202128751

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 202128751 A

(43)公開日： 中華民國 110 (2021) 年 08 月 01 日

(21)申請案號：109142627 (22)申請日： 中華民國 109 (2020) 年 12 月 03 日

(51)Int. Cl.： *C07K16/22 (2006.01)* *A61K39/395 (2006.01)*
C07H21/04 (2006.01) *C12N15/63 (2006.01)*
A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2019/12/06 世界智慧財產權組織 PCT/JP2019/047956

(71)申請人：日商大塚製藥股份有限公司 (日本) OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD. (JP)
日本

(72)發明人：西原茂樹 NISHIHARA, SHIGEKI (JP) ；石川優一 ISHIKAWA, YUICHI (JP) ；中石雄一郎 NAKAISHI, YUICHIRO (JP) ；川戸達矢 KAWATO, TATSUYA (JP)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：26 項 圖式數：14 共 219 頁

(54)名稱

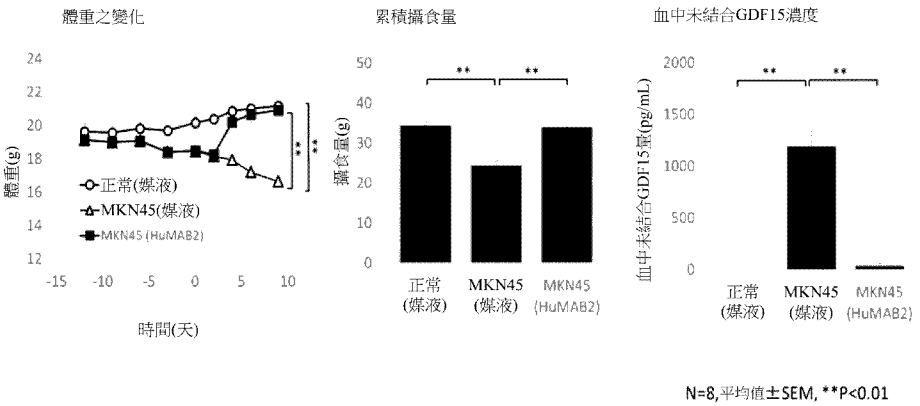
抗 GDF15 抗體

(57)摘要

本發明包括抗 hGDF15 抗體及其用途等，該抗 hGDF15 抗體與包含 DHCPLGPGRCCRLH(序列編號 3)之胺基酸序列之 hGDF15 之表位結合。

The present disclosure includes an anti-hGDF15 antibody that binds to an epitope of hGDF15 comprising the amino acid sequence of DHCPLGPGRCCRLH (SEQ ID NO: 3) and uses thereof.

指定代表圖：



【圖8】

202128751

【發明摘要】

【中文發明名稱】

抗GDF15抗體

【英文發明名稱】

ANTI-GDF15 ANTIBODY

【中文】

本發明包括抗hGDF15抗體及其用途等，該抗hGDF15抗體與包含DHCPLGPGRCCRLH(序列編號3)之胺基酸序列之hGDF15之表位結合。

【英文】

The present disclosure includes an anti-hGDF15 antibody that binds to an epitope of hGDF15 comprising the amino acid sequence of DHCPLGPGRCCRLH (SEQ ID NO: 3) and uses thereof.

【指定代表圖】

圖8

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

抗GDF15抗體

【英文發明名稱】

ANTI-GDF15 ANTIBODY

【技術領域】

【0001】

本申請係對國際申請編號PCT/JP2019/047956主張優先權者，且此處藉由參照而將其整體併入本說明書中。

本發明係關於一種抗GDF15抗體及其用途。

【先前技術】

【0002】

惡病質係一種常伴慢性疾病之複合性代謝性疾病，具有體重減少、肌肉無力之特徵。其中，癌症惡病質在眾多進展期癌症患者中可見，由於會使患者之預後或QOL(Quality of life，生活質量)變差，故需要積極治療。然而，惡病質之病情複雜，發生機制亦有較多不明之處，目前不存在有效之治療藥。

【0003】

GDF15(Growth Differentiation Factor 15，生長分化因子15)係TGF-β超家族之分泌蛋白，且報告有與癌症或糖尿病等各種疾病相關。目前有多個與血中GDF15濃度相關之臨床研究報告，例如報告有：癌症患者之血中及癌組織之GDF15量較高；癌症患者之血中GDF15量與預後相關。又，已知GDF15會作用於大腦攝食中樞而誘發食慾不振，與惡病質之發

病相關。

【發明內容】

[發明所欲解決之問題]

【0004】

本發明之目的在於提供一種對治療與GDF15相關之疾病或症狀有用之抗GDF15抗體。

[解決問題之技術手段]

【0005】

本發明於某一態樣中提供一種抗hGDF15抗體，其與包含DHCPLGPGRCCRLH(序列編號3)之胺基酸序列之hGDF15之表位結合。

【0006】

本發明於又一態樣中提供一種抗hGDF15抗體，其包括：

重鏈可變區，其含有：

包含序列編號4之胺基酸序列之重鏈可變區所包含之CDR1、或包含於上述CDR1之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號4之胺基酸序列之重鏈可變區所包含之CDR2、或包含於上述CDR2之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號4之胺基酸序列之重鏈可變區所包含之CDR3、或包含於上述CDR3之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR3；及

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號5之胺基酸序列之輕鏈可變區所包含之CDR1、或包含於上述CDR1之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號5之胺基酸序列之輕鏈可變區所包含之CDR2、或包含於上述CDR2之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號5之胺基酸序列之輕鏈可變區所包含之CDR3、或包含於上述CDR3之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR3。

【0007】

本發明於又一態樣中提供一種抗hGDF15抗體，其包括：

重鏈可變區，其含有：

包含序列編號18之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號19之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號20之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR3；及

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號21之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號22之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號23之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR3。

【0008】

本發明於又一態樣中提供一種抗hGDF15抗體，其包括：

重鏈可變區，其含有：與序列編號8之胺基酸序列具有80%、85%、90%、或95%以上之序列同一性之胺基酸序列、或序列編號8之胺基酸序列或者於序列編號8之胺基酸序列中有1～20個、1～15個、1～10個、1～5個、或1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列；及

輕鏈可變區，其含有：與序列編號9之胺基酸序列具有80%、85%、90%、或95%以上之序列同一性之胺基酸序列、或序列編號9之胺基酸序列或者於序列編號9之胺基酸序列中有1～20個、1～15個、1～10個、1～5個、或1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列。

【0009】

本發明於又一態樣中提供一種抗hGDF15抗體，其包括：

重鏈可變區，其含有：

包含序列編號133之胺基酸序列之重鏈可變區所包含之CDR1、或包含於上述CDR1之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號133之胺基酸序列之重鏈可變區所包含之CDR2、或包含於上述CDR2之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號133之胺基酸序列之重鏈可變區所包含之CDR3、或包含於上述CDR3之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序

列之CDR3；及

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號134之胺基酸序列之輕鏈可變區所包含之CDR1、或包含於上述CDR1之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號134之胺基酸序列之輕鏈可變區所包含之CDR2、或包含於上述CDR2之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號134之胺基酸序列之輕鏈可變區所包含之CDR3、或包含於上述CDR3之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR3。

【0010】

本發明於又一態樣中提供一種抗hGDF15抗體，其包括：

重鏈可變區，其含有：

包含序列編號137之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號138之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號139之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR3；及

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號140之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號141之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號142之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR3。

【0011】

本發明於又一態樣中提供一種抗hGDF15抗體，其包括：

重鏈可變區，其含有：

包含序列編號135之胺基酸序列之重鏈可變區所包含之CDR1、或包含於上述CDR1之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號135之胺基酸序列之重鏈可變區所包含之CDR2、或包含於上述CDR2之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號135之胺基酸序列之重鏈可變區所包含之CDR3、或包含於上述CDR3之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR3；及

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號136之胺基酸序列之輕鏈可變區所包含之CDR1、或包含於上述CDR1之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號136之胺基酸序列之輕鏈可變區所包含之CDR2、或包含於上述CDR2之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號136之胺基酸序列之輕鏈可變區所包含之CDR3、或包含於上述CDR3之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR3。

【0012】

本發明於又一態樣中提供一種抗hGDF15抗體，其包括：

重鏈可變區，其含有：

包含序列編號143之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號144之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號145之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR3；及

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號146之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號147之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號148之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR3。

【0013】

本發明於又一態樣中提供一種抗hGDF15抗體，其和上述任一抗體競爭性地與hGDF15結合。

【0014】

本發明於又一態樣中提供一種編碼上述任一抗體之聚核苷酸、包含上述聚核苷酸之表現載體、或包含上述聚核苷酸之轉形細胞。

【0015】

本發明於又一態樣中提供一種醫藥組合物，其包含上述任一抗體。

[發明之效果]

【0016】

本發明之抗hGDF15抗體會識別與既有之抗hGDF15抗體不同之表位，對與GDF15相關之疾病或症狀之治療有用。

【圖式簡單說明】

【0017】

圖1係表示使用4種抗hGDF15單株抗體(HuMAB2、MAB17、Hu01G06-127、MAB957)之競爭試驗之結果。

圖2A係表示HuMAB2之Fab與hGDF15之共結晶之立體結構分析的結果。

圖2B係表示利用HuMAB2之Fab與hGDF15之共結晶之立體結構分析所獲得的表位及互補位之分析結果。

圖3係HuMAB2之Fab與hGDF15之結合之立體結構分析結果。hGDF15形成同型二聚物，將HuMAB2所結合之胺基酸中存在於1個hGDF15單體(Monomer1)中之胺基酸以下劃線表示，將存在於另一個單體(Monomer2)中之胺基酸(71D72T)以雙下劃線表示。將對結合較為重要之胺基酸以粗體表示，將結合特別強之胺基酸以箭頭表示。

圖4係表示hGDF15或DHCPLGPGRCCRLH(序列編號3)之合成肽與HuMAB2之結合試驗之結果。

圖5A係表示HuMAB2變異體與hGDF15之結合(H鏈改性抗體 1/2)。

圖5B係表示HuMAB2變異體與hGDF15之結合(H鏈改性抗體 2/2)。

圖5C係表示HuMAB2變異體與hGDF15之結合(L鏈改性抗體 1/2)。

圖5D係表示HuMAB2變異體與hGDF15之結合(L鏈改性抗體 2/2)。

圖6係表示利用HuMAB2及MAB17捕捉血中hGDF15。

圖7係表示抗hGDF15抗體對於荷癌小鼠模型之血中未結合hGDF15濃度之效果。

圖8係表示HuMAB2對於荷癌小鼠模型之體重減少、累積攝食量、及血中未結合hGDF15濃度之效果。

圖9係表示HuMAB2對於荷癌小鼠模型之活動性(晝夜節律)之效果。

圖10係表示HuMAB2變異體與hGDF15之結合。

圖11係表示包含具有變異之H鏈(H49R、H49D、H48S、H71Y、H83R、 或H120F)及L鏈(L48K、L112D、L72F、 或L24H)的HuMAB2變異體與hGDF15之結合。

圖12係表示抗GDF15抗體對於GDF15及GFRAL之複合體形成之抑制活性之評價的模式圖。

圖13係表示HuMAB2對於GDF15、GFRAL及RET之複合體形成之抑制活性之評價的模式圖及其評價結果。

圖14係表示MAB1對於荷癌小鼠模型之體重減少、累積攝食量、及血中未結合hGDF15濃度之效果。

【實施方式】

【0018】

除非另有特別規定，本說明書中所使用之用語具有業者在有機化

學、醫學、藥學、分子生物學、微生物學等領域中通常理解之含義。以下記載若干有關本說明書中所使用之用語之定義，但該等定義於本說明書中優先於通常之理解。

【0019】

本發明中，於數值帶有用語「約」之情形時，意指包含該值±10%之範圍。例如「約20」視為包括「18～22」。數值之範圍包含兩端點間之所有數值及兩端點之數值。關於範圍之「約」適用於該範圍之兩端點。因此，例如「約20～30」視為包括「18～33」。

【0020】

本說明書中，胺基酸殘基以下述縮寫來表示。

Ala或A：丙胺酸

Arg或R：精胺酸

Asn或N：天冬醯胺

Asp或D：天冬胺酸

Cys或C：半胱胺酸

Gln或Q：麩醯胺

Glu或E：麩胺酸

Gly或G：甘胺酸

His或H：組胺酸

Ile或I：異白胺酸

Leu或L：白胺酸

Lys或K：離胺酸

Met或M：甲硫胺酸

Phe或F：苯基丙胺酸

Pro或P：脯胺酸

Ser或S：絲胺酸

Thr或T：蘇胺酸

Trp或W：色胺酸

Tyr或Y：酪胺酸

Val或V：纈胺酸

本說明書中，某一胺基酸序列中之胺基酸殘基有時以表示其位置之數字及表示胺基酸殘基之縮寫(例如，將第13號之精胺酸殘基表示為「13R」)來表示。

【0021】

GDF15(Growth Differentiation Factor 15)係作為MIC-1、PLAB、PDF、NAG-1為人所知之TGF-β超家族之分泌蛋白。GDF15基因表現作為前驅物之前導GDF15，該前導GDF15被膜型金屬內切蛋白酶切斷而生成成熟GDF15。GDF15為可溶型，認為會形成二聚物並被作為其受體之GFRAL所識別。除特別記載之情形外，本說明書中用語GDF15意指成熟GDF15。

【0022】

本說明書中，用語GDF15係以包含所有生物物種之GDF15之含義來使用。於某一實施形態中，GDF15係人類GDF15(hGDF15)。將前導hGDF15之代表性胺基酸序列示於序列編號1。前導hGDF15係包含如下308個胺基酸之多肽，即包含29個胺基酸之訊息肽(下劃線)、包含167個胺基酸之前導肽、及包含112個胺基酸之成熟肽(雙下劃線、hGDF15)。將

hGDF15之代表性胺基酸序列示於序列編號2，但本發明中之hGDF15並不限定於包含序列編號2之胺基酸序列者。

前導hGDF15(序列編號1)

MPGQELRTVN GSQMLLVLLV LSWLPHGGAL SLAEASRASF PGPSELHSED

SRFRELRKRY EDLLTRLRAN QSWEDSNTDL VPAPAVRILT PEVRLGSGGH

LHLRISRAAL PEGLPEASRL HRALFRLSPT ASRSWDVTRP LRRQLSLARP

QAPALHLRLS PPPSQSDQLL AESSSARPQL ELHLRPQAAR GRRRARARNG

DHCPLGPGRC CRLHTVRASL EDLGWADWVL SPREVQVTMC IGACPSQFRA

ANMHAQIKTS LHRLKPDTVP APCCVPASYN PMVLIQKTDT GVSLQTYDDL

LAKDCHCI

hGDF15(序列編號2)

ARNGDHCPLG PGRCCRLHTV RASLEDLGWA DWVLSPREVQ VTMCIGACPS

QFRAANMHAQ IKTSLHRLKP DTVPAPCCVP ASYNPMVLIQ KTDTGVSLQT

YDDLLAKDCH CI

【0023】

本說明書中之用語「抗體」意指具有對於抗原之結合性之免疫球蛋白或包含其一部分之分子，不僅意指天然之免疫球蛋白之形態之分子，亦意指嵌合抗體、人類化抗體、多重特異性抗體、抗體片段等包含各種結構之分子。本說明書中用語「單株」係用以與「多株抗體」區分來使用，該「多株抗體」係針對各不相同之表位之複數種抗體的混合物，該用語「單株」意指由單一種類之抗體集群獲得。因此，用語「單株抗體」例如可意指嵌合抗體、人類化抗體、人類抗體、多重特異性抗體、及抗體片段。抗體片段意指包含免疫球蛋白之一部分作為構成要素之分子，例如可例舉抗體之重鏈及輕鏈可變區(V_H及V_L)、$F(ab')_2$、Fab'、Fab、Fv、二硫鍵連接

之FV(sdFv)、單鏈FV(scFV)及其等之聚合物，並無限定。抗體之來源並無限定，例如可例舉來自小鼠、大鼠、兔、山羊、人類之抗體。

【0024】

本說明書中用語「單離出」意指某一生物學分子(例如，抗體或聚核苷酸)於天然環境下實質上自其他成分中分離出。

【0025】

抗體之免疫球蛋白類型係基於重鏈恆定區來決定。作為免疫球蛋白類型，可例舉：IgA、IgD、IgE、IgG、及IgM，與其等對應之重鏈分別稱為α鏈、δ鏈、ε鏈、γ鏈、及μ鏈。可將免疫球蛋白類型進一步分類為亞型(同型)、例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2。本說明書中之抗體之免疫球蛋白類型及亞型並無特比限定。於某一實施形態中，免疫球蛋白類型為IgG。抗體之輕鏈可基於其恆定區而分為κ鏈及λ鏈，但本說明書中之抗體可具有κ鏈及λ鏈之任一者。

【0026】

抗體之可變區一般由夾在4個構架區(framework region)(亦記載為FR)之3個互補決定區(complementarity determining region)(亦記載為CDR)所構成。FR及CDR一般來說，輕鏈及重鏈均以FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4之順序存在。定義抗體之可變區或CDR之方法報告有複數種，例如有Kabat之定義(Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. 1991)、Chothia之定義(Chothia et al., J. Mol. Biol., 1987; 196: 901-917)、AbM之定義(Martin et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1989; 86: 9268-9272)、Contact之定義

(MacCallum et al., J. Mol. Biol. 1996; 262: 732-745)、及IMGT之定義(Lefranc et al., Dev Comp Immunol. 2003; 27(1): 55-77)等。於本說明書中，除特別記載之情形外，均使用Kabat之定義。

【0027】

本說明書中，抗hGDF15抗體意指以足夠發揮所需效果之親和性與hGDF15結合之抗體。本發明之抗hGDF15抗體可使用hGDF15或其一部分作為免疫原並藉由普通方法取得。免疫原可藉由通常之肽合成法，例如藉由基因工程方法或化學合成來製作。或者，本發明之抗體亦可藉由使用基因工程方法製作包含抗體基因之表現載體，利用細胞使之表現而獲得。

【0028】

多株抗體可藉由「Antibodies: A Laboratory Manual, Lane, H. D. et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989」等中記載之普通方法來製造。具體而言，可藉由利用上述免疫原對大鼠、小鼠、兔、山羊、馬等哺乳動物進行免疫來製作。

【0029】

單株抗體可藉由如下公知方法來取得，即製作會產生抗體之融合瘤之方法；使用基因工程方法製作包含抗體基因之表現載體並利用細胞使之表現的方法等。

【0030】

會分泌單株抗體之融合瘤可依據Kohler et al., Nature 256:495, 1975中記載之方法來製作。首先，將免疫原、與用以提高抗原性之適當物質(例如匙孔螺血氰蛋白或牛血清血蛋白等)、及視需要之免疫活化劑(弗氏完全佐劑或不完全佐劑等)一同混合，來對大鼠、小鼠、兔、山羊、馬等

非人類哺乳動物進行免疫。通常，免疫動物以3～10天為間隔免疫複數次，且作為免疫原之肽被投予1～100 μg。繼而，自經複數次免疫之免疫動物回收免疫活性適格細胞(免疫動物中具有抗體產生能力之細胞)，使之與無自我抗體產生能力之骨髓瘤細胞(例如，來自小鼠、大鼠、豚鼠、倉鼠、兔或人類等哺乳動物之細胞)進行細胞融合。細胞融合可使用聚乙二醇法、電融合法等。進而，基於融合細胞所具有之選擇標記來選擇成功細胞融合之細胞，藉由下述免疫測定法等來確認所選擇之細胞所產生之抗體對於免疫源之反應性，藉此獲得產生目標單株抗體之融合瘤。單株抗體可自將所獲得之融合瘤於試管內進行培養所得之培養上清液中進行單離。又，亦可於小鼠、大鼠、豚鼠、倉鼠或兔等之腹水中等活體內進行培養，並自腹水中進行單離。

【0031】

又，單株抗體可藉由製作包含抗體基因之表現載體並利用宿主細胞使之表現而獲得(P.J.Delves., ANTIBODY PRODUCTION ESSENTIAL TECHNIQUES., 1997 WILEY; P.Shepherd and C.Dean., Monoclonal Antibodies., 2000 OXFORD UNIVERSITY PRESS; J.W. Goding., Monoclonal Antibodies:principles and practice., 1993 ACADEMIC PRESS)。進而，亦可使用基因轉殖動物製作技術，製作於內源性基因中組入有目標抗體之基因之基因轉殖動物(例如，牛、山羊、綿羊或豬)，自該基因轉殖動物之乳汁中取得來自其抗體基因之單株抗體。

【0032】

所獲得之單株抗體可藉由將該領域中周知之方法、例如利用蛋白A管柱之層析法、離子交換層析法、疏水層析法、硫酸銨沈澱法、凝膠過濾、

親和層析法等適當組合來進行純化。

【0033】

嵌合抗體係包含來源互不相同之序列之抗體，例如為將來源互不相同之可變區與恆定區連結而成之抗體。於某一實施形態中，嵌合抗體包含來自人類以外之哺乳動物之抗體之可變區、與來自人類抗體之恆定區。嵌合抗體例如可藉由如下方式取得：將編碼來自人類以外之哺乳動物之抗體之可變區的聚核苷酸與編碼人類抗體之恆定區的聚核苷酸連結並組入至表現載體中，將該表現載體導入至宿主並使之表現。

【0034】

CDR係實質上決定抗體之結合特異性之區域，其胺基酸序列富有多樣性。另一方面，即便於具有不同結合特異性之抗體之間，構成FR之胺基酸序列亦顯示較高之同源性。因此，可藉由移植CDR而將某抗體之結合特異性移植至其他抗體。

【0035】

CDR移植方法已知有多種，例如記載於下述文獻中：美國專利第7,022,500號說明書、美國專利第6,982,321號說明書、美國專利第6,180,370號說明書、美國專利第6,054,297號說明書、美國專利第5,693,762號說明書、美國專利第5,859,205號、美國專利第5,693,761號、美國專利第5,565,332號說明書；美國專利第5,585,089號說明書、美國專利第5,530,101號說明書、美國專利第5,225,539號說明書; Jones et al. (1986) Nature 321:522-525; Riechmann et al. (1988) Nature 332: 323-327; Queen， et al. (1989) Proc. Natl. Acad. U.S.A. 86:10029-10033; Verhoeyen et al. (1988) Science 239:1534-1536; Winter (1998) FEBS lett 430:92-94。

【0036】

人類化抗體一般來說，包含來自人類以外之動物之抗體之CDR、與來自人類抗體之FR及來自人類抗體之恆定區。人類化抗體可藉由將來自人類以外之動物之抗體之CDR移植至人類抗體而獲得。人類化抗體可藉由各種方法來製作，作為一例，可例舉：重疊延伸PCR(Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008))。本方法中，使用在來自人類以外之動物之抗體(例如小鼠抗體)之CDR與人類抗體之FR的末端具有重疊部分之寡核苷酸作為引子來進行PCR，合成將來自人類以外之動物之抗體之CDR與人類抗體之FR連結而成的聚核苷酸。繼而，將所獲得之聚核苷酸與編碼人類抗體之恆定區之聚核苷酸連結並組入至表現載體，將該表現載體導入至宿主並使之表現，藉此可取得人類化抗體。

【0037】

FR之序列例如可基於揭示生殖細胞系列之抗體基因序列之資料庫(例如，VBase, https://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/vbase/)或參考文獻(例如，Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. 1991); Tomlinson, I. M. et al. (1992) J. Mol. Biol. 227:776-798; Cox, J. P. L. et al. (1994) Eur. J Immunol. 24:827-836)來決定。FR與生殖細胞系列之序列相比，亦可含有1個以上之胺基酸變異。FR之適宜選擇方法眾所周知，例如可使用藉由最適方法(Sims et al. J. Immunol. 151:2296 (1993))所選擇出之FR、來自人類抗體之輕鏈或重鏈可變區之特定亞群之一致序列的FR(Carter et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285 (1992); Presta et al. J. Immunol. 151:2623 (1993))。

【0038】

人類抗體例如可藉由於試管內利用所需抗原使人類淋巴細胞致敏，繼而使致敏淋巴細胞與人類骨髓瘤細胞融合而取得(特公平1-59878號公報)。作為融合搭配物之人類骨髓瘤細胞例如可利用U266等。又，人類抗體亦可藉由利用所需抗原對具有全部人類抗體基因儲備庫之基因轉殖動物進行免疫而取得(Lonberg, Nat. Biotech. 23: 1117-1125, 2005)。進而，亦已知使用人類抗體庫，藉由淘選而取得人類抗體之技術(Antibody Phage Display: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology 178, 2001)。例如，藉由噬菌體呈現法，使人類抗體之可變區以單鏈抗體(scFv)之形式於噬菌體表面表現，選擇與抗原結合之噬菌體，對選擇出之噬菌體之基因進行分析，藉此可決定編碼與抗原結合之人類抗體之可變區之DNA序列。繼而，將該可變區序列與人類抗體恆定區之序列在框內(in-frame)連結，插入至適當之表現載體中，將該表現載體導入至宿主並使之表現，藉此可取得人類抗體。

【0039】

多重特異性抗體係與至少2個不同之部位結合之抗體。作為多重特異性抗體，可例舉：雙重特異性抗體、三重特異性抗體等。於某一實施形態中，多重特異性抗體係與hGDF15及1個以上之其他抗原結合。多重特異性抗體例如可藉由基因工程方法來製作，或藉由結合識別抗原不同之2個以上之抗體來製作。

【0040】

抗體片段例如可藉由利用木瓜酶、胃蛋白酶等蛋白酶來消化抗體而獲得。或者，可藉由將包含編碼抗體片段之聚核苷酸之表現載體導入至宿

主細胞並使之表現而獲得(例如，Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976; Better, M. and Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496; Pluckthun, A. and Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663; Rousseaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669; Bird, R. E. and Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137; Hudson et al., Nat. Med., (2003) 9, 129-134)。

【0041】

如上所述，抗體可藉由將包含編碼其之聚核苷酸之表現載體導入至細胞並使之表現而獲得。具體而言，構建如編碼抗體之序列會基於增強子或啟動子等表現控制區來表現之表現載體，利用該表現載體將宿主細胞進行轉形，而使抗體表現。

【0042】

即，本發明又提供一種編碼抗hGDF15抗體之聚核苷酸、包含上述聚核苷酸之表現載體、及包含能夠表現上述抗體之聚核苷酸之轉形細胞。

【0043】

作為宿主細胞，例如可使用動物細胞、植物細胞、真菌細胞等真核細胞。作為動物細胞，可例舉：哺乳類細胞(例如，CHO(chinese hamster ovary，中國倉鼠卵巢)、COS、NIH3T3、骨髓瘤、BHK(baby hamster kidney，幼倉鼠腎)、HeLa、Vero)、兩栖類細胞(例如非洲爪蟾卵母細胞)、或昆蟲細胞(例如，Sf9、Sf21、Tn5)。作為真菌細胞，可例舉：酵母(例如酵母(Saccharomyces)屬、例如釀酒酵母(Saccharomyces cerevisiae))、絲狀菌(例如麴菌(Aspergillus)屬、例如黑麴菌(Aspergillus

niger))等。又，亦可使用大腸桿菌(E. coli)(例如，JM109、DH5α、HB101等)、枯草桿菌等原核細胞作為宿主細胞。向宿主細胞導入載體時，例如可藉由磷酸鈣法、DEAE(Diethylaminoethanol，二乙胺基乙醇)葡聚糖法、電穿孔法、脂轉染法等方法來進行。

【0044】

所獲得之抗體向抗原之結合可藉由酵素免疫測定法(EIA)(包含ELISA)、放射免疫測定法(RIA)、化學發光免疫測定法(CIA)、螢光免疫測定法(FIA)等免疫測定法；或BIACORE(註冊商標)表面電漿子共振分析等進行確認。抗體向抗原之結合亦可藉由競爭檢定來進行確認。例如可藉由如下方式進行確認，即調查所獲得之抗體是否和確認到與hGDF15結合之抗hGDF15抗體競爭。

【0045】

本說明書中，所謂和規定抗hGDF15抗體(即，參照抗體)競爭之抗體，意指於在實施例所記載之條件下進行測定之情形時，使參照抗體與hGDF15之結合顯著減少之抗體。於某一實施形態中，本發明之抗體使參照抗體與hGDF15之結合減少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、或95%以上。

【0046】

於某一實施形態中，本發明之抗hGDF15抗體與包含DHCPLGPGRCCRLH(序列編號3)之胺基酸序列之hGDF15之表位結合。序列編號3之胺基酸序列相當於序列編號2之第5號～第18號之胺基酸殘基。是否與包含DHCPLGPGRCCRLH(序列編號3)之胺基酸序列之表位結合可藉由如下方式進行確認，即調查是否和包括包含序列編號8之胺基酸

序列之重鏈可變區及包含序列編號9之胺基酸序列之輕鏈可變區的抗體競爭性地與hGDF15結合。

【0047】

於又一實施形態中，本發明之抗hGDF15抗體和規定抗hGDF15抗體競爭性地與hGDF15結合。於某一實施形態中，本發明之抗體和包括包含序列編號8之胺基酸序列之重鏈可變區及包含序列編號9之胺基酸序列之輕鏈可變區的抗體競爭性地與hGDF15結合。

【0048】

於又一實施形態中，本發明之抗hGDF15抗體包括如下重鏈可變區及輕鏈可變區：

重鏈可變區，其含有：

包含序列編號4之胺基酸序列之重鏈可變區所包含之CDR1、或包含於上述CDR1之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號4之胺基酸序列之重鏈可變區所包含之CDR2、或包含於上述CDR2之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號4之胺基酸序列之重鏈可變區所包含之CDR3、或包含於上述CDR3之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR3；

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號5之胺基酸序列之輕鏈可變區所包含之CDR1、或包含於上述CDR1之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列

之CDR1、

包含序列編號5之胺基酸序列之輕鏈可變區所包含之CDR2、或包含於上述CDR2之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號5之胺基酸序列之輕鏈可變區所包含之CDR3、或包含於上述CDR3之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR3；

重鏈可變區，其含有：

包含序列編號133之胺基酸序列之重鏈可變區所包含之CDR1、或包含於上述CDR1之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號133之胺基酸序列之重鏈可變區所包含之CDR2、或包含於上述CDR2之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號133之胺基酸序列之重鏈可變區所包含之CDR3、或包含於上述CDR3之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR3；

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號134之胺基酸序列之輕鏈可變區所包含之CDR1、或包含於上述CDR1之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號134之胺基酸序列之輕鏈可變區所包含之CDR2、或包含於上述CDR2之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序

列之CDR2、及

包含序列編號134之胺基酸序列之輕鏈可變區所包含之CDR3、或包含於上述CDR3之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR3；或

重鏈可變區，其含有：

包含序列編號135之胺基酸序列之重鏈可變區所包含之CDR1、或包含於上述CDR1之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號135之胺基酸序列之重鏈可變區所包含之CDR2、或包含於上述CDR2之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號135之胺基酸序列之重鏈可變區所包含之CDR3、或包含於上述CDR3之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR3；

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號136之胺基酸序列之輕鏈可變區所包含之CDR1、或包含於上述CDR1之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號136之胺基酸序列之輕鏈可變區所包含之CDR2、或包含於上述CDR2之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號136之胺基酸序列之輕鏈可變區所包含之CDR3、或包含於上述CDR3之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序

列之CDR3。

於本實施形態中，CDR可藉由任何方法來特定。所謂規定之重鏈或輕鏈可變區所包含之CDR，意指包含藉由任一種方法自上述規定之重鏈或輕鏈可變區中特定出之胺基酸序列之CDR，包含該CDR之重鏈或輕鏈可變區中，CDR以外之序列亦可與上述規定之重鏈或輕鏈可變區不同。業者可考慮各種條件，藉由適宜方法來特定CDR。於某一實施形態中，CDR係藉由選自Kabat、Chothia、AbM、Contact、及IMGT中之任一種定義來特定。

【0049】

於又一實施形態中，本發明之抗hGDF15抗體包括：

重鏈可變區，其含有：

包含序列編號18之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號19之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號20之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR3；及

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號21之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號22之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號23之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基

酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR3。

【0050】

於又一實施形態中，本發明之抗hGDF15抗體包括：

重鏈可變區，其含有：

包含選自序列編號18、38～44、及149～150中之任一胺基酸序列之CDR1、

包含選自序列編號19、45～48、52～66、及151～153中之任一胺基酸序列之CDR2、及

包含選自序列編號20、49、50及67～80中之任一胺基酸序列之CDR3；及

輕鏈可變區，其含有：

包含選自序列編號21、81～89、100～104、及154中之任一胺基酸序列之CDR1、

包含選自序列編號22、90、106～115、及155～157中之任一胺基酸序列之CDR2、及

包含選自序列編號23、91～99、及118～132中之任一胺基酸序列之CDR3。

【0051】

於又一實施形態中，本發明之抗hGDF15抗體包括：

重鏈可變區，其含有：

包含選自序列編號18、38～42、及149～150中之任一胺基酸序列之CDR1、

包含選自序列編號19、46～48、52～66、及151～152中之任一胺基

酸序列之CDR2、及

包含選自序列編號20、71、73、77、及79中之任一胺基酸序列之CDR3；及

輕鏈可變區，其含有：

包含選自序列編號21、81～83、85～89、100～104、及154中之任一胺基酸序列之CDR1、

包含選自序列編號22、90、106、108～111、113～115、及155～157中之任一胺基酸序列之CDR2、及

包含選自序列編號23、93、95～99、121、122、124、125、131、及132中之任一胺基酸序列之CDR3。

【0052】

於又一實施形態中，本發明之抗hGDF15抗體包括：選自下述(1)～(3)中之任一重鏈可變區、及選自下述(4)～(6)中之任一輕鏈可變區：

(1)重鏈可變區，其含有：

包含選自序列編號18、38～44、及149～150中之任一胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號19之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號20之胺基酸序列之CDR3；

(2)重鏈可變區，其含有：

包含序列編號18之胺基酸序列之CDR1、

包含選自序列編號19、45～48、52～66、及151～153中之任一胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號20之胺基酸序列之CDR3；

(3)重鏈可變區，其含有：

包含序列編號18之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號19之胺基酸序列之CDR2、及

包含選自序列編號20、49、50及67～80中之任一胺基酸序列之CDR3；

(4)輕鏈可變區，其含有：

包含選自序列編號21、81～89、100～104、及154中之任一胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號22之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號23之胺基酸序列之CDR3；

(5)輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號21之胺基酸序列之CDR1、

包含選自序列編號22、90、106～115、及155～157中之任一胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號23之胺基酸序列之CDR3；

(6)輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號21之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號22之胺基酸序列之CDR2、及

包含選自序列編號23、91～99、及118～132中之任一胺基酸序列之CDR3。

【0053】

於又一實施形態中，本發明之抗hGDF15抗體包括：選自下述(1)～(3)中之任一重鏈可變區、及選自下述(4)～(6)中之任一輕鏈可變區：

(1)重鏈可變區，其含有：

包含選自序列編號18、38～42、及149～150中之任一胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號19之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號20之胺基酸序列之CDR3；

(2)重鏈可變區，其含有：

包含序列編號18之胺基酸序列之CDR1、

包含選自序列編號19、46～48、52～66、及151～152中之任一胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號20之胺基酸序列之CDR3；

(3)重鏈可變區，其含有：

包含序列編號18之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號19之胺基酸序列之CDR2、及

包含選自序列編號20、71、73、77、及79中之任一胺基酸序列之CDR3；

(4)輕鏈可變區，其含有：

包含選自序列編號21、81～83、85～89、100～104、及154中之任一胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號22之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號23之胺基酸序列之CDR3；

(5)輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號21之胺基酸序列之CDR1、

包含選自序列編號22、90、106、108～111、113～115、及155～

157中之任一胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號23之胺基酸序列之CDR3；

(6)輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號21之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號22之胺基酸序列之CDR2、及

包含選自序列編號23、93、95～99、121、122、124、125、131、及132中之任一胺基酸序列之CDR3。

【0054】

於又一實施形態中，本發明之抗hGDF15抗體包括：選自下述(1)～(3)中之任一重鏈可變區、及選自下述(4)～(6)中之任一輕鏈可變區：

(1)重鏈可變區，其含有：

包含選自序列編號18、38、及39中之任一胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號19之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號20之胺基酸序列之CDR3；

(2)重鏈可變區，其含有：

包含序列編號18之胺基酸序列之CDR1、

包含選自序列編號19、52、及66中之任一胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號20之胺基酸序列之CDR3；

(3)重鏈可變區，其含有：

包含序列編號18之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號19之胺基酸序列之CDR2、及

包含選自序列編號20及77中之任一胺基酸序列之CDR3；

(4)輕鏈可變區，其含有：

包含選自序列編號21及85中之任一胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號22之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號23之胺基酸序列之CDR3；

(5)輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號21之胺基酸序列之CDR1、

包含選自序列編號22、155、及157中之任一胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號23之胺基酸序列之CDR3；

(6)輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號21之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號22之胺基酸序列之CDR2、及

包含選自序列編號23及95中之任一胺基酸序列之CDR3。

【0055】

於又一實施形態中，本發明之抗hGDF15抗體包括如下重鏈可變區及輕鏈可變區：

(i)重鏈可變區，其含有：

包含選自序列編號18、38～44、及149～150中之任一胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號19之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號20之胺基酸序列自CDR3；

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號21之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號22之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號23之胺基酸序列之CDR3；

(ii)重鏈可變區，其含有：

包含序列編號18之胺基酸序列之CDR1、

包含選自序列編號19、45～48、52～66、及151～153中之任一胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號20之胺基酸序列之CDR3；

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號21之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號22之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號23之胺基酸序列之CDR3；

(iii)重鏈可變區，其含有：

包含序列編號18之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號19之胺基酸序列之CDR2、及

包含選自序列編號20、49、50及67～80中之任一胺基酸序列之CDR3；

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號21之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號22之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號23之胺基酸序列之CDR3；

(iv)重鏈可變區，其含有：

包含序列編號18之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號19之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號20之胺基酸序列之CDR3；

輕鏈可變區，其含有：

包含選自序列編號21、81～89、100～104、及154中之任一胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號22之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號23之胺基酸序列之CDR3；

(v)重鏈可變區，其含有：

包含序列編號18之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號19之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號20之胺基酸序列之CDR3；

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號21之胺基酸序列之CDR1、

包含選自序列編號22、90、106～115、及155～157中之任一胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號23之胺基酸序列之CDR3；或

(vi)重鏈可變區，其含有：

包含序列編號18之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號19之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號20之胺基酸序列之CDR3；

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號21之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號22之胺基酸序列之CDR2、及

包含選自序列編號23、91～99、及118～132中之任一胺基酸序列之CDR3。

【0056】

於又一實施形態中，本發明之抗hGDF15抗體包括如下重鏈可變區及輕鏈可變區：

(i)重鏈可變區，其含有：

包含選自序列編號18、38～42、及149～150中之任一胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號19之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號20之胺基酸序列之CDR3；

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號21之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號22之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號23之胺基酸序列之CDR3；

(ii)重鏈可變區，其含有：

包含序列編號18之胺基酸序列之CDR1、

包含選自序列編號19、45～48、52～66、及151～152中之任一胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號20之胺基酸序列之CDR3；

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號21之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號22之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號23之胺基酸序列之CDR3；

(iii)重鏈可變區，其含有：

包含序列編號18之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號19之胺基酸序列之CDR2、及

包含選自序列編號20、71、73、77、及79中之任一胺基酸序列之CDR3；

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號21之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號22之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號23之胺基酸序列之CDR3；

(iv)重鏈可變區，其含有：

包含序列編號18之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號19之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號20之胺基酸序列之CDR3；

輕鏈可變區，其含有：

包含選自序列編號21、81～83、85～89、100～104、及154中之任一胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號22之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號23之胺基酸序列之CDR3；

(v)重鏈可變區，其含有：

包含序列編號18之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號19之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號20之胺基酸序列之CDR3；

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號21之胺基酸序列之CDR1、

包含選自序列編號22、90、106、108～111、113～115、及155～

157中之任一胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號23之胺基酸序列之CDR3；或

(vi)重鏈可變區，其含有：

包含序列編號18之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號19之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號20之胺基酸序列之CDR3；

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號21之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號22之胺基酸序列之CDR2、及

包含選自序列編號23、93、95～99、121、122、124、125、131、及132中之任一胺基酸序列之CDR3。

【0057】

於又一實施形態中，本發明之抗hGDF15抗體包括：

重鏈可變區，其含有：

包含序列編號137之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號138之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號139之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR3；及

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號140之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號141之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號142之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR3。

【0058】

於又一實施形態中，本發明之抗hGDF15抗體包括：

重鏈可變區，其含有：

包含序列編號143之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號144之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號145之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR3；及

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號146之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號147之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號148之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR3。

【0059】

於又一實施形態中，本發明之抗hGDF15抗體包括：

重鏈可變區，其含有：與序列編號8之胺基酸序列具有80%、85%、

90%、或95%以上之序列同一性之胺基酸序列、或序列編號8之胺基酸序列或者於序列編號8之胺基酸序列中有1～20個、1～15個、1～10個、1～5個、或1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列；及

輕鏈可變區，其含有：與序列編號9之胺基酸序列具有80%、85%、90%、或95%以上之序列同一性之胺基酸序列、或序列編號9之胺基酸序列或者於序列編號9之胺基酸序列中有1～20個、1～15個、1～10個、1～5個、或1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列。

【0060】

於又一實施形態中，本發明之抗hGDF15抗體包括：

重鏈可變區，其含有序列編號8之胺基酸序列、或於序列編號8之胺基酸序列中包含選自H48R、H49R、H49D、H50R、H50S、H50F、H52R、H52Q、H72R、H73D、H73R、H73Y、H119R、H119F、H48S、H71Y、H72A、H72L、H72N、H72T、H72W、H75H、H75L、H75N、H75Q、H79H、H79K、H79Q、H79R、H83R、H117Q、H119E、H119H、H119K、H119N、H119Q、H119S、H119T、H120A、H120D、H120F、H120N、H120Q、H122F、H54T、H54N、H71R、H71H、及H71I中之任一種胺基酸置換之胺基酸序列；及

輕鏈可變區，其含有序列編號9之胺基酸序列、或於序列編號9之胺基酸序列中包含選自L47R、L48E、L48R、L48S、L48K、L50D、L50R、L50F、L50Y、L73R、L111F、L111Y、L112E、L112R、L112D、L112F、L113D、L113R、L113F、L48H、L48Y、L50Q、L50W、L51Q、L69Y、L70F、L70H、L72D、L72E、L72R、L72Y、L73K、L73N、L73Y、L75Q、L87K、L87N、L111A、L111N、

L111S、L112H、L112Q、L112T、L112Y、L113S、L114F、L114H、L114I、L114N、L114Y、L116H、L116Y、L51Y、L72F、L73Q、 及L74H中之任一種胺基酸置換之胺基酸序列。

【0061】

於又一實施形態中，本發明之抗hGDF15抗體包括：

重鏈可變區，其含有序列編號8之胺基酸序列、或於序列編號8之胺基酸序列中包含選自H49R、H49D、H50R、H50S、H50F、H73D、H73R、H73Y、H48S、H71Y、H72A、H72L、H72N、H72T、H72W、H75H、H75L、H75N、H75Q、H79H、H79K、H79Q、H79R、H83R、H119N、H119S、H120F、H120Q、H54T、H54N、H71R、及H71H中之任一種胺基酸置換之胺基酸序列；及

輕鏈可變區，其含有序列編號9之胺基酸序列、或於序列編號9之胺基酸序列中包含選自L47R、L48E、L48R、L48K、L50D、L50R、L50F、L50Y、L73R、L112E、L112D、L112F、L113D、L113R、L113F、L48H、L48Y、L50Q、L50W、L51Q、L70F、L72D、L72E、L72R、L72Y、L73N、L73Y、L75Q、L112H、L112Q、L112Y、L113S、L116H、L116Y、L51Y、L72F、L73Q、 及L74H中之任一種胺基酸置換之胺基酸序列。

【0062】

於又一實施形態中，本發明之抗hGDF15抗體包括：

重鏈可變區，其含有序列編號8之胺基酸序列、或於序列編號8之胺基酸序列中包含選自H49R、H49D、H48S、H71Y、H83R、及H120F中之任一種胺基酸置換之胺基酸序列；及

輕鏈可變區，其含有序列編號9之胺基酸序列、或於序列編號9之胺基酸序列中包含選自L48K、L112D、L72F、及L74H中之任一種胺基酸置換之胺基酸序列。

【0063】

於該等實施形態中，胺基酸置換係由表示置換前之胺基酸殘基之縮寫、表示其位置之數字、及表示置換後之胺基酸殘基之縮寫表示。例如，「H48R」意指第48號之組胺酸殘基向精胺酸殘基之置換。

【0064】

於又一實施形態中，本發明之抗hGDF15抗體包括：包含序列編號8之胺基酸序列之重鏈可變區、及包含序列編號9之胺基酸序列之輕鏈可變區。

【0065】

於又一實施形態中，本發明之抗hGDF15抗體包括如下重鏈可變區及輕鏈可變區：

重鏈可變區，其含有與序列編號4之胺基酸序列具有80%、85%、90%、或95%以上之序列同一性之胺基酸序列、或序列編號4之胺基酸序列或者於序列編號4之胺基酸序列中有1～20個、1～15個、1～10個、1～5個、或1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列；及

輕鏈可變區，其含有與序列編號5之胺基酸序列具有80%、85%、90%、或95%以上之序列同一性之胺基酸序列、或序列編號5之胺基酸序列或者於序列編號5之胺基酸序列中有1～20個、1～15個、1～10個、1～5個、或1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列；

重鏈可變區，其含有與序列編號6之胺基酸序列具有80%、85%、

90%、或95%以上之序列同一性之胺基酸序列、或序列編號6之胺基酸序列或者於序列編號6之胺基酸序列中有1～20個、1～15個、1～10個、1～5個、或1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列；及

輕鏈可變區，其含有與序列編號7之胺基酸序列具有80%、85%、90%、或95%以上之序列同一性之胺基酸序列、或序列編號7之胺基酸序列或者於序列編號7之胺基酸序列中有1～20個、1～15個、1～10個、1～5個、或1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列；

重鏈可變區，其含有與序列編號133之胺基酸序列具有80%、85%、90%、或95%以上之序列同一性之胺基酸序列、或序列編號133之胺基酸序列或者於序列編號133之胺基酸序列中有1～20個、1～15個、1～10個、1～5個、或1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列；及

輕鏈可變區，其含有與序列編號134之胺基酸序列具有80%、85%、90%、或95%以上之序列同一性之胺基酸序列、或序列編號134之胺基酸序列或者於序列編號134之胺基酸序列中有1～20個、1～15個、1～10個、1～5個、或1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列；或

重鏈可變區，其含有與序列編號135之胺基酸序列具有80%、85%、90%、或95%以上之序列同一性之胺基酸序列、或序列編號135之胺基酸序列或者於序列編號135之胺基酸序列中有1～20個、1～15個、1～10個、1～5個、或1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列；及

輕鏈可變區，其含有與序列編號136之胺基酸序列具有80%、85%、90%、或95%以上之序列同一性之胺基酸序列、或序列編號136之胺基酸序列或者於序列編號136之胺基酸序列中有1～20個、1～15個、1～10個、1～5個、或1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列。

【0066】

於本說明書中，胺基酸之改性包括胺基酸之缺失、置換、插入、及附加。改性可為缺失、置換、插入、及附加中之任一種，亦可為其等2種以上之組合。改性之數量並無限定，例如為1～20個、1～15個、1～10個、1～5個、或1～3個。於某一實施形態中，胺基酸之改性係胺基酸之置換。於又一實施形態中，胺基酸之改性係1～3個胺基酸之改性。於又一實施形態中，胺基酸之改性係1個胺基酸之置換。

【0067】

於本說明書中，「包含」規定胺基酸序列之胺基酸序列包括：向該規定胺基酸序列附加1個以上之胺基酸殘基而成之胺基酸序列、及包含該規定胺基酸序列之序列。

【0068】

於本說明書中，關於包含與規定重鏈可變區或輕鏈可變區之胺基酸序列具有80%、85%、90%、或95%以上之序列同一性之胺基酸序列的重鏈可變區或輕鏈可變區、及包含於規定重鏈可變區或輕鏈可變區之胺基酸序列中有1～20個、1～15個、1～10個、1～5個、或1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列的重鏈可變區或輕鏈可變區，包括該規定重鏈可變區或輕鏈可變區之胺基酸序列中CDR未產生改性之重鏈可變區或輕鏈可變區。

【0069】

本說明書中所謂與胺基酸序列相關之「序列同一性」，意指橫跨比較對象之序列與最佳狀態(一致成為最大之狀態)匹配之2個序列間一致之胺基酸殘基的比例。此處，比較對象之序列亦可於2個序列之最佳匹配中具

有附加或缺失(例如空位(gap)等)。序列同一性可使用公共資料庫(例如，DDBJ(http://www.ddbj.nig.ac.jp))中 所 提 供 之FASTA、BLAST、CLUSTAL W等程式而算出。或者，亦可使用市售之序列分析軟體(例如，Vector NTI(註冊商標)軟體、GENETYX(註冊商標) ver. 12)來求出。

【0070】

作為將胺基酸序列改性而獲得具有所需特性之抗體之方法，已知有各種方法。例如改善了結合親和性之變異體可藉由基於噬菌體呈現之方法獲得。於該方法中，例如藉由丙胺酸掃描變異導入法，對會影響抗體與抗原之相互作用的胺基酸殘基進行鑑定，或者對抗原抗體複合體之結晶結構進行分析而鑑定抗體與抗原之間之接觸點等，從而決定變異導入部位。藉由易錯PCR或定點變異導入等而製作將該部位之胺基酸改性所得之變異體，對所獲得之變異體進行庫篩選，藉此可獲得具有所需特性之變異體。

【0071】

本發明之抗體具有使血中GDF15濃度降低之作用。是否具有此作用，可藉由如下方式進行確認，即如實施例中所記載般，評價於移植有GDF15表現癌細胞之動物中與對照抗體相比，是否使血中GDF15濃度明顯減少。認為本發明之抗體會抑制前導GDF15之切斷，藉此使血中GDF15濃度降低，但此不受任何理論拘束。又，本發明之抗體可具有與成熟GDF15結合，抑制自GDF15之訊息傳遞之作用。

【0072】

本發明之抗體可藉由使血中GDF15濃度降低(視情形，進而抑制GDF15之訊息傳遞)，而發揮改善體重減少、食慾不振、晝夜節律障礙等症狀之作用。

【0073】

為了調節抗體依賴性細胞毒殺(ADCC)活性、補體依賴性細胞毒殺(CDC)活性或體內動態，抗體可選擇免疫球蛋白之亞型，亦可將Fc區之胺基酸序列或糖鏈加以改性。例如為了降低補體活化能力，可選擇IgG4。又，可進行如下改性等，例如降低或增強與Fc受體或C1q之結合性之改性、為了延長血中半衰期而提昇與FcRn之結合親和性之改性。

【0074】

又，例如為了延長抗體之血中半衰期、或改善穩定性等，抗體亦可與聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇、聚氧伸烷基二醇或聚乙二醇與聚丙二醇之共聚物等聚合物結合。

【0075】

又，抗體亦可與化學療法藥、毒性肽、放射性同位素等結合。作為化學療法藥，可例舉：順鉑、卡鉑、奧沙利鉑、二氯甲基二乙胺、環磷醯胺、氯芥苯丁酸、及異環磷醯胺等烷基化藥；硫唑嘌呤及巰嘌呤等代謝拮抗藥；長春花屬生物鹼(例如，長春新鹼、長春花鹼、長春瑞賓、及長春地辛)、紫杉烷(例如，紫杉醇、歐洲紫杉醇)、依託泊苷及替尼泊苷等生物鹼；喜樹鹼(例如伊立替康及托泊替康)等拓樸異構酶抑制劑；放射菌素、蒽環黴素、多柔比星、柔紅黴素、戊柔比星、艾達黴素、表柔比星、博來黴素、光輝黴素及絲裂黴素等細胞毒殺性抗生素等。

【0076】

本發明之抗體可用作醫藥組合物之有效成分。本發明之抗體具有使血中GDF15濃度降低之作用(視情形，進而抑制GDF15之訊息傳遞之作用)，對於與GDF15相關之疾病或症狀之治療有用。作為與GDF15相關之

疾病或症狀，可例舉：體重減少、食慾不振、肌量降低、活動性下降、晝夜節律障礙、腦下垂體激素分泌異常、體溫調節障礙、惡病質、癌症、糖尿病、腎功能衰竭、心衰竭、AIDS(Acquired Immune Deficiency Syndrome，後天性免疫不全症候群)、COPD(Chronic obstructive pulmonary disease，慢性阻塞性肺疾病)、多發性硬化症、類風濕性關節炎、敗血症、結核病、肌肉減少症、癌之骨轉移、抗癌劑誘發性噁心嘔吐、妊娠劇吐、慢性骨髓增生性疾病(例如，骨髓纖維症、真性紅細胞增多症、特發性血小板增多症)、神經性厭食症、躁鬱症、粒線體病、ICU獲得性肌無力等。

【0077】

於某一實施形態中，惡病質係伴隨癌症、糖尿病、腎功能衰竭、心衰竭、AIDS、COPD、多發性硬化症、類風濕性關節炎、敗血症、或結核病之惡病質。於又一實施形態中，惡病質係癌症惡病質。惡病質之治療包括：對選自體重減少、食慾不振、肌量降低、活動性下降、晝夜節律障礙、腦下垂體激素分泌異常、及體溫調節障礙中之1種以上之症狀進行改善。

【0078】

癌症並無限定，可例舉：胃癌、食管癌、大腸癌、肺癌、胰腺癌、腎癌、前列腺癌、卵巢癌、乳癌、宮頸癌、子宮體癌、睾丸癌、膀胱癌、甲狀腺癌、肝細胞癌、肝內膽管癌、頭頸癌、白血病、多發性骨髓瘤、淋巴瘤、腦瘤、神經膠瘤、黑色素瘤等。

【0079】

本發明之抗體以可發揮所需效果(例如，與GDF15相關之疾病或症狀

之治療)之量(於本說明書中稱為有效量)向對象投予。抗體之投予量係根據投予方法、投予對象年齡、體重、健康狀態等來適當選擇。例如，成人可每天以10 μg/kg～100 mg/kg、100 μg/kg～10 mg/kg、或1 mg/kg～10 mg/kg之量連日投予、或間隔數天、1週、數週、1個月或數個月投予1次，並不限定於此。抗體之投予方法亦根據投予對象年齡、體重、健康狀態等來適當選擇。投予方法可經口投予，亦可非經口投予，較佳為非經口投予。作為非經口投予，可例舉皮下投予、皮內投予、肌肉內投予、靜脈內投予等，較佳為靜脈內投予。

【0080】

本說明書中，「對象」為哺乳動物。作為哺乳動物，例如可例舉小鼠、大鼠、兔、貓、狗、綿羊、豬、馬、牛、猴、及人類，但並不限定於其等。於某一實施形態中，對象為人類。

【0081】

醫藥組合物可藉由常規方法進行製劑化。醫藥組合物除抗體以外，還可包含殺菌水、生理食鹽水、穩定劑、賦形劑、抗氧化劑、緩衝劑、防腐劑、界面活性劑、螯合劑、黏合劑等醫藥上所容許之載體或添加劑。

【0082】

本發明之抗體亦可與其他治療藥併用。本說明書中，於併用2種以上之有效成分之情形時，其全部或一部分之有效成分可包含在同一組合物中，亦可所有藥劑包含在另一組合物中。又，2種以上之有效成分之投予排程可相同亦可不同。

【0083】

於某一實施形態中，本發明之抗體係與癌症治療藥併用。作為癌症

治療藥，並無限定，可例舉：順鉑、卡鉑、奧沙利鉑、二氯甲基二乙胺、環磷醯胺、氯芥苯丁酸、及異環磷醯胺等烷基化藥；硫唑嘌呤及巯嘌呤等代謝拮抗藥；長春花屬生物鹼(例如，長春新鹼、長春花鹼、長春瑞賓、及長春地辛)、紫杉烷(例如，紫杉醇、歐洲紫杉醇)、依託泊苷及替尼泊苷等生物鹼；喜樹鹼(例如伊立替康及托泊替康)等拓樸異構酶抑制劑；放射菌素、蒽環黴素、多柔比星、柔紅黴素、戊柔比星、艾達黴素、表柔比星、博來黴素、光輝黴素及絲裂黴素等細胞毒殺性抗生素；EGFR抑制劑、HER2抑制劑、ALK抑制劑、VEGFR抑制劑等分子靶向藥；抗PD-1抗體、抗PD-L1抗體等免疫檢查點抑制劑。

【0084】

於以下記載本發明之例示實施形態。

【0085】

[1]

一種抗hGDF15抗體，其與包含DHCPLGPGRCCRLH(序列編號3)之胺基酸序列之hGDF15之表位結合。

[2]

如上述1記載之抗體，其包括：

重鏈可變區，其含有：

包含序列編號4之胺基酸序列之重鏈可變區所包含之CDR1、或包含於上述CDR1之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號4之胺基酸序列之重鏈可變區所包含之CDR2、或包含於上述CDR2之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列

之CDR2、及

包含序列編號4之胺基酸序列之重鏈可變區所包含之CDR3、或包含於上述CDR3之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR3；及

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號5之胺基酸序列之輕鏈可變區所包含之CDR1、或包含於上述CDR1之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號5之胺基酸序列之輕鏈可變區所包含之CDR2、或包含於上述CDR2之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號5之胺基酸序列之輕鏈可變區所包含之CDR3、或包含於上述CDR3之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR3。

[3]

如上述1或2記載之抗體，其包括：

重鏈可變區，其含有：

包含序列編號18之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號19之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號20之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR3；及

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號21之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號22之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號23之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR3。

[4]

一種抗hGDF15抗體，其包括：

重鏈可變區，其含有：

包含序列編號4之胺基酸序列之重鏈可變區所包含之CDR1、或包含於上述CDR1之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號4之胺基酸序列之重鏈可變區所包含之CDR2、或包含於上述CDR2之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號4之胺基酸序列之重鏈可變區所包含之CDR3、或包含於上述CDR3之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR3；及

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號5之胺基酸序列之輕鏈可變區所包含之CDR1、或包含於上述CDR1之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號5之胺基酸序列之輕鏈可變區所包含之CDR2、或包含於上述CDR2之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號5之胺基酸序列之輕鏈可變區所包含之CDR3、或包含於上述CDR3之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR3。

[5]

一種抗hGDF15抗體，其包括：

重鏈可變區，其含有：

包含序列編號18之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號19之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號20之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR3；及

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號21之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號22之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號23之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR3。

[6]

如上述2至5中任一項記載之抗體，其中上述1～3個胺基酸殘基之改性為1個胺基酸殘基之改性。

[7]

如上述2至6中任一項記載之抗體，其中上述胺基酸殘基之改性為胺基酸殘基之置換。

[8]

如上述2至7中任一項記載之抗體，其中上述1～3個胺基酸殘基之改性為1個胺基酸殘基之置換。

[9]

如上述1至8中任一項記載之抗體，其包括包含CDR3之重鏈可變區，該CDR3包含序列編號20之胺基酸序列。

[10]

如上述1至9中任一項記載之抗體，其包括包含CDR3之輕鏈可變區，該CDR3包含序列編號23之胺基酸序列。

[11]

如上述1至10中任一項記載之抗體，其包括：

重鏈可變區，其含有：

包含選自序列編號18、38～44、及149～150中之任一胺基酸序列之CDR1、

包含選自序列編號19、45～48、52～66、及151～153中之任一胺基酸序列之CDR2、及

包含選自序列編號20、49、50及67～80中之任一胺基酸序列之CDR3；及

輕鏈可變區，其含有：

包含選自序列編號21、81～89、100～104、及154中之任一胺基酸序列之CDR1、

包含選自序列編號22、90、106～115、及155～157中之任一胺基酸序列之CDR2、及

包含選自序列編號23、91～99、及118～132中之任一胺基酸序列之CDR3。

[12]

如上述1至11中任一項記載之抗體，其包括：

重鏈可變區，其含有：

包含選自序列編號18、38～42、及149～150中之任一胺基酸序列之CDR1、

包含選自序列編號19、46～48、52～66、及151～152中之任一胺基酸序列之CDR2、及

包含選自序列編號20、71、73、77、及79中之任一胺基酸序列之CDR3；及

輕鏈可變區，其含有：

包含選自序列編號21、81～83、85～89、100～104、及154中之任一胺基酸序列之CDR1、

包含選自序列編號22、90、106、108～111、113～115、及155～157中之任一胺基酸序列之CDR2、及

包含選自序列編號23、93、95～99、121、122、124、125、131、及132中之任一胺基酸序列之CDR3。

[13]

如上述1至12中任一項記載之抗體，其包括：

重鏈可變區，其含有：

包含選自序列編號18及38～44中之任一胺基酸序列之CDR1、

包含選自序列編號19、45～48、及52～66中之任一胺基酸序列之CDR2、及

包含選自序列編號20、49、50及67～80中之任一胺基酸序列之CDR3；

輕鏈可變區，其含有：

包含選自序列編號21、81～89、及100～104中之任一胺基酸序列之CDR1、

包含選自序列編號22、90、及106～115中之任一胺基酸序列之CDR2、及

包含選自序列編號23、91～99、及118～132中之任一胺基酸序列之CDR3。

[14]

如上述1至13中任一項記載之抗體，其包括：

重鏈可變區，其含有：

包含選自序列編號18及38～42中之任一胺基酸序列之CDR1、

包含選自序列編號19、46～48、及52～66中之任一胺基酸序列之CDR2、及

包含選自序列編號20、71、73、77、及79中之任一胺基酸序列之CDR3；及

輕鏈可變區，其含有：

包含選自序列編號21、81～83、85～89、及100～104中之任一胺基酸序列之CDR1、

包含選自序列編號22、90、106、108～111、及113～115中之任一胺基酸序列之CDR2、及

包含選自序列編號23、93、95～99、121、122、124、125、131、及132中之任一胺基酸序列之CDR3。

[15]

如上述1至14中任一項記載之抗體，其包括：選自下述(1)～(3)中之任一重鏈可變區、及選自下述(4)～(6)中之任一輕鏈可變區：

(1)重鏈可變區，其含有：

包含選自序列編號18、38～44、及149～150中之任一胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號19之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號20之胺基酸序列之CDR3；

(2)重鏈可變區，其含有：

包含序列編號18之胺基酸序列之CDR1、

包含選自序列編號19、45～48、52～66、及151～153中之任一胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號20之胺基酸序列之CDR3；

(3)重鏈可變區，其含有：

包含序列編號18之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號19之胺基酸序列之CDR2、及

包含選自序列編號20、49、50及67～80中之任一胺基酸序列之CDR3；

(4)輕鏈可變區，其含有：

包含選自序列編號21、81～89、100～104、及154中之任一胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號22之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號23之胺基酸序列之CDR3；

(5)輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號21之胺基酸序列之CDR1、

包含選自序列編號22、90、106～115、及155～157中之任一胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號23之胺基酸序列之CDR3；

(6)輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號21之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號22之胺基酸序列之CDR2、及

包含選自序列編號23、91～99、及118～132中之任一胺基酸序列之CDR3。

[16]

如上述1至15中任一項記載之抗體，其包括：選自下述(1)～(3)中之任一重鏈可變區、及選自下述(4)～(6)中之任一輕鏈可變區：

(1)重鏈可變區，其含有：

包含選自序列編號18、38～42、及149～150中之任一胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號19之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號20之胺基酸序列之CDR3；

(2)重鏈可變區，其含有：

包含序列編號18之胺基酸序列之CDR1、

包含選自序列編號19、46～48、52～66、及151～152中之任一胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號20之胺基酸序列之CDR3；

(3)重鏈可變區，其含有：

包含序列編號18之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號19之胺基酸序列之CDR2、及

包含選自序列編號20、71、73、77、及79中之任一胺基酸序列之CDR3；

(4)輕鏈可變區，其含有：

包含選自序列編號21、81～83、85～89、100～104、及154中之任一胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號22之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號23之胺基酸序列之CDR3；

(5)輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號21之胺基酸序列之CDR1、

包含選自序列編號22、90、106、108～111、113～115、及155～157中之任一胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號23之胺基酸序列之CDR3；

(6)輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號21之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號22之胺基酸序列之CDR2、及

包含選自序列編號23、93、95～99、121、122、124、125、131、及132中之任一胺基酸序列之CDR3。

[17]

如上述1至16中任一項記載之抗體，其包括：選自下述(1)～(3)中之任一重鏈可變區、及選自下述(4)～(6)中之任一輕鏈可變區：

(1)重鏈可變區，其含有：

包含選自序列編號18、38、及39中之任一胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號19之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號20之胺基酸序列之CDR3；

(2)重鏈可變區，其含有：

包含序列編號18之胺基酸序列之CDR1、

包含選自序列編號19、52、及66中之任一胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號20之胺基酸序列之CDR3；

(3)重鏈可變區，其含有：

包含序列編號18之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號19之胺基酸序列之CDR2、及

包含選自序列編號20及77中之任一胺基酸序列之CDR3；

(4)輕鏈可變區，其含有：

包含選自序列編號21及85中之任一胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號22之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號23之胺基酸序列之CDR3；

(5)輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號21之胺基酸序列之CDR1、

包含選自序列編號22、155、及157中之任一胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號23之胺基酸序列之CDR3；

(6)輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號21之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號22之胺基酸序列之CDR2、及

包含選自序列編號23及95中之任一胺基酸序列之CDR3。

[18]

如上述1至17中任一項記載之抗體，其包括如下重鏈可變區及輕鏈可變區：

(i)重鏈可變區，其含有：

包含選自序列編號18、38～44、及149～150中之任一胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號19之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號20之胺基酸序列之CDR3；

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號21之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號22之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號23之胺基酸序列之CDR3；

(ii)重鏈可變區，其含有：

包含序列編號18之胺基酸序列之CDR1、

包含選自序列編號19、45～48、52～66、及151～153中之任一胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號20之胺基酸序列之CDR3；

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號21之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號22之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號23之胺基酸序列之CDR3；

(iii)重鏈可變區，其含有：

包含序列編號18之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號19之胺基酸序列之CDR2、及

包含選自序列編號20、49、50及67～80中之任一胺基酸序列之CDR3；

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號21之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號22之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號23之胺基酸序列之CDR3；

(iv)重鏈可變區，其含有：

包含序列編號18之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號19之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號20之胺基酸序列之CDR3；

輕鏈可變區，其含有：

包含選自序列編號21、81～89、100～104、及154中之任一胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號22之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號23之胺基酸序列之CDR3；

(v)重鏈可變區，其含有：

包含序列編號18之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號19之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號20之胺基酸序列之CDR3；

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號21之胺基酸序列之CDR1、

包含選自序列編號22、90、106～115、及155～157中之任一胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號23之胺基酸序列之CDR3；或

(vi)重鏈可變區，其含有：

包含序列編號18之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號19之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號20之胺基酸序列之CDR3；

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號21之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號22之胺基酸序列之CDR2、及

包含選自序列編號23、91～99、及118～132中之任一胺基酸序列之CDR3。

[19]

如上述1至18中任一項記載之抗體，其包括如下重鏈可變區及輕鏈可變區：

(i)重鏈可變區，其含有：

包含選自序列編號18、38～42、及149～150中之任一胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號19之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號20之胺基酸序列之CDR3；

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號21之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號22之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號23之胺基酸序列之CDR3；

(ii)重鏈可變區，其含有：

包含序列編號18之胺基酸序列之CDR1、

包含選自序列編號19、45～48、52～66、及151～152中之任一胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號20之胺基酸序列之CDR3；

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號21之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號22之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號23之胺基酸序列之CDR3；

(iii)重鏈可變區，其含有：

包含序列編號18之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號19之胺基酸序列之CDR2、及

包含選自序列編號20、71、73、77、及79中之任一胺基酸序列之CDR3；

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號21之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號22之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號23之胺基酸序列之CDR3；

(iv)重鏈可變區，其含有：

包含序列編號18之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號19之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號20之胺基酸序列之CDR3；

輕鏈可變區，其含有：

包含選自序列編號21、81～83、85～89、100～104、及154中之任一胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號22之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號23之胺基酸序列之CDR3；

(v)重鏈可變區，其含有：

包含序列編號18之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號19之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號20之胺基酸序列之CDR3；

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號21之胺基酸序列之CDR1、

包含選自序列編號22、90、106、108～111、113～115、及155～157中之任一胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號23之胺基酸序列之CDR3；或

(vi)重鏈可變區，其含有：

包含序列編號18之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號19之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號20之胺基酸序列之CDR3；

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號21之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號22之胺基酸序列之CDR2、及

包含選自序列編號23、93、95～99、121、122、124、125、131、及132中之任一胺基酸序列之CDR3。

[20]

如上述1至19中任一項記載之抗體，其包括如下重鏈可變區及輕鏈可變區：

(i)重鏈可變區，其含有：

包含選自序列編號18及38～44中之任一胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號19之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號20之胺基酸序列之CDR3；

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號21之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號22之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號23之胺基酸序列之CDR3；

(ii)重鏈可變區，其含有：

包含序列編號18之胺基酸序列之CDR1、

包含選自序列編號19、45～48、及52～66中之任一胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號20之胺基酸序列之CDR3；

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號21之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號22之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號23之胺基酸序列之CDR3；

(iii)重鏈可變區，其含有：

包含序列編號18之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號19之胺基酸序列之CDR2、及

包含選自序列編號20、49、50及67～80中之任一胺基酸序列之CDR3；

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號21之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號22之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號23之胺基酸序列之CDR3；

(iv)重鏈可變區，其含有：

包含序列編號18之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號19之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號20之胺基酸序列之CDR3；

輕鏈可變區，其含有：

包含選自序列編號21、81～89、及100～104中之任一胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號22之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號23之胺基酸序列之CDR3；

(v)重鏈可變區，其含有：

包含序列編號18之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號19之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號20之胺基酸序列之CDR3；

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號21之胺基酸序列之CDR1、

包含選自序列編號22、90、及106～115中之任一胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號23之胺基酸序列之CDR3；或

(vi)重鏈可變區，其含有：

包含序列編號18之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號19之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號20之胺基酸序列之CDR3；

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號21之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號22之胺基酸序列之CDR2、及

包含選自序列編號23、91～99、及118～132中之任一胺基酸序列之CDR3。

[21]

如上述1至20中任一項記載之抗體，其包括如下重鏈可變區及輕鏈可變區：

(i)重鏈可變區，其含有：

包含選自序列編號18及38～42中之任一胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號19之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號20之胺基酸序列之CDR3；

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號21之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號22之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號23之胺基酸序列之CDR3；

(ii)重鏈可變區，其含有：

包含序列編號18之胺基酸序列之CDR1、

包含選自序列編號19、46～48、及52～66中之任一胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號20之胺基酸序列之CDR3；

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號21之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號22之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號23之胺基酸序列之CDR3；

(iii)重鏈可變區，其含有：

包含序列編號18之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號19之胺基酸序列之CDR2、及

包含選自序列編號20、71、73、77、及79中之任一胺基酸序列之CDR3；

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號21之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號22之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號23之胺基酸序列之CDR3；

(iv)重鏈可變區，其含有：

包含序列編號18之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號19之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號20之胺基酸序列之CDR3；

輕鏈可變區，其含有：

包含選自序列編號21、81～83、85～89、及100～104中之任一胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號22之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號23之胺基酸序列之CDR3；

(v)重鏈可變區，其含有：

包含序列編號18之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號19之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號20之胺基酸序列之CDR3；

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號21之胺基酸序列之CDR1、

包含選自序列編號22、90、106、108～111、及113～115中之任一胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號23之胺基酸序列之CDR3；或

(vi)重鏈可變區，其含有：

包含序列編號18之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號19之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號20之胺基酸序列之CDR3；

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號21之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號22之胺基酸序列之CDR2、及

包含選自序列編號23、93、95～99、121、122、124、125、131、及132中之任一胺基酸序列之CDR3。

[22]

如上述1至21中任一項記載之抗體，其包括：

重鏈可變區，其含有：

包含序列編號18之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號19之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號20之胺基酸序列之CDR3；及

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號21之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號22之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號23之胺基酸序列之CDR3。

[23]

如上述1至22中記載之抗體，其包括：包含序列編號4之胺基酸序列之重鏈可變區所包含之CDR1、CDR2、及CDR3；及包含序列編號5之胺基酸序列之輕鏈可變區所包含之CDR1、CDR2、及CDR3。

[24]

如上述1中記載之抗體，其包括：

重鏈可變區，其含有：

包含序列編號133之胺基酸序列之重鏈可變區所包含之CDR1、或包

含於上述CDR1之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號133之胺基酸序列之重鏈可變區所包含之CDR2、或包含於上述CDR2之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號133之胺基酸序列之重鏈可變區所包含之CDR3、或包含於上述CDR3之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR3；及

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號134之胺基酸序列之輕鏈可變區所包含之CDR1、或包含於上述CDR1之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號134之胺基酸序列之輕鏈可變區所包含之CDR2、或包含於上述CDR2之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號134之胺基酸序列之輕鏈可變區所包含之CDR3、或包含於上述CDR3之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR3。

[25]

如上述1或24中記載之抗體，其包括：

重鏈可變區，其含有：

包含序列編號137之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號138之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號139之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR3；及

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號140之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號141之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號142之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR3。

[26]

一種抗hGDF15抗體，其包括：

重鏈可變區，其含有：

包含序列編號133之胺基酸序列之重鏈可變區所包含之CDR1、或包含於上述CDR1之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號133之胺基酸序列之重鏈可變區所包含之CDR2、或包含於上述CDR2之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號133之胺基酸序列之重鏈可變區所包含之CDR3、或包含於上述CDR3之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR3；及

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號134之胺基酸序列之輕鏈可變區所包含之CDR1、或包含於上述CDR1之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號134之胺基酸序列之輕鏈可變區所包含之CDR2、或包含於上述CDR2之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號134之胺基酸序列之輕鏈可變區所包含之CDR3、或包含於上述CDR3之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR3。

[27]

一種抗hGDF15抗體，其包括：

重鏈可變區，其含有：

包含序列編號137之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號138之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號139之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR3；及

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號140之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號141之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基

酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號142之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR3。

[28]

如上述24至27中任一項記載之抗體，其中上述1～3個胺基酸殘基之改性為1個胺基酸殘基之改性。

[29]

如上述28記載之抗體，其中上述胺基酸殘基之改性為胺基酸殘基之置換。

[30]

如上述28或29記載之抗體，其中上述1～3個胺基酸殘基之改性為1個胺基酸殘基之置換。

[31]

如上述1及24至30中任一項記載之抗體，其包括包含CDR3之重鏈可變區，該CDR3包含序列編號139之胺基酸序列。

[32]

如上述1及24至31中任一項記載之抗體，其包括包含CDR3之輕鏈可變區，該CDR3包含序列編號142之胺基酸序列。

[33]

如上述1及24至32中任一項記載之抗體，其包括：

重鏈可變區，其含有：

包含序列編號137之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號138之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號139之胺基酸序列之CDR3；及

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號140之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號141之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號142之胺基酸序列之CDR3。

[34]

如上述1及24至33中任一項記載之抗體，其包括：包含序列編號133之胺基酸序列之重鏈可變區所包含之CDR1、CDR2、及CDR3；及包含序列編號134之胺基酸序列之輕鏈可變區所包含之CDR1、CDR2、及CDR3。

[35]

如上述1記載之抗體，其包括：

重鏈可變區，其含有：

包含序列編號135之胺基酸序列之重鏈可變區所包含之CDR1、或包含於上述CDR1之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號135之胺基酸序列之重鏈可變區所包含之CDR2、或包含於上述CDR2之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號135之胺基酸序列之重鏈可變區所包含之CDR3、或包含於上述CDR3之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR3；及

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號136之胺基酸序列之輕鏈可變區所包含之CDR1、或包含於上述CDR1之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號136之胺基酸序列之輕鏈可變區所包含之CDR2、或包含於上述CDR2之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號136之胺基酸序列之輕鏈可變區所包含之CDR3、或包含於上述CDR3之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR3。

[36]

如上述1或35記載之抗體，其包括：

重鏈可變區，其含有：

包含序列編號143之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號144之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號145之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR3；及

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號146之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號147之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號148之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR3。

[37]

一種抗hGDF15抗體，其包括：

重鏈可變區，其含有：

包含序列編號135之胺基酸序列之重鏈可變區所包含之CDR1、或包含於上述CDR1之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號135之胺基酸序列之重鏈可變區所包含之CDR2、或包含於上述CDR2之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號135之胺基酸序列之重鏈可變區所包含之CDR3、或包含於上述CDR3之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR3；及

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號136之胺基酸序列之輕鏈可變區所包含之CDR1、或包含於上述CDR1之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號136之胺基酸序列之輕鏈可變區所包含之CDR2、或包含於上述CDR2之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號136之胺基酸序列之輕鏈可變區所包含之CDR3、或包含於上述CDR3之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序

列之CDR3。

[38]

一種抗hGDF15抗體，其包括：

重鏈可變區，其含有：

包含序列編號143之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號144之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號145之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR3；及

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號146之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號147之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號148之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR3。

[39]

如上述35至38中任一項記載之抗體，其中上述1～3個胺基酸殘基之改性為1個胺基酸殘基之改性。

[40]

如上述39記載之抗體，其中上述胺基酸殘基之改性為胺基酸殘基之置換。

[41]

如上述39或40記載之抗體，其中上述1～3個胺基酸殘基之改性為1個胺基酸殘基之置換。

[42]

如上述1及35至41中任一項記載之抗體，其包括包含CDR3之重鏈可變區，該CDR3包含序列編號145之胺基酸序列。

[43]

如上述1及35至42中任一項記載之抗體，其包括包含CDR3之輕鏈可變區，該CDR3包含序列編號148之胺基酸序列。

[44]

如上述1及35至43中任一項記載之抗體，其包括：

重鏈可變區，其含有：

包含序列編號143之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號144之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號145之胺基酸序列之CDR3；及

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號146之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號147之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號148之胺基酸序列之CDR3。

[45]

如上述1及35至44中任一項記載之抗體，其包括：包含序列編號135之胺基酸序列之重鏈可變區所包含之CDR1、CDR2、及CDR3；及包含序列編號136之胺基酸序列之輕鏈可變區所包含之CDR1、CDR2、及

CDR3。

[46]

如上述1至45中任一項記載之抗體，其包括：

重鏈可變區，其含有：與序列編號8之胺基酸序列具有80%、85%、90%、或95%以上之序列同一性之胺基酸序列、或序列編號8之胺基酸序列或者於序列編號8之胺基酸序列中有1～20個、1～15個、1～10個、1～5個、或1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列；及

輕鏈可變區，其含有：與序列編號9之胺基酸序列具有80%、85%、90%、或95%以上之序列同一性之胺基酸序列、或序列編號9之胺基酸序列或者於序列編號9之胺基酸序列中有1～20個、1～15個、1～10個、1～5個、或1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列。

[47]

一種抗hGDF15抗體，其包括：

重鏈可變區，其含有：與序列編號8之胺基酸序列具有80%、85%、90%、或95%以上之序列同一性之胺基酸序列、或序列編號8之胺基酸序列或者於序列編號8之胺基酸序列中有1～20個、1～15個、1～10個、1～5個、或1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列；及

輕鏈可變區，其含有：與序列編號9之胺基酸序列具有80%、85%、90%、或95%以上之序列同一性之胺基酸序列、或序列編號9之胺基酸序列或者於序列編號9之胺基酸序列中有1～20個、1～15個、1～10個、1～5個、或1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列。

[48]

如上述1至47中任一項記載之抗體，其包括：包含序列編號8之胺基

酸序列之重鏈可變區、及包含序列編號9之胺基酸序列之輕鏈可變區。

[49]

如上述1至48中任一項記載之抗體，其包括：

重鏈可變區，其含有：序列編號8之胺基酸序列、或於序列編號8之胺基酸序列中包含選自H48R、H49R、H49D、H50R、H50S、H50F、H52R、H52Q、H72R、H73D、H73R、H73Y、H119R、H119F、H48S、H71Y、H72A、H72L、H72N、H72T、H72W、H75H、H75L、H75N、H75Q、H79H、H79K、H79Q、H79R、H83R、H117Q、H119E、H119H、H119K、H119N、H119Q、H119S、H119T、H120A、H120D、H120F、H120N、H120Q、H122F、H54T、H54N、H71R、H71H、及H71I中之任一種胺基酸置換之胺基酸序列；及

輕鏈可變區，其含有：序列編號9之胺基酸序列、或於序列編號9之胺基酸序列中包含選自L47R、L48E、L48R、L48S、L48K、L50D、L50R、L50F、L50Y、L73R、L111F、L111Y、L112E、L112R、L112D、L112F、L113D、L113R、L113F、L48H、L48Y、L50Q、L50W、L51Q、L69Y、L70F、L70H、L72D、L72E、L72R、L72Y、L73K、L73N、L73Y、L75Q、L87K、L87N、L111A、L111N、L111S、L112H、L112Q、L112T、L112Y、L113S、L114F、L114H、L114I、L114N、L114Y、L116H、L116Y、L51Y、L72F、L73Q、及L74H中之任一種胺基酸置換之胺基酸序列。

[50]

如上述1至49中任一項記載之抗體，其包括：

重鏈可變區，其含有：序列編號8之胺基酸序列、或於序列編號8之

胺基酸序列中包含選自H49R、H49D、H50R、H50S、H50F、H73D、H73R、H73Y、H48S、H71Y、H72A、H72L、H72N、H72T、H72W、H75H、H75L、H75N、H75Q、H79H、H79K、H79Q、H79R、H83R、H119N、H119S、H120F、H120Q、H54T、H54N、H71R、及H71H中之任一種胺基酸置換之胺基酸序列；及

輕鏈可變區，其含有：序列編號9之胺基酸序列、或於序列編號9之胺基酸序列中包含選自L47R、L48E、L48R、L48K、L50D、L50R、L50F、L50Y、L73R、L112E、L112D、L112F、L113D、L113R、L113F、L48H、L48Y、L50Q、L50W、L51Q、L70F、L72D、L72E、L72R、L72Y、L73N、L73Y、L75Q、L112H、L112Q、L112Y、L113S、L116H、L116Y、L51Y、L72F、L73Q、及L74H中之任一種胺基酸置換之胺基酸序列。

[51]

如上述1至50中任一項記載之抗體，其包括：

重鏈可變區，其含有：序列編號8之胺基酸序列、或於序列編號8之胺基酸序列中包含選自H49R、H49D、H48S、H71Y、H83R、及H120F中之任一種胺基酸置換之胺基酸序列；及

輕鏈可變區，其含有：序列編號9之胺基酸序列、或於序列編號9之胺基酸序列中包含選自L48K、L112D、L72F、及L74H中之任一種胺基酸置換之胺基酸序列。

[52]

如上述1至51中任一項記載之抗體，其和抗hGDF15抗體競爭性地與hGDF15結合，該抗hGDF15抗體包括：包含序列編號8之胺基酸序列之重

鏈可變區及包含序列編號9之胺基酸序列之輕鏈可變區。

[53]

如上述1至52中任一項記載之抗體，其係單株抗體。

【0086】

[54]

一種抗hGDF15抗體，其和如上述1至53中任一項記載之抗體競爭性地與hGDF15結合。

[55]

如上述54記載之抗體，其和抗hGDF15抗體競爭，該抗hGDF15抗體包括：包含序列編號8之胺基酸序列之重鏈可變區及包含序列編號9之胺基酸序列之輕鏈可變區。

[56]

如上述54或55記載之抗體，其使血中GDF15濃度降低。

[57]

如上述54至56中任一項記載之抗體，其抑制前導GDF15之切斷。

[58]

如上述54至56中任一項記載之抗體，其係單株抗體。

【0087】

[59]

一種聚核苷酸，其編碼如上述1至58中任一項記載之抗體。

[60]

如上述59所記載之聚核苷酸，其包含序列編號24及/或25之核酸序列。

[61]

一種表現載體，其包含如上述59或60記載之聚核苷酸。

[62]

一種轉形細胞，其包含如上述59或60記載之聚核苷酸。

【0088】

[63]

一種醫藥組合物，其包含如上述1至58中任一項記載之抗體。

[64]

如上述63記載之醫藥組合物，其用以治療與GDF15相關之疾病或症狀。

[65]

如上述64記載之醫藥組合物，其中與GDF15相關之疾病或症狀為癌症。

[66]

如上述64記載之醫藥組合物，其中與GDF15相關之疾病或症狀為惡病質。

[67]

如上述66記載之醫藥組合物，其中惡病質為癌症惡病質。

[68]

如上述63記載之醫藥組合物，其用以使血中GDF15濃度降低。

【0089】

[69]

如上述1至58中任一項記載之抗體，其用以治療與GDF15相關之疾病

或症狀。

[70]

如上述1至58中任一項記載之抗體，其用以使血中GDF15濃度降低。

[71]

一種治療與GDF15相關之疾病或症狀之方法，其包括：向需要治療之對象投予有效量之如上述1至58中任一項記載之抗體。

[72]

一種用以使血中GDF15濃度降低之方法，其包括：向上述需要降低血中GDF15濃度之對象投予有效量之如上述1至58中任一項記載之抗體。

[73]

一種如上述1至58中任一項記載之抗體之用途，其用以製造用以治療與GDF15相關之疾病或症狀之醫藥。

[74]

一種如上述1至58中任一項記載之抗體之用途，其用以製造用以降低血中GDF15濃度之醫藥。

【0090】

藉由以下實施例對本發明進一步進行說明，無論何種含義，本發明均不限定於本實施例。

[實施例]

【0091】

I.抗體製作(1)

A.抗hGDF15抗體之製作

1　對動物之免疫

日程

Day1；初次免疫(25 μg/shot/body、Abisco-100、ip)

Day10；第二次免疫(25 μg/shot/body、Abisco-100、ip)

Day17；第三次免疫(25 μg/shot/body、Abisco-100、ip)

Day21；效價檢測

Day24；最終增強免疫(25 μg/shot/body、Abisco-100、ip)

Day27；脾臟摘除、細胞融合

試劑

・重組人GDF15(rhGDF15)、R&D、957-GD-025/CF、25 μg

・Abisco-100 (ISCONOVA)

動物

・3H/HeJ Jms Slc-lpr/lpr (5W、日本SLC、雌性)

【0092】

步序

1.將50 μL之hGDF15 (0.5 mg/mL)、25 μL之Abisco-100、175 μL之PBS加以混合並投予至小鼠之腹腔內(初次免疫)。

2.在初次免疫後之10天及17天後，均腹腔內投予與初次免疫同樣地製備之hGDF15溶液。

3.在初次免疫後之21天後，使用毛細管採血管自小鼠尾部進行採血，藉由離心分離獲得血漿。

4.血漿係稀釋100倍、1000倍、及10000倍，使用固相有hGDF15之96孔盤進行ELISA，確認到對hGDF15之抗體效價上升。

5.在初次免疫後之24天後，腹腔內投予與初次免疫同樣地製備之

hGDF15溶液。

6.在初次免疫後之27天後，於麻醉下摘除脾臟，進行細胞融合。

【0093】

2　細胞融合及HAT選擇

細胞

・Sp2/o-14Ag(以下Sp2/o細胞、ATCC # CRL-1581)

以不會超過3×10^5 cells/mL之方式進行繼代

試劑

・DMEM (GIBCO、10313-021)

・FBS(56℃，經30分鐘滅活處理)

・青黴素-鏈黴素-麩醯胺酸(Invitrogen、10378-016)

・製備成胰島素(舟越、BT-243)10 mg/mL

・55 mM 2-巰基乙醇(1000×)(Invitrogen、21985-023)

・rIL-6

・PBS

・特克溶液

・台盼藍

・紅細胞裂解液(SIGMA、R7757)

・PEG1500 (羅氏、108014)

・HAT培養基添加劑(50×) Hybri-Max(SIGMA、H0262)

・HT培養基添加劑(50×) Hybri-Max(SIGMA、H0137)

器具

・6孔盤(BD、353046)

・懸浮細胞培養用大燒瓶

・手術用鑷子(3把)

・手術用剪刀(3把)

・50 mL Falcon管

・1 mL 注射器

・23G 注射針

・細胞濾網 40 μm(BD、352340)

培養基組成

・Sp2/o培養用培養基

DMEM	500 mL
FBS	55 mL(最終 10%)
青黴素-鏈黴素-麩醯胺酸(100×)	5 mL(最終 1×)

・細胞融合用培養基

DMEM

・融合瘤用培養基

DMEM	500 mL
FBS	55 mL(最終 10%)
青黴素-鏈黴素-麩醯胺酸 (100×)	5 mL(最終 1×)
2ME	500 μL(最終 0.1%)
胰島素(10 mg/mL)	250 μL(最終 5 μg/mL)
rIL-6	適宜(最終 5 ng/mL)

・HAT選擇培養基

融合瘤用培養基

50×HAT　　適宜(最終 1×)

【0094】

步序

・骨髓瘤之準備(細胞融合1週前)

1.使冷凍保存之Sp2/o細胞(約1×10^6 cells/vial)融解，使之於預先分注至15 mL之Falcon管中之Sp2/o用培養基10 mL中懸浮，以1500 rpm進行3分鐘離心分離，進行洗淨，將上清液去除。

2.使顆粒(Sp2/o細胞)於Sp2/o用培養基4 ml中懸浮。

3.預先向6孔盤之各孔中加入Sp2/o用培養基4 mL，將2.中懸浮之Sp2/o細胞以2倍系列進行稀釋。

4.於37℃、5.5%CO_2下培養1～2天。

5.藉由顯微鏡觀察，回收狀態良好之孔中之細胞，於懸浮細胞培養用大燒瓶(或中燒瓶)中進行擴大培養。於細胞融合2天前進行繼代。(於細胞融合當天成為5×10^5 cells/mL左右之細胞密度)

【0095】

・小鼠脾臟之摘除

1.對小鼠進行麻醉，充分地吹送70%乙醇後，於安全櫃內進行開腹。為了無菌地摘除脾臟，殺菌過之鑷子、剪刀係準備外皮用及腹腔內用之器具。

2.於麻醉下自腹主動脈全採血後，摘除脾臟。

3.向預先裝有PBS之50 mL之Falcon管放入脾臟，放置於冰上直至細胞融合。

【0096】

・細胞融合(融合瘤之製作)

預先將DMEM(無血清)及PEG於37℃培養箱中進行加溫，並進行以下操作。

1.回收Sp2/o細胞，對細胞數進行計數。僅使用1×10^6 cells/mL以下之燒瓶內之細胞。

2.於6孔Falcon培養盤之1孔中準備10 mL左右之PBS，向其中放入所摘除之脾臟，將周邊殘留之脂肪組織去除。

3.向剩餘之其中一個孔中新加入PBS 10 mL，將脾臟移至其中。利用殺菌過之鑷子及剪刀將脾臟切成兩半。

4.將23G之注射針安裝於1 mL注射器，吸出PBS並注入至切成兩半之脾臟中，將脾細胞擠出至PBS中。反覆進行此操作直至脾臟變白。

5.於50 mL Falcon管上部設置殺菌過之篩網，使包含脾細胞之PBS通過篩網，藉此去除脾細胞以外之組織。添加細胞融合用培養基直至總量成為40 mL。

6.以1500 rpm進行3分鐘離心分離，將上清液去除。

7.使脾細胞於細胞融合用培養基20 mL中懸浮，使用特克溶液進行染色(特克溶液：懸浮液＝10：1)，對白血球進行計數。(一般而言，成為1×10^8 cells、 5×10^6 cells/mL左右)

8.以1500 rpm進行3分鐘離心分離，將上清液去除。

9.於紅細胞裂解液3 mL中懸浮，於冰上靜置3分鐘。

10.添加細胞融合用培養基17 mL，以1500 rpm進行3分鐘離心分離，回收脾細胞。

11.將包含Sp2/o細胞之培養基以用細胞數計成為脾細胞：Sp2/o細胞

＝5：1之方式進行添加，使細胞懸浮。

12.以1500 rpm進行3分鐘離心分離，將上清液去除。

13.以輕敲之方式，使沈澱之細胞再懸浮。

14.一面緩慢地攪拌一面歷時1分鐘滴加1 mL之PEG1500。

15.進而持續攪拌1分鐘。

16.與14同樣地滴加細胞融合用培養基1 mL。

17.進而歷時3分鐘添加細胞融合用培養基3 mL。

18.進而歷時1分鐘添加細胞融合用培養基10 mL。

19.於37℃下靜置10分鐘。

20.以總量成為40 mL之方式添加細胞融合用培養基。

21.以1500 rpm進行3分鐘離心分離，將上清液去除。

22.以用脾細胞數計每1 mL成為1×10^6 cells之方式於融合瘤用培養基中懸浮，向96孔平底培養盤以每孔為100 μL之方式散佈融合瘤。

23.於37℃、CO_2 5.5%下進行o/n培養。

24.添加100 μL/孔之2×HAT選擇培養基，繼續進行培養。

25.每隔1天去除上清液100 μL，添加100 μL之1×HAT選擇培養基，藉此進行培養基交換。

【0097】

3　抗體之篩選

選擇會產生抗hGDF15抗體之融合瘤時，於利用96孔盤開始培養後經過5天後，使用融合瘤上清液，藉由ELISA進行測定，以所測得之對於hGDF15之結合強度作為指標，以如下方式來進行篩選。

【0098】

向固相化有hGDF15(R&D Systems，957-GD-025/CF)之96孔盤之各孔中添加100 μL之培養上清液，於室溫下反應2小時。將孔洗淨後，添加檢測用2次抗體(HRP標記抗小鼠IgG抗體(Promega、W402B))，於室溫下反應1小時。將孔洗淨後，使用TMB溶液(Sigma、T2885)進行顯色，利用讀板儀測定450 nm之吸光度。

【0099】

將450 nm吸光度為1.0以上之孔之融合瘤進而藉由極限稀釋法進行單純系化。最終獲得16個純系。所獲得之16個純系中，將為IgM之1個純系、及非特異性地與複數種蛋白質顯示結合之2個純系除外，對剩餘之13個純系進行培養。

【0100】

使用HiTrap rProtein A FF(GE Healthcare Life Sciences，17508001)，自培養上清液進行抗體之純化。純化抗體之濃度係使用NanoDrop(Thermo Scientific)，使用吸光度280 nm來進行測量。

【0101】

利用ELISA，以如下方式對經純化之各抗體與hGDF15之結合親和性進行測定。將200 ng/mL濃度之hGDF15以100 μL/孔添加至孔中。於固相化有hGDF15之96孔盤中，使0.39 ng/mL至25 ng/mL之連續稀釋後之純化抗體以100 μL/孔進行反應後，利用HRP偶聯物2次抗體對hGDF15-抗hGDF15抗體複合體進行檢測。顯色係測定450 nm之吸光度，並使用四參數邏輯曲線算出濃度5 ng/mL之抗體量的值。各抗體之結合值係以純系MAB17之值作為100，算出相對值。

【0102】

將所獲得之抗hGDF15抗體與hGDF15之親和性之結果示於表1。使顯示出遠強於MAB17之結合之MAB2人類化。

[表1]

純系	以MAB17之值作為100之相對值
MAB3	72.3
MAB4	44.2
MAB5	36.4
MAB6	68.1
MAB1	33.6
MAB11	12.0
MAB12	36.2
MAB13	50.1
MAB7	3.1
MAB15	25.1
MAB14	26.4
MAB17	100.0
MAB2	350.9

【0103】

4　人類化抗體之製作

・細胞

細胞株名：ExpiCHO

來源：中國倉鼠

細胞供應商：Thermo Fisher Scientific(A29127)

培養液：ExpiCHO表現培養基

培養液供應商：Thermo Fisher Scientific(A2910001)

【0104】

・表現載體

載體名：pcDNA-3.1

cDNA來源：全合成

供應商：Thermo Fisher Scientific

【0105】

・重組蛋白

蛋白質名：人類GDF15

來源：CHO細胞

供應商：R&D systems(957-GD-025/CF)

【0106】

・嵌合抗體之序列之設計

將來自小鼠之抗體即MAB2之包含CDR序列之可變區與貝伐單抗(bevacizumab)之恆定區連結而製成嵌合抗體之序列。

【0107】

・人類化抗體之序列之設計

利用Blast檢索對與MAB2相似性較高之人類抗體進行檢索。於該等人類抗體中對CDR序列進行置換，製作可變區並使之與貝伐單抗之恆定區連結，而製成全長人類化抗體。又，關於根據結構預測而認為對維持結構較為重要之胺基酸，小鼠抗體之胺基酸直接殘留，成為人類化抗體之一部分。

【0108】

・抗體之製作與純化

全合成重鏈及輕鏈基因並分別組入至表現載體中。向24孔盤接種ExpiCHO細胞，第二天，將重鏈及輕鏈表現載體利用TransIT-CHO套組(Takara、V2170)進行基因轉殖(共轉染)，使重鏈及輕鏈共表現。5天後，將包含所產生之抗體之培養上清液全部回收，使用Hitrap rProteinA FF管柱(GE healthcare、17-5080-01)對抗體純化。

【0109】

・抗體濃度之測定

上清液中之抗體濃度係利用人類IgG EIA套組(Takara、MK136)，依據隨附之操作說明所測得。純化抗體係利用NanoDrop(Thermo Fisher Scientific)，在吸光度280 nm下進行測定，從而確定濃度。

【0110】

・與hGDF15之結合量之測定(ELISA)

向96孔盤中加入100 μL之人類GDF15溶液(0.4 μg/mL)，進行靜置直至第二天早晨，製作ELISA培養盤。培養盤之阻斷係利用1%BSA進行1小時，包含抗體之培養上清液係製作公比3之稀釋系列，於ELISA培養盤中各添加100 μL，靜置2小時。2次抗體之反應係添加經20000倍稀釋之HRP複合抗人類IgG抗體(Gene Tex、GTX26759)100 μL並反應1小時。顯色反應係使用TMB(Sigma、T-0440)，反應終止液係使用2當量濃度之硫酸。吸光度係於450 nm下進行測定。

【0111】

・使用BLITZ之結合親和性之測定

抗體之結合親和性係使用作為生物分子間相互作用分析系統之BLITZ(Pall ForteBio)所測得。感測器晶片係使用Anti-HIS(Pall ForteBio、18-5114)，洗淨液係使用ForteBio Sample Diluent(Pall ForteBio、18-1048)。測定程序中，將hGDF15向感測器晶片之吸附設定為60秒，將抗體之結合設定為120秒，將解離設定為120秒。

【0112】

B.序列測定

1　試驗方法

由在10 cm培養皿中進行培養所得之融合瘤製備總RNA，使用SMARTer RACE 5'/3'套組(Takara、634858)來合成cDNA。將所合成之cDNA組入至pCR4Blunt-TOPO載體中，使用大腸桿菌進行擴增，對質體DNA進行純化。DNA之序列測定係使用BigDye™ Terminator v3.1循環測序套組(Thermo Fisher Scientific, 4337454)及M13引子，利用ABI 3130xl遺傳分析儀(Applied Biosystems)來進行。

【0113】

2　結果

將MAB17、MAB2、及HuMAB2之胺基酸序列示於表2，將CDR序列示於表3，將HuMAB2之cDNA序列示於表4。CDR係根據Kabat之定義來特定。

[表2-1]

抗體名	序列名 (載體名)	胺基酸序列 (下劃線部分爲CDR序列)	序列 編號
MAB2	H鏈可變區	MRMLSVLYLLSALPGILSDVQLQESGPSLVRPSQTLSL TCTVTGFSIN**SDCYWI**WIRQFPGNKLEYIG**YTFYSGIT** **YYNPSLAS**RTYITRDTSKNQFSLKLNSVTTEDTATYYC AR**DCDYAMDY**WGQGTSVTVS	4
	L鏈可變區	MGYSAQFLGLLLLCFQGTRCDIQMTQTTSSLSASLGDR VTISC**RASQDISNYLN**WYQQKPDGTVKLLIH**YTSTLHS** GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFC**QQGNTL** **PWT**FGGGTKLEIKRADA	5
MAB17	H鏈可變區	MDRLTFSFLLLIVPAYVLSQVTLKESGPGILQPSQTLS LTCSFSGFSLNTHGMGVGWIRQPSGKGLEWLANIWWND DKYYNSALKSRLTLSKDTSNNQVFLKISSVDTADTATY FCAQVAWDWFAYWGQGTLVTIS	6
	L鏈可變區	MDSQVQIFSFLLISASVILSRGQIVLTQSPAIMSASLG EEITLTCSASSSVRYMHWYQQKSGTSPKVLIYSTSNLA SGVPSRFSGSGSGTFYSLTISSVEAEDAADYYCHQWSS YPWTFGGGTKLEIKRADA	7

[表2-2]

抗體名	序列名 (載體名)	胺基酸序列 (下劃線部分爲CDR序列)	序列 編號
HuMAB2	H鏈可變區	MKHLWFLLLLAAPRWVLSQVQLQESGPGLVKPSETLSL TCTVSGFSIN**SDCYWI**WIRQPPGKGLEYIG**YTFYSGIT** **YYNPSLAS**RTTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC AR**DCDYAMDY**WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSG	8
	L鏈可變區	MRVPAQLLGLLLLWLPGARCDIQMTQSPSSLSASVGDR VTITC**RASQDISNYLN**WYQQKPGKAVKLLIH**YTSTLHS** GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFC**QQGNTL** **PWT**FGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP	9
	H鏈全長 (H3delK)	MKHLWFLLLLAAPRWVLSQVQLQESGPGLVKPSETLSL TCTVSGFSIN**SDCYWI**WIRQPPGKGLEYIG**YTFYSGIT** **YYNPSLAS**RTTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC AR**DCDYAMDY**WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPG	10
	L鏈 (L7)	MRVPAQLLGLLLLWLPGARCDIQMTQSPSSLSASVGDR VTITC**RASQDISNYLN**WYQQKPGKAVKLLIH**YTSTLHS** GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFC**QQGNTL** **PWT**FGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC	11

[表3]

抗體名	鏈	CDR編號	序列	序列編號
MAB17	H鏈	CDR-H1	THGMGVG	12
	H鏈	CDR-H2	NIWWNDDKYYNSALKS	13
	H鏈	CDR-H3	VAWDWFAY	14
	L鏈	CDR-L1	SASSSVRYMH	15
	L鏈	CDR-L2	STSNLAS	16
	L鏈	CDR-L3	HQWSSYPWT	17
MAB2 HuMAB2	H鏈	CDR-H1	SDCYWI	18
	H鏈	CDR-H2	YTFYSGITYYNPSLAS	19
	H鏈	CDR-H3	DCDYAMDY	20
	L鏈	CDR-L1	RASQDISNYLN	21
	L鏈	CDR-L2	YTSTLHS	22
	L鏈	CDR-L3	QQGNTLPWT	23

[表4-1]

抗體名	序列名 (載體名)	cDNA序列	序列 編號
HuMAB2	H鏈可變區	ATGAAGCACCTGTGGTTTCTGCTGCTGCTGGCCGCTCC CAGATGGGTGCTGTCTCAGGTGCAGCTGCAGGAATCTG GCCCTGGCCTCGTGAAGCCCAGCGAGACACTGAGCCTG ACCTGTACCGTGTCCGGCTTCAGCATCAACAGCGACTG CTACTGGATCTGGATCAGACAGCCCCCTGGCAAGGGCC TGGAGTACATCGGCTACACCTTCTACAGCGGCATCACC TACTACAACCCCAGCCTGGCCAGCCGGACCACCATCAG CAGAGACACCAGCAAGAACCAGTTCAGCCTGAAGCTGA GCAGCGTGACAGCCGCCGATACCGCCGTGTACTACTGC GCCAGAGACTGCGACTACGCCATGGACTATTGGGGCCA GGGCACCCTCGTGACCGTGTCTAGCGCCTCTACAAAGG GCCCCAGCGTGTTCCCTCTGGCCCCTAGCAGCAAGAGC ACATCTGGC	24
	L鏈可變區	ATGAGAGTGCCTGCTCAGCTGCTGGGACTGCTGCTGCT GTGGCTGCCTGGCGCTAGATGCGACATCCAGATGACCC AGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCCAGCGTGGGCGACAGA GTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGGACATCAGCAA CTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAACCCGGCAAGGCCG TGAAGCTGCTGATCCACTACACCAGCACCCTGCACAGC GGCGTGCCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCAC CGACTACACCCTGACAATCAGCTCCCTGCAGCCCGAGG ACTTCGCTACCTACTTCTGTCAGCAAGGCAACACCCTG CCCTGGACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAA GCGGACAGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCAC CT	25

[表4-2]

抗體名	序列名 (載體名)	cDNA序列	序列 編號
HuMAB2	H鏈全長 (H3del K)	ATGAAGCACCTGTGGTTTCTGCTGCTGCTGGCCGCTCC CAGATGGGTGCTGTCTCAGGTGCAGCTGCAGGAATCTG GCCCTGGCCTCGTGAAGCCCAGCGAGACACTGAGCCTG ACCTGTACCGTGTCCGGCTTCAGCATCAACAGCGACTG CTACTGGATCTGGATCAGACAGCCCCCTGGCAAGGGCC TGGAGTACATCGGCTACACCTTCTACAGCGGCATCACC TACTACAACCCCAGCCTGGCCAGCCGGACCACCATCAG CAGAGACACCAGCAAGAACCAGTTCAGCCTGAAGCTGA GCAGCGTGACAGCCGCCGATACCGCCGTGTACTACTGC GCCAGAGACTGCGACTACGCCATGGACTATTGGGGCCA GGGCACCCTCGTGACCGTGTCTAGCGCCTCTACAAAGG GCCCCAGCGTGTTCCCTCTGGCCCCTAGCAGCAAGAGC ACATCTGGCGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCTCGTGAA AGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCCTGGAACT CTGGCGCCCTGACAAGCGGCGTGCACACCTTTCCAGCC GTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACTCTCTGTCCAGCGT CGTGACTGTGCCCAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCT ACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAG GTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGCGACAAGAC CCACACCTGTCCCCCTTGTCCTGCCCCCGAACTGCTGG GAGGCCCTTCCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAAGCCCAAG GACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAAGTGACCTG CGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGA AGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAAC GCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACAGCAC CTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACAGTGCTGCACCAGG ACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCC AACAAGGCCCTGCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCTC CAAGGCCAAGGGACAGCCCCGCGAGCCCCAGGTGTACA CACTGCCTCCAAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAATCAG GTGTCCCTGACATGCCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTC CGATATTGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCG AGAACAACTACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGGACAGC GACGGCTCATTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGA CAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCA GCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAG AAGTCCCTGTCCCTGAGCCCCGGCTAA	26

[表4-3]

抗體名	序列名 (載體名)	cDNA序列	序列 編號
HuMAB2	L鏈全長 (L7)	ATGAGAGTGCCTGCTCAGCTGCTGGGACTGCTGCTGCT GTGGCTGCCTGGCGCTAGATGCGACATCCAGATGACCC AGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCCAGCGTGGGCGACAGA GTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGGACATCAGCAA CTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAACCCGGCAAGGCCG TGAAGCTGCTGATCCACTACACCAGCACCCTGCACAGC GGCGTGCCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCAC CGACTACACCCTGACAATCAGCTCCCTGCAGCCCGAGG ACTTCGCTACCTACTTCTGTCAGCAAGGCAACACCCTG CCCTGGACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAA GCGGACAGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCAC CTAGCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACCGCCTCTGTC GTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGCGAGGCCAA GGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGTCCGGCA ACAGCCAGGAAAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGAC TCCACCTACAGCCTGTCCTCCACCCTGACCCTGAGCAA GGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAG TGACCCACCAGGGCCTGAGCAGCCCTGTGACCAAGAGC TTCAACCGGGGCGAGTGCTGA	27

【0114】

C.與既有之抗hGDF15抗體之比較

1　試驗材料及方法

抗hGDF15抗體

將與HuMAB2之反應性比較所使用之抗體示於表5。

[表5]

抗體名	種類
MAB17	小鼠、單株
MAB3	小鼠、單株
MAB4	小鼠、單株
MAB5	小鼠、單株
MAB6	小鼠、單株
MAB1	小鼠、單株
MAB11	小鼠、單株
MAB12	小鼠、單株
MAB13	小鼠、單株
Hu01G06-127[1)]	人類化、單株
MAB957[2)]	小鼠、單株
生物素化山羊抗人GDF-15檢測抗體[3)]	山羊、多株

1)人類化抗hGDF15抗體(W02014/100689)
2)R&D Systems、MAB957、Lot No: UDC1014011
3)R&D Systems、DY957

【0115】

試驗方法

將HuMAB2及表5所示之抗GDF15單株抗體(2 μg/mL)以100 μL/孔添加於96孔盤中並分別進行固相化，於該培養盤中，使自1 ng/ml之濃度起經連續稀釋之hGDF15(R&D Systems、957-GD-025/CF)以100 μL/孔進行反應。將經EZ-Link Micro NHS-PEG4-生物素化套組(Thermo Fisher Scientific、21955)生物素化之HuMAB2用作檢測抗體(將1 μg/mL以100 μL/孔進行添加)。夾層ELISA能夠成立係使用人類GDF15 ELISA套組(R&D Systems、DY957)所隨附之抗生蛋白鏈菌素-HRP共軛物來檢測。作為夾層ELISA之陽性對照抗體(PC)，使用所有單株抗體均能夠進行夾層法之人類GDF15 ELISA套組(R&D Systems、DY957)所隨附的檢測抗體(表5)。

【0116】

2　結果

認為於經固相化之抗體與經生物素化之抗體識別相似表位之情形時，會引起競爭抑制，但於識別不同表位之情形時，不會引起競爭抑制。如圖1所示，HuMAB2與其他抗體同時識別出hGDF15。由此提示出，HuMAB2識別與其他抗體不同之表位。

【0117】

如上所述，明確HuMAB2不會與既有之抗體競爭。此處，藉由與上述相同之方法來對此次獲得之其他抗體是否與HuMAB2競爭進行試驗。以抑制%算出結果並示於表6。明確經過試驗之8個純系中4個純系(MAB1、MAB11、MAB12及MAB13)將HuMAB2與hGDF15之結合抑制70%以上。

[表6]
各hGDF15單株抗體之競爭試驗結果

純系	抑制%
MAB3	11
MAB4	46
MAB5	45
MAB6	22
MAB1	82
MAB11	73
MAB12	73
MAB13	79
MAB17	0
HuMAB2	80

【0118】

D. hGDF15與HuMAB2 Fab之複合體之結晶化

1　試驗材料及方法

將HuMAB2 Fab(包括：包含序列編號8之胺基酸序列之多肽及包含序列編號9之胺基酸序列之多肽)(20 ml Tris-HCl、200 mM NaCl、pH7.2)以莫耳比1：1且濃度成為5 mg/mL之方式混合至hGDF15(R&D Systems、9279-GD-050)，而製備複合體之蛋白溶液。HuMAB2結晶化係利用沉滴

式蒸氣擴散法來進行。蛋白溶液與貯液器溶液之混合比係設為1：1。使用利用篩選套組Crystal Screen 2(Hampton Research、HR2-112)所獲得之結晶，於分解能2.8 Å下來確定複合體之結晶結構。相位確定係利用分子置換法來進行。

【0119】

2　結果

藉由立體結構分析可知，hGDF15形成同型二聚物，hGDF15之二聚物上結合有2分子之HuMAB2之Fab(圖2A)。將於HuMAB2與hGDF15之結合交界面排列之胺基酸分別鑑定為互補位與表位(圖2B)。表7中用下劃線來表示對所鑑定之hGDF15之表位及結合較為重要之HuMAB2上之胺基酸。

[表7]

		胺基酸序列	序列編號
HuMAB2	H鏈可變區	MKHLWFLLLLAAPRWVLSQVQLQESGPGLVKPSETLSL TCTVSGFSINSDCYWIWIRQPPGKGLEYIGYTFYSGIT YYNPSLASRTTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC ARDCDYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSG	8
	L鏈可變區	MRVPAQLLGLLLLWLPGARCDIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAVKLLIHYTSTLHS GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQQGNTL PWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP	9
hGDF15		ARNGDHCPLG PGRCCRLHTV RASLEDLGWA DWVLSPREVQ VTMCIGACPS QFRAANMHAQ IKTSLHRLKP DTVPAPCCVP ASYNPMVLIQ KTDTGVSLQT YDDLLAKDCH CI	2

【0120】

將使用MOE(Molecular Operating Environment)進行分析所得之hGDF15之表位示於圖3。明確HuMAB2與1個(Monomer1)hGDF15單體上

之N端側之第5號天冬胺酸至第18號組胺酸為止的14個胺基酸、第45號異白胺酸(45I)及第46號甘胺酸(46G)，且與另一個單體(Monomer2)上之第71號天冬胺酸(71D)及第72號蘇胺酸(72T)結合。

【0121】

使用MOE之Protein Contacts來計算表位內推測與HuMAB2之相互作用特別密切相關之胺基酸殘基(表8)。其結果為，顯示圖3所示之胺基酸與HuMAB2特別強地結合。

[表8]

抗體	hGDF15	E(kcal/mol)
L Asn112	Arg13	-6.5
H Asp119	Arg16	-3.4
H Phe71	His6	-1.6
H Tyr69	His6	-1.4
L Asn51	Thr72	-1.2
L Tyr70	Thr72	-1.1
H Ile75	His6	-1.1
H Tyr120	Leu17	-0.91
L Trp116	Gly10	-0.76
K Tyr52	Cys7	-0.72

*表示上位10

【0122】

E. 抗hGDF15抗體對hGDF15及突變hGDF15之反應性

1　試驗材料及方法

試驗材料

將與HuMAB2抗體之反應性比較所使用之抗體示於表9。

[表9]

抗體名	種類
MAB17	小鼠、單株
Hu01G06-127[1)]	人類化、單株
MAB957[2)]	小鼠、單株
生物素化山羊抗人GDF-15檢測抗體[3)]	山羊、多株

1)人類化抗hGDF15抗體(W02014/100689)
2)R&D Systems, MAB957, Lot No: UDC1014011
3)R&D Systems, DY957

【0123】

試驗方法

試驗概要

將突變hGDF15表現用構建物向ExpiCHO-S細胞進行轉染，進行培養後，回收培養上清液。利用市售之GDF15測定用ELISA套組對所回收之培養上清液中之各突變hGDF15之表現進行確認後，藉由ELISA法對HuMAB2對各突變hGDF15之反應性進行評價。表位中特別重要之胺基酸殘基之鑑定中，藉由ELISA及生物分子間相互作用分析系統這兩種方法，對HuMAB2對突變導入GDF15之反應性進行評價。驗證由HuMAB2與其他抗hGDF15抗體之表位不同導致之差異化係藉由如下方式來進行，即，利用夾層ELISA法對其他抗hGDF15抗體對突變hGDF15之反應性及HuMAB2對突變hGDF15之反應性進行比較。

【0124】

突變hGDF15之製備

使用ExpiCHO™表現系統套組(Thermo Fisher Scientific、A29133)，將導入有各突變hGDF15基因之pcDNA-3.1載體(Thermo Fisher Scientific)向套組中所包含之ExpiCHO-S(Thermo Fisher Scientific)細胞進行轉染。將轉染後第10天之培養上清液於4℃下以8000 rpm進行30分鐘離心分離，回收培養上清液。所回收之培養上清液係進行冷凍(設定溫度-20℃)保存。

【0125】

突變hGDF15之表現確認

所回收之培養上清液中之突變hGDF15係使用人類GDF15 ELISA套

組(R&D Systems、DY957)，依據套組之隨附文書來實施測定，確認表現並測定濃度。

【0126】

GDF15抗體對於突變hGDF15之反應性評價

野生型(Wild-type: Wt)hGDF15係使用重組人GDF15(R&D Systems、957-GD-025/CF)。於固相有各hGDF15抗體之培養盤中使經連續稀釋之Wt及突變hGDF15反應，使用人類GDF15 ELISA套組(R&D Systems、DY957)之檢測抗體(表9)，對所結合之Wt及突變hGDF15進行檢測。

【0127】

藉由生物分子間相互作用分析系統來評價HuMAB2對突變導入GDF15之反應性

各突變hGDF15係使用於瓊脂糖凝膠(GE Healthcare、17-0906-01)中固定有MAB17之親和・管柱來純化。利用生物分子間相互作用分析系統之評價係使用OCTET QKe (ForteBio)來進行。Wt之GDF15係使用重組人GDF15(R&D Systems、957-GD-025/CF)。使Wt及突變hGDF15與生物感測器Ni-NTA(ForteBio、18-5101)結合，繼而使經連續稀釋之HuMAB2反應，對突變hGDF15與HuMAB2間之相互作用評價。分析係使用動力學方法來實施。

【0128】

2　結果

將野生型(WT)hGDF15及突變hGDF15之胺基酸序列示於表10。以下劃線表示將野生型hGDF15之胺基酸置換成丙胺酸之部位。

[表10]

	序列	序列編號
hGDF15 (WT)	ARNGDHCPLG PGRCCRLHTV RASLEDLGWA DWVLSPREVQ VTMCIGACPS QFRAANMHAQ IKTSLHRLKP DTVPAPCCVP ASYNPMVLIQ KTDTGVSLQT YDDLLAKDCH CI	2
H6A	ARNGD**A**CPLG PGRCCRLHTV RASLEDLGWA DWVLSPREVQ VTMCIGACPS QFRAANMHAQ IKTSLHRLKP DTVPAPCCVP ASYNPMVLIQ KTDTGVSLQT YDDLLAKDCH CI	28
R13A	ARNGDHCPLG PG**A**CCRLHTV RASLEDLGWA DWVLSPREVQ VTMCIGACPS QFRAANMHAQ IKTSLHRLKP DTVPAPCCVP ASYNPMVLIQ KTDTGVSLQT YDDLLAKDCH CI	29
R16A	ARNGDHCPLG PGRCC**A**LHTV RASLEDLGWA DWVLSPREVQ VTMCIGACPS QFRAANMHAQ IKTSLHRLKP DTVPAPCCVP ASYNPMVLIQ KTDTGVSLQT YDDLLAKDCH CI	30
R13A、R16A	ARNGDHCPLG PG**A**CC**A**LHTV RASLEDLGWA DWVLSPREVQ VTMCIGACPS QFRAANMHAQ IKTSLHRLKP DTVPAPCCVP ASYNPMVLIQ KTDTGVSLQT YDDLLAKDCH CI	31
3A	ARNGDHCPLG P**AA**CC**A**LHTV RASLEDLGWA DWVLSPREVQ VTMCIGACPS QFRAANMHAQ IKTSLHRLKP DTVPAPCCVP ASYNPMVLIQ KTDTGVSLQT YDDLLAKDCH CI	32
4A	ARNGDHCPLG P**AA**CC**AA**HTV RASLEDLGWA DWVLSPREVQ VTMCIGACPS QFRAANMHAQ IKTSLHRLKP DTVPAPCCVP ASYNPMVLIQ KTDTGVSLQT YDDLLAKDCH CI	33
6A	ARNGDHCPL**A** **AAA**CC**AA**HTV RASLEDLGWA DWVLSPREVQ VTMCIGACPS QFRAANMHAQ IKTSLHRLKP DTVPAPCCVP ASYNPMVLIQ KTDTGVSLQT YDDLLAKDCH CI	34
8A	ARNGDHC**AAA** **AAA**CC**AA**HTV RASLEDLGWA DWVLSPREVQ VTMCIGACPS QFRAANMHAQ IKTSLHRLKP DTVPAPCCVP ASYNPMVLIQ KTDTGVSLQT YDDLLAKDCH CI	35
T72A	ARNGDHCPLG PGRCCRLHTV RASLEDLGWA DWVLSPREVQ VTMCIGACPS QFRAANMHAQ IKTSLHRLKP D**A**VPAPCCVP ASYNPMVLIQ KTDTGVSLQT YDDLLAKDCH CI	36

【0129】

表11中表示4種抗hGDF15抗體與hGDF15及突變hGDF15之結合。HuMAB2未與突變hGDF15結合，或相較於與野生型hGDF15之結合，與突變hGDF15較弱地結合，但其他抗hGDF15抗體與hGDF15之結合未受突變影響。由此可知，HuMAB2之hGDF15之表位中N末端側之5DHCPLGPGRCCRLH18(序列編號3)對於結合較為重要，尤其是13R與16R對於HuMAB2之結合較為重要。又，該結果還支持MAB17、Hu01G06-127、及MAB957之表位與HuMAB2之表位不同。

[表11]

	抗GDF15抗體			
	HuMAB2	MAB17	Hu01G06-127	MAB957
hGDF15(WT)	100	100	100	100
H6A	136.1±1.4	87.7±5.0	90.5±2.3	88.3±2.6
R13A	17.8±1.4	97.2±0.6	91.4±3.5	89.9±0.5
R16A	24.0±0.9	101.2±4.1	102.0±4.3	93.9±0.8
R13A、R16A	4.9±0.9	83.0±1.0	87.6±3.0	80.6±1.9
3A	0.4±0.2	109.8±1.3	96.2±0.2	99.0±1.6
4A	0.0±0.1	95.0±1.2	83.5±1.3	84.1±0.6
6A	0.0±0.0	83.9±1.9	61.6±0.5	74.3±4.1
8A	-0.1+0.1	78.8±0.2	57.1±0.6	69.2±1.9
T72A	100.9±2.7	104.4±4.4	107.7±6.9	101.2±3.7

將抗GDF15抗體與500 pg/mL之hGDF15之結合量設為100時之與各突變hGDF15之結合以相對值表示。N＝3。值係平均值±SD。

【0130】

F. HuMAB2抗體對於表位區肽之反應性評價

1　試驗方法

已明確hGDF15之第5號天冬醯胺殘基直至第18號組胺酸殘基為止之14個殘基(DHCPLGPGRCCRLH、序列編號3)對於HuMAB2之結合較為重要，因此由GenScript公司合成該序列之肽(表12)。肽1係兩末端均未修飾，關於肽2，由於該區域在hGDF15內係內部區域，故為了模擬其狀態

而使胺基末端乙醯化，使羧基末端醯胺化來合成。向以100 μL/孔添加並固相有10 μg/mL之肽溶液之96孔盤，以100 μL/孔添加HuMAB2抗體(10 μg/mL)並進行反應(3小時、25℃)。針對所結合之HuMAB2抗體，將經5000倍稀釋之抗人IgG-HRP(Jackson ImmunoResearch、109-035-008)以100 μL/孔進行添加，於25℃下進行1小時反應並進行檢測。作為培養盤之對照，使用固相有hGDF15(R&D Systems、957-GD-025/CF)之培養盤。作為會與肽反應之陽性對照抗體，使用人類GDF15 ELISA套組(R&D Systems、DY957)之檢測抗體(表9)，作為陰性對照抗體，使用人類IgG1同型對照(Abcam、ab206198)。

[表12]

合成肽

肽名	序列	修飾
肽1	DHCPLGPGRCCRLH(序列編號3)	無
肽2	DHCPLGPGRCCRLH(序列編號3)	N末端乙醯化及C末端醯胺化

【0131】

2　結果

如圖4所示，作為陽性對照抗體之抗hGDF15多株抗體與2種肽及hGDF15均發生反應。相對於此，HuMAB2僅與hGDF15反應，對於2種合成肽，與作為陰性對照抗體之人類IgG1同型對照(hIgG1)同樣地未顯示反應。根據該結果提示，對HuMAB2向hGDF15之表位之結合來說，重要的是周邊之序列或立體結構。

【0132】

G.由CDR中之胺基酸置換產生之HuMAB2變異體向hGDF15之結合

1　試驗材料及方法

試驗體系

細胞

1)細胞株名：ExpiCHO

2)來源：中國倉鼠

3)細胞供應商：Thermo Fisher Scientific(A29127)

4)培養液：ExpiCHO表現培養基

5)培養液供應商：Thermo Fisher Scientific(A2910001)

抗體表現載體

1)載體名：pcDNA-3.1

2)cDNA來源：全合成

3)供應商：Thermo Fisher Scientific

重組蛋白

1)蛋白質名：人類GDF15 (hGDF15)

2)來源：CHO細胞

3)供應商：R&D systems(957-GD-025/CF)

【0133】

試驗方法

表現載體之設計

根據藉由HuMAB2與hGDF15之結晶結構分析所獲得之資訊，設計出如下表現載體，該表現載體係將在抗體與抗原之結合交界面上排列之胺基酸作為互補位及表位，並向HuMAB2之重鏈或輕鏈插入胺基酸變異而成。表13中顯示變異抗體之列表(將經改性之胺基酸以下劃線表示)。重鏈及輕鏈均自N末端起以FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4之順序排列。

【0134】

表現載體之細胞導入

向24孔盤接種CHO細胞，第二天，將表13之變異抗體之表現載體之重鏈及輕鏈進行組合，利用TransIT-CHO套組(Takara、V2170)進行基因轉殖。5天後回收所有上清液，於設定為-20℃之冷凍庫中進行保存直至使用為止。

【0135】

對於hGDF15之結合量之測定

向96孔盤添加100 μL之hGDF15溶液(0.4 μg/ml)，於4℃下進行靜置直至第二天早晨，製作ELISA培養盤。添加1%BSA，進行1小時阻斷，包含變異抗體之培養上清液係自30倍稀釋起製作稀釋系列(稀釋倍率之公比3)，向ELISA培養盤各添加100 μL，並靜置2小時。作為2次抗體，添加HRP複合抗人類IgG抗體(Gene Tex、GTX26759)(20000倍稀釋)，並靜置1小時。顯色反應係使用TMB(Sigma、T-0440)，反應終止液係使用2當量濃度之硫酸。吸光度係測定450 nm。

【0136】

使用OCTET之抗體濃度之測定

培養上清液中之抗體濃度係利用作為生物分子間相互作用分析系統之OCTET QKe(Pall ForteBio)所測得。感測器晶片係使用Protein L(Pall ForteBio、18-5085)，感測器晶片之再生液係使用10 mM甘胺酸(pH1.1)，洗淨液係使用ForteBio樣本稀釋劑(Pall ForteBio、18-1048)。標準係使用50 mg/mL、10 mg/mL、1 mg/mL、及0.1 mg/mL之IgG from human serum regent grade(Sigma-Aldrich、I12511-10MG)，供進行測定

之培養上清液係利用樣本稀釋劑(Pall ForteBio、18-1104)稀釋2倍來使用。測定程序之設定如下：將感測器晶片之再生設定為5秒，將洗淨設定為5秒，將該感測器晶片之再生及洗淨反覆進行3個循環後，將抗體濃度測定設定為120秒。

【0137】

與HuMAB2之結合量之比較

將抗體5 ng/mL中對於人類hGDF15之結合量於excel上進行計算，將HuMAB2對於hGDF15之結合量設為100，將此時之各變異抗體之結合量以相對值表示。進行3次獨立之試驗，求出平均值±標準誤差。因引入變異而抗體變得不再表現之抗體之結合量設為0。將結果示於圖5A～D。

【0138】

2　結果

相對結合量顯示HuMAB2之1.5倍以上之抗體發現有5種。另一方面，50%以下之結合量之降低於30種抗體中被觀察到。圖5A之「H鏈改性抗體1/2」中顯示出2種「H50S-L7」之結果，其等結果係由在培養及ELISA中為了確認孔間誤差而設置之相同載體所引起。由於2個均為相同程度之值，故表示試驗體系穩定。

【0139】

關於作為重鏈變異抗體之H48S-L7、H83R-L7、及H120F-L7；作為輕鏈變異抗體之H3-L48K及H3-L112D，與HuMAB2相比，結合力上升約1.5倍。另一方面，HuMAB2之輕鏈之第111號甘胺酸(111G)之變異體及第114號白胺酸(114L)之變異體均觀察到結合量降低，因此提示該等胺基酸係對於向hGDF15之結合及HuMAB2之CDR序列之結構維持較為重要的部

位。

【0140】

[表13-1]

抗體名	序列名		變異部位		序列	序列編號
	H鏈	L鏈	鏈	區域		
H48R-L7	H48R	L7	H鏈	FR1	DVQLQESGPGLVKPSETLSLTC TVSGFSI**R**	37
H49R-L7	H49R	L7	H鏈	CDR-H1	**R**DCYWI	38
H49D-L7	H49D	L7	H鏈	CDR-H1	**D**DCYWI	39
H50R-L7	H50R	L7	H鏈	CDR-H1	S**R**CYWI	40
H50S-L7	H50S	L7	H鏈	CDR-H1	S**S**CYWI	41
H50F-L7	H50F	L7	H鏈	CDR-H1	S**F**CYWI	42
H52R-L7	H52R	L7	H鏈	CDR-H1	SDC**R**WI	43
H52Q-L7	H52Q	L7	H鏈	CDR-H1	SDC**Q**WI	44
H72R-L7	H72R	L7	H鏈	CDR-H2	YTF**R**SGITYYNPSLAS	45
H73D-L7	H73D	L7	H鏈	CDR-H2	YTFY**D**GITYYNPSLAS	46
H73R-L7	H73R	L7	H鏈	CDR-H2	YTFY**R**GITYYNPSLAS	47
H73Y-L7	H73Y	L7	H鏈	CDR-H2	YTFY**Y**GITYYNPSLAS	48
H119R-L7	H119R	L7	H鏈	CDR-H3	DC**R**YAMDY	49
H119F-L7	H119F	L7	H鏈	CDR-H3	DC**F**YAMDY	50
H48S-L7	H48S	L7	H鏈	FR1	DVQLQESGPGLVKPSETLSLTC TVSGFSI**S**	51
H71Y-L7	H71Y	L7	H鏈	CDR-H2	YT**Y**YSGITYYNPSLAS	52
H72A-L7	H72A	L7	H鏈	CDR-H2	YTF**A**SGITYYNPSLAS	53
H72L-L7	H72L	L7	H鏈	CDR-H2	YTF**L**SGITYYNPSLAS	54
H72N-L7	H72N	L7	H鏈	CDR-H2	YTF**N**SGITYYNPSLAS	55
H72T-L7	H72T	L7	H鏈	CDR-H2	YTF**T**SGITYYNPSLAS	56
H72W-L7	H72W	L7	H鏈	CDR-H2	YTF**W**SGITYYNPSLAS	57
H75H-L7	H75H	L7	H鏈	CDR-H2	YTFYSG**H**TYYNPSLAS	58
H75L-L7	H75L	L7	H鏈	CDR-H2	YTFYSG**L**TYYNPSLAS	59
H75N-L7	H75N	L7	H鏈	CDR-H2	YTFYSG**N**TYYNPSLAS	60
H75Q-L7	H75Q	L7	H鏈	CDR-H2	YTFYSG**Q**TYYNPSLAS	61
H79H-L7	H79H	L7	H鏈	CDR-H2	YTFYSGITYY**H**PSLAS	62
H79K-L7	H79K	L7	H鏈	CDR-H2	YTFYSGITYY**K**PSLAS	63
H79Q-L7	H79Q	L7	H鏈	CDR-H2	YTFYSGITYY**Q**PSLAS	64
H79R-L7	H79R	L7	H鏈	CDR-H2	YTFYSGITYY**R**PSLAS	65
H83R-L7	H83R	L7	H鏈	CDR-H2	YTFYSGITYYNPSL**R**S	66

[表13-2]

抗體名	序列名		變異部位		序列	序列編號
	H鏈	L鏈	鏈	區域		
H117Q-L7	H117Q	L7	H鏈	CDR-H3	**Q**CDYAMDY	67
H119E-L7	H119E	L7	H鏈	CDR-H3	DC**E**YAMDY	68
H119H-L7	H119H	L7	H鏈	CDR-H3	DC**H**YAMDY	69
H119K-L7	H119K	L7	H鏈	CDR-H3	DC**K**YAMDY	70
H119N-L7	H119N	L7	H鏈	CDR-H3	DC**N**YAMDY	71
H119Q-L7	H119Q	L7	H鏈	CDR-H3	DC**Q**YAMDY	72
H119S-L7	H119S	L7	H鏈	CDR-H3	DC**S**YAMDY	73
H119T-L7	H119T	L7	H鏈	CDR-H3	DC**T**YAMDY	74
H120A-L7	H120A	L7	H鏈	CDR-H3	DCD**A**AMDY	75
H120D-L7	H120D	L7	H鏈	CDR-H3	DCD**D**AMDY	76
H120F-L7	H120F	L7	H鏈	CDR-H3	DCD**F**AMDY	77
H120N-L7	H120N	L7	H鏈	CDR-H3	DCD**N**AMDY	78
H120Q-L7	H120Q	L7	H鏈	CDR-H3	DCD**Q**AMDY	79
H122F-L7	H122F	L7	H鏈	CDR-H3	DCDYA**F**DY	80
H3-L47R	H3delK	L47R	L鏈	CDR-L1	RAS**R**DISNYLN	81
H3-L48E	H3delK	L48E	L鏈	CDR-L1	RASQ**E**ISNYLN	82
H3-L48R	H3delK	L48R	L鏈	CDR-L1	RASQ**R**ISNYLN	83
H3-L48S	H3delK	L48S	L鏈	CDR-L1	RASQ**S**ISNYLN	84
H3-L48K	H3delK	L48K	L鏈	CDR-L1	RASQ**K**ISNYLN	85
H3-L50D	H3delK	L50D	L鏈	CDR-L1	RASQDI**D**NYLN	86
H3-L50R	H3delK	L50R	L鏈	CDR-L1	RASQDI**R**NYLN	87
H3-L50F	H3delK	L50F	L鏈	CDR-L1	RASQDI**F**NYLN	88
H3-L50Y	H3delK	L50Y	L鏈	CDR-L1	RASQDI**Y**NYLN	89
H3-L73R	H3delK	L73R	L鏈	CDR-L2	YTS**R**LHS	90
H3-L111F	H3delK	L111F	L鏈	CDR-L3	QQ**F**NTLPWT	91
H3-L111Y	H3delK	L111Y	L鏈	CDR-L3	QQ**Y**NTLPWT	92
H3-L112E	H3delK	L112E	L鏈	CDR-L3	QQG**E**TLPWT	93
H3-L112R	H3delK	L112R	L鏈	CDR-L3	QQG**R**TLPWT	94
H3-L112D	H3delK	L112D	L鏈	CDR-L3	QQG**D**TLPWT	95
H3-L112F	H3delK	L112F	L鏈	CDR-L3	QQG**F**TLPWT	96
H3-L113D	H3delK	L113D	L鏈	CDR-L3	QQGN**D**LPWT	97
H3-L113R	H3delK	L113R	L鏈	CDR-L3	QQGN**R**LPWT	98
H3-L113F	H3delK	L113F	L鏈	CDR-L3	QQGN**F**LPWT	99
H3-L48H	H3delK	L48H	L鏈	CDR-L1	RASQ**H**ISNYLN	100
H3-L48Y	H3delK	L48Y	L鏈	CDR-L1	RASQ**Y**ISNYLN	101
H3-L50Q	H3delK	L50Q	L鏈	CDR-L1	RASQDI**Q**NYLN	102
H3-L50W	H3delK	L50W	L鏈	CDR-L1	RASQDI**W**NYLN	103
H3-L51Q	H3delK	L51Q	L鏈	CDR-L1	RASQDIS**Q**YLN	104

[表13-3]

抗體名	序列名		變異部位		序列	序列編號
	H鏈	L鏈	鏈	區域		
H3-L69Y	H3delK	L69Y	L鏈	FR2	WYQQKPGKAVKLLI**Y**	105
H3-L70F	H3delK	L70F	L鏈	CDR-L2	**F**TSTLHS	106
H3-L70H	H3delK	L70H	L鏈	CDR-L2	**H**TSTLHS	107
H3-L72D	H3delK	L72D	L鏈	CDR-L2	YT**D**TLHS	108
H3-L72E	H3delK	L72E	L鏈	CDR-L2	YT**E**TLHS	109
H3-L72R	H3delK	L72R	L鏈	CDR-L2	YT**R**TLHS	110
H3-L72Y	H3delK	L72Y	L鏈	CDR-L2	YT**Y**TLHS	111
H3-L73K	H3delK	L73K	L鏈	CDR-L2	YTS**K**LHS	112
H3-L73N	H3delK	L73N	L鏈	CDR-L2	YTS**N**LHS	113
H3-L73Y	H3delK	L73Y	L鏈	CDR-L2	YTS**Y**LHS	114
H3-L75Q	H3delK	L75Q	L鏈	CDR-L2	YTSTL**Q**S	115
H3-L87K	H3delK	L87K	L鏈	FR3	GVPSRFSGSG**K**GTDYTLTISSL QPEDFATYFC	116
H3-L87N	H3delK	L87N	L鏈	FR3	GVPSRFSGSG**N**GTDYTLTISSL QPEDFATYFC	117
H3-L111A	H3delK	L111A	L鏈	CDR-L3	QQ**A**NTLPWT	118
H3-L111N	H3delK	L111N	L鏈	CDR-L3	QQ**N**NTLPWT	119
H3-L111S	H3delK	L111S	L鏈	CDR-L3	QQ**S**NTLPWT	120
H3-L112H	H3delK	L112H	L鏈	CDR-L3	QQG**H**TLPWT	121
H3-L112Q	H3delK	L112Q	L鏈	CDR-L3	QQG**Q**TLPWT	122
H3-L112T	H3delK	L112T	L鏈	CDR-L3	QQG**T**TLPWT	123
H3-L112Y	H3delK	L112Y	L鏈	CDR-L3	QQG**Y**TLPWT	124
H3-L113S	H3delK	L113S	L鏈	CDR-L3	QQGN**S**LPWT	125
H3-L114F	H3delK	L114F	L鏈	CDR-L3	QQGNT**F**PWT	126
H3-L114H	H3delK	L114H	L鏈	CDR-L3	QQGNT**H**PWT	127
H3-L114I	H3delK	L114I	L鏈	CDR-L3	QQGNT**I**PWT	128
H3-L114N	H3delK	L114N	L鏈	CDR-L3	QQGNT**N**PWT	129
H3-L114Y	H3delK	L114Y	L鏈	CDR-L3	QQGNT**Y**PWT	130
H3-L116H	H3delK	L116H	L鏈	CDR-L3	QQGNTLP**H**T	131
H3-L116Y	H3delK	L116Y	L鏈	CDR-L3	QQGNTLP**Y**T	132

【0141】

II.藥理試驗　(1)

A.血中hGDF15之捕獲

1　試驗材料及方法

動物

1)物種/系統：mouse/ BALB-c Slc-nu/nu

2)微生物學等級：無特定病原(SPF)

3)供應商：Japan SLC

4)性別：雌性

5)週齡：6週齡(hGDF15、抗體投予時)

6)飼養條件

於設定為下述條件之環境下進行動物之飼養。

a)溫度：23±2℃

b)濕度：60±10%

c)照明：照明時間：上午7點～下午7點

熄燈時間：下午7點～上午7點

d)食料及水：自由攝取、CRF-1(Oriental Yeast(股))、自來水

【0142】

試驗排程

表14中顯示以抗體投予日作為0天之試驗排程。

[表14]

項目	以抗體投予日作為0天之天數(●係實施日)				
	-2	0	1	2	3
分群	●				
rhGDF15投予		●	●	●	●
抗體投予		●			
體重、攝食量	●	●	●	●	●
採血					●

【0143】

動物之飼養方法

在搬入日後之3天後，將小鼠分在不同之籠中。為了適應分開飼養，

將分群前之適應期間設為5天。

【0144】

分群

以體重為基礎，並利用實驗資料收集處理系統(SAS institute Japan、R9.3)以每群各6隻，共計6群之方式進行分群。

【0145】

抗hGDF15抗體之投予

rhGDF15、HuMAB2抗體、及MAB17抗體係以10 mL/kg進行腹腔內投予。對照群係以10 mL/kg投予Dulbecco's磷酸鹽緩衝液(DPBS)。群構成如表15所示。

[表15]

	處理	例數
1	DPRS	6
2	rhGDF15 0.3 mg/kg	6
3	rhGDF15 1 mg/kg	6
4	rhGDF15 3 mg/kg	6
5	rhGDF15 3 mg/kg + MAB17 3 mg/kg	6
6	rhGDF15 3 mg/kg + HuMAB2 3 mg/kg	6

【0146】

體重及攝食量之測定

體重及攝食量係於分群日及投予0天、1天、2天、3天後進行測定。

【0147】

採血、解剖

採血係於抗體投予後第3天自以吸入異氟醚方式麻醉之小鼠之下腔靜脈來進行。使用EDTA2K之採血管獲得血漿，於設定為-80℃之冷凍庫中進行保存直至使用。對於採血後之小鼠，在麻醉下直接切開腹部下腔靜脈，以放血方式使動物安樂死。

【0148】

血中未結合hGDF15濃度

為了測定血中未與抗體結合之hGDF15(未結合hGDF15)，將抗原抗體複合體按照以下步序去除。將5 μL 蛋白A/G瓊脂糖珠(Thermo scientific、20421)、與50 μL之小鼠血漿及145 μL之PBS加以混合，於4℃下混合2小時。離心分離後，將上清液移至新的微量管，於設定為-80℃之冷凍庫中進行保存直至使用。其後之血中GDF15測定係使用GDF15測定ELISA套組(R&D systems、DY957)，步序係依據套組之說明書。關於檢測極限以下之檢體，將血中GDF15濃度視為0 pg/mL。

【0149】

統計分析方法

關於血中未結合GDF15濃度，進行Wilcoxon秩和檢定。統計分析係使用SAS軟體(SAS institute Japan、R9.3)。

【0150】

2　結果

結果如圖6所示。hGDF15之血中濃度係rhGDF15之投予量依存性地增加，MAB17及HuMAB2均捕獲到血中GDF15。

【0151】

B.荷癌小鼠模型之血中GDF15濃度之減少

1　試驗材料及方法

試驗物質

・HuMAB2

・MAB1

・MAB13

對照物質

・MAB17

・MAB957(R&D Systems)

・Hu01G06-127 (WO2014/100689)

【0152】

試驗物質及對照物質之製備

將所有抗體於DPBS中製備成為1 mg/mL，於設定為-80℃之冷凍庫中進行保存直至投予日。

【0153】

試驗體系

細胞

1)細胞株名：MKN45

2)來源：人類胃癌

3)供應商：JCRB (Japanese Collection of Research Bioresources) cell bank

4)培養條件：37℃、5% CO_2

a)培養液：RPMI1640

i) 供應商：life technologies

b)血清：胎牛血清

i) 濃度：10%

ii) 供應商：Tissue Culture Biology

動物

5)物種/系統：mouse/ BALB-c Slc-nu/nu

6)微生物學等級：無特定病原(SPF)

7)供應商：Japan SLC

8)性別：雌性

9)週齡：7週齡(細胞移植時)

10) 於上述「A. 血中hGDF15之捕獲」中所記載之環境下進行動物之飼養。

【0154】

群構成

[表16]

試驗1				
	群名	細胞移植	投予物質(用量)	例數
1	正常(媒液)	無	DPBS	5
2	MKN45(媒液)	MKN45	DPBS	5
3	MKN45(MAB17)	MKN45	MAB17(10 mg/kg)	5
4	MKN45(MAB957[1)])	MKN45	MAB957(10 mg/kg)	5
5	MKN45(Hu01G06-127[2)])	MKN45	Hu01G06-127(10 mg/kg)	5
6	MKN45(HuMAB2)	MKN45	HuMAB2(10 mg/kg)	5

1)R&D Systems、MAB957、Lot No: UDC1014011

2)人類化抗hGDF15抗體(WO2014/100689)

[表17]

試驗2				
	群名	細胞移植	投予物質(用量)	例數
1	正常(媒液)	無	DPBS	5
2	MKN45(媒液)	MKN45	DPBS	5
3	MKN45(MAB17)	MKN45	MAB17(10 mg/kg)	5
4	MKNd5(MABl)	MKN45	MAB1(10 mg/kg)	5
5	MKN45(MAB13)	MKN45	MAB13(10 mg/kg)	5

【0155】

試驗方法

動物之飼養方法

在搬入日後之3天後，將小鼠分在不同之籠中。為了適應分開飼養，

將移植MKN45之前之適應期間設為5天。

【0156】

細胞之製備及向動物之細胞移植

MKN45細胞係於150 mm之培養皿中進行培養，於移植日利用0.25%胰蛋白酶-EDTA(SIGMA、T6689)處理來回收細胞，藉由離心分離(1200 rpm、5分鐘)去除上清液。利用DPBS以成為5×10^6 cells/mL之方式進行懸浮，以0.2 mL/body(1×10^6 cells/body)移植至以吸入異氟醚方式麻醉之小鼠之腹部皮下。

【0157】

分群

於試驗1中，在MKN45移植前自42隻小鼠中隨機選出5隻以作為正常(媒液)群，向剩餘之37隻小鼠移植MKN45。在MKN45移植後之12天後，以體重為基礎，利用SAS軟體(SAS institute Japan、R9.4)以每群5隻，共計6群之方式進行分群，分配成MKN45(媒液)群、MKN45(MAB17)群、MKN45(MAB957)群、MKN45(Hu01G06-127)群、及MKN45(HuMAB2)群。同樣地，於試驗2中亦以每群5隻之方式分配成正常(媒液)群、MKN45(媒液)群、MKN45(MAB17)群、MKN45(MAB1)群、及MKN45(13)群。分群後，對於多餘動物，於異氟醚麻醉下以放血方式使動物安樂死。

【0158】

DPBS及抗體之投予

在MKN45移植後之14天後(分群後之2天後)腹腔內投予DPBS及抗體(10 mL/kg)。於試驗1中，在抗體投予開始後第7天亦投予DPBS及抗體。

【0159】

採血

採血係於抗體投予開始後第14天(試驗1)或7天後(試驗2)，自以吸入異氟醚方式麻醉之小鼠之下腔靜脈來進行。使用EDTA2K之採血管獲得血漿，於設定為-80℃之冷凍庫中進行保存直至使用。對於採血後之小鼠，在麻醉下直接切開腹部下腔靜脈，藉此以放血方式使動物安樂死。

【0160】

血中未結合hGDF15濃度

為了測定血中未與抗體結合之hGDF15(未結合hGDF15)，將抗原抗體複合體按照以下步序去除。將5 μL 蛋白A/G瓊脂糖珠(Thermo scientific、20421)、與50 μL之小鼠血漿及145 μL之PBS加以混合，於4℃下混合2小時。離心分離後，將上清液移至新的微量管，於設定為-80℃之冷凍庫中進行保存直至使用。其後之血中GDF15測定係使用GDF15測定ELISA套組(R&D systems、DY957)，步序係依據套組之說明書。關於檢測極限以下(62.5 pg/mL以下)之檢體，將血中GDF15濃度視為0 pg/mL。

【0161】

統計分析方法

對於抗體投予開始後第14天(試驗1)或7天後(試驗2)之血中未結合hGDF15濃度，進行Wilcoxon秩和檢定。統計分析係使用SAS軟體(SAS institute Japan、R9.4)。

【0162】

2　結果

試驗1中，移植有MKN45細胞之MKN45群之血中hGDF15濃度約為

2000 pg/mL。於向移植有MKN45細胞之模型小鼠投予有抗體之群中，觀察到MAB17、MAB957、Hu01G06-127抗體投予群與溶劑投予群相比，血中hGDF15濃度上升。另一方面，於HuMAB2投予群中，血中hGDF15濃度減少(圖7)。

【0163】

試驗2中，將以溶劑投予群之血中hGDF15濃度作為100之情形時之相對值示於表18。與HuMAB2同樣地，觀察到血中hGDF15濃度亦因MAB1及MAB13而減少。

[表18]

群名	血中GDF15量之相對值
MKN45(媒液)	100
MKN45(MAB17)	302.6
MKN45(MAB1)	72.1
MKN45(MAB13)	85.8

【0164】

上述結果係與投予有重組hGDF15之試驗(圖6)中之MAB17之結果不同。作為原因之一，可例舉：HuMAB2與試驗中所使用之其他3個抗體之表位不同。hGDF15係前導hGDF15被蛋白質分解酵素切斷而產生(A. R. Bauson et al. Cancer Res. 2005; 65 (6): 2320-2336)。HuMAB2之表位存在於該切斷部位之附近，認為藉由結合於此處，有可能抑制hGDF15之產生。目前為止，有某抗CCL-2中和抗體(ABN912)未改善風濕患者之病情而是使之惡化之報告，認為該惡化之一個原因在於血中CCL-2濃度之抗體用量依存性地上升，因此提示出減少血中抗原濃度之重要性(J.J.Haringman et al. Arthritis & Rheumatism 2006; 54 (8): 2387-2392)。由此期待，如HuMAB2之會減少血中GDF15量之抗GDF15抗體較會增加血中hGDF15之抗體，在臨床上有用。

【0165】

C.荷癌小鼠模型之惡病質症狀之改善(1)

1　試驗材料及方法

1.1 試驗物質之製備

將HuMAB2於DPBS中製備成1 mg/mL，於設定為-80℃之冷凍庫中進行保存直至投予日。

【0166】

1.2 試驗體系

1.2.1　細胞

1)細胞株名：MKN45

2)來源：人類胃癌

3)供應商：JCRB (Japanese Collection of Research Bioresources) cell bank

4)培養條件：37℃、5% CO_2

a)培養液：RPMI 1640

i) 供應商：life technologies

b)血清：胎牛血清

i) 濃度：10%

ii) 供應商：Tissue Culture Biology

1.2.2　動物

1)物種/系統：mouse/ BALB-c Slc-nu/nu

2)微生物學等級：無特定病原(SPF)

3)供應商：Japan SLC

4)性別：雌性

5)週齡：7週齡(細胞移植時)

6)飼養條件

於設定為下述條件之環境下進行動物之飼養。

a)溫度：23±2℃

b)濕度：60± 10%

c)照明：照明時間：上午7點～下午7點

熄燈時間：下午7點～上午7點

d)食料及水：自由攝取、CRF-1(Oriental Yeast(股))、自來水

【0167】

1.2.3 群構成

[表19]

	群名	細胞移植	投予物質(用量)	例數
1	正常(媒液)	無	DPBS	8
2	MKN45(媒液)	MKN45	DPBS	8
3	MKN45(HuMAB2)	MKN45	HuMAB2(10 mg/kg)	8

【0168】

1.3 試驗方法

1.3.1 試驗排程

表20中顯示以抗體投予日作為0天之試驗排程。

[表20]

項目	以抗體投予日作為0天之天數(●係實施日)								
	-14	-11	-8	-5	-2	0	2	4	7
MKN45移植	●								
分群					●				
抗體投予						●			
體重、攝食量	●	●	●	●	●	●	●	●	●
採血、解剖									●

【0169】

1.3.2　動物之飼養方法

在搬入日後之3天後，將小鼠分在不同之籠中。為了適應分開飼養，將移植MKN45之前之適應期間設為5天。

【0170】

1.3.3　細胞之製備及向動物之細胞移植

MKN45細胞係於150 mm之培養皿中進行培養，於移植日利用0.25%胰蛋白酶-EDTA(SIGMA、T6689)處理來回收細胞，藉由離心分離(1200 rpm、5分鐘)將上清液去除。利用DBPS以成為5×10^6 cells/mL之方式進行懸浮，以0.2 mL/body(1×10^6 cells/body)移植至以吸入異氟醚方式麻醉之小鼠之腹部皮下。

【0171】

1.3.4　　分群

於MKN45移植前自32隻小鼠中隨機選出8隻以作為正常群，向剩餘之24隻小鼠移植MKN45。在MKN45移植後之12天後，以體重為基礎，利用實驗資料收集處理系統(EDCS、ver.2.1)以每群8隻，共計2群之方式進行分群，分配成MKN45群及HuMAB2群。在分群後，對於多餘動物，在異氟醚麻醉下以放血方式使動物安樂死。

【0172】

1.3.5　DPBS及HuMAB2之投予

在MKN45移植後之14天後(分群後之2天後)投予DPBS及HuMAB2。DPBS及HuMAB2係以10 mL/kg進行腹腔內投予。

【0173】

1.3.6　體重及攝食量之測定

體重及攝食量係自MKN45移植日至抗體投予日每隔3天測定一次。抗體投予日後，在投予0天、2天、4天、7天後進行測定。

【0174】

1.3.7　採血、解剖

採血係於抗體投予後第7天，自以吸入異氟醚方式麻醉之小鼠之下腔靜脈來進行。使用EDTA2K之採血管獲得血漿，於設定為-80℃之冷凍庫中進行保存直至使用。對於採血後之小鼠，在麻醉下直接切開腹部下腔靜脈，藉此以放血方式使動物安樂死。腫瘤係切開腫瘤部之皮膚，使用手術用剪刀來採集，並測定重量。

【0175】

1.4 統計分析方法

關於抗體投予7天後之體重及腫瘤重量、抗體投予日後第7天為止之累積攝食量，分別針對正常群及MKN45群、MKN45群及HuMAB2群，進行無對應之t檢驗。關於血中未結合GDF15濃度，進行Wilcoxon秩和檢定。統計分析係使用SAS軟體 (SAS institute Japan、R9.3)。

【0176】

2　結果

使用荷癌(MKN45細胞移植)小鼠，對HuMAB2對於癌症性惡病質之症狀即體重及攝食量之變化的效果進行研究，亦研究對血中未結合GDF15量之影響。圖8中表示體重之變化、及抗體投予後7天期間之累積攝食量、抗體投予7天後之血中未結合GDF15濃度。關於抗體投予7天後之體重，與正常群相比，MKN45群減少4 g左右，發現藉由移植MKN45細胞而體重減少顯著($P<0.01$)。另一方面，於HuMAB2群中，在抗體投予後觀察到體重

減少之恢復，與MKN45群相比，發現體重增加顯著(P＜0.01)。同樣地，關於抗體投予後7天期間之累積攝食量，於MKN45群中發現累積攝食量顯著地減少(P＜0.01)，於HuMAB2群中，發現與MKN45群相比，累積攝食量顯著地增大(P＜0.01)。血中未結合GDF15濃度於正常群中未檢測到，但於MKN45群中，顯著地上升至1500 pg/mL左右(P＜0.01)，與圖7之結果同樣地，於HuMAB2群中，顯著地減少至20分之1左右(P＜0.01)。根據該等結果確認到，MKN45移植小鼠之惡病質樣症狀(體重減少、攝食量)因投予HuMAB2而恢復。

【0177】

D. 荷癌小鼠模型之惡病質症狀之改善　(2)

1　試驗材料及方法

1.1 試驗物質之製備

將HuMAB2於DPBS中製備成1 mg/mL，於設定為-80℃之冷凍庫中進行保存直至投予日。

【0178】

1.2 試驗系

1.2.1　細胞

1)細胞株名：MKN45

1)來源：人類(人類胃癌組織)

2)供應商：JCRB(Japanese Collection of Research Bioresources)

3)培養條件：37℃ 5% CO_2 預培養條件：37℃ 5% CO_2

a)培養液：RPMI1640

i) 供應商：life technologies

b)血清：胎牛血清

i) 濃度：10%

ii)　供應商：Tissue Culture Biology

1.2.2　動物

1)物種/系統：小鼠/BALB-c Slc-nu/nu

2)微生物學等級：無特定病原(SPF)

3)供應商：Japan SLC

4)性別：雌性

5)週齡：6-12週齡

6)飼養條件

於設定為下述條件之環境下進行動物飼養。

a)溫度：23±2℃

b)濕度：60±10%

c)照明：照明時間：上午7點～下午7點

熄燈時間：下午7點～上午7點

d)食料及水：自由攝取(試驗1之成對飼養群係每天餵食規定量)、CRF-1(Oriental Yeast(股))、自來水

【0179】

1.2.3　群構成

[表21]

	群名	細胞移植	投予物質(用量)	例數
1	正常(媒液)	無	DPBS	5
2	MKN45(媒液)	MKN45	DPBS	4
3	MKN45(HuMAB2)	MKN45	HuMAB2(10 mg/kg)	4

【0180】

1.3 試驗方法

1.3.1　模型之製作、分群、抗體之投予

首先，隨機選出5隻作為正常群。惡病質模型製作係如上述C中記載所示來進行，抗體係進行腹腔內投予(圖9)。

【0181】

1.3.2　自發運動量之測定

自發運動量之測定係於籠內設置無線轉輪(BrainScience idea公司、ENV-044)，測定轉輪之轉速作為自發運動量。測定值係對光期(上午7點至下午7點為止)與暗期(下午7點至上午7點為止)每12小時統計一次。

【0182】

1.4 評價項目

- 體重
- 自發運動量

【0183】

1.5 統計分析方法

關於分群，以一個維度進行，即以體重作為指標。關於分群及檢驗，使用SAS軟體(SAS institute Japan、R9.3)。

【0184】

2　結果

為了評價由GDF15所誘發之惡病質樣症狀，於籠內放入轉輪來測定自發運動量。圖9中顯示試驗排程。與正常群相比，於MKN45群中，活動量減少至10分之1左右。已明確該活動量之減少在HuMAB2投予後3天左右時大致恢復至與正常群同等程度。又，於MKN45群中，判明不僅活動

量減少，活動方式亦存在差異。在正常群中，觀察到在暗期變得活躍，在光期活動性降低之夜行性動物之特徵，但於MKN45群中，其活動方式明顯發生反轉。並且，於投予有抗體之HuMAB2群中，其活動方式亦恢復至與正常群相同。

【0185】

III.抗體製作(2)

A.序列測定

針對MAB1及MAB13(表1)，與MAB2同樣地測定胺基酸序列。將H鏈及L鏈可變區之胺基酸序列示於表22，將CDR序列所示於表23。

【0186】

[表22]

抗體名	序列名 (載體名)	胺基酸序列 (下劃線部分爲CDR序列)	序列 編號
MAB1	H鏈可變區	MSSPQSLKTLTITMGWTWIFILILSVTTGVHSEVQLQQ SGPELEKPGASVKISCKASGYSFT**GYNMN**WVKQSNGKS LEWIG**NIDPYYGGTSYNQKFKG**KATLTVDKSSSTAYMQ LKSLTSEDSAVYYCAR**PGRYDGAWFAY**WGQGTLVTVSA	133
	L鏈可變區	MDFQVQIFSFLLISASVIMSRGQIVLSQSPAILSASPG EKVTMTC**RASSNVNYMH**WYQQKPGSSPKPWIY**ATSNLA** **S**GVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYC**QQWSD** **NPLT**FGAGTKLELK	134
MAB13	H鏈可變區	MSSPQSLKTLTLTMGGIWIFLFLLSGTAGVHSEIQLQQ TGPELVKPGASVKISCKASGYSFT**DYIML**WVKQRHGKS LEWIG**NIHPYYGTTSYNLKFKG**KATLTVDKSSSTAYMQ LNSLTSEDSAVYYCAR**GIGGSPFAY**WGQGTLVTVSA	135
	L鏈可變區	MKLPVRLLVLMFWIPASSSDVLMTQTPLSLPVSLGDQA SISC**RSSQSIVHSNGNTYLE**WYLQKPGQSPKLLIY**KVS** **NRFS**GVPDRFTGTGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC**FQ** **GSHVPYT**FGGGTKLEIK	136

【0187】

[表23]

抗體名	鏈	CDR編號	序列	序列編號
MAB1	H鏈	CDR-H1	GYNMN	137
	H鏈	CDR-H2	NIDPYYGGTSYNQKFKG	138
	H鏈	CDR-H3	PGRYDGAWFAY	139
	L鏈	CDR-L1	RASSNVNYMH	140
	L鏈	CDR-L2	ATSNLAS	141
	L鏈	CDR-L3	QQWSDNPLT	142
MAB13	H鏈	CDR-H1	DYIML	143
	H鏈	CDR-H2	NIHPYYGTTSYNLKFKG	144
	H鏈	CDR-H3	GIGGSPFAY	145
	L鏈	CDR-L1	RSSQSIVHSNGNTYLE	146
	L鏈	CDR-L2	KVSNRFS	147
	L鏈	CDR-L3	FQGSHVPYT	148

【0188】

B.變異抗體之製作

與上述「I. 抗體製作(1) G. 藉由CDR中之胺基酸置換產生之HuMAB2變異體向hGDF15之結合」同樣地，製作表24所示之又一個HuMAB2變異體。將HuMAB2向hGDF15之結合量作為100時之各變異抗體之結合量示於圖10。獲得了複數個顯示與HuMAB2同等以上之結合量之抗體。

[表24]

抗體名	序列名		變異部位		序列	序列編號
	H鏈	L鏈	鏈	區域		
H54T-L7	H54T	L7	H鏈	CDR-H1	SDCYW**T**	149
H54N-L7	H54N	L7	H鏈	CDR-H1	SDCYW**N**	150
H71R-L7	H71R	L7	H鏈	CDR-H2	YT**R**YSGITYYNPSLAS	151
H71H-L7	H71H	L7	H鏈	CDR-H2	YT**H**YSGITYYNPSLAS	152
H71I-L7	H71I	L7	H鏈	CDR-H2	YT**I**YSGITYYNPSLAS	153
H3-L51Y	H3	L51Y	L鏈	CDR-L1	RASQDIS**Y**YLN	154
H3-L72F	H3	L72F	L鏈	CDR-L2	YT**F**TLHS	155
H3-L73Q	H3	L73Q	L鏈	CDR-L2	YTS**Q**LHS	156
H3-L74H	H3	L74H	L鏈	CDR-L2	YTST**H**HS	157

【0189】

進而，將向hGDF15之結合力較高之HuMAB2變異體之H鏈(H49R、H49D、H48S、H71Y、H83R、 或H120F)及L鏈(L48K、L112D、L72F、或L74H)(表25)組合，對所獲得之抗體與hGDF15之結合進行調查。將結果示於圖11。獲得了顯示與HuMAB2同等以上之結合量之多個抗體。

[表25]

序列名	變異部位		序列	序列編號
	鏈	區域		
H49R	H鏈	CDR-H1	**R**DCYWI	38
H49D	H鏈	CDR-H1	**D**DCYWI	39
H48S	H鏈	FR1	DVQLQESGPGLVKPSETLSLT CTVSGFSI**S**	51
H71Y	H鏈	CDR-H2	YT**Y**YSGITYYNPSLAS	52
H83R	H鏈	CDR-H2	YTFYSGITYYNPSL**R**S	66
H120F	H鏈	CDR-H3	DCD**F**AMDY	77
L48K	L鏈	CDR-L1	RASQ**K**ISNYLN	85
L112D	L鏈	CDR-L3	QQG**D**TLPWT	95
L72F	L鏈	CDR-L2	YT**F**TLHS	155
L74H	L鏈	CDR-L2	YTST**H**HS	157

【0190】

C.對GDF15、GFRAL及RET複合體形成之抑制活性評價

GDF15與作為受體之GFRAL及作為輔受體之RET形成複合體，而於

細胞內傳遞訊息。因此，HuMAB2對GDF15、GFRAL及RET複合體形成之影響進行了研究。

【0191】

首先，研究對GDF15與GFRAL之複合體形成之影響(圖12)。於固相化有GFRAL(R&D systems、9697-GR)之培養盤中，使經EZ-Link Micro NHS-PEG4-生物素化套組(Thermo Fisher Scientific, 21955)生物素化之GDF15(R&D Systems, 957-GD/CF)與抗GDF15單株抗體(表26)之連續稀釋液進行反應。作為陰性對照用抗體，使用人類IgG1, kappa-同型對照(Abcam)。使用Pierce高敏感度抗生蛋白鏈菌素-HRP(Thermo Fisher Scientific, 21130)檢測出與GFRAL結合之GDF15。顯色係使用TMB 1-Component Microwell Peroxidase Substrate, SureBlue(SeraCare Life Sciences)，反應係添加終止液(Wako)來終止。吸光度係使用Emax(Molecular Devices)於450 nm(OD450)下進行測定。% of control值係以未添加抗體時之OD450值作為對照，根據添加各抗體時之OD450值，使用式-1算出。IC50值係根據所獲得之% of control值，使用式-2算出抑制率，並使用Excel IC50算出宏而求出。

% of control＝抗體添加樣本之OD450之值÷未添加抗體時之OD450之值×100　　(式-1)

抑制率＝100－% of control　　(式-2)

【0192】

如表26所示，除HuMAB2外之抗GDF15抗體抑制了GDF15與GFRAL之複合體形成，HuMAB2並未抑制。認為此不同係由該等抗體之表位之不同導致。

[表26]

抗體	TC50(nM)
HuMAB2	＞500
Hu01G06-127[1)]	0.05
MAB17	11.98
MAB957[2)]	11.13
Human IgG[3)] (陰性對照)	＞500

1)人類化抗hGDF15抗體(W02014/100689)
2)R&DSystems、MAB957、Lot No: UDC1014011
3)人類IgGl, kappa-同型對照(Abeam)

【0193】

繼而，研究對GDF15、GFRAL及RET之複合體形成之影響。向固相化有30 nM之GFRAL(R&D systems)之ELISA培養盤添加50 nM之GDF15(R&D Systems、9279-GD)、30 nM之RET(R&D Systems、1168-CR)及HuMAB2之連續稀釋液(0-500 nM)的混合液。作為陰性對照用抗體，使用人類IgG1, kappa-同型對照(Abcam)。使用Anti-His過氧化酶綴合抗體(R&D systems、MAB050H)來檢測所形成之GDF15/GFRAL/RET複合體。顯色係使用TMB 1-Component Microwell Peroxidase Substrate, SureBlue(SeraCare Life Sciences)，反應係添加終止液(Wako)來終止。吸光度係使用Emax(Molecular Devices)於450 nm下進行測定。% of control值係以抗體濃度(0 nM)(未添加抗體時)之OD450值作為對照，根據添加各抗體時之OD450值，使用式-1而算出。IC50值係根據所獲得之% of control值，使用式-2算出抑制率，並使用Excel IC50算出宏而求出。

【0194】

HuMAB2未對GDF15/GFRAL複合體形成顯示抑制活性(表26)，但對GDF15/GFRAL/RET複合體形成顯示出抑制活性(圖13)。根據該等結果，認為HuMAB2藉由抑制與具有將訊息向細胞內傳遞之功能之RET形成複合

體，而發揮出GDF15之功能之抑制活性。

【0195】

VI.藥理試驗(2)

A.荷癌小鼠模型之惡病質症狀之改善(3)

與上述「II. 藥理試驗(1) C. 荷癌小鼠模型之惡病質症狀之改善(1)」同樣地，使用荷癌(MKN45細胞移植)小鼠，研究MAB1對於體重、攝食量、及血中未結合GDF15量之影響。群構成所表27所示。

[表27]

	群名	細胞移植	投予物質(用量)	例數
1	正常(媒液)	無	DPBS	8
2	MKN45(媒液)	MKN45	DPBS	8
3	MKN45(MAB17)	MKN45	MAB17(10 mg/kg)	8
4	MKN45(MAB1)	MKN45	MAB1(10 mg/kg)	8

【0196】

圖14中表示體重之變化、抗體投予後7天期間之累積攝食量、及抗體投予7天後之血中未結合GDF15濃度。MKN45群中觀察到體重減少，相對於此，於MAB1群中，在抗體之投予後觀察到體重減少之恢復。關於抗體投予後7天期間之累積攝食量，發現有於MAB1群中，與MKN45群相比有所增大之傾向。因MKN45移植而增大之血中未結合GDF15濃度與HuMAB2(圖8)同樣地，因MAB1而減少。根據該等結果確認到，MKN45移植小鼠之惡病質樣症狀(體重減少、攝食量)因MAB1之投予而恢復。

【序列表】

<110> 日商大塚製藥股份有限公司(OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.)

<120> 抗GDF15抗體

<130> 583093

<150> PCT/JP2019/047956
<151> 2019-12-06

<160> 157

<170> PatentIn第3.5版

<210> 1
<211> 308
<212> PRT
<213> 智人

<400> 1

```
Met Pro Gly Gln Glu Leu Arg Thr Val Asn Gly Ser Gln Met Leu Leu
1               5                  10                  15

Val Leu Leu Val Leu Ser Trp Leu Pro His Gly Gly Ala Leu Ser Leu
            20                  25                  30

Ala Glu Ala Ser Arg Ala Ser Phe Pro Gly Pro Ser Glu Leu His Ser
        35                  40                  45

Glu Asp Ser Arg Phe Arg Glu Leu Arg Lys Arg Tyr Glu Asp Leu Leu
    50                  55                  60

Thr Arg Leu Arg Ala Asn Gln Ser Trp Glu Asp Ser Asn Thr Asp Leu
65                  70                  75                  80

Val Pro Ala Pro Ala Val Arg Ile Leu Thr Pro Glu Val Arg Leu Gly
                85                  90                  95

Ser Gly Gly His Leu His Leu Arg Ile Ser Arg Ala Ala Leu Pro Glu
            100                 105                 110
```

Gly Leu Pro Glu Ala Ser Arg Leu His Arg Ala Leu Phe Arg Leu Ser
115 120 125

Pro Thr Ala Ser Arg Ser Trp Asp Val Thr Arg Pro Leu Arg Arg Gln
130 135 140

Leu Ser Leu Ala Arg Pro Gln Ala Pro Ala Leu His Leu Arg Leu Ser
145 150 155 160

Pro Pro Pro Ser Gln Ser Asp Gln Leu Leu Ala Glu Ser Ser Ser Ala
165 170 175

Arg Pro Gln Leu Glu Leu His Leu Arg Pro Gln Ala Ala Arg Gly Arg
180 185 190

Arg Arg Ala Arg Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly
195 200 205

Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly
210 215 220

Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys
225 230 235 240

Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln
245 250 255

Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro
260 265 270

Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr
275 280 285

Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp
290 295 300

Cys His Cys Ile

305

<210> 2
<211> 112
<212> PRT
<213> 智人

<400> 2

Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg
1 5 10 15

Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp
20 25 30

Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys
35 40 45

Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser
50 55 60

Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro
65 70 75 80

Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val
85 90 95

Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105 110

<210> 3
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 3

Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His
1 5 10

<210> 4

<211> 134
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 4

Met Arg Met Leu Ser Val Leu Tyr Leu Leu Ser Ala Leu Pro Gly Ile
1 5 10 15

Leu Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Ser Leu Val Arg Pro
20 25 30

Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Phe Ser Ile Asn
35 40 45

Ser Asp Cys Tyr Trp Ile Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu
50 55 60

Glu Tyr Ile Gly Tyr Thr Phe Tyr Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro
65 70 75 80

Ser Leu Ala Ser Arg Thr Tyr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln
85 90 95

Phe Ser Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Asp Cys Asp Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
115 120 125

Thr Ser Val Thr Val Ser
130

<210> 5
<211> 131
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 5

Met Gly Tyr Ser Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys Phe Gln

1 5 10 15

Gly Thr Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser
20 25 30

Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp
35 40 45

Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val
50 55 60

Lys Leu Leu Ile His Tyr Thr Ser Thr Leu His Ser Gly Val Pro Ser
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn
100 105 110

Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
115 120 125

Ala Asp Ala
130

<210> 6
<211> 136
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 6

Met Asp Arg Leu Thr Phe Ser Phe Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr
1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln
20 25 30

Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu
35 40 45

Asn Thr His Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys
50 55 60

Gly Leu Glu Trp Leu Ala Asn Ile Trp Trp Asn Asp Asp Lys Tyr Tyr
65 70 75 80

Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Leu Ser Lys Asp Thr Ser Asn
85 90 95

Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Ser Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala
100 105 110

Thr Tyr Phe Cys Ala Gln Val Ala Trp Asp Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
115 120 125

Gln Gly Thr Leu Val Thr Ile Ser
130 135

<210> 7
<211> 132
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 7

Met Asp Ser Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Ile Leu Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile
20 25 30

Met Ser Ala Ser Leu Gly Glu Glu Ile Thr Leu Thr Cys Ser Ala Ser
35 40 45

Ser Ser Val Arg Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser
50 55 60

Pro Lys Val Leu Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65 70 75 80

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Phe Tyr Ser Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Ser Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys His Gln Trp
100 105 110

Ser Ser Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
115 120 125

Arg Ala Asp Ala
130

<210> 8
<211> 155
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2

<400> 8

Met Lys His Leu Trp Phe Leu Leu Leu Leu Ala Ala Pro Arg Trp Val
1 5 10 15

Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro
20 25 30

Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Ile Asn
35 40 45

Ser Asp Cys Tyr Trp Ile Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Tyr Ile Gly Tyr Thr Phe Tyr Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro
65 70 75 80

Ser Leu Ala Ser Arg Thr Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln
85 90 95

Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Asp Cys Asp Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
115 120 125

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
130 135 140

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
145 150 155

<210> 9
<211> 140
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2

<400> 9

Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp
35 40 45

Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Val
50 55 60

Lys Leu Leu Ile His Tyr Thr Ser Thr Leu His Ser Gly Val Pro Ser
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn
100 105 110

Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
130 135 140

<210> 10
<211> 464
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2

<400> 10

Met Lys His Leu Trp Phe Leu Leu Leu Leu Ala Ala Pro Arg Trp Val
1 5 10 15

Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro
20 25 30

Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Ile Asn
35 40 45

Ser Asp Cys Tyr Trp Ile Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Tyr Ile Gly Tyr Thr Phe Tyr Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro
65 70 75 80

Ser Leu Ala Ser Arg Thr Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln
85 90 95

```
Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
            100                 105                 110

Tyr Cys Ala Arg Asp Cys Asp Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
        115                 120                 125

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
    130                 135                 140

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
145                 150                 155                 160

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
                165                 170                 175

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
            180                 185                 190

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
        195                 200                 205

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
    210                 215                 220

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
225                 230                 235                 240

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
                245                 250                 255

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
            260                 265                 270

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
        275                 280                 285

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
```

290 295 300

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
305 310 315 320

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
325 330 335

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
340 345 350

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
355 360 365

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
370 375 380

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
385 390 395 400

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
405 410 415

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
420 425 430

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
435 440 445

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
450 455 460

<210> 11
<211> 234
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2

<400> 11

Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp
35 40 45

Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Val
50 55 60

Lys Leu Leu Ile His Tyr Thr Ser Thr Leu His Ser Gly Val Pro Ser
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn
100 105 110

Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 12
<211> 7
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 12

Thr His Gly Met Gly Val Gly
1 5

<210> 13
<211> 16
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 13

Asn Ile Trp Trp Asn Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 14
<211> 8
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 14

Val Ala Trp Asp Trp Phe Ala Tyr
1 5

<210> 15
<211> 10
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 15

Ser Ala Ser Ser Ser Val Arg Tyr Met His
1 5 10

<210> 16
<211> 7
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 16

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 17

His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
1 5

<210> 18
<211> 6
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 18

Ser Asp Cys Tyr Trp Ile
1 5

<210> 19
<211> 16
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 19

Tyr Thr Phe Tyr Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Ala Ser
1 5 10 15

<210> 20
<211> 8
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 20

Asp Cys Asp Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 21
<211> 11
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 21

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 22
<211> 7
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 22

Tyr Thr Ser Thr Leu His Ser
1 5

<210> 23
<211> 9
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 23

Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 24
<211> 465
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2

<400> 24
atgaagcacc tgtggtttct gctgctgctg gccgctccca gatgggtgct gtctcaggtg 60

cagctgcagg aatctggccc tggcctcgtg aagcccagcg agacactgag cctgacctgt 120

accgtgtccg gcttcagcat caacagcgac tgctactgga tctggatcag acagcccccc 180

ggcaagggcc tggagtacat cggctacacc ttctacagcg gcatcaccta ctacaacccc 240

agcctggcca gccggaccac catcagcaga gacaccagca agaaccagtt cagcctgaag 300

ctgagcagcg tgacagccgc cgataccgcc gtgtactact gcgccagaga ctgcgactac 360

gccatggact attggggcca gggcaccctc gtgaccgtgt ctagcgcctc tacaaagggc 420

cccagcgtgt tccctctggc ccctagcagc aagagcacat ctggc 465

<210> 25
<211> 420
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2

<400> 25
atgagagtgc ctgctcagct gctgggactg ctgctgctgt ggctgcctgg cgctagatgc 60

gacatccaga tgacccagag ccccagcagc ctgtctgcca gcgtgggcga cagagtgacc 120

atcacctgta gagccagcca ggacatcagc aactacctga actggtatca gcagaaaccc 180

ggcaaggccg tgaagctgct gatccactac accagcaccc tgcacagcgg cgtgccccagc 240

agattttctg gcagcggctc cggcaccgac tacaccctga caatcagctc cctgcagccc 300

gaggacttcg ctacctactt ctgtcagcaa ggcaacaccc tgccctggac ctttggccag 360

ggcaccaagc tggaaatcaa gcggacagtg gccgctccca gcgtgttcat cttcccacct 420

<210> 26
<211> 1395
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2

<400> 26
atgaagcacc tgtggtttct gctgctgctg gccgctccca gatgggtgct gtctcaggtg 60

cagctgcagg aatctggccc tggcctcgtg aagcccagcg agacactgag cctgacctgt 120

accgtgtccg gcttcagcat caacagcgac tgctactgga tctggatcag acagcccccc 180

ggcaagggcc tggagtacat cggctacacc ttctacagcg gcatcaccta ctacaacccc 240

agcctggcca gccggaccac catcagcaga gacaccagca agaaccagtt cagcctgaag 300

ctgagcagcg tgacagccgc cgataccgcc gtgtactact gcgccagaga ctgcgactac 360

gccatggact attggggcca gggcaccctc gtgaccgtgt ctagcgcctc tacaaagggc 420

cccagcgtgt tccctctggc ccctagcagc aagagcacat ctggcggaac agccgccctg 480

ggctgcctcg tgaaagacta cttccccgag cccgtgacag tgtcctggaa ctctggcgcc 540

ctgacaagcg gcgtgcacac ctttccagcc gtgctgcaga gcagcggcct gtactctctg 600

tccagcgtcg tgactgtgcc cagcagctct ctgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg 660

aaccacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaggtgg aacccaagag ctgcgacaag 720

acccacacct gtcccccttg tcctgccccc gaactgctgg gaggcccttc cgtgttcctg 780

ttccccccaa agcccaagga caccctgatg atcagcagaa cccccgaagt gacctgcgtg 840

gtggtggacg tgtcccacga ggaccctgaa gtgaagttca attggtacgt ggacggcgtg 900

gaagtgcaca acgccaagac caagcctaga gaggaacagt acaacagcac ctaccgggtg 960

gtgtccgtgc tgacagtgct gcaccaggac tggctgaacg gcaaagagta caagtgcaag 1020

gtgtccaaca aggccctgcc tgcccccatc gagaaaacca tctccaaggc caagggacag 1080

ccccgcgagc cccaggtgta cacactgcct ccaagccggg aagagatgac caagaatcag 1140

gtgtccctga catgcctcgt gaagggcttc tacccctccg atattgccgt ggaatgggag 1200

agcaacggcc agcccgagaa caactacaag accacccccc ctgtgctgga cagcgacggc 1260

tcattcttcc tgtacagcaa gctgaccgtg gacaagtccc ggtggcagca gggcaacgtg 1320

ttcagctgca gcgtgatgca cgaggccctg cacaaccact acacccagaa gtccctgtcc 1380

ctgagccccg gctaa 1395

<210> 27
<211> 705
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2

<400> 27
atgagagtgc ctgctcagct gctgggactg ctgctgctgt ggctgcctgg cgctagatgc 60

gacatccaga tgacccagag ccccagcagc ctgtctgcca gcgtgggcga cagagtgacc 120

atcacctgta gagccagcca ggacatcagc aactacctga actggtatca gcagaaaccc 180

ggcaaggccg tgaagctgct gatccactac accagcaccc tgcacagcgg cgtgccccagc 240

agattttctg gcagcggctc cggcaccgac tacaccctga caatcagctc cctgcagccc 300

gaggacttcg ctacctactt ctgtcagcaa ggcaacaccc tgccctggac ctttggccag 360

ggcaccaagc tggaaatcaa gcggacagtg gccgctccca gcgtgttcat cttcccacct 420

agcgacgagc agctgaagtc tggcaccgcc tctgtcgtgt gcctgctgaa caacttctac 480

ccccgcgagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaatgccc tgcagtccgg caacagccag 540

gaaagcgtga ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgtcctc caccctgacc 600

ctgagcaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaagtgac ccaccagggc 660

ctgagcagcc ctgtgaccaa gagcttcaac cggggcgagt gctga 705

<210> 28
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hGDF15突變體

<400> 28

Ala Arg Asn Gly Asp Ala Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg
1 5 10 15

Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp
20 25 30

Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys
35 40 45

Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser
50 55 60

Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro
65 70 75 80

Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val
85 90 95

Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105 110

<210> 29
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hGDF15突變體

<400> 29

Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Ala Cys Cys Arg
1 5 10 15

Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp
20 25 30

Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys
35 40 45

Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser
50 55 60

Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro
65 70 75 80

Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val
85 90 95

Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105 110

<210> 30
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hGDF15突變體

<400> 30

Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Ala
1 5 10 15

Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp
20 25 30

Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys
35 40 45

Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser
50 55 60

Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro
65 70 75 80

Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val
85 90 95

Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105 110

<210> 31
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hGDF15突變體

<400> 31

Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Ala Cys Cys Ala
1 5 10 15

Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp
20 25 30

Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys
35 40 45

Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser
50 55 60

Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro
65 70 75 80

Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val
85 90 95

Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105 110

<210> 32
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hGDF15突變體

<400> 32

Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Ala Ala Cys Cys Ala

1 5 10 15

Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp
20 25 30

Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys
35 40 45

Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser
50 55 60

Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro
65 70 75 80

Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val
85 90 95

Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105 110

<210> 33
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hGDF15突變體

<400> 33

Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Ala Ala Cys Cys Ala
1 5 10 15

Ala His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp
20 25 30

Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys
35 40 45

Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser

50 55 60

Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro
65 70 75 80

Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val
85 90 95

Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105 110

<210> 34
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hGDF15突變體

<400> 34

Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Ala Ala Ala Ala Cys Cys Ala
1 5 10 15

Ala His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp
20 25 30

Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys
35 40 45

Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser
50 55 60

Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro
65 70 75 80

Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val
85 90 95

Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile

100 105 110

<210> 35
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hGDF15突變體

<400> 35

Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Ala Ala Ala Ala Ala Ala Cys Cys Ala
1 5 10 15

Ala His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp
20 25 30

Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys
35 40 45

Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser
50 55 60

Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro
65 70 75 80

Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val
85 90 95

Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105 110

<210> 36
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hGDF15突變體

<400> 36

Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg
1 5 10 15

Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp
20 25 30

Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys
35 40 45

Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser
50 55 60

Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Ala Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro
65 70 75 80

Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val
85 90 95

Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105 110

<210> 37
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 37

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Ile Arg
20 25 30

<210> 38
<211> 6
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 38

Arg Asp Cys Tyr Trp Ile
1 5

<210> 39
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 39

Asp Asp Cys Tyr Trp Ile
1 5

<210> 40
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 40

Ser Arg Cys Tyr Trp Ile
1 5

<210> 41
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 41

Ser Ser Cys Tyr Trp Ile

1 5

<210> 42
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 42

Ser Phe Cys Tyr Trp Ile
1 5

<210> 43
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 43

Ser Asp Cys Arg Trp Ile
1 5

<210> 44
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 44

Ser Asp Cys Gln Trp Ile
1 5

<210> 45
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 45

Tyr Thr Phe Arg Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Ala Ser
1 5 10 15

<210> 46
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 46

Tyr Thr Phe Tyr Asp Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Ala Ser
1 5 10 15

<210> 47
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 47

Tyr Thr Phe Tyr Arg Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Ala Ser
1 5 10 15

<210> 48
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 48

Tyr Thr Phe Tyr Tyr Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Ala Ser
1 5 10 15

<210> 49
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 49

Asp Cys Arg Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 50
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 50

Asp Cys Phe Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 51
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 51

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Ile Ser
20 25 30

<210> 52
<211> 16
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 52

Tyr Thr Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Ala Ser
1 5 10 15

<210> 53
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 53

Tyr Thr Phe Ala Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Ala Ser
1 5 10 15

<210> 54
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 54

Tyr Thr Phe Leu Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Ala Ser
1 5 10 15

<210> 55
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 55

Tyr Thr Phe Asn Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Ala Ser

1 5 10 15

<210> 56
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 56

Tyr Thr Phe Thr Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Ala Ser
1 5 10 15

<210> 57
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 57

Tyr Thr Phe Trp Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Ala Ser
1 5 10 15

<210> 58
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 58

Tyr Thr Phe Tyr Ser Gly His Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Ala Ser
1 5 10 15

<210> 59
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 59

Tyr Thr Phe Tyr Ser Gly Leu Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Ala Ser
1 5 10 15

<210> 60
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 60

Tyr Thr Phe Tyr Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Ala Ser
1 5 10 15

<210> 61
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 61

Tyr Thr Phe Tyr Ser Gly Gln Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Ala Ser
1 5 10 15

<210> 62
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 62

Tyr Thr Phe Tyr Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr His Pro Ser Leu Ala Ser
1 5 10 15

<210> 63
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 63

Tyr Thr Phe Tyr Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Lys Pro Ser Leu Ala Ser
1 5 10 15

<210> 64
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 64

Tyr Thr Phe Tyr Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Gln Pro Ser Leu Ala Ser
1 5 10 15

<210> 65
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 65

Tyr Thr Phe Tyr Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Arg Pro Ser Leu Ala Ser
1 5 10 15

<210> 66
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 66

Tyr Thr Phe Tyr Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Arg Ser
1 5 10 15

<210> 67
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 67

Gln Cys Asp Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 68
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 68

Asp Cys Glu Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 69
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 69

Asp Cys His Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 70

<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 70

Asp Cys Lys Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 71
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 71

Asp Cys Asn Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 72
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 72

Asp Cys Gln Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 73
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 73

Asp Cys Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 74
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 74

Asp Cys Thr Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 75
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 75

Asp Cys Asp Ala Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 76
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 76

Asp Cys Asp Asp Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 77
<211> 8
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 77

Asp Cys Asp Phe Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 78
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 78

Asp Cys Asp Asn Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 79
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 79

Asp Cys Asp Gln Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 80
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 80

Asp Cys Asp Tyr Ala Phe Asp Tyr

1 5

<210> 81
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 81

Arg Ala Ser Arg Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 82
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 82

Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 83
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 83

Arg Ala Ser Gln Arg Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 84
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 84

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 85
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 85

Arg Ala Ser Gln Lys Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 86
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 86

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asp Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 87
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 87

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 88
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 88

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Phe Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 89
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 89

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Tyr Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 90
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 90

Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser
1 5

<210> 91
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 91

Gln Gln Phe Asn Thr Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 92
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 92

Gln Gln Tyr Asn Thr Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 93
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 93

Gln Gln Gly Glu Thr Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 94
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 94

Gln Gln Gly Arg Thr Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 95

<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 95

Gln Gln Gly Asp Thr Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 96
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 96

Gln Gln Gly Phe Thr Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 97
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 97

Gln Gln Gly Asn Asp Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 98
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 98

Gln Gln Gly Asn Arg Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 99
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 99

Gln Gln Gly Asn Phe Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 100
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 100

Arg Ala Ser Gln His Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 101
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 101

Arg Ala Ser Gln Tyr Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 102
<211> 11
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 102

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Gln Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 103
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 103

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Trp Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 104
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 104

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Gln Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 105
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 105

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Val Lys Leu Leu Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 106
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 106

Phe Thr Ser Thr Leu His Ser
1 5

<210> 107
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 107

His Thr Ser Thr Leu His Ser
1 5

<210> 108
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 108

Tyr Thr Asp Thr Leu His Ser
1 5

<210> 109
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 109

Tyr Thr Glu Thr Leu His Ser
1 5

<210> 110
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 110

Tyr Thr Arg Thr Leu His Ser
1 5

<210> 111
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 111

Tyr Thr Tyr Thr Leu His Ser
1 5

<210> 112
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 112

Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser
1 5

<210> 113
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 113

Tyr Thr Ser Asn Leu His Ser
1 5

<210> 114
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 114

Tyr Thr Ser Tyr Leu His Ser
1 5

<210> 115
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 115

Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Ser
1 5

<210> 116
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 116

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Lys Gly Thr Asp Tyr Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys
20 25 30

<210> 117
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 117

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Asn Gly Thr Asp Tyr Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys
20 25 30

<210> 118
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 118

Gln Gln Ala Asn Thr Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 119
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 119

Gln Gln Asn Asn Thr Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 120
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 120

Gln Gln Ser Asn Thr Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 121
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 121

Gln Gln Gly His Thr Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 122
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 122

Gln Gln Gly Gln Thr Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 123

<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 123

Gln Gln Gly Thr Thr Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 124
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 124

Gln Gln Gly Tyr Thr Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 125
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 125

Gln Gln Gly Asn Ser Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 126
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 126

Gln Gln Gly Asn Thr Phe Pro Trp Thr
1 5

<210> 127
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 127

Gln Gln Gly Asn Thr His Pro Trp Thr
1 5

<210> 128
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 128

Gln Gln Gly Asn Thr Ile Pro Trp Thr
1 5

<210> 129
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 129

Gln Gln Gly Asn Thr Asn Pro Trp Thr
1 5

<210> 130
<211> 9
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 130

Gln Gln Gly Asn Thr Tyr Pro Trp Thr
1 5

<210> 131
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 131

Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro His Thr
1 5

<210> 132
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 132

Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr
1 5

<210> 133
<211> 152
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 133

Met Ser Ser Pro Gln Ser Leu Lys Thr Leu Thr Ile Thr Met Gly Trp
1 5 10 15

Thr Trp Ile Phe Ile Leu Ile Leu Ser Val Thr Thr Gly Val His Ser
20 25 30

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly Ala
35 40 45

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
50 55 60

Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Asn Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
65 70 75 80

Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
85 90 95

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
100 105 110

Met Gln Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
115 120 125

Ala Arg Pro Gly Arg Tyr Asp Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
130 135 140

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
145 150

<210> 134
<211> 128
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 134

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45

Ser Asn Val Asn Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
50 55 60

Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
100 105 110

Ser Asp Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
115 120 125

<210> 135
<211> 150
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 135

Met Ser Ser Pro Gln Ser Leu Lys Thr Leu Thr Leu Thr Met Gly Gly
1 5 10 15

Ile Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly Val His Ser
20 25 30

Glu Ile Gln Leu Gln Gln Thr Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
35 40 45

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
50 55 60

Ile Met Leu Trp Val Lys Gln Arg His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
65 70 75 80

Gly Asn Ile His Pro Tyr Tyr Gly Thr Thr Ser Tyr Asn Leu Lys Phe
85 90 95

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
100 105 110

Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
115 120 125

Ala Arg Gly Ile Gly Gly Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
130 135 140

Leu Val Thr Val Ser Ala
145 150

<210> 136
<211> 131
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 136

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
1 5 10 15

Ser Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
20 25 30

Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile
35 40 45

Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
50 55 60

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Thr Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

85 90 95

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys
100 105 110

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
115 120 125

Glu Ile Lys
130

<210> 137
<211> 5
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 137

Gly Tyr Asn Met Asn
1 5

<210> 138
<211> 17
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 138

Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 139
<211> 11
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 139

Pro Gly Arg Tyr Asp Gly Ala Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 140
<211> 10
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 140

Arg Ala Ser Ser Asn Val Asn Tyr Met His
1 5 10

<210> 141
<211> 7
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 141

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 142
<211> 9
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 142

Gln Gln Trp Ser Asp Asn Pro Leu Thr
1 5

<210> 143
<211> 5
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 143

Asp Tyr Ile Met Leu
1 5

<210> 144
<211> 17
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 144

Asn Ile His Pro Tyr Tyr Gly Thr Thr Ser Tyr Asn Leu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 145
<211> 9
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 145

Gly Ile Gly Gly Ser Pro Phe Ala Tyr
1 5

<210> 146
<211> 16
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 146

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
1 5 10 15

<210> 147
<211> 7
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 147

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 148
<211> 9
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 148

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr
1 5

<210> 149
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 149

Ser Asp Cys Tyr Trp Thr
1 5

<210> 150
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 150

Ser Asp Cys Tyr Trp Asn
1 5

<210> 151
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 151

Tyr Thr Arg Tyr Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Ala Ser
1 5 10 15

<210> 152
<211> 16
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 152

Tyr Thr His Tyr Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Ala Ser
1 5 10 15

<210> 153
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 153

Tyr Thr Ile Tyr Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Ala Ser
1 5 10 15

<210> 154
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 154

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Tyr Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 155
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 155

Tyr Thr Phe Thr Leu His Ser

1 5

<210> 156
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 156

Tyr Thr Ser Gln Leu His Ser
1 5

<210> 157
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HuMAB2變異體

<400> 157

Tyr Thr Ser Thr His His Ser
1 5

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種抗hGDF15抗體，其與包含DHCPLGPGRCCRLH(序列編號3)之胺基酸序列之hGDF15之表位結合。

【請求項2】

如請求項1之抗體，其包括：

重鏈可變區，其含有：

包含序列編號4之胺基酸序列之重鏈可變區所包含之CDR1、或包含於上述CDR1之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號4之胺基酸序列之重鏈可變區所包含之CDR2、或包含於上述CDR2之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號4之胺基酸序列之重鏈可變區所包含之CDR3、或包含於上述CDR3之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR3；及

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號5之胺基酸序列之輕鏈可變區所包含之CDR1、或包含於上述CDR1之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號5之胺基酸序列之輕鏈可變區所包含之CDR2、或包含於上述CDR2之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號5之胺基酸序列之輕鏈可變區所包含之CDR3、或包含於上述CDR3之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR3。

【請求項3】

如請求項1或2之抗體，其包括：

重鏈可變區，其含有：

包含序列編號18之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號19之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號20之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR3；及

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號21之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號22之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號23之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR3。

【請求項4】

如請求項1至3中任一項之抗體，其包括：

重鏈可變區，其含有：

包含序列編號18之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號19之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號20之胺基酸序列之CDR3；及

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號21之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號22之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號23之胺基酸序列之CDR3。

【請求項5】

如請求項1至4中任一項之抗體，其包括：包含序列編號4之胺基酸序列之重鏈可變區所包含之CDR1、CDR2、及CDR3；及包含序列編號5之胺基酸序列之輕鏈可變區所包含之CDR1、CDR2、及CDR3。

【請求項6】

如請求項1之抗體，其包括：

重鏈可變區，其含有：

包含序列編號133之胺基酸序列之重鏈可變區所包含之CDR1、或包含於上述CDR1之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號133之胺基酸序列之重鏈可變區所包含之CDR2、或包含於上述CDR2之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號133之胺基酸序列之重鏈可變區所包含之CDR3、或包含於上述CDR3之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR3；及

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號134之胺基酸序列之輕鏈可變區所包含之CDR1、或包含於上述CDR1之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號134之胺基酸序列之輕鏈可變區所包含之CDR2、或包含於上述CDR2之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號134之胺基酸序列之輕鏈可變區所包含之CDR3、或包含於上述CDR3之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR3。

【請求項7】

如請求項1或6之抗體，其包括：

重鏈可變區，其含有：

包含序列編號137之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號138之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號139之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR3；及

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號140之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號141之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號142之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR3。

【請求項8】

如請求項1、6及7中任一項之抗體，其包括：

重鏈可變區，其含有：

包含序列編號137之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號138之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號139之胺基酸序列之CDR3；及

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號140之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號141之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號142之胺基酸序列之CDR3。

【請求項9】

如請求項1及6至8中任一項之抗體，其包括：包含序列編號133之胺基酸序列之重鏈可變區所包含之CDR1、CDR2、及CDR3；及包含序列編號134之胺基酸序列之輕鏈可變區所包含之CDR1、CDR2、及CDR3。

【請求項10】

如請求項1之抗體，其包括：

重鏈可變區，其含有：

包含序列編號135之胺基酸序列之重鏈可變區所包含之CDR1、或包含於上述CDR1之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號135之胺基酸序列之重鏈可變區所包含之CDR2、或包

含於上述CDR2之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號135之胺基酸序列之重鏈可變區所包含之CDR3、或包含於上述CDR3之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR3；及

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號136之胺基酸序列之輕鏈可變區所包含之CDR1、或包含於上述CDR1之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號136之胺基酸序列之輕鏈可變區所包含之CDR2、或包含於上述CDR2之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號136之胺基酸序列之輕鏈可變區所包含之CDR3、或包含於上述CDR3之胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR3。

【請求項11】

如請求項1或10之抗體，其包括：

重鏈可變區，其含有：

包含序列編號143之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號144之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號145之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基

酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR3；及

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號146之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號147之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號148之胺基酸序列或於上述胺基酸序列中有1～3個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列之CDR3。

【請求項12】

如請求項1、10及11中任一項之抗體，其包括：

重鏈可變區，其含有：

包含序列編號143之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號144之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號145之胺基酸序列之CDR3；及

輕鏈可變區，其含有：

包含序列編號146之胺基酸序列之CDR1、

包含序列編號147之胺基酸序列之CDR2、及

包含序列編號148之胺基酸序列之CDR3。

【請求項13】

如請求項1及10至12中任一項之抗體，其包括：包含序列編號135之胺基酸序列之重鏈可變區所包含之CDR1、CDR2、及CDR3；及包含序列編號136之胺基酸序列之輕鏈可變區所包含之CDR1、CDR2、及CDR3。

【請求項14】

如請求項1至13中任一項之抗體，其包括：

重鏈可變區，其含有：與序列編號8之胺基酸序列具有90%以上之序列同一性之胺基酸序列、或序列編號8之胺基酸序列或者於序列編號8之胺基酸序列中有1～20個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列；及

輕鏈可變區，其含有：與序列編號9之胺基酸序列具有90%以上之序列同一性之胺基酸序列、或序列編號9之胺基酸序列或者於序列編號9之胺基酸序列中有1～20個胺基酸殘基改性而成之胺基酸序列。

【請求項15】

如請求項1至14中任一項之抗體，其包括：包含序列編號8之胺基酸序列之重鏈可變區及包含序列編號9之胺基酸序列之輕鏈可變區。

【請求項16】

一種抗hGDF15抗體，其和如請求項1至15中任一項之抗體競爭性地與hGDF15結合。

【請求項17】

如請求項16之抗體，其和抗hGDF15抗體競爭，該抗hGDF15抗體包括：包含序列編號8之胺基酸序列之重鏈可變區及包含序列編號9之胺基酸序列之輕鏈可變區。

【請求項18】

一種聚核苷酸，其編碼如請求項1至17中任一項之抗體。

【請求項19】

一種表現載體，其包含如請求項18之聚核苷酸。

【請求項20】

一種轉形細胞，其包含如請求項18之聚核苷酸。

【請求項21】

一種醫藥組合物，其包含如請求項1至17中任一項之抗體。

【請求項22】

如請求項21之醫藥組合物，其用以治療與GDF15相關之疾病或症狀。

【請求項23】

如請求項22之醫藥組合物，其中與GDF15相關之疾病或症狀為癌症。

【請求項24】

如請求項22之醫藥組合物，其中與GDF15相關之疾病或症狀為惡病質。

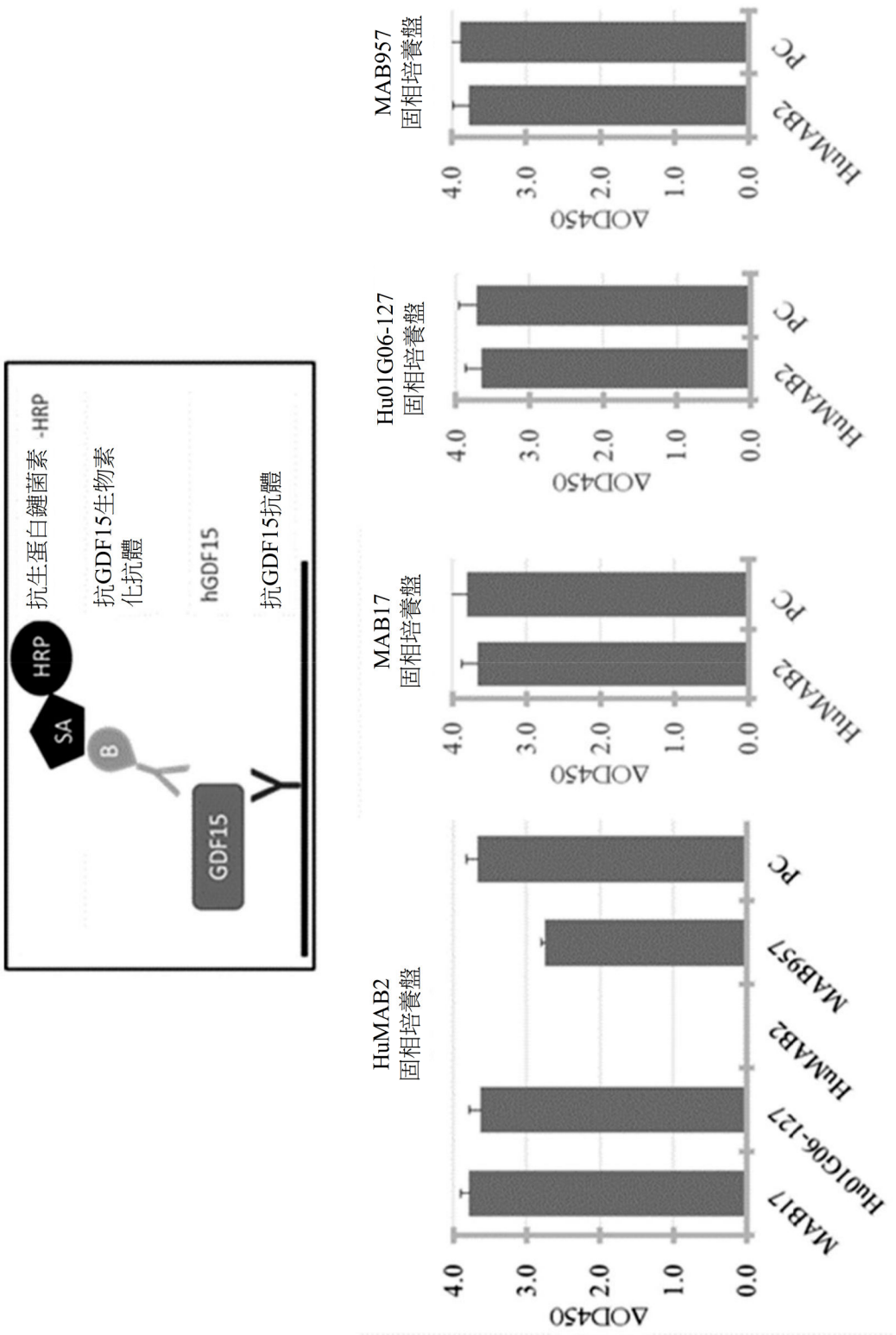
【請求項25】

如請求項24之醫藥組合物，其中惡病質為癌症惡病質。

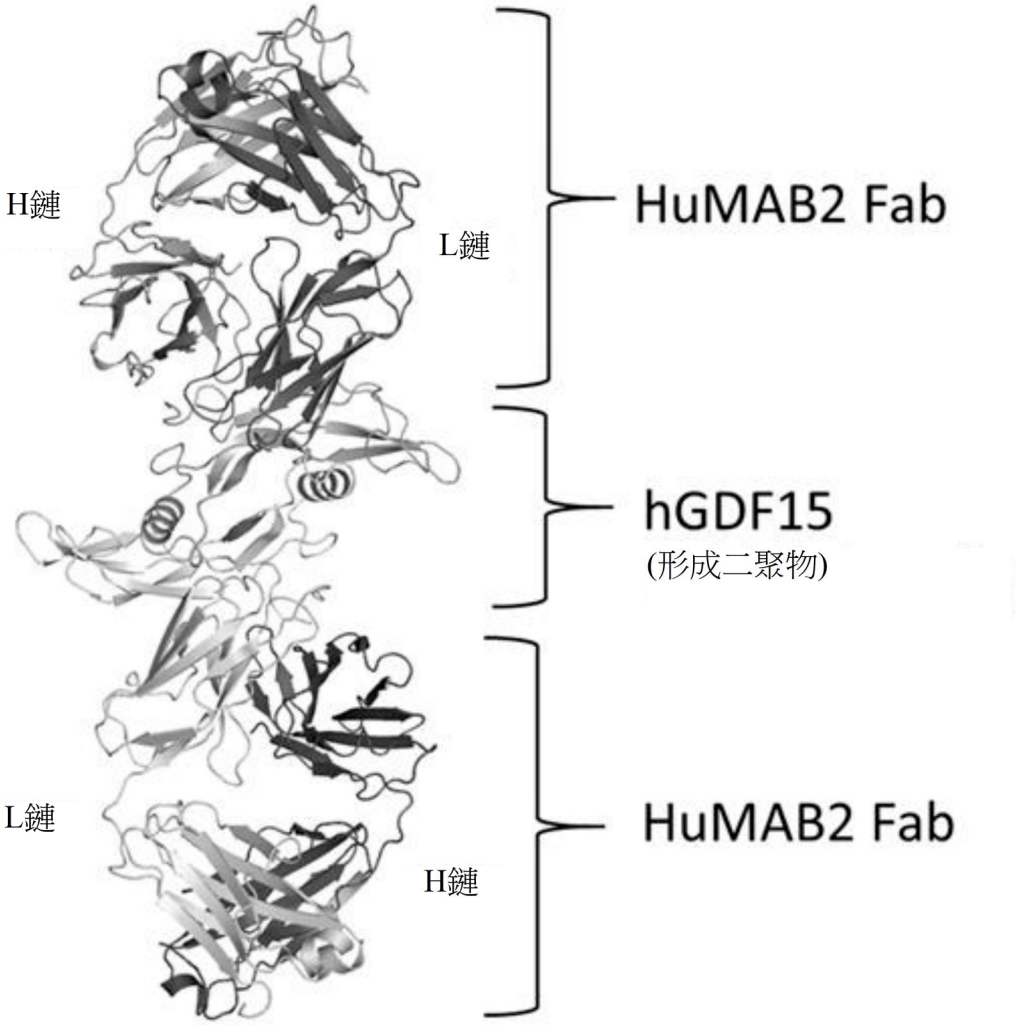
【請求項26】

如請求項21之醫藥組合物，其用以使血中GDF15濃度降低。

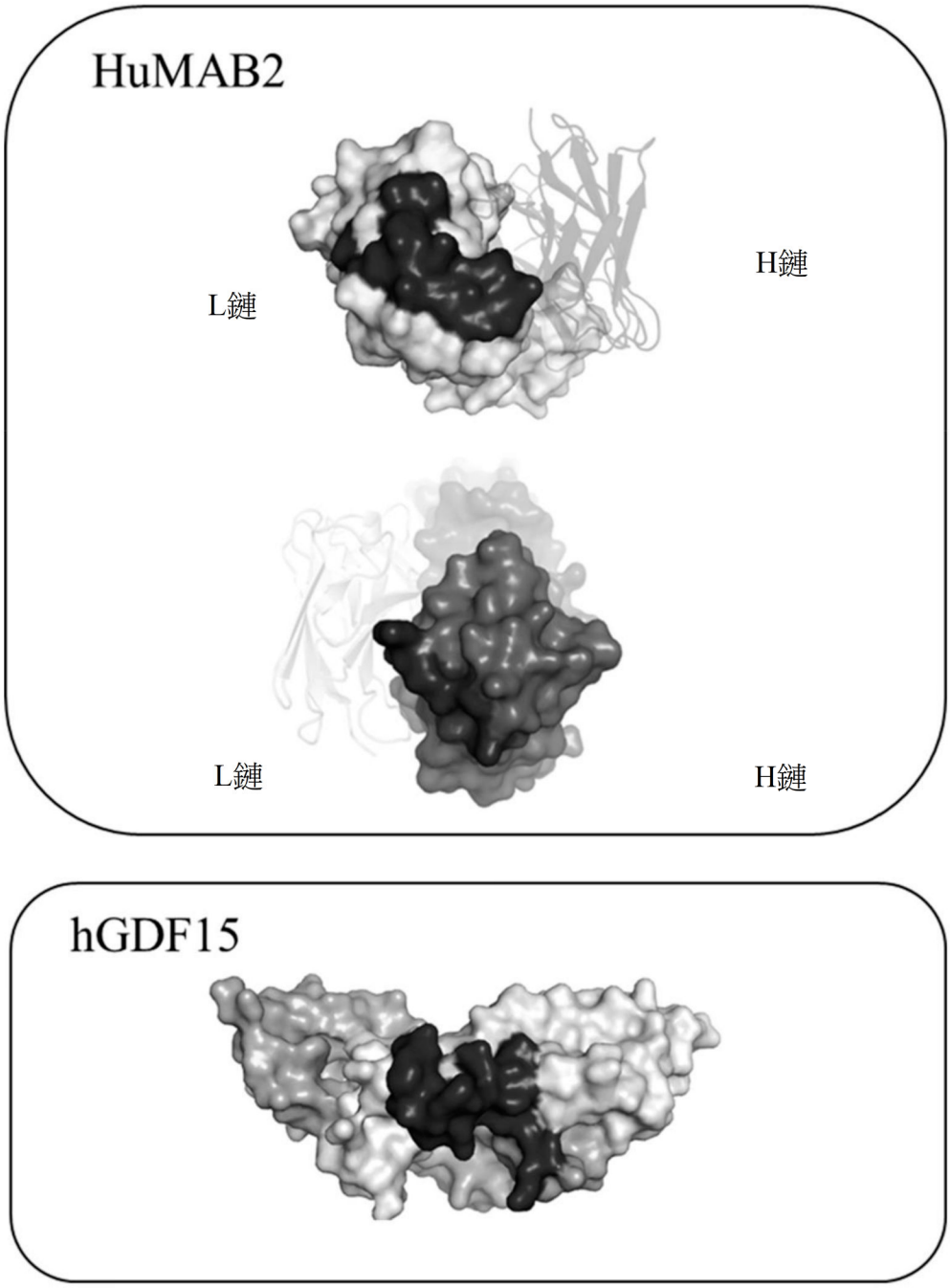
【發明圖式】


抗生蛋白鏈菌素 -HRP
HRP
SA
B
抗GDF15生物素化抗體
hGDF15
GDF15
抗GDF15抗體
HuMAB2
固相培養盤
MAB17
MAB957
Hu01G06-127
PC
AOD450
0.0
1.0
2.0
3.0
4.0

【圖1】



【圖2A】

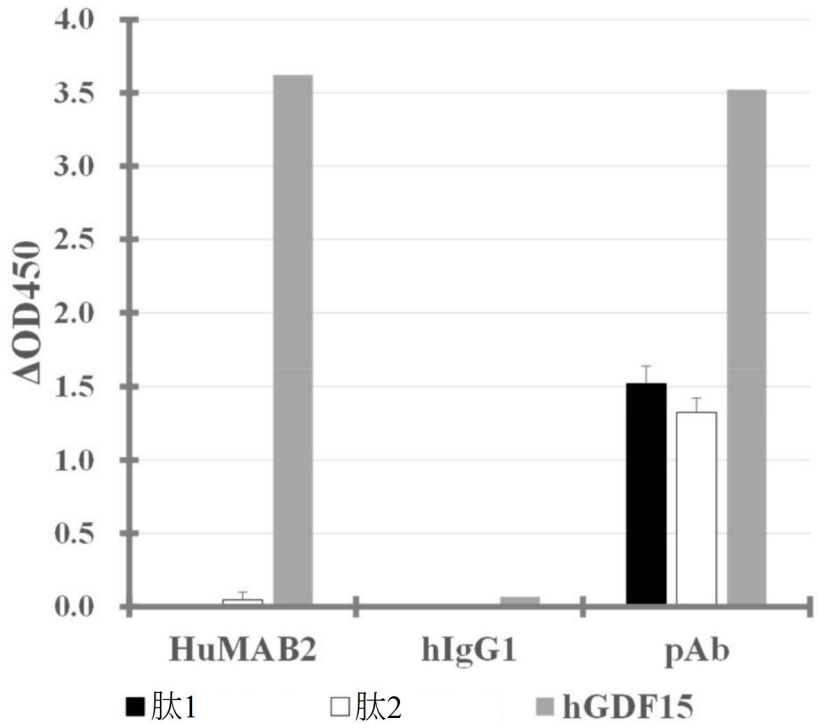


【圖2B】

hGDF15

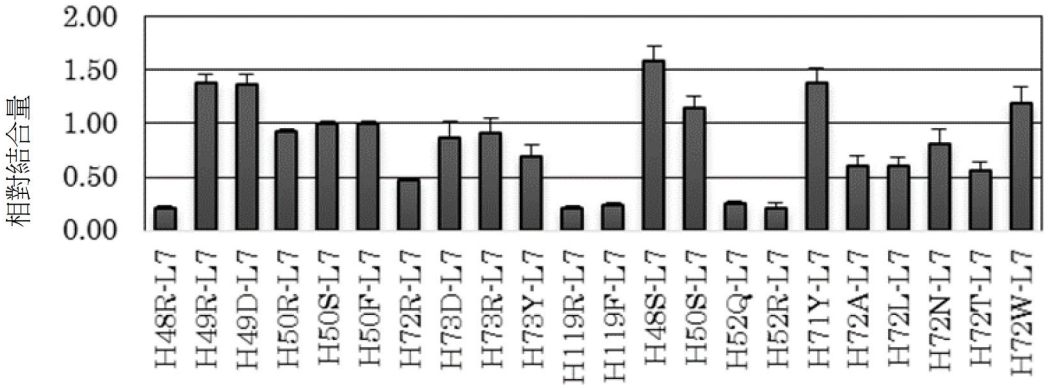
```
          10        20                30                40
ARNGDHCPLG PGRCCRLHTV RASLEDLGWA DWVLSPREVQ
          50        60                70        80
VTMCIGACPS QFRAANMHAQ IKTSLHRLKP DTVPAPCCVP
          90        100               110  112
ASYNPMVLIQ KTDTGVSLQT YDDLLAKDCH CI   (SEQ ID NO: 2 )
```

【圖3】



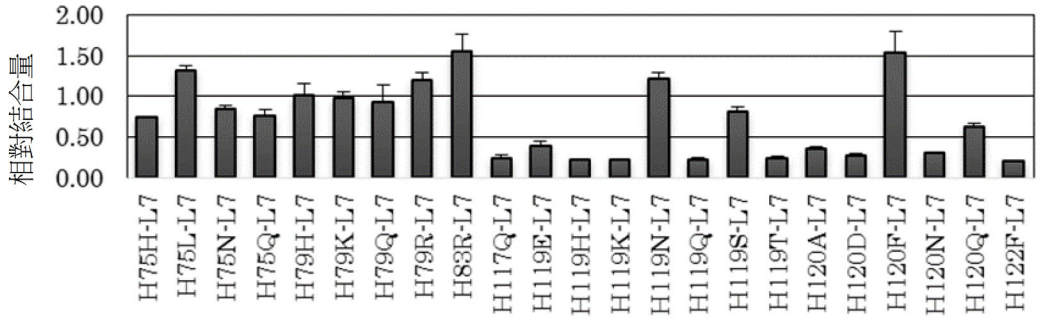
【圖4】

H鏈改性抗體1/2



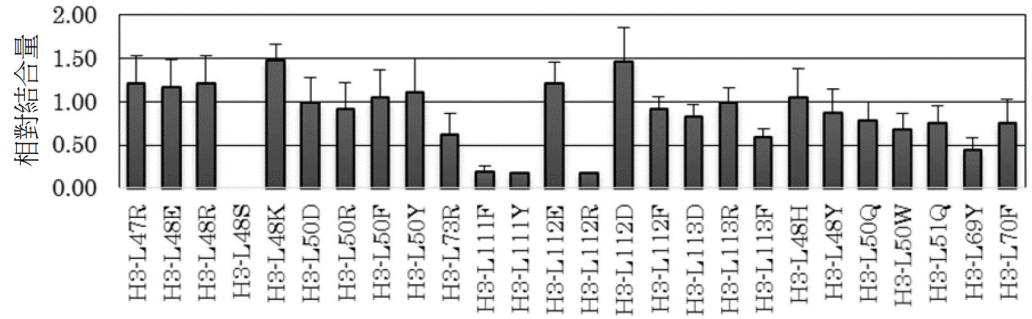
【圖5A】

H鏈改性抗體2/2



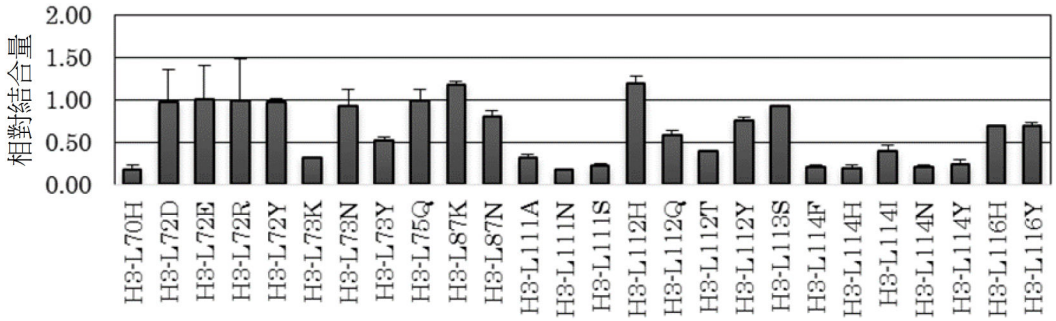
【圖5B】

L鏈改性抗體1/2



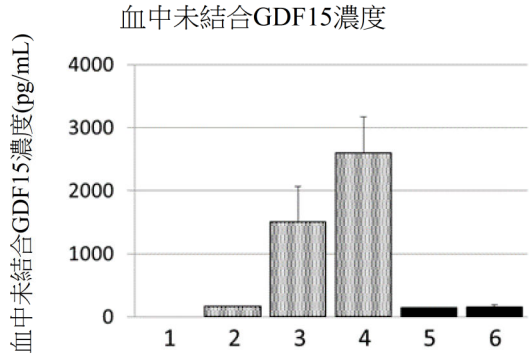
【圖5C】

L鏈改性抗體2/2

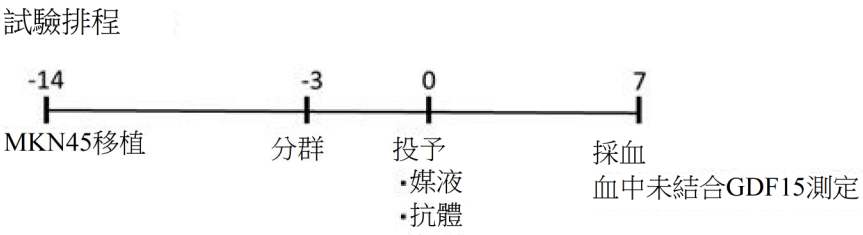


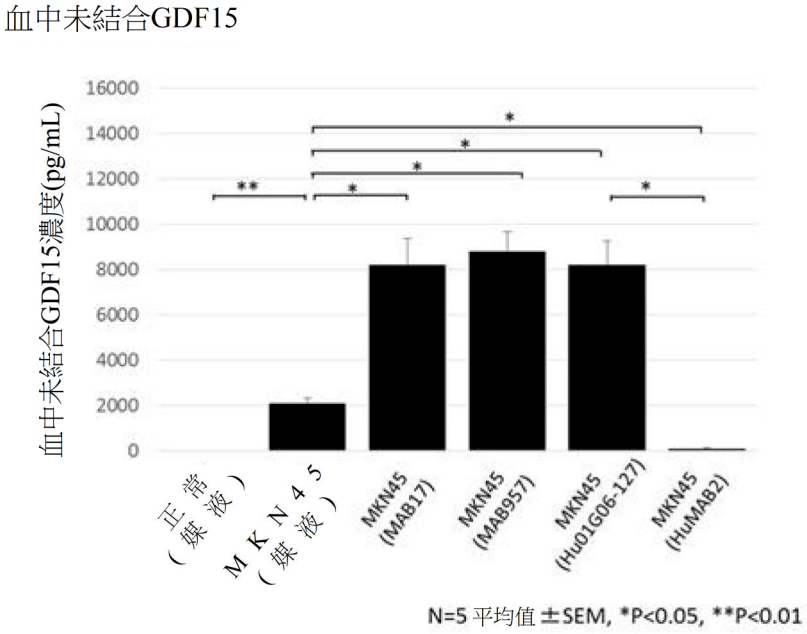
【圖5D】

群	處理
1	媒液
2	rhGDF15 0.3mg/kg
3	rhGDF15 1mg/kg
4	rhGDF15 3mg/kg
5	rhGDF15 3mg/kg + MAB17 3mg/kg
6	rhGDF15 3mg/kg + HuMAB2 3mg/kg

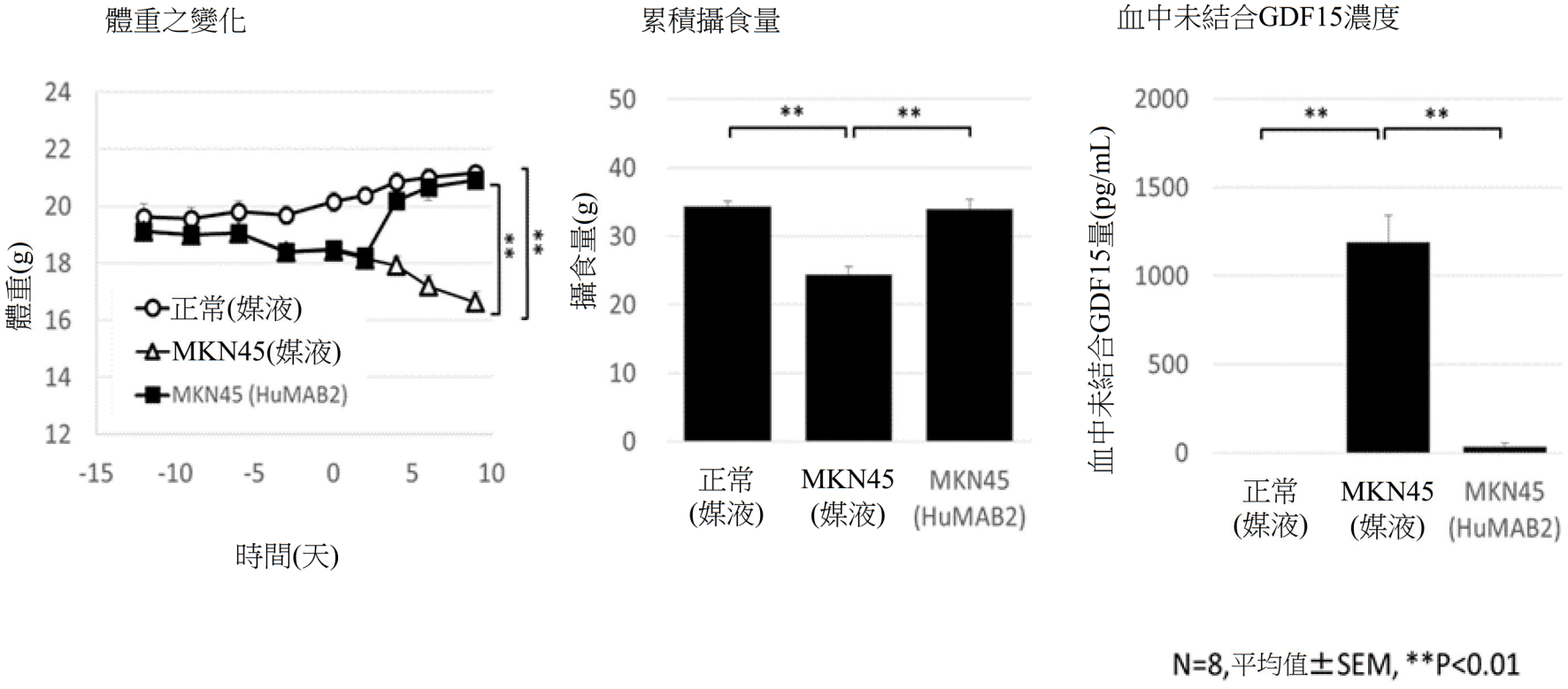


【圖6】


試驗排程
-14
-3
0
7
MKN45移植
分群
投予
・媒液
・抗體
採血
血中未結合GDF15測定

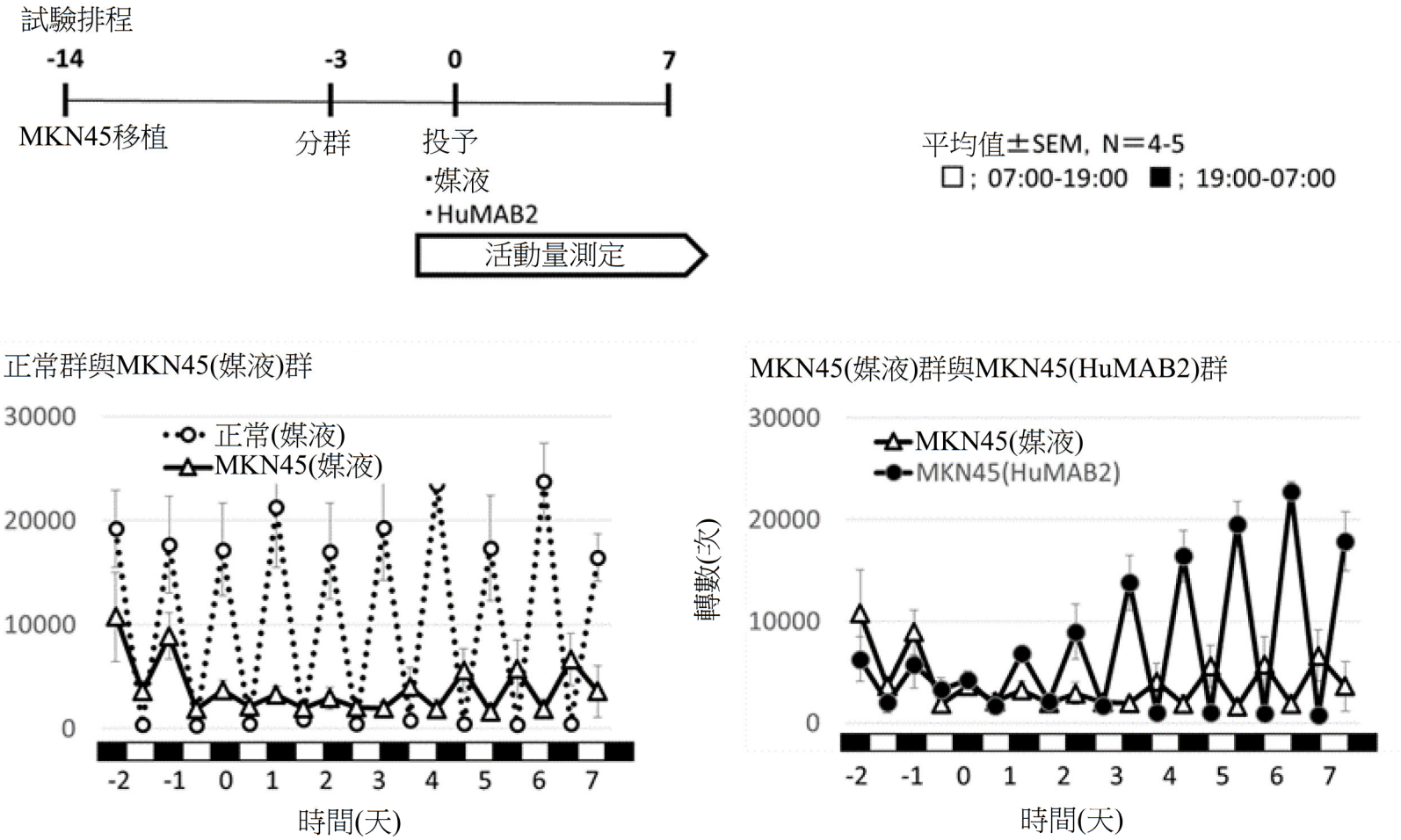

血中未結合GDF15
血中未結合GDF15濃度(pg/mL)
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
**
*
*
*
*
*
正常（媒液）
MKN45（媒液）
MKN45 (MAB17)
MKN45 (MAB957)
MKN45 (Hu01G06-127)
MKN45 (HuMAB2)
N=5 平均值 ±SEM, *P<0.05, **P<0.01

【圖7】

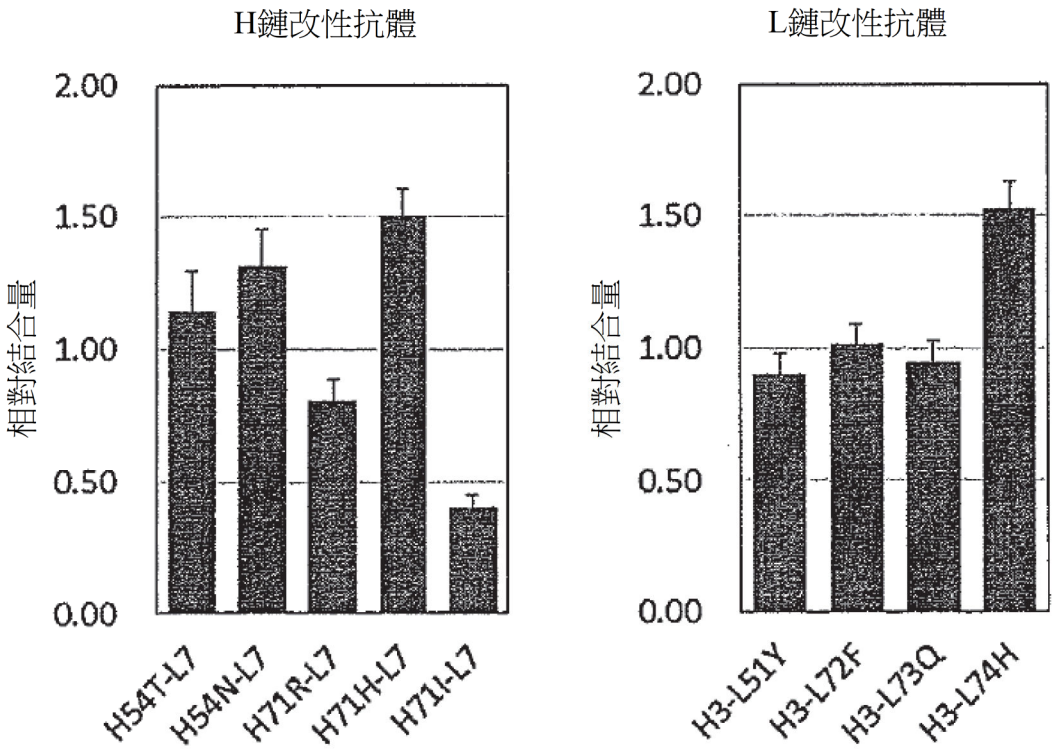


N=8,平均值±SEM, **P<0.01

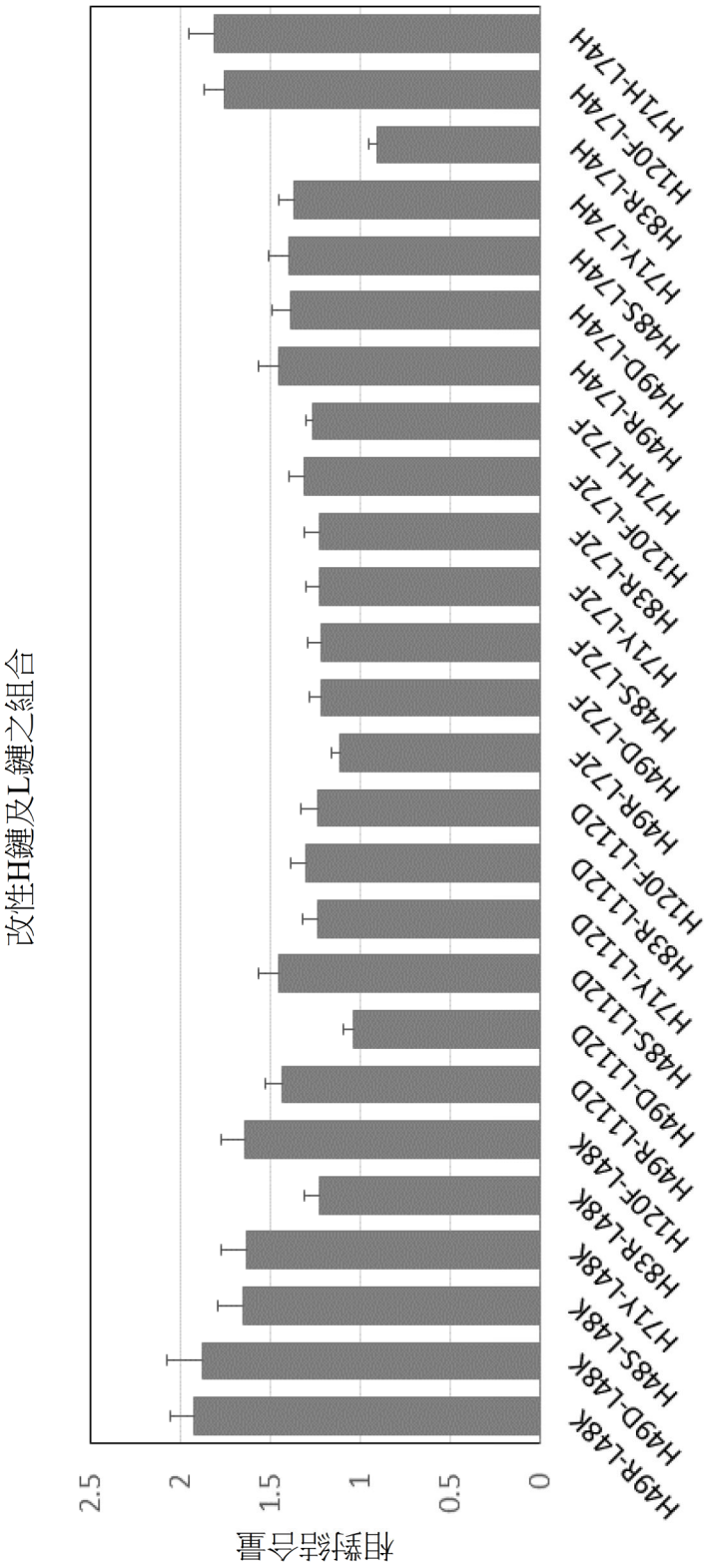
【圖8】


試驗排程
-14
-3
0
7
MKN45移植
分群
投予
•媒液
•HuMAB2
活動量測定
平均值±SEM，N＝4-5
□；07:00-19:00 ■；19:00-07:00
正常群與MKN45(媒液)群
正常(媒液)
MKN45(媒液)
轉數(次)
30000
20000
10000
0
-2 -1 0 1 2 3 4 5 6 7
時間(天)
MKN45(媒液)群與MKN45(HuMAB2)群
MKN45(媒液)
MKN45(HuMAB2)
轉數(次)
30000
20000
10000
0
-2 -1 0 1 2 3 4 5 6 7
時間(天)

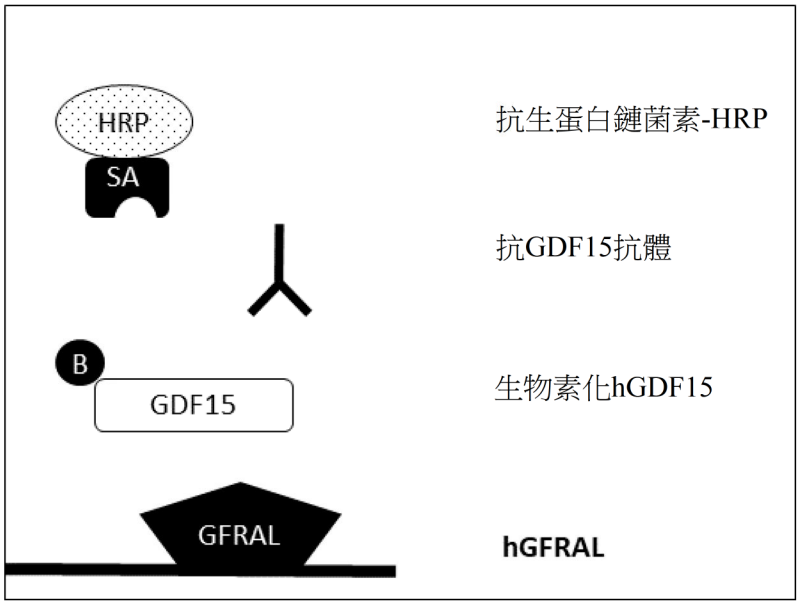
【圖9】


H鏈改性抗體
L鏈改性抗體
相對結合量
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
H54T-L7
H54N-L7
H71R-L7
H71H-L7
H71I-L7
H3-L51Y
H3-L72F
H3-L73Q
H3-L74H

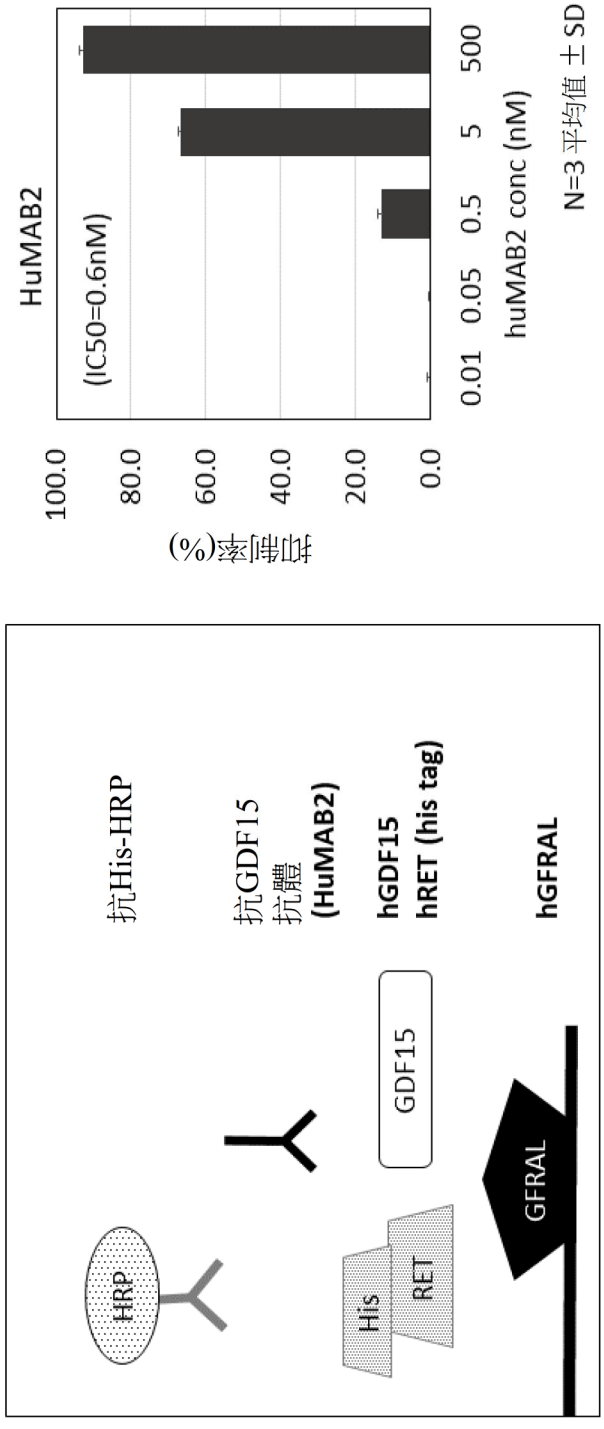
【圖10】


改性H鏈及L鏈之組合
相對結合量
0
0.5
1
1.5
2
2.5
H49R-L4K
H49D-L4K
H48S-L4K
H71Y-L4K
H83R-L4K
H120F-L4K
H49R-L112D
H49D-L112D
H48S-L112D
H71Y-L112D
H83R-L112D
H120F-L112D
H49R-L72F
H49D-L72F
H48S-L72F
H71Y-L72F
H83R-L72F
H120F-L72F
H71H-L72F
H49R-L74H
H49D-L74H
H48S-L74H
H71Y-L74H
H83R-L74H
H120F-L74H
H71H-L74H

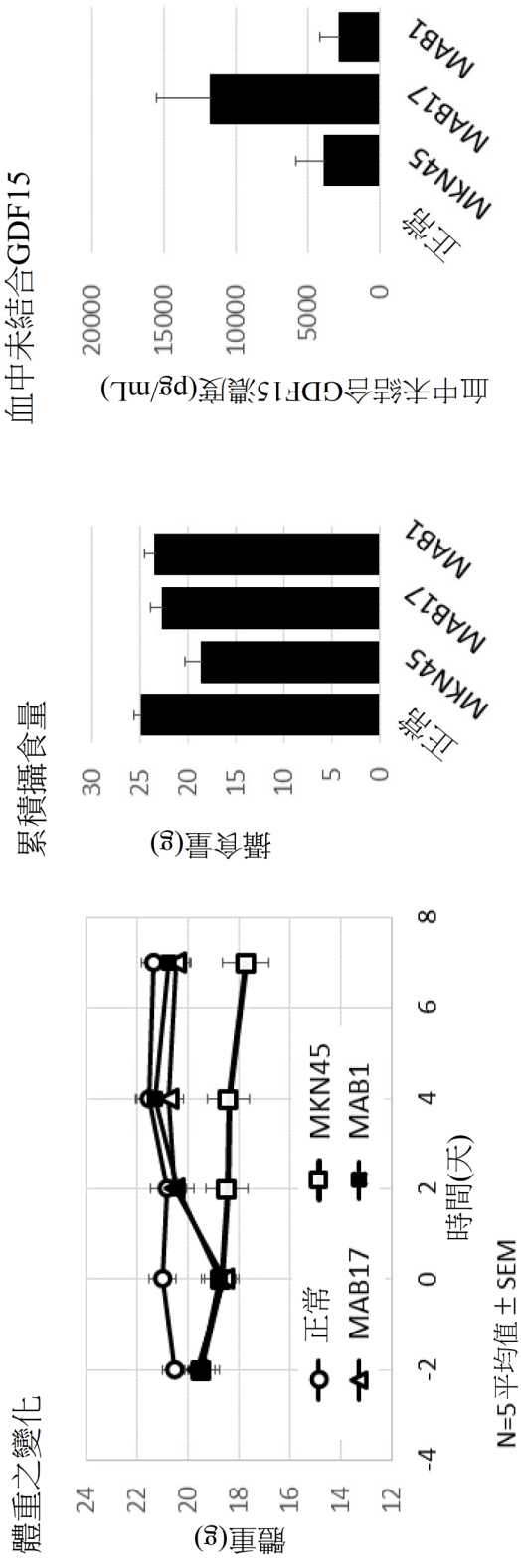
【圖11】


HRP
SA
抗生蛋白鏈菌素-HRP
抗GDF15抗體
B
GDF15
生物素化hGDF15
GFRAL
hGFRAL

【圖12】


抗His-HRP
抗GDF15
抗體
(HuMAB2)
hGDF15
hRET (his tag)
hGFRAL
HRP
GDF15
His
RET
GFRAL
抑制率(%)
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
HuMAB2
(IC50=0.6nM)
0.01
0.05
0.5
5
500
huMAB2 conc (nM)
N=3 平均值 ± SD

【圖13】


體重之變化
體重(g)
24
22
20
18
16
14
12
-4
-2
0
2
4
6
8
時間(天)
正常
MAB17
MKN45
MAB1
N=5平均值 ± SEM
累積攝食量
攝食量(g)
30
25
20
15
10
5
0
正常
MKN45
MAB17
MAB1
血中未結合GDF15
血中未結合GDF15濃度(pg/mL)
20000
15000
10000
5000
0
正常
MKN45
MAB17
MAB1

【圖14】