GLP-1 (日·nmol)	活性/全 AUC 比
HS9_DSB7_V19A	10 mg/kg IV	1595	1216	0.76
HS9_DSB7_V19A	30 mg/kg IV	8702	6230	0.72
HS9_DSB7_V19A	60 mg/kg IV	24535	26494	1.08
PC9#2_Exe4	1 mg/kg IV	299	40	0.13

【０３５５】

ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａは、親分子ＰＣ９＃２＿Ｅｘｅ４と比べてより大きい活性／全ＡＵＣ比を呈し、これはＧＬＰ－１受容体での活性におけるラットでの改善されたインビボ安定性特性を示す。

【０３５６】

血清試料中の遊離ラットＰＣＳＫ９濃度の測定は、ＭＳＤ（登録商標）プラットフォームを用いるサンドイッチリガンド結合アッセイ法に基づいた。遊離ラットＰＣＳＫ９を、最初にＳｔａｎｄａｒｄ　Ｂｉｎｄ　ＭＳＤ（登録商標）プレートの炭素表面上に非特異的に吸着する抗ＰＣＳＫ９　ｍＡｂ　ＨＳ９を用いて捕捉した。Ａｂｃａｍ製の抗ＰＣＳＫ９抗体（製品番号ａｂ１２５２５１）を、社内でＭＳＤ（登録商標）ＳＵＬＦＯ－ＴＡＧ（商標）を用いて標識し、検出試薬として用いた。次にプレートを、ＭＳＤ（登録商標）Ｓｅｃｔｏｒ　Ｉｍａｇｅｒ　６０００（ＳＩ６０００）装置を用いて読み取った。

【０３５７】

ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９ＡのラットＰＣＳＫ９への経時的会合を、ラット血清試料中の遊離抗原の濃度を測定することによって評価した。３つの投与群（１０、３０および６０ｍｇ／ｋｇ）におけるデータは、表２６および図３８に示す。

【０３５８】

【表７８】

表 26: ラット血漿試料中の遊離抗原の経時的濃度

10 mg/kg IV		30 mg/kg IV		60 mg/kg IV	
時間 (h)	平均遊離ラット [PCSK9] (ng/mL)	時間 (h)	平均遊離ラット [PCSK9] (ng/mL)	時間 (h)	平均遊離ラット [PCSK9] (ng/mL)
0	837.2	0	741.8	0	688.5
0.5	LLOQ 未満	0.5	125.8	0.5	LLOQ 未満
6	26.7	24	LLOQ 未満	24	LLOQ 未満
24	74.1	48	LLOQ 未満	72	LLOQ 未満
48	162.5	96	LLOQ 未満	168	LLOQ 未満
96	301.0	168	70.9	336	45.4
168	374.7	240	130.3	504	135.8

【０３５９】
ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａは、ラットＰＣＳＫ９を、すべての試験用量で９０％未満に抑制することができるが、抑制の持続時間は用量依存性である。遊離ラットＰＣＳＫ９は、ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａが１０、３０および６０ｍｇ／ｋｇで投与されるとき、注射から各々６時間、１６８時間および３３６時間経過後に再び検出可能である。
【０３６０】
実施例３０　単回皮下投与後の抗ＰＣＳＫ９抗体との融合物中のＧＬＰ－１類似体ペプチドのラットでの薬物動態学および薬力学
ＣＤラットにおける６０ｍｇ／ｋｇでの単回皮下ボーラス後のＧＬＰ－１類似体ペプチド抗体融合物ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａについての薬物動態試験を、投与の経路ならびに化合物曝露およびインビボ安定性に対するその潜在的な影響を比較するため、実施した。
【０３６１】
融合分子を、１．５ｍＬ／ｋｇの処方計画を用いて４０ｍｇ／ｍＬで注射した。血液試料を、投与前－６時間－２４時間－４８時間－９６時間－１６８時間および２４０時間経過後に採取した。
【０３６２】
血清試料中の全ヒトＩｇＧ１抗体の濃度および活性ＧＬＰ－１化合物の濃度ならびに遊離ラットＰＣＳＫ９抗原の濃度を、実施例４および実施例２９に記載のように測定した。
【０３６３】
ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａにおける全および活性化合物ならびに遊離ラットＰＣＳＫ９濃度を図３９に示す。約１０００ｎＭの最大化合物濃度が、注射後４８時間～９６時間の間に認められた。遊離ラットＰＣＳＫ９の濃度は、化合物注射後、アッセイの定量の下限未満に急激に低下しており、１６８時間後に再び検出することができる。
【０３６４】
実施例２９に記載の単回静脈内用量注射からのデータを用いて予測をモデリングするため、全および活性化合物の双方における曲線下面積（ＡＵＣ）を算出し、比較した（表２７）。吸収フラクションおよび吸収速度を各々、７５％および０．３d^{-1}に設定した。
【０３６５】

【表７９】

表 27: 融合分子 HS9_DSB7_V19A の単回皮下注射後の曲線下面積の算出値および予測値

	SC データ 60mg/kg	IV データを用いた予測値
曝露 AUC0-t (日 nmol)	7815	8103
活性 GLP-1 AUC0-t (日 nmol)	5796	5739
活性/曝露 AUC 比	0.74	0.71

【０３６６】
６０ｍｇ／ｋｇでの単回皮下注射後のＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａの曝露および活性ＧＬＰ－１のＡＵＣは、単回静脈注射データを用いて予測した値と類似している。これは、注射の皮下経路が、静脈内投与経路と比べて、化合物のインビボ安定性に対して有意な影響を有しないことを示す。
【０３６７】
実施例３１　抗ＰＣＳＫ９抗体との融合物中のＧＬＰ－１類似体ペプチドの齧歯類での薬理学的抗糖尿病効果
ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａ融合分子のＧＬＰ－１類似体ペプチド部分の改変された性質により、抗糖尿病活性がインビボで保持されたことを確認するため、正常、肥満、および糖尿病マウスモデルにおけるいくつかの齧歯類薬理学試験を実施した。
【０３６８】
Ａ）Ｃ５７Ｂｌ６マウスにおける耐糖能に対するＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａの急性および亜急性効果
単回用量のＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａを、正常Ｃ５７Ｂｌ６マウスの皮下に１または５０ｍｇ／ｋｇのいずれかで投与した。融合分子のＧＬＰ－１類似体成分の有効性を、複数のグルコース負荷（経口グルコース負荷試験）により、ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａの投与から４、４８、および１６８時間後に評価した。融合されたＧＬＰ－１類似体ペプチドを含まない抗ＰＣＳＫ９　ｍＡｂ　ＨＳ９を耐糖能における負の対照として５０ｍｇ／ｋｇで投与した一方、リラグルチド（Ｖｉｃｔｏｚａ）およびＧＬＰ－１類似体－Ｆｃγ４融合物（デュラグルチドに類似）を各々、０．２および１ｍｇ／ｋｇで投与した。リラグルチドの半減期が短いことから、この化合物は各グルコース負荷の２時間前に投与した一方、ＧＬＰ－１類似体－Ｆｃγ４融合分子はＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａ試験化合物と同時に１回投与した。
【０３６９】
Ｔａｃｏｎｉｃ　Ｄｅｎｍａｒｋから得た雄Ｃ５７Ｂｌ６マウス３０匹を、実験前５日間気候順応させた。試験の１日目、動物を体重に基づいて５群に無作為化した。
【０３７０】
実験群は次の通りであった。
グループ１：ＧＬＰ－１類似体ペプチド成分を含まない抗ＰＣＳＫ９　ｍＡｂ　ＨＳ９（負の対照）－５０ｍｇ／ｋｇ皮下用量
グループ２：リラグルチド（正の対照）－０．２ｍｇ／ｋｇ皮下用量
グループ３：ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａ－１ｍｇ／ｋｇ皮下用量
グループ４：ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａ－５０ｍｇ／ｋｇ皮下用量
グループ５：ＧＬＰ－１類似体－Ｆｃγ４融合物－１ｍｇ／ｋｇ皮下用量
【０３７１】
融合分子のＧＬＰ－１類似体成分の有効性を投与後長期にわたって評価するため、３つの経口グルコース負荷試験（ＯＧＴＴ）を０日目、２日目および７日目に実施した。動物を、経口グルコース負荷前に４時間絶食させた。ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａ、不活性対照およびＧＬＰ－１類似体－Ｆｃγ４融合物の用量はいずれも、０日目、ＯＧＴＴの４時

間前に１回投与した。０日目、２日目および７日目、リラグルチド（正の対照）を各グルコース負荷の２時間前に投与した。ｔ＝０マウスで、全マウスに、経口グルコース負荷として２ｇ／ｋｇグルコースを負荷した。血糖は、ベースラインを確立するのにｔ＝－２４０分、－１２０分および０分に、またグルコース可動域に対する効果を監視するのにｔ＝１５分、３０分、６０分および１２０分に測定する。０日目、２日目および７日目のＯＧＴＴの結果を、図４０Ａ～Ｃ（０日目（Ａ）、２日目（Ｂ）、７日目（Ｃ））に示す。

【０３７２】

本試験では、５０ｍｇ／ｋｇでのＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａの単回皮下投与の、正常Ｃ５７Ｂｌ６マウスでの少なくとも７日間の耐糖能を改善する能力を確認する。

【０３７３】

ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａ融合分子のＧＬＰ－１類似体成分の有効性のさらなる測定として、すべての体重を－３日目から試験の終了にかけて１日１回記録した。１および２日目、５０ｍｇ／ｋｇでのＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａの単回皮下投与が、体重における一過性の低下を誘発した。経時的なパーセント体重変化を図４１に示す。

【０３７４】

Ｂ）Ｃ５７Ｂｌ６マウス－用量応答における耐糖能に対するＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａの急性および亜急性効果

用量応答効果を試験し、また正常Ｃ５７Ｂｌ６マウスでの耐糖能および体重低下に対するＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａの最大有効用量を測定するため、設計的に上記の試験に類似する試験を、以下の実験群および用量で実施した。

グループ１：ＧＬＰ－１類似体ペプチド成分を含まない抗ＰＣＳＫ９　ｍＡｂ　ＨＳ９（負の対照）－５０ｍｇ／ｋｇ皮下用量

グループ２：リラグルチド（正の対照）－０．２ｍｇ／ｋｇ皮下用量

グループ３：ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａ－１０ｍｇ／ｋｇ皮下用量

グループ４：ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａ－３０ｍｇ／ｋｇ皮下用量

グループ５：ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａ－６０ｍｇ／ｋｇ皮下用量

グループ６：ＧＬＰ－１類似体－Ｆｃγ４融合物－１ｍｇ／ｋｇ皮下用量

【０３７５】

－１日目、動物を、体重に基づいて、これら６グループに無作為化した（ｎ＝動物６匹／１群）。前述のとおり、ＯＧＴＴを０、２および７日目に実施し、血糖をｔ＝－２４０、－１２０、０、１５、３０、６０および１２０分に測定した。

【０３７６】

ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａの全部で３つの用量により、ＯＧＴＴを実施した全部で３つの時点で類似レベルの改善された耐糖能が得られた。図４２Ａ～Ｃは、この経口グルコース負荷試験からの結果を図示する（０日目（Ａ）、２日目（Ｂ）、７日目（Ｃ））。

【０３７７】

グルコースホメオスタシスの改善において認められる用量応答の欠如と対照的に、体重低下に対する明確な用量依存性効果が本試験で認められた。図４３。

【０３７８】

本実験モデルでは、ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａの単回１０ｍｇ／ｋｇ用量により、投与後７日目に実施したＯＧＴＴでグルコースホメオスタシスにおける最大有効レベルの改善が得られた一方、同用量は、試験中の任意の時点で体重低下に対して統計学的に有意な効果を有しなかった。

【０３７９】

Ｃ）糖尿病ｄｂ／ｄｂマウスモデルにおけるＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａの慢性代謝効果

糖尿病モデルにおけるいくつかの代謝パラメータに対するＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａの慢性ビボ有効性を確認するため、ｄｂ／ｄｂ（レプチン受容体欠損）マウスを、ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａの週投与の空腹時グルコース、耐糖能、体重低下および体重組成に対する効果を試験するために用いた。

【０３８０】

本試験では、発明者らは、ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａの慢性代謝効果を、皮下経路を介する週投与時に試験した。溶媒対照群および正の対照ＧＬＰ－１類似体－Ｆｃγ４融合分子を隔週に皮下投与した。投与操作の数を本試験における全動物に一致させるため、ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａの週用量を受ける群は、他の動物が溶媒（負の対照）または正の対照ＧＬＰ－１類似体－Ｆｃγ４融合分子のいずれかの２週用量を受けた日に溶媒の投与を受けた。

【０３８１】

Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ，Ｉｔａｌｙから得た雄ｄｂ／ｄｂマウス６０匹は、一次的に体重およびグリコシル化ヘモグロビン（ＨｂＡ１ｃ）について、また二次的に４時間空腹時血糖について無作為化した。これらの動物は、次のように５群（ｎ＝１２）に無作為化した。

グループ１：溶媒対照群（リン酸塩緩衝生理食塩水）－隔週（ＢＩＷ）の皮下投与

グループ２：ＧＬＰ－１類似体－Ｆｃγ４融合物（正の対照）－１ｍｇ／ｋｇ皮下用量・隔週の皮下投与

グループ３：ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａ－３０ｍｇ／ｋｇ皮下用量－週１回（ＱＷ）

グループ４：ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａ－１０ｍｇ／ｋｇ皮下用量－週１回（ＱＷ）

グループ５：ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａ－３ｍｇ／ｋｇ皮下用量－週１回（ＱＷ）

【０３８２】

慢性試験は、初期投与後２８日間実施した。ＢＩＷ群の最終投与は試験２４日目である一方、ＱＷ群の最終投与は試験２１日目であった。本試験の主要な有効性エンドポイントは、体重、空腹時血糖、および耐糖能である。

【０３８３】

体重は、治療期間中、３週毎に測定した。

【０３８４】

４時間空腹時血糖は、週１回、投与から約２４時間後に測定した。

【０３８５】

耐糖能は、試験２２日目、投与から約２４時間後、腹腔内グルコース負荷試験（ＩＰＧＴＴ）により測定した。動物は、１ｇ／ｋｇグルコースボーラスの投与前の４時間、絶食させた。血糖は、ｔ＝０、１５、３０、６０、１２０、および１８０分に測定した。

【０３８６】

本試験における体重低下は、正の対照ＧＬＰ－１類似体－Ｆｃγ４融合分子群における１時点を除いて有意でなかった。ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａの全部で３つの用量は、２８日の試験過程でのいずれの時刻でも有意な体重低下を生じなかった。図４４。

【０３８７】

１週間のＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａは、溶媒対照と比べると、４時間空腹時血糖において用量依存性の低下を示した。図４５。

【０３８８】

毎週投与したＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａは、試験２２日目、ＩＰＧＴＴによる評価として、耐糖能における用量依存性の改善を示した。図４６。

【０３８９】

Ｄ）食餌誘発性肥満（ＤＩＯ）マウスモデルにおける耐糖能に対する単回用量ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａの急性効果

ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａの単回用量を、食餌誘発性肥満（ＤＩＯ）マウスの皮下に０．１、１または１０ｍｇ／ｋｇで投与した。融合分子のＧＬＰ－１類似体成分の有効性を、ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａの投与から４および１６８時間後、別々のグルコース負荷（腹腔内グルコース負荷試験）により評価した。融合されたＧＬＰ－１類似体ペプチドを含まない抗ＰＣＳＫ９　ｍＡｂ　ＨＳ９を、耐糖能に対する効果における負の対照として１０ｍｇ／ｋｇで１回投与した。正の対照として、先行実験で用いたＧＬＰ－１類似体－Ｆｃγ４融合物（デュラグルチドに類似）を、隔週に（ＢＩＷ）１ｍｇ／ｋｇで投与した。正の対照ＧＬＰ－１類似体－Ｆｃγ４融合物の投与計画について模擬実験を行うため

、負の対照群およびＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａ実験群における全動物に、溶媒をＢＩＷに投与した。試験持続時間は、初回投与後の２１日間であった。一次エンドポイントは、０日目（投与から４時間後）および７日目でのＩＰＧＴＴにおける耐糖能に対する効果であった。二次エンドポイントは、体重低下であった。

【０３９０】

試験開始前、１５週間の６０％高脂肪食に対する２１週齢雄ＤＩＯマウス５０匹を、Ｊａｃｋｓｏｎ　ｌａｂｓから得た（ＪＡＸ：３８００５０）。試験開始直前、動物を、体重に基づいて５群に無作為化した。

【０３９１】

実験群（ｎ＝１０匹／群）は次の通りであった。

グループ１：ＧＬＰ－１類似体ペプチド成分を含まない抗ＰＣＳＫ９　ｍＡｂ　ＨＳ９（負の対照）－１０ｍｇ／ｋｇ皮下用量－単回用量

グループ２：ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａ－０．１ｍｇ／ｋｇ皮下用量－単回用量

グループ３：ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａ－１ｍｇ／ｋｇ皮下用量_単回用量

グループ４：ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａ－１０ｍｇ／ｋｇ皮下用量－単回用量

グループ５：ＧＬＰ－１類似体－Ｆｃγ４融合物－１ｍｇ／ｋｇ皮下用量・隔週投与（ＢＩＷ）

【０３９２】

融合分子のＧＬＰ－１類似体成分の有効性を投与後長期にわたって評価するため、２つの腹腔内グルコース負荷試験（ＩＰＧＴＴ）を０および７日目に実施した。動物を、ＩＰグルコース負荷前に６時間絶食させた。ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａ、不活性対照およびＧＬＰ－１類似体－Ｆｃγ４融合物の全部で３つの用量を、０日目、ＯＧＴＴの４時間前に１回投与した。ＧＬＰ－１類似体－Ｆｃγ４融合物を、０、３、７、１０、１４、１７および２１日目に投与した。０日目、全群にＩＰグルコース負荷の４時間前に試験化合物を投与する一方、７日目、ＩＰグルコース負荷の４時間前にＧＬＰ－１類似体－Ｆｃγ４融合物を投与し、他方、他のすべての群に溶媒のみを投与した。ＩＰＧＴＴを実施した各日においては、ｔ＝０マウスで、全マウスに、ＩＰグルコース負荷として１．５ｇ／ｋｇグルコースを負荷した。血糖は、ベースラインを確立するのにｔ＝－２４０分および０分に、またグルコース可動域に対する効果を監視するのにｔ＝１５分、３０分、４５分、６０分、９０分および１２０分に測定した。

【０３９３】

０および７日目のＩＰＧＴＴの結果を図４７Ａ～Ｂに示す。

【０３９４】

体重に対するＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９ＡのＧＬＰ－１成分の効果を評価するため、試験の全過程にかけて全動物を毎日秤量した。体重に対する効果を図４８Ａ～Ｂに示す。

【０３９５】

Ｅ）ＤＩＯマウスでの体重に対するＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａの複数回用量の効果

体重低下における用量－応答を確立するため、ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａを、週１回（ＱＷ）、３、１０および３０ｍｇ／ｋｇで食餌誘発性肥満マウスの皮下に投与した。試験の持続時間は２８日であり、一次エンドポイントは体重低下であった。血糖パラメータの二次評価は、分析を含み、試験の全過程を通じての供給グルコースおよび終了時空腹時血糖の測定を含んだ。ＤＩＯおよびｄｂ／ｄｂマウス双方における我々の先行試験と同様、ＧＬＰ－１類似体－Ｆｃγ４融合物を、グルコース調節および体重低下の双方における正の対照として、１ｍｇ／ｋｇで隔週に（ＢＩＷ）皮下投与した。

【０３９６】

試験開始前、１５週間の６０％高脂肪食に対する２１週齢雄ＤＩＯマウスを、Ｊａｃｋｓｏｎ　ｌａｂｓから得た（ＪＡＸ：３８００５０）。試験開始直前、動物を、体重に基づいて５群に無作為化した（ｎ＝動物８匹／群）。

【０３９７】

実験群（ｎ＝８匹／群）は次の通りであった。

グループ１：溶媒対照
グループ２：ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａ－３ｍｇ／ｋｇ皮下用量－週１回（ＱＷ）
グループ３：ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａ－１０ｍｇ／ｋｇ皮下用量－週１回（ＱＷ）
グループ４：ＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９Ａ－３０ｍｇ／ｋｇ皮下用量－週１回（ＱＷ）
グループ５：ＧＬＰ－１類似体－Ｆｃγ４融合物－１ｍｇ／ｋｇ皮下用量・隔週投与（ＢＩＷ）

【０３９８】

体重に対するＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９ＡのＧＬＰ－１成分の効果（本試験の一次エンドポイント）を評価するため、試験の全過程にかけて全動物を毎日秤量した。体重に対する効果を図４９に示す。

【０３９９】

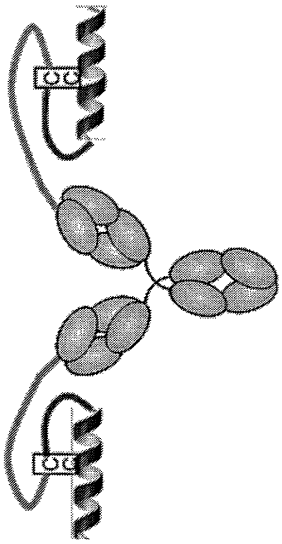
二次エンドポイントとして、また週用量設定において血糖調節に対するＨＳ９＿ＤＳＢ７＿Ｖ１９ＡのＧＬＰ－１成分の効果を評価するため、供給グルコースを０、７、１１、１４、２１および２６日目に測定し、空腹時グルコースを試験終了（２８日目）直前に測定した。結果を図５０Ａ～Ｂに示す。

【０４００】

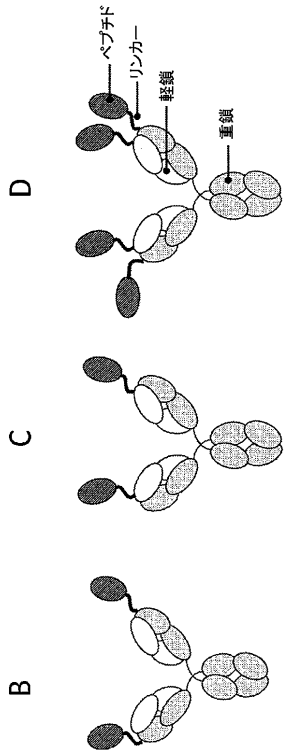
等価物

前述の明細書は、当業者が実施形態を実施することを可能にするのに十分であると考えられる。前述の説明および実施例は、特定の実施形態を詳述し、本発明者によって考察されたベストモードを記述する。しかし、前述が本文中でいかに詳細に見え得るとしても、実施形態が多くの方法で実行され、かつ特許請求の範囲がその任意の等価物を含み得ることは理解されるであろう。

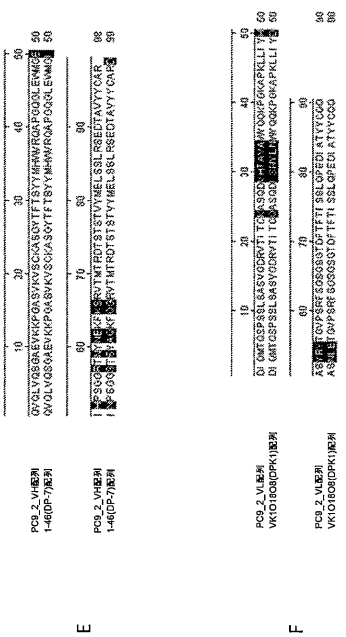
【図１Ａ】



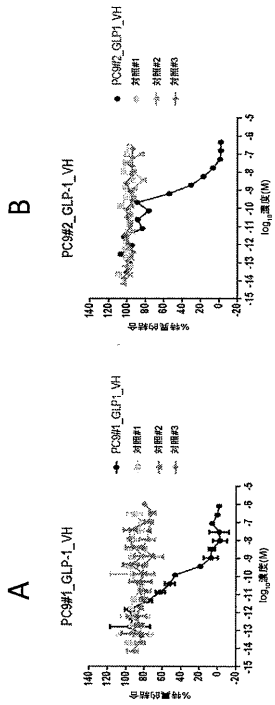
【図１Ｂ－Ｄ】



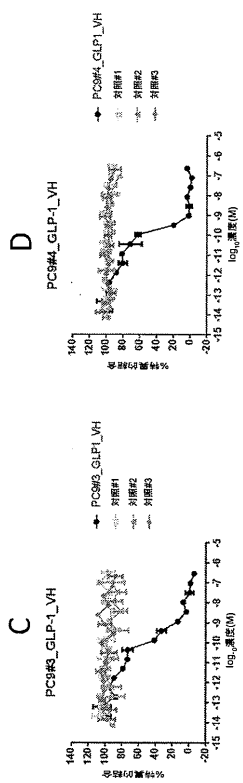
【図１Ｅ－Ｆ】



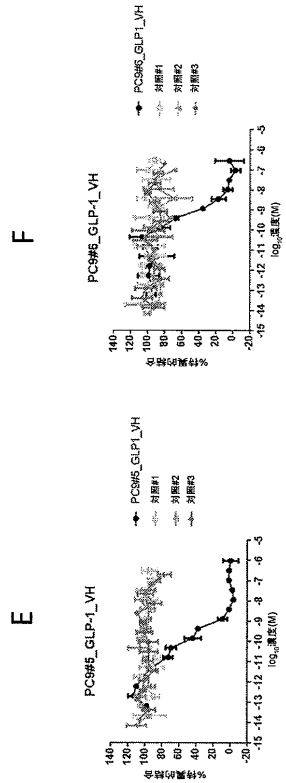
【図２Ａ－Ｂ】



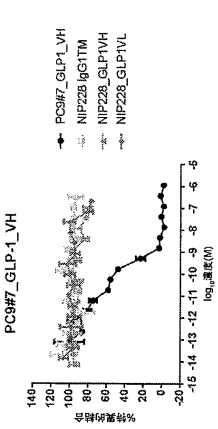
【図２Ｃ－Ｄ】



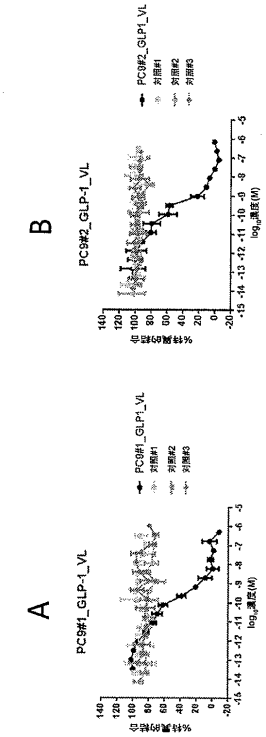
【図２Ｅ－Ｆ】



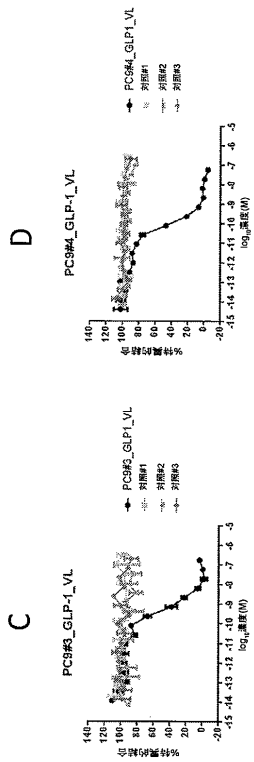
【図２Ｇ】



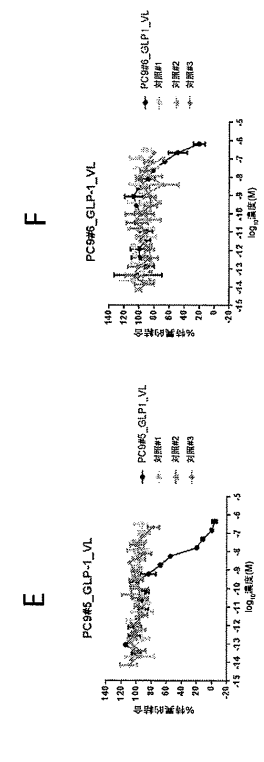
【図３Ａ－Ｂ】



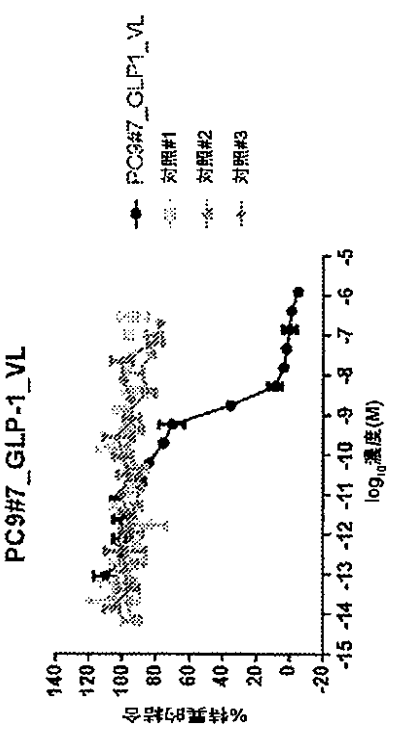
【図３Ｃ－Ｄ】



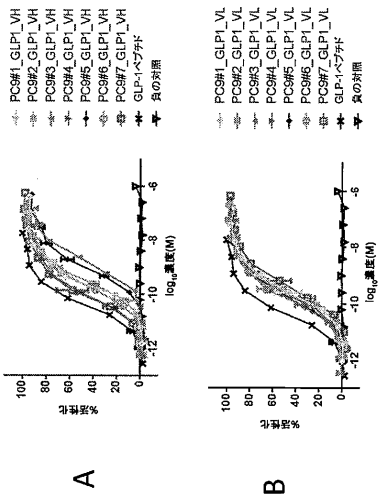
【図３Ｅ－Ｆ】



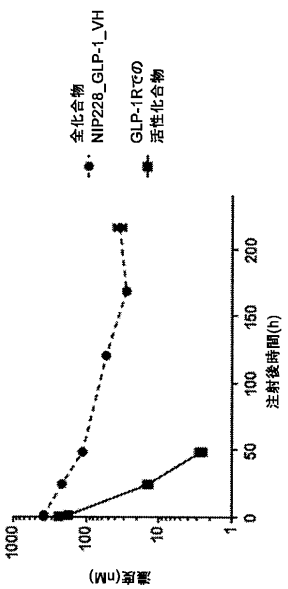
【図３Ｇ】



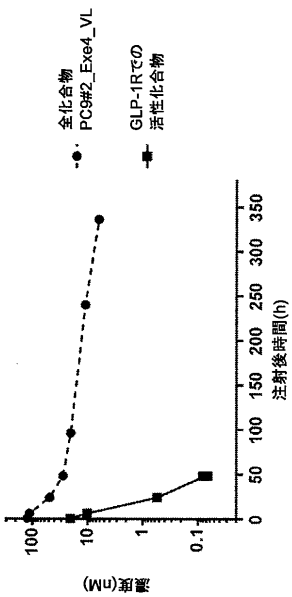
【図４Ａ－Ｂ】



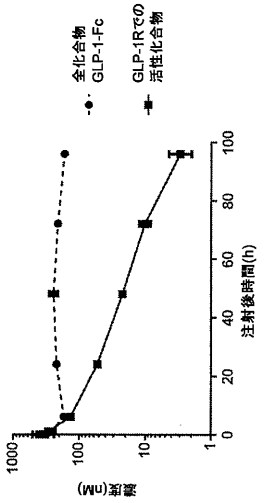
【図５Ａ】



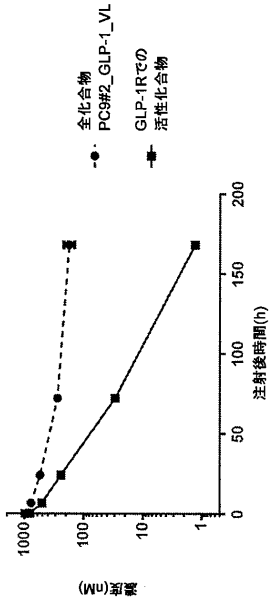
【図５Ｂ】



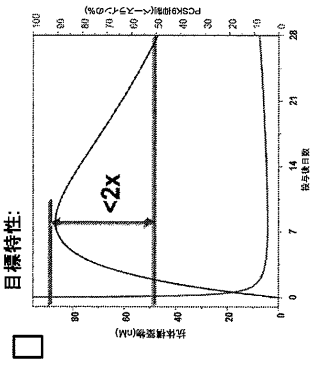
【図５Ｃ】



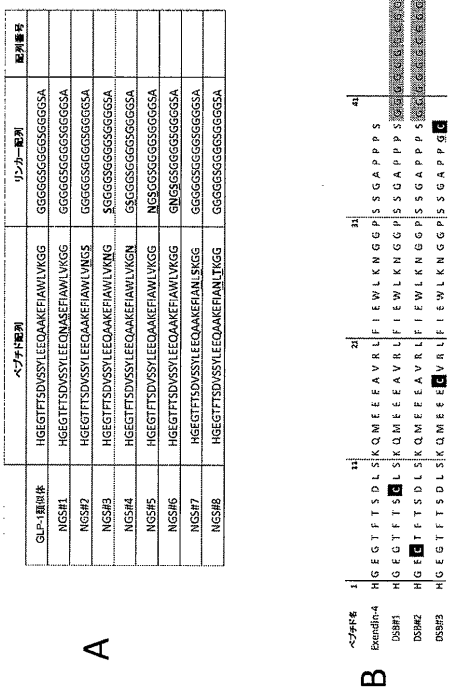
【図５Ｄ】



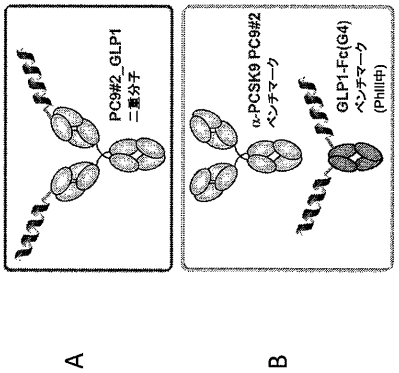
【図６】



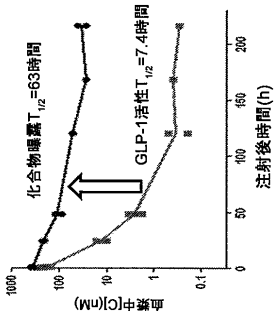
【図７Ａ－Ｂ】



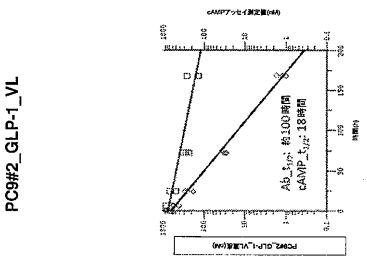
【図８Ａ－Ｂ】



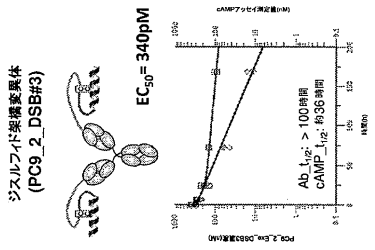
【図９】



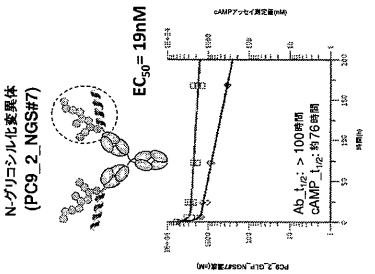
【図１０】



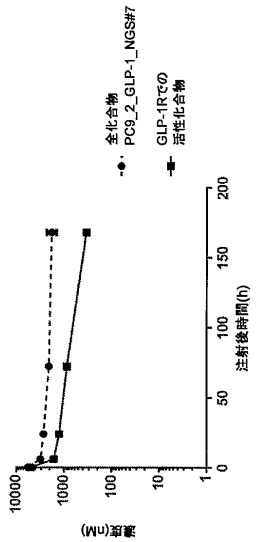
【図１１】



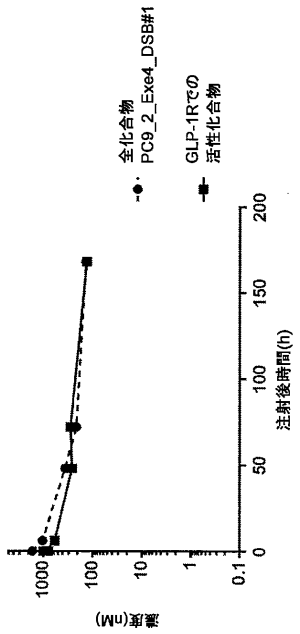
【図１２】



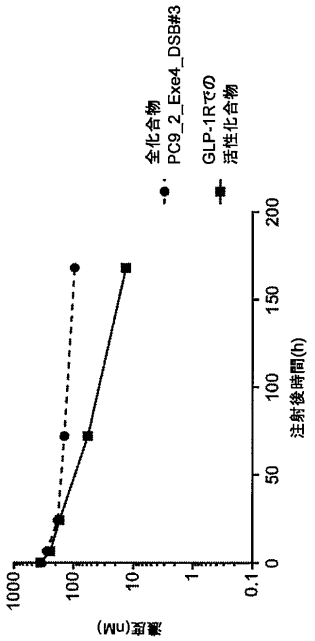
【図１３Ａ】



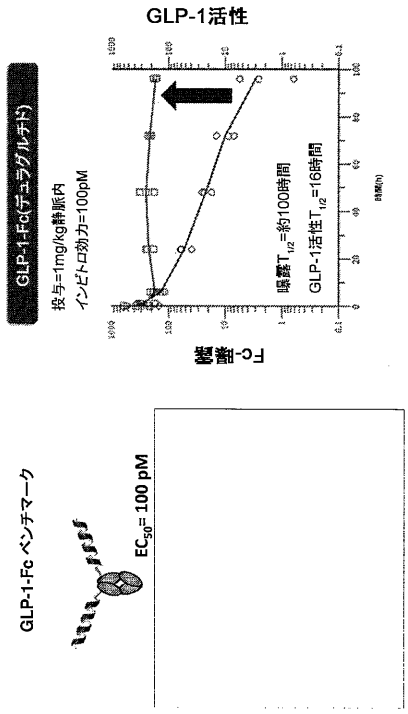
【図１３Ｂ】



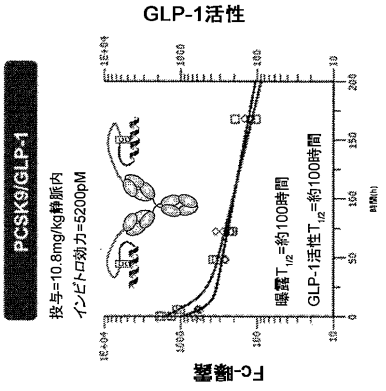
【図１３Ｃ】



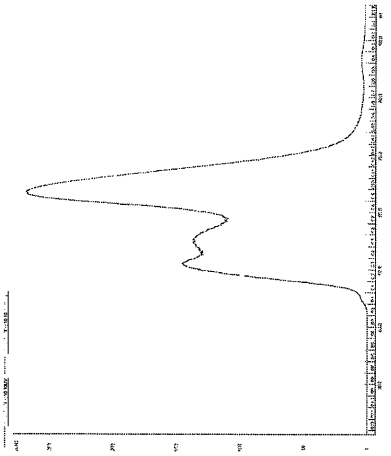
【図１４Ａ】



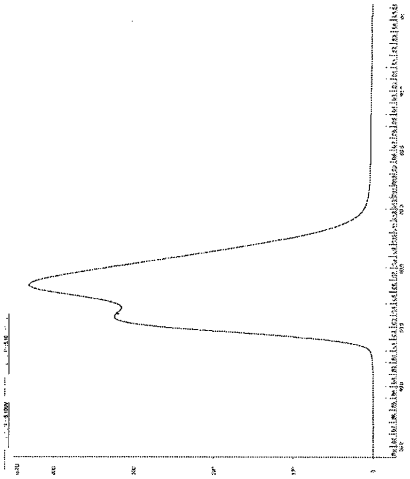
【図１４Ｂ】



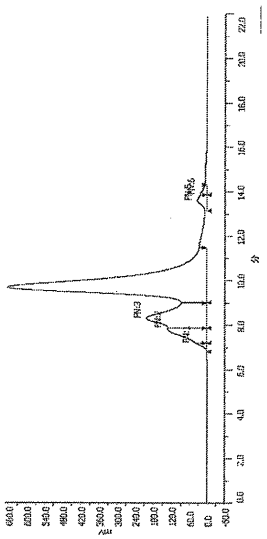
【図１５Ａ】



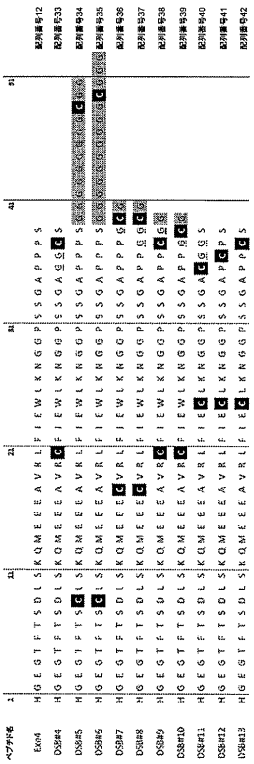
【図１５Ｂ】



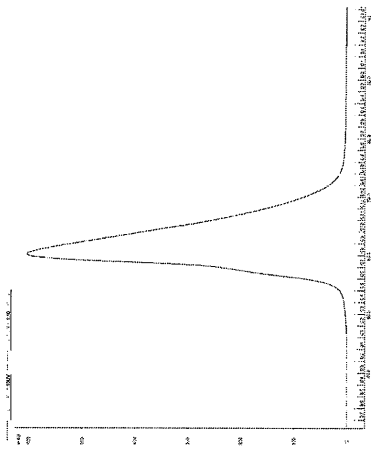
【図１６】



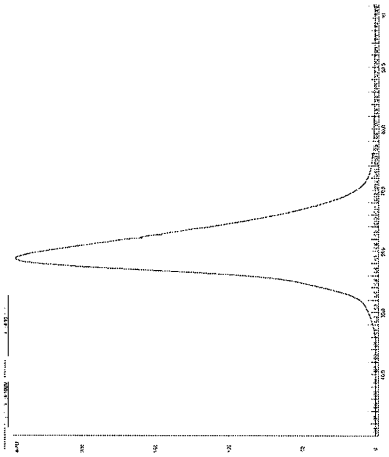
【図１７】



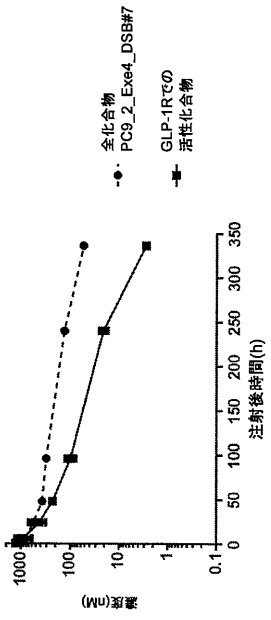
【図１８】



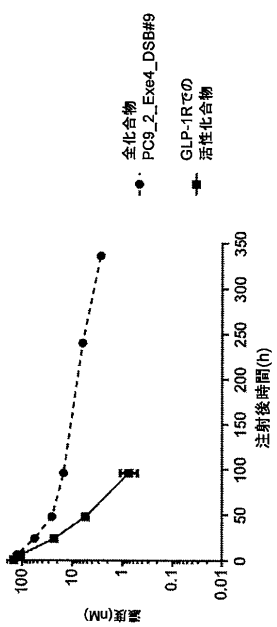
【図１９】



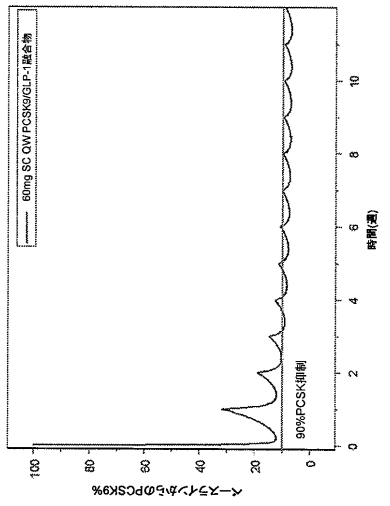
【図２０】



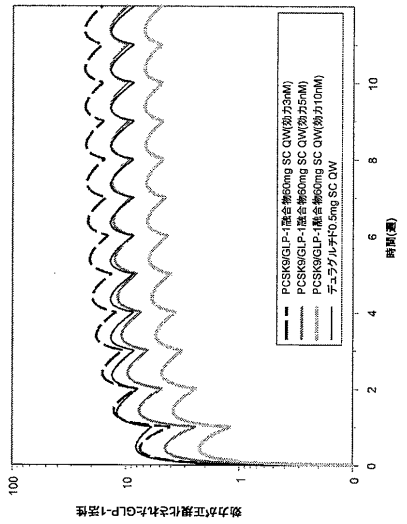
【図２１】



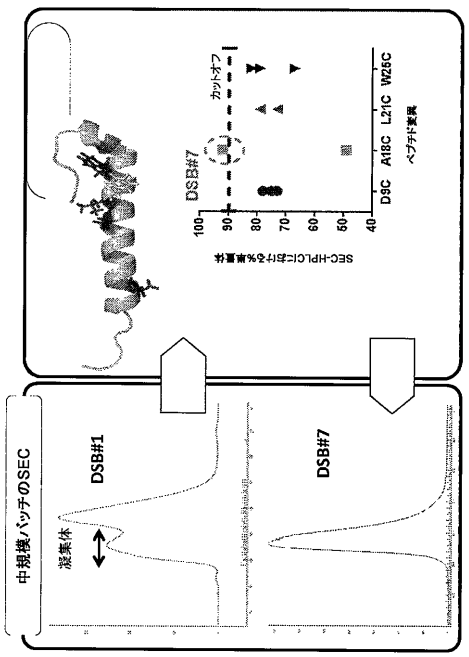
【図２２Ａ】



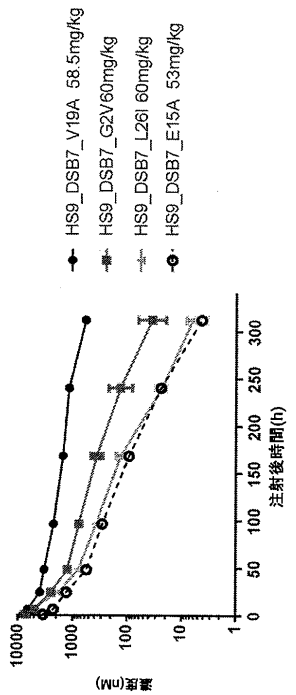
【図２２Ｂ】



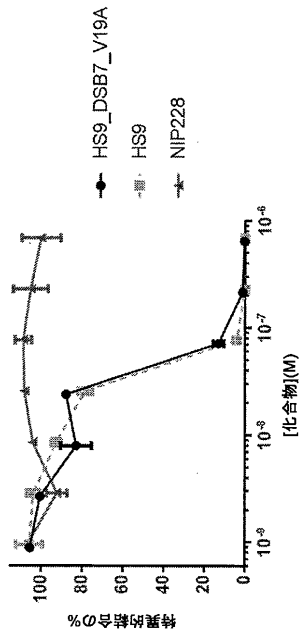
【図２３】



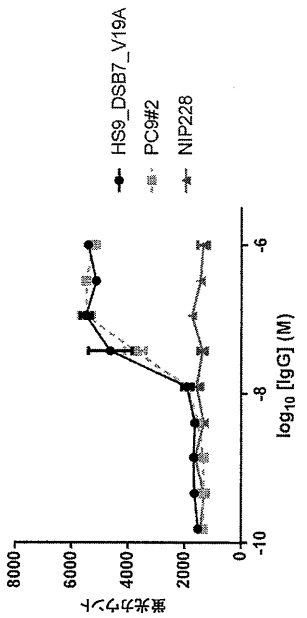
【図２４】



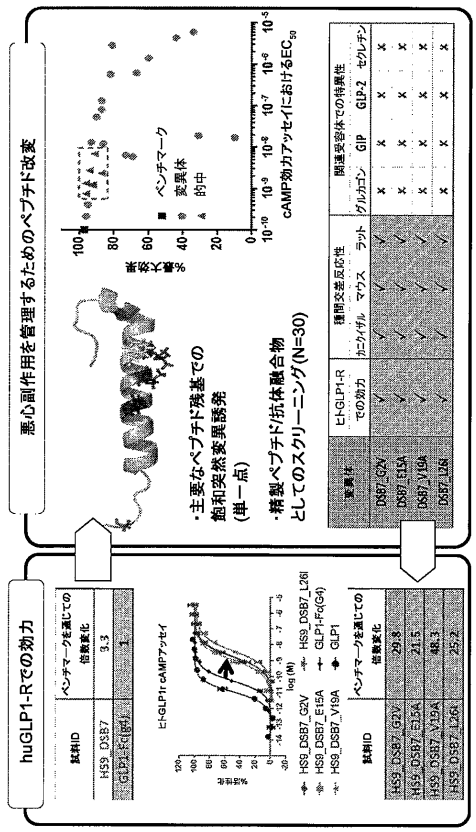
【図２５】



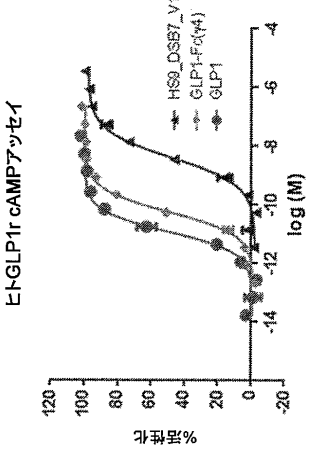
【図２６】



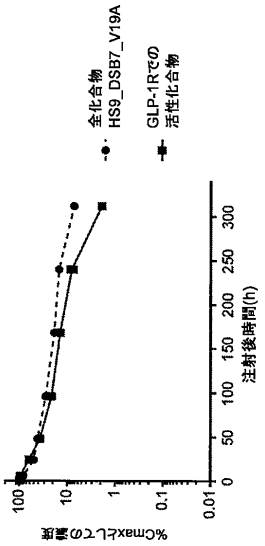
【図２７】



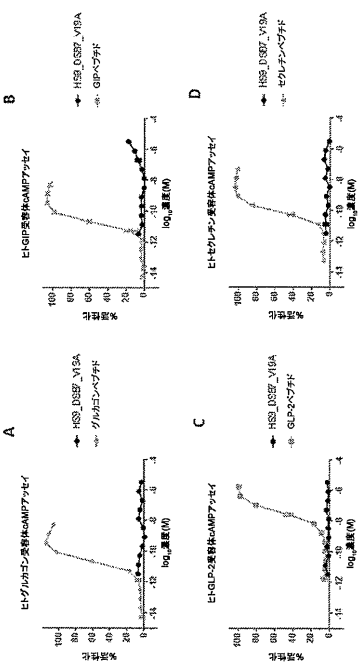
【図２８Ａ】



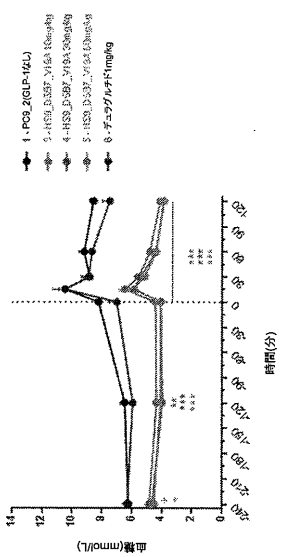
【図２８Ｂ】



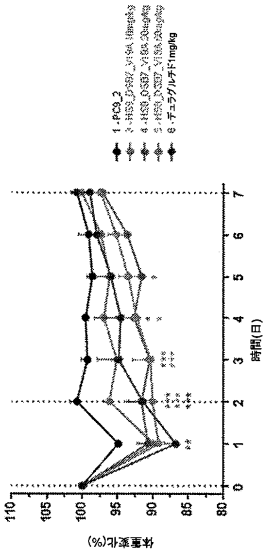
【図２９Ａ－Ｄ】



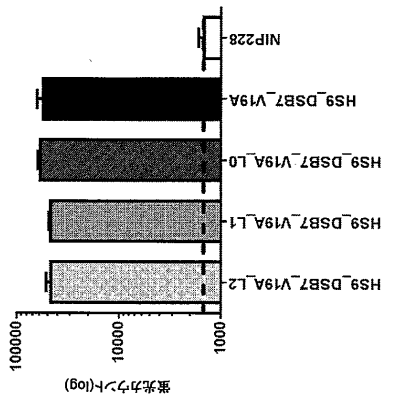
【図３０Ａ】



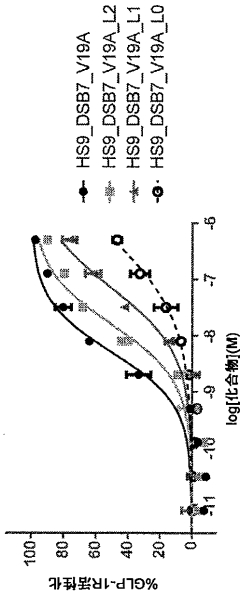
【図３０Ｂ】



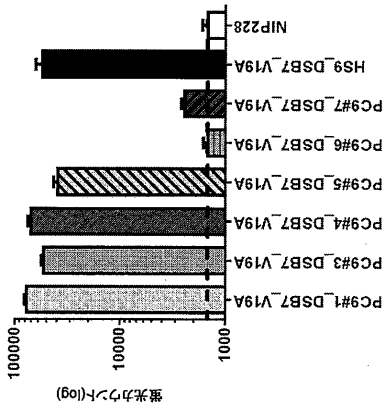
【図３１】



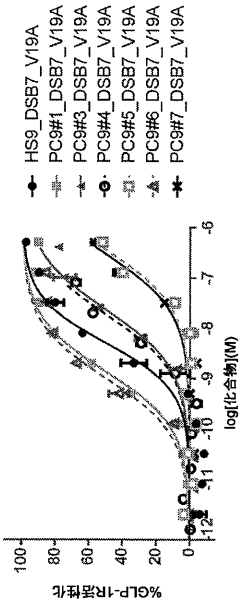
【図３２】



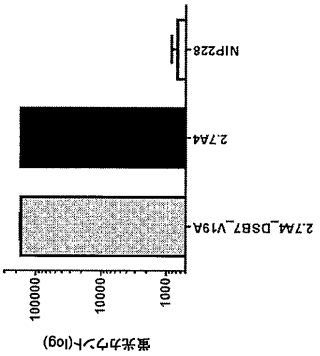
【図３３】



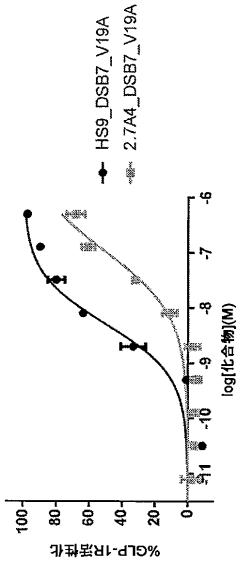
【図３４】



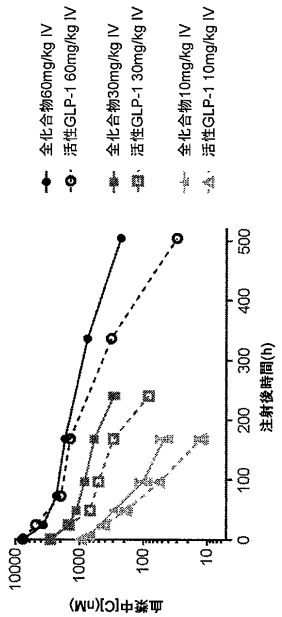
【図３５】



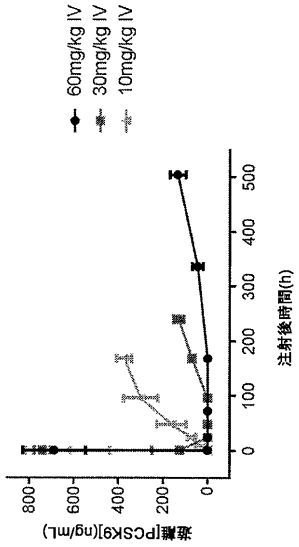
【図３６】



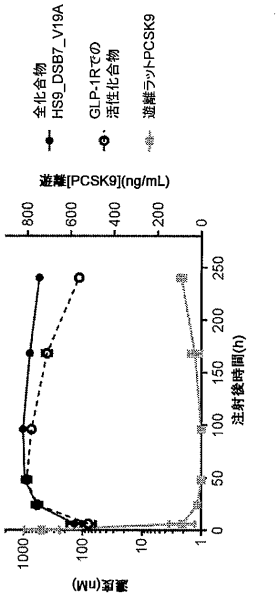
【図３７】



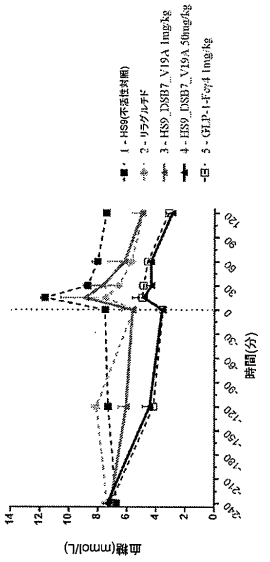
【図３８】



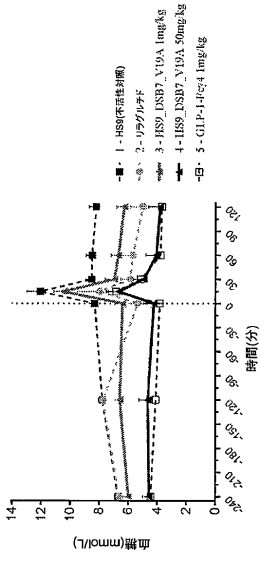
【図３９】



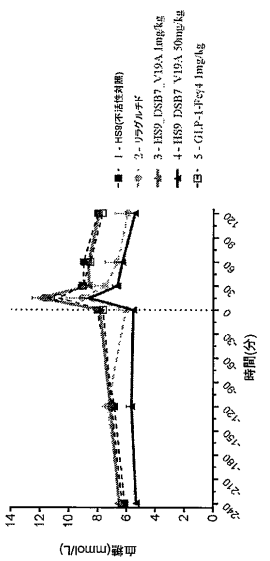
【図４０Ａ】



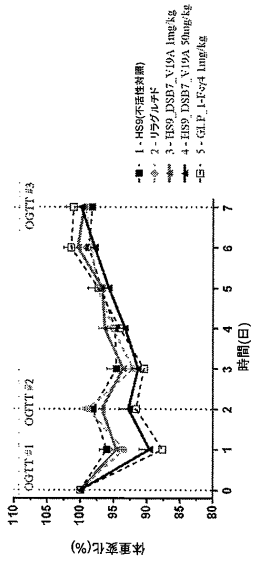
【図４０Ｂ】



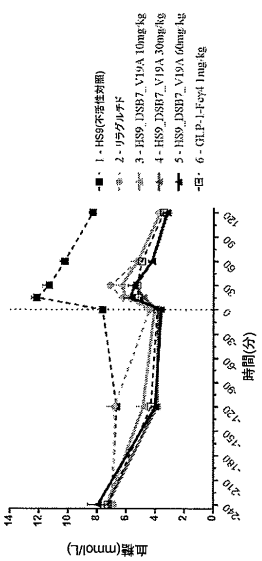
【図４０Ｃ】



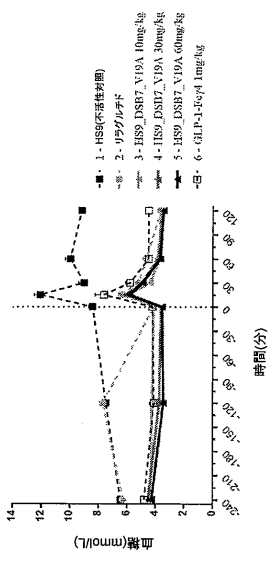
【図４１】



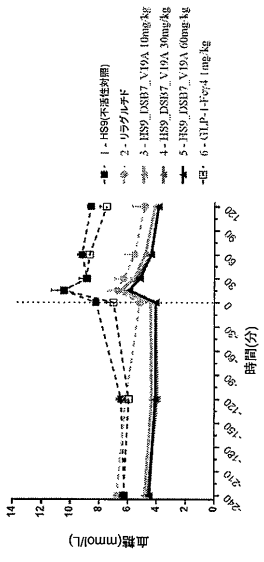
【図４２Ａ】



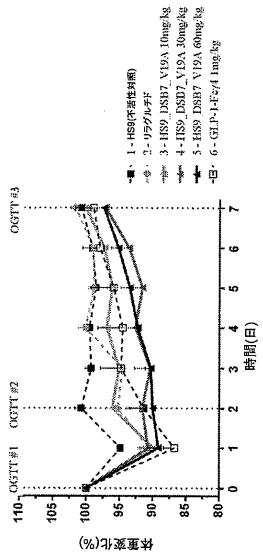
【図４２Ｂ】



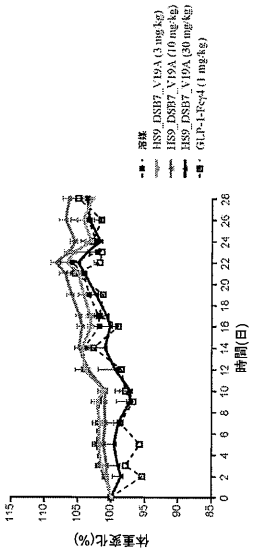
【図４２Ｃ】



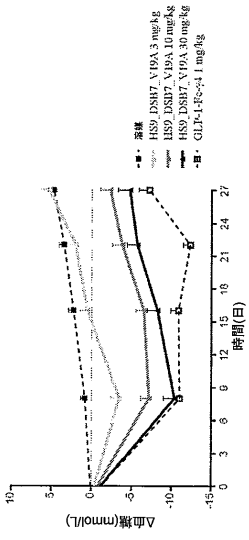
【図４３】



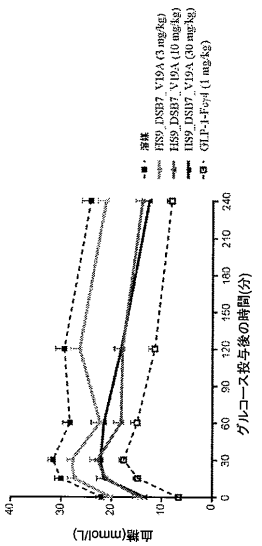
【図４４】



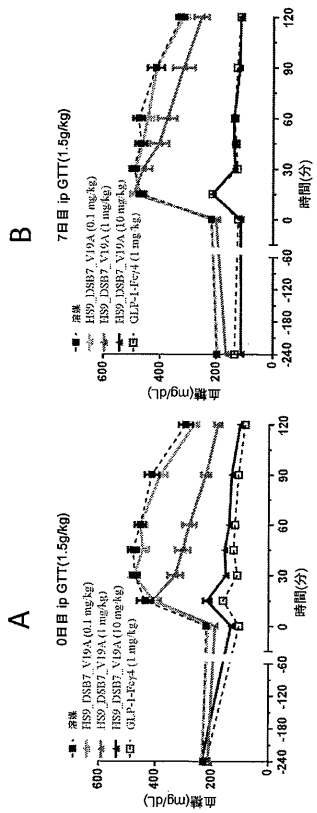
【図４５】



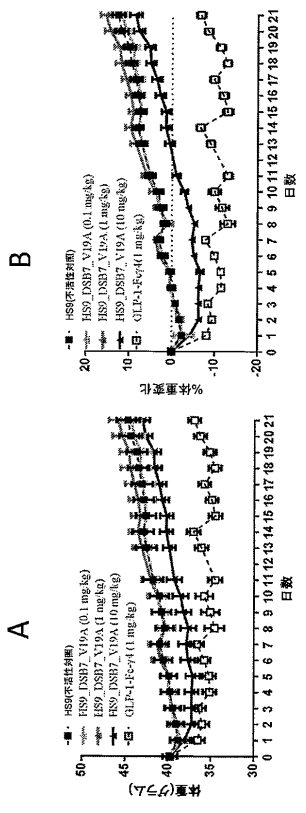
【図４６】



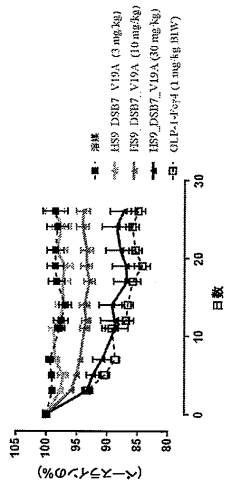
【図４７Ａ－Ｂ】



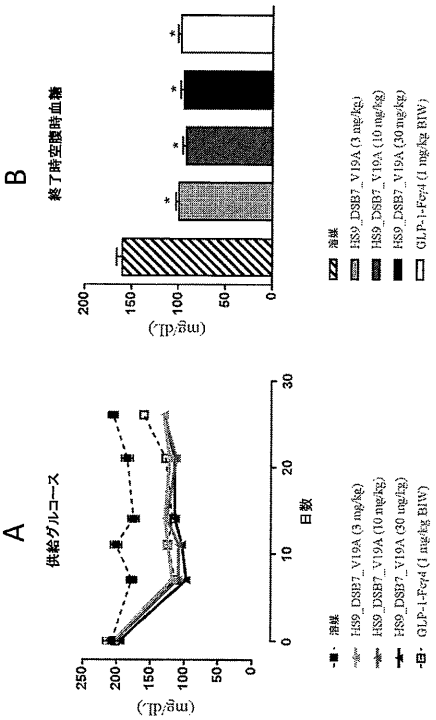
【図４８Ａ－Ｂ】



【図４９】



【図５０Ａ－Ｂ】



【配列表】
2017512457000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 15/16911

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - C07K 16/40, C07K 16/46, A61K 38/26, A61P 3/10 (2015.01)
CPC - C07K 16/40, C07K 2319/30, A61K 38/26, A61K 2039/505
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC(8) - C07K 16/40, C07K 16/46, A61K 38/26, A61P 3/10 (2015.01)
CPC - C07K 16/40, C07K 2319/30, A61K 38/26, A61K 2039/505

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched (keyword limited; terms below)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
PatBase, Google Patents, Google Scholar
Search terms: proprotein convertase subtilisin kexin type 9, PCSK9, GLP-1, GLP1, glucagon-like peptide-1, fusion, fusion protein, conjugate, fused, link, chimeric, diabetes

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y — A	US 2013/0071390 A1 (STADHEIM et al.) 21 March 2013 (21.03.2013) para [0078], [0079], [0137], [0162], [0164], [0168], [0170]	1-3, 25-27 — 4-6, 9-19
Y — A	US 2013/0302399 A1 (FELDHAUS et al.) 14 November 2013 (14.11.2013) para [0011], [0077]	1-3, 25-27 — 4-6, 9-19
Y	US 2011/0034373 A1 (COSKUN et al.) 10 February 2011 (10.02.2011) para [0012], [0013], [0022], [0051]; SEQ ID NO: 28	25-27
Y	US 2013/0330336 A1 (DARLING et al.) 12 December 2013 (12.12.2013) para [0008]; SEQ ID NO: 11; SQ ID NO: 14	26, 27/26
A	CN 101665799 A (YANG et al.) 10 March 2010 (10.03.2010) SEQ ID NO: 3	4-6, 9-19
A	US 2012/0238496 A1 (FAN et al.) 20 September 2012 (20.09.2012) SEQ ID NO: 58	4-6, 9-19
A	US 2010/0009904 A1 (LV et al.) 14 January 2010 (14.01.2010) SEQ ID NO: 6	4-6, 9-19

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
09 June 2015 (09.06.2015)	07 JUL 2015
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 15/16911

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 7, 8, 20-24, 28-40
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

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

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

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

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

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
C12N	***1/15***	***(2006.01)***	C12N	1/15		4H045
C12N	***1/19***	***(2006.01)***	C12N	1/19		
C12N	***1/21***	***(2006.01)***	C12N	1/21		
C12N	***5/10***	***(2006.01)***	C12N	5/10		
A61P	***3/10***	***(2006.01)***	A61P	3/10		
A61P	***43/00***	***(2006.01)***	A61P	43/00	121	
A61K	***38/26***	***(2006.01)***	A61K	37/28		
A61K	***39/395***	***(2006.01)***	A61K	39/395	D	
A61K	***47/50***	***(2017.01)***	A61K	39/395	N	
A61P	***3/08***	***(2006.01)***	A61K	39/395	C	
A61P	***3/06***	***(2006.01)***	A61K	39/395	L	
A61P	***3/04***	***(2006.01)***	A61K	47/48		
C12P	***21/08***	***(2006.01)***	A61P	3/08		
A61K	*47/42*	*(2017.01)*	A61P	3/06		
			A61P	3/04		
			C12P	21/08		
			A61K	47/42		

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

(74)代理人 100122389
弁理士 新井 栄一
(74)代理人 100111741
弁理士 田中 夏夫
(74)代理人 100169971
弁理士 菊田 尚子
(74)代理人 100196966
弁理士 植田 渉
(72)発明者 セレステ，アンソニー
アメリカ合衆国 ２０８７８ メリーランド州，ゲイサーズバーグ，ワン メディミューン ウェイ，メディミューン，エルエルシー
(72)発明者 チョドルジュ，マチュー
イギリス国 シービー２１ ６ジーエイチ ケンブリッジ，グランタ パーク，ミルステイン ビルディング，メディミューン，リミテッド
(72)発明者 ブキャナン，アンドリュー
イギリス国 シービー２１ ６ジーエイチ ケンブリッジ，グランタ パーク，ミルステイン ビルディング，メディミューン，リミテッド
(72)発明者 ロンディノーネ，クリスティーナ
アメリカ合衆国 ２０８７８ メリーランド州，ゲイサーズバーグ，ワン メディミューン ウェイ，メディミューン，エルエルシー
(72)発明者 グリムズビー，ジョセフ

アメリカ合衆国　２０８７８　メリーランド州，ゲイサーズバーグ，ワン　メディミューン　ウェイ，メディミューン，エルエルシー
(72)発明者　ラヴン，ピーター
イギリス国　シービー２１　６ジーエイチ　ケンブリッジ，グランタ　パーク，ミルステイン　ビルディング，メディミューン，リミテッド
(72)発明者　シーマン，ジョナサン
イギリス国　シービー２１　６ジーエイチ　ケンブリッジ，グランタ　パーク，ミルステイン　ビルディング，メディミューン，リミテッド
(72)発明者　フェアマン，デヴィッド
イギリス国　シービー５　８イーエイチ　ケンブリッジ，ディットン　ウォーク，アビー　ガーデンズ，２

Ｆターム(参考) 4B064 AG15 AG27 CA19 CC24 DA01
4B065 AA01X AA57X AA72X AA90X AB01 BA02 CA24 CA44
4C076 AA95 BB14 BB16 CC21 CC41 EE41 EE59
4C084 AA02 AA03 AA07 BA02 BA08 BA19 BA23 BA26 BA41 BA42
DB35 MA02 NA05 NA14 ZA701 ZC331 ZC351 ZC751
4C085 AA13 AA14 AA22 AA24 AA25 CC01 CC21 CC23 DD62 EE01
EE03 GG02 GG04
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA41 CA40 DA30 DA76 EA27 FA74