

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7219265号

(P7219265)

(45)発行日 令和5年2月7日(2023.2.7)

(24)登録日 令和5年1月30日(2023.1.30)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/13 (2006.01)

C 1 2 N 15/13

C 0 7 K 16/18 (2006.01)

C 0 7 K 16/18

Z N A

C 0 7 K 16/46 (2006.01)

C 0 7 K 16/46

C 1 2 N 15/63 (2006.01)

C 1 2 N 15/63

Z

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

請求項の数 18 (全62頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2020-511350(P2020-511350)

(86)(22)出願日 平成30年8月21日(2018.8.21)

(65)公表番号 特表2020-536492(P2020-536492  
A)

(43)公表日 令和2年12月17日(2020.12.17)

(86)国際出願番号 PCT/US2018/047144

(87)国際公開番号 WO2019/040390

(87)国際公開日 平成31年2月28日(2019.2.28)

審査請求日 令和3年6月3日(2021.6.3)

(31)優先権主張番号 62/658,111

(32)優先日 平成30年4月16日(2018.4.16)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/549,523

(32)優先日 平成29年8月24日(2017.8.24)

最終頁に続く

(73)特許権者 520032206

フェインズ セラピューティクス, イン

コーポレーテッド

アメリカ合衆国 9 2 1 2 1 カリフォル

ニア州, サン ディエゴ, スイート 4 0

0, ソレント パレー ロード 1 1 5 3 5

(74)代理人 110002572

弁理士法人平木国際特許事務所

(72)発明者 ワン, ミンガン

アメリカ合衆国 9 2 1 3 0 カリフォル

ニア州, サンディエゴ, アリーダ ロウ

6 1 0 4

(72)発明者 ゾウ, フィ

アメリカ合衆国 7 5 2 0 5 テキサス州

, ダラス, ピンクリー アベニュー 3 4

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗アペリン抗体及びその使用

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

(1)それぞれ、配列番号41、42、43、101、102、及び103;

(2)それぞれ、配列番号44、45、46、104、105、及び106;又は

(3)それぞれ、配列番号47、48、49、107、108、及び109;

のポリペプチド配列を有する重鎖相補性決定領域1(HCDR1)、HCDR2、HCDR3、軽鎖相補性決定領域1(LCDR1)、LCDR2、及びLCDR3を含み、アペリン、好ましくはヒトアペリンに特異的に結合する、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片。

## 【請求項 2】

a. 配列番号1と少なくとも95%同一であるポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号2と少なくとも95%同一であるポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域;

b. 配列番号3と少なくとも95%同一であるポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号4と少なくとも95%同一であるポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域;

c. 配列番号5と少なくとも95%同一であるポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号6と少なくとも95%同一であるポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域;

d. 配列番号213と少なくとも95%同一であるポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号216と少なくとも95%同一であるポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域;又は

e. 配列番号214と少なくとも95%同一であるポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号216と少なくとも95%同一であるポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域

10

20

を含む、請求項1に記載の単離されたモノクローナル抗体又は抗原結合断片。

【請求項3】

- a. 配列番号213のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号215のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域;
  - b. 配列番号1のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号2のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域;
  - c. 配列番号3のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号4のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域;
  - d. 配列番号5のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号6のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域;
  - e. 配列番号211のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号215のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域;
  - f. 配列番号212のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号215のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域;
  - g. 配列番号214のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号215のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域;
  - h. 配列番号213のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号216のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域;
  - i. 配列番号214のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号216のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域;
  - j. 配列番号217のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号219のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域;又は
  - k. 配列番号218のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号220のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域
- を含む、単離されたモノクローナル抗体又は抗原結合断片。

【請求項4】

配列番号188のアミノ酸配列であるエピトープに特異的に結合し、アペリンに対する単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片の結合が、アペリン受容体を通じたアペリンにより媒介されるシグナル伝達を阻害し、アペリン活性を中和する、請求項1～3のいずれか一項に記載の単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片。

【請求項5】

アペリン-13の残基11、12、若しくは13の側鎖のいずれか1つが配列番号188のアミノ酸配列を含むエピトープへの結合に必要とされる、請求項4に記載の単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片。

【請求項6】

アペリン活性を阻害する、請求項4に記載の単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片であって、アペリン-13、ピロ-アペリン-13、アペリン-17、アペリン-36、アペリン-55、及び/又はアペリン-13と同一のC末端を有するアペリンの他の形態に結合することが可能であってもよい、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片。

【請求項7】

キメラである、及び/又はヒトの若しくはヒト化されたものである、請求項1～6のいずれか一項に記載の単離されたモノクローナル抗体又は抗原結合断片。

【請求項8】

請求項1～7のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体又はその抗原結合断片を含む、二重特異性抗体。

【請求項9】

請求項1～7のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体又は抗原結合断片をコードする単離された核酸。

【請求項10】

請求項9に記載の単離された核酸を含むベクター。

## 【請求項 1 1】

請求項10に記載のベクターを含む宿主細胞。

## 【請求項 1 2】

請求項1～7のいずれか一項に記載の単離されたモノクローナル抗体又は抗原結合断片、及び薬学的に許容される担体を含む、医薬組成物。

## 【請求項 1 3】

請求項12に記載の医薬組成物であって、それを必要とする対象において、アペリン受容体へのアペリンの結合を阻止するための、及び/又は、それを必要とする対象において糖尿病性網膜症(DR)、加齢黄斑変性症(AMD)、糖尿病性黄斑浮腫(DME)、網膜静脈閉塞症(RVO)後の黄斑浮腫、網膜変性症、近視性脈絡膜新生血管(mCNV)、糖尿病性腎症、慢性腎疾患(CKD)、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)、肝硬変、プラーク血管新生、虹彩ルベオシス、血管新生緑内障、角膜血管新生(CNV)、未熟児網膜症(ROP)、網膜症、黄斑変性症、卵巣過剰刺激症候群(OHSS)、子宮出血、子宮内膜症、子宮内膜増殖症、子宮平滑筋腫、腺筋腫、組織線維症、及びがんからなる群から選択される疾患を処置するための、医薬組成物であり、前記がんは、肺がん、胃がん、結腸がん、肝細胞がん、腎細胞がん、膀胱尿路上皮がん、胆管がん、転移性黒色腫、乳がん、卵巣がん、子宮頸がん、頭頸部がん、膵臓がん、神経膠腫、神経膠芽腫、及び他の固形腫瘍からなる群から選択される固形腫瘍であってもよい、医薬組成物。

10

## 【請求項 1 4】

前記疾患が、がんであり、医薬組成物が、抗がん剤をさらに含み、抗がん剤は抗VEGF剤であってもよく、抗VEGF剤はアバスタチン、ペバシズマブバイオシミラー剤、VEGFR1ブロッカー、及びVEGFR2ブロッカーからなる群から選択されてもよい、請求項13に記載の医薬組成物。

20

## 【請求項 1 5】

対象におけるアペリンのレベルを決定する方法であって、

a.対象由来の試料を請求項1～7のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体又は抗原結合断片と接触させるステップ;及び

b.対象におけるアペリンのレベルを決定するステップを含む方法。

## 【請求項 1 6】

試料が、組織試料又は血液試料であり、組織試料はがん組織試料であってもよい、請求項15に記載の方法。

30

## 【請求項 1 7】

請求項1～7のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体又は抗原結合断片を生産する方法であって、前記モノクローナル抗体又は抗原結合断片を産生する条件下で、前記モノクローナル抗体又は抗原結合断片をコードする核酸を含む細胞を培養するステップ、及び細胞又は培養物から抗体又は抗原結合断片を回収するステップを含む、方法。

## 【請求項 1 8】

請求項1～7のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体又は抗原結合断片を含む医薬組成物を生産する方法であって、前記モノクローナル抗体又は抗原結合断片を、薬学的に許容される担体と配合して、医薬組成物を得るステップを含む、方法。

40

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

## 関連出願の相互参照

この出願は、2017年8月24日に出願された米国仮出願第62/549,523号;2017年10月31日に出願された米国仮出願第62/579,287号;2018年4月12日に出願された米国仮出願第62/656,586号;及び2018年4月16日に出願された米国仮出願第62/658,111号に対する優先権を主張する。それぞれの開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

## 【0002】

50

この発明は、モノクローナル抗アペリン抗体、該抗体をコードする核酸及び発現ベクター、該ベクターを含有する組換え細胞、並びに該抗体を含む組成物に関する。該抗体を製する方法、血液及び/又は組織中のアペリンのレベルを測定する際に診断目的で該抗体を使用する方法、並びに糖尿病性網膜症(DR;増殖性糖尿病性網膜症(PDR)及び非増殖性糖尿病性網膜症(NPDR)を含む)、加齢黄斑変性症(AMD)、糖尿病性黄斑浮腫(DME)、網膜静脈閉塞症(RVO)後の黄斑浮腫、網膜変性症、近視性脈絡膜新生血管(mCNV)、糖尿病性腎症、慢性腎疾患(CKD)、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)、肝硬変、プラーク血管新生、虹彩ルベオシス、血管新生緑内障、角膜血管新生(CNV)、未熟児網膜症(ROP)、網膜症、黄斑変性症、卵巣過剰刺激症候群(OHSS)、子宮出血、子宮内膜症、子宮内膜増殖症及びがん、子宮平滑筋腫、腺筋腫、がん(例えば、固形腫瘍及び悪性血液疾患)、線維症(例えば、病理学的及び生理学的線維症、腎線維症、心筋線維症、肝線維症、並びに肺線維症)、及び/又は関連する合併症を含む疾患を処置するために該抗体を使用する方法も提供される。

#### 【0003】

電子的に提出した配列表への言及

この出願は、ファイル名が「689204.1WO Sequence Listing」、作成日が2018年8月15日の、88kbのサイズを有するASCIIフォーマットの配列表として、EFS-Webにより電子的に提出される配列表を含む。EFS-Webにより提出される配列表は本明細書の一部であり、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

#### 【背景技術】

#### 【0004】

アペリンは、いくつかの内因性形態を有する天然に存在するペプチドである。アペリンは、最初に、77アミノ酸前駆体、すなわち、プレプロアペリンとして生産され、それがタンパク質分解処理されて、アペリン-36(すなわち、アペリン36)(アペリン前駆体のC末端の36アミノ酸を含有する)、アペリン-17(すなわち、アペリン17)(プレプロアペリンのC末端の17アミノ酸を含有する;K17F)及びアペリン-13(すなわち、アペリン13)(プレプロアペリンのC末端の13アミノ酸を含有する)となる(Tatemotoら、Biochem Biophys Res Commun. 251(2):471~6頁(1998);Habataら、Biochim Biophys Acta 1452(1):25~35頁(1999);Leeら、J. Neurochem. 74(1):34~41頁(2000))。77アミノ酸前駆体に由来する他の形態のアペリンも報告されている(Mesminら、J Proteome Res. 10(11):5222~31頁(2011);Shinら、Biochim Biophys Acta. 1861(8):1901~12頁(2017))。アペリン13のN末端のグルタミン残基はピログルタミル化されて、アペリン13のピログルタミル形態(pE13F)を生じ得る。アペリンは、アペリン受容体APJ(アペリンR、AGTRL1、又はAPLNRとも称される)の内因性リガンドである。APJは、Gタンパク質共役型受容体遺伝子ファミリーのメンバーである。アペリンは、APJに結合し、APJを活性化し、広範な下流のシグナル伝達事象を誘発し、これらの事象には、フォルスコリン誘導性のcAMP産生の下方調節並びに細胞外シグナル調節キナーゼ(ERK)、Akt、及びp70 S6キナーゼのリン酸化の促進が含まれる(De Mota, Neuroendocrinology 72(6):400~7頁(2000);Liら、Front Biosci. 13:3786~92頁(2008);Masriら、Biochem Biophys Res Commun. 290(1):539~45頁(2002);Liuら、Biochem Biophys Res Commun. 468(4):617~21頁(2015);Masriら、FASEB J. 18(15):1909~11頁(2004);O'Carrollら、J Endocrinol. 219(1):R13~35頁(2013))。K17FとpE13Fは両方とも、APJ受容体の内在化を誘導できる。K17Fは、APJに対してpE13Fよりも高い親和性を有し、一方、アペリン-36は、pE13Fと同様の親和性を有する(Iturriozら、J Biol Chem. 285(42):32627~37頁(2010);Medhurstら、J Neurochem. 84(5):1162~72頁(2003))。アペリンとAPJは両方とも、中枢神経系及び末梢組織において発現される(O'Carrollら、J Endocrinol. 219(1):R13~35頁(2013))。アペリン/APJ軸は、心収縮性、血圧、心血管緊張、組織血管形成、水分ホメオスタシス、胃腸管(gastrointestinal track)生理、血管平滑筋細胞(VSMC)及び他の細胞型の増殖、ヒト臍帯静脈内皮細胞への単球の接着、心筋梗塞後の心修復、並びにいくつかの組織又は器官における病理学的線維症を含む多くの生理学的機能を調節する(O'Carrollら、J Endocrinol. 219(1):R13~35頁(2013))。

## 【 0 0 0 5 】

アペリンは、血管形成及び内皮細胞(EC)の細胞増殖において重要な役割を果たす(Kalinら、Dev Biol. 305(2):599～614頁(2007);Kasaiら、Biochem Biophys Res Commun. 325(2):395～400頁(2004))。アペリンとAPJは両方とも、血管形成の際に新たに発達する血管のEC上で発現され(Kidoyaら、EMBO J. 27(3):522～34頁(2008);Saint-Geniezら、Mech Dev. 110(1-2):183～6頁(2002))、アペリンの発現は低酸素症によって誘導される(Kasaiら、Arterioscler Thromb Vasc Biol. 30(11):2182～7頁(2010))。アペリンノックアウトマウスは、網膜の血管形成及び眼の発生が損なわれており(Kasaiら、Arterioscler Thromb Vasc Biol. 28(10):1717～22頁(2008))、このことは、網膜発生におけるアペリンの重要な役割を示唆している。アペリンの硝子体内濃度は、糖尿病を有さない個体におけるよりも、増殖性糖尿病性網膜症(PDR)を有する患者においてより高い(Taoら、Invest Ophthalmol Vis Sci. 51(8):4237～42頁(2010))。アペリンのレベルの上昇は、強力な血管形成効果及び増殖効果を発揮し、糖尿病及び他の眼疾患の網膜において病理学的変化をもたらす得る。アペリン中和モノクローナル抗体(mAb)は、アペリンに特異的に結合し、アペリン受容体APJを発現する細胞上でその生物学的活性を阻止することができる;これは、中和活性を有する抗アペリンmAbとも呼ばれ得る。アペリン中和mAbなどの薬剤を使用して、糖尿病性網膜症(DR)、加齢黄斑変性症(AMD)、及び糖尿病性黄斑浮腫(DME)を処置することができる。アペリン/APJ軸は、VEGF経路と協調的に作用することができ、アペリン中和mAbとラニビズマブ(Lucentis(登録商標))などのVEGFブロッカーとの組合せは、DR、DME、AMD、及び/又は他の眼疾患を有する患者において、相加的又はさらには相乗的治療効果を有し得る。アペリンとVEGFの両方を標的とする二重特異性抗体は同様の効果を有することができるであろう。

10

20

## 【 0 0 0 6 】

アペリン-13は、乳がん、肝細胞がん、リンパ腺がん、肺がん及び卵巣がんを含む様々な種類のがんにおける腫瘍増殖を促進することが示されている。アペリン及びAPJ発現は、様々な腫瘍において上方調節される(Sorliら、Oncogene. 26(55):7692～9頁(2007);Picaultら、Eur J Cancer. 50(3):663～74頁(2014);Zuurbierら、Oncotarget. 8(26):42949～42961頁(2017);Mutoら、Anticancer Res. 34(10):5313～20頁(2014))。アペリンは、その受容体APJの結合及び活性化を介した腫瘍新血管形成及び増殖の有効な活性化因子である(Sorliら、Drug Discov Today. 11(23～24):1100～6頁(2006))。よって、アペリン中和mAbによるアペリン作用の阻止を用いて、アペリン/APJ軸が腫瘍部位近辺のがん細胞成長及び/又は血管形成において役割を果たす様々ながんを処置し得る。アペリン中和mAbをアバスタチン(Avastin(登録商標))又は他の抗VEGF及び/若しくは抗血管形成剤と組み合わせ、がん処置における相加的效果又はさらには相乗的效果を実現し得る。さらに、アペリン中和mAbを他の抗がん剤、例えば、化学療法、腫瘍成長の阻害又はがん免疫療法のためのものなどと組み合わせ、より高い有効性を実現し得る。

30

## 【 0 0 0 7 】

アペリンは、肝疾患にも関連する。アペリンは、硬変ラットの活性化肝星細胞(HSC)において過剰発現され、これらの動物の血管形成と線維症の両方において重要な役割を果たす(Principeら、Hepatology. 48(4):1193～201頁(2008))。アペリンは、ヒト硬変肝のHSCにおいても過剰発現され(Melgar-Lesmesら、Endocrinology. 151(11):5306～14頁(2010))、APJもまた同様である(Yokomoriら、J Gastroenterol. 46(2):222～31頁(2011))。一方、低酸素症と炎症促進因子は両方とも、ヒトHSC及び肝細胞においてAPJの発現を上方調節する。肝硬変を有する患者は、アペリンの血清中レベルが増加している。さらに、血清中のアペリンのレベルは、慢性肝疾患の重篤度に関連する。これらの知見は、アペリンが非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)、肝線維症及び肝硬変などの肝疾患の発症機序において重要な役割を果たし得ることを示唆している。アペリン中和mAbをこれらの肝疾患の処置に使用することができるであろう。

40

## 【 0 0 0 8 】

アペリンは、糸球体内皮細胞の透過性を増強し、有足細胞の機能不全を誘導することに

50

よって、げっ歯類の糖尿病性腎症を促進することが示されている(Guoら、J Cell Mol Med. 19(9):2273~85頁(2015))。アペリンは、有足細胞におけるオートファジーを阻害することによって、糖尿病性腎症の進行に関与することも見出されている(Liuら、Cell Death Dis. 8(8):e3006頁(2017))。よって、アペリン中和mAbを、糖尿病性腎症及び慢性腎疾患の処置において使用することができる。

#### 【発明の概要】

##### 【0009】

一般的な一態様では、本発明は、アペリンに特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片に関する。

##### 【0010】

- (1)それぞれ、配列番号168、169、170、171、102、及び172;
- (2)それぞれ、配列番号50、51、52、110、111、及び112;
- (3)それぞれ、配列番号173、174、175、176、114、及び115;
- (4)それぞれ、配列番号68、177、178、128、129、及び130;
- (5)それぞれ、配列番号74、75、76、134、135、及び136;
- (6)それぞれ、配列番号179、78、180、137、138、及び139;
- (7)それぞれ、配列番号83、84、85、143、144、及び145;
- (8)それぞれ、配列番号86、87、88、146、147、及び148;
- (9)それぞれ、配列番号89、90、91、149、150、及び151;
- (10)それぞれ、配列番号92、93、94、152、153、及び154;
- (11)それぞれ、配列番号95、96、97、155、156、及び157;又は
- (12)それぞれ、配列番号98、99、100、158、159、及び160;

のポリペプチド配列を有する重鎖相補性決定領域1(HCDR1)、HCDR2、HCDR3、軽鎖相補性決定領域1(LCDR1)、LCDR2、及びLCDR3を含み、アペリン、好ましくはヒトアペリンに特異的に結合する、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片が提供される。配列番号168は、アミノ酸配列 $X_1NRX_2S$ で表され、ここで、 $X_1$ は、S又はTから選択されるアミノ酸であり、 $X_2$ は、M又はVから選択されるアミノ酸である。配列番号169は、アミノ酸配列 $SIGSSPWX_1ASWAX_2G$ で表され、ここで、 $X_1$ は、Y又はFから選択されるアミノ酸であり、 $X_2$ は、Q又はLから選択される。配列番号170は、アミノ酸配列 $GGYRPGX_1SX_2$ で表され、ここで、 $X_1$ は、A又はGから選択されるアミノ酸であり、 $X_2$ は、V又はIから選択されるアミノ酸である。配列番号171は、アミノ酸配列 $QSSQSVYDNDLX_1$ で表され、ここで、 $X_1$ は、A又はGから選択されるアミノ酸である。配列番号172は、アミノ酸配列 $AGGYX_1GDIYT$ で表され、ここで、 $X_1$ は、S又はNから選択されるアミノ酸である。配列番号173は、アミノ酸配列 $X_1YAX_2D$ で表され、ここで、 $X_1$ は、N又はSから選択されるアミノ酸であり、 $X_2$ は、M又はIから選択される。配列番号174は、アミノ酸配列 $VIAPNX_1X_2TX_3YPTWARG$ で表され、ここで、 $X_1$ は、R、G、又はHから選択されるアミノ酸であり; $X_2$ は、R、A、又はYから選択されるアミノ酸であり; $X_3$ は、Y又はCから選択されるアミノ酸である。配列番号175は、アミノ酸配列 $YPIX_1X_2GX_3NI$ で表され、ここで、 $X_1$ は、E又はDから選択されるアミノ酸であり; $X_2$ は、P、A、S、又はTから選択されるアミノ酸であり; $X_3$ は、A又はSから選択されるアミノ酸である。配列番号176は、アミノ酸配列 $QSSESVX_1X_2NNQLS$ で表され、ここで、 $X_1$ は、D又はGから選択されるアミノ酸であり、 $X_2$ は、Y、N、又はMから選択されるアミノ酸である。配列番号177は、アミノ酸配列 $VIAPSX_1TTYYPWTWAKG$ で表され、ここで、 $X_1$ は、G又はSから選択されるアミノ酸である。配列番号178は、アミノ酸配列 $YPIDPGSNX_1$ で表され、ここで、 $X_1$ は、I又はVから選択されるアミノ酸である。配列番号179は、アミノ酸配列 $X_1X_2AMD$ で表され、ここで、 $X_1$ は、N又はSから選択されるアミノ酸であり、 $X_2$ は、Y又はHから選択されるアミノ酸である。配列番号180は、アミノ酸配列 $YPIDX_1GANV$ で表され、ここで、 $X_1$ は、V又はAから選択されるアミノ酸である。

##### 【0011】

- a.配列番号1のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号2のポリペプチド

配列を有する軽鎖可変領域;

b. 配列番号3のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号4のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域;

c. 配列番号5のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号6のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域;

d. 配列番号7のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号8のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域;

e. 配列番号9のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号10のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域;

f. 配列番号11のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号12のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域;

10

g. 配列番号13のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号14のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域;

h. 配列番号15のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号16のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域;

i. 配列番号17のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号18のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域;

j. 配列番号19のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号20のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域;

k. 配列番号21のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号22のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域;

20

l. 配列番号23のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号24のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域;

m. 配列番号25のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号26のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域;

n. 配列番号27のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号28のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域;

o. 配列番号29のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号30のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域;

p. 配列番号31のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号32のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域;

30

q. 配列番号33のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号34のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域;

r. 配列番号35のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号36のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域;

s. 配列番号37のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号38のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域;又は

t. 配列番号39のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号40のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域

を含む単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片も提供される。

40

#### 【0012】

配列番号188のアミノ酸配列を含むエピトープに特異的に結合する、アペリンに対する単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片も提供される。単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片は、例えば、アペリン活性を阻害し得る。単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片は、例えば、ピロ-アペリン-13、アペリン-13、アペリン-17、アペリン-36、アペリン-55、及び/又はアペリン-13と同一のC末端を有するアペリンの他の形態に特異的に結合することができる。

#### 【0013】

配列番号204のアミノ酸配列を含むエピトープに特異的に結合する、アペリンに対する単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片も提供される。単離されたモノクロ

50

ーナル抗体又はその抗原結合断片は、例えば、アペリン活性を阻害し得る。単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片は、例えば、アペリン-13及びピロ-アペリン-13に特異的に結合し得る。

【0014】

ある特定の実施形態では、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片は、キメラである。

【0015】

ある特定の実施形態では、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片は、ヒトのものであるか又はヒト化されたものである。ある特定の実施形態では、ヒト化されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片は：

a. 配列番号211のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号215のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域；

b. 配列番号212のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号215のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域；

c. 配列番号213のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号215のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域；

d. 配列番号214のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号215のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域；

e. 配列番号213のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号216のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域；

f. 配列番号214のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号216のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域；

g. 配列番号217のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号219のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域；又は

h. 配列番号218のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号220のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域を含む。

【0016】

本明細書に開示されている本発明のモノクローナル抗体又はその抗原結合断片をコードする単離された核酸も提供される。

【0017】

本発明のモノクローナル抗体又はその抗原結合断片をコードする単離された核酸を含むベクターも提供される。

【0018】

本発明のモノクローナル抗体又はその抗原結合断片をコードする単離された核酸を含むベクターを含む宿主細胞も提供される。

【0019】

ある特定の実施形態では、本発明の単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物が提供される。

【0020】

それを必要とする対象において、アペリン受容体へのアペリンの結合を阻止する方法であって、本発明の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法も提供される。

【0021】

それを必要とする対象において、糖尿病性網膜症(DR)を処置する方法であって、本発明の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法も提供される。

【0022】

それを必要とする対象において、加齢黄斑変性症(AMD)を処置する方法であって、本発明の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法も提供される。

【0023】

それを必要とする対象において、糖尿病性黄斑浮腫(DME)を処置する方法であって、本

10

20

30

40

50



発明の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法も提供される。

【0024】

それを必要とする対象において、網膜静脈閉塞症(RVO)後の黄斑浮腫を処置する方法であって、本発明の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法も提供される。

【0025】

それを必要とする対象において、網膜変性症を処置する方法であって、本発明の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法も提供される。

【0026】

それを必要とする対象において、近視性脈絡膜新生血管(mCNV)を処置する方法であって、本発明の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法も提供される。

10

【0027】

それを必要とする対象において、糖尿病性腎症を処置する方法であって、本発明の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法も提供される。

【0028】

それを必要とする対象において、慢性腎疾患(CKD)を処置する方法であって、本発明の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法も提供される。

【0029】

それを必要とする対象において、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)を処置する方法であって、本発明の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法も提供される。

【0030】

それを必要とする対象において、組織線維症を処置する方法であって、本発明の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法も提供される。

20

【0031】

それを必要とする対象において、肝硬変を処置する方法であって、本発明の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法も提供される。

【0032】

それを必要とする対象において、ブランク血管新生を処置する方法であって、本発明の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法も提供される。

【0033】

それを必要とする対象において、虹彩ルベオーシスを処置する方法であって、本発明の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法も提供される。

30

【0034】

それを必要とする対象において、血管新生緑内障を処置する方法であって、本発明の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法も提供される。

【0035】

それを必要とする対象において、角膜血管新生(CNV)を処置する方法であって、本発明の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法も提供される。

【0036】

それを必要とする対象において、未熟児網膜症(ROP)を処置する方法であって、本発明の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法も提供される。

40

【0037】

それを必要とする対象において、網膜症を処置する方法であって、本発明の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法も提供される。

【0038】

それを必要とする対象において、黄斑変性症を処置する方法であって、本発明の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法も提供される。

【0039】

それを必要とする対象において、卵巣過剰刺激症候群(OHSS)を処置する方法であって、本発明の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法も提供される。

【0040】

50

それを必要とする対象において、子宮出血を処置する方法であって、本発明の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法も提供される。

【0041】

それを必要とする対象において、子宮内膜症を処置する方法であって、本発明の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法も提供される。

【0042】

それを必要とする対象において、子宮内膜増殖症及びがんを処置する方法であって、本発明の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法も提供される。

【0043】

それを必要とする対象において、子宮平滑筋腫を処置する方法であって、本発明の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法も提供される。

10

【0044】

それを必要とする対象において、腺筋腫を処置する方法であって、本発明の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法も提供される。

【0045】

それを必要とする対象において、がんを処置する方法であって、本発明の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法も提供される。がんは、任意の液状がん(liquid cancer)又は固形がんであってもよく、例えば、以下に限定されないが、肺がん、胃がん、結腸がん、肝細胞がん、腎細胞がん、膀胱尿路上皮がん、胆管がん、転移性黒色腫、乳がん、卵巣がん、子宮頸がん、頭頸部がん、膵臓がん、神経膠腫、神経膠芽腫、及び他の固形腫瘍、並びに非ホジキンリンパ腫(NHL)、急性リンパ性白血病(ALL)、慢性リンパ性白血病(CLL)、慢性骨髄性白血病(CML)、多発性骨髄腫(MM)、急性骨髄性白血病(AML)、及び他の液状腫瘍から選択され得る。

20

【0046】

ある特定の実施形態では、医薬組成物は、第2の治療用抗がん剤をさらに含む。第2の治療用抗がん剤は、例えば、抗VEGF剤であり得る。抗VEGF剤は、例えば、アバスチン(Avastin(登録商標))又はベバシズマブバイオシミラー剤であり得る。抗VEGF剤は、例えば、VEGFR1及び/又はVEGFR2ブロッカーであり得る。

【0047】

対象におけるアペリンのレベルを決定する方法も提供される。この方法は、(a)対象から試料を得るステップ;(b)試料を本発明の抗体又はその抗原結合断片と接触させるステップ;及び(c)対象におけるアペリンのレベルを決定するステップを含む。ある特定の実施形態では、試料は、組織試料である。組織試料は、例えば、がん組織試料、肝組織試料、又は腎組織試料であってもよい。

30

【0048】

本発明のモノクローナル抗体又はその抗原結合断片を生産する方法であって、モノクローナル抗体又は抗原結合断片を産生する条件下で、モノクローナル抗体又は抗原結合断片をコードする核酸を含む細胞を培養するステップ、及び細胞又は培養物から抗体又は抗原結合断片を回収するステップを含む方法も提供される。

【0049】

本発明のモノクローナル抗体又はその抗原結合断片を含む医薬組成物を生産する方法であって、モノクローナル抗体又は抗原結合断片を薬学的に許容される担体と配合して、医薬組成物を得るステップを含む方法も提供される。

40

【0050】

前述の概要、及び本出願の好ましい実施形態についての以下の詳細な説明は、添付の図面と併せて読まれるとより理解されるであろう。しかしながら、本出願は、図面に示されるまさにその実施形態に限定されないことが理解されるべきである。

【図面の簡単な説明】

【0051】

【図1A】図1A~1Cは、ELISAによって測定した様々なビオチン化アペリンペプチドへ

50

の抗アペリンmAbの結合を示す。ビオチン化アペリンペプチドをニュートラアビジンでコーティングしたELISAプレートに固定し、このプレート上のペプチドに結合させるために精製した組換えウサギ抗アペリンmAbを添加した。アルカリホスファターゼにコンジュゲートしたヤギ抗ウサギIgG Fc及びPNPP基質を添加することによって結合を検出し、405 nmにおける吸光度として測定した。図1Aは、ELISAによって測定した場合の様々なビオチン化アペリンペプチドへの抗アペリンmAb C5、C8、C17、C24、C25、C26、C27、C4及びC9の結合を実証するグラフを示す。図1Bは、ELISAによって測定した場合の様々なビオチン化アペリンペプチドへの抗アペリンmAb C1、C6、C7、C10、C12、及びC16の結合を実証するグラフを示す。図1Cは、ELISAによって測定した場合の様々なビオチン化アペリンペプチドへの抗アペリンmAb C11、C14、C22、C20、及びC13の結合を実証するグラフを示す。

10

【図1B】図1Aの続きである。

【図1C】図1Bの続きである。

【図2A - B】図2A～2Kは、アペリン活性に関する細胞ベースのアッセイにおいて、選択した抗アペリンmAbの中和効果を示す。アペリン活性を、cAMP Hunter(商標)CHO-K1 AGTRL1 Gi細胞(DiscoverX 番号95-0147C2)においてフォルスコリン(FSK)誘導性のcAMP産生を下方調節するアペリンの能力について評価した。各mAbは、所与の希釈度にて三連でアッセイした。所与の濃度におけるmAbによる%阻害を計算するために、0%阻害を、アペリン処理したFSK刺激細胞からのシグナルとして定義し、100%阻害を、アペリン処理していないFSK刺激細胞からのシグナルとして定義した。%阻害は、増加するmAb濃度に対してプロットした。図2Aは、抗アペリンmAb C1の活性についてのグラフを示す。図2Bは、抗アペリンmAb C6の活性についてのグラフを示す。図2Cは、抗アペリンmAb C7の活性についてのグラフを示す。図2Dは、抗アペリンmAb C8の活性についてのグラフを示す。図2Eは、抗アペリンmAb C24の活性についてのグラフを示す。図2Fは、抗アペリンmAb C25の活性についてのグラフを示す。図2Gは、抗アペリンmAb C10の活性についてのグラフを示す。図2Hは、抗アペリンmAb C11の活性についてのグラフを示す。図2Iは、抗アペリンmAb C12の活性についてのグラフを示す。図2Jは、抗アペリンmAb C22の活性についてのグラフを示す。図2Kは、抗アペリンmAb C26の活性についてのグラフを示す。

20

【図2C - D】図2A - Bの続きである。

【図2E - F】図2C - Dの続きである。

【図2G - H】図2E - Fの続きである。

【図2I - J】図2G - Hの続きである。

【図2K】図2I - Jの続きである。

30

【図3A】図3A～3Cは、ELISAによって測定した場合の、抗アペリンmAb C8、C24及びC25へのビオチン-アペリン-13(配列番号165)の結合の、表7の競合ペプチドによる阻害を実証するグラフを示す。ヤギ抗ウサギIgGをELISAプレートに固定した。ウサギ抗アペリンmAb(C8、C24、又はC25)と競合ペプチドの混合物を室温で30分間ブレインキュベートし、次いで、ビオチン-アペリン-13(配列番号165)を添加し、混合して、最終溶液をプレート上に添加した。固定された抗アペリンmAbであるC8(図3A)、C24(図3B)、及びC25(図3C)へのビオチン-アペリン-13(配列番号165)の結合を、アルカリホスファターゼにコンジュゲートしたストレプトアビジン及びPNPP基質を添加することによって検出し、405nmでの吸光度として測定した。

40

【図3B - C】図3Aの続きである。

【図4A - B】図4A～4Cは、ELISAによって測定した場合の、抗アペリンmAb C8、C24及びC25へのビオチン-アペリン-13(配列番号165)の結合の、エピトープ8-13(KGPMPF(配列番号188))に由来するアラニンスキャニングペプチド(表8)による阻害を実証するグラフを示す。ヤギ抗ウサギIgGをELISAプレートに固定した。ウサギ抗アペリンmAb(C8、C24、又はC25)とアラニンスキャニングペプチドの混合物を室温で30分間ブレインキュベートし、次いで、ビオチン-アペリン-13(配列番号165)を添加し、混合して、最終溶液を

50

プレート上に添加した。固定された抗アペリンmAbであるC8(図4A)、C24(図4B)、及びC25(図4C)へのピオチン-アペリン-13(配列番号165)の結合を、アルカリホスファターゼにコンジュゲートしたストレプトアビジン及びPNPP基質を添加することによって検出し、405nmでの吸光度として測定した。いくつかの競合ペプチドを対照として使用した。

【図4C】図4A - Bの続きである。

【図5A】図5A~5Cは、ELISAによって測定した場合の、抗アペリンmAb C1、C6及びC7へのアペリン-13-ピオチン((QRPLSHKGPMPPF-ピオチン(配列番号165))の結合の、表9の競合ペプチドによる阻害を実証するグラフを示す。ヤギ抗ウサギIgGをELISAプレートに固定した。ウサギ抗アペリンmAb(C1、C6、又はC7)と競合ペプチドの混合物を室温で30分間ブレインキュベートし、次いで、アペリン-13-ピオチン(配列番号165)を添加し、混合して、最終溶液をプレート上に添加した。固定された抗アペリンmAb、C1(図5A)、C6(図5B)、及びC7(図5C)へのアペリン-13-ピオチン(配列番号165)の結合を、アルカリホスファターゼにコンジュゲートしたストレプトアビジン及びPNPP基質を添加することによって検出し、405nmでの吸光度として測定した。

【図5B - C】図5Aの続きである。

【図6A - B】図6A~6Bは、上記のELISAによって測定した場合の、抗アペリンmAb C6(図6A)及びC7(図6B)へのアペリン-13-ピオチン(配列番号165)の結合の、エピトープ1~5(QRPRL(配列番号204))に由来するアラニンスクランニングペプチド(表10)による阻害を実証するグラフを示す。

【図7A - B】図7A~7Bは、細胞ベースのアッセイにおけるヒト化抗アペリンmAb A31のIC50曲線を示す。アペリン活性を、cAMP Hunter(商標)CHO-K1 AGTRL1 Gi細胞(DiscoveRx 番号95-0147C2)においてフォルスコリン(FSK)誘導性のcAMP産生を下方調節するアペリンの能力について評価し、抗アペリンmAbの活性を、アペリンの阻害作用を覆す抗アペリンmAbの能力について評価した。図7Aは、アペリン13(APL13)をアッセイにおいて使用した場合のIC50のグラフを示す。図7Bは、ピロ-アペリン13(pyroAPL13)をアッセイにおいて使用した場合のIC50のグラフを示す。CPSは1秒当たりのカウント数である。

【図8】図8は、異種移植片モデルにおける腫瘍成長に対するヒト化抗アペリンmAb A31の効果を示す。当該mAbを、単独又はペバシズマブとの組合せのいずれかで試験し;ペバシズマブ単独も本研究に含めた。

【発明を実施するための形態】

【0052】

様々な刊行物、文献及び特許が背景技術及び本明細書の全体を通して引用又は記載され、これらの参考文献のそれぞれは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。本明細書に含まれている文書、作用、材料、デバイス、物品などについての議論は、本発明に関する背景を提供することを目的とする。このような議論は、これらの事項のいずれか又はすべてが、開示されるか又は特許請求される任意の発明に関して先行技術の一部を形成することを認めるものではない。

【0053】

別途定義されていない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語及び科学用語は、この発明が関与する技術分野の当業者に通常理解されるものと同じ意味を有する。そうでなければ、本明細書で使用される特定の用語は、本明細書に示す意味を有する。

【0054】

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形の「a」、「an」、及び「the」は、別途この文脈で明確に示されていない限り、複数の対象を含む。

【0055】

別途記載されていない限り、任意の数値、例えば、本明細書に記載の濃度又は濃度範囲は、すべての例で、用語「約」で修飾されているものと理解されるべきである。よって、数値は、通常は、記載された値の $\pm 10\%$ を含む。例えば、1mg/mLの濃度は、0.9mg/mL~1.1mg/mLを含む。同様に、1%~10%(w/v)の濃度範囲は、0.9%(w/v)から11%(w/v)

までを含む。本明細書で使用する場合、数値範囲の使用は、文脈が別途明確に示していない限り、そのような範囲内の整数及びその値の分数を含む、可能性のあるすべての下位範囲、その範囲内のすべての個々の数値を明確に含む。

【0056】

別途示されていない限り、一連の要素に先行する用語「少なくとも」は、その連続したあらゆる要素を指すものと理解されるべきである。当業者であれば、単なる慣用の実験を使用して、本明細書に記載の本発明の具体的実施形態の多くの均等物を認識するか、又は確認することができるであろう。このような均等物は、本発明に包含されることが意図される。

【0057】

本明細書で使用する場合、用語「含む(comprises)」、「含むこと(comprising)」、「含む(includes)」、「含むこと(including)」、「有する(has)」、「有すること(having)」、「含有する(contains)」若しくは「含有すること(containing)」、又はその任意の他の変形は、記載された整数又は整数の群の包含を意味するが、任意の他の整数又は整数の群の除外を意味するものではなく、非排他的又はオープンエンドであることを意図するものである。例えば、要素の列挙を含む組成物、混合物、プロセス、方法、物品、又は装置は、これらの要素のみに必ずしも限定されるものではなく、明示的に列挙されていないか又はこのような組成物、混合物、プロセス、方法、物品、若しくは装置に固有の他の要素を含み得る。さらに、明示的にその逆が述べられていない限り、「又は(or)」は、包括的な又はを指し、排他的な又はを指すものではない。例えば、条件A又はBは、以下のうちのいずれか1つを満たす:Aが真であり(又は存在し)Bが偽である(又は存在しない);Aが偽であり(又は存在しない)Bが真である(又は存在する);及びAとBの両方が真である(又は存在する)。

【0058】

本明細書で使用する場合、複数の記載された要素間の接続的用語「及び/又は」は、個々の選択肢及び組み合わせた選択肢の両方を包含するものと理解される。例えば、2つの要素が「及び/又は」により接続される場合、第1の選択肢は、第2の要素なしでの第1の要素の適用性を指す。第2の選択肢は、第1の要素なしでの第2の要素の適用性を指す。第3の選択肢は、第1及び第2の要素の一緒の適用性を指す。これらの選択肢のいずれか1つは、その意味の範囲内にあると理解され、したがって、本明細書で使用される用語「及び/又は」の要件を満たす。この選択肢の1つ以上の同時適用も、この意味に含まれると理解され、したがって、用語「及び/又は」の要件を満たす。

【0059】

本明細書で使用する場合、本明細書及び特許請求の範囲の全体を通して使用される用語「からなる(consists of)」、又はその変形、例えば、「からなる(consist of)」若しくは「からなる(consisting of)」は、任意の記載された整数又は整数の群の包含を示すが、さらなる整数又は整数の群を特定の方法、構造、又は組成物に追加することはできない。

【0060】

本明細書で使用する場合、本明細書及び特許請求の範囲の全体を通して使用される、用語「から本質的になる(consists essentially of)」、又はその変形、例えば、「から本質的になる(consist essentially of)」若しくは「から本質的になる(consisting essentially of)」は、任意の記載された整数又は整数の群の包含、及び特定の方法、構造又は組成物の基本的な又は新規な特性を実質的に変えない任意の記載された整数又は整数の群の任意選択の包含を示す。M.P.E.P. § 2111.03を参照のこと。

【0061】

本明細書で使用する場合、「対象」は、任意の動物、好ましくは哺乳動物、最も好ましくはヒトを意味する。用語「哺乳動物」は、本明細書で使用する場合、任意の哺乳動物を包含する。哺乳動物の例としては、これらに限定されないが、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ネコ、イヌ、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、サル、ヒトなど、より好ましくはヒトが挙げられる。

10

20

30

40

50

## 【0062】

用語「右」、「左」、「下」、及び「上」は、言及される図面の方向を示す。

## 【0063】

好ましい発明の構成要素の寸法又は特徴に言及する場合に本明細書で使用する用語「約(about)」、「およそ(approximately)」、「全般的に(generally)」、「実質的に(substantially)」などの用語は、記載された寸法/特徴が、厳密な境界又はパラメータではなく、当業者に理解されるように、機能的に同じか又は同様のそれらの軽微な変化を除外するものではないことも理解されるべきである。少なくとも、数値パラメータを含むこのような言及は、当技術分野で許容される数学的及び工業的原理(例えば、丸め誤差、測定誤差又は他の系統誤差、製作公差など)を使用した場合に少なくとも最下位桁を変化させないばらつきを含む。

10

## 【0064】

2つ以上の核酸又はポリペプチド配列(例えば、抗アペリン抗体、アペリンポリペプチド、及びそれらをコードするポリヌクレオチド)の文脈における、用語「同一の」又は「同一性」パーセントは、以下の配列比較アルゴリズムのうちの1つを使用するか又は目視検査によって測定して最大一致となるように比較及びアライメントされた場合に、同じであるか、又は同じであるアミノ酸残基若しくはヌクレオチドを特定のパーセンテージで有する、2つ以上の配列又は部分配列を指す。

## 【0065】

配列比較では、通常は、1つの配列が、試験配列が比較される参照配列として機能する。配列比較アルゴリズムを使用する場合、試験配列及び参照配列がコンピュータに入力され、必要に応じて部分配列座標が指定され、配列アルゴリズムプログラムパラメータが指定される。次いで、配列比較アルゴリズムによって、指定されたプログラムパラメータに基づいて、参照配列と比較した試験配列に関する配列同一性パーセントが計算される。

20

## 【0066】

比較のために最適な配列アラインメントは、例えば、Smith及びWaterman、Adv. Appl. Math. 2:482(1981)のローカルホモロジーアルゴリズムによって、Needleman及びWunsch、J. Mol. Biol. 48:443(1970)のホモロジーアラインメントアルゴリズムによって、Pearson及びLipman、Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444(1988)の類似性検索法によって、これらのアルゴリズム(Wisconsin Genetics Software Package、Genetics Computer Group、575 Science Dr., Madison, WI)のGAP、BESTFIT、FASTA、及びTFASTA)のコンピュータ上での実行によって、又は目視検査(全般的に、Current Protocols in Molecular Biology、F.M. Ausubelら編、Current Protocols、Greene Publishing Associates, Inc.とJohn Wiley & Sons, Inc.の合併事業、(1995補遺)(Ausubel)を参照のこと)によって行うことができる。

30

## 【0067】

配列同一性パーセント及び配列類似性を決定するのに好適なアルゴリズム例は、Altschulら(1990)J. Mol. Biol. 215:403~410頁及びAltschulら(1997)Nucleic Acids Res. 25:3389~3402頁にそれぞれ記載される、BLAST及びBLAST2.0アルゴリズムである。BLAST分析を実施するためのソフトウェアは、米国立生物工学情報センター(National Center for Biotechnology Information)を通じて公的に利用可能である。このアルゴリズムはまず、データベース配列中の同じ長さのワードと整列させた場合、ある正の値の閾値スコアTと一致するか又はそれを満たすかのいずれかである、クエリー配列中の長さWの短いワードを特定することによって、高スコア配列対(HSP)を特定することを伴う。Tは、隣接ワードスコア閾値と呼ばれる(Altschulら、上掲)。これらの初期隣接ワードヒットは、それらを含むより長いHSPを見出すための検索を開始するためのシードとして作用する。次いで、このワードヒットは、累積アラインメントスコアが増加し得る限り、各配列に沿って両方向に伸長される。

40

## 【0068】

累積スコアは、ヌクレオチド配列については、パラメータM(一致する残基の対に関する

50

リワードスコア;常に0より大きい)及びN(ミスマッチの残基に関するペナルティスコア;常に0より小さい)を使用して計算される。アミノ酸配列については、スコアリングマトリックスを使用して、累積スコアを計算する。累積アラインメントスコアがその最大達成値から量X下降するか;累積スコアが1つ以上の負のスコアリングの残基アラインメントの蓄積のために、0以下になるか;又はいずれかの配列の末端に達するかした場合、それぞれの方向でのワードヒットの伸長が停止される。BLASTアルゴリズムパラメータW、T及びXは、アラインメントの感度及び速度を決定する。BLASTNプログラム(ヌクレオチド配列について)は、ワード長(W)を11、期待値(E)を10、M=5、N=-4、及び両鎖の比較をデフォルトとして使用する。アミノ酸配列については、BLASTPプログラムは、ワード長(W)を3、期待値(E)を10、及びBLOSUM62スコアリングマトリックス(Henikoff及びHenikoff、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915頁(1989)を参照のこと)をデフォルトとして使用する。

10

#### 【0069】

配列同一性パーセントを計算することに加えて、BLASTアルゴリズムはまた、2つの配列間の類似性の統計分析も実施する(例えば、Karlin及びAltschul、Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90:5873~5787頁(1993)を参照のこと)。BLASTアルゴリズムによって提供される類似性の1つの尺度は、2つのヌクレオチド又はアミノ酸配列間の一致が偶然に生じる確率の指標を提供する最小和確率(P(N))である。例えば、試験核酸と参照核酸との比較における最小和確率が約0.1未満、より好ましくは約0.01未満、最も好ましくは約0.001未満である場合、その核酸は参照配列と類似すると考えられる。

#### 【0070】

20

2つの核酸配列又はポリペプチドが実質的に同一であることのさらなる指標は、第1の核酸によってコードされるポリペプチドが、以下に記載されるように、第2の核酸によってコードされるポリペプチドと免疫学的に交差反応性であることである。よって、ポリペプチドは、典型的には、例えば、2つのペプチドが保存的置換によってのみ異なる場合に、第2のポリペプチドと実質的に同一である。2つの核酸配列が実質的に同一であることの別の指標は、2つの分子が、ストリンジェントな条件下で互いにハイブリダイズすることである。

#### 【0071】

本明細書で使用する場合、用語「阻害する」、「阻害すること」、及び「阻害」は、活性、応答、状態、疾患又は他の生物学的パラメータを低下させることを意味する。これは、以下に限定されないが、活性、応答、状態、又は疾患の完全な消失を含んでもよい。これは、例えば、天然の又は対照のレベルと比較して、活性、応答、状態、又は疾患の10%の低減を含んでもよい。よって、低減は、天然の又は対照のレベルと比較して、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100%、又はその間の任意の量の低減であってもよい。非限定例として、本発明の抗体は、アペリンタンパク質の活性を阻害し得る。アペリンタンパク質の活性は、天然のアペリンタンパク質の活性に比べて、低減又は消失され得る。

30

#### 【0072】

抗体

本発明は、全般的に、単離された抗アペリン抗体、これらの抗体をコードする核酸及び発現ベクター、このベクターを含有する組換え細胞、並びにこれらの抗体を含む組成物に関する。これらの抗体を作製する方法、並びに糖尿病性網膜症(DR)(増殖性糖尿病性網膜症(PDR)及び非増殖性糖尿病性網膜症(NPDR)を含む)、加齢黄斑変性症(AMD)、糖尿病性黄斑浮腫(DME)、網膜静脈閉塞症(RVO)後の黄斑浮腫、網膜変性症、近視性脈絡膜新生血管(mCNV)、糖尿病性腎症、慢性腎疾患(CKD)、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)、肝硬変、プラーク血管新生、虹彩ルベオーシス、血管新生緑内障、角膜血管新生(CNV)、未熟児網膜症(ROP)、網膜症、黄斑変性症、卵巣過剰刺激症候群(OHSS)、子宮出血、子宮内膜症、子宮内膜増殖症及びがん、子宮平滑筋腫、腺筋腫、がん(例えば、固形腫瘍及び悪性血液疾患)、及び線維症(例えば、病理学的及び生理学的線維症、腎線維症、心筋線維症、肝線維症、並びに肺線維症)を含む疾患を処置するためにこれらの抗体を使用する方法も提供

40

50

される。本発明の抗体は、以下に限定されないが、アペリンへの高親和性結合、アペリンへの高い特異性、アペリン受容体へのアペリンの結合を阻止する能力を含む、1つ以上の望ましい機能的特性を有する。

【0073】

全般的態様では、本発明は、アペリンに特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片に関する。

【0074】

本明細書で使用する場合、用語「抗体」は、広義の意味で使用され、免疫グロブリン又は抗体分子を含み、モノクローナル若しくはポリクローナルである、ヒトの、ヒト化された、複合体の及びキメラの抗体及び抗体断片を含む。一般的に、抗体は、特定の抗原への結合特異性を示すタンパク質又はペプチド鎖である。抗体構造は周知である。免疫グロブリンは、重鎖定常ドメインアミノ酸配列に応じて5つの主要なクラス(すなわち、IgA、IgD、IgE、IgG及びIgM)に割り当てることができる。IgA及びIgGは、アイソタイプIgA1、IgA2、IgG1、IgG2、IgG3及びIgG4にさらに細分類される。したがって、本発明の抗体は、5つの主要なクラス又は対応するサブクラスのいずれかのものであり得る。好ましくは、本発明の抗体は、IgG1、IgG2、IgG3又はIgG4である。脊椎動物種の抗体軽鎖は、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づき、2つの明確に異なるタイプ、すなわち、カッパ及びラムダのうちの一方に割り当てることができる。したがって、本発明の抗体は、カッパ又はラムダ軽鎖定常ドメインを含有し得る、特定の実施形態によれば、本発明の抗体は、ラット又はヒト抗体由来の重鎖及び/又は軽鎖定常領域を含む。重鎖及び軽鎖定常ドメインに加えて、抗体は、軽鎖可変領域及び重鎖可変領域から構成される抗原結合領域を含み、その軽鎖可変領域及び重鎖可変領域のそれぞれが3つのドメイン(すなわち、相補性決定領域1~3;(CDR1、CDR2、及びCDR3))を含む。軽鎖可変領域のドメインは、代わりに、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3と称され、重鎖可変領域のドメインは、代わりに、HCDR1、HCDR2、及びHCDR3と称される。

【0075】

本明細書で使用する場合、用語「単離された抗体」は、異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含まない抗体を指す(例えば、アペリンに特異的に結合し、アペリンに結合しない抗体を実質的に含まない単位された抗体)。さらに、単離された抗体は、他の細胞材料及び/又は化学物質を実質的に含まない。

【0076】

本明細書で使用する場合、用語「モノクローナル抗体」は、実質的に均質な抗体の集団から得られる抗体を指し、すなわち、その集団に含む個々の抗体は、わずかな量で存在し得る天然に存在する可能性のある突然変異を除いて、同一である。本発明のモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法、ファージディスプレイ技法、単ーリンパ球遺伝子クローニング技法によって、又は組換えDNA法によって、作製することができる。例えば、モノクローナル抗体は、ヒト重鎖導入遺伝子及び軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有するトランスジェニック非ヒト動物、例えば、トランスジェニックマウス又はラットから得られるB細胞を含むハイブリドーマによって産生させることができる。

【0077】

本明細書で使用する場合、用語「抗原結合断片」は、例えば、ダイアボディ、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv断片、ジスルフィド安定化Fv断片(dsFv)、(dsFv)<sub>2</sub>、二重特異性dsFv(dsFv-dsFv')、ジスルフィド安定化ダイアボディ(dsダイアボディ)、単鎖抗体分子(scFv)、単一ドメイン抗体(sdab)、scFv二量体(二価のダイアボディ)、1つ以上のCDRを含む抗体の一部から形成された多重特異性抗体、ラクダ化単一ドメイン抗体、ナノボディ、ドメイン抗体、二価ドメイン抗体、又は抗原に結合するが完全な抗体構造を含まない任意の他の抗体断片などの、抗体断片を指す。抗原結合断片は、親抗体又は親抗体断片が結合するのと同じ抗原に結合することが可能である。特定の実施形態によれば、抗原結合断片は、軽鎖可変領域、軽鎖定常領域、及び重鎖のFdセグメントを含む。他の特定の実施形態によれば、抗原結合断片は、Fab及びF(ab')を含む。



## 【 0 0 7 8 】

本明細書で使用する場合、用語「単鎖抗体」は、約15～約20アミノ酸の短いペプチドによって連結した重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む、この分野の従来の単鎖抗体を指す。本明細書で使用する場合、用語「単ドメイン抗体」は、重鎖可変領域及び重鎖定常領域を含むか又は重鎖可変領域のみを含む、この分野の従来の単ドメイン抗体を指す。

## 【 0 0 7 9 】

本明細書で使用する場合、用語「ヒト抗体」は、ヒトによって産生される抗体又は当技術分野で公知の任意の技法を使用して作製されるヒトによって産生される抗体に対応するアミノ酸配列を有する抗体を指す。ヒト抗体のこの定義は、インタクトな若しくは完全長の抗体、その断片、並びに/又は少なくとも1つのヒト重鎖及び/若しくは軽鎖ポリペプチドを含む抗体を含む。

10

## 【 0 0 8 0 】

本明細書で使用する場合、用語「ヒト化抗体」は、抗体の抗原結合特性は保持されるが、ヒトの身体におけるその抗原性は低下するように、ヒト抗体のものに対する配列相同性を増加させるよう改変されている、非ヒト抗体を指す。

## 【 0 0 8 1 】

本明細書で使用する場合、用語「キメラ抗体」は、免疫グロブリン分子のアミノ酸配列が2つ以上の生物種に由来する抗体を指す。軽鎖と重鎖の両方の可変領域が、所望の特異性、親和性、及び能力を有する哺乳動物のうちの1種(例えば、マウス、ラット、ウサギなど)に由来する抗体の可変領域に対応する 경우가多く、一方、定常領域は、その種における免疫応答の誘発を回避するために、哺乳動物の別の種(通常、ヒト)に由来する抗体の配列に対応する。

20

## 【 0 0 8 2 】

本明細書で使用する場合、用語「多重特異性抗体」は、複数の免疫グロブリン可変ドメイン配列を含む抗体を指し、この複数のうち第1の免疫グロブリン可変ドメイン配列は、第1のエピトープに対する結合特異性を有し、この複数のうち第2の免疫グロブリン可変ドメイン配列は、第2のエピトープに対する結合特異性を有する。一実施形態では、第1及び第2のエピトープは、同じ抗原上、例えば、同じタンパク質(又は多量体タンパク質の同じサブユニット)上にある。一実施形態では、第1及び第2のエピトープは、重複しているか又は実質的に重複している。一実施形態では、第1及び第2のエピトープは、重複していないか又は実質的に重複していない。一実施形態では、第1及び第2のエピトープは、異なる抗原上、例えば、異なるタンパク質(又は多量体タンパク質の異なるサブユニット)上にある。一実施形態では、多重特異性抗体は、第3、第4、又は第5の免疫グロブリン可変ドメインを含む。一実施形態では、多重特異性抗体は、二重特異性抗体分子、三重特異性抗体、又は四重特異性抗体分子である。

30

## 【 0 0 8 3 】

本明細書で使用する場合、用語「二重特異性抗体」は、たった2つのエピトープ又は2つの抗原に結合する多重特異性抗体を指す。二重特異性抗体は、第1のエピトープに対する結合特異性を有する第1の免疫グロブリン可変ドメイン配列と、第2のエピトープに対する結合特異性を有する第2の免疫グロブリン可変ドメイン配列とによって特徴付けられる。一実施形態では、第1及び第2のエピトープは、同じ抗原上、例えば、同じタンパク質(又は多量体タンパク質の同じサブユニット)上にある。一実施形態では、第1及び第2のエピトープは、重複しているか又は実質的に重複している。一実施形態では、第1及び第2のエピトープは、異なる抗原上、例えば、異なるタンパク質(又は多量体タンパク質の異なるサブユニット)上にある。一実施形態では、二重特異性抗体は、第1のエピトープに対する結合特異性を有する重鎖可変ドメイン配列及び軽鎖可変ドメイン配列と、第2のエピトープに対する結合特異性を有する重鎖可変ドメイン配列及び軽鎖可変ドメイン配列とを含む。一実施形態では、二重特異性抗体は、第1のエピトープに対する結合特異性を有する半抗体、又はその断片、及び第2のエピトープに対する結合特異性を有する半抗体、又はその断片を含む。一実施形態では、二重特異性抗体は、第1のエピトープに対する結合特異性

40

50

を有するscFv、又はその断片、及び第2のエピトープに対する結合特異性を有するscFv、又はその断片を含む。一実施形態では、第1のエピトープは、アペリン上に位置し、第2のエピトープは、VEGF、アンジオポエチン-2(ANG-2)、ロイシンリッチアルファ-2-グリコプロテイン1(LRG1)、PD-1、PD-L1、LAG-3、TIM-3、CTLA-4、HER-2、EGFR、CD19、CD73、CD47、CD20、CD33、DLL3、クローディン18.2、TIP-1、CD3、PDGF、VI型コラーゲン受容体、TGF-ベータ受容体、LOXL2、p75ニュートロフィン受容体(NGFR p75)、及び/又はインスリン様成長因子2受容体(IGF2R)上に位置する。ある特定の実施形態では、本発明の抗アペリンモノクローナル抗体又はその抗原結合断片及び抗VEGF抗体(例えば、アバスチン(Avastin(登録商標))又はベバシズマブバイオシミラー剤)又はその抗原結合断片を操作して、アペリンとVEGFの両方を標的とする二重特異性抗体を形成する。

10

#### 【0084】

本明細書で使用する場合、用語「アペリン」は、プレプロアペリンとも呼ばれる77アミノ酸前駆体タンパク質、及びその処理されたアイソフォームを指し、これらは、アペリン-13、アペリン-16、アペリン-17、アペリン-36、アペリン-55、及び77アミノ酸前駆体に由来する他の形態を含む。各アイソフォームは別個の活性を有し、クラスAのロドプシン様Gタンパク質共役受容体(GPCR)であるアペリン受容体APJ(アペリンR、AGTRL1、又はAPLNRとも称される)に対するリガンドであることによって作用する。アペリンアイソフォーム群に対する受容体結合親和性は様々であり、それが、アペリン受容体APJの細胞内シグナル伝達の誘発における有効性が様々であることの主要因である。アペリン/APJ系は、以下に限定されないが、血圧の調節、心収縮性、心血管緊張、組織血管形成、水分ホメオスタシス、胃腸管生理、代謝バランス、血管平滑筋細胞(VSMC)及び他の細胞型の増殖、ヒト臍帯静脈内皮細胞への単球の接着、心筋梗塞後の心修復、並びにいくつかの組織又は器官における病理学的線維症を含む多くの器官の生理学及び病態生理学において重要且つ多様な役割を果たす。用語「ヒトアペリン」は、ヒトを起源とするアペリンを指す。前駆体ヒトアペリンの例示的アミノ酸配列は、GenBankアクセッション番号AAF25815.1(配列番号221)に示される。

20

#### 【0085】

本明細書で使用する場合、「アペリンに特異的に結合する」抗体は、 $1 \times 10^{-7}$ M以下、好ましくは $1 \times 10^{-8}$ M以下、より好ましくは $5 \times 10^{-9}$ M以下、 $1 \times 10^{-9}$ M以下、 $5 \times 10^{-10}$ M以下、又は $1 \times 10^{-10}$ M以下のKDで、アペリン、好ましくはヒトアペリンに結合する抗体を指す。用語「KD」は、解離定数を指し、 $K_a$ に対する $K_d$ の比率(すなわち、 $K_d/K_a$ )から得られ、モル濃度(M)として表される。抗体に対するKD値は、本開示に鑑みて、当技術分野における方法を使用して決定することができる。例えば、抗体のKDは、表面プラズモン共鳴を使用して、例えば、バイオセンサーシステム、例えば、Biacore(登録商標)システムを使用して、又はバイオレイヤー干渉法、例えば、Octet RED96システムを使用して、決定することができる。

30

#### 【0086】

抗体のKD値が小さいほど、抗体が標的抗原に結合する親和性は高くなる。

#### 【0087】

特定の態様によれば、本発明は:

- (1)それぞれ、配列番号168、169、170、171、102、及び172;
- (2)それぞれ、配列番号50、51、52、110、111、及び112;
- (3)それぞれ、配列番号173、174、175、176、114、及び115;
- (4)それぞれ、配列番号68、177、178、128、129、及び130;
- (5)それぞれ、配列番号74、75、76、134、135、及び136;
- (6)それぞれ、配列番号179、78、180、137、138、及び139;
- (7)それぞれ、配列番号83、84、85、143、144、及び145;
- (8)それぞれ、配列番号86、87、88、146、147、及び148;
- (9)それぞれ、配列番号89、90、91、149、150、及び151;

40

50

(10)それぞれ、配列番号92、93、94、152、153、及び154;

(11)それぞれ、配列番号95、96、97、155、156、及び157;又は

(12)それぞれ、配列番号98、99、100、158、159、及び160;

のポリペプチド配列を有する重鎖相補性決定領域1(HCDR1)、HCDR2、HCDR3、軽鎖相補性決定領域1(LCDR1)、LCDR2、及びLCDR3を含み、アペリン、好ましくはヒトアペリンに特異的に結合する、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片に関する。

【0088】

配列番号168は、アミノ酸配列 $X_1NRX_2S$ で表され、ここで、 $X_1$ は、S又はTから選択されるアミノ酸であり、 $X_2$ は、M又はVから選択されるアミノ酸である。

【0089】

配列番号169は、アミノ酸配列SIGSSPW $X_1$ ASW $X_2$ Gで表され、ここで、 $X_1$ は、Y又はFから選択されるアミノ酸であり、 $X_2$ は、Q又はLから選択される。

【0090】

配列番号170は、アミノ酸配列GGYRPG $X_1$ S $X_2$ で表され、ここで、 $X_1$ は、A又はGから選択されるアミノ酸であり、 $X_2$ は、V又はIから選択されるアミノ酸である。

【0091】

配列番号171は、アミノ酸配列QSSQSVYDNNDL $X_1$ で表され、ここで、 $X_1$ は、A又はGから選択されるアミノ酸である。

【0092】

配列番号172は、アミノ酸配列AGGY $X_1$ GDIYTで表され、ここで、 $X_1$ は、S又はNから選択されるアミノ酸である。

【0093】

配列番号173は、アミノ酸配列 $X_1YAX_2D$ で表され、ここで、 $X_1$ は、N又はSから選択されるアミノ酸であり、 $X_2$ は、M又はIから選択される。

【0094】

配列番号174は、アミノ酸配列VIAPN $X_1X_2TX_3YPTWARG$ で表され、ここで、 $X_1$ は、R、G、又はHから選択されるアミノ酸であり; $X_2$ は、R、A、又はYから選択されるアミノ酸であり; $X_3$ は、Y又はCから選択されるアミノ酸である。

【0095】

配列番号175は、アミノ酸配列YPIX $X_1X_2GX_3NI$ で表され、ここで、 $X_1$ は、E又はDから選択されるアミノ酸であり; $X_2$ は、P、A、S、又はTから選択されるアミノ酸であり; $X_3$ は、A又はSから選択されるアミノ酸である。

【0096】

配列番号176は、アミノ酸配列QSSESV $X_1X_2NNQLS$ で表され、ここで、 $X_1$ は、D又はGから選択されるアミノ酸であり、 $X_2$ は、Y、N、又はMから選択されるアミノ酸である。

【0097】

配列番号177は、アミノ酸配列VIAPSX $X_1TTYPTWAKG$ で表され、ここで、 $X_1$ は、G又はSから選択されるアミノ酸である。

【0098】

配列番号178は、アミノ酸配列YPIDPGSN $X_1$ で表され、ここで、 $X_1$ は、I又はVから選択されるアミノ酸である。

【0099】

配列番号179は、アミノ酸配列 $X_1X_2AMD$ で表され、ここで、 $X_1$ は、N又はSから選択されるアミノ酸であり、 $X_2$ は、Y又はHから選択されるアミノ酸である。

【0100】

配列番号180は、アミノ酸配列YPID $X_1GANV$ で表され、ここで、 $X_1$ は、V又はAから選択されるアミノ酸である。

【0101】

別の特定の態様によれば、本発明は、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、若しくは39のうちの1つと少なくとも8

10

20

30

40

50

5%、好ましくは90%、より好ましくは95%同一であるポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、又は配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、若しくは40のうちの1つと少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95%同一であるポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域を含む、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片に関する。好ましい一実施形態によれば、本発明の単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片は、それぞれ、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、又は39と少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95%同一であるポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、又は40と少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95%同一であるポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域を含む。

10

# 【0102】

別の特定の態様によれば、本発明は、

- a. 配列番号1のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号2のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域;
- b. 配列番号3のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号4のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域;
- c. 配列番号5のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号6のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域;
- d. 配列番号7のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号8のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域;
- e. 配列番号9のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号10のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域;
- f. 配列番号11のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号12のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域;
- g. 配列番号13のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号14のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域;
- h. 配列番号15のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号16のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域;
- i. 配列番号17のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号18のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域;
- j. 配列番号19のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号20のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域;
- k. 配列番号21のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号22のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域;
- l. 配列番号23のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号24のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域;
- m. 配列番号25のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号26のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域;
- n. 配列番号27のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号28のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域;
- o. 配列番号29のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号30のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域;
- p. 配列番号31のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号32のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域;
- q. 配列番号33のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号34のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域;
- r. 配列番号35のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号36のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域;
- s. 配列番号37のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号38のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域;

20

30

40

50

チド配列を有する軽鎖可変領域;又は

t. 配列番号39のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号40のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域

を含む、本発明の単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片に関する。

【0103】

一実施形態では、本発明は、それぞれ、配列番号41、42、43、101、102、及び103のポリペプチド配列を有するHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2及びLCDR3を含む、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片に関する。別の実施形態では、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片は、配列番号1と少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95%同一であるポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号2と少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95%同一であるポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域を含む。好ましくは、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片は、配列番号1のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号2のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域を含む。

10

【0104】

一実施形態では、本発明は、それぞれ、配列番号44、45、46、104、105、及び106のポリペプチド配列を有するHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2及びLCDR3を含む、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片に関する。別の実施形態では、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片は、配列番号3と少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95%同一であるポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号4と少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95%同一であるポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域を含む。好ましくは、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片は、配列番号3のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号4のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域を含む。

20

【0105】

一実施形態では、本発明は、それぞれ、配列番号47、48、49、107、108、及び109のポリペプチド配列を有するHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2及びLCDR3を含む、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片に関する。別の実施形態では、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片は、配列番号5と少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95%同一であるポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号6と少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95%同一であるポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域を含む。好ましくは、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片は、配列番号5のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号6のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域を含む。

30

【0106】

一実施形態では、本発明は、それぞれ、配列番号50、51、52、110、111、及び112のポリペプチド配列を有するHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2及びLCDR3を含む、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片に関する。別の実施形態では、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片は、配列番号7と少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95%同一であるポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号8と少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95%同一であるポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域を含む。好ましくは、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片は、配列番号7のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号8のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域を含む。

40

【0107】

一実施形態では、本発明は、それぞれ、配列番号53、54、55、113、114、及び115のポリペプチド配列を有するHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2及びLCDR3を含む、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片に関する。別の実施形態では、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片は、配列番号9と少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95%同一であるポリペプチド配列を有する重鎖可変

50

領域、及び配列番号10と少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95%同一であるポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域を含む。好ましくは、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片は、配列番号9のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号10のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域を含む。

【0108】

一実施形態では、本発明は、それぞれ、配列番号56、57、58、116、117、及び118のポリペプチド配列を有するHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2及びLCDR3を含む、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片に関する。別の実施形態では、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片は、配列番号11と少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95%同一であるポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号12と少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95%同一であるポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域を含む。好ましくは、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片は、配列番号11のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号12のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域を含む。

10

【0109】

一実施形態では、本発明は、それぞれ、配列番号59、60、61、119、120、及び121のポリペプチド配列を有するHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2及びLCDR3を含む、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片に関する。別の実施形態では、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片は、配列番号13と少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95%同一であるポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号14と少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95%同一であるポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域を含む。好ましくは、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片は、配列番号13のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号14のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域を含む。

20

【0110】

一実施形態では、本発明は、それぞれ、配列番号62、63、64、122、123、及び124のポリペプチド配列を有するHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2及びLCDR3を含む、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片に関する。別の実施形態では、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片は、配列番号15と少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95%同一であるポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号16と少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95%同一であるポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域を含む。好ましくは、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片は、配列番号15のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号16のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域を含む。

30

【0111】

一実施形態では、本発明は、それぞれ、配列番号65、66、67、125、126、及び127のポリペプチド配列を有するHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2及びLCDR3を含む、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片に関する。別の実施形態では、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片は、配列番号17と少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95%同一であるポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号18と少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95%同一であるポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域を含む。好ましくは、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片は、配列番号17のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号18のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域を含む。

40

【0112】

一実施形態では、本発明は、それぞれ、配列番号68、69、70、128、129、及び130のポリペプチド配列を有するHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2及びLCDR3を含む、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片に関する。別の実施形態では、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片は、配列番号19と少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95%同一であるポリペプチド配列を有する重鎖可

50

変領域、及び配列番号20と少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95%同一であるポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域を含む。好ましくは、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片は、配列番号19のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号20のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域を含む。

【0113】

一実施形態では、本発明は、それぞれ、配列番号71、72、73、131、132、及び133のポリペプチド配列を有するHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2及びLCDR3を含む、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片に関する。別の実施形態では、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片は、配列番号21と少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95%同一であるポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号22と少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95%同一であるポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域を含む。好ましくは、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片は、配列番号21のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号22のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域を含む。

10

【0114】

一実施形態では、本発明は、それぞれ、配列番号74、75、76、134、135、及び136のポリペプチド配列を有するHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2及びLCDR3を含む、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片に関する。別の実施形態では、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片は、配列番号23と少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95%同一であるポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号24と少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95%同一であるポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域を含む。好ましくは、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片は、配列番号23のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号24のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域を含む。

20

【0115】

一実施形態では、本発明は、それぞれ、配列番号77、78、79、137、138、及び139のポリペプチド配列を有するHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2及びLCDR3を含む、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片に関する。別の実施形態では、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片は、配列番号25と少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95%同一であるポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号26と少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95%同一であるポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域を含む。好ましくは、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片は、配列番号25のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号26のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域を含む。

30

【0116】

一実施形態では、本発明は、それぞれ、配列番号80、81、82、140、141、及び142のポリペプチド配列を有するHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2及びLCDR3を含む、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片に関する。別の実施形態では、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片は、配列番号27と少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95%同一であるポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号28と少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95%同一であるポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域を含む。好ましくは、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片は、配列番号27のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号28のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域を含む。

40

【0117】

一実施形態では、本発明は、それぞれ、配列番号83、84、85、143、144、及び145のポリペプチド配列を有するHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2及びLCDR3を含む、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片に関する。別の実施形態では、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片は、配列番号29と少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95%同一であるポリペプチド配列を有する重鎖可

50

変領域、及び配列番号30と少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95%同一であるポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域を含む。好ましくは、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片は、配列番号29のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号30のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域を含む。

【0118】

一実施形態では、本発明は、それぞれ、配列番号86、87、88、146、147、及び148のポリペプチド配列を有するHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2及びLCDR3を含む、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片に関する。別の実施形態では、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片は、配列番号31と少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95%同一であるポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号32と少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95%同一であるポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域を含む。好ましくは、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片は、配列番号31のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号32のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域を含む。

10

【0119】

一実施形態では、本発明は、それぞれ、配列番号89、90、91、149、150、及び151のポリペプチド配列を有するHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2及びLCDR3を含む、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片に関する。別の実施形態では、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片は、配列番号33と少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95%同一であるポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号34と少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95%同一であるポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域を含む。好ましくは、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片は、配列番号33のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号34のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域を含む。

20

【0120】

一実施形態では、本発明は、それぞれ、配列番号92、93、94、152、153、及び154のポリペプチド配列を有するHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2及びLCDR3を含む、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片に関する。別の実施形態では、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片は、配列番号35と少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95%同一であるポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号36と少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95%同一であるポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域を含む。好ましくは、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片は、配列番号35のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号36のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域を含む。

30

【0121】

一実施形態では、本発明は、それぞれ、配列番号95、96、97、155、156、及び157のポリペプチド配列を有するHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2及びLCDR3を含む、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片に関する。別の実施形態では、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片は、配列番号37と少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95%同一であるポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号38と少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95%同一であるポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域を含む。好ましくは、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片は、配列番号37のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号38のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域を含む。

40

【0122】

一実施形態では、本発明は、それぞれ、配列番号98、99、100、158、159、及び160のポリペプチド配列を有するHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2及びLCDR3を含む、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片に関する。別の実施形態では、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片は、配列番号39と少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95%同一であるポリペプチド配列を有する重鎖可

50



変領域、及び配列番号40と少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95%同一であるポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域を含む。好ましくは、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片は、配列番号39のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号40のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域を含む。

【0123】

別の特定の態様によれば、本発明は、配列番号188のアミノ酸配列を含むエピトープに特異的に結合する、アペリンに対する単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片に関する。単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片は、例えば、アペリンの活性を阻害し得る。モノクローナル抗体又はその抗原結合断片は、例えば、ピロ-アペリン-13、アペリン-13、アペリン-17、アペリン-36、アペリン-55、及び/又はアペリン-13と同一のC末端を有するアペリンの他の形態に特異的に結合することができる。

10

【0124】

別の特定の態様によれば、本発明は、配列番号204のアミノ酸配列を含むエピトープに特異的に結合する、アペリンに対する単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片に関する。単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片は、例えば、アペリンの活性を阻害し得る。モノクローナル抗体又はその抗原結合断片は、例えば、アペリン-13及び/又はピロ-アペリン-13に特異的に結合することができる。

【0125】

別の特定の態様によれば、本発明は、キメラである、本発明の単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片に関する。

20

【0126】

別の特定の態様によれば、本発明は、ヒトの又はヒト化された、本発明の単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片に関する。

【0127】

別の特定の態様によれば、本発明は、単離されたヒト化モノクローナル抗体又は抗原結合断片に関し、その単離されたヒト化抗体又はその抗原結合断片は：

- a. 配列番号211のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号215のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域；
- b. 配列番号212のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号215のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域；
- c. 配列番号213のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号215のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域；
- d. 配列番号214のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号215のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域；
- e. 配列番号213のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号216のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域；
- f. 配列番号214のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号216のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域；
- g. 配列番号217のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号219のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域；又は
- h. 配列番号218のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号220のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域を含む。

30

40

【0128】

別の一般的態様では、本発明は、本発明のモノクローナル抗体又はその抗原結合断片をコードする、単離された核酸に関する。タンパク質のコード配列を、タンパク質のアミノ酸配列を変化させることなく、変化させる(例えば、置換、欠失、挿入など)ことができることは当業者によって認識されるであろう。したがって、本発明のモノクローナル抗体又はその抗原結合断片をコードする核酸配列は、タンパク質のアミノ酸配列を変化させることなく変更され得ることは、当業者によって理解されるであろう。

50

## 【 0 1 2 9 】

別の一般的態様では、本発明は、本発明のモノクローナル抗体又はその抗原結合断片をコードする単離された核酸を含むベクターに関する。本開示を鑑みて、当業者に公知の任意のベクター、例えば、プラスミド、コスミド、ファージベクター又はウイルスベクターを使用することができる。一部の実施形態では、ベクターは、組換え発現ベクター、例えば、プラスミドである。ベクターは、発現ベクターの従来の機能を確認するための任意の要素、例えば、プロモーター、リボソーム結合エレメント、ターミネーター、エンハンサー、選択マーカー、及び複製起点を含むことができる。プロモーターは、構成性、誘導性又は抑制性プロモーターであってもよい。核酸を細胞に送達することが可能な多くの発現ベクターが、当技術分野で公知であり、本明細書において、細胞における抗体又はその抗原結合断片の生産に使用することができる。本発明の実施形態によれば、従来のクローニング技法又は人工遺伝子合成を使用して組換え発現ベクターを生成することができる。

10

## 【 0 1 3 0 】

別の一般的態様では、本発明は、本発明のモノクローナル抗体又はその抗原結合断片をコードする単離された核酸を含む宿主細胞に関する。本開示に鑑みて、当業者に公知の任意の宿主細胞を、本発明の抗体又はその抗原結合断片の組換え発現に使用することができる。一部の実施形態では、宿主細胞は、大腸菌(*E. coli*)TG1若しくはBL21細胞(例えば、scFv又はFab抗体の発現用)、CHO-DG44若しくはCHO-K1細胞又はHEK293細胞(例えば、完全長IgG抗体の発現用)である。特定の実施形態によれば、従来の方法、例えば、化学的トランスフェクション、熱ショック、又はエレクトロポレーションによって、組換え発現ベクターは宿主細胞に形質転換され、組換え核酸が有効に発現されるように組換え発現ベクターが宿主細胞のゲノムに安定して組み込まれる。

20

## 【 0 1 3 1 】

別の一般的態様では、本発明は、本発明のモノクローナル抗体又はその抗原結合断片を生産する方法であって、本発明のモノクローナル抗体又はその抗原結合断片を産生する条件下で、モノクローナル抗体又はその抗原結合断片をコードする核酸を含む細胞を培養するステップ、及び細胞又は細胞培養物から(例えば、上清から)、抗体又はその抗原結合断片を回収するステップを含む方法に関する。当技術分野で公知であり、本明細書に記載される従来の技法に従って、発現された抗体又はその抗原結合断片を細胞から採取し、精製することができる。

30

## 【 0 1 3 2 】

## 医薬組成物

別の一般的態様では、本発明は、本発明の単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物に関する。用語「医薬組成物」は、本明細書で使用する場合、本発明の抗体を、薬学的に許容される担体と一緒に含む生産物を意味する。本発明の抗体及びこれらを含む組成物は、本明細書で言及した治療適用のための医薬の製造においても有用である。

## 【 0 1 3 3 】

本明細書で使用する場合、用語「担体」は、任意の賦形剤、希釈剤、充填剤、塩、緩衝剤、安定剤、相溶剤、油、脂質、ベシクルを含む脂質、マイクロスフェア、リボソーム封入、又は医薬製剤において使用するための当技術分野で周知の他の材料を指す。担体、賦形剤又は希釈剤の特徴は、特定の適用のための投与経路に依存することが理解されよう。本明細書で使用する場合、用語「薬学的に許容される担体」は、本発明による組成物の有効性又は本発明による組成物の生物学的活性を妨げない非毒性材料を指す。特定の実施形態によれば、本開示に鑑みて、抗体医薬組成物において使用するのに好適な任意の薬学的に許容される担体を、本発明において使用することができる。

40

## 【 0 1 3 4 】

薬学的に活性な成分の薬学的に許容される担体との製剤化は、例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy(例えば、第21版(2005)、その後の任意の版)にあるように、当技術分野で公知である。追加の成分の非限定例として、緩衝剤、希釈剤、

50

溶媒、張性調節剤、防腐剤、安定剤、及びキレート剤が挙げられる。1つ以上の薬学的に許容される担体を、本発明の医薬組成物の製剤化において使用することができる。

【0135】

本発明の一実施形態では、医薬組成物は、液体製剤である。液体製剤の好ましい例は、水性製剤、すなわち、水を含む製剤である。液体製剤は、溶液、懸濁液、エマルション、マイクロエマルション、ゲルなどを含むことができる。水性製剤は、典型的には、少なくとも50%w/wの水、又は少なくとも60%、70%、75%、80%、85%、90%、又は少なくとも95%w/wの水を含む。

【0136】

一実施形態では、医薬組成物は、例えば、注射デバイス(例えば、シリンジ又は輸液ポンプ)を介して注射することができる注射剤として製剤化することができる。注射は、例えば、皮下、筋肉内、腹腔内、硝子体内、又は静脈内に送達することができる。

【0137】

別の実施形態では、医薬組成物は、固体製剤、例えば、凍結乾燥又は噴霧乾燥組成物であり、これはそのまま使用してもよく、又は、医師若しくは患者が使用前に溶媒、及び/若しくは希釈剤を添加して使用してもよい。固体剤形としては、錠剤、例えば、圧縮錠剤、及び/又はコーティングされた錠剤、並びにカプセル(例えば、ハード又はソフトゼラチンカプセル)を挙げることができる。医薬組成物はまた、例えば、サッシェ、糖衣錠、粉末、顆粒、トローチ剤、又は再構築用の粉末の形態であってもよい。

【0138】

剤形は、即時放出(この場合、水溶性又は分散性担体を含み得る)であってもよく、又は、遅延放出、持続放出、若しくは修正放出(これらの場合は、胃腸管又は皮下における剤形の溶解速度を調節する非水溶性ポリマーを含み得る)であってもよい。

【0139】

他の実施形態では、医薬組成物は、鼻腔内、頬内、又は舌下送達され得る。

【0140】

水性製剤のpHは、pH3~pH10の間であり得る。本発明の一実施形態では、製剤のpHは、約7.0~約9.5である。本発明の別の実施形態では、製剤のpHは、約3.0~約7.0である。

【0141】

本発明の別の実施形態では、医薬組成物は、緩衝剤を含む。緩衝剤の非限定例として、アルギニン、アスパラギン酸、ピシン、クエン酸塩、リン酸水素二ナトリウム、フマル酸、グリシン、グリシルグリシン、ヒスチジン、リシン、マレイン酸、リンゴ酸、酢酸ナトリウム、炭酸ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム、リン酸ナトリウム、コハク酸塩、酒石酸、トリシン、及びトリス(ヒドロキシメチル)-アミノメタン、並びにこれらの混合物が挙げられる。緩衝剤は、個々に又は全体で、約0.01mg/ml~約50mg/ml、例えば、約0.1mg/ml~約20mg/mlの濃度で存在してもよい。これらの具体的な緩衝剤の各々を含む医薬組成物は、本発明の代替的な実施形態を構成する。

【0142】

本発明の別の実施形態では、医薬組成物は、防腐剤を含む。防腐剤の非限定例として、塩化ベンゼトニウム、安息香酸、ベンジルアルコール、プロノポール、ブチル4-ヒドロキシベンゾエート、クロロブタノール、クロロクレゾール、クロロヘキシジン、クロルフェネシン、o-クレゾール、m-クレゾール、p-クレゾール、エチル4-ヒドロキシベンゾエート、イミド尿素、メチル4-ヒドロキシベンゾエート、フェノール、2-フェノキシエタノール、2-フェニルエタノール、プロピル4-ヒドロキシベンゾエート、デヒドロ酢酸ナトリウム、チメロサル、及びこれらの混合物が挙げられる。防腐剤は、個々に又は全体で、約0.01mg/ml~約50mg/ml、例えば、約0.1mg/ml~約20mg/mlの濃度で存在してもよい。これらの具体的な防腐剤の各々を含む医薬組成物は、本発明の代替的な実施形態を構成する。

【0143】

10

20

30

40

50

本発明の別の実施形態では、医薬組成物は、等張剤を含む。本実施形態の非限定例として、塩(例えば、塩化ナトリウム)、アミノ酸(例えば、グリシン、ヒスチジン、アルギニン、リシン、イソロイシン、アスパラギン酸、トリプトファン、及びトレオニン)、アルジトール(例えば、グリセロール、1,2-プロパンジオールプロピレングリコール)、1,3-プロパンジオール、及び1,3-ブタンジオール)、ポリエチレングリコール(例えば、PEG400)、及びこれらの混合物が挙げられる。等張剤の別の例としては、糖が挙げられる。糖の非限定例は、単糖類、二糖類、若しくは多糖類、又は水溶性グルカンであってもよく、例えば、フルクトース、グルコース、マンノース、ソルボース、キシロース、マルトース、ラクトース、ショ糖、トレハロース、デキストラン、プルラン、デキストリン、シクロデキストリン、アルファ及びベータHPCD、可溶性デンプン、ヒドロキシエチルデンプン、並びにカルボキシメチルセルロースナトリウムが挙げられる。等張剤の別の例は糖アルコールであり、用語「糖アルコール」は、少なくとも1つの-OH基を有するC(4~8)炭化水素として定義される。糖アルコールの非限定例として、マンニトール、ソルビトール、イノシトール、ガラクトール、ズルシトール、キシリトール、及びアラビトールが挙げられる。等張剤は、個々に又は全体で、約0.01mg/ml~約50mg/ml、例えば、約0.1mg/ml~約20mg/mlの濃度で存在してもよい。これらの具体的な等張剤の各々を含む医薬組成物は、本発明の代替的な実施形態を構成する。

10

#### 【0144】

本発明の別の実施形態では、医薬組成物は、キレート剤を含む。キレート剤の非限定例として、クエン酸、アスパラギン酸、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)の塩、及びこれらの混合物が挙げられる。キレート剤は、個々に又は全体で、約0.01mg/ml~約50mg/ml、例えば、約0.1mg/ml~約20mg/mlの濃度で存在してもよい。これらの具体的なキレート剤の各々を含む医薬組成物は、本発明の代替的な実施形態を構成する。

20

#### 【0145】

本発明の別の実施形態では、医薬組成物は、安定剤を含む。安定剤の非限定例として、1つ以上の凝集阻害剤、1つ以上の酸化阻害剤、1つ以上の界面活性剤、及び/又は1つ以上のプロテアーゼ阻害剤が挙げられる。

#### 【0146】

本発明の別の実施形態では、医薬組成物は、安定剤を含み、前記安定剤は、カルボキシ/ヒドロキシセルロース及びその誘導体(例えば、HPC、HPC-SL、HPC-L及びHPMC)、シクロデキストリン、2-メチルチオエタノール、ポリエチレングリコール(例えば、PEG3350)、ポリビニルアルコール(PVA)、ポリビニルピロリドン、塩(例えば、塩化ナトリウム)、硫黄含有物質、例えば、モノチオグリセロール)、又はチオグリコール酸である。安定剤は、個々に又は全体で、約0.01mg/ml~約50mg/ml、例えば、約0.1mg/ml~約20mg/mlの濃度で存在してもよい。これらの具体的な安定剤の各々を含む医薬組成物は、本発明の代替的な実施形態を構成する。

30

#### 【0147】

本発明のさらなる実施形態では、医薬組成物は、1つ以上の界面活性剤、好ましくは界面活性剤、少なくとも1つの界面活性剤、又は2つの異なる界面活性剤を含む。用語「界面活性剤」は、水溶性(親水性)部分と、脂溶性(親油性)部分とから構成される任意の分子又はイオンを指す。界面活性剤は、例えば、アニオン性界面活性剤、カチオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤、及び/又は双極性イオン界面活性剤からなる群から選択することができる。界面活性剤は、個々に又は全体で、約0.1mg/ml~約20mg/mlの濃度で存在してもよい。これらの具体的な界面活性剤の各々を含む医薬組成物は、本発明の代替的な実施形態を構成する。

40

#### 【0148】

本発明のさらなる実施形態では、医薬組成物は、1つ以上のプロテアーゼ阻害剤、例えば、EDTA、及び/又は塩酸(HCl)ベンズアミジンなどを含む。プロテアーゼ阻害剤は、個々に又は全体で、約0.1mg/ml~約20mg/mlの濃度で存在してもよい。これらの具体的なプロテアーゼ阻害剤の各々を含む医薬組成物は、本発明の代替的な実施形態を構成する。

50

## 【 0 1 4 9 】

別の一般的態様では、本発明は、本発明のモノクローナル抗体又はその抗原結合断片を含む医薬組成物を生産する方法であって、モノクローナル抗体又はその抗原結合断片を薬学的に許容される担体と配合して、医薬組成物を得るステップを含む方法に関する。

## 【 0 1 5 0 】

使用方法

別の一般的態様では、本発明は、アペリンのアペリン受容体への結合を阻止する方法、であって、本発明の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法に関する。

## 【 0 1 5 1 】

アペリンに結合する抗体及びその抗原結合断片の機能的活性は、当技術分野で公知の方法及び本明細書に記載される方法によって特徴付けることができる。アペリンに結合する抗体及びその抗原結合断片を特徴付けるための方法として、以下に限定されないが、Biacore、ELISA、及びOctetRed分析を含む親和性及び特異性アッセイ;アペリン受容体へのアペリンの結合の阻止を検出するための受容体リガンド結合アッセイ;アペリンに刺激される細胞内シグナル伝達に対するmAbの中和活性を検出するための細胞ベースのアッセイが挙げられる。特定の実施形態によれば、アペリンに結合する抗体及びその抗原結合断片を特徴付けるための方法は、以下に記載されるものを含む。

10

## 【 0 1 5 2 】

別の全般的態様では、本発明は、それを必要とする対象において、糖尿病性網膜症(DR)を処置する方法であって、本発明の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法に関する。

20

## 【 0 1 5 3 】

別の全般的態様では、本発明は、それを必要とする対象において、加齢黄斑変性症(AMD)を処置する方法であって、本発明の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法に関する。

## 【 0 1 5 4 】

別の全般的態様では、本発明は、それを必要とする対象において、糖尿病性黄斑浮腫(DME)を処置する方法であって、本発明の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法に関する。

## 【 0 1 5 5 】

別の全般的態様では、本発明は、それを必要とする対象において、網膜静脈閉塞症(RVO)後の黄斑浮腫を処置する方法であって、本発明の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法に関する。

30

## 【 0 1 5 6 】

別の全般的態様では、本発明は、それを必要とする対象において、網膜変性症を処置する方法であって、本発明の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法に関する。

## 【 0 1 5 7 】

別の全般的態様では、本発明は、それを必要とする対象において、近視性脈絡膜新生血管(mCNV)の方法であって、本発明の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法に関する。

40

## 【 0 1 5 8 】

別の全般的態様では、本発明は、それを必要とする対象において、糖尿病性腎症を処置する方法であって、本発明の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法に関する。

## 【 0 1 5 9 】

別の全般的態様では、本発明は、それを必要とする対象において、慢性腎疾患(CKD)を処置する方法であって、本発明の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法に関する。

## 【 0 1 6 0 】

別の全般的態様では、本発明は、それを必要とする対象において、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)を処置する方法であって、本発明の医薬組成物を対象に投与するステップ

50

を含む方法に関する。

【0161】

別の全般的態様では、本発明は、それを必要とする対象において、肝硬変を処置する方法であって、本発明の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法に関する。

【0162】

別の全般的態様では、本発明は、それを必要とする対象において、プラーク血管新生を処置する方法であって、本発明の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法に関する。

【0163】

別の全般的態様では、本発明は、それを必要とする対象において、虹彩ルベオーシスを処置する方法であって、本発明の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法に関する。

10

【0164】

別の全般的態様では、本発明は、それを必要とする対象において、血管新生緑内障を処置する方法であって、本発明の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法に関する。

【0165】

別の全般的態様では、本発明は、それを必要とする対象において、角膜血管新生(CNV)を処置する方法であって、本発明の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法に関する。

【0166】

別の全般的態様では、本発明は、それを必要とする対象において、未熟児網膜症(ROP)を処置する方法であって、本発明の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法に関する。

20

【0167】

別の全般的態様では、本発明は、それを必要とする対象において、網膜症を処置する方法であって、本発明の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法に関する。

【0168】

別の全般的態様では、本発明は、それを必要とする対象において、黄斑変性症を処置する方法であって、本発明の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法に関する。

【0169】

別の全般的態様では、本発明は、それを必要とする対象において、卵巢過剰刺激症候群(OHSS)を処置する方法であって、本発明の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法に関する。

30

【0170】

別の全般的態様では、本発明は、それを必要とする対象において、子宮出血を処置する方法であって、本発明の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法に関する。

【0171】

別の全般的態様では、本発明は、それを必要とする対象において、子宮内膜症を処置する方法であって、本発明の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法に関する。

【0172】

別の全般的態様では、本発明は、それを必要とする対象において、子宮内膜増殖症及びがんを処置する方法であって、本発明の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法に関する。

40

【0173】

別の全般的態様では、本発明は、それを必要とする対象において、子宮平滑筋腫を処置する方法であって、本発明の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法に関する。

【0174】

別の全般的態様では、本発明は、それを必要とする対象において、腺筋腫を処置する方法であって、本発明の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法に関する。

【0175】

50

別の全般的態様では、本発明は、それを必要とする対象において、線維症を処置する方法であって、本発明の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法に関する。線維症は、例えば、病理学的及び生理学的線維症、腎線維症、心筋線維症、肝線維症、又は肺線維症から選択することができる。

#### 【0176】

別の全般的態様では、本発明は、それを必要とする対象において、がんを処置する方法であって、本発明の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法に関する。がんは、任意の液性又は固形がんであってもよく、例えば、がんは、以下に限定されないが、肺がん、胃がん、結腸がん、肝細胞がん、腎細胞がん、膀胱尿路上皮がん、胆管がん、転移性黒色腫、乳がん、卵巣がん、子宮頸がん、頭頸部がん、膵臓がん、神経膠腫、神経膠芽腫、及び他の固形腫瘍、並びに非ホジキンリンパ腫(NHL)、急性リンパ性白血病(ALL)、慢性リンパ性白血病(CLL)、慢性骨髄性白血病(CML)、多発性骨髄腫(MM)、急性骨髄性白血病(AML)、及び他の液状腫瘍から選択され得る。

#### 【0177】

ある特定の実施形態では、医薬組成物は、第2の治療用抗がん剤をさらに含む。第2の治療用抗がん剤は、例えば、抗VEGF剤であってもよい。抗VEGF剤は、例えば、アバスチン(Avastin(登録商標))又はベパシズマブバイオシミラー剤であってもよい。抗VEGF剤は、例えば、VEGFR1及び/又はVEFR2ブロック剤であってもよい。ある特定の実施形態では、抗アペリンモノクローナル抗体又はその抗原結合断片及び第2の治療用抗がん剤は、別々の製剤において同時投与される。ある特定の実施形態では、抗アペリンモノクローナル抗体又はその抗原結合断片及び第2の治療用抗がん剤は、単一の製剤において同時投与される。ある特定の実施形態では、抗アペリンモノクローナル抗体又はその抗原結合断片及び第2の治療用抗がん剤、例えば、アバスチン(Avastin(登録商標))などの抗VEGF剤を操作して、VEGFとアペリンの両方を標的とする二重特異性抗体とする。

#### 【0178】

本発明の実施形態によれば、医薬組成物は、治療有効量の抗アペリン抗体又はその抗原結合断片を含む。本明細書で使用する場合、用語「治療有効量」は、対象において、所望の生物学的又は医学的応答を誘発する、有効成分又は構成成分の量を指す。治療有効量は、記載された目的に関連して、経験的かつ慣用の方法で決定することができる。

#### 【0179】

抗アペリン抗体又はその抗原結合断片に関連して本明細書で使用する場合、治療有効量は、それを必要とする対象において、免疫応答をモジュレートする抗アペリン抗体又はその抗原結合断片の量を意味する。また、抗アペリン抗体又はその抗原結合断片に関連して本明細書で使用する場合、治療有効量は、疾患、障害、若しくは状態の処置をもたらす、疾患、障害、若しくは状態を予防するか若しくはその進行を遅延させるか、又は疾患、障害、若しくは状態に伴う症状を低減するか若しくは完全に緩和する、抗アペリン抗体又はその抗原結合断片の量を意味する。

#### 【0180】

特定の実施形態によれば、処置される疾患、障害又は状態は、糖尿病性網膜症(DR)、加齢黄斑変性症(AMD)、糖尿病性黄斑浮腫(DME)、網膜静脈閉塞症(RVO)後の黄斑浮腫、網膜変性症、近視性脈絡膜新生血管(mCNV)、糖尿病性腎症、慢性腎疾患(CKD)、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)、肝硬変、ブランク血管新生、虹彩ルベオシス、血管新生緑内障、角膜血管新生(CNV)、未熟児網膜症(ROP)、網膜症、黄斑変性症、卵巣過剰刺激症候群(OHSS)、子宮出血、子宮内膜症、子宮内膜増殖症及びがん、子宮平滑筋腫、腺筋腫、線維症(例えば、病理学的及び生理学的線維症、腎線維症、心筋線維症、肝線維症、並びに肺線維症)、並びに/又は関連する合併症である。他の特定の実施形態によれば、処置される疾患、障害又は状態は、がん、好ましくは肺がん、胃がん、結腸がん、肝細胞がん、腎細胞がん、膀胱尿路上皮がん、胆管がん、転移性黒色腫、乳がん、卵巣がん、子宮頸がん、頭頸部がん、膵臓がん、神経膠腫、神経膠芽腫、及び他の固形腫瘍、並びに非ホジキンリンパ腫(NHL)、急性リンパ性白血病(ALL)、慢性リンパ性白血病(CLL)、慢性骨髄性白血病

病(CML)、多発性骨髄腫(MM)、急性骨髄性白血病(AML)、及び他の液状腫瘍からなる群から選択されるがんである。

【0181】

特定の実施形態によれば、治療有効量は、以下の効果のうちの1つ、2つ、3つ、4つ、又はそれを超えるものを達成するのに十分な治療の量を指す:(i)処置される疾患、障害若しくは状態、又はそれに伴う症状の重症度を低減又は改善すること、(ii)処置される疾患、障害若しくは状態、又はそれに伴う症状の期間を短縮すること、(iii)処置される疾患、障害若しくは状態、又はそれに伴う症状の進行を予防すること、(iv)処置される疾患、障害若しくは状態、又はそれに伴う症状の退縮を生じること、(v)処置される疾患、障害若しくは状態、又はそれに伴う症状の進展又は発症を予防すること、(vi)処置される疾患、障害若しくは状態、又はそれに伴う症状の再発を予防すること、(vii)処置される疾患、障害、若しくは状態、又はそれに伴う症状を有する対象の入院を減少させること、(viii)処置される疾患、障害若しくは状態、又はそれに伴う症状を有する対象の入院期間を短縮させること、(ix)処置される疾患、障害若しくは状態、又はそれに伴う症状を有する対象の生存率を高めること、(xi)対象における、処置される疾患、障害若しくは状態、又はそれに伴う症状を阻害若しくは低減すること、並びに/あるいは(xii)別の治療の予防的又は治療効果を強化又は改善すること。

10

【0182】

治療有効量又は治療有効投与量は、様々な因子、例えば、処置される疾患、障害又は状態、投与の手段、標的部位、対象の生理学的状態(例えば、年齢、体重、健康を含む)、対象がヒトであるか又は動物であるか、投与される他の医薬、及び処置が予防的であるか又は治療的であるかに応じて変動し得る。処置投与量は、安全性及び有効性を最適化するように最適に用量設定される。

20

【0183】

特定の実施形態によれば、本明細書に記載の組成物は、対象への意図した投与経路に好適となるように製剤化される。例えば、本明細書に記載の組成物は、静脈内、皮下、又は筋肉内投与に好適となるよう製剤化することができる。

【0184】

本明細書で使用する場合、用語「処置する(treat)」、「処置すること(treating)」、及び「処置(treatment)」はいずれも、がん、糖尿病性網膜症(DR)の疾患、障害若しくは状態、加齢黄斑変性症(AMD)の疾患、障害若しくは状態、糖尿病性黄斑浮腫(DME)の疾患、障害若しくは状態、網膜静脈閉塞症(RVO)後の黄斑浮腫の疾患、障害若しくは状態、網膜変性症の疾患、障害若しくは状態、近視性脈絡膜新生血管(mCNV)の疾患、障害若しくは状態、糖尿病性腎症の疾患、障害若しくは状態、慢性腎疾患(CKD)の疾患、障害若しくは状態、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)の疾患、障害若しくは状態、肝硬変の疾患、障害若しくは状態、プラーク血管新生の疾患、障害若しくは状態、虹彩ルベオシスの疾患、障害若しくは状態、血管新生緑内障の疾患、障害若しくは状態、角膜血管新生(CNV)の疾患、障害若しくは状態、未熟児網膜症(ROP)の疾患、障害若しくは状態、網膜症の疾患、障害若しくは状態、黄斑変性症の疾患、障害若しくは状態、卵巣過剰刺激症候群(OHSS)の疾患、障害若しくは状態、子宮出血の疾患、障害若しくは状態、子宮内膜症の疾患、障害若しくは状態、子宮内膜増殖症及びがんの疾患、障害若しくは状態、子宮平滑筋腫の疾患、障害若しくは状態、腺筋腫の疾患、障害若しくは状態、及び/又は線維症の疾患、障害若しくは状態に関連した少なくとも1つの測定可能な物理的パラメータの改善又は好転を指すことを意図し、これは対象において必ずしも認識されとは限らないが、対象において認識可能な場合もある。用語「処置する(treat)」、「処置すること(treating)」、及び「処置(treatment)」はまた、疾患、障害、又は状態の退縮を生じること、その進行を予防すること、又は少なくともその進行速度を低下させることを指してもよい。特定の実施形態では、「処置する(treat)」、「処置すること(treating)」、及び「処置(treatment)」は、腫瘍、より好ましくはがんなどの、疾患、障害、又は状態に伴う1つ以上の症状の緩和、進展若しくは発症の予防、又はその期間の短縮を指す。特定の実施形態では、「処

30

40

50



置する(treat)」、「処置すること(treating)」、及び「処置(treatment)」は、疾患、障害、又は状態の再発の予防を指す。特定の実施形態では、「処置する(treat)」、「処置すること(treating)」、及び「処置(treatment)」は、疾患、障害、又は状態を有する対象の生存率の向上を指す。特定の実施形態では、「処置する(treat)」、「処置すること(treating)」、及び「処置(treatment)」は、対象における疾患、障害、又は状態の消失を指す。

#### 【0185】

特定の実施形態によれば、がん、糖尿病性網膜症(DR)の疾患、障害若しくは状態、加齢黄斑変性症(AMD)の疾患、障害若しくは状態、糖尿病性黄斑浮腫(DME)の疾患、障害若しくは状態、網膜静脈閉塞症(RVO)後の黄斑浮腫の疾患、障害若しくは状態、網膜変性症の疾患、障害若しくは状態、近視性脈絡膜新生血管(mCNV)の疾患、障害若しくは状態、糖尿病性腎症の疾患、障害若しくは状態、慢性腎疾患(CKD)の疾患、障害若しくは状態、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)の疾患、障害若しくは状態、肝硬変の疾患、障害若しくは状態、プラーク血管新生の疾患、障害若しくは状態、虹彩ルベオシスの疾患、障害若しくは状態、血管新生緑内障の疾患、障害若しくは状態、角膜血管新生(CNV)の疾患、障害若しくは状態、未熟児網膜症(ROP)の疾患、障害若しくは状態、網膜症の疾患、障害若しくは状態、黄斑変性症の疾患、障害若しくは状態、卵巣過剰刺激症候群(OHSS)の疾患、障害若しくは状態、子宮出血の疾患、障害若しくは状態、子宮内膜症の疾患、障害若しくは状態、子宮内膜増殖症及びがんの疾患、障害若しくは状態、子宮平滑筋腫の疾患、障害若しくは状態、腺筋腫の疾患、障害若しくは状態、及び/又は線維症の疾患、障害若しくは状態の処置において使用される組成物は、別の処置と組み合わせて使用され得る。がんの処置では、組成物は、以下に限定されないが、化学療法、アバスチン(AVASTIN(登録商標))などのVEGF/VEGFR1/VEGFR2軸を阻止する療法、抗CD20 mAb、抗CTLA-4抗体、抗LAG-3 mAb、抗EGFR mAb、抗HER-2 mAb、抗CD19 mAb、抗CD33 mAb、抗CD73 mAb、抗CD47 mAb、抗DLL-3 mAb、抗アペリンmAb、抗TIP-1 mAb、抗CLDN18.2 mAb、抗FOLR1 mAb、抗PD-L1抗体、抗PD-1抗体、PD-1/PD-L1療法、又は他のがん免疫薬(immuno-oncology drug)、標的治療、抗血管新生薬、放射線療法、又は他の抗がん薬などの別の処置と組み合わせて使用され得る。抗アペリン抗体を、VEGF、アンジオポエチン-2(ANG-2)、ロイシンリッチアルファ-2-グリコプロテイン1(LRG1)、CD73、PD-1、PD-L1、LAG-3、TIM-3、CTLA-4、EGFR、HER-2、CD19、CD20、CD33、CD47、DLL3、クローディン18.2、TIP-1、CD3、PDGF、VI型コラーゲン受容体、TGF-β受容体、LOXL2、p75ニュートロフィン受容体(NGFR p75)、インスリン様成長因子2受容体(IGF2R)に対するパートナーmAb、及び/又はがん/腫瘍を処置するための腫瘍表面抗原に対する他のmAbと共に使用して二重特異性抗体を構築することができる。糖尿病性網膜症(DR)、加齢黄斑変性症(AMD)、及び/又は糖尿病性黄斑浮腫(DME)の処置のために、以下に限定されないが、VEGFブロッカー(例えば、ラニビズマブ(LUCENTIS(登録商標)))、アフリベルセプト(EYLEA(登録商標)、コンベルセプト)又は別の抗DR、抗AMD、及び/又は抗DME薬などの別の処置と組み合わせて、組成物を使用することができる。抗アペリン抗体を、VEGF、ANG-2に対するパートナーmAb、並びに/又はDR、AMD、及び/若しくはDME特異的抗原に対する他のmAbと共に使用して二重特異性抗体を構築し、アペリンと特異的DR、AMD、及び/又はDME抗原の両方を発現するDR、AMD、及び/若しくはDMEを処置することができる。

#### 【0186】

本明細書で使用する場合、対象への2つ以上の治療の施行の文脈における、用語「組み合わせて」は、2つ以上の治療の使用を指す。用語「組み合わせて」の使用は、治療が対象に施行される順序を限定するものではない。例えば、第1の治療(例えば、本明細書に記載の組成物)を、対象への第2の治療の施行前に(例えば、5分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、12時間、16時間、24時間、48時間、72時間、96時間、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、8週間、又は12週間前に)、施行と同時に、又は施行後に(例えば、5分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、12

10

20

30

40

50

時間、16時間、24時間、48時間、72時間、96時間、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、8週間、又は12週間後に)施行することができる。

【0187】

別の一般的態様では、本発明は、対象におけるアペリンのレベルを決定する方法に関する。本方法は、(a)対象から試料を得るステップ;(b)試料を本発明の抗体又はその抗原結合断片と接触させるステップ;及び(c)対象におけるアペリンのレベルを決定するステップを含む。

【0188】

本明細書で使用する場合、「試料」は、対象から単離された生体試料を指し、以下に限定されないが、全血、血清、血漿、血液細胞、内皮細胞、組織生検(例えば、がん組織、肝組織など)、リンパ液、腹水液、間質液、骨髓、脳脊髄液、唾液、粘液、痰、汗、尿、又は任意の他の分泌物、排せつ物、又は他の体液を挙げることができる。「血液試料」は、全血又は血液細胞、血清、及び血漿を含むその任意の画分を指す。

【0189】

ある特定の実施形態では、対象におけるアペリンのレベルは、以下に限定されないが、ウエスタンブロットアッセイ、ELISAアッセイ、及び/又はラジオイムノアッセイ(RIA)から選択されるアッセイを利用して決定することができる。相対的なタンパク質レベルは、ウエスタンブロット分析、及び免疫組織化学(IHC)を利用することによって決定することができる。絶対的なタンパク質レベルは、ELISAアッセイ又はRIAアッセイを利用して決定することができる。アペリンの相対的レベルを決定する場合、アペリンのレベルは、少なくとも2つの試料間、例えば、同じ対象由来の異なる時点における試料間、同じ対象の異なる組織由来の試料間、及び/又は異なる対象由来の試料間で決定することができる。あるいは、アペリンの絶対的レベルを、例えばELISAアッセイによって決定する場合、試料中のアペリンの絶対的レベルは、試料を試験する前に、ELISAアッセイについての標準を作成することによって決定することができ、RIAアッセイを利用する場合は、試料中のアペリンの絶対的レベルは、試料を放射標識されたアペリン及び公知の量の本発明の抗体又はその抗原結合断片と混合してそれらを結合させ、結合したアペリン(放射標識されたもの及び天然のものを含む)を遊離の(結合していない)もの(これも放射標識されたもの及び天然のものを含む)から分離し、遊離の(結合していない)アペリンの放射活性を測定することによって決定することができる。当業者であれば、本発明の抗体又はその抗原結合断片を利用して、対象由来の試料中のアペリンのレベルを決定するために、どの分析技法を利用するかを理解するであろう。

【0190】

対象由来の試料中のアペリンのレベルを決定する方法を利用することによって、疾患における異常な(上昇した、低減した、又は不十分な)アペリンのレベルの診断につながり、適切な治療上の決定をすることができる。このような疾患は、以下に限定されないが、心血管疾患、心不全、糖尿病、肥満、糖尿病性網膜症(DR)、加齢黄斑変性症(AMD)、糖尿病性黄斑浮腫(DME)、網膜静脈閉塞症(RVO)後の黄斑浮腫、網膜変性症、近視性脈絡膜新生血管(mCNV)、糖尿病性腎症、慢性腎疾患(CKD)、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)、肝硬変、プラーク血管新生、虹彩ルベオシス、血管新生緑内障、角膜血管新生(CNV)、未熟児網膜症(ROP)、網膜症、黄斑変性症、卵巣過剰刺激症候群(OHSS)、子宮出血、子宮内膜症、子宮内膜増殖症及びがん、子宮平滑筋腫、腺筋腫、線維症(例えば、病理学的及び生理学的線維症、腎線維症、心筋線維症、肝線維症、並びに肺線維症)、及び/又はがんから選択され得る。さらに、対象におけるアペリンのレベルをモニターすることによって、特定の疾患におけるアペリンのレベルについての知識に基づいて及び/又は特定の疾患の進行の間に、上記で示されている疾患を発症するリスクを決定することができる。

【0191】

実施形態

本発明は、以下の非限定的実施形態も提供する。

【0192】

10

20

30

40

50

実施形態1は、

- (1)それぞれ、配列番号168、169、170、171、102、及び172；
- (2)それぞれ、配列番号50、51、52、110、111、及び112；
- (3)それぞれ、配列番号173、174、175、176、114、及び115；
- (4)それぞれ、配列番号68、177、178、128、129、及び130；
- (5)それぞれ、配列番号74、75、76、134、135、及び136；
- (6)それぞれ、配列番号179、78、180、137、138、及び139；
- (7)それぞれ、配列番号83、84、85、143、144、及び145；
- (8)それぞれ、配列番号86、87、88、146、147、及び148；
- (9)それぞれ、配列番号89、90、91、149、150、及び151；
- (10)それぞれ、配列番号92、93、94、152、153、及び154；
- (11)それぞれ、配列番号95、96、97、155、156、及び157；又は
- (12)それぞれ、配列番号98、99、100、158、159、及び160；

10

のポリペプチド配列を有する重鎖相補性決定領域1(HCDR1)、HCDR2、HCDR3、軽鎖相補性決定領域1(LCDR1)、LCDR2、及びLCDR3を含み、アペリン、好ましくはヒトアペリンに特異的に結合する、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片である。

#### 【0193】

実施形態2は、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、若しくは39と少なくとも95%同一であるポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、又は配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、若しくは40と少なくとも95%同一であるポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域を含む、実施形態1の単離されたモノクローナル抗体又は抗原結合断片である。

20

#### 【0194】

実施形態3は、

- (a)配列番号1のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号2のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域；
- (b)配列番号3のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、配列番号4のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域；
- (c)配列番号5のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、配列番号6のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域；
- (d)配列番号7のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、配列番号8のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域；
- (e)配列番号9のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、配列番号10のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域；
- (f)配列番号11のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、配列番号12のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域；
- (g)配列番号13のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、配列番号14のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域；
- (h)配列番号15のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、配列番号16のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域；
- (i)配列番号17のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、配列番号18のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域；
- (j)配列番号19のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、配列番号20のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域；
- (k)配列番号21のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、配列番号22のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域；
- (l)配列番号23のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、配列番号24のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域；
- (m)配列番号25のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、配列番号26のポリペプチド

30

40

50

配列を有する軽鎖可変領域;

(n)配列番号27のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、配列番号28のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域;

(o)配列番号29のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、配列番号30のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域;

(p)配列番号31のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、配列番号32のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域;

(q)配列番号33のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、配列番号34のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域;

(r)配列番号35のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、配列番号36のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域;

(s)配列番号37のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、配列番号38のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域;又は

(t)配列番号39のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、配列番号40のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域

を含む、実施形態1又は2の単離されたモノクローナル抗体又は抗原結合断片である。

【0195】

実施形態4は、配列番号188のアミノ酸配列を含むエピトープに特異的に結合する、アペリンに対する単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片である。

【0196】

実施形態5は、配列番号204のアミノ酸配列を含むエピトープに特異的に結合する、アペリンに対する単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片である。

【0197】

実施形態6は、アペリン活性を阻害する、実施形態4又は5の単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片である。

【0198】

実施形態7は、ピロ-アペリン-13、アペリン-13、アペリン-17、アペリン-36、アペリン-55、及び/又はアペリン-13と同一のC末端を有するアペリンの他の形態に結合することが可能である、実施形態4の単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片である。

【0199】

実施形態8は、アペリン-13及び/又はピロ-アペリン-13に結合することが可能である、実施形態5の単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片である。

【0200】

実施形態9は、キメラである、実施形態1から8のいずれか1つの単離されたモノクローナル抗体又は抗原結合断片である。

【0201】

実施形態10は、ヒトの又はヒト化されたものである、実施形態1から9のいずれか1つの単離されたモノクローナル抗体又は抗原結合断片である。

【0202】

実施形態11は、

a.配列番号211のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号215のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域;

b.配列番号212のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号215のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域;

c.配列番号213のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号215のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域;

d.配列番号214のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号215のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域;

e.配列番号213のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号216のポリペ

10

20

30

40

50

プチド配列を有する軽鎖可変領域;

f.配列番号214のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号216のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域;

g.配列番号217のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号219のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域;又は

h.配列番号218のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号220のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域

を含む、実施形態10の単離されたモノクローナル抗体又は抗原結合断片である。

【0203】

実施形態12は、実施形態1から11のいずれか1つのモノクローナル抗体又は抗原結合断片をコードする、単離された核酸である。

【0204】

実施形態13は、実施形態12の単離された核酸を含むベクターである。

【0205】

実施形態14は、実施形態13のベクターを含む宿主細胞である。

【0206】

実施形態15は、実施形態1から11のいずれか1つの単離されたモノクローナル抗体又は抗原結合断片及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物である。

【0207】

実施形態16は、それを必要とする対象において、アペリンのアペリン受容体への結合を阻止する方法であって、実施形態15の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法である。

【0208】

実施形態17は、それを必要とする対象において、糖尿病性網膜症(DR)を処置する方法であって、実施形態15の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法である。

【0209】

実施形態18は、それを必要とする対象において、加齢黄斑変性症(AMD)を処置する方法であって、実施形態15の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法である。

【0210】

実施形態19は、それを必要とする対象において、糖尿病性黄斑浮腫(DME)を処置する方法であって、実施形態15の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法である。

【0211】

実施形態20は、それを必要とする対象において、網膜静脈閉塞症(RVO)後の黄斑浮腫を処置する方法であって、実施形態15の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法である。

【0212】

実施形態21は、それを必要とする対象において、網膜変性症を処置する方法であって、実施形態15の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法である。

【0213】

実施形態22は、それを必要とする対象において、近視性脈絡膜新生血管(mCNV)を処置する方法であって、実施形態15の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法である。

【0214】

実施形態23は、それを必要とする対象において、糖尿病性腎症を処置する方法であって、実施形態15の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法である。

【0215】

実施形態24は、それを必要とする対象において、慢性腎疾患(CKD)を処置する方法であって、実施形態15の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法である。

【0216】

実施形態25は、それを必要とする対象において、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)を

10

20

30

40

50

処置する方法であって、実施形態15の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法である。

【0217】

実施形態26は、それを必要とする対象において、肝硬変を処置する方法であって、実施形態15の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法である。

【0218】

実施形態27は、それを必要とする対象において、プラーク血管新生を処置する方法であって、実施形態15の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法である。

【0219】

実施形態28は、それを必要とする対象において、虹彩ルペオーシスを処置する方法であって、実施形態15の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法である。

10

【0220】

実施形態29は、それを必要とする対象において、血管新生緑内障を処置する方法であって、実施形態15の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法である。

【0221】

実施形態30は、それを必要とする対象において、角膜血管新生(CNV)を処置する方法であって、実施形態15の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法である。

【0222】

実施形態31は、それを必要とする対象において、未熟児網膜症(ROP)を処置する方法であって、実施形態15の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法である。

20

【0223】

実施形態32は、それを必要とする対象において、網膜症を処置する方法であって、実施形態15の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法である。

【0224】

実施形態33は、それを必要とする対象において、黄斑変性症を処置する方法であって、実施形態15の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法である。

【0225】

実施形態34は、それを必要とする対象において、卵巢過剰刺激症候群(OHSS)を処置する方法であって、実施形態15の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法である。

【0226】

実施形態35は、それを必要とする対象において、子宮出血を処置する方法であって、実施形態15の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法である。

30

【0227】

実施形態36は、それを必要とする対象において、子宮内膜症を処置する方法であって、実施形態15の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法である。

【0228】

実施形態37は、それを必要とする対象において、子宮内膜増殖症及びがんを処置する方法であって、実施形態15の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法である。

【0229】

実施形態38は、それを必要とする対象において、子宮平滑筋腫を処置する方法であって、実施形態15の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法である。

40

【0230】

実施形態39は、それを必要とする対象において、腺筋腫を処置する方法であって、実施形態15の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法である。

【0231】

実施形態40は、それを必要とする対象において、がんを処置する方法であって、実施形態15の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法である。

【0232】

実施形態41は、医薬組成物が、第2の抗がん剤をさらに含む、実施形態40の方法である。

50

## 【 0 2 3 3 】

実施形態42は、第2の抗がん剤が、抗VEGF剤である、実施形態41の方法である。

## 【 0 2 3 4 】

実施形態43は、抗VEGF剤が、アバスチン(AVASTIN(登録商標))又はベバシズマブバイオシミラー剤である、実施形態42の方法である。

## 【 0 2 3 5 】

実施形態44は、抗VEGF剤が、VEGFR1及び/又はVEGFR2ブロッカーである、実施形態42の方法である。

## 【 0 2 3 6 】

実施形態45は、がんが、肺がん、胃がん、結腸がん、肝細胞がん、腎細胞がん、膀胱尿路上皮がん、胆管がん、転移性黒色腫、乳がん、卵巣がん、子宮頸がん、頭頸部がん、膵臓がん、神経膠腫、神経膠芽腫、及び他の固形腫瘍、並びに非ホジキンリンパ腫(NHL)、急性リンパ性白血病(ALL)、慢性リンパ性白血病(CLL)、慢性骨髄性白血病(CML)、多発性骨髄腫(MM)、急性骨髄性白血病(AML)、及び他の液性腫瘍からなる群から選択される、実施形態40から44のいずれか1つの方法である。

10

## 【 0 2 3 7 】

実施形態46は、がんが、胆管がんである、実施形態45の方法である。

## 【 0 2 3 8 】

実施形態47は、それを必要とする対象において、組織線維症を処置する方法であって、実施形態15の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法である。

20

## 【 0 2 3 9 】

実施形態48は、対象におけるアペリンのレベルを決定する方法であって、(a)対象から試料を得るステップ;(b)試料を実施形態1から11のいずれか1つの抗体又は抗原結合断片と接触させるステップ;及び(c)対象におけるアペリンのレベルを決定するステップを含む方法である。

## 【 0 2 4 0 】

実施形態49は、試料が、組織試料である、実施形態48の方法である。

## 【 0 2 4 1 】

実施形態50は、組織試料が、がん組織試料である、実施形態49の方法である。

## 【 0 2 4 2 】

実施形態51は、組織試料が、肝組織試料である、実施形態49の方法である。

30

## 【 0 2 4 3 】

実施形態52は、組織試料が、腎組織試料である、実施形態49の方法である。

## 【 0 2 4 4 】

実施形態53は、実施形態1から11のいずれか1つのモノクローナル抗体又は抗原結合断片を生産する方法であって、モノクローナル抗体又は抗原結合断片を産生する条件下で、モノクローナル抗体又は抗原結合断片をコードする核酸を含む細胞を培養するステップ、及び細胞又は培養物から抗体又は抗原結合断片を回収するステップを含む、方法である。

## 【 0 2 4 5 】

実施形態54は、実施形態1から11のいずれか1つのモノクローナル抗体又は抗原結合断片を含む医薬組成物を生産する方法であって、モノクローナル抗体又は抗原結合断片を薬学的に許容される担体と配合して、医薬組成物を得るステップを含む、方法である。

40

## 【実施例】

## 【 0 2 4 6 】

## [実施例1]

抗アペリンモノクローナル抗体の特定

KLHキャリアタンパク質にコンジュゲートしたCys-アペリン-17(N末端に付加されたシステインを有する;C-KFRRQRPRLSHKGMPF(配列番号161))及びpyr-アペリン-13-Cys(C末端に付加されたシステインを有するアペリン-13のピログルタミル化形態;pE-RPRLSHKGMPF-C(配列番号162))ペプチドで、ウサギを免疫化した。ウサギmAbを作製するた

50

めに、免疫化したウサギの全血からPBMCを単離し、抗原特異的B細胞を96ウェルプレートで増殖させた。B細胞培養上清の抗原結合ELISAスクリーニングによって、pyr-アペリン-13(アペリン-13のピログルタミル化形態;pE-RPRLSHKGPMPF(配列番号163))-反応性抗体を分泌するB細胞を特定した。高結合ELISAプレートを1  $\mu\text{g/ml}$ のカーボネートコーティング緩衝液(pH9.6)中のpyr-アペリン-13で終夜コーティングした。TBS中1% BSAでプレートをブロッキングした後、希釈したB細胞培養上清(1から10倍の希釈液)を添加し、プレートを室温で90分間インキュベートした。ウサギ抗体をpyr-アペリン-13に結合させた後、アルカリホスファターゼにコンジュゲートしたヤギ抗ウサギIgG Fcを添加し、PNPP基質を添加することによって抗体抗原結合を検出し、405nmでELISAプレートの吸光度を読み取った。pyr-アペリン-13-Cys(pE-RPRLSHKGPMPF-C(配列番号162))、Cys-(Q)アペリン-13(CQRPLSHKGPMPF(配列番号164))、及びCys-アペリン-17(CKFRRQRPRLSHKGPMPF(配列番号161))ペプチドへの抗体の示差的結合によって、pyr-アペリン-13へのウサギ抗体の結合をさらに確認した。抗アペリン-13ウサギモノクローナル抗体をクローン化するために、ウサギIgG cDNAを特定したB細胞から調製した全RNAから作製し、PCRによって増幅させ、次いで、発現ベクター中にクローニングした。

10

【0247】

重鎖及び軽鎖の可変領域をシーケンシングした。抗アペリンmAbの重鎖及び軽鎖可変領域の配列を、それぞれ、表1及び表2に列挙する。これらのmAbの重鎖及び軽鎖CDRの配列を、それぞれ、表3及び表4に列挙する。抗アペリンmAbについての重鎖及び軽鎖CDRは、Kabatの方法を利用して決定した。

20

【0248】

30

40

50



【表 1】

表1: 抗アペリンモノクローナル抗体(mAb)についての重鎖可変領域の配列

mAb クローン	VH
C8	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGIDLYSNRMSWVRQAPGKGLEWIGSI GSSPWYASWAQGRFTISKTSSTTVNLKITSPTTEDTATYFCAKGGYRPGA SVWGPGLTVTVSS (配列番号1)
C24	QSLEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGIDLYTNRVSWVRQAPGKGLDWIGSI GSSPWYASWAQGRFTISKTSSTTVNLKITSSTTEDTATYFCAKGGYRPGGS IWGPGLTVTVSS (配列番号3)
C25	QSLEESGGGLVTPGTPLTLTCTVSGIDLYTNRMSWVRQAPGKGLEWIGSI GSSPWFASWALGRFTISKTSSTTVNLKITSPTTEDTATYFCAKGGYRPGAS VWGPGLTVTVSS (配列番号5)
C7	QSLEESGGRLAKPDETLTLTCTVSGIDLNSHAMDWVRQAPGKGLEWIGVI APDTRTYATWARGRFTISKTSSTSVELKMTSLTTEDTATYFCAAYPIEPG ANIWGPGLTVTVSS (配列番号7)
C6	QSLEESGGRLVKPDETLTLTCTVSGIDLSNYAMDWVRQAPGKGLEWIGVI APNRRTYYPTWARGRFTISKTSSTTVDLKMTSLTTEDTATYFCATYPIEPG ANIWGPGLTVTVSS (配列番号9)
C1	QSLEESGGRLVTPGGSLTLTCTVSGFSLSSYAMDWVRQAPGKGLEWIGVI APNGATYYPTWARGRFTISKTSSTTVDLKMTSLTAADTATYFCATYPIDAGA NIWGPGLTVTVSS (配列番号11)
C16	QSLEESGGRLVTPGGSLTLTCTVSGIDLNSYAMDWVRQAPGKGLEWIGVI APNHYYTYPTWARGRFTISKTSSTTVDLKMTRLTTEDTATYFCATYPIESGS NIWGPGLTVTVSS (配列番号13)
C20	QSLEESGGRLVTPGGSLTLTCTVSGIDLNNYAIDWVRQAPGKGLEWIGVIA PNHYTCYPTWARGRFTISKTSSTTVDLKMTSLTTEDTATYFCAAYPIETGSNI WGPGLTVTVSS (配列番号15)
C22	QSLEESGGRLVTPGGSLTLTCTVSGIDLNNYAMDWVRQAPGKGLEWIGVI APNHYYTYPTWARGRFTISKTSSTTVDLKMTSLTTEDTATYFCATYPIETGS NIWGPGLTVTVSS (配列番号17)
C10	QSLEESGGRLVTPGGSLTLTCTVSGIDLNSYAIDWVRQAPGKGLEWIGVIA PSGTTYPTWAKGRFTISKTSSTTVDLKVTGLTTEDTATYFCAAYPIDPGSNI WGPGLTVTVSS (配列番号19)
C12	QSLEESGGRLVTPGGSLTLTCTVSGIDLSSYAIDWVRQAPGKGLEWIGVIA PSSTYYPTWAKGRFTISKTSSTTVDLKVIGLTTEDTATYFCAAYPIDPGSN VWGPGLTVTVSS (配列番号21)
C13	QSLEESGGRLAKPGETLTLTCTVSGIDLNSHAVDWVRQAPGKGLEWIGVI GPGGNTYYASWAKGRFTISKTSSTTVDLKMTSLTAEDTATFFCATYPIYSG DNIWGPGLTVTVSS (配列番号23)
C14	QSPEESGGRLVTPGGSLTLTCKISGVDLSNYAMDWVRQAPGKGLEWIGVI APNDATYYPTWARGRLTISKTSSTTVDLKMTRLTTEDTATYFCAAYPIDVGA NVWGPGLTVTVSS (配列番号25)

10

20

30

40

50

C11	QSLEESGGRLVSPGGSLLTCTVSGIDLSSHAMDWVRQAPGKGLEWIGVI APNDATYYPTWARGRFTISKSTTVGLKMTRLTTEDTATYFCAAYPIDAGA NVWGPGLTVTVSS (配列番号27)
C4	QEQLQSGGGAEGGLVKPGGSLELCCASGFTLSSSYWICWVRQAPGK GLEWIGCIHYGSSGTAYYASWVNGRFTLSRDIDQSTGCLQLNSLTAADTA MYCARFLSDMYYYNLWGPGLTVTVSS (配列番号29)
C5	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLSGAWMNWVRQAPGKGLEWIG VVSSDDNIYYADWAKGRFTISKSTTVDLKLTSPTTEDTATYFCARNLGTI WGPGLTVTVSS (配列番号31)
C9	QEQLLEESGGDLVKPEGSLLTCTASGFSFSSSYWICWVRQAPGKGLEWI ACIQSGDGRTWYASWAEGRFTISKSTPTTVTLQMASLTAADTATYFCAR CPHNTYSHFDLWGPSTLTVTVSS (配列番号33)
C26	QEQLLEESGGGLVQPEGSLLTCTASGFTLSNYWMSWVRQAPGKGLVWI GCIDIGSDDTYASWAKGRFTISRTSSTTVTLQVTSLTAADTATYFCARSG GLWGPGLTVTVSS (配列番号35)
C27	QSVEESGGRLVTPGGSLLTCTVSGIDLINAWMNWVRQAPGKGLEWIGT TTDDDTIYYANWAKGRFTISRTSTTVDLKVTSLTSEDATYFCSKGRIWGP GTLTVTVSL (配列番号37)
C17	QSVEESGGRLVKPDETLTLCAVSGIDLSSNAMNWVRQAPGEGLEWIGS MYTDGTTYANWAKGRFTISRASSTTVDLKMTSLTAADTATYFCARGDIW GPGTLTVTVSS (配列番号39)

10

20

VH:重鎖可変領域

【 0 2 4 9 】

30

40

50

【表 2】

表2: 抗アペリンmAbについての軽鎖可変領域の配列

mAb クローン	VL
C8	QVLTQTESPVSAVGGTVTIACQSSQSVYDNNDLAWYQQKAGQTPKRLIY LASSLD SGVPSRFKSGSGTEFTLTISDLECDAAATYYCAGGYSGDIYTFG GGTEVVVE (配列番号2)
C24	QVLTQSASPVSAAVGDSVTIACQSSQSVYDNNDLGWYQQKPGQTPKRLI YLASSLD SGVPSRFSGSGGTQFTLTISDLECDAAATYYCAGGYSGDIYTF GGGTEVVVK (配列番号4)
C25	QVLTQTESPVSAVGGTVTIACQSSQSVYDNNDLAWYQQKAGQTPKRLIF LASSLD SGVPSRFKSGSGTEFTLTISDLECDAAATYYCAGGYNGDIYTF GGGTEVVVK (配列番号6)
C7	DPVLTQTPSPVSAVGGTVTIGCQASESVDYNNQLSWYQQKPGQAPKRL MYVSTLD SGVPSRFKSGSGTQFTLTISDLECDAAATYYCQGGYPYNIY PFGGGTEVVVK (配列番号8)
C6	DPVLTQTPSPVSAVGGTVTIGCQSSESVDYNNQLSWYQQKPGQPPKRL MYVSTLD SGVPSRFKSGSGTQFTLTISDLECDAAATYYCQGGYISNIYP FGGGTEVVVK (配列番号10)
C1	DPVLTQTPSSVSAVGGTVTIGCQSSESVDNNQLSWYQQKSGQPPKRL MYVSTLD SGVPSRFKSGSGTHFTLTISGVQCDAATYYCQGGYISNLY PFGGGTEVVVK (配列番号12)
C16	DPVLTQTPSSVSAVGGTVTIGCQSSESVMNNQLSWYQQKPGQPPKRL MYVSTLD SGVPSRFKSGSGTQFSLTISDLECDAGTYCQGGYISNLY PFGGGTEVVVK (配列番号14)
C20	DPMLTQTPSSVSAVGGTVTISCQSSESVDMMNNQLSWYQQKPGQPPKRL MYVSTLD SGVPSRFKSGSGIHFTLTISDLECADAGTYCQGGYISNLYP FGGGTEVVVK (配列番号16)
C22	DPVLTQTPSSVSAVGGTVTISCQSSESVDMMNNQLSWYHQKSGQPPKRL MYVSTLD SGVPSRFKSGSGTQFTLTISGVQCDDAGTYCQGGYISNLY PFGGGTEVVVK (配列番号18)
C10	DPVLTQTPSSVSAVGGTATIGCQSSESVDYGNQLSWYQQKPGQPPKRL AYVSTLD AGVPSRFKSGSGTQFTLTISDLECDAAATYYCQGGYISNLYP FGGGTEVVVK (配列番号20)
C12	DPVLTQTPSSVSAVGGTVTIGCQSSESVDYGNQLSWYQQKPGQPPKRL TYVSTLD AGVPSRFKSGSGTQFTLTISDLECDAAATYYCQGGYISNLYP FGGGTEVVVK (配列番号22)
C13	DPVLTQTPSSVSAVGGTVTINCQSSESVDNNQLSWYQQKVGQPPKRL MYASTLD SGVPSRFKGGSGTHFTLTITDLECDAAATYYCQGGTATNIY PFGGGTEVVVK (配列番号24)
C14	DPMLTQTASPVSAVGGTVTINCQSSESVDYNNQLSWYQQKPGQPPKRL MYVSTLD SGVPSRFKSGSGTQFSLTISDLECDAGTYCQGGYISNLY PFGGGTEVVVK (配列番号26)

10

20

30

40

50

C11	DPMLTQTASPVSAHVGGTVTINCQSSESVDYNNQLSWYQQKPGQPPKRL MYVSTLD SGVPSRFKGS GSGTQFSLTISDLECDAGTYCQGGYISNLY PFGGGTEVVVK (配列番号28)
C4	QVLTQTPASVSAAVGGTVTINCQASQSIYNNQLSWYQQKPGQPPKLLIY YASTLASGVSSRFKGS GSGTQFTLTISGVQCDDAATYYCQGGFNCRSAD CHAFGGGTEVVVK (配列番号30)
C5	QVLTQTESPVSAAVGGTVTINCQSSQSVWSNYLSWFQQKPGQPPKVLIIY GTSKLPSGVPSRFSGSGSGTEFTLTINDLECD AATYYCAGGYSGHIYSF GGGTEVVVK (配列番号32)
C9	ADIVMTQTPASVEAAVGGTVTIKCQASQSINSWLSWYQQKPGQPPKPLIY GASNLASGVPSRFKGS GSGTQFTLTISDLECD AATYSCLGYYYSSYNSV GFWAFGGGTEVVVK (配列番号34)
C26	QVLTQTPSSTSAAVGGTVTINCQASQSVYNNNDLAWYQQKPGQPPKRLI YEASKLASGVPSRFSGSGSGTQFTLTISDLECD AATYYCAGGWSGNFY VFGGGTEVVVK (配列番号36)
C27	QVLTQTPASVSAAVGGTVTINCQASQSVYDGNWLCWYQQKPGQPPKRLI YKASTLES GVP SRFKGS GSGTQFTLTISDLECD AATYYCQGGFTSNIYPF AGGTEVVVK (配列番号38)
C17	QVLTQTASPVSAAVGGTVTISCQSSQSVYNNNWLAWFQQKPGQPPKRLI YGTSELASGVPSRFKGS GSGTQFTLTISGVQCDDAATYYCLGTYSNIHV FGGGTEVVVK (配列番号40)

10

20

VL:軽鎖可変領域

【 0 2 5 0 】

30

40

50

## 【表 3】

表3: 抗アペリンmAbについての重鎖のCDR領域1~3

mAb クローン	HC		
	CDR1 (配列番号)	CDR2 (配列番号)	CDR3 (配列番号)
C8	SNRMS (41)	SIGSSPWYASWAQG (42)	GGYRPGASV (43)
C24	TNRVS (44)	SIGSSPWYASWAQG (45)	GGYRPGGSI (46)
C25	TNRMS (47)	SIGSSPWFASWALG (48)	GGYRPGASV (49)
C7	SHAMD (50)	VIAPDTRTYATWARG (51)	YPIEPGANI (52)
C6	NYAMD (53)	VIAPNRRTYYPTWARG (54)	YPIEPGANI (55)
C1	SYAMD (56)	VIAPNGATYYPTWARG (57)	YPIDAGANI (58)
C16	SYAMD (59)	VIAPNHYYTYPTWARG (60)	YPIESGSNI (61)
C20	NYAID (62)	VIAPNHYYTCYPTWARG (63)	YPIETGSNI (64)
C22	NYAMD (65)	VIAPNHYYTYPTWARG (66)	YPIETGSNI (67)
C10	SYAID (68)	VIAPSGTTYPTWAKG (69)	YPIDPGSNI (70)
C12	SYAID (71)	VIAPSSTTYPTWAKG (72)	YPIDPGSNV (73)
C13	SHAVD (74)	VIGPGGNTYYASWAKG (75)	YPIYSGDNI (76)
C14	NYAMD (77)	VIAPNDATYYPTWARG (78)	YPIDVGANV (79)
C11	SHAMD (80)	VIAPNDATYYPTWARG (81)	YPIDAGANV (82)
C4	SSYWIC (83)	CIHYGSSGTAYYASWVNG (84)	FLSDMYYYNL (85)
C5	GAWMN (86)	VVSSDDNIYYADWAKG (87)	NLGTI (88)
C9	SSYWIC (89)	CIYQSGDGRTWYASWAEG (90)	CPHNTYSHFDL (91)
C26	NYWMS (92)	CIDIGSDDTYASWAKG (93)	SGGL (94)
C27	NAWMN (95)	TTTDDDTIYYANWAKG (96)	GRI (97)
C17	SNAMN (98)	SMYTDGTTYANWAKG (99)	GDI (100)

HC: 重鎖; CDR: 相補性決定領域

抗アペリンmAbについてのHC CDRを、IMGT法(Lefranc, M.-P.ら、Nucleic Acids Res. 1999; 27:209-212)を使用して決定した。

【 0 2 5 1 】

10

20

30

40

50

## 【表 4】

表4: 抗アペリンmAbについての軽鎖のCDR領域1~3

mAb クローン	LC		
	CDR1 (配列番号)	CDR2 (配列番号)	CDR3 (配列番号)
C8	QSSQSVYDNNDLA (101)	LASSLDS (102)	AGGYSGDIYT (103)
C24	QSSQSVYDNNDLG (104)	LASSLDS (105)	AGGYSGDIYT (106)
C25	QSSQSVYDNNDLA (107)	LASSLDS (108)	AGGYNGDIYT (109)
C7	QASESVDYNNQLS (110)	YVSTLDS (111)	QGGYPYNIYP (112)
C6	QSSESVDYNNQLS (113)	YVSTLDS (114)	QGGYISNIYP (115)
C1	QSSESVDNNNQLS (116)	YVSTLDS (117)	QGGYISNLYP (118)
C16	QSSESVGMNNQLS (119)	YVSTLDS (120)	QGGYISNLYP (121)
C20	QSSESVDMNNQLS (122)	YVSTLDS (123)	QGGYISNLYP (124)
C22	QSSESVDMNNQLS (125)	YVSTLDS (126)	QGGYISNLYP (127)
C10	QSSESVDYGNQLS (128)	YVSILDA (129)	QGGYISNLYP (130)
C12	QSSESVDYGNQLS (131)	YVSILDA (132)	QGGYISNLYP (133)
C13	QSSESVDNNNQLS (134)	YASTLDS (135)	QGGTATNIYP (136)
C14	QSSESVDYNNQLS (137)	YVSTLDS (138)	QGGYISNLYP (139)
C11	QSSESVDYNNQLS (140)	YVSTLDS (141)	QGGYISNLYP (142)
C4	QASQSIYNNNQLS (143)	YASTLAS (144)	QGGFNCRSADCHA (145)
C5	QSSQSVWSNYLS (146)	GTSKLPS (147)	AGGYSGHIYS (148)
C9	QASQSINSWLS (149)	GASNLAS (150)	LGYYYSSYNSVGFWA (151)
C26	QASQSVYNNNDLA (152)	EASKLAS (153)	AGGWSGNFYV (154)
C27	QASQSVYDGNWLC (155)	KASTLES (156)	QGGFTSNIYP (157)
C17	QSSQSVYNNNNWLA (158)	GTSELAS (159)	LGTYSSNIHV (160)

LC: 軽鎖; CDR: 相補性決定領域

抗アペリンmAbに関するLC CDRを、IMGT法(Lefranc, M.-P.ら、Nucleic Acids Res. 1999; 27:209-212)を使用して決定した。

## 【 0 2 5 2 】

## [実施例2]

## 組換えmAbの生産及び精製

組換え抗アペリンウサギmAbを得るために、ウサギIgG cDNAを含有する発現ベクターをHEK293細胞へと一過性トランスフェクトした。組換え抗体を、これらのHEK293細胞の懸濁液中で生産し、プロテインA親和性クロマトグラフィーを使用して精製した。

## 【 0 2 5 3 】

## [実施例3]

## アペリンペプチドへの抗アペリンmAbの特異的結合の評価

アペリンへの組換えウサギmAbの特異的結合を、以下のビオチン化アペリンペプチドを使用するELISAにより確認した: ビオチン-アペリン-13(ビオチン-QRPRLSHKGPMPPF(配列番号165))、アペリン-13-ビオチン(QRPRLSHKGPMPPF-ビオチン(配列番号165))、pyr-アペリン-13-ビオチン(pE-RPRLSHKGPMPPF-ビオチン(配列番号163))、ビオチン-アペリン-17(ビオチン-KFRRQRPRLSHKGPMPPF(配列番号166))、アペリン-17-ビオチン(KFRRQRPRLSHKGPMPPF-ビオチン(配列番号166))、及びビオチン-アペリン-(27-14)(ビオチン-GPGAWQGGRKFR(配列番号167))。結合アッセイのため、カーボネートコーティング緩衝液中のニュートラアビジンを、1 µg/mlで終夜、高結合ELISAプレート上にコーティングした。TBS中1% BSAでプレートをブロッキングした後、4 µg/mlのペプチドを添加した。プレートを室温で60分間インキュベートした後、プレートを洗浄し、次いで、200ng/mlの精製した組換えウサギ抗体を添加した。室温で90分間プレート上のペプチド

へとウサギ抗体を結合させた後、アルカリホスファターゼにコンジュゲートしたヤギ抗ウサギIgG Fcを添加し、PNPP基質を添加することによって抗体抗原結合を検出し、405nmでELISAプレートの吸光度を読み取った。各mAbを二連でアッセイした。アペリンペプチドへの抗アペリンmAbの結合を図1A～Cに示す(ビオチン-APL13、ビオチン-アペリン-13; APL13-ビオチン、アペリン-13-ビオチン; pyrAPL13-ビオチン、pyr-アペリン-13-ビオチン; ビオチン-APL17、ビオチン-アペリン-17; APL17-ビオチン、アペリン-17-ビオチン; ビオチン-APL27-14、ビオチン-アペリン-(27～14))。図1A中のある特定のmAbによるアペリン結合は、アペリンペプチドのC末端のビオチン化によって影響を受け、そのことは、アペリンのC末端が、これらのmAbによるアペリン結合にとって重要であることを示唆する。図1B中のある特定のmAbによるアペリン結合は、アペリン-13のN末端のビオチン化の影響を受ける。図1C中のmAbは、図1A及び1Bのものと異なる結合プロファイルを有する。

10

【0254】

## [実施例4]

抗アペリンmAbの中和作用を評価するための細胞ベースのアッセイ

cAMP Hunter(商標) CHO-K1 AGTRL1 Gi細胞株(番号95-0147C2)(DiscoverX; Fremont, CA; USA)を使用して、HitHunter(登録商標) cAMPアッセイを行った。細胞を、10,000細胞/ウェルで、384ウェル白色組織培養処理プレート(Corning 番号3570)(Corning; Corning, NY; USA)中に播種し、37℃で終夜インキュベートした。次いで、細胞を無血清培地で3回洗浄した後、37℃で15分間プレインキュベートしたアペリン/mAb混合物と共に37℃で5分間インキュベートした。細胞と共にインキュベートした最終のアペリン濃度は、このステップで1.2nMである。最終のフォルスコリン(FSK)濃度が15μM、最終のアペリン濃度が1nMとなるように、FSKを各ウェルに添加した。30分間のインキュベーション後、Biologics用のHITHUNTER(登録商標) cAMPアッセイキット(DiscoverX 番号90-0075LM10)を製造業者のプロトコールに従って使用して、cAMPレベルを測定した。EnVisionプレートリーダー(384 US Lum)(Perkin Elmer; Waltham, MA; USA)において化学発光シグナルを読み取った。各mAbを所与の希釈度にて三連でアッセイした。所与の濃度におけるmAbによる%阻害を計算するために、0%阻害を、アペリン処置したFSK刺激細胞からのシグナルとして定義し、100%阻害を、アペリン処理していないFSK刺激細胞からのシグナルとして定義した。選択した抗アペリンmAbの中和作用を図2A～Kに示す。

20

30

【0255】

## [実施例5]

抗アペリンmAbの親和性分析

mAbクローンC4、C5、C8、C9、C17、C24、C25、C26及びC27のKD決定のために、ビオチン-アペリン-13(ビオチン-QRPRLSHKGPMPPF(配列番号165))をCM5-SA(ストレプトアビジン)チップ(GE Lifesciences; Marlborough, MA)表面に固定した。4つの異なる濃度(12.5nM、25nM、50nM及び100nM)の抗アペリンmAbを、チップ表面に捕捉した。抗体抗原結合の結合速度及び解離速度を測定し、曲線に当てはめて計算した。データを表5に示す。

40

【0256】

mAbクローンC1、C6、C7、C10、C11、C12、C14、C16、C20、及びC22のKD決定のために、アペリン-13-ビオチン(QRPRLSHKGPMPPF-ビオチン(配列番号165))及びpyr-アペリン-13-ビオチン(pE-RPRLSHKGPMPPF-ビオチン(配列番号163))を、上記のBiacoreアッセイにおいて使用した。データを表6に示す。

【0257】

## 【表 5】

表5: Biacoreアッセイ由来の  
抗アペリンmAbのKD値

mAbクローン	KD
C4	4.01 nM
C5	51.3 nM
C8	17.4 pM
C9	14.8 nM
C17	1.06 nM
C24	0.401 pM
C25	50.8 pM
C26	119 pM
C27	589 pM

10

## 【 0 2 5 8 】

## 【表 6】

表6: Biacoreアッセイによって測定したアペリン13と  
ピロ-アペリン13の両方に関して測定した抗アペリンmAbのKD値

mAbクローン	KD	
	アペリン13	ピロ-アペリン13
C1	48.9 pM	0.154 pM
C6	5.96 pM	0.513 pM
C7	3.14 pM	0.326 pM
C10	6.46 pM	0.0482 pM
C11	39.3 pM	0.141 pM
C12	3.55 pM	0.0555 pM
C14	141 pM	6.49 pM
C16	14.3 nM	6.14 nM
C20	202 pM	41.9 pM
C22	107 pM	0.155 pM

20

30

## 【 0 2 5 9 】

## [実施例6]

## 抗アペリンmAbに関するエピトープマッピング

ELISAベースのペプチド競合アッセイを使用して、抗アペリンmAb C8、C24、及びC25に関する抗体結合部位をマッピングした。簡潔に述べると、mAbをELISAプレート上に捕捉し、mAbに結合するビオチン-アペリン-13(配列番号165)を測定した。各競合ペプチド(表7)を、mAbへのビオチン-アペリン-13の結合を阻害するその能力に関して評価した。阻害シグナルは、溶液中でmAbに結合する競合ペプチドの能力を反映する。

40

## 【 0 2 6 0 】

ペプチド競合アッセイとして、カーボネートコーティング緩衝液中のヤギ抗ウサギIgGを、1 µg/mlで終夜、高結合ELISAプレート上にコーティングした。ウサギmAb(C8、C24、又はC25)と競合ペプチド(表7)の混合物を室温で30分間ブレインキュベートし、次いで、ビオチン-アペリン-13(配列番号165)を添加し、混合して、最終溶液をELISAプレート上に添加した。室温で60分間のインキュベーション後、プレートを洗浄し、次いで、アルカリホスファターゼにコンジュゲートしたストレプトアビジンを添加し、PNPP基質を添加することによって結合を検出し、405nmでELISAプレートの吸光度を読み取った。各競合ペプチド又は対照試料を、所定のmAbに関して二連でアッセイした。競合ペプチドに

50



よる抗アペリンmAbへのビオチン-アペリン-13(配列番号165)の結合の阻害を図3A～3Cに示す。「競合ペプチドなし」:競合ペプチドが添加されなかった;「抗体なし、競合ペプチドなし」:競合ペプチドも抗アペリンmAbも添加されなかった。図3Aに示されるように、アペリン13のC末端から1つのアミノ酸が欠失すると、ペプチドはC8に結合しない。アペリン13のN末端アミノ酸の連続的な欠失は、残基番号8が欠失するまで、C8へのその結合に影響を及ぼさない。マッピングの結果により、C8は、アミノ酸KGPMMPF(配列番号188)を含むエピトープに結合することが示される。同じ結果は、C24及びC25でも観察された。したがって、C8、C24、及びC25はすべて、アミノ酸KGPMMPF(配列番号188)を含むエピトープに結合する。

【0261】

mAb C8、C14、又はC25によるエピトープの結合におけるエピトープ8～13(KGPMMPF(配列番号188))におけるアミノ酸の重要性をさらに理解するために、アラニンスキャニングペプチド(表8)を作製し、これらのmAbに対するビオチン-アペリン-13(配列番号165)の結合を阻害するそれらの能力に関して、上記のELISAベースのペプチド競合アッセイを使用して評価した。アラニンスキャニングペプチドによる抗アペリンmAb C8、C24、又はC25へのビオチン-アペリン-13(配列番号165)結合の阻害について、図4A～4Cに示す。各ペプチド又は対照試料を所与のmAbに関して二連でアッセイした。図4Aにおいて示されるように、ペプチド8Aは、C8へのビオチン-アペリン-13(配列番号165)の結合を依然として阻止するが、アペリン13(ペプチド1～13)、9A、又は10Aと比較して程度は低い。ペプチド11A、12A、及び13Aは、C8へのビオチン-アペリン-13(配列番号165)の結合を阻止する能力をほとんど失っている。これらのデータは、残基11、12、及び13の側鎖が、C8へのアペリンの結合に必要であり、残基8の側鎖が、C8の結合にある程度寄与しており;残基9及び10の側鎖は、C8の結合にとって重要ではないことを示す。同じ結果が、図4B及び4Cに示されるように、C24及びC25で観察された。

【0262】

【表7】

表7: 抗アペリンmAb C8、C24、及びC25を用いる競合アッセイにおいて使用したアペリンペプチド

ペプチド	配列	配列番号
1-17	KFRRQRPRLSHKGPMMPF	166
1-13	QRPRLSHKGPMMPF	165
1-12	QRPRLSHKGMP	181
2-13	RPRLSHKGPMMPF	182
3-13	PRLSHKGPMMPF	183
4-13	RLSHKGPMMPF	184
5-13	LSHKGPMMPF	185
6-13	SHKGPMMPF	186
7-13	HKGPMMPF	187
8-13	KGPMMPF	188
9-13	GPMPF	189
10-13	PMPF	190
11-13	MPF	191

【0263】

10

20

30

40

50

## 【表 8】

表8: 抗アペリンmAb C8、C24、及びC25を用いる  
競合アッセイにおいて使用されたエピトープ8～13に  
由来するアラニンスキャニングペプチド

ペプチド	配列	配列番号
8A	AGPMPF	192
9A	KAPMPF	193
10A	KGAMPF	194
11A	KGPAPF	195
12A	KGPMAF	196
13A	KGPMPA	197

10

## 【0264】

抗アペリンmAb C1、C6、及びC7についての抗体結合部位を、アペリン-13-ビオチン(QRPRLSHKGPMFP-ビオチン(配列番号165))及び表9に示される競合ペプチドを使用して、上記のELISAベースのペプチド競合アッセイによりマッピングした。競合ペプチドによる抗アペリンmAb C1、C6、及びC7へのアペリン-13-ビオチン(配列番号165)の結合の阻害を図5A～5Cに示す。図5Aに示されるように、アペリン13のN末端から1つのアミノ酸が欠失すると、ペプチドはC1に結合しない。アペリン13のC末端アミノ酸の連続的な欠失は、残基番号5が欠失するまで、C1へのその結合に影響を及ぼさない。興味深いことに、C1は、アペリン17(表9のペプチド1～17)に結合せず、そのことは、アペリン-13の遊離のN末端が、C1への結合にとって重要であることを示唆する。マッピングの結果により、C1は、アミノ酸QRPRL(配列番号204)(表9のペプチド1～5)を含むエピトープに結合することが示される。同じ結果は、C6及びC7でも観察された。

20

## 【0265】

mAb C6又はC7によるエピトープの結合におけるエピトープ1～5(QRPRL(配列番号204))におけるアミノ酸の重要性をさらに理解するために、アラニンスキャニングペプチド(表10)を作製し、これらのmAbに対するアペリン-13-ビオチン(配列番号165)の結合を阻害するそれらの能力に関して、上記のELISAベースのペプチド競合アッセイを使用して評価した。アラニンスキャニングペプチドによる抗アペリンmAb C6又はC7へのアペリン-13-ビオチン(配列番号165)の結合の阻害について、図6A～6Bに示す。各ペプチド又は対照試料を所与のmAbに関して二連でアッセイした。図6A及び6Bにおいて示されるように、ペプチド1A、2A、3A、4A及び5Aは、C6又はC7へのアペリン-13-ビオチン(配列番号165)の結合を阻止する能力を失っている。これらのデータは、残基1、2、3、4、及び5の側鎖が、C6又はC7へのアペリンの結合に必要とされることを示す。

30

## 【0266】

40

50

## 【表 9】

表9: 抗アペリンmAb C1、C6及びC7を用いる  
競合アッセイにおいて使用されたアペリンペプチド

ペプチド	配列	配列番号
1-17	KFRRQRPRLSHKGMPF	166
1-13	QRPRLSHKGMPF	165
2-13	RPRLSHKGMPF	182
1-12	QRPRLSHKGMP	181
1-11	QRPRLSHKGPM	198
1-10	QRPRLSHKGP	199
1-9	QRPRLSHKG	200
1-8	QRPRLSHK	201
1-7	QRPRLSH	202
1-6	QRPRLS	203
1-5	QRPRL	204
1-4	QRPR	205

10

## 【 0 2 6 7 】

## 【表 1 0】

20

表10: 抗アペリンmAb C6及びC7を用いる  
競合アッセイにおいて使用されたエピトープ1～5に  
由来するアラニンスキャニングペプチド

ペプチド	配列	配列番号
1A	ARPR	206
2A	QAPRL	207
3A	QRARL	208
4A	QRPAL	209
5A	QRPRA	210

30

## 【 0 2 6 8 】

## [実施例7]

## 抗アペリンmAbのヒト化

ウサギ抗アペリンmAb C8をヒト化して、ヒト患者に使用した場合の免疫原性の可能性を低減させた。重鎖及び軽鎖(VH及びVL)の可変領域の配列を、Protein Data Bank(PDB)データベースのヒト抗体配列と比較し、SWISS-モデリングを適用することによって相同性モデルを構築した。ウサギmAbの重鎖と軽鎖の両方のCDRを、抗原結合に必要であると思われる正しい構造を維持する可能性が最も高いヒトフレームワークへと移植した。必要な場合は、ヒト残基からウサギ残基への復帰突然変異を設計した。ヒト化VH及びVL領域の配列を、それぞれ、表11及び表12に示す。ヒト化VH及びVL領域を、それぞれ、ヒトIgG1重鎖及びカッパ軽鎖の定常領域と融合させて、ヒト化mAbを作製した。mAb配列に対応する構築物を、HEK293細胞における一過性トランスフェクションのために使用し、上清をアペリンに対するそれぞれのヒト化mAbの親和性について分析した。ヒト化mAbのKD値を、ピオチン-アペリン-13(ピオチン-QRPRLSHKGMPF(配列番号165))を使用して、Biacoreで決定した。データを表13に示す。

40

## 【 0 2 6 9 】

2つの追加のヒト化mAb(B24及びB25)をA31に関する配列修飾により作製した。これら3つのmAb(A31、B24、及びB25)をヒトIgG4骨格にクローン化し、漸増濃度の抗体をプレート上に固定したELISAアッセイにおいて試験し、ピオチン-アペリン-13(ピオチン-

50

QRPRLSHKGPMPF(配列番号165))を結合させるために添加し、続いて、アルカリホスファターゼにコンジュゲートしたストレプトアビジンを結合させた。次いで、PNPP基質を添加し、405nmでELISAプレートの吸光度を読み取ることによって結合を検出した。ELISA結合曲線に関するEC50値を表14に示す。

【0270】

ヒト化抗アペリンmAb A31(ヒトIgG1骨格)のIC50曲線を、上記の細胞ベースのアッセイを使用して作成した。アペリン活性を、cAMP Hunter(商標) CHO-K1 AGTRL1 Gi 細胞(DiscoverX 番号95-0147C2)におけるフォルスコリン(FSK)誘導性のcAMP産生を下方調節するその能力に関して評価し、抗アペリンmAbの活性を、アペリンの阻害作用を覆すその能力に関して評価した。図7Aは、アペリン13(APL13)をアッセイにおいて使用した場合のIC50グラフを示し;図7Bは、ピロ-アペリン13(ピロAPL13)をアッセイにおいて使用した場合のIC50のグラフを示す。CPSは1秒当たりのカウント数である。

10

【0271】

腫瘍成長に関する抗アペリンmAb A31(ヒトIgG1骨格上)の効果を、マウス異種移植片モデルにおいて試験した。HUCCT1細胞( $1 \times 10^7$ )をNOD/SCIDマウスに移植し、腫瘍が $150 \sim 200 \text{mm}^3$ に到達するまで成長させた。無作為化(1群当たり $n=3$ )後、マウスに、ビヒクル、0.5mg/kgのペバシズマブ、20mg/kgのmAb A31、又は0.5mg/kgのペバシズマブと20mg/kgのmAb A31の組合せのいずれかを投与した。1週間当たり3回、腹腔内注射により投与し、同じ日に腫瘍体積を測定した。図8は、研究の間の異なる群の腫瘍体積を示す。データは、mAb A31のペバシズマブとの組合せが、腫瘍成長に対して強い阻害効果を有することを示す。

20

【0272】

30

40

50

## 【表 1 1】

表 11: ヒト化抗アペリンmAbの重鎖可変領域の配列

mAb クローン	VH
A11	QSLEESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLYSNRMSWVRQAPGKGLEWVS SIGSSPWYASWAQGRFTISRDNSNTLYLQMNSLTAEDTAVYYCAKGGYR PGASVWGQGTLVTVSS (配列番号211)
A21	QSLEESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLYSNRMSWVRQAPGKGLEWVS SIGSSPWYASWAQGRFTISRDNSNTVYLMNSLTAEDTATYFCAKGGYR PGASVWGQGTLVTVSS (配列番号212)
A31	QSLEESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLYSNRMSWVRQAPGKGLEWVG SIGSSPWYASWAQGRFTISRDNSNTVYLMNSLTAEDTATYFCAKGGYR PGASVWGQGTLVTVSS (配列番号213)
A41	QSLEESGGGLVQPGGSLRLSCTVSGIDLYSNRMSWVRQAPGKGLEWVG SIGSSPWYASWAQGRFTISRDNSNTVYLMNSPTAEDTATYFCAKGGYR PGASVWGQGTLVTVSS (配列番号214)
A33	QSLEESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLYSNRMSWVRQAPGKGLEWVG SIGSSPWYASWAQGRFTISRDNSNTVYLMNSLTAEDTATYFCAKGGYR PGASVWGQGTLVTVSS (配列番号213)
A43	QSLEESGGGLVQPGGSLRLSCTVSGIDLYSNRMSWVRQAPGKGLEWVG SIGSSPWYASWAQGRFTISRDNSNTVYLMNSPTAEDTATYFCAKGGYR PGASVWGQGTLVTVSS (配列番号214)
B24	QSLEESGGGLVQPGGSLRLSCTVSGIDLYTNRVSWVRQAPGKGLEWVG SIGSSPWYASWAQGRFTISRDNSNTVYLMNSPTAEDTATYFCAKGGYR PGGSIWGQGTLVTVSS (配列番号217)
B25	QSLEESGGGLVQPGGSLRLSCTVSGIDLYTNRMSWVRQAPGKGLEWVG SIGSSPWFAWALGRFTISRDNSNTVYLMNSPTAEDTATYFCAKGGYRP GASVWGQGTLVTVSS (配列番号218)

VH:重鎖可変領域

## 【 0 2 7 3 】

10

20

30

40

50

## 【表 1 2】

表 12: ヒト化抗アペリンmAbの軽鎖可変領域の配列

mAb クローン	VL
A11	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQSIYDNNDLAWYQQKPGKTPKRLIY LASSLD SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCAGGYSGDIYTFG GGTKVEIK (配列番号215)
A21	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQSIYDNNDLAWYQQKPGKTPKRLIY LASSLD SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCAGGYSGDIYTFG GGTKVEIK (配列番号215)
A31	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQSIYDNNDLAWYQQKPGKTPKRLIY LASSLD SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCAGGYSGDIYTFG GGTKVEIK (配列番号215)
A41	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQSIYDNNDLAWYQQKPGKTPKRLIY LASSLD SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCAGGYSGDIYTFG GGTKVEIK (配列番号215)
A33	AQVLTQSPSSLSASVGDRVTIACQSSQSVYDNNDLAWYQQKAGQTPKRLI YLASSLD SGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQCEDVATYYCAGGYSGDIYTF GGGTEVVVE (配列番号216)
A43	AQVLTQSPSSLSASVGDRVTIACQSSQSVYDNNDLAWYQQKAGQTPKRLI YLASSLD SGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQCEDVATYYCAGGYSGDIYTF GGGTEVVVE (配列番号216)
B24	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQSIYDNNDLGWYQQKPGKTPKRLIY LASSLD SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCAGGYSGDIYTFG GGTKVEIK (配列番号219)
B25	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQSIYDNNDLAWYQQKPGKTPKRLIY LASSLD SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCAGGYNGDIYTF GGGTKVEIK (配列番号220)

VL:軽鎖可変領域

## 【 0 2 7 4 】

## 【表 1 3】

表 13: Biacoreアッセイ由来の  
ヒト化抗アペリンmAbのKD値

mAbクローン	KD
A11	0.126 pM
A21	1.65 fM
A31	0.148 pM
A41	0.067 pM
A33	0.0143 pM
A43	3.26 pM

## 【 0 2 7 5 】

10

20

30

40

50

## 【表 1 4】

表 14: ヒト化mAbに関する  
ELISA結合EC50値

mAbクローン	EC50 (nM)
A31	0.21
B24	0.79
B25	0.47

## 【 0 2 7 6 】

10

上記の実施形態に対し、その広義の発明概念から逸脱することなく、変更がなされ得ることは当業者であれば認識するであろう。したがって、この発明は、開示された特定の実施形態に限定されず、本明細書によって定義した本発明の趣旨及び範囲内の改変を包含することを意図するものとして理解される。

20

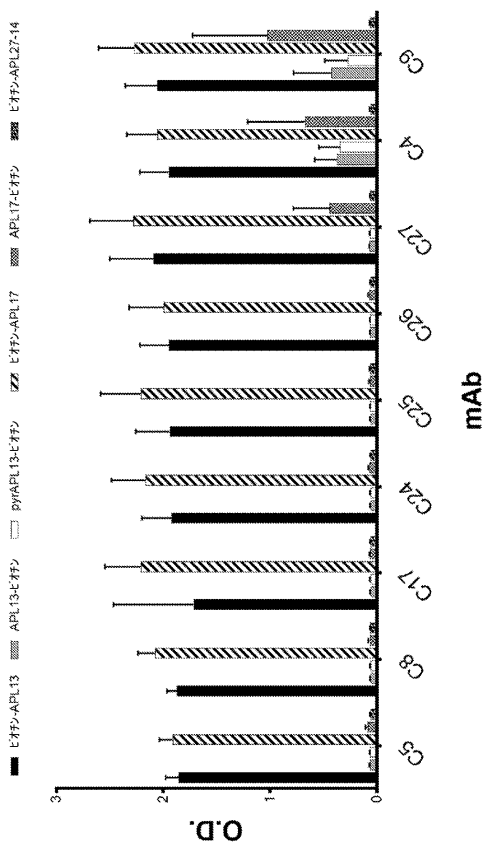
30

40

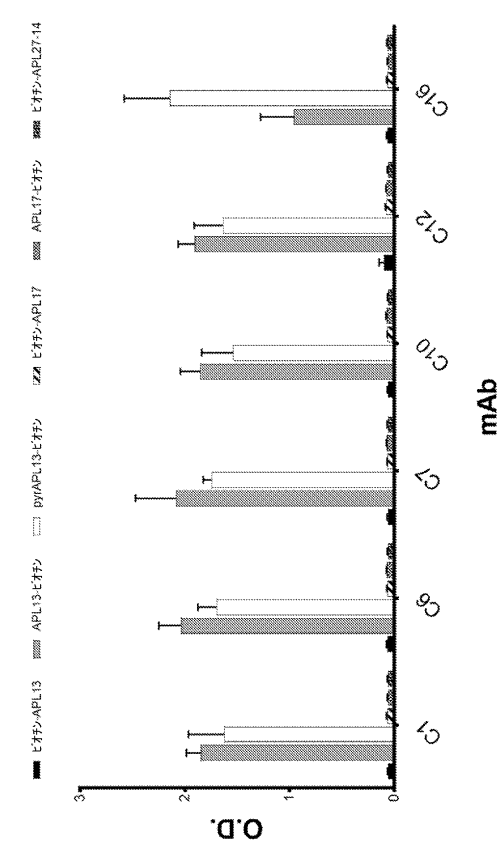
50

【図面】

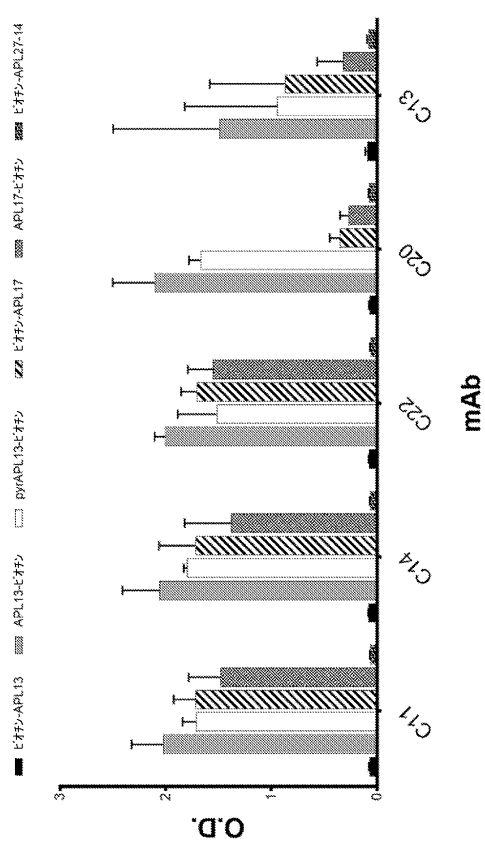
【図 1 A】



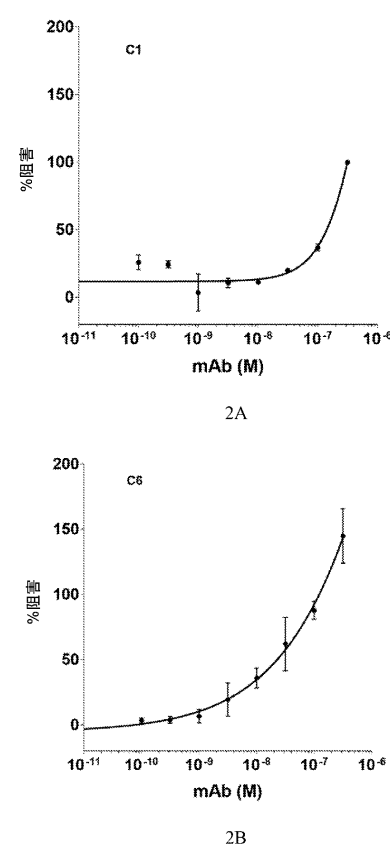
【図 1 B】



【図 1 C】



【図 2 A - B】



10

20

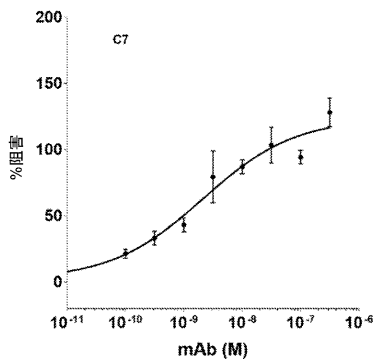
30

40

50

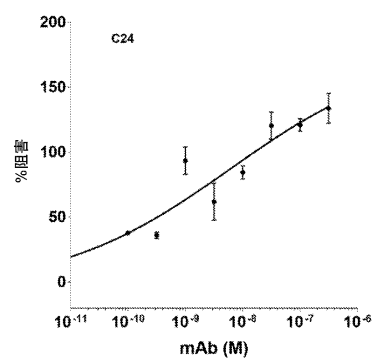


【図 2 C - D】



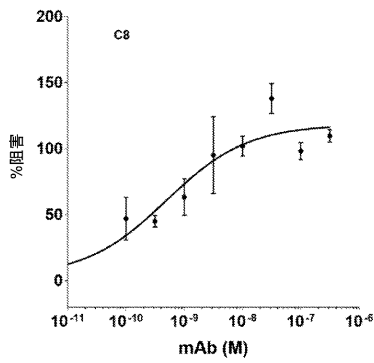
2C

【図 2 E - F】

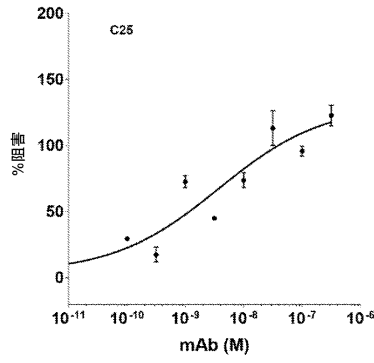


2E

10



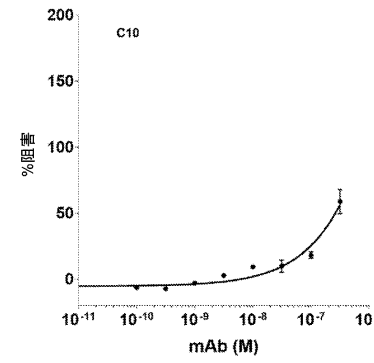
2D



2F

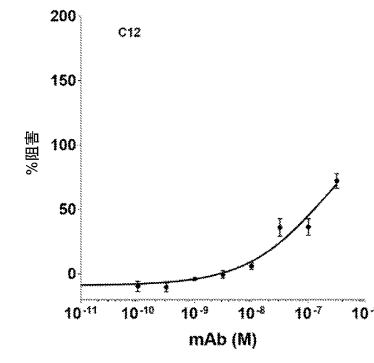
20

【図 2 G - H】



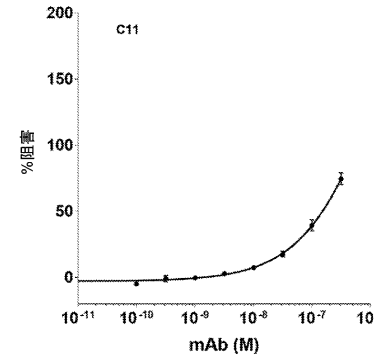
2G

【図 2 I - J】

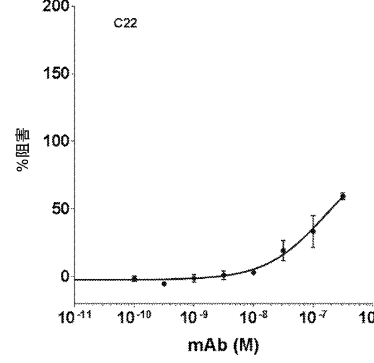


2I

30



2H

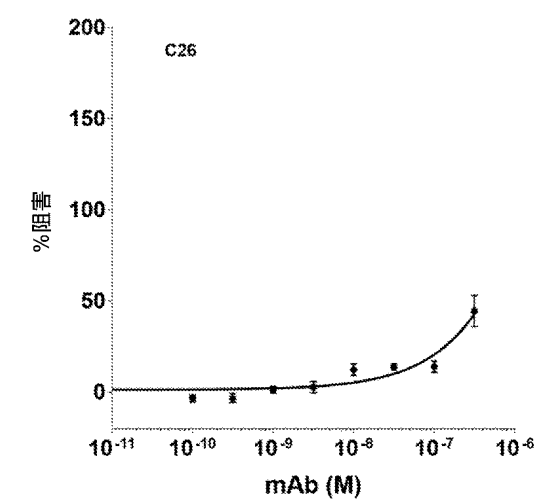


2J

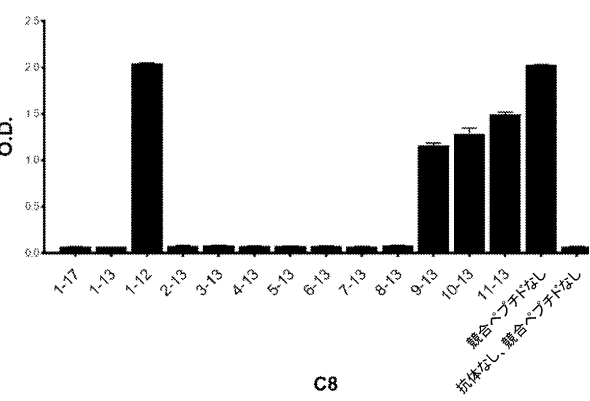
40

50

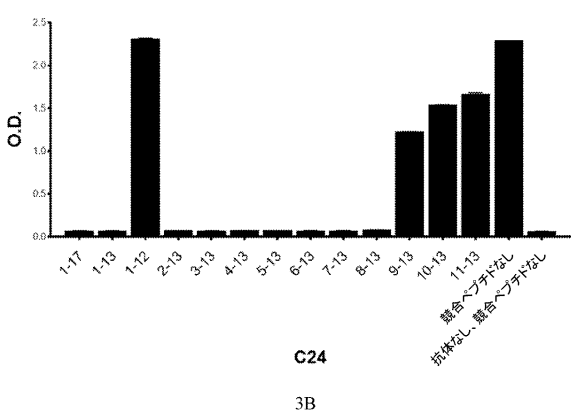
【 図 2 K 】



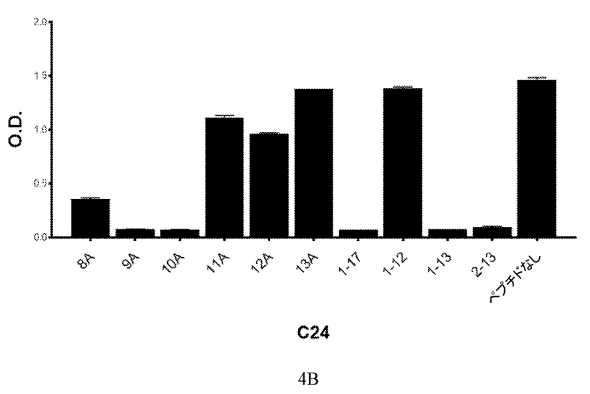
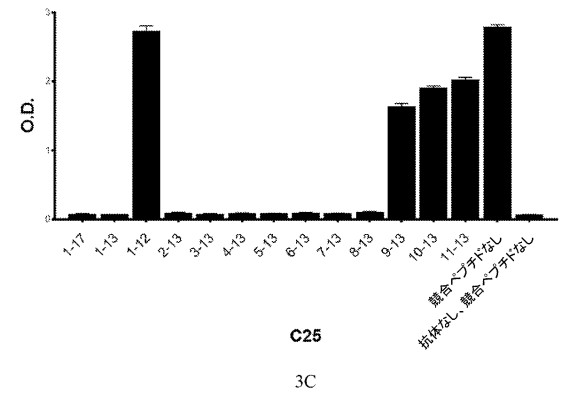
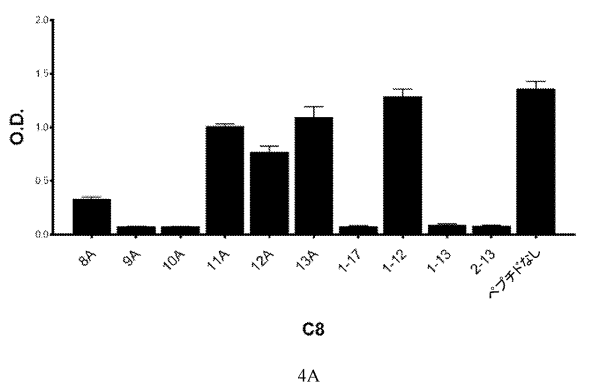
【 図 3 A 】



【 図 3 B - C 】



【 図 4 A - B 】




10

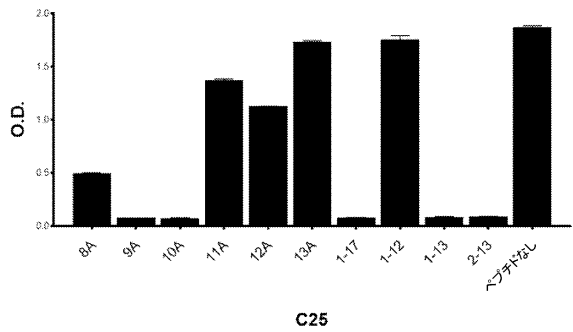
20


30

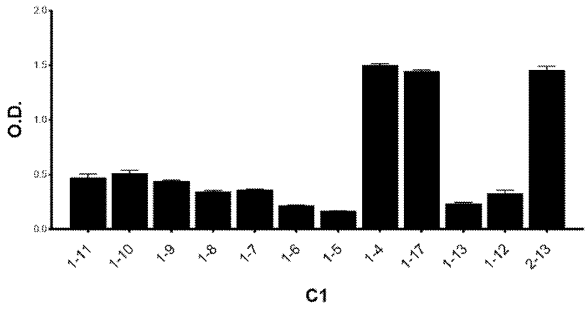
40

50


【 4 C】

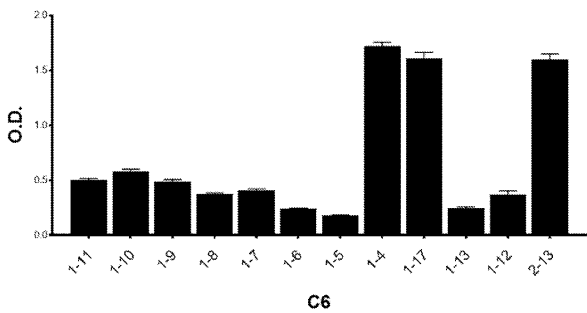


【 5 A】



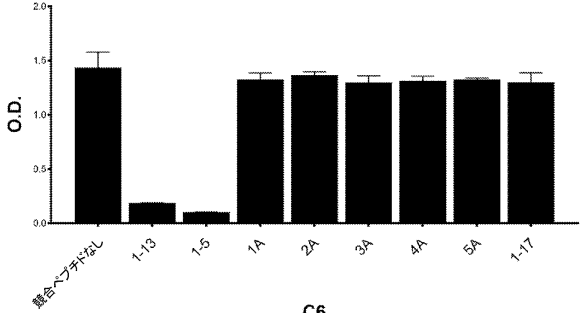
10

【 5 B - C】



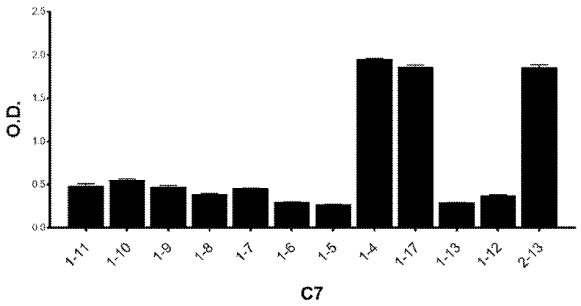
5B

【 6 A - B】

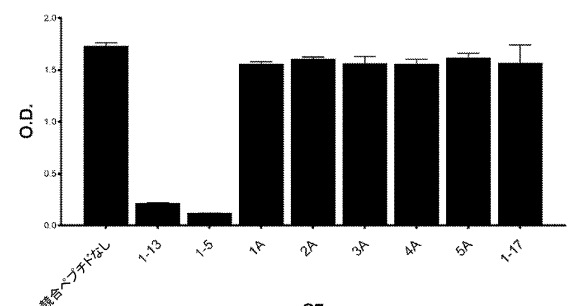


6A

20



5C



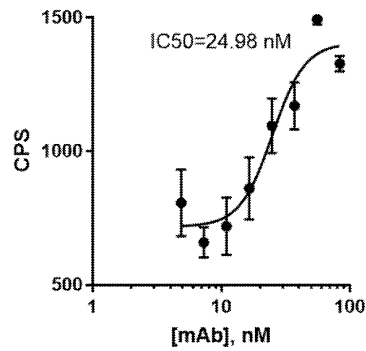
6B

30

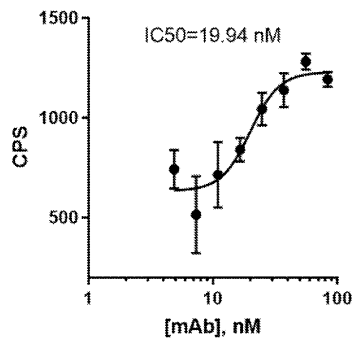
40

50

【 図 7 A - B 】

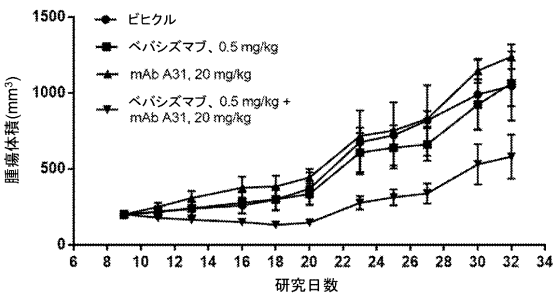


7A



7B

【 図 8 】



10

20

【 配列表 】

0007219265000001.app

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

## F I

C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 Q	1/02 (2006.01)	C 1 2 Q	1/02	
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 P	9/10 (2006.01)	A 6 1 P	9/10	
A 6 1 P	27/02 (2006.01)	A 6 1 P	27/02	
A 6 1 P	13/12 (2006.01)	A 6 1 P	13/12	
A 6 1 P	1/16 (2006.01)	A 6 1 P	1/16	
A 6 1 P	9/02 (2006.01)	A 6 1 P	9/02	
A 6 1 P	27/06 (2006.01)	A 6 1 P	27/06	
A 6 1 P	15/00 (2006.01)	A 6 1 P	15/00	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	
G 0 1 N	33/574 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
		G 0 1 N	33/574	D

## (33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

## (31)優先権主張番号 62/579,287

## (32)優先日 平成29年10月31日(2017.10.31)

## (33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

## (31)優先権主張番号 62/656,586

## (32)優先日 平成30年4月12日(2018.4.12)

## (33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

4 3

## (72)発明者 タム, アーヴィン

アメリカ合衆国 9 2 1 2 8 カリフォルニア州, サンディエゴ, スプリングサイド ロード 1 1  
7 4 6

審査官 進士 千尋

## (56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 1 6 / 0 0 5 3 0 0 0 ( U S , A 1 )

米国特許出願公開第 2 0 1 5 / 0 0 7 2 9 3 2 ( U S , A 1 )

米国特許出願公開第 2 0 1 5 / 0 1 2 5 4 5 9 ( U S , A 1 )

## (58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 1 3

C 0 7 K 1 6 / 1 8

C 0 7 K 1 6 / 4 6

C 1 2 N 1 5 / 6 3

C 1 2 N 1 / 1 5

C 1 2 N 1 / 1 9

C 1 2 N 1 / 2 1

C 1 2 N 5 / 1 0

C 1 2 Q 1 / 0 2

C 1 2 P 2 1 / 0 8

A 6 1 K 3 9 / 3 9 5

A 6 1 P 9 / 1 0

A 6 1 P 2 7 / 0 2

---

A 6 1 P 1 3 / 1 2

A 6 1 P 1 / 1 6

A 6 1 P 9 / 0 2

A 6 1 P 2 7 / 0 6

A 6 1 P 1 5 / 0 0

A 6 1 P 4 3 / 0 0

A 6 1 P 3 5 / 0 0

A 6 1 K 4 5 / 0 0

G 0 1 N 3 3 / 5 3

G 0 1 N 3 3 / 5 7 4

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T  
N )

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

U n i P r o t / G e n e S e q