

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5484063号  
(P5484063)

(45) 発行日 平成26年5月7日(2014.5.7)

(24) 登録日 平成26年2月28日(2014.2.28)

(51) Int.Cl.

F 1

C07K	16/18	(2006.01)
A61K	39/395	(2006.01)
A61P	3/00	(2006.01)
A61P	3/06	(2006.01)
A61P	3/04	(2006.01)

C07K	16/18	Z N A
A61K	39/395	N
A61P	3/00	
A61P	3/06	
A61P	3/04	

請求項の数 32 (全 72 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2009-540313 (P2009-540313)
(86) (22) 出願日	平成19年12月6日 (2007.12.6)
(65) 公表番号	特表2010-512320 (P2010-512320A)
(43) 公表日	平成22年4月22日 (2010.4.22)
(86) 國際出願番号	PCT/US2007/025080
(87) 國際公開番号	W02008/073300
(87) 國際公開日	平成20年6月19日 (2008.6.19)
審査請求日	平成22年12月1日 (2010.12.1)
(31) 優先権主張番号	60/873,834
(32) 優先日	平成18年12月8日 (2006.12.8)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	500087671 レキシコン ファーマシューティカルズ インコーポレーテッド アメリカ合衆国 77381-1160 テキサス州、ザ ウッドランズ、テクノ ロジー フォレスト プレイス 8800
(74) 代理人	110000796 特許業務法人三枝国際特許事務所
(72) 発明者	リー、イー-チャン アメリカ合衆国 77382 テキサス州 , ザ ウッドランズ, ホワイト ウイング コート 3

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ANGPTL3に対するモノクローナル抗体

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ANGPTL3に結合し、かつANGPTL3の少なくとも1つの活性を中和するモノクローナル抗体であって、該モノクローナル抗体が配列番号10のアミノ酸配列を有するANGPTL3のSP1領域内のエピトープに結合する、抗体。

## 【請求項 2】

前記抗体が少なくとも1つの血清脂質のレベルをin vivoで減少させる、請求項1に記載のモノクローナル抗体。

## 【請求項 3】

少なくとも1つの血清脂質が、血清トリグリセリド、コレステロール、および遊離脂肪酸から選択される、請求項2に記載のモノクローナル抗体。 10

## 【請求項 4】

前記抗体が配列番号10のアミノ酸配列を有するペプチドに50 nM未満のK<sub>D</sub>で結合する、請求項1～3のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体。

## 【請求項 5】

前記抗体が配列番号10のアミノ酸配列を有するペプチドに30 nM未満のK<sub>D</sub>で結合する、請求項4に記載のモノクローナル抗体。

## 【請求項 6】

前記抗体が配列番号10のアミノ酸配列を有するペプチドに10 nM未満のK<sub>D</sub>で結合する、請求項5に記載のモノクローナル抗体。

10

20

**【請求項 7】**

前記抗体が配列番号10のアミノ酸配列を有するペプチドに5 nM未満のK<sub>D</sub>で結合する、請求項6に記載のモノクローナル抗体。

**【請求項 8】**

配列番号10のアミノ酸配列を有するペプチドに対する第1の親和性と、配列番号84、配列番号85、配列番号86、配列番号87、配列番号88、配列番号90、または配列番号92のアミノ酸配列を有するペプチドに対する第2の親和性を有し、第1の親和性が第2の親和性よりも少なくとも3倍強い、請求項1～3のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体。

**【請求項 9】**

前記第2の親和性が、配列番号85、配列番号86、配列番号87、配列番号88、または配列番号90に対するものである、請求項8に記載のモノクローナル抗体。 10

**【請求項 10】**

配列番号20のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号28のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む抗体と同じエピトープに特異的に結合する、請求項1～3のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体。

**【請求項 11】**

配列番号22のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号30のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む抗体と同じエピトープに特異的に結合する、請求項1～3のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体。

**【請求項 12】**

配列番号24のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号32のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む抗体と同じエピトープに特異的に結合する、請求項1～3のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体。 20

**【請求項 13】**

配列番号64のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号68のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む抗体と同じエピトープに特異的に結合する、請求項1～3のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体。

**【請求項 14】**

配列番号66のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号70のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む抗体と同じエピトープに特異的に結合する、請求項1～3のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体。 30

**【請求項 15】**

マウス抗体、ヒト化抗体、またはヒト抗体である、請求項1～14のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体。

**【請求項 16】**

前記抗体が配列番号20のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号28のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、請求項1～3のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体。

**【請求項 17】**

前記抗体が配列番号22のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号30のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、請求項1～3のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体。 40

**【請求項 18】**

前記抗体が配列番号24のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号32のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、請求項1～3のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体。

**【請求項 19】**

前記抗体が配列番号64のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号68のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、請求項1～3のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体。 50

**【請求項 2 0】**

前記抗体が配列番号66のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号70のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、請求項1～3のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体。

**【請求項 2 1】**

前記重鎖が配列番号35に示すCDR1、配列番号36に示すCDR2、および配列番号37に示すCDR3を含み、前記軽鎖が配列番号44に示すCDR1、配列番号45に示すCDR2、および配列番号46に示すCDR3を含む、請求項1～3のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体。

**【請求項 2 2】**

前記重鎖が配列番号38に示すCDR1、配列番号39に示すCDR2、および配列番号40に示すCDR3を含み、前記軽鎖が配列番号47に示すCDR1、配列番号48に示すCDR2、および配列番号49に示すCDR3を含む、請求項1～3のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体。 10

**【請求項 2 3】**

前記重鎖が配列番号41に示すCDR1、配列番号42に示すCDR2、および配列番号43に示すCDR3を含み、前記軽鎖が配列番号50に示すCDR1、配列番号51に示すCDR2、および配列番号52に示すCDR3を含む、請求項1～3のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体。

**【請求項 2 4】**

前記重鎖が配列番号53に示すCDR1、配列番号54に示すCDR2、および配列番号55に示すCDR3を含み、前記軽鎖が配列番号56に示すCDR1、配列番号57に示すCDR2、および配列番号58に示すCDR3を含む、請求項1～3のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体。 20

**【請求項 2 5】**

前記重鎖が配列番号71に示すCDR1、配列番号72に示すCDR2、および配列番号73に示すCDR3を含み、前記軽鎖が配列番号77に示すCDR1、配列番号78に示すCDR2、および配列番号79に示すCDR3を含む、請求項1～3のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体。

**【請求項 2 6】**

前記重鎖が配列番号74に示すCDR1、配列番号75に示すCDR2、および配列番号76に示すCDR3を含み、前記軽鎖が配列番号80に示すCDR1、配列番号81に示すCDR2、および配列番号82に示すCDR3を含む、請求項1～3のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体。

**【請求項 2 7】**

抗体フラグメントである、請求項1～26のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体。

30

**【請求項 2 8】**

前記抗体フラグメントがscFvフラグメント、Fabフラグメント、 $F(ab')フラグメント、またはFab'フラグメントである、請求項27に記載のモノクローナル抗体。$

**【請求項 2 9】**

請求項1～28のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体を含有する医薬組成物。

**【請求項 3 0】**

1以上の血清脂質のレベルを低下させるためのものである、請求項29に記載の医薬組成物。

**【請求項 3 1】**

脂質代謝障害の治療用である、請求項29に記載の医薬組成物。

40

**【請求項 3 2】**

前記脂質代謝障害が、高トリグリセリド血症、高コレステロール血症、肥満、メタボリックシンドローム、糖尿病、又は虚血性心疾患である、請求項31に記載の医薬組成物。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本願は2006年12月8日出願の米国仮出願番号60/873,834（如何なる目的でも参照により本明細書に組み入れられるものとする）の利益を主張する。

**【0002】****I . 技術分野**

50

アンジオポエチン様タンパク質3(ANGPTL3)に特異的に結合するモノクローナル抗体を提供する。アンジオポエチン様タンパク質3(ANGPTL3)に特異的に結合するモノクローナル抗体の使用方法を提供する。アンジオポエチン様タンパク質3(ANGPTL3)に特異的に結合するモノクローナル抗体を含有する医薬組成物を提供する。

【背景技術】

【0003】

III.序論

アンジオポエチン様タンパク質3(ANGPTL3)はいくつかの哺乳動物種の間で保存されている。Li, C. (2006) *Curr. Opin. Lipidol.* 17(2):152-156. ANGPTL3はN末端のコイルドコイルドメインとC末端のフィブリノーゲン様ドメインを含む。Conklin, D. ら(1999) *Genomics* 62:477-482。N末端のコイルドコイルドメインはANGPTL3のオリゴマー化を媒介する。Ge, H. ら(2005) *J. Lipid Res.* 46(7):1484-1490。オリゴマー化されたANGPTL3が*in vivo*でタンパク質加水分解プロセッシングを受けると、フィブリノーゲン様ドメインの切断が生じる。Ono M. ら(2003) *J. Biol. Chem.* 278(43):41804-41809。

10

【0004】

ANGPTL3は主に肝臓において発現される。Koishi, R. ら(2002) *Nat. Genet.* 30(2):151-157。ANGPTL3はリポタンパク質リパーゼ(LPL)活性を阻害すると考えられており、超低密度リポタンパク質(VLDL)クリアランスを減少させる。Shimizugawa T. ら(2002) *J. Biol. Chem.* 277(37):33742-33748。KK/San自然突然変異マウスはAngptl3遺伝子のエクソン6に挿入を有し、また著しい血清低リポタンパク血症を示す。Koishi ら(2002) *Nat. Genet.*, 30(2):151-157。ANGPTL3のアデノウイルス介発現またはANGPTL3の直接投与により、KK/Sanマウスの低リポタンパク血症が回復に向かった。Koishi ら(2002) *Nat. Genet.* 30(2):151-157。Angptl3ノックアウトマウスは、摂食雄マウスおよび摂食または絶食雌マウスにおいて減少したトリグリセリドレベルを有することが示されている。Koster, A. ら(2005) *Endocrinol.* 146:4943-4950。これらのマウスは、摂食および絶食の両方の雄マウスおよび雌マウスにおいて減少したコレステロールレベルを有することも示されている。Koster, A. ら(2005) *Endocrinol.* 146:4943-4950。Angptl3発現は、ストレプトゾトシン糖尿病マウス、db/dbマウス、およびob/dbマウスの両方において増加することが示されている。Inukai, K. ら(2004) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 317(4):10751079; Shimamura, M. ら(2004) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 322(3):1080-1085。

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Li, C. (2006) *Curr. Opin. Lipidol.* 17(2):152-156

【非特許文献2】Conklin, D. ら(1999) *Genomics* 62:477-482

【非特許文献3】Ge, H. ら(2005) *J. Lipid Res.* 46(7):1484-1490

【非特許文献4】Ono M. ら(2003) *J. Biol. Chem.* 278(43):41804-41809

【非特許文献5】Koishi, R. ら(2002) *Nat. Genet.* 30(2):151-157

【非特許文献6】Shimizugawa T. ら(2002) *J. Biol. Chem.* 277(37):33742-33748

【非特許文献7】Koster, A. ら(2005) *Endocrinol.* 146:4943-4950

40

【非特許文献8】Inukai, K. ら(2004) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 317(4):10751079

【非特許文献9】Shimamura, M. ら(2004) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 322(3):1080-1085

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

III.概要

ある実施形態においては、ANGPTL3に結合し、かつANGPTL3の少なくとも1つの活性を中和するモノクローナル抗体を提供する。ある実施形態においては、該モノクローナル抗体がマウスモノクローナル抗体である。ある実施形態においては、該モノクローナル抗体が

50

ヒト化モノクローナル抗体である。ある実施形態においては、該モノクローナル抗体がヒトモノクローナル抗体である。ある実施形態においては、該モノクローナル抗体がin vivoで少なくとも1つの血清脂質のレベルを低下させる。

#### 【0007】

ある実施形態においては、該モノクローナル抗体が配列番号59のアミノ酸配列を有するANGPTL3のエピトープに結合する。ある実施形態においては、該モノクローナル抗体が配列番号60のアミノ酸配列を有するANGPTL3のエピトープに結合する。ある実施形態においては、該モノクローナル抗体が配列番号9のアミノ酸配列を有するANGPTL3のエピトープに結合する。ある実施形態においては、該モノクローナル抗体が配列番号10のアミノ酸配列を有するANGPTL3のエピトープに結合する。

10

#### 【0008】

ある実施形態においては、該モノクローナル抗体が、配列番号20のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号28のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。ある実施形態においては、該モノクローナル抗体が、配列番号22のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号30のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。ある実施形態においては、該モノクローナル抗体が、配列番号24のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号32のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。ある実施形態においては、該モノクローナル抗体が、配列番号64のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号68のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。ある実施形態においては、該モノクローナル抗体が、配列番号66のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号70のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

20

#### 【0009】

ある実施形態においては、該モノクローナル抗体が抗体4.7.1と同じエピトープに特異的に結合する。ある実施形態においては、該モノクローナル抗体が抗体4.8.3と同じエピトープに特異的に結合する。ある実施形態においては、該モノクローナル抗体が抗体4.9.1と同じエピトープに特異的に結合する。ある実施形態においては、該モノクローナル抗体が抗体1.315.1と同じエピトープに特異的に結合する。ある実施形態においては、該モノクローナル抗体が抗体5.35と同じエピトープに特異的に結合する。ある実施形態においては、該モノクローナル抗体が抗体5.50と同じエピトープに特異的に結合する。

#### 【0010】

30

ある実施形態においては、該モノクローナル抗体が抗体フラグメントである。ある実施形態においては、該モノクローナル抗体がscFvフラグメントである。ある実施形態においては、該モノクローナル抗体がFabフラグメントである。ある実施形態においては、該モノクローナル抗体がF(ab')<sub>2</sub>フラグメントである。ある実施形態においては、該モノクローナル抗体がFab'フラグメントである。

#### 【0011】

ある実施形態においては、ANGPTL3に特異的に結合する、重鎖と軽鎖を含む単離された抗体を提供し、ここで該重鎖は、a)配列番号19～26および63～66のいずれか1つに示すアミノ酸配列；b)配列番号35、36、および37に示す少なくとも1つのアミノ酸配列；c)配列番号38、39、および40に示す少なくとも1つのアミノ酸配列；d)配列番号41、42、もしくは43に示す少なくとも1つのアミノ酸配列；e)配列番号53、54、および55に示す少なくとも1つのアミノ酸配列；f)配列番号71、72、および73に示す少なくとも1つのアミノ酸配列；またはg)配列番号74、75、および76に示す少なくとも1つのアミノ酸配列を含むものであり、そして該抗体はANGPTL3の少なくとも1つの活性を中和する。ある実施形態においては、該抗体の該重鎖が、配列番号35に示すCDR1、配列番号36に示すCDR2、および配列番号37に示すCDR3を含む。ある実施形態においては、該抗体の該重鎖が、配列番号38に示すCDR1、配列番号39に示すCDR2、および配列番号40に示すCDR3を含む。ある実施形態においては、該抗体の該重鎖が、配列番号41に示すCDR1、配列番号42に示すCDR2、および配列番号43に示すCDR3を含む。ある実施形態においては、該抗体の該重鎖が、配列番号53に示すCDR1、配列番号54に示すCDR2、および配列番号55に示すCDR3を含む。ある実施形態にお

40

50

いては、該抗体の該重鎖が、配列番号71に示すCDR1、配列番号72に示すCDR2、および配列番号73に示すCDR3を含む。ある実施形態においては、該抗体の該重鎖が、配列番号74に示すCDR1、配列番号75に示すCDR2、および配列番号76に示すCDR3を含む。

#### 【0012】

ある実施形態においては、ANGPTL3に特異的に結合する、重鎖と軽鎖を含む単離された抗体を提供し、ここで該重鎖は、a)配列番号19～26および63～66のいずれか1つに示すアミノ酸配列；b)配列番号35、36、および37に示す少なくとも1つのアミノ酸配列；c)配列番号38、39、および40に示す少なくとも1つのアミノ酸配列；d)配列番号41、42、または43に示す少なくとも1つのアミノ酸配列；e)配列番号53、54、および55に示す少なくとも1つのアミノ酸配列；f)配列番号71、72、および73に示す少なくとも1つのアミノ酸配列；あるいはg)配列番号74、75、および76に示す少なくとも1つのアミノ酸配列を含むものであり、そして該抗体はANGPTL3の少なくとも1つの活性を中和し、ここで該軽鎖はa)配列番号27～34および67～70のいずれか1つに示すアミノ酸配列；b)配列番号44、45、および46に示す少なくとも1つのアミノ酸配列；c)配列番号47、48、および49に示す少なくとも1つのアミノ酸配列；d)配列番号50、51、もしくは52に示す少なくとも1つのアミノ酸配列；e)配列番号56、57、および58に示す少なくとも1つのアミノ酸配列；f)配列番号77、78、および79に示す少なくとも1つのアミノ酸配列；またはg)配列番号80、81、および82に示す少なくとも1つのアミノ酸配列を含むものである。ある実施形態においては、該抗体の該重鎖が、配列番号35に示すCDR1、配列番号36に示すCDR2、および配列番号37に示すCDR3を含み、かつ該抗体の該軽鎖が、配列番号44に示すCDR1、配列番号45に示すCDR2、および配列番号46に示すCDR3を含む。ある実施形態においては、該抗体の該重鎖が、配列番号38に示すCDR1、配列番号39に示すCDR2、および配列番号40に示すCDR3を含み、かつ該抗体の該軽鎖が、配列番号47に示すCDR1、配列番号48に示すCDR2、および配列番号49に示すCDR3を含む。ある実施形態においては、該抗体の該重鎖が、配列番号41に示すCDR1、配列番号42に示すCDR2、および配列番号43に示すCDR3を含み、かつ該抗体の該軽鎖が、配列番号50に示すCDR1、配列番号51に示すCDR2、および配列番号52に示すCDR3を含む。ある実施形態においては、該抗体の該重鎖が、配列番号53に示すCDR1、配列番号54に示すCDR2、および配列番号55に示すCDR3を含み、かつ該抗体の該軽鎖が、配列番号56に示すCDR1、配列番号57に示すCDR2、および配列番号58に示すCDR3を含む。ある実施形態においては、該抗体の該重鎖が、配列番号71に示すCDR1、配列番号72に示すCDR2、および配列番号73に示すCDR3を含み、かつ該抗体の該軽鎖が、配列番号77に示すCDR1、配列番号78に示すCDR2、および配列番号79に示すCDR3を含む。ある実施形態においては、該抗体の該重鎖が、配列番号74に示すCDR1、配列番号75に示すCDR2、および配列番号76に示すCDR3を含み、かつ該抗体の該軽鎖が、配列番号80に示すCDR1、配列番号81に示すCDR2、および配列番号82に示すCDR3を含む。

#### 【0013】

ある実施形態においては、ANGPTL3に特異的に結合する、重鎖と軽鎖を含む単離された抗体を提供し、ここで該軽鎖は、a)配列番号27～34および67～70のいずれか1つに示すアミノ酸配列；b)配列番号44、45、および46に示す少なくとも1つのアミノ酸配列；c)配列番号47、48、および49に示す少なくとも1つのアミノ酸配列；d)配列番号50、51、もしくは52に示す少なくとも1つのアミノ酸配列；e)配列番号56、57、および58に示す少なくとも1つのアミノ酸配列；f)配列番号77、78、および79に示す少なくとも1つのアミノ酸配列；またはg)配列番号80、81、および82に示す少なくとも1つのアミノ酸配列を含むものであり、そして該抗体はANGPTL3の少なくとも1つの活性を中和する。ある実施形態においては、該抗体の該軽鎖が、配列番号44に示すCDR1、配列番号45に示すCDR2、および配列番号46に示すCDR3を含む。ある実施形態においては、該抗体の該軽鎖が、配列番号47に示すCDR1、配列番号48に示すCDR2、および配列番号49に示すCDR3を含む。ある実施形態においては、該軽鎖が、配列番号50に示すCDR1、配列番号51に示すCDR2、および配列番号52に示すCDR3を含む。ある実施形態においては、該軽鎖が、配列番号56に示すCDR1、配列番号57に示すCDR2、および配列番号58に示すCDR3を含む。ある実施形態においては、該軽鎖が、

、配列番号77に示すCDR1、配列番号78に示すCDR2、および配列番号79に示すCDR3を含む。ある実施形態においては、該軽鎖が、配列番号80に示すCDR1、配列番号81に示すCDR2、および配列番号82に示すCDR3を含む。

#### 【0014】

ある実施形態においては、ANGPTL3に結合し、かつANGPTL3の少なくとも1つの活性を中和するモノクローナル抗体を提供し、ここで配列番号9のアミノ酸配列を有するペプチドに対する該抗体の親和性は、配列番号84、配列番号85、配列番号86、配列番号87、配列番号88、配列番号90、および配列番号92のいずれか1つに示すアミノ酸配列を有するペプチドに対する該抗体の親和性よりも少なくとも3倍高い。ある実施形態においては、配列番号9のアミノ酸配列を有するペプチドに対する該抗体の親和性が、配列番号85、配列番号86、配列番号87、配列番号88、および配列番号90のそれぞれに対する該抗体の親和性よりも少なくとも3倍高い。ある実施形態においては、ANGPTL3に結合し、かつANGPTL3の少なくとも1つの活性を中和するモノクローナル抗体を提供し、ここで該抗体は、配列番号9のアミノ酸配列を有するペプチドに50 nM未満のK<sub>D</sub>で結合する。ある実施形態においては、該抗体が、配列番号9のアミノ酸配列を有するペプチドに30 nM未満のK<sub>D</sub>で結合する。ある実施形態においては、該抗体が、配列番号9のアミノ酸配列を有するペプチドに10 nM未満のK<sub>D</sub>で結合する。ある実施形態においては、該抗体が、配列番号9のアミノ酸配列を有するペプチドに5 nM未満のK<sub>D</sub>で結合する。

10

#### 【0015】

ある実施形態においては、上記抗体を含有する医薬組成物を提供する。ある実施形態においては、脂質代謝障害の治療方法を提供し、該方法は有効量の該医薬組成物を患者に投与することを含む。ある実施形態においては、1以上の血清脂質のレベルを減少させる方法を提供し、該方法は有効量の該医薬組成物を患者に投与することを含む。ある実施形態においては、高トリグリセリド血症の治療方法を提供し、該方法は有効量の該医薬組成物を患者に投与することを含む。ある実施形態においては、高コレステロール血症の治療方法を提供し、該方法は有効量の該医薬組成物を患者に投与することを含む。ある実施形態においては、肥満の治療方法を提供し、該方法は有効量の該医薬組成物を患者に投与することを含む。ある実施形態においては、糖尿病の治療方法を提供し、該方法は有効量の該医薬組成物を患者に投与することを含む。ある実施形態においては、虚血性心疾患の治療方法を提供し、該方法は有効量の該医薬組成物を患者に投与することを含む。ある実施形態においては、メタボリックシンドロームの治療方法を提供し、該方法は有効量の該医薬組成物を患者に投与することを含んでなる。

20

#### 【0016】

### IV. 図面の簡単な説明

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0017】

【図1】抗体1.315.1、4.7.1、4.8.3、4.9.1、および対照抗体抗KLHの注射の4日後のマウスの摂食時および絶食時血清トリグリセリドレベルを示す。これは実施例Jに記載の通りである。

【図2】抗体1.315.1、4.7.1、4.8.3、4.9.1、および対照抗体抗KLHの注射の4日後のマウスの摂食時および絶食時血清コレステロールレベルを示す。これは実施例Jに記載の通りである。

30

【図3】抗ANGPTL3抗体4.8.3、抗ANGPTL4抗体14D12、および対照抗体抗KLHの注射の4日後のマウスの摂食時および絶食時血清トリグリセリドレベルを示す。これは実施例Jに記載の通りである。

【図4】抗ANGPTL3抗体4.8.3、抗ANGPTL4抗体14D12、および対照抗体抗KLHの注射の4日後のマウスの摂食時および絶食時血清コレステロールレベルを示す。これは実施例Jに記載の通りである。

【図5】抗ANGPTL3抗体4.7.1、4.8.3、4.9.1、抗ANGPTL4抗体14D12、および対照抗体抗KLHの注射の4日後のマウスの摂食時および絶食時血清トリグリセリドレベルを示す。これは

40

50

実施例Jに記載の通りである。

【図6】抗ANGPTL3抗体4.7.1、4.8.3、4.9.1、抗ANGPTL4抗体14D12、および対照抗体抗KLHの注射の4日後のマウスの摂食時および絶食時血清コレステロールレベルを示す。これは実施例Jに記載の通りである。

【図7】抗体1.125.1、1.132.1、1.173.2、1.315.1、1.424.1、1.431.1、および対照抗体抗KLHの注射の4日後(上図)および8日後(下図)のマウスの摂食時および絶食時血清トリグリセリドレベルを示す。これは実施例Jに記載の通りである。

【図8】種々の用量のAd5-hAngptl3Tウイルスまたは $2 \times 10^9$  vpの対照ウイルスの注射後のマウスの血清トリグリセリドレベルを示す。これは実施例Bに記載の通りである。

【図9】抗体4.1.1、4.4.1、4.6.3、4.7.1、4.8.1、4.8.2、4.8.3、および4.9.1の、ANGPTL3 SP1、ANGPTL3T、および対照タンパク質BTS324への結合を示す。これは実施例Hに記載の通りである。  
10

【図10】抗体4.7.1(配列番号19)、4.8.3(配列番号21)、および4.9.1(配列番号23)の重鎖可変領域のアライメントを示す。重鎖コンセンサス配列(配列番号25)、ならびにシグナルペプチド(SP)、フレームワーク領域1(FWR1)、相補性決定領域1(CDR1)、フレームワーク領域2(FWR2)、相補性決定領域2(CDR2)、フレームワーク領域3(FWR3)、相補性決定領域3(CDR3)、およびフレームワーク領域4(FWR4)に対応する重鎖配列の領域も示す。

【図11】抗体4.7.1(配列番号27)、4.8.3(配列番号29)、および4.9.1(配列番号31)の軽鎖可変領域のアライメントを示す。軽鎖コンセンサス配列(配列番号33)、ならびにシグナルペプチド(SP)、フレームワーク領域1(FWR1)、相補性決定領域1(CDR1)、フレームワーク領域2(FWR2)、相補性決定領域2(CDR2)、フレームワーク領域3(FWR3)、相補性決定領域3(CDR3)、およびフレームワーク領域4(FWR4)に対応する軽鎖配列の領域も示す。  
20

【図12】マウスモノクローナル抗ANGPTL3抗体4.9.1、4.8.3、1.315.1、4.7.1、および1.173.2で処理した後のin vitroにおけるLPL活性を示す。これは実施例Lに記載の通りである。

【図13】特定のマウスモノクローナル抗ANGPTL3抗体のin vivo薬物動態を示す。これは実施例Nに記載の通りである。

【図14】抗体4.7.1、4.8.3、4.9.1、5.35、および5.50のSP1ペプチドのアラニン - スキヤニング突然変異体への結合を示す。これは実施例Hに記載の通りである。

【図15】抗体5.35または5.50の注射の4日後(上図)および7日後(下図)のマウスの血清トリグリセリドレベルを示す。これは実施例Jに記載の通りである。  
30

【図16】抗体5.35または5.50の注射の4日後(上図)および7日後(下図)のマウスの血清コレステロールレベルを示す。これは実施例Jに記載の通りである。

【図17】抗体5.35 および5.50のin vivo薬物動態を示す。これは実施例Nに記載の通りである。

【図18】抗体4.7.1、4.9.1、5.35、および5.50のin vivo薬物動態を示す。これは実施例Nに記載の通りである。

【図19】抗体5.35および5.50ならびに対照抗体抗KLHを注射したApoEマウスの血清トリグリセリドおよび血清コレステロールの減少を示す。

【発明を実施するための形態】

【0018】

#### V. 各種の実施形態の詳細な説明

本明細書において、単数形の使用は、特に断らないかぎり、複数形を含むものとする。本明細書において、「1つ」(aまたはan)という語は、特に断らないかぎり、「少なくとも1つ」を意味する。本明細書において、「または」の使用は、特に断らないかぎり、「および/または」を意味する。さらに、「含む」および他のその活用形の使用は、制限的ではない。また、「要素」または「成分」のような用語は、特に断らないかぎり、1ユニットを含む要素または成分と、2ユニット以上を含む要素または成分との両方を包含する。

【0019】

10

20

30

40

50

本明細書で用いるセクションの見出しあは、単に構成上の目的のためであり、そこに記載する主題を制限するものと解釈されるべきでない。本明細書に引用する全ての文献または文献の一部(特許、特許出願、論文、書物、専門書を含むが、これらに限らない)は、あらゆる目的のためにその全体を参照により本明細書に組み入れるものとする。組み込んだ文献および同様の資料がある用語を定義しており、それが本明細書中で定義するその用語と矛盾する場合には、本明細書が優先する。

#### 【0020】

##### A. 定義

「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」という用語は、アミノ酸残基の重合体をさすために、本明細書では互換的に使用される。これらの用語は、天然のアミノ酸を含むアミノ酸重合体だけでなく、1個または複数のアミノ酸残基が、対応する天然アミノ酸の人工的な化学類似体であるアミノ酸重合体にも当てはまる。<sup>10</sup> アミノ酸の重合体はどのような長さのものであってもよい。

#### 【0021】

本明細書で用いる「抗体」とは、完全な抗体または抗体フラグメント(抗原との結合について完全な抗体と競合する)をさす。抗体フラグメントには、限定するものではないが、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、scFv、Fd、ダイアボディ(diabodies)、および完全な抗体の可変領域の少なくとも一部を保持する他の抗体フラグメントが含まれる。例えば、Hudsonら (2003) Nat. Med. 9:129-134を参照されたい。ある実施形態では、抗体フラグメントが完全な抗体の酵素的または化学的切断により作製される。ある実施形態では、抗体フラグメントが組換えDNA法により作製される。<sup>20</sup>

#### 【0022】

「天然のポリペプチド」とは、自然界に存在するポリペプチドをさす。「天然の抗体」とは、自然界に存在する抗体をさす。

#### 【0023】

「モノクローナル抗体」とは、同一のエピトープに特異的に結合する、実質的に均一な抗体集団からの抗体をさす。ある実施形態では、モノクローナル抗体はハイブリドーマにより分泌される。そのような特定の実施形態では、ハイブリドーマを当業者に公知の方法により作製する。例えば、Kohler and Milstein (1975) Nature, 256: 495-499を参照されたい。ある実施形態では、モノクローナル抗体は組換えDNA法を用いて作製される。例えば、米国特許第4.8.16,567号を参照されたい。ある実施形態では、モノクローナル抗体は、ファージディスプレイライブリーから単離される抗体フラグメントをさす(例えば、Clacksonら (1991) Nature 352: 624-628、およびMarksら (1991) J. Mol. Biol. 222: 581-597を参照されたい)。種々の他のモノクローナル抗体作製技術については、例えばHarlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)を参照されたい。<sup>30</sup>

#### 【0024】

「キメラ」抗体とは、少なくとも2つの異なる供給源に由来する成分から構成された抗体をさす。ある実施形態において、キメラ抗体は、第1の生物種由来の抗体の一部を、別の分子(例えば、第2の生物種由来の抗体の一部)に融合させたものを含んでなる。このような特定の実施形態において、キメラ抗体は、ヒト由来の抗体の一部に融合された、非ヒト動物由来の抗体の一部を含んでなる。このような特定の実施形態において、キメラ抗体は、ヒト由来の抗体の定常領域に融合された、非ヒト動物由来の抗体の可変領域の全部または一部を含んでなる。<sup>40</sup>

#### 【0025】

「ヒト化」抗体とは、それがヒト抗体に(アミノ酸配列の点で)よりぴったりとマッチするように改変されている非ヒト抗体をさす。したがって、ヒト化抗体はキメラ抗体の1種である。ある実施形態においては、非ヒト抗体の可変領域の抗原結合残基以外のアミノ酸残基が改変される。ある実施形態において、ヒト化抗体を構築するには、ヒト抗体の相補性決定領域(CDR)の全部または一部を、所望の抗原結合特異性を有する別の抗体(例えば、<sup>50</sup>

非ヒト抗体)由来のCDRの全部または一部と置き換える。ある実施形態では、ヒト化抗体は、そのCDRの全部または実質的に全部が非ヒト抗体のCDRに一致し、かつフレームワーク領域(FR)の全部または実質的に全部がヒト抗体のFRに一致する可変領域を含んでなる。ある実施形態では、ヒト化抗体がヒト抗体の定常領域(Fc)をさらに含んでなる。

#### 【0026】

「ヒト抗体」とは、ヒト抗体配列を含み、非ヒト動物由来の抗体配列を含まないモノクローナル抗体をさす。ある実施形態において、ヒト抗体は天然の抗体には見出せない合成配列を含んでいてもよい。この用語は、抗体が作られる様式によって制限されない。例えば、各種の実施形態では、ヒト抗体はトランスジェニックマウスにおいて、ファージディスプレイにより、ヒトBリンパ球により、または組換え法により作製しうる。

10

#### 【0027】

「中和抗体」または「中和する抗体」とは、その抗体が特異的に結合するエピトープを含むポリペプチドの少なくとも1つの活性を低下させる抗体をさす。ある実施形態では、中和抗体がin vitroおよび/またはin vivoで活性を低下させる。

#### 【0028】

「抗原結合部位」とは、抗原に特異的に結合することができる抗体の部分をさす。ある実施形態では、抗原結合部位は抗体の1つまたは複数の可変領域により提供される。

#### 【0029】

「エピトープ」とは、免疫グロブリンまたはT細胞受容体に特異的に結合することができるポリペプチド決定基をさす。ある実施形態において、エピトープは抗体が特異的に結合する抗原の領域である。ある実施形態では、エピトープはアミノ酸、糖側鎖、ホスホリル、またはスルホニル基のような分子の化学的に活性な表面基群を含みうる。ある実施形態では、エピトープは特定の三次元構造特性(例えば、「立体配座」エピトープ)および/または特定の電荷特性を備えている。

20

#### 【0030】

特定の抗体が2つのエピトープに特異的に結合する場合、1つのエピトープはもう1つのエピトープと「同一」であると規定される。ある実施形態では、異なる一次アミノ酸配列を有するポリペプチドが同一のエピトープを含む可能性がある。ある実施形態では、同一のエピトープが異なる一次アミノ酸配列をもつ可能性がある。異なる抗体が同一のエピトープへの結合について競合する場合に、それらの異なる抗体は同一のエピトープに結合すると言える。

30

#### 【0031】

ある抗体がタンパク質および/または巨大分子の複雑な混合物中のある抗原を選択的に認識する場合、該抗体は該抗原と「特異的に結合する」。ある実施形態において、抗体は特定のエピトープに特異的に結合する抗原結合部位を含む。そのような特定の実施形態では、異なる抗原がその特定のエピトープを含むかぎり、その抗体は異なる抗原に結合することができる。例えば、ある場合に、異なる生物種由来の同種タンパク質は同一のエピトープを含みうる。ある実施形態において解離定数( $K_D$ )が $\leq 1 \mu M$ であるとき、ある実施形態において解離定数( $K_D$ )が $\leq 100nM$ であるとき、また、ある実施形態において解離定数( $K_D$ )が $\leq 10nM$ であるとき、抗体は抗原に特異的に結合すると言える。

40

#### 【0032】

「ANGPTL3」とは、別途特定しないかぎり、任意の脊椎動物または哺乳動物起源(ヒト、ウシ、ニワトリ、げっ歯類、マウス、ラット、ブタ、ヒツジ、靈長類、サル、モルモットを含むが、これらに限らない)由来のアミノ酸配列を有するangiopoietin-like protein 3をさす。この用語はまた、天然のANGPTL3の少なくとも1つのin vivoまたはin vitro活性を保持する天然のANGPTL3の断片および変異体をさす。この用語は、ANGPTL3の全長のプロセッシングされていない前駆体型、ならびにシグナルペプチドの翻訳後切断により生じる成熟型およびフィブリノーゲンドメインのタンパク質加水分解プロセッシングにより生じる型を包含する。ある実施形態において、全長のプロセッシングされていないマウスANGPTL3は配列番号1(Genbankアクセスション番号NP\_038

50

941)に示すアミノ酸配列を有する。ある実施形態において、全長のプロセッシングされていないヒトANGPTL3は配列番号3(Genbankアクセション番号NP\_055310)に示すアミノ酸配列を有する。

**【 0 0 3 3 】**

「Angptl3」はANGPTL3をコードする核酸をさす。

**【 0 0 3 4 】**

「LPL」とは、任意の脊椎動物または哺乳動物起源(ヒト、ウシ、ニワトリ、げっ歯類、マウス、ラット、ブタ、ヒツジ、靈長類、サル、モルモットを含むが、これらに限らない)由来のアミノ酸配列を有するリポタンパク質リバーゼをさす。ある実施形態において、リポタンパク質リバーゼは、キロミクロンや超低密度リポタンパク質(VLDL)中のトリアシルグリセロールをジアシルグリセロールと遊離の脂肪酸アニオンとに加水分解することを触媒する。ある実施形態では、リポタンパク質リバーゼはジアシルグリセロールを加水分解することもできる。10

**【 0 0 3 5 】**

「作用物質」とは、化合物、化合物の混合物、生物学的巨大分子、または生物学的材料から得られる抽出物をさす。

**【 0 0 3 6 】**

「ANGPTL3のアンタゴニスト」とは、ANGPTL3の活性を低下させる作用物質をさす。

**【 0 0 3 7 】**

「ANGPTL3のアゴニスト」とは、ANGPTL3の活性を増加させる作用物質をさす。20

**【 0 0 3 8 】**

「患者」とは、ヒトおよび動物の被験者を含む。ある実施形態において、患者は哺乳動物である。ある実施形態において、患者はヒトである。

**【 0 0 3 9 】**

基準ポリペプチドの「断片」とは、その基準ポリペプチドのいずれかの部分からのアミノ酸の連続した広がりをさす。断片は基準ポリペプチドの長さよりも短いどのような長さのものであってもよい。

**【 0 0 4 0 】**

基準ポリペプチドの「変異体」とは、その基準ポリペプチドに対して1以上のアミノ酸置換、欠失、または挿入を有するポリペプチドをさす。30

**【 0 0 4 1 】**

「保存的」アミノ酸置換とは、ポリペプチド中のアミノ酸を、サイズや電荷のような性質が類似している別のアミノ酸で置換することをいう。ある実施形態では、保存的アミノ酸置換を有するポリペプチドは未置換ポリペプチドの少なくとも1つの活性を保持する。保存的アミノ酸置換は、天然に存在しないアミノ酸残基を含んでいてもよく、一般には、かかる非天然アミノ酸残基は生物学的系での合成ではなく化学的ペプチド合成により組み込まれる。これらには、限定するものではないが、ペプチド模倣体、およびアミノ酸成分の他の逆転または反転形態が含まれる。

**【 0 0 4 2 】**

その天然残基は、共通の側鎖の性質に基づいていくつかのクラスに分類される：40

- 1) 疎水性： ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile;
- 2) 中性親水性： Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;
- 3) 酸性： Asp、Glu;
- 4) 塩基性： His、Lys、Arg;
- 5) 鎌の配向に影響を与える残基： Gly、Pro;
- 6) 芳香族： Trp、Tyr、Phe。

**【 0 0 4 3 】**

例えば、非保存的置換は、これらのクラスの1つのメンバーを別のクラスからのメンバーと交換することを含む。そのような置換残基は非ヒト抗体と相同なヒト抗体の領域、または該分子の非相同領域に導入することができる。50

## 【0044】

置換を行う際には、ある実施形態によれば、アミノ酸のハイドロパシー値を考慮してもよい。各アミノ酸はその疎水性と電荷特性に基づいてハイドロパシー値を割り当てられている。それらは次のとおりである：イソロイシン(+4.5)；バリン(+4.2)；ロイシン(+3.8)；フェニルアラニン(+2.8)；システイン/シスチン(+2.5)；メチオニン(+1.9)；アラニン(+1.8)；グリシン(-0.4)；トレオニン(-0.7)；セリン(-0.8)；トリプトファン(-0.9)；チロシン(-1.3)；プロリン(-1.6)；ヒスチジン(-3.2)；グルタミン酸(-3.5)；グルタミン(-3.5)；アスパラギン酸(-3.5)；アスパラギン(-3.5)；リシン(-3.9)；およびアルギニン(-4.5)。

## 【0045】

10

タンパク質に相互作用型生物学的機能を付与する上でのアミノ酸のハイドロパシー値の重要なことは、いくつかの場合において、当技術分野で理解されている。Kyteら, J. Mol. Biol., 157:105-131 (1982)。ある場合には、特定のアミノ酸を同様のハイドロパシー値またはスコアをもつ他のアミノ酸で置換しても、依然として同様の生物学的活性を保持することが知られている。ハイドロパシー値に基づいて変更する場合、ある実施形態では、ハイドロパシー値が $\pm 2$ 以内にあるアミノ酸同士の置換が含まれる。ある実施形態では、 $\pm 1$ 以内にあるものが、またある実施形態では、 $\pm 0.5$ 以内にあるものが含まれる。

## 【0046】

また、当技術分野では、類似アミノ酸同士の置換を親水性に基づいて効果的に行うことができるとしても理解されており、特に、こうして作られた生物学的に機能性のタンパク質またはペプチドが本発明の場合のように免疫学的実施形態での使用を目的としている場合にはそうである。ある実施形態では、タンパク質の最大局所平均親水性(その隣接アミノ酸の親水性に左右される)はその免疫原性と抗原性(すなわち、そのタンパク質の生物学的性質)に相関する。

20

## 【0047】

以下の親水性値がこれらのアミノ酸残基に割り当てられている：アルギニン(+3.0)；リシン(+3.0)；アスパラギン酸(+3.0 ± 1)；グルタミン酸(+3.0 ± 1)；セリン(+0.3)；アスパラギン(+0.2)；グルタミン(+0.2)；グリシン(0)；トレオニン(-0.4)；プロリン(-0.5 ± 1)；アラニン(-0.5)；ヒスチジン(-0.5)；システイン(-1.0)；メチオニン(-1.3)；バリン(-1.5)；ロイシン(-1.8)；イソロイシン(-1.8)；チロシン(-2.3)；フェニルアラニン(-2.5) およびトリプトファン(-3.4)。類似の親水性値に基づいて変更する場合、ある実施形態では、親水性値が $\pm 2$ 以内にあるアミノ酸同士の置換が含まれる。ある実施形態では、 $\pm 1$ 以内にあるものが、またある実施形態では、 $\pm 0.5$ 以内にあるものが含まれる。また、一次アミノ酸配列から親水性に基づいてエピトープを同定することもできる。これらの領域は「エピトープコア領域」とも呼ばれている。アミノ酸置換の例を表1に示す。

30

## 【0048】

アミノ酸置換の例を以下の表1に示す。

## 【表1】

表1：アミノ酸置換

もとの残基	置換の例
Ala	Val, Leu, Ile
Arg	Lys, Gln, Asn
Asn	Gln
Asp	Glu
Cys	Ser, Ala
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro, Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, ノルロイシン
Leu	ノルロイシン, Ile, Val, Met, Ala, Phe
Lys	Arg, 1,4ジアミノ酪酸, Gln, Asn
Met	Leu, Phe, Ile
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr
Pro	Ala
Ser	Thr, Ala, Cys
Thr	Ser
Trp	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, ノルロイシン

10

20

30

## 【0049】

当業者は、本明細書に記載のペプチドの適当な変異体を、周知の技術を用いて確認することができるだろう。ある実施形態において、当業者であれば、活性にとって重要ではないと考えられる領域を標的とすることによって、活性を破壊することなく変更しうる分子の適当な領域を同定できよう。ある実施形態では、類似のポリペプチド間で保存されている分子の残基および部分を同定することができる。ある実施形態では、生物学的活性または構造にとって重要である領域でさえも、生物学的活性を破壊したりポリペプチドの構造に有害な影響を及ぼしたりすることなく、保存的アミノ酸置換に付すことができる。

## 【0050】

さらに、ある実施形態において、当業者は、類似のポリペプチドにおいて活性や構造に重要な意味をもつ残基を同定するための構造・機能研究を検討してもよい。このような比較から、ある実施形態では、タンパク質中のアミノ酸残基(類似のタンパク質において活性や構造に重要であるアミノ酸残基に相当する)の重要性を予測することができる。ある実施形態では、当業者であれば、そのような予測された重要なアミノ酸残基に代えて化学的に類似したアミノ酸による置換を選ぶことができる。

## 【0051】

ある実施形態においては、当業者は、類似のポリペプチドにおいて三次元構造およびその構造に関係するアミノ酸配列を解析することもできる。ある実施形態では、そのような情報を考慮して、その三次元構造に関して抗体のアミノ酸残基の整列を予測しうる。ある実施形態では、タンパク質の表面に存在すると予想されるアミノ酸残基に対して過激な変

40

50

更を行わないように選択する。なぜならば、そうした残基は他の分子との重要な相互作用に関与している可能性があるからである。さらに、ある実施形態においては、それぞれの所望のアミノ酸残基に单一のアミノ酸置換を含む試験変異体を作製することができる。続いて、ある実施形態では、当業者に公知の活性アッセイを用いてこれらの変異体をスクリーニングする。ある実施形態では、かかる変異体が適当な変異体についての情報を集めるために使用されるだろう。例えば、ある実施形態において、特定のアミノ酸残基への変更が破壊された、望ましくないほどに低下した、または不適当な活性をもたらすことが判明したならば、そのような変更のある変異体を回避しうる。言い換えれば、ある実施形態においては、こうしたルーチンな実験から集めた情報に基づいて、当業者は、さらなる置換が単独でまたは他の変異との組合せで回避されねばならないアミノ酸を容易に決定することができる。

10

#### 【0052】

多くの科学文献が二次構造の予測をテーマとしている。例えば、Moult J., Curr. Opin. Biotechnol. (1996) 7(4):422-427; Chouら, (1974) Biochemistry, 13(2):222-245; Chouら, (1974) Biochemistry 13(2):211-222; Chouら, (1978); Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 47:45-148; Chouら, (1976) Ann. Rev. Biochem. 47:251-27 および Chouら, (1979) Biophys. J. 26:367-384を参照されたい。さらに、二次構造の予測を支援するために現在ではコンピュータプログラムが利用可能である。二次構造を予測する方法の1つは、ホモロジーモデリング(ホモロジーモデリング(homology modeling))に基づくものである。例えば、30%を上回る配列同一性、または40%を超える類似性を有する2つのポリペプチドまたはタンパク質は類似した構造トポロジーをもつことが多い。タンパク質構造のデータベース(PDB)の発達により、ポリペプチド構造内の折りたたみの潜在数を含めた二次構造の予測可能性が向上した。例えば、Holmら, (1999) Nucl. Acid. Res. 27(1):244-247を参照されたい。所定のポリペプチドまたはタンパク質には限られた数の折りたたみが存在すること、また、ひとたび臨界数の構造が解明されると、構造予測は劇的により精確になることが提案されている (Brennerら, (1997) Curr. Op. Struct. Biol. 7(3):369-376)。

20

#### 【0053】

二次構造を予測する別の方には、「スレッディング」(threading)(例えば、Jones, D. , (1997) Curr. Opin. Struct. Biol. 7(3):377-387; Sipplら, (1996) Structure 4(1):15-19を参照)、「プロファイル解析」(例えば、Bowieら, (1991) Science 253:164-170; Gribskovら, (1990) Meth. Enzym. 183:146-159; Gribskovら, (1987) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 84(13):4355-4358を参照)、および「進化的連関」(evolutionary linkage)(例えば、Holmら, (1999) Nucl. Acid. Res. 27(1):244-247、およびBrennerら, (1997) Curr. Op. Struct. Biol. 7(3):369-376 (1997)を参照)が含まれる。

30

#### 【0054】

ある実施形態において、基準抗体の変異体には、グリコシル化部位の数および/またはタイプが基準抗体のアミノ酸配列に対して改変されているグリコシル化変異体が含まれる。ある実施形態では、ポリペプチドの変異体は天然のポリペプチドよりも多数または少數のN-結合型グリコシル化部位を含む。N-結合型グリコシル化部位は配列Asn-X-SerまたはAsn-X-Thrにより特徴づけられ、ここでXにより示されるアミノ酸残基はプロリン以外の任意のアミノ酸残基でありうる。この配列を生み出すアミノ酸残基の置換は、N-結合型糖鎖の付加のための新しい潜在的部位をもたらす。これとは別に、前記配列を排除する置換は既存のN-結合型糖鎖を除去することになる。ある実施形態では、N-結合型糖鎖の再配列が行われ、この場合には1以上のN-結合型グリコシル化部位(一般的には天然に存在する部位)が除かれて、1以上の新しいN-結合型部位が作り出される。抗体変異体の例としてシステイン変異体が挙げられるが、かかる変異体では1個以上のシステイン残基が基準抗体のアミノ酸配列から欠失されるか、または別のアミノ酸(例えば、セリン)に置換される。ある実施形態において、システイン変異体は、抗体を生物学的に活性な立体構造にリフォールディングしなければならない場合(例えば、不溶性の封入体を単離した後など)に有用

40

50

でありうる。ある実施形態では、システイン変異体が天然のポリペプチドより少数のシステイン残基を有する。ある実施形態では、システイン変異体が対になつてないシステインから生じる相互作用を最小限にするために偶数のシステイン残基を有する。

#### 【0055】

ある実施形態によれば、アミノ酸置換は、(1)タンパク質加水分解に対する感受性を低減させるもの、(2)酸化に対する感受性を低減させるもの、(3)タンパク質複合体を形成するための結合親和性を改変するもの、(4)結合親和性を改変するもの、および/または(5)そのようなポリペプチドに他の物理化学的性質または機能的性質を付与するもしくは修飾するものである。ある実施形態によれば、単一または複数のアミノ酸置換(ある実施形態では、保存的アミノ酸置換)を天然に存在する配列(ある実施形態では、分子間接触を形成するドメインの外側のポリペプチド部分)において行うことができる。ある実施形態において、保存的アミノ酸置換は、典型的には、基準配列の構造的特徴を実質的に変えないものである(例えば、ある実施形態では、置換用アミノ酸は基準配列に生じるヘリックスを破壊したり、基準配列に特徴的な他のタイプの二次構造を破壊したりするようなものであつてはならない)。当技術分野で認められているポリペプチド二次および三次構造の例は、例えば、Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton編, W. H. Freeman and Company, New York (1984)); Introduction to Protein Structure (C. Branden and J. Tooze編, Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); およびThornton, J.M ら(1991) Nature 354:105-106に記載されている。

#### 【0056】

核酸配列に関する「同一性パーセント」または「同一性%」は、Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)エンジンを用いてアライメントさせた少なくとも2つのポリヌクレオチド配列間の同一のヌクレオチドのパーセンテージをさす。Tatusovaら (1999) FEMS Microbiol. Lett. 174:247-250を参照されたい。BLASTエンジン(バージョン2.2.10)は、National Center for Biotechnology Information (NCBI)(Bethesda, MD)から一般公開されている。2つのポリヌクレオチド配列をアライメントさせるためには、「Blast 2 Sequences」ツールが用いられ、これは次のようなデフォルト値のパラメーターセットで「blastn」プログラムを利用する：

Matrix: 適用せず

Reward for match: 1

Penalty for mismatch: -2

Open gap: 5ペナルティ

Extension gap: 2ペナルティ

Gap\_x dropoff: 50

Expect: 10.0

Word size: 11

Filter: on

ポリペプチド配列に関する「同一性パーセント」または「同一性%」は、Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)エンジンを用いてアライメントさせた少なくとも2つのポリペプチド配列間の同一アミノ酸のパーセンテージをさす。Tatusovaら (1999) FEMS Microbiol. Lett. 174:247-250を参照されたい。BLASTエンジン(バージョン2.2.10)は、National Center for Biotechnology Information (NCBI)(Bethesda, MD)から一般公開されている。2つのポリペプチド配列をアライメントさせるためには、「Blast 2 Sequences」ツールが用いられ、これは次のようなデフォルト値のパラメーターセットで「blastp」プログラムを利用する：

Matrix: BLOSUM62

Open gap: 11ペナルティ

Extension gap: 1ペナルティ

Gap\_x dropoff: 50

Expect: 10.0

10

20

30

40

50

Word size: 3

Filter: on

「有効用量」または「有効量」とは、患者の症状の軽減をもたらすかまたは所望の生物学的成果をもたらす薬剤(例えば、中和抗体)の量をさす。ある実施形態において、有効用量または有効量は、ANGPTL3の少なくとも1つの活性を低下させるのに十分な量である。ある実施形態では、有効用量または有効量が以下の第V部のGに記載するとおりに決定される。

#### 【0057】

「治療」という用語は、特に断らないかぎり、治療的処置と予防的/防止的処置の両方を包含する。治療が必要な個体には、限定するものではないが、特定の症状もしくは障害を既に有する個体だけでなく、特定の症状もしくは障害を被るリスクのある個体(例えば、予防的/防止的処置が必要な個体)も含まれる。「治療する」なる用語は、治療的および/または予防的/防止的目的のために患者に薬剤を投与することを意味する。

#### 【0058】

「治療剤」とは、治療効果および/または予防効果をもたらすためにin vivo投与される薬剤をさす。

#### 【0059】

「治療用抗体」とは、治療効果および/または予防効果をもたらすためにin vivo投与される抗体をさす。

#### 【0060】

「単離された核酸」および「単離されたポリヌクレオチド」という用語は、互換的に用いられる。典型的な単離されたポリヌクレオチドとしては、ゲノムDNA、RNA、cDNA、合成DNAもしくはRNAまたはその任意の組合せが挙げられるがそれらに限定されない。「単離されたポリヌクレオチド」は、(1)「単離されたポリヌクレオチド」が自然界で見出されるポリヌクレオチドの全部もしくは一部と会合していない、(2)それが自然界では結合していないポリヌクレオチドに結合している、または(3)自然界でより大きな配列の一部として存在しないものである。

#### 【0061】

### B. 天然抗体および特定の抗体フラグメントの構造

天然抗体は通常、四量体構造をとる。四量体は通常、2つの同一のポリペプチド鎖対を有し、それぞれの対は1つの軽鎖(特定の実施形態では、約25 kDa)と1つの重鎖(特定の実施形態では、約50~70 kDa)とを有する。天然抗体では、重鎖は可変領域、V<sub>H</sub>、ならびに3つの定常領域、C<sub>H</sub>1、C<sub>H</sub>2、およびC<sub>H</sub>3を有する。V<sub>H</sub>ドメインは重鎖のアミノ末端にあり、C<sub>H</sub>3ドメインはカルボキシ末端にある。天然抗体では、軽鎖は可変領域、V<sub>L</sub>、および定常領域、C<sub>L</sub>を有する。軽鎖の可変領域は軽鎖のアミノ末端にある。天然抗体では、それぞれの軽鎖/重鎖対の可変領域が通常、抗原結合部位を形成する。定常領域は通常、エフェクター機能に関与する。

#### 【0062】

天然のヒト軽鎖は通常、カッパおよびラムダ軽鎖に分類される。天然のヒト重鎖は通常、ミュー、デルタ、ガンマ、アルファ、またはイプシロンに分類され、抗体のアイソタイプをそれぞれIgM、IgD、IgG、IgA、およびIgEと定義する。IgGは、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4を含むがそれらに限定されないサブクラスを有する。IgMは、IgM1およびIgM2を含むがそれらに限定されないサブクラスを有する。IgAは、IgA1およびIgA2を含むがそれらに限定されないサブクラスを有する。天然のヒト軽鎖および重鎖では、可変領域と定常領域は通常、約12個またはそれ以上のアミノ酸の「J」領域によって連結され、重鎖はまた約10個以上のアミノ酸の「D」領域を含む。例えば、Fundamental Immunology (1989) Ch. 7(Paul, W., 編、第二版Raven Press, N.Y.)を参照されたい。

#### 【0063】

天然抗体では、可変領域は通常、比較的保存性の高いフレームワーク領域(FR)が相補性決定領域(CDR)とも呼ばれる3つの超可変領域によって連結されているという同一の一般

10

20

30

40

50

構造を示す。それぞれの対の 2 つの鎖に由来するCDRは通常、フレームワーク領域によつて整列され、それが特異的なエピトープへの結合を可能にしうる。N末端からC末端に向かって、軽鎖と重鎖の両可変領域は通常、ドメインFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3およびFR4を有する。重鎖のCDRはH1、H2、およびH3と呼ばれ、一方、軽鎖のCDRはL1、L2、およびL3と呼ばれる。通常、CDR3が抗原結合部位の中で最大の分子多様性の源である。例えば、特定の場合、H3は2アミノ酸残基の短さであり得、または26以上であり得る。各ドメインに対するアミノ酸の割り当ては通常、Kabatら(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Publication No. 91-3242, vols. 1-3, Bethesda, MD); Chothia, C.およびLesk, A.M. (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917; またはChothia, C.らNature 342:878-883 (1989)の定義に従う。本明細書において「CDR」という用語は、別途規定されない限り、軽鎖または重鎖のいずれかに由来するCDRを指す。10

#### 【 0 0 6 4 】

「Fab」フラグメントは、1つの軽鎖ならびに1つの重鎖のC<sub>H</sub>1および可変領域を有する。Fab分子の重鎖は、別の重鎖分子とジスルフィド結合を形成できない。「Fab'」フラグメントは、1つの軽鎖およびC<sub>H</sub>1とC<sub>H</sub>2ドメインとの間に伸びている更なる定常領域を含む1つの重鎖を有する。Fab' フラグメントの2つの重鎖の間で鎖間ジスルフィド結合が形成され、「F(ab')<sub>2</sub>」分子が形成されうる。

#### 【 0 0 6 5 】

「Fv」フラグメントは、重鎖と軽鎖の両方に由来する可変領域を有するが、定常領域を欠いている。一本鎖Fv(scFv)フラグメントは、柔軟性のあるリンカーによって連結された重鎖および軽鎖可変領域を有し、抗原結合領域を有する単一ポリペプチド鎖を形成する。典型的な一本鎖抗体はWO 88/01649ならびに米国特許第4,946,778号および第5,260,203号において詳細に議論される。場合によっては、Fvより低い親和性ではあるが、単独の可変領域(すなわち、重鎖可変領域または軽鎖可変領域)が、抗原を認識して結合する能力を持ちうる。20

#### 【 0 0 6 6 】

本明細書において使用される場合、「重鎖」という用語は、単独でまたは軽鎖とともに抗原特異性を与えるのに十分な重鎖可変領域配列を有するポリペプチドを指す。

#### 【 0 0 6 7 】

本明細書において使用される場合、「軽鎖」という用語は、単独でまたは重鎖とともに抗原特異性を与えるのに十分な軽鎖可変領域配列を有するポリペプチドを指す。30

#### 【 0 0 6 8 】

#### C. 特定の抗体

特定の実施形態では、ANGPTL3に特異的に結合するモノクローナル抗体が提供される。このような特定の実施形態では、モノクローナル抗体は、in vivoおよび/またはin vitroにおいてANGPTL3の少なくとも1つの活性を低下させる中和モノクローナル抗体である。

#### 【 0 0 6 9 】

特定の実施形態では、ANGPTL3に対する中和モノクローナル抗体は、in vivoにおいて少なくとも1つの血清脂質レベルを低下させる。特定の実施形態では、ANGPTL3に対する中和モノクローナル抗体は、in vivoにおいて血清トリグリセリドレベルを低下させる。特定の実施形態では、中和モノクローナル抗体は、in vivoにおいて総コレステロールレベルを低下させる。特定の実施形態では、ANGPTL3に対する中和モノクローナル抗体は、in vivoにおいて遊離脂肪酸(FFA)レベルを低下させる。特定の実施形態では、ANGPTL3に対する中和モノクローナル抗体は、in vivoにおいてそれらのレベルのうち少なくとも2つを低下させる。特定の実施形態では、ANGPTL3に対する中和モノクローナル抗体は、in vivoにおいてそれらのレベルのうち少なくとも3つを低下させる。40

#### 【 0 0 7 0 】

特定の実施形態では、ANGPTL3に対する中和モノクローナル抗体は、in vivoにおいてLD<sub>50</sub>ノックアウトマウスの血清トリグリセリドを低下させる。特定の実施形態では、ANGPTL50

3に対する中和モノクローナル抗体は、*in vivo*においてLDL<sub>r</sub>ノックアウトマウスの総コレステロールを低下させる。特定の実施形態では、ANGPTL3に対する中和モノクローナル抗体は、*in vivo*においてApoEノックアウトマウスの血清トリグリセリドを低下させる。特定の実施形態では、ANGPTL3に対する中和モノクローナル抗体は、*in vivo*においてApoEノックアウトマウスの総コレステロールを低下させる。特定の実施形態では、ANGPTL3に対する中和モノクローナル抗体は、*in vivo*においてdb/dbマウスの血清トリグリセリドを低下させる。特定の実施形態では、ANGPTL3に対する中和モノクローナル抗体は、*in vivo*においてdb/dbマウスの総コレステロールを低下させる。

#### 【0071】

特定の実施形態では、マウスANGPTL3に特異的に結合する中和モノクローナル抗体が提供される。特定の実施形態では、ヒトANGPTL3に特異的に結合する中和モノクローナル抗体が提供される。特定の実施形態では、異なる種に由来するANGPTL3中の同一のエピトープに特異的に結合する中和モノクローナル抗体(すなわち、交差反応性を示す抗体)が提供される。このような特定の実施形態では、抗体はマウスANGPTL3とヒトANGPTL3との両方に特異的に結合する。

#### 【0072】

特定の実施形態では、ANGPTL3のN末端のコイルドコイルドメイン内のエピトープに特異的に結合する中和モノクローナル抗体が提供される。特定の実施形態では、マウスANGPTL3のN末端のコイルドコイルドメイン内のエピトープに特異的に結合する中和モノクローナル抗体が提供される。特定の実施形態では、中和モノクローナル抗体は、マウスANGPTL3の配列番号1の残基17～残基240(配列番号59)の領域内のエピトープに特異的に結合する。特定の実施形態では、中和モノクローナル抗体は、マウスANGPTL3の配列番号1の残基32～残基57(配列番号9)のSP1領域に特異的に結合する。特定の実施形態では、中和モノクローナル抗体は、配列番号1のアミノ酸34～37および40(配列番号9のアミノ酸3～6および9)を含むマウスANGPTL3のSP1領域内のエピトープに特異的に結合する。特定の実施形態では、中和モノクローナル抗体は、配列番号1のアミノ酸33～37および40(配列番号9のアミノ酸2～6および9)を含むマウスANGPTL3のSP1領域内のエピトープに特異的に結合する。特定の実施形態では、中和モノクローナル抗体は、配列番号1のアミノ酸34～37、40、および42(配列番号9のアミノ酸3～6、9、および11)を含むマウスANGPTL3のSP1領域内のエピトープに特異的に結合する。特定の実施形態では、中和モノクローナル抗体は、配列番号1のアミノ酸34～37および40～42(配列番号9のアミノ酸3～6および9～11)を含むマウスANGPTL3のSP1領域内のエピトープに特異的に結合する。

#### 【0073】

特定の実施形態では、ヒトANGPTL3のN末端のコイルドコイルドメイン内のエピトープに特異的に結合する中和モノクローナル抗体が提供される。特定の実施形態では、中和モノクローナル抗体は、ヒトANGPTL3の配列番号3の残基20～残基143(配列番号60)の領域内のエピトープに特異的に結合する。特定の実施形態では、中和モノクローナル抗体は、ヒトANGPTL3の配列番号3の残基32～残基57(配列番号10)のSP1領域に特異的に結合する。特定の実施形態では、中和モノクローナル抗体は、配列番号3のアミノ酸34～37および40(配列番号10のアミノ酸3～6および9)を含むマウスANGPTL3のSP1領域内のエピトープに特異的に結合する。特定の実施形態では、中和モノクローナル抗体は、配列番号3のアミノ酸33～37および40(配列番号10のアミノ酸2～6および9)を含むマウスANGPTL3のSP1領域内のエピトープに特異的に結合する。特定の実施形態では、中和モノクローナル抗体は、配列番号3のアミノ酸34～37、40、および42(配列番号10のアミノ酸3～6、9、および11)を含むマウスANGPTL3のSP1領域内のエピトープに特異的に結合する。特定の実施形態では、中和モノクローナル抗体は、配列番号3のアミノ酸34～37および40～42(配列番号10のアミノ酸3～6および9～11)を含むマウスANGPTL3のSP1領域内のエピトープに特異的に結合する。

#### 【0074】

各種の実施形態では、中和モノクローナル抗体は、該中和モノクローナル抗体が配列番号84、配列番号85、配列番号86、配列番号87、配列番号88、配列番号90、および配列番号

10

20

30

40

50

92のいずれか1つのアミノ酸配列を有するペプチドに結合するよりも少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも7倍、または少なくとも10倍高い親和性で、配列番号9のアミノ酸配列を有するペプチドに結合する。各種の実施形態では、中和モノクローナル抗体は、該中和モノクローナル抗体が配列番号84、配列番号85、配列番号86、配列番号87、配列番号88、配列番号90、および配列番号92のそれぞれに結合するよりも少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも7倍、または少なくとも10倍高い親和性で、配列番号9のアミノ酸配列を有するペプチドに結合する。特定の実施形態では、親和性は実施例H(2)に記載されるようにして決定される。

## 【0075】

10

特定の実施形態では、中和モノクローナル抗体は非ヒトモノクローナル抗体である。そのような特定の実施形態では、中和モノクローナル抗体はげっ歯類のモノクローナル抗体である。そのような特定の実施形態では、中和モノクローナル抗体はマウスモノクローナル抗体である。特定の実施形態では、中和モノクローナル抗体はキメラモノクローナル抗体である。特定の実施形態では、中和モノクローナル抗体はヒト化モノクローナル抗体である。特定の実施形態では、中和モノクローナル抗体はヒトモノクローナル抗体である。特定の実施形態において、キメラ、ヒト化、および/またはヒトモノクローナル抗体は、ヒトの治療抗体として有用である。

## 【0076】

20

特定の実施形態では、中和モノクローナル抗体は抗体フラグメントである。典型的な抗体フラグメントとしては、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、scFv、Fd、ダイアボディ(diabody)、および他の抗体フラグメントが挙げられるがそれらに限定されない。

## 【0077】

30

各種の実施形態では、中和モノクローナル抗体は、ヒトANGPTL3と、1 μM未満、500 nM未満、300 nM未満、200 nM未満、100 nM未満、75 nM未満、50 nM未満、30 nM未満、25 nM未満、20 nM未満、15 nM未満、10 nM未満、5 nM未満、4 nM未満、3 nM未満、または2 nM未満のK<sub>D</sub>で結合する。各種の実施形態では、中和モノクローナル抗体は、ヒトSP1ペプチドと、1 μM未満、500 nM未満、300 nM未満、200 nM未満、100 nM未満、75 nM未満、50 nM未満、30 nM未満、25 nM未満、20 nM未満、15 nM未満、10 nM未満、5 nM未満、4 nM未満、3 nM未満、または2 nMのK<sub>D</sub>で結合する。各種の実施形態では、中和モノクローナル抗体は、配列番号9のアミノ酸配列を有するペプチドと、1 μM未満、500 nM未満、300 nM未満、200 nM未満、100 nM未満、75 nM未満、50 nM未満、30 nM未満、25 nM未満、20 nM未満、15 nM未満、10 nM未満、5 nM未満、4 nM未満、3 nM未満、または2 nM未満のK<sub>D</sub>で結合する。各種の実施形態では、中和モノクローナル抗体は、配列番号10のアミノ酸配列を有するペプチドと、1 μM未満、500 nM未満、300 nM未満、200 nM未満、100 nM未満、75 nM未満、50 nM未満、30 nM未満、25 nM未満、20 nM未満、15 nM未満、10 nM未満、5 nM未満、4 nM未満、3 nM未満、または2 nM未満のK<sub>D</sub>で結合する。

## 【0078】

40

各種の実施形態では、ANGPTL3に対する中和モノクローナル抗体は、マウスANGPTL4(配列番号107)に結合するよりも少なくとも10倍高い親和性、少なくとも15倍高い親和性、少なくとも20倍高い親和性、少なくとも25倍高い親和性、少なくとも30倍高い親和性、少なくとも40倍高い親和性、少なくとも50倍高い親和性、少なくとも100倍高い親和性、または少なくとも200倍高い親和性で、マウスANGPTL3(配列番号1)に結合する。各種の実施形態では、ANGPTL3に対する中和モノクローナル抗体は、ヒトANGPTL4(配列番号108)に結合するよりも少なくとも10倍高い親和性、少なくとも15倍高い親和性、少なくとも20倍高い親和性、少なくとも25倍高い親和性、少なくとも30倍高い親和性、少なくとも40倍高い親和性、少なくとも50倍高い親和性、少なくとも100倍高い親和性、または少なくとも200倍高い親和性で、ヒトANGPTL3(配列番号3)に結合する。各種の実施形態では、ANGPTL3に対する中和モノクローナル抗体は、マウスANGPTL4 SP1領域のアミノ酸配列(配列番号109)を有するペプチドに結合するよりも少なくとも10倍高い親和性、少なくとも15倍高い親和性

50

、少なくとも20倍高い親和性、少なくとも25倍高い親和性、少なくとも30倍高い親和性、少なくとも40倍高い親和性、少なくとも50倍高い親和性、少なくとも100倍高い親和性、または少なくとも200倍高い親和性で、マウスANGPTL3 SP1領域のアミノ酸配列(配列番号9)を有するペプチドに結合する。各種の実施形態では、ANGPTL3に対する中和モノクローナル抗体は、ヒトANGPTL4 SP1領域のアミノ酸配列(配列番号110)を有するペプチドに結合するよりも少なくとも10倍高い親和性、少なくとも15倍高い親和性、少なくとも20倍高い親和性、少なくとも25倍高い親和性、少なくとも30倍高い親和性、少なくとも40倍高い親和性、少なくとも50倍高い親和性、少なくとも100倍高い親和性、または少なくとも200倍高い親和性で、ヒトANGPTL3 SP1領域のアミノ酸配列(配列番号10)を有するペプチドに結合する。

10

#### 【0079】

4.7.1、4.8.3、4.9.1、1.315.1、5.35、および5.50と称される代表的な中和モノクローナル抗体が提供される。抗体4.7.1、4.8.3、4.9.1、5.35、および5.50は、マウスANGPTL3またはヒトANGPTL3の残基32～57(配列番号9および10)内のエピトープに結合する。特定の実施形態では、抗体4.7.1および4.9.1は、配列番号2または配列番号3のアミノ酸33～37および40(配列番号9または配列番号10のアミノ酸2～6および9)を含むマウスANGPTL3またはヒトANGPTL3のSP1領域内のエピトープに結合する。特定の実施形態では、抗体5.35および5.50は、配列番号2または配列番号3のアミノ酸34～37および40～42(配列番号9または配列番号10のアミノ酸3～6および9～11)を含むマウスANGPTL3またはヒトANGPTL3のSP1領域内のエピトープに結合する。特定の実施形態では、抗体4.8.3は、配列番号2または配列番号3のアミノ酸34～37、40、および42(配列番号9または配列番号10のアミノ酸3～6、9、および11)を含むマウスANGPTL3またはヒトANGPTL3のSP1領域内のエピトープに結合する。抗体1.315.1は、マウスANGPTL3の残基42～116(配列番号61)内のエピトープに結合する。

20

#### 【0080】

抗体4.7.1、4.8.3、4.9.1、1.315.1、5.35、および5.50は、少なくとも1つのANGPTL3活性を中和する。したがって、抗体4.7.1、4.8.3、4.9.1、1.315.1、5.35、および5.50(例えば、ヒトまたはマウスANGPTL3のどちらか)の少なくとも1つが結合するエピトープに結合する抗体も中和活性を有することが期待される。ANGPTL3に対する特定の中和モノクローナル抗体は、配列番号9、10、12、13、および61から選択される1つ以上のペプチドに結合するANGPTL3に対する特定の中和モノクローナル抗体は、配列番号9および10から選択される1つ以上のペプチドに結合する。特定の実施形態では、ANGPTL3に対する中和モノクローナル抗体は、配列番号61の配列を有するペプチドに結合する。特定の実施形態では、ANGPTL3に対する中和モノクローナル抗体は、配列番号12の配列を有するペプチドおよび配列番号13の配列を有するペプチドに結合する。

30

#### 【0081】

特定の実施形態では、モノクローナル抗体4.7.1が結合するのと同じエピトープに結合する中和モノクローナル抗体が提供される。特定の実施形態では、モノクローナル抗体4.8.3が結合するのと同じエピトープに結合する中和モノクローナル抗体が提供される。特定の実施形態では、モノクローナル抗体4.9.1が結合するのと同じエピトープに結合する中和モノクローナル抗体が提供される。特定の実施形態では、モノクローナル抗体5.35が結合するのと同じエピトープに結合する中和モノクローナル抗体が提供される。特定の実施形態では、モノクローナル抗体5.50が結合するのと同じエピトープに結合する中和モノクローナル抗体が提供される。特定の実施形態では、モノクローナル抗体1.315.1が結合するのと同じエピトープに結合する中和モノクローナル抗体が提供される。

40

#### 【0082】

特定の中和抗体は、配列番号20に示すアミノ酸配列を有する重鎖を含む。特定の中和抗体は、配列番号22に示すアミノ酸配列を有する重鎖を含む。特定の中和抗体は、配列番号24に示すアミノ酸配列を有する重鎖を含む。特定の中和抗体は、配列番号28に示すアミノ酸配列を有する軽鎖を含む。特定の中和抗体は、配列番号30に示すアミノ酸配列を有する軽鎖を含む。特定の中和抗体は、配列番号32に示すアミノ酸配列を有する軽鎖を含む。

50

## 【0083】

特定の中和抗体は、配列番号20に示すアミノ酸配列を有する重鎖と配列番号28に示すアミノ酸配列を有する軽鎖とを含む。特定の中和抗体は、配列番号22に示すアミノ酸配列を有する重鎖と配列番号30に示すアミノ酸配列を有する軽鎖とを含む。特定の中和抗体は、配列番号24に示すアミノ酸配列を有する重鎖と配列番号32に示すアミノ酸配列を有する軽鎖とを含む。

## 【0084】

## 1. キメラ化およびヒト化モノクローナル抗体

特定の実施形態では、非ヒト抗体はキメラ化される。特定の実施形態では、ヒトANGPTL3に特異的に結合するマウスモノクローナル抗体がキメラ化される。キメラ抗体を作製するための特定の代表的な方法は、例えば、Morrisonら(1984) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 81:6851-6855; Neubergerら(1984) Nature 312:604-608; Takedaら(1985) Nature 314:452-454; ならびに米国特許第6,075,181号および第5,877,397号において提供される。10

## 【0085】

特定の実施形態では、非ヒト抗体は「ヒト化」される。特定の実施形態では、ヒトANGPTL3に特異的に結合するマウスモノクローナル抗体がヒト化される。特定の実施形態では、マウスANGPTL3に対して誘導されたが、ヒトANGPTL3に特異的に結合する(すなわち、交差反応する)マウスモノクローナル抗体がヒト化される。特定の実施形態では、ヒト化抗体は、ヒトに投与した場合、それらの結合特異性を保持したまま、免疫原性が低下している(例えば、ヒト抗マウス抗体(HAMA)反応が低下している)。特定の実施形態では、ヒト化は、下記に詳述されるような、CDRグラフトおよび人間工学を含むがそれらに限定されない方法によって達成される。20

## 【0086】

ヒト化抗体の特定の実施形態では、望ましい結合特異性を有する抗体(「ドナー」抗体)の軽鎖および重鎖可変領域に由来する1つ以上の相補性決定領域(CDR)が、「アクセプター」抗体のヒトフレームワーク領域(FR)にグラフトされる。代表的なCDRグラフトは、例えば、米国特許第6,180,370号、第5,693,762号、第5,693,761号、第5,585,089号、および第5,530,101号; Queenら(1989) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 86:10029-10033に記載される。特定の実施形態では、軽鎖および重鎖可変領域に由来する1つ以上のCDRは、アクセプター抗体のコンセンサスヒトFRにグラフトされる。コンセンサスヒトFRを作成するために、特定の実施形態では、いくつかのヒト重鎖または軽鎖アミノ酸配列に由来するFRをアライメントしてコンセンサスアミノ酸配列を同定する。30

## 【0087】

特定の実施形態では、アクセプター抗体中の特定のFRアミノ酸は、ドナー抗体由来のFRアミノ酸と置換される。このような特定の実施形態では、ドナー抗体由来のFRアミノ酸は、標的抗原に対するドナー抗体の親和性に寄与するアミノ酸である。例えば、米国特許第6,180,370号、第5,693,762号、第5,693,761号、第5,585,089号、および第5,530,101; Queenら(1989) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:10029-10033を参照されたい。特定の実施形態では、ドナーおよび/またはアクセプター抗体をモデリングして、抗原への結合に関与すると思われる残基および/または抗原結合部位の構造に寄与すると思われる残基を同定し、FR残基などの、ドナー抗体において置換されるべき残基の選択を支援するために、コンピュータープログラムが用いられる。40

## 【0088】

特定の実施形態では、ドナー抗体由来のCDRが、ヒト定常領域を有するアクセプター抗体にグラフトされる。このような特定の実施形態では、FRもまたアクセプターにグラフトされる。特定の実施形態では、ドナー抗体由来のCDRは一本鎖Fv抗体に由来する。特定の実施形態では、ドナー抗体由来のFRは一本鎖Fv抗体に由来する。特定の実施形態では、ヒト化抗体に移植されるCDRは更に、標的抗原に対するヒト化抗体の親和性を増加させるために(例えば、アミノ酸置換、欠失、または挿入によって)変更される。特定の実施形態では、ヒト化抗体に移植されるFRは更に、標的抗原に対するヒト化抗体の親和性を増加させ50

るために(例えば、アミノ酸置換、欠失、または挿入によって)改変される。

#### 【0089】

特定の実施形態では、非ヒト抗体は「人間工学」(human engineering)法を用いてヒト化されうる。例えば、米国特許第5,766,886号および第5,869,619号を参照されたい。人間工学の特定の実施形態では、可変領域内の特定のアミノ酸残基が(a)抗原結合に関与する、(b)抗体表面に露出する(すなわち、溶媒と接触しやすい)、または(c)抗体可変領域に埋め込まれる(すなわち、可変領域の構造の維持に関与する)という可能性を評価するために、抗体可変領域の構造の情報(例えば、結晶構造および/または分子モデリングから得られた情報)が用いられる。更に、特定の実施形態では、ヒト可変領域間で保存されている残基を同定するために、ヒト可変領域コンセンサス配列が生成される。特定の実施形態では、その情報は、非ヒト抗体の可変領域のアミノ酸残基を置換するべきかどうかについての指針を提供する。10

#### 【0090】

特定の中和抗体は、4.7.1のCDR1、CDR2、およびCDR3を有する重鎖を含む。特定の中和抗体は、4.8.3のCDR1、CDR2、およびCDR3を有する重鎖を含む。特定の中和抗体は、4.9.1のCDR1、CDR2、およびCDR3を有する重鎖を含む。特定の中和抗体は、5.35のCDR1、CDR2、およびCDR3を有する重鎖を含む。特定の中和抗体は、5.50のCDR1、CDR2、およびCDR3を有する重鎖を含む。特定の中和抗体は、1.315.1のCDR1、CDR2、およびCDR3を有する重鎖を含む。特定の中和抗体は、4.7.1の少なくとも1つのCDRを有する重鎖を含む。特定の中和抗体は、4.8.3の少なくとも1つのCDRを有する重鎖を含む。特定の中和抗体は、5.35の少なくとも1つのCDRを有する重鎖を含む。特定の中和抗体は、5.50の少なくとも1つのCDRを有する重鎖を含む。特定の中和抗体は、1.315.1の少なくとも1つのCDRを有する重鎖を含む。特定の中和抗体は、4.9.1の少なくとも1つのCDRを有する重鎖を含む。特定の中和抗体は、5.35の少なくとも1つのCDRを有する重鎖を含む。特定の中和抗体は、5.50の少なくとも1つのCDRを有する重鎖を含む。特定の中和抗体は、1.315.1の少なくとも1つのCDRを有する重鎖を含む。特定の中和抗体は、4.7.1の少なくとも2つのCDRを有する重鎖を含む。特定の中和抗体は、4.8.3の少なくとも2つのCDRを有する重鎖を含む。特定の中和抗体は、5.35の少なくとも2つのCDRを有する重鎖を含む。特定の中和抗体は、5.50の少なくとも2つのCDRを有する重鎖を含む。特定の中和抗体は、1.315.1の少なくとも2つのCDRを有する重鎖を含む。20

#### 【0091】

特定の中和抗体は、4.7.1のCDR1、CDR2、およびCDR3を有する軽鎖を含む。特定の中和抗体は、4.8.3のCDR1、CDR2、およびCDR3を有する軽鎖を含む。特定の中和抗体は、4.9.1のCDR1、CDR2、およびCDR3を有する軽鎖を含む。特定の中和抗体は、5.35のCDR1、CDR2、およびCDR3を有する軽鎖を含む。特定の中和抗体は、5.50のCDR1、CDR2、およびCDR3を有する軽鎖を含む。特定の中和抗体は、1.315.1のCDR1、CDR2、およびCDR3を有する軽鎖を含む。特定の中和抗体は、4.7.1の少なくとも1つのCDRを有する軽鎖を含む。特定の中和抗体は、4.8.3の少なくとも1つのCDRを有する軽鎖を含む。特定の中和抗体は、4.9.1の少なくとも1つのCDRを有する軽鎖を含む。特定の中和抗体は、5.35の少なくとも1つのCDRを有する軽鎖を含む。特定の中和抗体は、5.50の少なくとも1つのCDRを有する軽鎖を含む。特定の中和抗体は、1.315.1の少なくとも1つのCDRを有する軽鎖を含む。特定の中和抗体は、4.7.1の少なくとも2つのCDRを有する軽鎖を含む。特定の中和抗体は、4.8.3の少なくとも2つのCDRを有する軽鎖を含む。特定の中和抗体は、4.9.1の少なくとも2つのCDRを有する軽鎖を含む。特定の中和抗体は、5.35の少なくとも2つのCDRを有する軽鎖を含む。特定の中和抗体は、5.50の少なくとも2つのCDRを有する軽鎖を含む。特定の中和抗体は、1.315.1の少なくとも2つのCDRを有する軽鎖を含む。30

#### 【0092】

##### 2. 抗体アイソタイプ

特定の実施形態では、ANGPTL3に対する抗体は、IgM、IgD、IgG、IgA、およびIgEより選択される任意のアイソタイプである。特定の実施形態では、ANGPTL3に対する抗体は、IgGアイソタイプである。このような特定の実施形態では、抗体は、サブクラスIgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4である。特定の実施形態では、ANGPTL3に対する抗体は、IgMアイソタイ40

プである。このような特定の実施形態では、抗体は、サブクラスIgM1またはIgM2である。特定の実施形態では、ANGPTL3に対する抗体は、IgAアイソタイプである。このような特定の実施形態では、抗体は、サブクラスIgA1またはIgA2である。特定の実施形態では、ANGPTL3に対する抗体は、ヒトカッパ軽鎖およびヒトIgG1またはIgG2重鎖を有する。特定の実施形態では、ANGPTL3に対する抗体は、マウスカッパ軽鎖およびマウスIgG1またはIgG2重鎖を有する。

#### 【0093】

##### 3. 修飾抗体

様々な実施形態において、抗体は、その1つ以上の特性を改変するために修飾される。特定の実施形態では、修飾抗体は、安定性の増加、循環時間の増加、または免疫原性的減少のような、非修飾抗体を越える利点を持ちうる(例えば、米国特許第4,179,337号を参照されたい)。特定の実施形態では、抗体は、それを非タンパク質性成分に結合することによって、修飾される。特定の実施形態では、抗体は、抗体のグリコシル化状態を改変することによって(例えば、抗体上の炭水化物鎖の数、種類、結合、および/または位置を改変することによって)修飾される。特定の実施形態では、抗体はグリコシル化されないように改変される。

#### 【0094】

特定の実施形態では、1つ以上の化学成分が抗体のアミノ酸骨格および/または炭水化物残基に結合される。抗体に化学成分を結合させるための特定の代表的な方法は、当業者に知られている。このような方法としては、アシリル化反応またはアルキル化反応が挙げられるがそれらに限定されない。例えば、EP 0 401 384; Malik ら(1992), Exp. Hematol., 20:1028-1035; Mediscript, Mountain Court, Friern Barnet Lane, London N20 0LD, U Kにより出版されたFrancis (1992) Focus on Growth Factors 3(2):4-10; EP 0 154 316; EP 0 401 384; WO 92/16221; WO 95/34326; WO 95/13312; WO 96/11953; WO 96/19459およびWO 96/19459を参照されたい。特定の実施形態では、任意のこれらの反応は、そのアミノ末端で化学的に修飾された抗体を作製するために用いられる。

#### 【0095】

特定の実施形態では、抗体は、酵素標識、蛍光標識、同位体標識または親和性標識などの検出可能な標識に結合される。このような特定の実施形態において、検出可能な標識は、抗体の検出または単離を可能にする。特定の実施形態では、検出可能な標識は、抗体が結合した抗原の検出を可能にする。

#### 【0096】

特定の実施形態では、抗体は、それを1つ以上のポリマーに結合させることによって修飾される。特定の実施形態では、抗体は1つ以上の水溶性ポリマーに結合される。このような特定の実施形態では、水溶性ポリマーへの結合は、抗体が生理環境のような水性環境において沈殿する可能性を低下させる。特定の実施形態では、治療抗体が水溶性ポリマーに結合される。特定の実施形態において、当業者は、ポリマー/抗体コンジュゲートが患者の治療に用いられるかどうか、ならびに、その場合、抗体の薬理学的特性(例えば、半減期、用量、活性、抗原性、および/または他の要因)を含むがそれらに限定されない検討事項に基づいて、適切な水溶性ポリマーを選択できる。

#### 【0097】

特定の代表的な臨床上許容され得る水溶性ポリマーとしては、ポリエチレングリコール(PEG); ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒド; エチレングリコール/プロピレングリコールの共重合体; モノメトキシポリエチレングリコール; カルボキシメチルセルロース; デキストラン; ポリビニルアルコール(PVA); ポリビニルピロリドン、ポリ-1, 3-ジオキソラン; ポリ-1,3,6-トリオキサン; エチレン/無水マレイン酸共重合体; ポリ- -アミノ酸(ホモ重合体もしくはランダム共重合体のいずれか); ポリ(n-ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール; ポリプロピレングリコールホモ重合体(PPG)および他のポリアルキレンオキシド; ポリプロピレンオキシド/エチレンオキシド共重合体; ポリオキシエチル化ポリオール(POG)(例えば、グリセロール)および他のポリオキシエチル化ポリオール; ポリオキシエ

10

20

30

40

50

チル化ソルビトール、ポリオキシエチル化グルコース、コロン酸(colonic acid)もしくは他の炭水化物ポリマー;ならびにフィコール、デキストラン、またはそれらの混合物が挙げられるがそれらに限定されない。特定の代表的なPEGとしては、モノ-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)アルコキシ-またはアリールオキシ-PEGなどの、抗体修飾に有用であることが当技術分野において既知の特定の形態が挙げられるがそれらに限定されない。特定の実施形態では、PEGプロピオンアルデヒドは、その水中での安定性のため製造に有利でありうる。

#### 【0098】

特定の実施形態では、水溶性ポリマーは任意の分子量である。特定の実施形態では、水溶性ポリマーは分岐または非分岐型である。特定の実施形態では、水溶性ポリマーは、約2 kDa ~ 約10 0 kDaの平均分子量を有し、その範囲の両端値の間のすべての点を含む。特定の実施形態では、水溶性ポリマーは、約5 kDa ~ 約40 kDaの平均分子量を有する。特定の実施形態では、水溶性ポリマーは、約10 kDa ~ 約35 kDaの平均分子量を有する。特定の実施形態では、水溶性ポリマーは、約15 kDa ~ 約30 kDaの平均分子量を有する。

10

#### 【0099】

特定の実施形態では、抗体はPEGに結合される(すなわち、抗体は「ペグ化」される)。様々な実施形態で、PEGは哺乳動物において低い毒性を示す。Carpenterら(1971) Toxicol. Appl. Pharmacol., 18:35-40を参照されたい。特に、アデノシンデアミナーゼのPEG付加物は、ヒトにおいて重症複合免疫不全症候群の治療に使用するために、米国で認可された。様々な実施形態において、PEGは抗体の免疫原性を低下させうる。例えば、特定の実施形態では、非ヒト配列を有する抗体へのPEGの結合は、ヒトに投与した場合、その抗体の抗原性を低下させうる。

20

#### 【0100】

特定の実施形態では、ポリマーは抗体の1つ以上の反応性アミノ酸残基に結合される。特定の典型的な反応性アミノ酸残基としては、アミノ末端のアミノ酸のアルファアミノ基、リジン側鎖のイブシロンアミノ基、システイン側鎖のスルフヒドリル基、アスパルチルおよびグルタミル側鎖のカルボキシル基、カルボキシ末端のアミノ酸のアルファカルボキシル基、チロシン側鎖、および特定のアスパラギン、セリン、またはトレオニン残基に結合した活性化グリコシル鎖が挙げられるが、それらに限定されない。タンパク質との直接反応に適した特定の代表的な活性型のPEG(「PEG試薬」)が当業者に知られている。例えば、特定の実施形態では、アミノ基との結合に適したPEG試薬としては、PEGのカルボン酸またはカルボネート誘導体の活性エステル、例えば、脱離基がN-ヒドロキシスクシンイミド、p-ニトロフェノール、イミダゾールもしくは1-ヒドロキシ-2-ニトロベンゼン-4-スルホネートであるものが挙げられるが、それらに限定されない。特定の実施形態では、マレイミドまたはハロアセチル基を含むPEG試薬が、スルフヒドリル基を修飾するために用いられる。特定の実施形態では、アミノ、ヒドラジンおよび/またはヒドラジド基を含むPEG試薬が、タンパク質中の炭水化物基の過ヨウ素酸酸化によって生じるアルデヒドとの反応に使用されうる。

30

#### 【0101】

特定の実施形態では、水溶性ポリマーは少なくとも1つの反応基を有する。特定の実施形態では、PEGなどの水溶性ポリマーの活性型誘導体は、水溶性ポリマーと活性化基との反応によって作製される。特定の実施形態では、活性化基は、単官能性、二官能性、または多官能性でありうる。水溶性ポリマーを2つ以上の抗体に結合させるために使用され得る特定の代表的な活性化基としては、以下の基、すなわち、スルホン(例えば、クロロスルホン、ビニルスルホンおよびジビニルスルホン)、マレイミド、スルフヒドリル、チオール、トリフレート、トレシレート、アジジリン(azidirine)、オキシラン、および5-ピリジルが挙げられるが、それらに限定されない。特定の実施形態では、PEG誘導体は通常、pH約1.1以下の水性環境で長期間に渡り加水分解に対して安定である。特定の実施形態では、抗体などの別の分子に結合されたPEG誘導体は、その分子に加水分解からの安定性をもたらす。特定の代表的なホモ二官能性PEG誘導体としては、PEG-ビス-クロロスルホンおよびPEG-ビス-ビニルスルホンが挙げられるがそれらに限定されない(WO 95/13312参照)

40

50

。

### 【0102】

#### D. モノクローナル抗体を作製する特定の方法

##### 1. 特定のハイブリドーマ法

特定の実施形態では、モノクローナル抗体は標準的な方法によって產生される。特定の実施形態では、モノクローナル抗体はハイブリドーマに基づく方法によって產生される。このような特定の方法は当業者に知られている。例えば、Kohlerら(1975) Nature 256:49 5-497; HarlowおよびLane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual Ch. 6 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)を参照されたい。このような特定の実施形態では、マウス、ラット、ハムスター、サル、または他の哺乳動物などの適切な動物が、抗体分泌細胞を作製するために、免疫原によって免疫される。特定の実施形態では、抗体分泌細胞は、リンパ球または脾細胞などのB細胞である。特定の実施形態では、リンパ球(例えば、ヒトリンパ球)は、抗体分泌細胞を作製するためにin vitroで免疫される。例えば、Borrebackら(1988) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85:3995-3999を参照されたい。  
10

### 【0103】

特定の実施形態では、抗体分泌細胞は、骨髄性細胞株などの「不死化」細胞株と融合され、ハイブリドーマ細胞が作製される。特定の実施形態では、目的とする抗体を產生するハイブリドーマ細胞は、例えばELISAによって同定される。特定の実施形態では、このような細胞はその後、標準的な方法を用いてサブクローニングされ、培養され得る。特定の実施形態では、このような細胞はまた、適切な動物宿主における腹水腫瘍としてin vivoで増殖され得る。特定の実施形態では、モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ培養液、血清、または腹水から、アフィニティクロマトグラフィーなどの標準的な分離法を用いて単離される。特定の実施形態に従ったハイブリドーマの作製およびモノクローナル抗体の精製のための指針は、例えば、HarlowおよびLane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual Ch. 8 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)において提供される。  
20

### 【0104】

特定の実施形態では、マウスモノクローナル抗体は、遺伝子改変マウスを免疫原で免疫することによって作製される。このような特定の実施形態では、マウスは、部分的または完全にANGPTL3機能を欠如しているANGPTL3欠損マウスである。このような特定の実施形態では、マウスは、ANGPTL3をコードする遺伝子のすべてまたは一部を欠如している「ノックアウト」マウスである。特定の実施形態では、このようなノックアウトマウスはマウスANGPTL3で免疫される。特定の実施形態では、このようなノックアウトマウスはヒトANGPTL3で免疫される。  
30

### 【0105】

特定の実施形態では、ヒトモノクローナル抗体は、ヒト抗体を產生することができるトランスジェニック動物(例えば、マウス)において產生される。例えば、米国特許第6,075,181 A号および第6,114,598 A号;ならびにWO 98/24893 A2を参照されたい。例えば、特定の実施形態では、ヒト免疫グロブリン遺伝子は、(例えば、酵母人工染色体、ヒト染色体断片、または生殖細胞系への組み込みを用いて)内在性免疫グロブリン(Ig)遺伝子が不活性化されているマウスに導入される。例えば、Jakobovitsら(1993) Nature 362:255-258; Tomizukaら(2000) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 97:722-727;および(トランスジェニックマウスのXenoMouse II(登録商標)系統を記載している)Mendezら(1997) Nat. Genet. 15:146-156を参照されたい。  
40

### 【0106】

特定の実施形態では、このようなトランスジェニックマウスが免疫原によって免疫される。このような特定の実施形態では、抗体を発現するマウスから(B細胞などの)リンパ細胞が得られる。このような特定の実施形態では、このように回収された細胞は、骨髄性細胞株などの「不死化」細胞株と融合され、ハイブリドーマ細胞が作製される。このような特定の実施形態では、ハイブリドーマ細胞は、目的の抗原に特異的な抗体を產生するもの  
50

を同定するために、スクリーニングおよび選択される。ヒトモノクローナル抗体の產生に適した特定の代表的な方法およびトランスジェニックマウスは、例えば、Jakobovitsら(1993) *Nature* 362:255-258; Jakobovits (1995) *Curr. Opin. Biotechnol.* 6:561-566; Lo nbergら(1995) *Int'l Rev. Immunol.* 13:65-93; Fishwildら(1996) *Nat. Biotechnol.* 14:845-851; Mendezら(1997) *Nat. Genet.* 15:146-156; Green (1999) *J. Immunol. Methods* 231:11-23; Tomizukaら(2000) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 97:722-727に記載され、Littleら(2000) *Immunol. Today* 21:364-370; およびWO 98/24893に概説される。特定の実施形態では、ANGPTL3に対するヒトモノクローナル抗体が治療抗体としての使用に適している。下記の第V部のGを参照されたい。

#### 【0107】

10

##### 2. 特定のディスプレイに基づく方法

特定の実施形態では、ヒトモノクローナル抗体は、例えば、下記に記載される任意の方法のような、ディスプレイに基づく方法を用いて產生される。

#### 【0108】

20

特定の実施形態では、モノクローナル抗体はファージディスプレイ法を用いて產生される。特定の代表的な抗体ファージディスプレイ法は当業者に知られており、例えば、Methods in Molecular Biology: Antibody Phage Display: Methods and Protocols (2002) 178:1-37 (O'BrienおよびAitken, 編、Human Press, Totowa, NJ) のHoogenboom, Overview of Antibody Phage-Display Technology and Its Applicationsに記載される。例えれば、特定の実施形態では、抗体のライプラリーは、非溶原性纖維状ファージfdまたはM13などの纖維状ファージの表面に提示される。特定の実施形態では、抗体は、scFv、Fab、V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub> 対を安定化するために操作された分子間ジスルフィド結合を有するFv、およびダイアボディーなどの抗体フラグメントである。特定の実施形態では、望ましい結合特異性を有する抗体はその後選択され得る。抗体ファージディスプレイ法の特定の代表的な実施形態は、下記において更に詳細に記載される。

#### 【0109】

30

特定の実施形態では、抗体ファージディスプレイライプラリーは、当業者にとって既知の特定の方法を用いて調製され得る。例えば、Methods in Molecular Biology: Antibody Phage Display: Methods and Protocols (2002) 178:1-37 (O'BrienおよびAitken, 編、Human Press, Totowa, NJ) のHoogenboom, Overview of Antibody Phage-Display Technology and Its Applicationsを参照されたい。特定の実施形態では、可変遺伝子レパートリーは、ゲノムDNAまたは抗体分泌細胞のmRNAに由来するcDNAのPCR増幅によって調製される。例えば、特定の実施形態では、cDNAはB細胞のmRNAから調製される。特定の実施形態では、重鎖および軽鎖可変領域をコードするcDNAは、例えばPCRによって増幅される。

#### 【0110】

40

特定の実施形態では、重鎖cDNAおよび軽鎖cDNAは適切なベクターにクローニングされる。特定の実施形態では、重鎖cDNAおよび軽鎖cDNAはクローニングの過程で無作為に組み合わされ、それによって多様なscFvまたはFabをコードするcDNAライプラリーがアセンブリされる。特定の実施形態では、重鎖cDNAおよび軽鎖cDNAは、適切なベクターにクローニングされる前にライゲーションされる。特定の実施形態では、重鎖cDNAおよび軽鎖cDNAは、適切なベクターへの段階的クローニングによってライゲーションされる。

#### 【0111】

50

特定の実施形態では、cDNAは、ファージミドベクターなどのファージディスプレイベクターにクローニングされる。pCES1などの特定の代表的なファージミドベクターが当業者に知られている。特定の実施形態では、重鎖と軽鎖との両方をコードするcDNAは、同一のベクター上に存在する。例えば、特定の実施形態では、scFvをコードするcDNAは、マイナーファージコートタンパク質pIIIをコードする遺伝子IIIのすべてまたは一部の読み枠にクローニングされる。このような特定の実施形態では、ファージミドはファージ表面におけるscFv-pIII融合物の発現をもたらす。あるいは、特定の実施形態では、重鎖(または軽鎖)をコードするcDNAは遺伝子IIIのすべてまたは一部の読み枠にクローニングされ、軽鎖

(または重鎖)をコードするcDNAは同一のベクターにおいてシグナル配列の下流にクローニングされる。シグナル配列は宿主細胞のペリプラズム内への軽鎖(または重鎖)の発現をもたらし、そこで重鎖および軽鎖は会合してFabフラグメントとなる。あるいは、特定の実施形態では、重鎖をコードするcDNAと軽鎖をコードするcDNAは別のベクター上に存在する。このような特定の実施形態では、重鎖および軽鎖cDNAは、一方はファージミドに、他方はファージベクターに、別々にクローニングされ、それら両方は宿主細胞におけるin vivoでの再結合のためのシグナルを含む。

#### 【0112】

特定の実施形態では、組換えファージミドまたはファージベクターは、E. coliなどの適切な細菌宿主に導入される。ファージミドを用いた特定の実施形態では、宿主にファージ構造タンパク質を提供するためのヘルパーファージを感染させ、それによってファージ表面に抗体-pIII融合タンパク質を有するファージ粒子の発現を可能にする。

10

#### 【0113】

特定の実施形態では、in vitroで再構成される可変遺伝子のレパートリーを用いて「合成」抗体ライブラリーが構築される。例えば、特定の実施形態では、重鎖または軽鎖をコードする個々の遺伝子断片(それぞれ、V-D-JもしくはV-J)は、PCRを用いて無作為に組み合わされる。このような特定の実施形態では、例えばエラープローンPCRによって、更なる配列多様性がCDRおよび場合によってはFRに導入され得る。このような特定の実施形態では、更なる配列多様性は、CDR3、例えば重鎖のH3に導入される。

#### 【0114】

20

特定の実施形態では、免疫されていない動物由来の核酸を用いて上述のように、「ナイーブ」または「ユニバーサル」ファージディスプレイライブラリーが構築される。特定の実施形態では、免疫されていない動物はヒトである。特定の実施形態では、免疫された動物由来の核酸を用いて上述のように、「免疫された」ファージディスプレイライブラリーが構築される。特定の実施形態では、免疫される動物は、ヒト、ラット、マウス、ハムスター、またはサルである。このような特定の実施形態では、動物は下記に記載される任意の免疫原によって免疫される。

#### 【0115】

特定の代表的なユニバーサルヒト抗体ファージディスプレイライブラリーは、商業的供給源から入手可能である。特定の代表的なライブラリーとしては、MorphoSys AG (Martin Streid/Munich, Germany)からのHuCAL(登録商標)シリーズのライブラリー; MAbstract(登録商標)技術を用いたCrucell (Leiden, the Netherlands)からのライブラリー; Biolnvent (Lund, Sweden)からのn-CoDeR(商標)Fabライブラリー; およびCambridge Antibody Technology (Cambridge, UK)から入手可能なライブラリーが挙げられるが、それらに限定されない。

30

#### 【0116】

特定の実施形態では、目的とする結合特異性を有する抗体のファージディスプレイライブラリーからの選択は、一連のパニングステップによって達成される。パニングの特定の実施形態では、ライブラリーファージ調製物は抗原に暴露される。このような特定の実施形態にでは、ファージ-抗原複合体は洗浄され、結合しなかったファージが除去される。このような特定の実施形態では、結合したファージは回収され、その後、E. coliに感染させることによって増幅される。このような特定の実施形態では、モノクローナル抗体产生ファージは、単一プラーカをピッキングすることによってクローニングされうる。特定の実施形態では、上述の過程が繰り返される。

40

#### 【0117】

特定の実施形態では、パニングに用いられる抗原は下記に記載される任意の免疫原である。特定の実施形態では、アフィニティーコロマトグラフィーによる抗原結合ファージの精製を可能にするために、抗原は固相支持体に固定化される。特定の実施形態では、抗原はビオチン化され、それにより、ストレプトアビシンでコートされた磁気ビーズを用いて結合したファージを結合しなかったファージから分離することを可能にする。特定の実施

50

形態では、抗原は、細胞上(直接パニングのため)、組織凍結切片、または膜上(例えば、ナイロンもしくはニトロセルロースメンブレン)に固定化されうる。特定のパニング法の他の変形例は、当業者によって通常決定されうる。

#### 【0118】

特定の実施形態では、モノクローナル抗体を産生するために、酵母ディスプレイシステムが用いられる。このような特定の実施形態では、抗体は、酵母AGA2タンパク質のすべてまたは一部との融合タンパク質として発現され、酵母細胞壁の表面に提示されるようになる。このような特定の実施形態では、目的とする結合特異性を有する抗体を発現している酵母細胞はその後、細胞を蛍光標識抗原に暴露することによって同定され得る。このような特定の実施形態では、抗原に結合する酵母細胞はその後、フローサイトメトリーによって単離され得る。例えば、Boderら(1997) Nat. Biotechnol. 15:553-557を参照されたい。  
10。

#### 【0119】

##### 3. 特定の親和性成熟法

特定の実施形態では、特定の抗原に対する抗体の親和性は、抗体にin vitroでの親和性成熟(すなわち「指向進化」)を受けさせることによって増加する。in vivoでは、自然抗体は、体細胞超変異とそれに続く選択によって親和性成熟を受ける。特定のin vitroでの方法はそのin vivoでの過程を模倣し、それによって、自然抗体の親和性と同等またはそれを上回る親和性を有する抗体の産生を可能にする。

#### 【0120】

親和性成熟の特定の実施形態では、突然変異は、目的とする結合特異性を有する抗体の可変領域をコードする核酸配列に導入される。例えば、Hudsonら(2003) Nat. Med. 9:129-134; Brekkeら(2002) Nat. Reviews 2:52-62を参照されたい。特定の実施形態では、突然変異は、重鎖、軽鎖、または両方の可変領域に導入される。特定の実施形態では、突然変異は1つ以上のCDRに導入される。このような特定の実施形態では、突然変異は、H3、L3、または両方に導入される。特定の実施形態では、突然変異は1つ以上のFRに導入される。特定の実施形態では、突然変異のライブラリーは、例えば、ファージ、リボソーム、または酵母ディスプレイライブラリーにおいて作製され、標準的なスクリーニング法によって、増加した親和性を有する抗体が同定されうる。例えば、Boderら(2000) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 97:10701-10705; Footeら(2000) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 97:10681; Methods in Molecular Biology: Antibody Phage Display: Methods and Protocols (2002) 178:1-37 (O'BrienおよびAitken, 編, Human Press, Totowa, NJ) のHoogenboom, Overview of Antibody Phage-Display Technology and Its Applications; ならびにHanesら(1998) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:14130-14135を参照されたい。  
20 30

#### 【0121】

特定の実施形態では、突然変異は、抗体の構造、例えば、抗原結合部位の情報に基づいた部位特異的突然変異誘発によって導入される。特定の実施形態では、突然変異は、CDRのコンビナトリアル突然変異誘発を用いて導入される。特定の実施形態では、可変領域コード配列のすべてまたは一部は、例えば、E. coli突然変異誘発細胞、相同遺伝子再構成、またはエラーブローンPCRを用いて、無作為に突然変異誘発される。特定の実施形態では、突然変異は「DNAシャフリング」を用いて導入される。例えば、Crameriら(1996) Nat. Med. 2:100-102; Fermerら(2004) Tumor Biol. 25:7-13を参照されたい。  
40

#### 【0122】

特定の実施形態では、増加した親和性を有する抗体を作製するために、「チェーンシャフリング」(chain shuffling)が用いられる。チェーンシャフリングの特定の実施形態では、一方の鎖、例えば軽鎖は軽鎖のレパートリーと置換されるが、他方の鎖、例えば重鎖は変化させずに特異性を与える。このような特定の実施形態では、同じ重鎖と、軽鎖のレパートリーに由来するそれぞれの軽鎖とが組み合わされて発現される、鎖をシャッフルした抗体のライブラリーが作製される。特定の実施形態では、このようなライブラリーはその後、増加した親和性を有する抗体についてスクリーニングされうる。特定の実施形態で  
50

は、重鎖と軽鎖の両方が順次置換される。特定の実施形態では、重鎖および/または軽鎖可変領域のみが置換される。特定の実施形態では、重鎖および/または軽鎖可変領域の一部、例えばCDRのみが置換される。例えば、Hudsonら(2003) Nat. Med. 9:129-134; Brekkeら(2002) Nat. Reviews 2:52-62; Kangら(1991) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 88:11120-11123; Marksら(1992) Biotechnol. 10:779-83を参照されたい。

#### 【0123】

特定の実施形態では、ヒトANGPTL3に特異的に結合するマウスモノクローナル抗体(マウスANGPTL3に対するマウスモノクローナル抗体であるが、ヒトANGPTL3に特異的に結合する(すなわち、交差反応する)ものを含むがそれに限定されない)が、連続的なチェーンシャーフリングを受ける。特定の実施形態では、例えば、既定のマウスモノクローナル抗体の重鎖は新たなヒト軽鎖のレパートリーと組み合わされ、目的とする親和性を有する抗体が選択される。このような特定の実施形態において、選択された抗体の軽鎖は次に、新たなヒト重鎖のレパートリーと組み合わされ、望ましい親和性を有する抗体が選択される。このようにして、特定の実施形態では、目的とする抗原結合特異性および親和性を有するヒト抗体が選択される。

10

#### 【0124】

あるいは、特定の実施形態では、既定のマウスモノクローナル抗体の重鎖が新たなヒト軽鎖のレパートリーと組み合わされ、望ましい親和性を有する抗体はこの1回目のシャーフリングから選択される。特定の実施形態では、元のマウスモノクローナル抗体の軽鎖は新たなヒト重鎖のレパートリーと組み合わされ、望ましい親和性を有する抗体はこの2回目のシャーフリングから選択される。特定の実施形態では、1回目のシャーフリングで選択された抗体に由来するヒト軽鎖がその後、2回目のシャーフリングで選択された抗体に由来するヒト重鎖と組み合わされる。このようにして、特定の実施形態では、目的とする抗原結合特異性および親和性を有するヒト抗体が選択される。

20

#### 【0125】

特定の実施形態では、抗体選択と親和性成熟を交互に行う「リボソームディスプレイ」法が用いられる。リボソームディスプレイ法の特定の実施形態では、抗体をコードする核酸は、選択ステップの間にRT-PCRによって増幅される。従って、特定の実施形態では、核酸に突然変異を導入するためにエラープローンポリメラーゼが使用されうる。このような方法の非限定的な例は、Hanesら(1998) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:14130-14135に詳細に記載される。

30

#### 【0126】

##### 4. 特定の組換え法

特定の実施形態では、モノクローナル抗体は組換え技術によって產生される。例えば、米国特許第4,8,16,567号を参照されたい。このような特定の実施形態では、モノクローナル抗体鎖をコードする核酸がクローニングされ、適切な宿主細胞において発現される。例えば、特定の実施形態では、成熟B細胞またはハイブリドーマ細胞などの目的とする抗体を発現している細胞から、標準的な方法を用いてRNAが調製され得る。特定の実施形態では、RNAはその後、標準的な方法を用いてcDNAを作製するために使用され得る。特定の実施形態では、重鎖または軽鎖ポリペプチドをコードするcDNAは、例えばPCRによって、特異的なオリゴヌクレオチドプライマーを用いて増幅される。特定の実施形態では、cDNAは適切な発現ベクターにクローニングされる。特定の実施形態では、発現ベクターはその後、内因的に抗体を產生しない宿主細胞のような適切な宿主細胞に形質転換またはトランسفェクトされる。特定の代表的な宿主細胞としては、E. coli、COS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、および骨髄腫細胞が挙げられるが、それらに限定されない。重鎖および軽鎖が同一宿主内で共発現する特定の実施形態では、再構成された抗体が単離されうる。

40

#### 【0127】

特定の実施形態では、重鎖または軽鎖をコードするcDNAは改変され得る。例えば、特定の実施形態では、マウス重鎖または軽鎖の定常領域は、ヒト重鎖または軽鎖の定常領域と

50

置換され得る。このように、特定の実施形態では、ヒト抗体定常領域を有するが、マウス抗体の結合特異性を保持するキメラ抗体が産生され得る。

#### 【0128】

特定の実施形態では、組換え抗体は特定の細胞株において発現され得る。特定の実施形態では、特定の抗体をコードする配列は、適切な哺乳動物宿主細胞の形質転換に使用され得る。特定の実施形態によると、形質転換は、宿主細胞にポリヌクレオチドを導入するための任意の既知の方法によって可能である。特定の代表的な方法としては、ウイルス(またはウイルスベクター内)へのポリヌクレオチドのパッケージングおよびウイルス(またはベクター)による宿主細胞の形質導入、ならびに、米国特許第4,399,216号、第4,912,040号、第4,740,461号、および第4,959,455号などの、当技術分野において既知の特定のトランسفエクション法の使用が挙げられるが、それらに限定されない。特定の実施形態において、使用される形質転換法は、形質転換される宿主に依存しうる。異種ポリヌクレオチドを哺乳動物細胞に導入するための特定の代表的な方法は当技術分野において知られており、デキストラン媒介トランسفエクション、リン酸カルシウム沈殿法、ポリブレン媒介トランسفエクション、プロトプラス融合、エレクトロポレーション、ポリヌクレオチドのリポソームへのカプセル化、および核内へのDNAの直接マイクロインジェクションが挙げられるが、それらに限定されない。10

#### 【0129】

発現のための宿主として利用可能な特定の代表的な哺乳動物細胞株には、当技術分野において知られており、American Type Culture Collection(ATCC)から入手可能な多数の不死化細胞株が含まれるがそれらに限定されず、それらにはチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、HeLa細胞、ベビーハムスターの腎臓(BHK)細胞、サルの腎臓細胞(COS)、ヒト肝細胞癌細胞(例えば、Hep G2)、および多数の他の細胞株が含まれるがそれらに限定されない。特定の実施形態では、細胞株は、いずれの細胞株が特異的にANGPTL3に結合する高レベルの抗体を産生するかを測定することによって選択されうる。20

#### 【0130】

##### E. 特定のポリペプチド免疫原

特定の実施形態では、抗体を作製するために、動物を免疫原で免疫する。特定の実施形態では、免疫原はANGPTL3を含むポリペプチドである。特定の実施形態では、免疫原はANGPTL3の断片を含むポリペプチドである。特定の実施形態では、免疫原はANGPTL3のN末端のコイルドコイルドメインを含むポリペプチドである。特定の実施形態では、免疫原はANGPTL3のSP1領域を含むポリペプチドである。30

#### 【0131】

特定の実施形態では、免疫原はマウスANGPTL3を含む。特定の実施形態では、免疫原はヒトANGPTL3を含む。特定の実施形態では、免疫原は、配列番号1のアミノ酸配列を有するマウスANGPTL3を含む。特定の実施形態では、免疫原は、配列番号3のアミノ酸配列を有するヒトANGPTL3を含む。特定の実施形態では、免疫原はマウスANGPTL3の断片を含む。特定の実施形態では、免疫原は配列番号59のアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、免疫原は、配列番号1の残基32～残基57の断片を含む。特定の実施形態では、免疫原は配列番号9のアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、免疫原は配列番号61のアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、免疫原はヒトANGPTL3の断片を含む。特定の実施形態では、免疫原は配列番号60のアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、免疫原は配列番号1の残基32～残基57の断片を含む。特定の実施形態では、免疫原は配列番号10のアミノ酸配列を含む。40

#### 【0132】

特定の実施形態では、免疫原は、配列番号1の残基17～残基240の連続した約10～20個のアミノ酸の任意のペプチドを含む。特定の実施形態では、免疫原は、配列番号3の残基20～残基243の連続した約10～20個のアミノ酸の任意のペプチドを含む。特定の実施形態では、免疫原は、配列番号9、10、12、13、59、60、および61から選択される1つ以上のペ50

ペプチドを含む。特定の実施形態では、免疫原は、配列番号9および10より選択されるペプチドを含む。特定の実施形態では、免疫原は、配列番号59および60より選択される1つ以上のアミノ酸配列を有するペプチドを含む。特定の実施形態では、免疫原は、配列番号12、13、および61を有するペプチドを含む。このような特定の実施形態では、免疫原性を有する可能性が高いペプチドが選択される。このような特定の実施形態では、親水性であると予測され、かつ/または、その折りたたみ状態において天然のANGPTL3の表面に露出する可能性が高いペプチドが選択される。適切な免疫原性ペプチドを選択するための代表的な指針は、例えば、Ausubelら(1989) *Current Protocols in Molecular Biology Ch. 11.14* (John Wiley & Sons, NY);ならびにHarlowおよびLane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual Ch. 5* (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)において提供される。  
10

#### 【0133】

タンパク質のペプチド部分が親水性であり、そのためにタンパク質の表面に露出する可能性が高いかどうかを予測するための特定の代表的なアルゴリズムは、当業者に知られている。特定のこのようなアルゴリズムは、タンパク質の一次配列情報を用いてこのような予測を行う。特定のこのようなアルゴリズムは、例えば、HoppおよびWoods (1981) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 78:3824-3828、またはKyteおよびDoolittle (1982) *J. Mol. Biol.* 157:105-132の方法に基づく。タンパク質の一次アミノ酸配列に基づいてタンパク質の二次構造を予測するための特定の代表的なアルゴリズムは、当業者に知られている。例えば、Corriganら(1982) *Comput. Programs Biomed.* 3:163-168を参照されたい。特定のこのようなアルゴリズムは、例えば、ChouおよびFasman (1978) *Ann. Rev. Biochem.* 47:25-276の方法に基づく。特定の実施形態では、ターンを形成すると予測され、そのためにタンパク質の表面に露出すると思われるペプチド部分が、免疫原として選択されうる。  
20

#### 【0134】

特定の実施形態では、動物は免疫原および1つ以上のアジュバントによって免疫される。特定の実施形態では、アジュバントは、免疫反応を増加させるために、宿主となる種に応じて使用される。特定の代表的なアジュバントとしては、(完全および不完全)フロイントアジュバント、水酸化アルミニウムまたはリン酸アルミニウムなどの無機塩類、界面活性物質、キトサン、リゾレシチン、フルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳剤、ならびに、BCG (*bacille Calmette-Guerin*)およびCorynebacterium parvumなどの潜在的に有用なヒトアジュバントが挙げられるが、それらに限定されない。特定の実施形態では、免疫原、例えば、ペプチド免疫原への免疫反応は、免疫原を別の免疫原性分子すなわち「キャリアタンパク質」に結合することによって増強される。特定の代表的なキャリアタンパク質としては、キーホールリンベットヘモシアニン(KLH)、破傷風トキソイド、ジフテリアトキソイド、オボアルブミン、コレラトキソイド、およびその免疫原性断片が挙げられるが、それらに限定されない。ペプチド免疫原のキャリアタンパク質との結合における代表的な指針については、例えば、Ausubelら(1989) *Current Protocols in Molecular Biology Ch. 11.15* (John Wiley & Sons, NY);ならびにHarlowおよびLane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual Ch. 5* (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)を参照されたい。  
30  
40

#### 【0135】

特定の実施形態では、上記の任意の免疫原は標準的な組換え法を用いて產生され得る。例えば、特定の実施形態では、マウスもしくはヒトのANGPTL3をコードするポリヌクレオチドまたはそのポリヌクレオチドの断片は、適切な発現ベクターにクローニングされうる。特定の実施形態では、そのポリヌクレオチドは、配列番号5または配列番号6の核酸配列を含む。特定の実施形態では、組換えベクターはその後、適切な宿主細胞に導入される。特定の実施形態では、ポリペプチドはその後、宿主細胞から標準的な方法によって単離される。特定の代表的な組換えタンパク質発現の方法については、例えば、Ausubelら(1991) *Current Protocols in Molecular Biology Ch. 16* (John Wiley & Sons, NY)を参照されたい。  
50

## 【0136】

## F. 特定のアッセイ

## 1. 特定の結合アッセイ

特定の実施形態では、抗体は、ANGPTL3への結合について、抗体の抗原への結合を検出する特定の日常的な方法を用いてスクリーニングされる。例えば、特定の実施形態では、モノクローナル抗体のANGPTL3への結合能力は、ウェスタンプロットなどの標準的な免疫プロッティング法によってアッセイされる。例えば、Ausubelら(1992) Current Protocols in Molecular Biology Ch. 10.8 (John Wiley & Sons, NY); HarlowおよびLane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)を参照されたい。特定の実施形態において、このようなアッセイに使用されるANGPTL3は単離されていてもよく、またはタンパク質および/もしくは高分子の複合混合物中に存在してもよい。

## 【0137】

特定の実施形態では、モノクローナル抗体のANGPTL3への結合能力は、競合的結合アッセイを用いてアッセイされ、それはANGPTL3への結合について候補抗体が既知の抗ANGPTL3抗体と競合する能力を評価する。このような特定の実施形態では、既知の抗ANGPTL3抗体は、下記の第VI部のJに記載される任意のモノクローナル抗体である。特定の実施形態では、競合的結合アッセイはELISAを用いて行われる。例えば、HarlowおよびLane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual Ch. 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)を参照されたい。

## 【0138】

特定の実施形態では、結合アッセイは、ANGPTL3に対する抗体の結合速度論(例えば、速度定数)または結合親和性(例えば、結合定数もしくは解離定数)を定量化するために用いられる。特定の実施形態では、結合の速度論または親和性は、固相支持体に抗原(例えば、ANGPTL3)を固定化することによって、「固相」で測定される。固定化された抗原は溶液から抗体を「捕捉」する。特定の実施形態では、結合の速度論または親和性は、固相支持体に抗体(例えば、ANGPTL3に対する抗体)を固定化することによって、「固相」で測定される。固定化された抗体は溶液から抗原を「捕捉」する。

## 【0139】

特定の実施形態では、結合速度論または結合親和性はELISAに基づく方法を用いて測定される。特定の実施形態では、結合速度論または結合親和性は、Biacore表面プラズモン共鳴技術(Biacore, Piscataway, NJ)などのバイオセンサーに基づく技術を用いて測定される。特定のこのような方法は当業者に知られている。例えば、McCaffertyら(編)(1996) Antibody Engineering: A Practical Approach (IRL, Oxford, UK); Goldbergら(1993) Curr. Opin. Immunol. 5:278-281; Karlssonら(1991) J. Immunol. Methods 145:229-240; Malmqvist (1993) Curr. Opin. Immunol. 5:282-286を参照し、概説としては、Methods in Molecular Biology: Antibody Phage Display: Methods and Protocols (2002) 178:1-37 at 19 (O'BrienおよびAitken編、Human Press, Totowa, NJ)のHoogenboom, Overview of Antibody Phage-Display Technology and Its Applicationsを参照されたい。

## 【0140】

特定の実施形態では、ANGPTL3に特異的に結合するFabフラグメントの結合速度論または結合親和性が測定される。特定の場合、Fabフラグメントは多量体化しない特性を有する。多量体化は、場合によっては、「固相」法における結合速度論および結合親和性の測定を困難にし得る。例えば、Methods in Molecular Biology: Antibody Phage Display: Methods and Protocols (2002) 178:1-37 at 19 (O'BrienおよびAitken編、Human Press, Totowa, NJ)のHoogenboom, Overview of Antibody Phage-Display Technology and Its Applicationsを参照されたい。従って、特定の実施形態では、ANGPTL3に特異的に結合するFabフラグメントは、例えばELISAに基づくアッセイまたはBiacoreアッセイなどの、抗原が固相支持体に固定化される結合アッセイでの使用に適している。特定の実施形態では、Fabフラグメントは、ANGPTL3に特異的に結合する完全な抗体から酵素法を用いて作製さ

10

20

30

40

50

れる。特定の実施形態では、Fabフラグメントは、第V部のD.3に上述されたような組換え発現系において、Fabフラグメントをコードする核酸を発現させることによって產生される。

#### 【0141】

特定の実施形態では、ANGPTL3に対する抗体の結合速度論または結合親和性は、「液相」法を用いて測定される。このような方法では、結合の速度論または親和性は、溶液中の抗体抗原複合体について測定される。特定のこののような方法は当業者に知られている。このような方法の非限定的な例は、「結合平衡除外法」すなわち「KinExA」である。例えば、Blakeら(1996) J. Biol. Chem. 271:27677-27685; Drakeら(2004) Anal. Biochem. 328:35-43(Biacoreの「固相」法とKinExAの「液相」法とを比較している)を参照されたい。  
特定の実施形態では、KinExAを実施するための装置はSapidyne Instruments, Inc. (Boise, ID)により提供される。

10

#### 【0142】

特定の実施形態では、多価抗体もしくは多量体化する抗体の結合速度論または結合親和性は、液相法を用いて測定される。特定の場合、多価抗体もしくは多量体化する抗体の結合速度論または結合親和性の測定は、液相での分析に適している。

#### 【0143】

特定の実施形態では、その $K_D$ によって測定される抗ANGPTL3抗体の結合親和性は、約 $10^{-6}$ M以下である。特定の実施形態では、抗ANGPTL3抗体の結合親和性は、約 $10^{-7}$  M、約 $10^{-8}$  M、または約 $10^{-9}$  M以下である。このような特定の実施形態では、抗ANGPTL3抗体は治療抗体として使用されうる。例えば、Hudsonら(2003) Nat. Med. 9:129-134を参照されたい。特定の実施形態では、 $10^{-9}$  M未満の結合親和性(例えば、約100 pM～約5 pMの結合親和性を含むがそれに限定されない、約500 pM～約0.5 pMの結合親和性)は、例えば、親和性成熟法を用いて達成可能である。例えば、Boderら(2000) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 97:10701-10705を参照されたい。特定の実施形態では、抗ANGPTL3抗体の結合親和性は約 $5 \times 10^{-8}$  M未満である。

20

#### 【0144】

特定の実施形態では、マウスANGPTL3に対して產生させたモノクローナル抗体は、ヒトANGPTL3への特異的結合について、例えば、本明細書において記載されたもののような特定の通常の検出方法を用いてスクリーニングされる。マウスANGPTL3とヒトANGPTL3の両方に結合する(すなわち、「交差反応性」を示す)モノクローナル抗体の能力は、マウスおよびヒトANGPTL3における同一エピトープの存在を示唆する。変性条件を用いる検出方法の特定の実施形態(例えば、ウェスタンプロット)では、交差反応性は、マウスモノクローナル抗体がマウスおよびヒトANGPTL3における同一の「線状」エピトープに結合することを示唆する。非変性条件を用いる検出方法の特定の実施形態では、交差反応性は、マウスマонクローナル抗体がマウスおよびヒトANGPTL3における同一エピトープ(例えば、線状エピトープまたは立体構造エピトープ)に結合することを示唆する。

30

#### 【0145】

##### 2. 特定のエピトープマッピングの方法

様々な実施形態において、モノクローナル抗体が結合するエピトープは、任意の多数のアッセイによって同定される。特定の代表的なアッセイは、例えば、Morris, Methods in Molecular Biology Vol.66: Epitope Mapping Protocols (1996) (Humana Press, Totowa, NJ)に記載される。例えば、エピトープマッピングは、遺伝子断片発現アッセイまたはペプチドに基づくアッセイによって達成されうる。遺伝子断片発現アッセイの特定の実施形態では、例えば、ANGPTL3の断片をコードする核酸が原核細胞において発現され、単離される。このような特定の実施形態では、それらの断片に結合するモノクローナル抗体の能力はその後、例えば、免疫沈降または免疫プロッティングによって評価される。特定の実施形態では、ANGPTL3の断片をコードする核酸は、in vitroにおいて放射性アミノ酸の存在下で転写され、翻訳される。ANGPTL3の放射性標識断片はその後、モノクローナル抗体への結合について検査される。特定の実施形態では、ANGPTL3の断片はタンパク質分解

40

50

的断片化によって生成される。特定の実施形態では、エピトープは、ファージまたは酵母の表面に提示されたランダムペプチドのライブラリーを用いて同定される。特定の実施形態では、エピトープは、ANGPTL3の重複合成ペプチド断片のライブラリーを、モノクローナル抗体への結合について検査することにより同定される。特定の実施形態では、エピトープは、下記に記載されるもののような、競合アッセイを用いて同定される。特定の実施形態では、エピトープは、例えば下に記載されるような、アラニン - スキャニング突然変異誘発を用いてさらに特定されうる。

#### 【0146】

##### 3. 特定の競合アッセイ

特定の実施形態では、関心のあるモノクローナル抗体と同一のANGPTL3のエピトープに結合するモノクローナル抗体が同定される。特定の実施形態では、このようなモノクローナル抗体は、例えば、上述のようなエピトープマッピングによって同定される。特定の実施形態では、このようなモノクローナル抗体は、通常の競合アッセイによって同定される。例えば、HarlowおよびLane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual ch. 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) を参照されたい。非限定的な例となる競合アッセイでは、ANGPTL3またはその断片はマルチウェルプレートのウェル上に固定化される。特定のこのような実施形態では、関心のあるモノクローナル抗体は、標準的な方法によって蛍光標識(特定の実施形態では、フルオレセインイソチオシアネート)で標識される。特定のこのような実施形態では、関心のある標識モノクローナル抗体と標識されていないテストモノクローナル抗体との混合物がウェルに添加される。特定のこのような実施形態では、各ウェルの蛍光が定量化され、標識されていないテストモノクローナル抗体が関心のある標識モノクローナル抗体の結合を遮断する程度を測定する。特定の実施形態において、互いの結合を50%以上遮断する場合、モノクローナル抗体はエピトープを共有すると見なされる。代表的な競合アッセイもまた、例えば、Morris, Methods in Molecular Biology Vol.66: Epitope Mapping Protocols (1996) (Humana Press, Totowa, NJ) に記載される。非限定的な例となる競合アッセイは、下記の第VI部の〇において提供される。

10

20

#### 【0147】

##### 4. 中和抗体を同定するための特定のアッセイ

特定の実施形態では、モノクローナル抗体は、中和抗体、すなわち、*in vivo*および/または*in vitro*においてANGPTL3の活性を低下させるものについてスクリーニングされる。特定の実施形態において、ANGPTL3の活性とは、LPLを阻害するANGPTL3の能力である。従って、特定の実施形態では、中和抗体は、ANGPTL3の存在下でのLPL活性を増加させるその能力によって同定される。このような特定の実施形態では、中和抗体は、対照抗体と比較して少なくとも約20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%までLPL活性を増加させる。*in vivo*および*in vitro*においてLPL活性を測定する特定の代表的なアッセイは、当技術分野において知られている。

30

#### 【0148】

特定の実施形態では、*in vivo*においてANGPTL3の活性を低下させる中和抗体は、少なくとも1つの血清脂質レベルを減少させるその能力によって同定される。特定の典型的な血清脂質としては、トリグリセリド、コレステロール、および遊離脂肪酸が挙げられるが、それらに限定されない。このような特定の実施形態では、中和抗体は、対照抗体と比較して、少なくとも1つの血清脂質レベルを少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%減少させる。特定の実施形態では、*in vivo*においてANGPTL3の活性を低下させる中和抗体は、脂肪含有食の特定の作用を弱める、またはそれから保護するその能力によって同定される。特定の典型的な作用としては、体重増加、肥満、グルコース不耐性(高血糖症)、インスリン非感受性(高インスリン血症)、肝臓脂肪症(脂肪肝)、および筋肉細胞内への脂質蓄積が挙げられるが、それらに限定されない。

40

#### 【0149】

##### G. 中和モノクローナル抗体を用いた特定の医薬組成物および治療方法

50

特定の実施形態では、中和抗体は治療抗体として使用されうる。治療抗体として使用される特定の代表的な中和抗体としては、キメラ抗体、ヒト化抗体、およびヒト抗体が挙げられるがそれらに限定されない。当業者は特定の抗体の治療薬としての使用に精通している。例えば、1980年代半ば以来、1ダース以上もの抗体が、治療薬としての使用のためにFDAによって認可されている。例えば、Hudsonら(2003) Nat. Med. 9:129-134; Gura (2002) Nature 417:584-586; Brekkeら(2002) Nat. Reviews 2:52-62を参照されたい。特定のFDAに認可された抗体としては、様々な癌、炎症、およびウイルス感染を治療するために使用されるもの、ならびに移植片拒絶反応を防ぐために使用されるものが挙げられる。例えば、Gura (2002) Nature 417:584-586; Brekkeら(2002) Nat. Reviews 2:52-62を参照されたい。更に、1ダース以上もの抗体が現在臨床試験中である。例えば、Brekkeら(2002) Nat. Reviews 2:52-62を参照されたい。  
10

#### 【0150】

特定の実施形態では、有効量のANGPTL3に対する中和抗体の投与を含む、脂質代謝障害を治療するための方法が提供される。特定の実施形態では、有効量のANGPTL3に対する中和抗体の投与を含む、急性の脂質代謝障害を治療するための方法が提供される。特定の実施形態では、有効量のANGPTL3に対する中和抗体の投与を含む、慢性の脂質代謝障害を治療するための方法が提供される。特定の実施形態では、脂質代謝障害を治療するための方法は、有効量のANGPTL4に対する中和抗体の投与をさらに含む。例えば、PCT公報WO 2006/074228を参照されたい。

#### 【0151】

本明細書において用いられる場合、「脂質代謝障害」としては、二次性高脂血症(高トリグリセリド血症および高コレステロール血症を含む)を引き起こし得る障害が挙げられるがそれらに限定されない。特定の典型的な脂質代謝障害としては、アテローム性動脈硬化症、異常脂質血症、高トリグリセリド血症(薬物誘導性高トリグリセリド血症、利尿薬誘導性高トリグリセリド血症、アルコール誘導性高トリグリセリド血症、-アドレナリン遮断薬誘導性高トリグリセリド血症、エストロゲン誘導性高トリグリセリド血症、グルココルチコイド誘導性高トリグリセリド血症、レチノイド誘導性高トリグリセリド血症、シメチジン誘導性高トリグリセリド血症、および家族性高トリグリセリド血症を含む)、高トリグリセリド血症に関連した急性膵炎、カイロミクロン症候群、カイロミクロン血症、Apo-Eの欠損、LPLの欠損または低活性、高脂血症(家族性混合型高脂血症を含む)、高コレステロール血症、高コレステロール血症に関連した痛風、黄色腫症(皮下のコレステロール沈着)、冠動脈疾患(虚血性心疾患とも呼ばれる)、冠動脈疾患に関連した炎症、再狭窄、末梢血管障害、ならびに卒中が挙げられるが、それらに限定されない。特定の典型的な脂質代謝障害としては、肥満、メタボリックシンドロームの個々の要素(例えば、中心性肥満、FBG/前糖尿病/糖尿病、高コレステロール血症、高トリグリセリド血症、および高血圧)を含むメタボリックシンドローム、甲状腺機能低下症、尿毒症、ならびに(急速な体重増加を含む)体重増加に関連した他の症状、体重減少、体重減少の維持、または体重減少後の体重再増加の危険性などの、体重に関連した障害が挙げられるが、それらに限定されない。特定の典型的な脂質代謝障害としては、糖尿病、高血圧、およびインスリン抵抗性に関連した多囊胞性卵巣症候群などの、関連した血糖障害が挙げられるがそれらに限定されない。特定の典型的な脂質代謝障害としては、腎臓移植、ネフローゼ症候群、クッシング症候群、末端肥大症、全身性エリテマトーデス、異常グロブリン血症、脂肪異常症、糖原病I型、およびアジソン病が挙げられるが、それらに限定されない。  
30  
40

#### 【0152】

脂質代謝障害としては、二次性高トリグリセリド血症(I、V、およびIV型を含むがそれらに限定されないHTG)が挙げられるがそれらに限定されず、それには、(過度の飲酒、体重増加、および肥満を含むがそれらに限定されない)食生活によるHTG、(外因性エストロゲン、タモキシフェン、レチノイド、チアジド、クロルタリドン、ベータ遮断薬、(リトナビルを含むがそれに限定されない)プロテアーゼ阻害剤、プロポフォール注入、および非経口脂質注入を含むがそれらに限定されない)薬物によるHTG、(糖尿病、妊娠、慢性腎

不全、甲状腺機能低下症、家族性高脂血症、および膵炎を含むがそれらに限定されない)代謝障害によるHTGが含まれるが、それらに限定されない。

#### 【0153】

脂質代謝障害としては、血管アクセス機能障害に関連した脂質障害；(前立腺癌、腎臓癌、肝臓癌、乳癌、卵巣癌、肺癌および膵臓癌を含むがそれらに限定されない)新生組織形成を含むがそれに限定されない増殖性疾患に関連した脂質障害；例えば、感染症、創傷治癒、免疫不全症候群(AIDSおよび異常分化に関連したそれらの症候群を含むがそれらに限定されない他の症候群)、瘢痕形成、アテローム性動脈硬化症、再狭窄および移植片拒絶反応、自己免疫疾患、ならびに慢性炎症性疾患および障害に関連するものを含むがそれらに限定されない炎症に応答して起こる障害(それらには、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスを含むがそれらに限定されない障害、ならびに、クローン病、大腸炎、炎症性腸疾患、ライム病を含む反応性関節炎、インスリン依存性糖尿病、臓器特異的自己免疫、多発性硬化症、橋本甲状腺炎およびグレイヴィズ病、シェーグレン症候群、接触性皮膚炎、乾癬、強皮症、移植片対宿主拒絶反応、サルコイドーシス、マラリア、敗血症、膵炎、アレルギー(喘息およびアレルギー性鼻炎を含むがそれに限定されない)を含むがそれらに限定されないアトピー性症状、食品アレルギーを含むがそれに限定されない消化管アレルギー、好酸球増加症、結膜炎および糸球体腎炎、血液凝固障害、内毒素性ショックならびに、睡眠時無呼吸および眠気などの他の炎症介在性障害を含むがそれらに限定されない障害が含まれるがそれらに限定されない)が挙げられるが、それらに限定されない。

#### 【0154】

特定の実施形態では、有効量のANGPTL3に対する抗体および少なくとも1つの更なる治療薬の投与を含む、脂質代謝障害を治療するための方法が提供される。このような特定の実施形態では、有効量の更なる治療薬は投与される。特定の実施形態では、更なる治療薬はANGPTL3に対する別の抗体である。特定の実施形態では、更なる治療薬はANGPTL4に対する中和抗体である。例えば、PCT公報WO 2006/074228を参照されたい。特定の実施形態では、更なる治療薬は非抗体の薬剤である。特定の実施形態では、更なる治療薬は、1つ以上の血清脂質レベルを低下させる薬剤である。特定の代表的な更なる治療薬としては、HMG-CoA還元酵素阻害剤(例えば、ロバスタチン、シンバスタチン、プラバスタチン、およびフルバスタチン)などのコレステロール合成阻害剤(スタチン)；コレスチラミンおよび他の樹脂などの胆汁捕捉剤；ナイアシンなどのVLDL分泌阻害剤；プロブコールなどの脂溶性抗酸化剤；アシルCoA コlesteroールアシルトランスフェラーゼ阻害剤；ファルネソイドX受容体アンタゴニスト；ステロール調節結合タンパク質切断活性化タンパク質(SCAP)活性化剤；ミクロゾームトリグリセリド転移タンパク質(MTP)阻害剤；ならびにApoE関連ペプチドが挙げられるが、それらに限定されない。特定の実施形態では、更なる治療薬は、高比重リポタンパク質(HDL)を上昇させる薬剤である。このような薬剤の非限定的な例には、コレステリルエステル転送タンパク質(CETP)阻害剤が含まれるがそれに限定されない。

#### 【0155】

特定の実施形態では、有効量のANGPTL3に対する抗体、ならびに製薬上許容されうる希釈剤、担体、可溶化剤、乳化剤、防腐剤および/またはアジュバントを含有する医薬組成物が提供される。特定の実施形態では、有効量のANGPTL3に対する抗体ならびに有効量の少なくとも1つの更なる治療薬を、製薬上許容されうる希釈剤、担体、可溶化剤、乳化剤、防腐剤および/またはアジュバントとともに含有する医薬組成物が提供される。特定の実施形態では、少なくとも1つの更なる治療薬は上述のものから選択される。

#### 【0156】

特定の実施形態では、医薬組成物のための製剤材料は、用いられる用量および濃度において受容者に対して毒性を持たない。

#### 【0157】

特定の実施形態では、医薬組成物は、例えば、組成物のpH、浸透圧、粘性、透明度、色、等張性、匂い、無菌性、安定性、溶解または放出の速度、吸収性または透過性を改良、

10

20

30

40

50

維持、または保存するための製剤材料を含有する。特定の実施形態では、適切な製剤材料としては、アミノ酸(例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンおよびリジン)；抗菌剤；抗酸化剤(例えば、アスコルビン酸、亜硫酸ナトリウムおよび亜硫酸水素ナトリウム)；バッファー(例えば、ホウ酸塩、重炭酸塩、Tris-HCl、クエン酸塩、リン酸塩および他の有機酸)；充填剤(例えば、マンニトールおよびグリシン)；キレート剤(例えば、エチレンジアミン四酢酸(EDTA))；錯化剤(例えば、カフェイン、ポリビニルピロリドン、ベータ-シクロデキストリン、およびヒドロキシプロピル-ベータ-シクロデキストリン)；增量剤；単糖類、二糖類、および他の炭水化物(例えば、グルコース、マンノースおよびデキストリン)；タンパク質(例えば、血清アルブミン、ゼラチンおよび免疫グロブリン)；着色料、着香料、および賦形剤；乳化剤；親水性ポリマー(例えば、ポリビニルピロリドン)；低分子量ポリペプチド；塩を形成する対イオン(例えば、ナトリウム)；防腐剤(例えば、塩化ベンザルコニウム、安息香酸、サリチル酸、チメロサール、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロルヘキシジン、ソルビン酸および過酸化水素)；溶媒(例えば、グリセリン、プロピレングリコールおよびポリエチレングリコール)；糖アルコール(例えば、マンニトールおよびソルビトール)；懸濁化剤；界面活性剤または湿潤剤(例えば、ブルロニック、PEG、ソルビタンエステル、ポリソルベート(例えば、ポリソルベート20およびポリソルベート80)、トリトン、トロメタミン、レシチン、コレステロール、およびチロキサポール)；安定性向上剤(例えば、スクロースおよびソルビトール)；等張性向上剤(例えば、ハロゲン化アルカリ金属(例えば、塩化ナトリウムまたはカリウム)、マンニトール、およびソルビトール)；送達ビヒクル；希釈剤；賦形剤；ならびに製薬アジュvantが挙げられるが、それらに限定されない(Remington's Pharmaceutical Sciences, 第18版、A.R. Gennaro, 編、Mack Publishing Company (1990))。

#### 【0158】

特定の実施形態では、ANGPTL3に対する抗体または他の治療用分子は、半減期を延長するビヒクルに結合される。特定の代表的な半減期を延長するビヒクルが当技術分野において知られている。特定のこのようなビヒクルとしては、Fcドメイン、ポリエチレングリコール、およびデキストランが挙げられるが、それらに限定されない。特定のこのようなビヒクルは、例えば、公開されたPCT出願WO 99/25044に記載される。

#### 【0159】

特定の実施形態では、最適な医薬組成物は、例えば、目的とする投与経路、送達形式、および望ましい用量に応じて、当業者により決定されるであろう。例えば、上記のRemington's Pharmaceutical Sciencesを参照されたい。特定の実施形態では、このような組成物は、中和抗体の物理的状態、安定性、in vivoでの放出速度、in vivoでのクリアランス速度に影響を及ぼしうる。

#### 【0160】

特定の実施形態では、医薬組成物中の主要なビヒクルまたは担体は、水性もしくは非水性の性質のいずれかであります。例えば、特定の実施形態では、適切なビヒクルまたは担体は、注射用の水、生理食塩水、または人工脳脊髄液であり、場合により、非経口投与用の組成物において一般的な他の物質が追加されうる。特定の典型的なビヒクルとしては、中性緩衝生理食塩水および血清アルブミンを配合した生理食塩水が挙げられるがそれらに限定されない。特定の実施形態では、医薬組成物は、約pH 7.0～8.5のTrisバッファー、または約pH 4.0～5.5の酢酸バッファーを含有し、それは更にソルビトールまたは適切なその代替物を含有しうる。特定の実施形態では、少なくとも1つの更なる治療薬を含む、またはそれを含まないANGPTL3に対する抗体を含有する組成物は、望ましい純度を有する選択された組成物と任意の製剤物質(Remington's Pharmaceutical Sciences、上記)とを混合することによって、凍結乾燥固体もしくは水溶液の形状として、保存用に調製されうる。特定の実施形態では、少なくとも1つの更なる治療薬を含む、またはそれを含まないANGPTL3に対する抗体を含有する組成物は、スクロースなどの適切な賦形剤を用いて凍結乾燥物として処方されうる。

10

20

30

40

50

## 【0161】

特定の実施形態では、医薬組成物は非経口投与のために選択される。特定の実施形態では、医薬組成物は、吸入のため、または、経口のような消化管を介した送達のために選択される。製薬上許容されうる組成物を調製するための特定の代表的な技術は、当業者の技術の範囲内である。

## 【0162】

特定の実施形態では、製剤成分は、投与部位に許容されうる濃度で存在する。特定の実施形態では、バッファーは組成物を生理的なpHまたはそれよりわずかに低いpHに維持するために使用され、通常、約5～8のpH範囲内である。

## 【0163】

特定の実施形態では、非経口投与が企図される場合、医薬組成物は、発熱物質を含まず非経口的に許容されうる水溶液の形状でありえ、製薬上許容されうるビヒクル中に更なる治療薬を含む、またはそれを含まないANGPTL3に対する望ましい抗体を含有している。特定の実施形態では、非経口注射用のビヒクルは滅菌蒸留水であり、その中に、少なくとも1つの更なる治療薬を含む、またはそれを含まないANGPTL3に対する抗体が滅菌等張液として処方され、適切に保存される。特定の実施形態では、製剤は、所望の分子の、注射可能なマイクロスフェア、生体分解性粒子、高分子化合物(例えばポリ乳酸もしくはポリグリコール酸など)、ビーズまたはリポソームなどの物質との处方を含むことができ、それは、その後デポー注射によって送達されうる生成物の制御放出または持続放出を提供しうる。特定の実施形態では、ヒアルロン酸が使用されてもよく、循環血液中での持続時間を向上させる作用を持ちうる。特定の実施形態では、所望の分子を導入するために、埋め込み型の薬物送達装置が使用されうる。

10

20

## 【0164】

特定の実施形態では、医薬組成物は吸入用に処方されうる。特定の実施形態では、少なくとも1つの更なる治療薬を含む、またはそれを含まないANGPTL3に対する抗体は、吸入用の乾燥粉末として処方されうる。特定の実施形態では、少なくとも1つの更なる治療薬を含む、またはそれを含まないANGPTL3に対する抗体を含有する吸入溶液が、エアロゾル送達のための推進剤とともに処方されうる。特定の実施形態では、溶液は噴霧されうる。

## 【0165】

特定の実施形態では、製剤は経口投与されうる。特定の実施形態では、この方法で投与される、少なくとも1つの更なる治療薬を含む、またはそれを含まないANGPTL3に対する抗体は、錠剤およびカプセルなどの固体剤形の配合に通常使用される担体とともに、またはそれを含まずに処方されうる。特定の実施形態では、カプセルは、消化管内で生体利用性を最大にし、浸透前の分解を最小にする時点で製剤の有効成分を放出するように設計されうる。特定の実施形態では、任意の更なる治療薬を含む、またはそれを含まないANGPTL3に対する抗体の吸収を促進するために、少なくとも1つの更なる物質が追加され得る。特定の実施形態では、希釈剤、着香料、低融点ワックス、植物油、滑沢剤、懸濁化剤、錠剤崩壊剤、および/または結合剤もまた使用されうる。

30

## 【0166】

特定の実施形態では、医薬組成物は、錠剤の製造に適した毒性を持たない賦形剤との混合物中に、少なくとも1つの更なる治療薬を含む、またはそれを含まない有効量のANGPTL3に対する抗体を含有する。特定の実施形態では、錠剤を滅菌水または別の適切なビヒクルに溶解することによって、溶液が単位投与剤型に調製されうる。特定の典型的な賦形剤としては、不活性希釈剤(例えば、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、重炭酸ナトリウム、ラクトース、およびリン酸カルシウム)；結合剤(例えば、デンプン、ゼラチン、およびアラビアゴム)；ならびに滑沢剤(例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、およびタルク)が挙げられるが、それらに限定されない。

40

## 【0167】

更なる医薬組成物は当業者にとって明白であり、持続送達または制御送達製剤中に少なくとも1つの更なる治療薬を含む、またはそれを含まないANGPTL3に対する抗体を含有す

50

る製剤を含んでいる。特定の代表的な持続送達または制御送達製剤としては、リポソーム担体、生体分解性微粒子、多孔質ビーズ、およびデポー注射が挙げられるが、それらに限定されない。特定の製剤を調製するための特定の代表的な技術は、当業者に知られている。特定の実施形態では、持続放出製剤は、例えばフィルムまたはマイクロカプセルなどの造形品の形での半透性ポリマーマトリックスを含みうる。特定の代表的な持続放出マトリックスとしては、ポリエステル、ヒドロゲル、ポリ乳酸(例えば、米国特許第3,773,919号およびEP 058,481参照)、L-グルタミン酸とガンマエチル-L-グルタミン酸との共重合体(例えば、Sidmanら(1983) Biopolymers 22:547-556参照)、ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)(例えば、Langerら(1981) J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277およびLanger (1982) Chem. Tech. 12:98-105参照)、エチレン酢酸ビニル(Langerら、上記)、ならびにポリ-D(-)-3-ヒドロキシ酪酸(EP 133,988)が挙げられるが、それらに限定されない。特定の実施形態では、持続放出組成物はリポソームを含んでもよく、それは、特定の実施形態では、当技術分野において既知の任意のいくつかの方法によって調製され得る。例えば、Eppsteinら(1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688-3692; EP 036,676; EP 088,046; およびEP 143,949を参照されたい。10

#### 【0168】

特定の実施形態では、*in vivo*投与のために使用される医薬組成物は通常滅菌される。特定の実施形態では、これは滅菌したる過膜を介したる過によって達成されうる。特定の実施形態において、組成物が凍結乾燥される場合、この方法を用いた滅菌は凍結乾燥および再構成の前または後のいずれかに実施されうる。特定の実施形態では、非経口投与のための組成物は凍結乾燥された形または溶液で保存されうる。特定の実施形態では、非経口組成物は通常、滅菌した接続口を有する容器、例えば、皮下注射針によって貫通可能な栓を有する静脈注射用溶液のバッグまたはバイアルに収容される。20

#### 【0169】

特定の実施形態では、医薬組成物が製剤化された時点で、それは、溶液、懸濁液、ゲル、乳液、固体として、または乾燥粉末もしくは凍結乾燥粉末として滅菌バイアル中に保存されうる。特定の実施形態では、このような製剤は、すぐに使用可能な形状または投与前に再構成される形状(例えば、凍結乾燥)のいずれかで保存されうる。

#### 【0170】

特定の実施形態では、単回投与ユニットを製造するためのキットが提供される。特定の実施形態では、キットは、それぞれ乾燥タンパク質を入れた第一の容器と水性製剤を入れた第二の容器の両方を含みうる。特定の実施形態では、单一または複数の隔室を有する事前に充填された注射器(例えば、液体注射器およびリオシリング(Iosyringe))を含むキットが含まれる。30

#### 【0171】

特定の実施形態では、治療に用いられるべき、少なくとも1つの更なる治療薬を含む、またはそれを含まないANGPTL3に対する抗体を含有する医薬組成物の有効量は、例えば、治療の状況および目的によって異なるであろう。当業者は、特定の実施形態に応じて治療に適した投与量レベルが、一つには、送達される分子、少なくとも1つの更なる治療薬を含む、またはそれを含まないANGPTL3に対する抗体が使用されている適応症、投与経路、ならびに患者の大きさ(体重、体表面もしくは臓器の大きさ)および/または状態(年齢および全体的な健康状態)によって異なることを理解するであろう。特定の実施形態では、最適な治療効果を得るために、臨床医は投与量の力価を検査し、投与経路を変更しうる。特定の実施形態では、標準的な投与量は、上述の要因に応じて、患者の体重kgあたり約0.1 μg～約100 mgまたはそれ以上でありうる。特定の実施形態では、投与量は、0.1 μg/kg～約100 mg/kgまで；1 μg/kg～約100 mg/kgまで；または5 μg/kg～約100 mg/kgまでの範囲でありえ、前記の任意の両端値の間のすべての点を含みうる。特定の実施形態では、投与量は、約10 mg/kg体重～約60 mg/kg体重の間である。特定の実施形態では、投与量は、約10 mg/kg体重、約20 mg/kg体重、約30 mg/kg体重、約40 mg/kg体重、約50 mg/kg体重、または約60 mg/kg体重である。4050

**【 0 1 7 2 】**

特定の実施形態では、ANGPTL3に対する中和抗体のヒト用量は、マウスにおける同抗体の有効用量に基づいて決定される。特定の実施形態では、ANGPTL3に対する中和抗体のヒト用量は、「Guidance for Industry: Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers」、米国保健社会福祉省、食品医薬品局およびFDA医薬品評価センター(CDER)、2005年7月(Pharmacology and Toxicology)を用いて決定される。特定の実施形態では、ANGPTL3に対する中和抗体のヒト用量は、0.07 mg/kg ~ 7 mg/kgである。特定の実施形態では、ANGPTL3に対する中和抗体のヒト用量は、0.1 mg/kg ~ 5 mg/kgである。特定の実施形態では、ANGPTL3に対する中和抗体のヒト用量は、0.1 mg/kg ~ 2 mg/kgである。各種の実施形態では、ANGPTL3に対する中和抗体は、1週間あたり2回、1週間あたり1回、2週間毎に1回、または1ヶ月あたり1回、患者に投与される。

10

**【 0 1 7 3 】**

特定の実施形態では、適切な投与量は、例えば動物実験に基づいて当業者により決定され得る。

**【 0 1 7 4 】**

特定の実施形態では、投与頻度は、ANGPTL3に対する抗体、および、該当する場合には、使用される製剤中の任意の更なる治療薬の薬物動態パラメーターを考慮に入れるであろう。特定の実施形態では、臨床医は、投与量が望ましい効果を達成するまで、組成物を投与するであろう。特定の実施形態では、そのために組成物は、単回投与として、または経時的な(同一量の目的とする分子を含有してもしなくてもよい)2回以上の投与として、または埋め込み型装置もしくはカテーテルを介した持続注入として投与されうる。特定の実施形態では、適切な投与量の更なる改善は当業者によって日常的に行われ、彼らによって日常的に行われる作業の範囲内である。特定の実施形態では、適切な投与量は、適切な用量応答データの使用によって確定されうる。特定の実施形態では、患者は、ANGPTL3に対する抗体を含有する医薬組成物の1回の投与を受ける。特定の実施形態では、患者は、ANGPTL3に対する抗体を含有する医薬組成物の、1日あたり1回、2回、3回、または4回の投与を受ける。特定の実施形態では、患者は、ANGPTL3に対する抗体を含有する医薬組成物の、1週間あたり1回、2回、3回、4回、5回または6回の投与を受ける。特定の実施形態では、患者は、ANGPTL3に対する抗体を含有する医薬組成物の、1ヶ月あたり1回または2回の投与を受ける。

20

**【 0 1 7 5 】**

特定の実施形態では、医薬組成物の投与経路は既知の方法と一致し、例えば、経口で、静脈内、腹腔内、脳内(実質内)、脳室内、筋内、眼内、動脈内、門脈内、または病巣内への注射を介して；持続放出システムもしくは埋め込み型装置による。特定の実施形態では、組成物は、ボーラス注射によってまたは持続的に点滴によって、または埋め込み型装置によって投与されうる。

30

**【 0 1 7 6 】**

特定の実施形態では、組成物は、目的とする分子が吸着もしくは封入された膜、スポンジまたは別の適切な素材の移植によって局所投与されうる。特定の実施形態において、埋め込み型装置が用いられる場合、装置は任意の適切な組織または臓器に移植され、目的とする分子の送達は拡散、持続放出型ボーラス、または持続投与でありうる。

40

**【 0 1 7 7 】**

特定の実施形態では、少なくとも1つの更なる治療薬を含む、またはそれを含まないANGPTL3に対する抗体を含有する医薬組成物のex vivoでの使用が望ましいかもしれない。このような特定の場合、患者から摘出された細胞、組織および/または臓器を、少なくとも1つの更なる治療薬を含む、またはそれを含まないANGPTL3に対する抗体を含有する医薬組成物に触れさせ、その後、該細胞、組織および/または臓器を再度患者に移植する。

**【 0 1 7 8 】**

特定の実施形態では、少なくとも1つの更なる治療薬を含む、またはそれを含まないAN

50

GPTL3に対する抗体は、本明細書に記載されたような方法を用いて、そのポリペプチドを発現および分泌するように遺伝子操作された特定の細胞を移植することによって送達される。特定の実施形態では、このような細胞は動物細胞もしくはヒト細胞でありえ、自己細胞、異種(heterologous)細胞、または異種(xenogeneic)細胞でありうる。特定の実施形態では、細胞は不死化されうる。特定の実施形態では、免疫反応の可能性を減少させるために、細胞は周囲の組織の浸潤を避けるように封入されうる。特定の実施形態では、封入素材は通常、タンパク質生成物の放出を可能にするが、患者の免疫系によるもしくは周囲の組織由来の他の有害な因子による細胞の破壊を防ぐ、生体適合性のある、半透性ポリマーの封入体または膜である。

【0179】

10

#### H. 特定の検出および診断方法

特定の実施形態では、ANGPTL3に対する抗体はin vivoまたはin vitroにおけるANGPTL3の存在を検出するために使用される。特定の実施形態では、in vivoにおけるANGPTL3のレベルは、脂質代謝障害などの病状と相関し、従ってその病状の診断を可能にする。ANGPTL3に対する抗体によって診断されうる特定の典型的な病状は、上記に記載されている。

【0180】

20

特定の代表的な検出方法は当技術分野において知られており、ELISA、ラジオイムノアッセイ、免疫プロット、ウェスタンプロット、免疫蛍光検査法、および免疫沈降が挙げられるが、それらに限定されない。特定の実施形態では、ANGPTL3に対する抗体は、例えば、抗体を標識に結合させることによってそれらを直接検出しうるように修飾される。特定の代表的な標識としては、蛍光団、発色団、放射性原子、高電子密度試薬、酵素、およびリガンドが挙げられるが、それらに限定されない。特定の実施形態では、ANGPTL3に対する抗体は、ある種の抗体に結合する標識された「二次」抗体(例えば、ヤギ抗マウス抗体)を用いることによって検出される。

【0181】

#### I. 特定のANGPTL3アンタゴニストおよびアゴニストのスクリーニング方法

特定の実施形態では、ANGPTL3に結合する薬剤のスクリーニング方法が提供される。特定の実施形態では、スクリーニング方法は、ANGPTL3を適切な条件下で1つ以上の薬剤候補に暴露すること、およびANGPTL3と該1つ以上の薬剤候補との結合を評価することを含む。特定の実施形態では、スクリーニング方法は、競合的結合アッセイにおけるANGPTL3に対する抗体の使用を含む。このような特定の実施形態では、ANGPTL3に対する抗体およびANGPTL3を含有する第一結合混合物が用いられる。第一結合混合物におけるANGPTL3と抗体との間の結合量( $M_0$ )が測定される。抗体、ANGPTL3、およびスクリーニングされるべき薬剤を含有する第二結合混合物もまた用いられる。第二結合混合物におけるANGPTL3と抗体との間の結合量( $M_1$ )が測定される。第一結合混合物における結合量は、例えば、 $M_1/M_0$ 比の計算によって第二結合混合物における結合量と比較される。第二結合混合物におけるANGPTL3に対する抗体の結合量が第一結合混合物におけるANGPTL3に対する抗体の結合量より少ない場合、薬剤はANGPTL3に結合できると考えられる。特定の実施形態では、ANGPTL3に結合する薬剤は、抗体のANGPTL3への結合を少なくとも約10%(すなわち、 $M_1/M_0 < 0.9$ )、少なくとも約30%(すなわち、 $M_1/M_0 < 0.7$ )、少なくとも約50%(すなわち、 $M_1/M_0 < 0.5$ )、少なくとも約70%(すなわち、 $M_1/M_0 < 0.3$ )、少なくとも約80%(すなわち、 $M_1/M_0 < 0.2$ )、少なくとも約90%(すなわち、 $M_1/M_0 < 0.1$ )、または少なくとも約95%(すなわち、 $M_1/M_0 < 0.05$ )減少させる。

30

【0182】

40

特定の実施形態では、上述の任意のスクリーニング方法に使用されるANGPTL3は、ANGPTL3のN末端のコイルドコイルドメインまたはその断片である。ANGPTL3のN末端のコイルドコイルドメイン内に結合する特定の抗体が血清トリグリセリドおよび血清コレステロールレベルをin vivoで低下させ得るという出願人の観察に基づき、スクリーニング法によってANGPTL3のN末端のコイルドコイルドメインに結合すると同定された薬剤(例えば、抗体または非抗体性の薬剤)は、ANGPTL3活性のアンタゴニスト候補である。特定の実施形態

50

では、スクリーニング法によってANGPTL3のN末端のコイルドコイルドメイン内のSP1領域に結合すると同定された薬剤(例えば、抗体または非抗体性の薬剤)は、ANGPTL3活性のアンタゴニスト候補である。

#### 【0183】

特定の実施形態では、アゴニスト活性は、アンタゴニスト候補がin vivoまたはin vitroアッセイにおいてANGPTL3活性を中和することによって確認される。特定の典型的なアッセイは本明細書に記載されている。当業者は、本明細書に記載されるアッセイおよび／または当技術分野において既知のアッセイから適切なアッセイを選択および／または改変することができる。特定の実施形態では、ANGPTL3のアンタゴニストは脂質代謝障害の治療に使用される。

10

#### 【0184】

特定の実施形態では、ANGPTL3のフィブリノーゲンドメインに結合する薬剤のスクリーニング方法が提供される。特定の実施形態では、ANGPTL3のフィブリノーゲンドメイン内に結合する薬剤はANGPTL3活性を増強させ得る。したがって、スクリーニング方法によってANGPTL3のフィブリノーゲンドメインに結合すると同定された薬剤(例えば、抗体または非抗体性の薬剤)は、ANGPTL3活性のアゴニスト候補である。特定の実施形態では、アゴニスト活性は、アゴニスト候補がin vitroまたはin vivoアッセイにおいてANGPTL3活性を増強することを実証することによって確認される。当業者は、当技術分野において既知のアッセイおよび／または本明細書に記載されるアッセイに基づき適切なアッセイを選択および／または改変することができる。特定の実施形態では、ANGPTL3のアゴニストは、神経性食欲不振症、神経性過食症、ならびに、癌、囊胞性線維症、およびAIDSなどの疾患に関連した悪液質(消耗)などの過度の体重減少に関連したある種の疾患の治療に使用される。

20

#### 【0185】

ANGPTL3への結合についてスクリーニングされ得る特定の典型的な薬剤としては、抗体、低分子(例えば、有機化合物、有機金属化合物、有機化合物または有機金属化合物の塩、単糖類、アミノ酸、ヌクレオシド、およびヌクレオチド)、アプタマー、ペプチド、ならびにペプチド模倣薬が挙げられるが、それらに限定されない。特定の典型的なペプチドとしては、ランダムペプチドライブラリー(例えば、Lamら(1991) Nature 354:8.2-84; Houghtenら(1991) Nature 354:84-86参照)の構成要素ならびにD-および／またはL-立体配置アミノ酸で作製されたコンビナトリアルケミストリー由来の分子ライブラリーの構成要素を含むがそれらに限定されない可溶性ペプチド；ならびに無作為のまたは部分的に縮重した、方向性のあるリン酸化ペプチドライブラリー(例えば、Songyang (1993) Cell 72:767-778参照)の構成要素を含むがそれに限定されないリン酸化ペプチドが挙げられる。

30

#### 【0186】

特定の実施形態では、コンピュータモデリングおよび検索技術が、ANGPTL3に結合する化合物の同定、または既に同定された化合物の改良を可能にする。特定の代表的な分子モデルシステムとしては、CHARMMおよびQUANTAプログラム(Polygen Corporation, Waltham, MA)が挙げられるがそれらに限定されない。CHARMMはエネルギー最小化および分子動力学関数を実行する。QUANTAは、分子構造の、構築、グラフィックモデリングおよび解析を実行する。QUANTAは、分子同士の挙動の、相互作用的な構築、改変、視覚化、および解析を可能にする。

40

#### 【0187】

##### J. ANGPTL3の核酸アンタゴニスト

特定の実施形態では、ANGPTL3をコードする核酸の発現を減少させる単離核酸が提供される。特定の実施形態では、ANGPTL3をコードする核酸はマウスANGPTL3をコードする。特定の実施形態では、ANGPTL3をコードする核酸はヒトANGPTL3をコードする。特定の実施形態では、単離核酸はアンチセンス核酸である。このような特定の実施形態では、アンチセンス核酸は、RNaseHに基づく機構によって標的mRNAの分解を促進する一本鎖DNA分子である。特定の実施形態では、アンチセンス核酸は約8～30ヌクレオチドの長さ(両端値の間のすべての点を含む)のオリゴヌクレオチドである。特定の実施形態では、アンチセンス核

50

酸は約18~26ヌクレオチドの長さのオリゴヌクレオチドである。

#### 【0188】

特定の実施形態では、アンチセンス核酸は、RNA干渉(RNAi)に基づく機構によって標的核酸の発現を減少させるRNA分子を含む。RNAiに適した特定の代表的なRNA分子としては、低分子干渉RNA(siRNA)、ミクロRNA(mRNA)、小型非コードRNA(tiny non-coding RNA: tncRNA)、および低分子調節RNA(smrna)が挙げられるが、それらに限定されない。特定の代表的なRNAi機構およびRNAiにおいて使用するためのRNA分子の総説については、例えば、Novinaら(2004) Nature 430:161-164を参照されたい。

#### 【0189】

特定の実施形態では、ANGPTL3をコードする核酸の発現を減少させるsiRNAが提供される。  
特定の実施形態では、siRNAは約18~26ヌクレオチドの長さ(両端値の間のすべての点を含む)のオリゴヌクレオチドである。特定の実施形態では、siRNAは約20~24ヌクレオチドの長さのオリゴヌクレオチド、または約21~23ヌクレオチドの長さのオリゴヌクレオチドである。特定の実施形態では、siRNAは二本鎖RNAである。特定の実施形態では、siRNAは、siRNAのアンチセンス鎖に相補的な標的mRNA分子の分解を誘導するであろう。例えば、Novinaら(2004) Nature 430:161-164を参照されたい。

10

#### 【0190】

アンチセンスDNA分子またはsiRNAなどのアンチセンス核酸の活性は、しばしば標的mRNAの二次構造の影響を受ける。例えば、Vickersら(2003) J. Biol. Chem. 278:7108-7118を参考されたい。従って、特定の実施形態では、塩基対合に使用可能な標的mRNAの領域に相補的なアンチセンス核酸が選択される。特定の実施形態では、標的mRNAの適切な領域は、「遺伝子歩行(gene walk)」の実施、例えば、多数のアンチセンスオリゴヌクレオチドを、標的mRNAの様々な領域にハイブリダイズするそれらの能力について、および/または標的mRNA発現を減少させるそれらの能力について、実験的に検査することによって同定される。例えば、Vickersら(2003) J. Biol. Chem. 278:7108-7118; Hillら(1999) Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 21:728-737を参考されたい。特定の実施形態では、標的mRNAのどのような他の領域にもハイブリダイズしない標的mRNAの領域を同定するための、mRNA二次構造予測プログラムまたは関連アルゴリズムを用いて、標的mRNAの適切な領域を同定する。例えば、Hillら(1999) Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 21:728-737を参考されたい。特定の実施形態では、標的mRNAの適切な領域を同定するために、上記方法の両方の組み合わせが用いられる。例えば、Hillら(1999) Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 21:728-737を参考されたい。

20

#### 【0191】

特定の実施形態では、ANGPTL3をコードする核酸の発現を減少させることによってANGPTL3活性を低下させる方法が提供される。特定の実施形態では、その方法は、*in vitro*または*in vivo*の細胞においてANGPTL3をコードする核酸の発現を減少させることを含む。特定の実施形態では、その方法は、ANGPTL3をコードする核酸の発現を減少させるアンチセンス核酸を、*in vitro*または*in vivo*の細胞に投与することを含む。特定の実施形態では、ANGPTL3をコードする核酸はヒトANGPTL3をコードする。特定の実施形態では、ANGPTL3をコードする核酸はマウスANGPTL3をコードする。

30

#### 【0192】

特定の実施形態では、上述の障害のような脂質代謝障害を治療する方法が提供される。特定の実施形態では、その方法は、患者にANGPTL3をコードする核酸の発現を減少させる有効量のアンチセンス核酸を投与することを含む。特定の実施形態では、アンチセンス核酸はANGPTL3をコードする核酸を発現する臓器に送達される。

40

#### 【0193】

ANGPTL3は主に肝臓において発現される。Oike, Y.ら(2005) TRENDS Mol. Med. 11(10):473-479。マウスにおいて、発現は短期間の絶食の影響を明らかに受けない。Oike, Y.ら(2005) TRENDS Mol. Med. 11(10):473-479。しかしながら、特定のマウスの肥満および糖尿病モデル(例えば、db/dbおよびob/dbマウス、ならびにストレプトゾトシン誘導I型糖尿

50

病を有するマウス)において、コレステロールの摂取により発現は増加する。このことは、ANGPTL3が糖尿病の脂質異常およびメタボリックシンドロームの一因となり得ることを示唆している。Oike, Y. ら(2005) TRENDS Mol. Med. 11(10):473-379。従って、特定の実施形態では、アンチセンス核酸は、肝臓に送達される。アンチセンス核酸の *in vivo*投与、および肝臓などの特定の臓器への持続送達を含む *in vivo*でのアンチセンス核酸の持続送達のための特定の代表的な指針は、例えば、Khanら(2004) J. Drug Targeting 12:393-404において提供される。特定の実施形態では、持続送達は、生分解性ポリマーによって封入された、または別の方法で含有されたアンチセンス核酸を投与することによって達成される。例えば、特定の実施形態では、アンチセンス核酸はポリグリコール酸(PLGA)マイクロスフェア(例えば、0.5~20 μm; 3000 MW)内に含有されうる。特定の実施形態では、アンチセンス核酸は親油性成分とコンジュゲートされる(Khanら(2004) J. Drug Targeting 12:393-404参照)。

#### 【実施例】

##### 【0194】

##### VI. 実施例

###### A. マウス飼育および食餌研究

マウス研究は、連邦政府の指針に沿って行った。下に示すように、マウスを12時間明/12時間暗の固定周期にて24 hで飼育し、水および齧歯類用の飼料(chow)(脂質由来カロリー22%)(製品番号5021; Purina, St. Louis, MO)を自由に摂取できるようにした。以下で「絶食状態」にあると称するマウスには、飼料を16時間与えなかった。

##### 【0195】

###### B. マウスにおけるヒトANGPTL3の *in vivo*過剰発現

全長ヒトANGPTL3(配列番号6)をコードするcDNAをアデノウイルスベクターpFADのAd E1欠失領域内に挿入して、それにより該cDNAをサイトメガロウイルスプロモーターの制御下に配置した。Cell Biology: A Laboratory Handbook 第1巻, pp. 500-512 (J.E. Celis編, 第2版 1998)中のHittら、「Construction and propagation of human adenovirus vectors」を参照されたい。得られた構築物Ad5-hAngptl3Tを、CHO細胞に感染させるために使用した。対照として、空のAd5ウイルスもCHO細胞に感染させるために使用した。ヒトANGPTL3の発現は、感染CHO細胞の抽出物のウェスタンプロットにより確認した。

##### 【0196】

Ad5-hAngptl3Tを、以下の用量にてC57BL/6Jマウスに尾静脈から注射した:  $2 \times 10^9$  vp、 $1 \times 10^9$  vp、 $5 \times 10^8$  vp、 $2 \times 10^8$  vp。対照として、空のAd5ベクターを、 $2 \times 10^9$  vpにてC57BL/6Jマウスに尾静脈から注射した。各グループには5匹のマウスがいた。アデノウイルス感染マウス由来の血液サンプルを4日後(この期間中、マウスには通常通りに餌を与えた(絶食させなかった))に採血した。血清中のトリグリセリドレベルは、Cobas Integra 500 (Roche, Basel, スイス)を用いて測定した。

##### 【0197】

結果を図8に示す。この実験において、 $2 \times 10^9$  vpまたは $1 \times 10^9$  vpのAd5-hAngptl3Tを注射したマウスは、空のAd5ベクター対照を注射したマウスと比べて有意に増加した血清トリグリセリドレベルを示した。

##### 【0198】

###### C. マウスANGPTL3およびヒトANGPTL3の製造と精製

組換えマウスANGPTL3を発現させるために、CHO細胞に $1.5 \times 10^{11}$  vpの組換えアデノウイルスAd5-mAngptl3Tを感染させた。Ad5-mAngptl3Tは、mANGPTL3T(配列番号2)と呼ばれる、C末端にHis<sub>6</sub>タグを有するマウスANGPTL3(グリシン残基がANGPTL3とHis<sub>6</sub>タグの間に含まれる)を発現する。16~24時間後に、培地を無血清培地(EX-CELL 325-PF CHO培地, 14335, JRH, Lenexa, KS)に交換した。24~36時間ごとに、条件培地を回収し、新鮮な無血清培地と交換し、合計5回の回収を行った。

##### 【0199】

条件培地(1 L)をニッケルキレート樹脂(R801-01, Invitrogen, Carlsbad, CA)の10~12

10

20

30

40

50

mIカラムに加えた。カラムを5カラム容量の洗浄バッファー(10 mMイミダゾール、20 mM Tris pH 7.8、500 mM NaCl)で洗浄した。結合したmANGPTL3Tを、溶出バッファー(500 mM イミダゾール、20 mM Tris pH 7.8、500 mM NaCl)を用いて溶出させ、一連の1.5 ml画分として回収した。ウェスタンプロットティングおよび簡便な青色染色を用いて回収画分中のmANGPTL3Tの存在を調べた。mANGPTL3Tを含有する画分と一緒にプールし、分注し、次いで-70 °Cで凍結させた。

#### 【0200】

組換えヒトANGPTL3を発現させるために、CHO細胞に $1.5 \times 10^{11}$  vpの組換えアデノウイルスAd5-hAngpt1Tを感染させた。Ad5-hAngpt1Tは、hANGPTL3T(配列番号4)と呼ばれる、C末端にHis<sub>6</sub>タグを有するヒトANGPTL3(グリシン残基がANGPTL3とHis<sub>6</sub>タグの間に含まれる)を発現する。hANGPTL3TをmANGPTL3Tについて上述したようにして発現させ、精製した。

#### 【0201】

##### D. rN'-mANGPTL3TおよびrN'-hANGPTL3Tの製造と精製

マウスANGPTL3のアミノ酸17~240をコードするポリヌクレオチド配列を発現ベクターpET22b(+)(Novagen)にクローニングした。そのベクターはN末端peIBリーダー配列、ならびにC末端Hisタグをコードする。得られた発現ベクターをpET-N'-mANGPTL3Tと呼ぶ。タンパク質に翻訳して、peIB配列の11アミノ酸以外の全部を除去した後に、N'-mANGPTL3Tは配列番号7に記載の配列を有する。その配列は、peIB配列由来の11アミノ酸、それに続くマウスANGPTL3のアミノ酸17~240(表7で下線を施した)、それに続く2アミノ酸リンカーおよびHis<sub>6</sub>タグを含む。

#### 【0202】

同様に、ヒトANGPTL3のアミノ酸20~243をコードするポリヌクレオチド配列を発現ベクターpET22b(+)(Novagen)にクローニングした。そのベクターはN末端peIBリーダー配列、ならびにC末端Hisタグをコードする。得られた発現ベクターをpET-N'-hANGPTL3Tと呼ぶ。タンパク質に翻訳して、peIB配列の11アミノ酸以外の全部を除去した後に、N'-hANGPTL3Tは配列番号8に記載の配列を有する。その配列は、peIB配列由来の11アミノ酸、それに続くヒトANGPTL3のアミノ酸20~243(表7で下線を施した)、それに続く2アミノ酸リンカーおよびHis<sub>6</sub>タグを有する。

#### 【0203】

N'-mANGPTL3TまたはN'-hANGPTL3Tを大腸菌(E. coli)から次のように発現させて精製する。50 μg/mlのクロラムフェニコールおよび100 μg/mlのカルベニシリンを含有するLBの10mlに、pET-N'-mANGPTL3Tで形質転換された大腸菌(E. coli)のコロニーを1つ接種する。この培養物を37 °Cで一晩インキュベートする。次に10 mlの培養物を、抗生素質フリーの500 mlのLBに移し、OD<sub>600</sub>が0.6に達するまで(約2時間)37 °Cでインキュベートする。IPTGを添加して最終濃度1 mMとし、培養物を200 rpmで振とうしながら30 °Cで4時間インキュベートする。次いで培養物を氷上に5分置く。JLA16.25ローター中で8000 rpmで15分の遠心分離により細胞をペレット化させる。次にペレットを50 mlの溶解バッファー(50 mM Tris、pH 7.5、0.5 M NaCl、1% Triton X-100、1×プロテアーゼ阻害剤カクテル(Roche)および0.25 ml PMSF(イソプロパノール中0.1 M))に再懸濁する。その後溶解細胞をJA25.5ローター中で9700 rpmで30分遠心分離する。上清を分離し、SW28ローター中で28,000 rpmにて30分の遠心分離によりさらに上清を清澄化する。次にProbond (Ni)クロマトグラフィー(Invitrogen)を用いて、清澄化された上清から組換えN'-mANGPTL3TまたはN'-hANGPTL3Tを精製することができる。

#### 【0204】

溶解細胞の遠心分離後に残存した不溶性ペレットから組換えN'-mANGPTL3TまたはN'-hANGPTL3Tを精製するために、30 ml溶解バッファーを用いてペレットを洗浄し、JA25.5ローター中で9700 rpmで遠心分離する。洗浄工程を2回繰り返し、合計3回の洗浄を行う。次にペレット由来の不溶性タンパク質を10 mlの変性バッファー(50 mM Tris、pH 8.0、6 M グアニジンHCl)に溶解させる。その後、当該溶液をJA25.5ローター中で28,000 rpmで30分遠心分離する。次に上清を5 ml Probond樹脂カラムに加える。カラムを50 mlの洗浄バッ

10

20

30

40

50

ファー(50 mM Tris、pH 8.0、1 M NaCl、8 Mウレア、15 mM イミダゾール)で洗浄する。洗浄バッファーから再生バッファー(50 mM Tris、pH 8.0、1 M NaCl、0.5% Tween 20)への50 ml濃度勾配を利用して、組換えタンパク質をカラム中でリフォールディングさせる。その後、溶出バッファー(250 mMイミダゾールを含む再生バッファー)を用いて組換えタンパク質を溶出させる。組換えタンパク質を含む画分を回収し、保存バッファー(50 mM Tris、pH 8.0、100 mM NaCl、0.2% Tween 20)に対して透析する。精製N'-mANGPTL3Tまたは精製N'-hANGPTL3Tを等分し、-70°で保存する。

#### 【0205】

##### E. SP1およびSP2-KLHの製造と精製

精製SP1(配列番号9および10)および精製SP2-KLH(配列番号62)は、Sigma Genosys(The Woodlands, Texas)から購入した。ANGPTL3のSP1領域の配列は、マウスとヒトの両方において同一である。SP2-KLHは、システインをSP1のCOOH末端に付加し、次いで、当技術分野において公知の標準的な方法を用いてキーホールリンペットヘモシアニンをシステインを介してペプチドに結合することにより作製した。

#### 【0206】

##### F. Angptl3ノックアウトマウスにおける、ANGPTL3に対するモノクローナル抗体の生成

それぞれ異なる一連の抗原注射を受けている5~8匹ずつのマウスからなる3つのコホート集団を用いて、ヒトおよびマウスANGPTL3の両方と交差反応するモノクローナル抗体をAngptl3ノックアウトマウスにおいて産生させた。コホート集団1を、上に記載した方法で製造および精製したmANGPTL3T(配列番号2)を用いて初回免疫した。コホート集団1を、mANGPTL3Tを用いて4回追加免疫した。mANGPTL3Tを用いて、リンパ組織を回収する前に最後の追加免疫を行った。コホート集団2を、上に記載した方法で製造および精製したrN'-hANGPTL3T(配列番号8)を用いて初回免疫した。コホート集団2を、上に記載した方法で製造および精製したrN'-mANGPTL3T(配列番号7)を用いて1回、次いでmANGPTL3T(配列番号2)を用いて3回追加免疫した。hANGPTL3T(配列番号4)を用いて、リンパ組織を回収する前に最後の追加免疫を行った。コホート集団3を、上に記載した方法で製造および精製したhANGPTL3T(配列番号4)を用いて初回免疫し、次いでhANGPTL3Tを用いて1回追加免疫し、次いで上に記載した方法で製造および精製した合成ペプチドSP2-KLH(配列番号62)を用いて2回追加免疫した。コホート集団3からの2匹の高力価の動物について、リンパ組織を回収する前にSP2-KLH(配列番号62)で最後の追加免疫を行った。残りのコホート集団3の動物(コホート集団4と呼ぶ)を上に記載した方法で製造および精製した合成ペプチドSP2-KLH(配列番号62)を用いてさらに4回追加免疫した。SP2-KLH(配列番号62)を用いて、リンパ組織を回収する前にコホート集団4に対する最後の追加免疫を行った。

#### 【0207】

各マウスは以下のようにして初回免疫および追加免疫した。完全フロイントアジュvant中の40 μgの精製抗原を腹腔内注射して各マウスを初回免疫した。2週間後に不完全フロイントアジュvant(IF)中の30 μgの精製抗原を腹腔内注射してマウスを追加免疫し、次いでさらに2週間後にIF中の20 μgの精製抗原を用いて再度腹腔内免疫した。別の方法として、キトサン系のアジュvantを使用することができる。例えば、米国特許第5,912,000号；第5,965,144号；および第5,980,912号を参照されたい。ELISAにより、下に記載するように、mANGPTL3を抗原でコーティングされたプレートとして用いて、2回目の追加免疫から1週間後に血清力価を測定した。2回目の追加免疫から2週間後に、IF中の10 μgの精製抗原を用いてマウスを腹腔内免疫した。3回目の追加免疫から1週間後に、上に記載したようにELISAにより血清力価を再度測定した。コホート集団4に対し、腹腔内追加免疫を高い力価が達成されるまで続けた。高い力価が生成され次第、初回免疫抗原(コホート集団1および2)または追加免疫抗原(コホート集団3および4)のいずれかを用いて最後の追加免疫を行った。最後から2番目の追加免疫から約2週間半後に、10 μgの精製抗原を静脈内注射して最後の追加免疫を行った。

#### 【0208】

最後の追加免疫から3日後に免疫マウスから脾臓細胞を回収し、PEG1500を融合剤として

10

20

30

40

50

使用して、該脾臓細胞を骨髄腫細胞(NS1)と融合させた。得られた細胞融合生成物をハイブリドーマ培地に希釈し、次いで96ウェル型組織培養プレートに播種した。1日後、ハイブリドーマ培養物にHAT培地を添加した。必要に応じて培地を3~4日おきに交換した。

【0209】

10 ~ 14日間の選択と培養後に、ELISAによりハイブリドーマをスクリーニングした。コホート集団1からのハイブリドーマを、mANGPTL3T、hANGPTL3T、およびN'-hANGPTL3Tを用いてスクリーニングした。コホート集団2からのハイブリドーマを、mANGPTL3TおよびhANGPTL3Tを用いてスクリーニングした。コホート集団3および4からのハイブリドーマを、hANGPTL3TおよびANGPTL3のSP1領域に相当する合成ペプチドを用いてスクリーニングした。

【0210】

ELISAは下に記載するようにして行った。

【0211】

G. ELISA法

ELISAを用いて抗原への結合について抗体をスクリーニングした。mANGPTL3T、hANGPTL3T、N'-hANGPTL3T、および/またはhANGPTL3 SP1ペプチドへの結合について各コホート集団からの抗体をスクリーニングした。96ウェル型Nunc Maxi-Sorp ImmunoPlates(商標)(Nunc #446612, Roskilde, Denmark)に、コーティングバッファー(BuPH(商標)炭酸-重炭酸バッファー, Pierce #28382, Rockford, IL)中の2.5 µg/ml溶液のmANGPTL3T、hANGPTL3T、N'-hANGPTL3T、および/またはhANGPTL3 SP1ペプチドを50 µl/ウェルで添加して、一晩4でコーティングを行った。コーティングバッファーを除去し、250 µl/ウェルのプロッキングバッファー(1%Blocker(商標)BSA, Pierce #37525, PBS中)を室温で2時間加えることによりプレートをプロッキングした。50 µlのハイブリドーマ上清(未希釈またはプロッキングバッファー中に希釈)または単離した抗ANGPTL3抗体(未希釈またはプロッキングバッファー中に希釈)をウェルに添加し、室温で少なくとも1時間インキュベートした。PBS/Tween 20を用いてウェルを4回洗浄した。100 µlの希釈(1:5,000~1:10,000)HRP結合ヤギ抗マウスIgG(Pierce #31446)をウェルに添加し37度で1時間インキュベートした。PBS/Tween 20を用いてウェルを6回洗浄した。50 µlのTMB(テトラメチルベンジジン)溶液(Immuno Pure(登録商標)TMB基質キット, Pierce #34021)を5~10分、ウェルに加えることにより抗ANGPTL3抗体を検出した。プレートは、マイクロプレートリーダー(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)を用いて分光光度法により450 nmで読み取った。

【0212】

H. モノクローナル抗体のエピトープマッピング

1. 特定のANGPTL3ペプチドに結合する抗体

コホート集団1からの6種の抗体を、マウスANGPTL3のN末端からの3種の異なる50アミノ酸ペプチドへのおよびN'-mANGPTL3Tへの結合について抗体捕捉ELISAにより試験した。試験した抗体を、1.251.1、1.132.1、1.173.2、1.315.1、1.424.1、および1.431.1と称した。これらの抗体を、S<sup>17</sup>-G<sup>66</sup>ペプチド(配列番号11)、D<sup>42</sup>-E<sup>91</sup>ペプチド(配列番号12)、Q<sup>67</sup>-M<sup>116</sup>ペプチド(配列番号13)、およびN'-mANGPTL3T(配列番号7)への結合について試験した。

【0213】

この実験の結果を表2に示す。

10

20

30

40

## 【表2】

表2 : ANGPTL3ペプチドに結合する抗体

抗体	マウス ANGPTL3 ペプチド			
	S <sup>17</sup> -G <sup>66</sup>	D <sup>42</sup> -E <sup>91</sup>	Q <sup>67</sup> -M <sup>116</sup>	N' -mANGPTL3T
1. 251. 1	-	+	-	+
1. 132. 1	-	-	-	-
1. 173. 2	-	+	+	+
1. 315. 1	-	+	-	+
1. 424. 1	-	+	-	+
1. 431. 1	-	-	-	-

10

## 【0214】

どの試験抗体もS<sup>17</sup>-G<sup>66</sup>ペプチドには結合しなかった。抗体1.251.1、1.173.1、1.315.1、および1.424.1はD<sup>42</sup>-E<sup>91</sup>ペプチドとN' -mANGPTL3Tの両方に結合した。抗体1.173.1はQ<sup>67</sup>-M<sup>116</sup>ペプチドにも結合した。抗体1.132.1および1.431.1は試験したペプチドのいずれにも、またN' -mANGPTL3Tにも結合しなかったが、このことは、これらの抗体がmANGPTL3のS<sup>1</sup>とD<sup>240</sup>の間の領域の外側のエピトープに結合することを示唆する。

## 【0215】

コホート集団3からの8種の抗体を、ANGPTL3のSP1領域(ANGPTL3 SP1と呼ぶ)の配列を有する合成ペプチド：

20

EPKSRFAMLDDVKILANGLLQLGHGL(配列番号9および10)、および

全長HISタグ化ヒトANGPTL3T：

MFTIKLLLFIVPLVISSRIDQDNSSFDLSPEPKSRFAMLDDVKILANGLLQLGHGLKDFVHKTKGQINDIFQKLNIFDQS  
FYDLSLQTSEIKEEKELRRRTYKLQVKNEEVKNMSLELNSKLESLLEEKILLQQKVYLEEQLTNLQNQPETPEHPE  
VTSKTFVEKQDNSIKDLLQTVEDQYKQLNQQHSQIKEIENQLRRTSIQEPETEISLSSKPRAPRTTPFLQLNEIRNVKHD  
GIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRDGEFWLGLEKI  
YSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSG  
GWWWHDECGENNLNGKYNKPRAKSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESFEGHHHHHH(配列番号4)、

および全長ヒトANGPTL3(ANGPTL3Tを用いて、上記の方法で製造した)(配列番号3)

30

との結合について、抗体捕捉ELISAにより試験した。対照として、非関連組換えタンパク質を用いた。

## 【0216】

この実験の結果を図9に示す。抗体4.1.1、4.4.1、4.8.1、および4.8.3は、全長ANGPTL3Tよりも強くANGPTL3 SP1に結合した。抗体4.7.1および4.9.1は、ANGPTL3 SP1およびANGPTL3Tの両方に結合した。抗体4.6.3は、全長ANGPTL3Tに結合したが、ANGPTL3 SP1には結合しなかった。最後に、抗体4.8.2は、対照タンパク質も含め、試験したすべてのタンパク質に結合した。

## 【0217】

コホート集団4からの抗体を、hANGPTL3TおよびhANGPTL3 SP1ペプチドへの結合について試験した(データ示さず)。抗体5.35および5.50は両方の抗原に結合し、これらをさらなる分析のために選択した。

40

## 【0218】

2. SP1ペプチドのアラニン - スキャニング突然変異誘発

抗体4.7.1、4.8.3、4.9.1、5.35、および5.50に対するエピトープを、SP1ペプチドのアラニン - スキャニング突然変異誘発を用いてさらに特定した。野生型SP1ペプチドは配列EPKSRFAMLDDVKILANGLLQLGHGL(配列番号9)を有する。一連の26種の突然変異体を作製し、これらにおいて野生型SP1ペプチドの各26アミノ酸を表3に示すようにアラニンに置換した。

## 【表3】

表3：突然変異体SP1ペプチド

ペプチド	配列	配列番号
SP1	EPKSRFAMLDDVKILANGLLQLGHGL	9
突然変異体1	APKSRFAMLDDVKILANGLLQLGHGL	83
突然変異体2	EAKSRFAMLDDVKILANGLLQLGHGL	84
突然変異体3	EPASRFAMLDDVKILANGLLQLGHGL	85
突然変異体4	EPKARFAMLDDVKILANGLLQLGHGL	86
突然変異体5	EPKSAFAMLDDVKILANGLLQLGHGL	87
突然変異体6	EPKSRAAMLDVKILANGLLQLGHGL	88
“突然変異体7”	EPKSRFAMLDDVKILANGLLQLGHGL	9
突然変異体8	EPKSRAALDDVKILANGLLQLGHGL	89
突然変異体9	EPKSRFAMADDVKILANGLLQLGHGL	90
突然変異体10	EPKSRFAMLADVVKILANGLLQLGHGL	91
突然変異体11	EPKSRFAMLDAVVKILANGLLQLGHGL	92
突然変異体12	EPKSRFAMLDAAVKILANGLLQLGHGL	93
突然変異体13	EPKSRFAMLDVVAIILANGLLQLGHGL	94
突然変異体14	EPKSRFAMLDVKALANGLLQLGHGL	95
突然変異体15	EPKSRFAMLDVKIAANGLLQLGHGL	96
“突然変異体16”	EPKSRFAMLDVKILANGLLQLGHGL	9
突然変異体17	EPKSRFAMLDVKILAAGLLQLGHGL	97
突然変異体18	EPKSRFAMLDVKILANALLQLGHGL	98
突然変異体19	EPKSRFAMLDVKILANGALQLGHGL	99
突然変異体20	EPKSRFAMLDVKILANGLAQLGHGL	100
突然変異体21	EPKSRFAMLDVKILANGLLALGHGL	101
突然変異体22	EPKSRFAMLDVKILANGLLQAGHGL	102
突然変異体23	EPKSRFAMLDVKILANGLLQLAHGL	103
突然変異体24	EPKSRFAMLDVKILANGLLQLGAGL	104
突然変異体25	EPKSRFAMLDVKILANGLLQLGHAL	105
突然変異体26	EPKSRFAMLDVKILANGLLQLGHGA	106

## 【0219】

「突然変異体7」および「突然変異体16」は、野生型配列中のアラニンをアラニンで「置換」した。したがって、これらの「突然変異体」は野生型SP1ペプチド配列を有し、作

製しなかった。

#### 【0220】

抗体4.7.1、4.8.3、4.9.1、5.35、および5.50を、表3に示す合成ペプチド(「突然変異体7」および「突然変異体16」ペプチド以外)への結合について抗体捕捉ELISAにより以下のように試験した。アラニン突然変異体をFlag-SUMO-SP1遺伝子カセットを用い、点突然変異誘発PCRにより作製した。「Flag」はflagタグであり、「SUMO」は低分子ユビキチン関連修飾因子である。各突然変異体をin vitroで翻訳し、濃度を抗flag M1モノクローナル抗体を用いたウェスタンプロッティングにより標準化した。各突然変異体に結合する抗体をELISA法により以下のように決定した。野生型SP1ペプチドおよび各突然変異体ペプチドは、抗flag M1モノクローナル抗体でコーティングしたELISAプレートのウェルに別々に捕捉された。次に、ビオチン化抗体(4.7.1、4.8.3、4.9.1、5.35、または5.50)をウェルに加えた。抗体のペプチドへの結合をHRP結合ストレプトアビジン(Pierce #21124)を用いて検出し、実施例Gに記載したようにしてTMBを用いて発色させた。  
10

#### 【0221】

この実験の結果を図14に示す。図中の各棒グラフにおいて、野生型SP1ペプチドは「0」で示され、各棒グラフの右端に位置する。この実験において、抗体4.7.1および4.9.1に対するエピトープは、SP1ペプチドのアミノ酸2~6および9(マウスANGPTL3のアミノ酸33~37および40; ヒトANGPTL3のアミノ酸33~37および40)を含むと考えられた。この実験において、抗体5.35および5.50に対するエピトープはSP1ペプチドのアミノ酸3~6および9~11(マウスANGPTL3のアミノ酸34~37および40~42; ヒトANGPTL3のアミノ酸34~37および40~42)を含むと考えられた。この実験において、抗体4.8.3に対するエピトープは、SP1ペプチドのアミノ酸3~6、9、および11(マウスANGPTL3のアミノ酸34~37、40、および42; ヒトANGPTL3のアミノ酸34~37、40、および42)を含むと考えられた。したがって、中和抗体4.7.1、4.8.3、4.9.1、5.35、および5.50はすべて、ANGPTL3のアミノ酸34~37および40を含むANGPTL3のSP1領域内のエピトープに結合すると考えられた。  
20

#### 【0222】

##### I. アイソタイプ

抗体4.7.1、4.8.3、4.9.1、5.35、5.50、および1.315.1のアイソタイプを標準法により決定した。4.7.1および5.50はIgG2bアイソタイプのものであり、4.8.3、1.315.1、および5.35はIgG2aアイソタイプのものであり、また、4.9.1はIgG1アイソタイプのものである。  
30

#### 【0223】

IgG2b抗体の血清中の予測半減期は3~3.5日である。IgG2a抗体の血清中の予測半減期は6~12日である。IgG1抗体の血清中の予測半減期は8~11日である。

#### 【0224】

##### J. ANGPTL3に対するモノクローナル抗体のin vivo投与

ANGPTL3に対するモノクローナル抗体をマウスに投与して、該抗体がマウスのトリグリセリドおよび/またはコレステロールレベルを有効に減少させることができるかを調べた。第1の実験において、標準食餌を与えた8週齢C57アルビノマウス(「飼料(chow)摂食」マウス)に、30 μgのモノクローナル抗体を体重1グラム当たり10 μlの量で注射した。この実験で試験した抗ANGPTL3抗体は1.315.1、4.7.1、4.8.3、4.9.1であった。対照として、抗KLH抗体を投与した。各抗体について5匹のマウスに注射した。トリグリセリドおよびコレステロールの摂食および絶食血清レベルを4日後に測定した。  
40

#### 【0225】

この実験の結果を図1および2に示す。図1は、1.315.1、4.7.1、4.8.3、4.9.1、および抗KLHを投与したマウスの4日後の摂食および絶食トリグリセリドレベルを示す。抗体4.7.1を精製した場合には、2つのピークを回収した。これらの各ピークをマウスに別々に投与した(4.7.1-P1および4.7.1-P2)。4種の抗ANGPTL3抗体すべてが、抗KLHを投与したマウスと比べて摂食状態のマウスの血清トリグリセリドレベルを統計的に有意に減少させた。しかしながら、この実験において、抗ANGPTL3抗体はいずれも、絶食状態のマウスの血清トリグリセリドレベルを減少させなかった。事実、この実験において、抗体4.7.1は絶  
50

食マウスの血清トリグリセリドレベルを増加させた。

【0226】

図2は、1.315.1、4.7.1、4.8.3、4.9.1、および抗KLHを投与したマウスの4日後の摂食および絶食コレステロールレベルを示す。上記したように、この実験において、抗体4.7.1の2つの別のピークを試験した。同様に、すべての抗体が、抗KLHを投与したマウスと比べて摂食状態のマウスの血清コレステロールレベルを統計的に有意に減少させた。しかしながら、この実験において、抗ANGPTL3抗体はいずれも、絶食状態のマウスの血清コレステロールレベルを減少させなかった。

【0227】

第2の実験において、飼料摂食させた8週齢C57アルビノマウスに、30 μgのモノクローナル抗体を体重1グラム当たり10 μlの量で注射した。この実験において、抗ANGPTL3抗体4.8.3を試験した。抗KLH抗体を対照として投与した。さらに、抗ANGPTL4抗体14D12を比較のために試験した。例えば、PCT公報WO 2006/074228を参照のこと。各抗体について5匹のマウスに注射した。4日後に、トリグリセリドおよびコレステロールの摂食および絶食血清レベルを測定した。

10

【0228】

この実験の結果を図3および4に示す。図3は、抗ANGPTL3抗体4.8.3、抗ANGPTL4抗体14D12、または抗KLH抗体を投与したマウスの摂食および絶食血清トリグリセリドレベルを示す。この実験において、4.8.3は、摂食および絶食マウスの両方で血清トリグリセリドレベルを統計的に有意に減少させた。一方、この実験において、抗体14D12は、絶食マウスにおいてのみ、血清トリグリセリドレベルを統計的に有意に減少させた。

20

【0229】

図4は、抗ANGPTL3抗体4.8.3、抗ANGPTL4抗体14D12、または抗KLH抗体を投与したマウスの摂食および絶食血清コレステロールレベルを示す。この実験において、4.8.3は、摂食および絶食マウスの両方で血清コレステロールレベルを統計的に有意に減少させた。一方、この実験において、抗体14D12は、絶食マウスにおいてのみ、血清コレステロールレベルを統計的に有意に減少させた。

【0230】

第3の実験において、標準食餌を与えた8週齢C57アルビノマウス(「飼料(chow)摂食」マウス)に、30 μgのモノクローナル抗体を体重1グラム当たり10 μlの量で注射した。この実験において試験した抗ANGPTL3抗体は、4.7.1、4.8.3、および4.9.1であった。抗KLH抗体を対照として投与した。さらに、抗ANGPTL4抗体14D12を比較のために試験した。各抗体について10匹のマウスに注射した。トリグリセリドおよびコレステロールの摂食および絶食血清レベルを4日後に測定した。

30

【0231】

この実験の結果を図5および6に示す。図5は、4.7.1、4.8.3、4.9.1、14D12、および抗KLHを投与したマウスの4日後の摂食および絶食トリグリセリドレベルを示す。この実験において、抗ANGPTL3抗体4.8.3および4.9.1は、摂食状態のマウスの血清トリグリセリドレベルを統計的に有意に減少させた。抗体4.7.1が摂食状態においてトリグリセリドを減少させることができない理由としては、1つには、抗体4.7.1が血清中の予測半減期が3~3.5日間しかないIgG2b抗体であることが挙げられよう。この実験において、抗ANGPTL3抗体4.7.1、4.8.3、および4.9.1は、抗ANGPTL4抗体14D12と同様に、絶食状態のマウスの血清トリグリセリドレベルを減少させた。

40

【0232】

図6は、4.7.1、4.8.3、4.9.1、14D12、および抗KLHを投与したマウスの4日後の摂食および絶食コレステロールレベルを示す。この実験において、抗ANGPTL3抗体4.7.1、4.8.3および4.9.1、ならびに抗ANGPTL4抗体14D12は、摂食状態のマウスの血清コレステロールレベルを減少させた。しかしながら、この実験においては、抗ANGPTL3抗体4.9.1および抗ANGPTL4抗体14 D12のみが、絶食状態のマウスの血清コレステロールレベルを減少させた。

50

## 【0233】

第4の実験において、標準食餌を与えた8週齢C57アルビノマウス(「飼料(chow)摂食」マウス)に、30 µgのモノクローナル抗体を体重1グラム当たり10 µlの量で注射した。この実験において試験した抗ANGPTL3抗体は、1.125.1、1.132.1、1.173.2、1.315.1、1.424.1、および1.431.1であった。抗KLH抗体を対照として投与した。各グループには5匹のマウスがいた。トリグリセリドの摂食および絶食血清レベルを4日後および8日後に測定した。

## 【0234】

この実験の結果を図7に示す。この実験において、1.315.1は、4日後と8日後において血清トリグリセリドを統計的に有意に減少させた。

10

## 【0235】

第5の実験において、標準食餌を与えた8~10週齢C57アルビノマウス(「飼料(chow)摂食」マウス)に、0 µg、3 µg、10 µg、30 µg、または90 µgのモノクローナル抗体を体重1グラム当たり10 µlの量で注射した。この実験において試験した抗ANGPTL3抗体は、5.35および5.50であった。各用量の各抗体について5匹のマウスに注射した。トリグリセリドおよびコレステロールの摂食血清レベルを4日後および7日後に測定した。

## 【0236】

この実験の結果を図15および16に示す。図15は、種々の量の抗体5.35および5.50を注射したマウスの4日後および7日後の血清トリグリセリドを示す。この実験において、抗体5.35および5.50の両方が30 mg/kgまたは90 mg/kgの抗体を注射したマウスにおいて4日後の血清トリグリセリドを減少させた。この実験において、抗体5.50は、3 mg/kgまたは10 mg/kgの抗体を注射したマウスにおいても4日後の血清トリグリセリドを減少させた。この実験において、10 mg/kg、30 mg/kg、または90 mg/kgの抗体5.50を注射したマウスの血清トリグリセリドは7日後にも減少したが、一方、90 mg/kgの抗体5.35を注射したマウスにおいてのみ、血清トリグリセリドが7日後に減少し続けていた。

20

## 【0237】

図16は、種々の量の抗体5.35および5.50を注射したマウスの血清コレステロールレベルを示す。この実験において、30 mg/kgもしくは90 mg/kgの抗体5.35、または10 mg/kg、30 mg/kg、もしくは90 mg/kgの抗体5.50を注射したマウスでは、4日後の血清コレステロールレベルが減少した。90 mg/kgの抗体5.35または90 mg/kgの抗体5.50を注射したマウスは、7日後の血清コレステロールレベルが減少し続けていた。

30

## 【0238】

K. ANGPTL3に対するモノクローナル抗体のApoEノックアウトマウスへの投与

ApoEノックアウトマウスは自然発症高コレステロール血症を発症することが見出されている。例えば、Piedrahitaら(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89(10):4471-5; およびZhangら(1992) Science 258(5081):468-71を参照のこと。ANGPTL3に対する特定のモノクローナル抗体がApoEノックアウトマウスの血清コレステロールおよびトリグリセリドレベルを減少させることができるか否かを調べるために、次の実験を行った。それぞれが14週齢のApoEノックアウトマウス(Taconic Animal Models、系統B6.129P2-Apoetm1Unc N11)8匹からなる3グループに、30 mg/kgの抗KLH、30 mg/kgの抗体5.35、または30 mg/kgの抗体5.50を腹腔内注射した。各マウスに0日目に1回の注射、4日目に1回の注射を施した。すべてのマウスに標準食餌を与えた(「飼料摂食」)。各マウスにおいて、摂食血清トリグリセリドレベルおよび摂食コレステロールレベルを、0日目(注射前)、4日目、8日目、および12日目に測定した。

40

## 【0239】

この実験の結果を図19に示す。抗体5.35は4日目までに血清トリグリセリドレベルを36%減少させた。この減少は8日目までずっと続き、12日目までに消失した。抗体5.50は4日目までに血清トリグリセリドレベルを60%減少させた。この減少は8日目までずっと続き、血清トリグリセリドは12日目までずっと有意に減少し続けた。

## 【0240】

50

この実験において、抗体5.35は血清コレステロールレベルを17%減少させたが、この減少は8日目まで達成されず、また減少は12日目までにいくらか衰えた。抗体5.50は4日目までに血清コレステロールレベルを減少させ、8日目および12日目までずっと血清コレステロールレベルを減少させ続け、この実験の終了時点で合計30%の減少となった。

#### 【0241】

これらの結果は抗体5.35および5.50が、ApoEマウスの血清トリグリセリドレベルと血清コレステロールレベルの両方を減少させることを実証した。この実験において、抗体5.50は、血清トリグリセリドレベルおよび血清コレステロールレベルの両方を減少させるのにより有効であったが、これはこの抗体がより長い半減期を有するためであろう。

#### 【0242】

#### L. ANGPTL3に対するモノクローナル抗体のin vitro投与

10

マウスモノクローナル抗ANGPTL3のLPL活性に対する効果をin vitroアッセイを用いて試験した。LPL条件培地を得るために、HEK293F細胞(FreeStyle(商標)293 Expression System)(Invitrogen, Carlsbad, CA)に、IRES puroプラスミド(Clontech, Mountain View, CA)中にC末端FLAGタグを有するLPLをコードするDNAを含むLPL発現ベクターを、トランスフェクトした。

#### 【0243】

形質転換細胞を、選択培地(1Xペニシリン-ストレプトマイシン-グルタミン(Invitrogen, Carlsbad, CA)および2.4 μg/mlのピューロマイシンを追加したFreeStyle(商標)293 System培地(GIBCO BRL, Gaithersburg, MD))中で増殖させた。細胞数を数え上げ、遠心分離により細胞をペレット化させた。得られた細胞ペレットを新鮮なFreeStyle(商標)293培地(1x GPSを含み、ピューロマイシンを含まない)中に1×10<sup>6</sup> 細胞/mlの濃度で再懸濁させた。48時間インキュベートした後、LPLを含む条件培地を細胞から回収し、5 mlアリコートに分配し、次いで使用するまで-70°Cで凍結させた。

20

#### 【0244】

条件培地中のLPL活性を、条件培地のアリコートに200 mg/dL Intralipid(登録商標)(Pharmacia & Upjohn)、12 mM グルコース、5ユニット/ml ヘパリンおよび200 μl 5%マウス血清(Apo C-II源として)を加えることによりアッセイした。次に、この培地を37°Cでインキュベートした。サンプルを2時間、4時間、および6時間後に回収し、アッセイを行うまで-70°Cで凍結させた。LPL条件培地を、LPL活性について、無希釈の条件培地および1:2、1:4、1:8、1:16、および1:32の希釈物を用いてFFAレベルを測定することによりアッセイした。FFAレベルは、2時間、4時間および6時間後にWako FFAキット(Wako Chemical USA, Inc., Richmond, VA)を用いて決定した。

30

#### 【0245】

LPL活性のin vitroアッセイにおいて、ANGPTL3活性を中和するモノクローナル抗体の能力も決定した。LPL活性についてのin vitroアッセイは、Wako FFAキット(Wako Chemical USA, Inc., Richmond, VA)を用いてFFAレベルを測定するものである。別々のLPL活性アッセイを、25 nM マウスANGPTL3および4つの濃度(0.8 μg/ml、2 μg/ml、10 μg/mlおよび50 μg/ml)の5種のモノクローナル抗体(抗体4.9.1、4.8.3、1.315.1、4.7.1、および1.173.2)のそれぞれの存在下で行った。結果を図12に示す。各抗体について、中和活性は、LPL活性を増大させる抗体の能力、すなわち、ANGPTL3による阻害からLPLを「レスキュー」する能力により、実証される。レスキュー活性は、ANGPTL3のみの存在下でのLPL活性と比べたときの、ANGPTL3および抗ANGPTL3抗体の両方の存在下でのLPL活性の増大パーセンテージとして決定される。4種の抗体(4.9.1、4.8.3、1.315.1および4.7.1)は、その濃度に応じて50%より多く、LPL活性をレスキューすることができた。この結果は、これらの抗体がANGPTL3活性を中和することによりLPL活性をレスキューすることができることを示していた。これに対し、抗体1.173.2は、LPL活性を有意にレスキューせず、それ自体が内部陰性対照として機能した。

40

#### 【0246】

#### M. ANGPTL3に対するモノクローナル抗体の結合親和性

50

N'-hANGPTL3TおよびhANGPTL3Tに対する抗体4.7.1、4.8.3、および4.9.1の親和定数ならびにSP1ペプチドに対する抗体4.7.1、4.9.1、5.35、および5.50の親和定数を、BIACORE(登録商標)3000システム(GE Healthcare, Uppsala, Sweden)を用いて測定した。BIACORE(登録商標)3000は、表面プラズモン共鳴技術を用いてタンパク質-タンパク質相互作用を検出および定量化するためのリアルタイム生体分子解析システムである。以下の親和定数をBIACORE(登録商標)3000システムのメーカーの使用説明書に従い決定した：平衡解離定数( $K_D$ )、結合速度定数( $k_{on}$ )、および解離速度定数( $k_{off}$ )。

#### 【0247】

N'-hANGPTL3TおよびhANGPTL3Tタンパク質抗原に対する4.7.1、4.8.3、および4.9.1抗体の親和定数をそれぞれ以下のように決定した。アミンカップリングキット(Amine Coupling Kit)(製品番号：BR-1000-50, GE Healthcare, Uppsala Sweden)を用いて10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のN'-hANGPTL3Tまたは20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のhANGPTL3Tのいずれかをチップ表面にカップリングさせることにより、BIACORE CM5チップ表面をタンパク質抗原でコーティングした。先ず抗体のFabフラグメント(Fab Preparation Kit(製品番号：44885, Pierce, Rockford, IL 61105))を、メーカーの使用説明書に従って用いて作製した)をコーティングされたチップ表面を有するBIACORE(登録商標)3000システムに2分間30  $\mu\text{l}/\text{分}$  の流速でインジェクトすることにより、結合相および解離相( $k_{on}$ および $k_{off}$ 定数を決定するために使用される)を生成した。試験したFabフラグメントの濃度は200 nM、100 nM、50 nM、25 nM、12.5 nM、6.25 nM、3.125 nM、1.5625 nM、0.78125 nM、および0 nMであった。インジェクション相(injection phase)を結合速度定数、すなわち $k_{on}$ を決定するために使用した。各インジェクションの後、BIACORE HBS-EPバッファー(製品番号：BR-1001-88, GE Healthcare, Uppsala Sweden)を5分間、BIACORE CM5チップ表面上の抗原-Fab複合体上に流すことにより、Fabフラグメントをタンパク質抗原から解離させた。この解離相を、解離速度定数、すなわち $k_{off}$ を決定するために使用した。次のインジェクションの前に、10 mM HClを100  $\mu\text{l}/\text{分}$  の流速で30秒間インジェクトすることによりBIACOREチップ表面を再生させた。データ解析用のBIACOREセンソグラムを、4.7.1、4.8.3、および4.9.1表面のFab特異的結合プロファイルから基準表面(同等レベルの非関連タンパク質を固定したもの)の非特異的結合プロファイルを差し引くことにより作成した。 $K_D$ 、 $k_{on}$ 、および $k_{off}$ 値を含む親和性パラメーターを、BIAevaluation Software Version 3.0 (GE Healthcare, Uppsala Sweden)を用いて、質量移動を補正するとともに結合および解離データセットを1:1結合モデルに全体的にフィッティングすることにより決定した。

#### 【0248】

4.7.1、4.9.1、5.35、および5.50抗体のSP1ペプチド抗原に対する親和定数は、それ以下のように決定した。アミンカップリングキット(製品番号：BR-1000-50, GE Healthcare, Uppsala Sweden)を用いて90  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のImmunoPureヤギ抗マウスIgG F<sub>c</sub>(製品番号：31170 Pierce, Rockford, IL 61105)をチップ表面にカップリングさせることにより、BIACORE CM5チップ表面を抗マウスIgG F<sub>c</sub>でコーティングした。次に、抗体を10  $\mu\text{l}/\text{分}$  の流速で30秒間インジェクトすることにより、抗体を抗マウスIgG F<sub>c</sub> BIACOREチップ表面上に捕捉した。先ず抗体でコーティングしたチップ表面を有するBIACORE(登録商標)3000システムにSP1ペプチドを2分間30  $\mu\text{l}/\text{分}$  の流速でインジェクトすることにより、結合相および解離相( $k_{on}$ および $k_{off}$ 定数を決定するために使用される)を生成した。試験したSP1ペプチドの濃度は、200 nM、100 nM、50 nM、25 nM、12.5 nM、6.25 nM、3.125 nM、1.5625 nM、0.78125 nM、および0 nMであった。インジェクション相を、結合速度定数、すなわち $k_{on}$ を決定するために使用した。各インジェクションの後、BIACORE HBS-EPバッファー(製品番号：BR-1001-88, GE Healthcare, Uppsala Sweden)を5分間、BIACORE CM5チップ表面上のペプチド-抗体複合体上に流すことにより、SP1ペプチドを抗体から解離させた。この解離相を、解離速度定数、すなわち $k_{off}$ を決定するために使用した。次のインジェクションの前に、10 mM HClを100  $\mu\text{l}/\text{分}$  の流速で30秒間インジェクトすることによりBIACOREチップ表面を再生させた。データ解析用のBIACOREセンソグラムを、4.7.1、4.9.1、5.35、および5.50表面の抗原特異的結合プロファイルから基準表面(同等レベルの非関連マウスIgG F<sub>c</sub>)を用いて、質量移動を補正するとともに結合および解離データセットを1:1結合モデルに全体的にフィッティングすることにより決定した。

gGを捕捉している)の非特異的結合プロファイルを差し引くことにより作成した。 $K_D$ 、 $k_{on}$ 、および $k_{off}$ 値を含む親和性パラメーターを、BIAevalution Software Version 3.0 (GE Healthcare, Uppsala Sweden)用いて、質量移動を補正するとともに結合および解離データセットを1:1結合モデルに全体的にフィッティングすることにより決定した。

#### 【0249】

この実験の結果を表4、5、および6に示す。各抗体は二重に重複して試験した。各実験の結果を示す。

#### 【表4】

表4 : N'-hANGPTL3Tに対する抗体親和性

抗体	$K_D$ (nM)	$k_{on}$ ( $M^{-1} 秒^{-1}$ )	$k_{off}$ (秒 $^{-1}$ )
4.7.1	49.5	$1.85 \times 10^5$	$9.15 \times 10^{-3}$
4.7.1	77.5	$1.16 \times 10^5$	$8.99 \times 10^{-3}$
4.8.3	210	$9.00 \times 10^4$	$1.90 \times 10^{-2}$
4.8.3	251	$1.09 \times 10^5$	$2.75 \times 10^{-2}$
4.9.1	45.4	$1.31 \times 10^5$	$5.93 \times 10^{-3}$
4.9.1	55	$1.33 \times 10^5$	$7.34 \times 10^{-3}$

10

#### 【0250】

#### 【表5】

表5 : hANGPTL3Tに対する抗体親和性

抗体	$K_D$ (nM)	$k_{on}$ ( $M^{-1} 秒^{-1}$ )	$k_{off}$ (秒 $^{-1}$ )
4.7.1	45.3	$1.76 \times 10^5$	$7.96 \times 10^{-3}$
4.7.1	117	$8.12 \times 10^4$	$9.53 \times 10^{-3}$
4.8.3	970	$2.23 \times 10^4$	$2.16 \times 10^{-2}$
4.8.3	450	$6.00 \times 10^4$	$2.73 \times 10^{-2}$
4.9.1	48.1	$1.29 \times 10^5$	$6.22 \times 10^{-3}$
4.9.1	45.2	$1.72 \times 10^5$	$7.77 \times 10^{-3}$

20

#### 【0251】

#### 【表6】

表6 : SP1ペプチドに対する抗体親和性

抗体	$K_D$ (nM)	$k_{on}$ ( $M^{-1} 秒^{-1}$ )	$k_{off}$ (秒 $^{-1}$ )
4.7.1	26.1	$2.09 \times 10^6$	$5.46 \times 10^{-3}$
4.9.1	46.1	$1.69 \times 10^5$	$7.78 \times 10^{-3}$
5.35	1.80	$8.35 \times 10^5$	$1.5 \times 10^{-3}$
5.50	1.78	$1.08 \times 10^6$	$1.93 \times 10^{-3}$

30

#### 【0252】

#### N. ANGPTL3に対する特定のモノクローナル抗体のin vivo薬物動態

40

これらの抗体(抗体4.7.1、4.8.3、および4.9.1)のin vivoにおける薬物動態を決定するために、4匹の異なるマウスに1kgあたり30mgの用量で腹腔内注射することによりそれぞれを別々に投与した。図13に示す時点において、マウスの採血をし、血清を得た。抗体捕捉ELISAにより決定した力価を、マウスに注射した抗体と同じ抗体の段階希釈物を用いて抗体捕捉ELISAにおいて確立した標準曲線と比較することにより、血清中に存在する抗ANGPTL3抗体のレベルを決定した。抗体捕捉ELISAは実施例Gに記載したようにして行った。結果を図13に示す。

#### 【0253】

抗体5.35および5.50のin vivoにおける薬物動態を決定するために、実施例Jの第5の実

50

験に記載したマウスにおいて、注射後4日目、7日目、および12日目に抗体レベルを決定した。血清中に存在する抗ANGPTL3抗体のレベルを、組換えヒトANGPTL3でコーティングされたプレートを用いた抗体捕捉ELISAにより決定した。マウスに注射した抗体と同じ抗体の段階希釈物を用いて抗体捕捉ELISAにおいて作成した標準曲線と比較することにより、血清中の抗体の濃度を決定した。ELISAは実施例Gに記載したようにして行った。

#### 【0254】

この実験の結果を図17に示す。この実験において、抗体5.50はin vivoで抗体5.35よりも長い半減期を有した。より長い半減期は、実施例Jに記載した実験において図15および16に示すように、抗体5.50が抗体5.35と比べて増大した有効性をin vivoで有することと相關していた。

10

#### 【0255】

図18に、30 mg/kg抗体を1回注射した後のC57マウスにおける抗体4.7.1、4.9.1、5.35、および5.50の薬物動態を示す。抗体濃度は、実施例Gに記載したように抗体捕捉ELISAを用いて決定した。血清中の抗体の濃度は、マウスに注射した抗体と同じ抗体の段階希釈物を用いて抗体捕捉ELISAにおいて確立した標準曲線と比較することにより決定した。この実験において、抗体5.50および4.9.1は、ほぼ同等の半減期を有した。さらに、抗体5.50および4.9.1の半減期は、この実験において、互いにほぼ同等であった抗体5.35および4.7.1の半減期よりも長かった。さらに、この実験において、抗体5.35および5.50のCmaxはほぼ同等であり、これは抗体4.9.1のCmaxよりも大きく、さらにそれは抗体4.7.1のCmaxよりも大きかった。

20

#### 【0256】

##### 0. ANGPTL3に対する特定のモノクローナル抗体の配列

抗体4.7.1、4.8.3、4.9.1、5.35、および5.50の重鎖および軽鎖可変領域を決定した。抗体4.7.1の重鎖可変領域を配列番号19(N末端シグナルペプチドを有する)および配列番号20(N末端シグナルペプチドを有しない)に示す。抗体4.7.1の軽鎖可変領域を配列番号27(N末端シグナルペプチドを有する)および配列番号28(N末端シグナルペプチドを有しない)に示す。抗体4.8.3の重鎖可変領域を配列番号21(N末端シグナルペプチドを有する)および配列番号22(N末端シグナルペプチドを有しない)に示す。抗体4.8.3の軽鎖可変領域を配列番号29(N末端シグナルペプチドを有する)および配列番号30(N末端シグナルペプチドを有しない)に示す。抗体4.9.1の重鎖可変領域を配列番号23(N末端シグナルペプチドを有する)および配列番号24(N末端シグナルペプチドを有しない)に示す。抗体4.9.1の軽鎖可変領域を配列番号31(N末端シグナルペプチドを有する)および配列番号32(N末端シグナルペプチドを有しない)に示す。抗体5.35の重鎖可変領域を配列番号63(N末端シグナルペプチドを有する)および配列番号64(N末端シグナルペプチドを有しない)に示す。抗体5.35の軽鎖可変領域を配列番号67(N末端シグナルペプチドを有する)および配列番号68(N末端シグナルペプチドを有しない)に示す。抗体5.50の重鎖可変領域を配列番号65(N末端シグナルペプチドを有する)および配列番号66(N末端シグナルペプチドを有しない)に示す。抗体5.50の軽鎖可変領域を配列番号69(N末端シグナルペプチドを有する)および配列番号70(N末端シグナルペプチドを有しない)に示す。

30

#### 【0257】

抗体4.7.1、4.8.3、および4.9.1の重鎖可変領域のアライメントを図10に示す。重鎖可変領域のコンセンサス配列も示す(配列番号25)。シグナルペプチドを有しない重鎖可変領域のコンセンサス配列を表7に示す(配列番号26)。

40

#### 【0258】

抗体4.7.1、4.8.3、および4.9.1の軽鎖可変領域のアライメントを図11に示す。軽鎖可変領域のコンセンサス配列も示す(配列番号33)。シグナルペプチドを有しない軽鎖可変領域のコンセンサス配列を表7に示す(配列番号34)。

#### 【0259】

##### P. ANGPTL3に対する特定のモノクローナル抗体のヒト化

以下のプロトコルに抗体4.7.1のヒト化を記載する。抗体4.8.3、4.9.1、5.35、5.50、

50

および1.315.1は同じ方法によりヒト化することができる。抗体4.7.1のヒト化形態を「hu4.7.1」と呼ぶ。抗体4.8.3、4.9.1、5.35、5.50、および1.315.1のヒト化形態を、それぞれ、「hu4.8.3」、「hu4.9.1」、「hu5.35」、「hu5.50」、および「hu1.315.1」と呼ぶ。

#### 【0260】

各重鎖および軽鎖について、ヒトフレームワーク領域を、抗体4.7.1に存在するマウスフレームワーク領域に対する相同性に基づき、一連のファミリー特異的コンセンサスヒトフレームワーク領域から選択する。選択されたヒトフレームワーク領域を、特定のアミノ酸位置において多様化し、選択したV遺伝子ファミリー内のフレームワーク多様性を反映させる。抗体4.7.1の重鎖のCDR1、CDR2、およびCDR3をコードするポリヌクレオチドを、重鎖についての多様化されたヒトフレームワーク領域をコードするポリヌクレオチドのライブラリーにクローニングする。得られるライブラリーをヒト化4.7.1重鎖可変領域ライブラリーと呼ぶ。抗体4.7.1の軽鎖のCDR1、CDR2、およびCDR3をコードするポリヌクレオチドを、軽鎖についての多様化されたヒトフレームワーク領域をコードするポリヌクレオチドのライブラリー中にクローニングする。得られるライブラリーをヒト化4.7.1軽鎖可変領域ライブラリーと呼ぶ。ヒト化4.7.1重鎖可変領域ライブラリーおよびヒト化4.7.1軽鎖可変領域ライブラリーを、一本鎖Fv(scFv)形式のファージディスプレイベクター中にクローニングする。10

#### 【0261】

次に、scFvファージディスプレイライブラリーを、高親和性scFvを選択するために、2～3回の結合を通じて、標的抗原、例えばヒトANGPTL3に対して、スクリーニングする。次に、scFvを可溶形態で発現させ、標的の親和性および/またはin vitro中和能について試験する。次に、適切な親和性および能力について選択されたscFvの重鎖可変領域および軽鎖可変領域を、全長IgGまたはscFv-CL-PEG(CLはヒト定常軽鎖である)として発現させ、in vivo活性、例えば、マウスにおける血清トリグリセリドおよび/または血清コレステロールの減少について試験する。PEGをCL基にシステインを介して付加する。20

#### 【0262】

##### Q. ANGPTL3に対する特定のモノクローナル抗体の親和性成熟

以下のプロトコルに抗体4.7.1の親和性成熟を記載する。抗体4.8.3、4.9.1、5.35、5.50、および1.315.1の親和性成熟は、同じ方法を用いて行うことができる。同様に、hu4.7.1、hu4.8.3、hu4.9.1、hu5.35、hu5.50、およびhu1.315.1の親和性成熟は、同じ方法を用いて行うことができる。30

#### 【0263】

抗体4.7.1の重鎖をコードするポリヌクレオチドを、例えばエラープローンPCRを用いて、ランダム突然変異誘発に供する。エラープローンPCRは、GeneMorph(登録商標)II Random Mutagenesis Kit(Stratagene, La Jolla, CA)を用い、メーカーの使用説明書に従って行った。

#### 【0264】

抗体4.7.1の軽鎖をコードするポリヌクレオチドを、例えばエラープローンPCRを用いて、ランダム突然変異誘発に供する。エラープローンPCRは、GeneMorph(登録商標) II Random Mutagenesis Kit(Stratagene, La Jolla, CA)を用い、メーカーの使用説明書に従って行った。ランダム突然変異誘発した重鎖ポリヌクレオチドおよびランダム突然変異誘発した軽鎖ポリヌクレオチドを、一本鎖Fv (scFv)形式のファージディスプレイベクター中にクローニングする。40

#### 【0265】

次に、scFvファージディスプレイライブラリーを、高親和性scFvを選択するために、2～3回の結合を通じて、標的抗原、例えばヒトANGPTL3に対して、スクリーニングする。次に、scFvを可溶形態で発現させ、標的の親和性および/またはin vitro中和能について試験する。次に、適切な親和性および能力について選択されたscFvの重鎖可変領域および軽鎖可変領域を、全長IgGまたはscFv-CL-PEGとして発現させ、in vivo活性、例えば、マウ50

スにおける血清トリグリセリドおよび／または血清コレステロールの減少について試験する。

【0266】

次に、選択された親和性成熟抗体は、まだヒト化されていない場合には、実施例Pに記載したようにしてヒト化することができる。

【0267】

上記実施例は、とりわけマウスANGPTL3に対する特定の中和モノクローナル抗体およびそうした抗体のマウス中でのin vivo効果について説明するが、当業者ならば、ヒトANGPTL3に対する中和モノクローナル抗体が作製可能であり、また、かかる抗体はヒト中で同一または類似のin vivo効果を有するであろう、ということを容易に認識するであろう。この結論は、部分的には、ヒトANGPTL3とマウスANGPTL3が、構造的および機能的特性を共有する、進化的に保存されたタンパク質であるという観察に基づく。例えばConklin, D.ら(1999) Genomics 62:477-4.8.2を参照のこと。例えば、ヒトおよびマウスANGPTL3は約76%アミノ酸配列同一性を共有する。ヒトおよびマウスANGPTL3はまた、共通する二次構造的構成要素、例えばN末端のコイルドコイルドメインおよびC末端フィブリノーゲン様ドメインを共有する。その上、ヒトANGPTL3の、マウス中で過剰発現させたときの血清脂質レベルを上昇させる能力から実証されるとおり、ヒトANGPTL3はマウスANGPTL3と類似する機能を有する。Koishiら(2002) Nat. Genet. 30(2):151-157。

10

【0268】

また当技術分野で一般に認識されていることとして、マウスは、中和抗体を使用する種々の症状や疾患の治療のためのモデルとして、日常的に使用されている。例えば、中和抗体は、マウスにおけるプリオント病、糖尿病、および炎症を治療するために使用してきた。例えば、Whiteら(2003) Nature 422:80-83; Cailleauら(1997) Diabetes 46:937-940; およびLochnerら(2002) J. Immunol. Methods 259:149-157を参照されたい。後者(Lochnerら)の研究では、マウスIL-18を中和するモノクローナル抗体をIL-18欠損マウス中で產生させた。こうしたマウスモノクローナル抗体は、野生型マウスにおいてリポ多糖誘発型炎症応答を抑制する能力を有していた。このことから、当業者ならば、前述した実施例が、ヒトの病状の治療における、ヒトANGPTL3に対する中和モノクローナル抗体の使用を支持するものである、と結論付けるであろう。

20

【表7】

表7：配列の表

名称	配列番号	配列	
マウス ANGPTL3 (アクセッショ番号 NP_038941)	1	MHTIKLFLFV VPLVIASRVD PDLSFD SAP SEP KSR FAML DDVKILANGL LQLGHGLKDF VHKTGQIND IFQKLNIFDQ SFYDLSLRN EIKEEKELR RTTSTLQVKN EEVKNMSVEL NSKLESLEE KTALQHKVRA LEEQLTNLIL SPAGAQEHPE VTSLKSFVEQ QDN SIRELLQ SVEE QYKQLS QQHMQIKEIE KQLRK TGQIE PSEN SLSKS RAPRTT PPLQ LNETENTE QD DL PADCS AYV NRGEHTSGVY TIKPRNSQGF NVYCDTQS GS PWTLI QHRKD GSQDFNETWE NYEKGFR LD GEFWLGLEKI YAIVQQSN YI LRLELQDWKD SKHYVEYSFH LGSHETNYTL HVAEIA GNIP GALPEHT DLM FSTWNHRAKG QLYCPESY SG GWWWDICGE NN LN GKY NKP RTKSPERRR GIYWRPQSRK LYAIKSSKMM LQPTT	10
mANGPTL3T	2	MHTIKLFLFV VPLVIASRVD PDLSFD SAP SEP KSR FAML DDVKILANGL LQLGHGLKDF VHKTGQIND IFQKLNIFDQ SFYDLSLRN EIKEEKELR RTTSTLQVKN EEVKNMSVEL NSKLESLEE KTALQHKVRA LEEQLTNLIL SPAGAQEHPE VTSLKSFVEQ QDN SIRELLQ SVEE QYKQLS QQHMQIKEIE KQLRK TGQIE PSEN SLSKS RAPRTT PPLQ LNETENTE QD DL PADCS AYV NRGEHTSGVY TIKPRNSQGF NVYCDTQS GS PWTLI QHRKD GSQDFNETWE NYEKGFR LD GEFWLGLEKI YAIVQQSN YI LRLELQDWKD SKHYVEYSFH LGSHETNYTL HVAEIA GNIP GALPEHT DLM FSTWNHRAKG QLYCPESY SG GWWWDICGE NN LN GKY NKP RTKSPERRR GIYWRPQSRK LYAIKSSKMM LQPTTGH HHHHH	20
ヒト ANGPTL3 (アクセッショ番号 NP_055310)	3	MFTIKLLLFI VPLVISSRID QDN SSFD SLS PEP KSR FAML DDVKILANGL LQLGHGLKDF VHKTGQIND IFQKLNIFDQ SFYDLSLQTS EIKEEKELR RTTYKLQVKN EEVKNMSLEL NSKLESLEE KILLQQKV KY LEEQLTNLIQ NQPETPEHPE VTSLKTFVEK QDN SIK DLLQ TVEDQYKQLN QQHSQIKEIE NQLRRTSIQE PTEISLSSKP RAPRTT PFLQ LNEIRNVHD GIPAECTTIY NRGEHTSGMY AIRPSNSQVF HVYCDVISGS PWTLI QHRID GSQNFNETWE NYKYGFR LD GEFWLGLEKI YSIVKQSN YV LRIELEDWKD NKHYIEYSFY LGNHE TYTL HLVAITGNVP NAIPENKDLV FSTWDHKAKG HFNCPEGY SG GWWWHDEC GE NN LN GKY NKP RAKSKPERRR GLSWKSQNGR LYSIKSTKML IHPTDSESFE	30
hANGPTL3T	4	MFTIKLLLFI VPLVISSRID QDN SSFD SLS PEP KSR FAML DDVKILANGL LQLGHGLKDF VHKTGQIND IFQKLNIFDQ SFYDLSLQTS EIKEEKELR RTTYKLQVKN EEVKNMSLEL NSKLESLEE KILLQQKV KY LEEQLTNLIQ NQPETPEHPE VTSLKTFVEK QDN SIK DLLQ TVEDQYKQLN QQHSQIKEIE NQLRRTSIQE PTEISLSSKP RAPRTT PFLQ LNEIRNVHD GIPAECTTIY NRGEHTSGMY AIRPSNSQVF HVYCDVISGS PWTLI QHRID GSQNFNETWE NYKYGFR LD GEFWLGLEKI YSIVKQSN YV LRIELEDWKD NKHYIEYSFY LGNHE TYTL HLVAITGNVP NAIPENKDLV FSTWDHKAKG HFNCPEGY SG GWWWHDEC GE NN LN GKY NKP RAKSKPERRR GLSWKSQNGR LYSIKSTKML IHPTDSESFE GH	40

マウス Angpt13 (アクセッショング番号 NM_013913) (mRNA/cDNA)	5	TCAGGAGGGAA GAAGTTCAA ATTGCTAAA ATTGAATAAT TGAGACAAAA AATGCACACA ATTAAATTAT TCCTTTTGT TGTCCTTTA GTAATTGCAT CCAGAGTGGAA TCCAGACCTT TCATCATTTG ATTCTGCACC TTCAGAGCCA AAATCAAGAT TTGCTATGTT GGATGATGTC AAAATTAG CGAATGGCCT CCTGCAGCTG GGTATGGAC TTAAAGATT TGTCATAAG ACTAAGGGAC AAATTAACGA CATATTCAG AAGCTCAACA TATTTGATCA GTCTTTTAT GACCTATCAC TTCGAACCAA TGAAATCAA GAAGAGGAAA AGGAGCTAAG AAGAACTACA TCTACACTAC AAGTTAAAAA CGAGGAGGTG AAGAACATGT CAGTAGAACT GAACTCAAAG CTTGAGAGTC TGCTGGAAGA GAAGACAGCC CTTCAACACA AGGTCAAGGGC TTGGAGGAG CAGCTAACCA ACTTAATTCT AAGCCCAGCT GGGGCTCAGG AGCACCCAGA AGTAACATCA CTCAAAAGTT TTGAGAACAA GCAAGACAAAC AGCATAAGAG AACTCCTCCA GAGTGTGGAA GAACAGTATA ACAATTAAAG TCAACAGCAC ATGCAGATAA AAGAAATAGA AAAGCAGCTC AGAAAGACTG GTATTCAAGA ACCCCTCAGAA ATTCTCTTT CTTCTAAATC AAGAGCACCA AGAACTACTC CCCCTCTTC ACTGAACGAA ACAGAAAATA CAGAACAAAGA TGACCTTCCT GCCGACTGCT CTGCCGTTA TAACAGAGGC GAACATACAA GTGGCGTGTAA CACTATTAAA CCAAGAAAAT CCCAAGGGTT TAATGTCTAC TGTGATAACCC AATCAGGCAG TCCATGGACA TTAATTCAAC ACCGGAAAGA TGGCTCACAG GACTCAACG AAACATGGGA AACTACGAA AAGGGCTTG GGAGGCTCGA TGGAGAATT TGTTGGGCC TAGAGAAGAT CTATGCTATA GTCCAACAGT CTAACTACAT TTTACGACTC GAGCTACAAG ACTGGAAAGA CAGCAAGCAC TACGTTGAAT ACTCCTTC ACTGGCGAGT CACGAAACCA ACTACACGCT ACATGTGGCT GAGATTGCTG GCAATATCCC TGGGGCCCTC CCAGAGCACA CAGACCTGAT GTTTCTACA TCCAATCACA GAGCAAAGGG ACAGCTCTAC TGTCCAGAAA GTTACTCAGG TGGCTGGTGG TGGAAATGACA TATGTGGAGA AAACAACCTA AATGGAAAAT ACAACAAACC CAGAACCAAA TCCAGACCAG AGAGAAGAAG AGGGATCTAC TGGAGACCTC AGAGCAGAAA GCTCTATGCT ATCAAATCAT CCAAAATGAT GCTCCAGCCC ACCACCTAAC AAGCTTCAAC TGAACGTGAGA CAAATAAAA GATCAATAAA TTAAATATTA AAGTCCTCCC GATCACTGTA GTAATCTGGT ATTAAAATT TAATGGAAAG CTTGAGAATT GAATTCAAT TAGGTTAAA CTCATTGTTA AGATCAGATA TCACCGAATC AACGTAACAA AAATTATCT TTTC
ヒト Angpt13 (アクセッショング番号 NM_014495) (mRNA/cDNA)	6	TTCCAGAAGA AAACAGTTCC ACGTTGCTTG AAATTGAAAA TCAAGATAAA AATGTTCACAA ATTAAAGCTCC TTCTTTTAT TGTCCTCTA GTTATTCCT CCAGAATTGA TCAAGACAAT TCATCATTTG ATTCTCTATC TCCAGAGCCA AAATCAAGAT TTGCTATGTT AGACGATGTA AAAATTAG CCAATGGCCT CCTTCAGTTG GGACATGGTC TTAAAGACTT TGTCATAAG ACGAAGGGCC AAATTAATGA CATATTCAA AACTCAACA TATTTGATCA GTCTTTTAT GATCTATCGC TGCAAACCAG TGAAATCAA GAAGAAGAAA AGGAAGTGGAG AAGAACTACA TATAAAACTAC AAGTCAAAAA TGAAGAGGTAA AGAATATGT CACTGAACT CAACTCAAA CTTGAAAGCC TCCTAGAAGA AAAAATTCTA CTTCAACAAA AAGTGAATAA TTTAGAAGAG CAACTAACTA ACTTAATTCA AAATCAACCT GAAACTCCAG AACACCCAGA AGTAACCTCA CTTAAAACCT TTGTAGAAAA

		ACAAGATAAT AGCATCAAAG ACCTTCTCCA GACCGTGGAA GACCAATATA AACAAATTAAA CCAACAGCAT AGTCAAATAA AAGAAATAGA AAATCAGCTC AGAAGGACTA GTATTCAAGA ACCCACAGAA ATTTCTCTAT CTTCCAAGCC AAGAGCACCA AGAACTACTC CCTTTCTTCAGA ATAAGAAATG TAAAACATGA TGGCATTCCCT GCTGAATGTA CCACCATTTA TAACAGAGGT GAACATACAA GTGGCATGTA TGCCATCAGA CCCAGCAACT CTCAAGTTT TCATGTCTAC TGTGATGTTA TATCAGGTAG TCCATGGACA TTAATTCAAC ATCGAATAGA TGGATCACAA AACCTCAATG AAACGTGGGA GAACTACAAA TATGGTTTG GGAGGCTTGA TGGAGAATT TGGTTGGGCC TAGAGAAGAT ATACTCCATA GTGAAGCAAT CTAATTATGT TTTACGAATT GAGTTGGAAG ACTGGAAAGA CAACAAACAT TATATTGAAT ATTCTTTTA CTTGGGAAAT CACGAAACCA ACTATACGCT ACATCTAGTT GCGATTACTG GCAATGTCCC CAATGCAATC CCGGAAAACA AAGATTTGGT GTTTTCTACT TGGGATCACA AAGCAAAAGG ACACCTCAAC TGTCAGAGG GTTATTCAAGG AGGCTGGTGG TGGCATGATG AGTGTGGAGA AAACAAACCTA AATGGTAAAT ATAACAAACC AAGAGCAAAA TCTAAGCCAG AGAGGAGAAG AGGATTATCT TGGAAGTCTC AAAATGGAAG GTTATACTCT ATAAAATCAA CCAAAATGTT GATCCATCCA ACAGATTCAAG AAAGCTTGA ATGAACTGAG GCAAATTAA AAGGCAATAA TTTAACACATT AACCTCATT CAAGTTAATG TGGTCTAATA ATCTGGTATT AAATCCTTAA GAGAAAGCTT GAGAAATAGA TTTTTTTAT CTTAAAGTCA CTGTCTATT AAGATTAAAC ATACAATCAC ATAACCTTAA AGAATACCGT TTACATTCT CAATCAAAAT TCTTATAATA CTATTGTT TAAATTTGT GATGTGGAA TCAATTTAG ATGGTCACAA TCTAGATTAT AATCAATAGG TGAACATT AAATAACTT TCTAAATAAA AAATTTAGAG ACTTTTATTT TAAAAGGCAT CATATGAGCT AATATCACAA CTTCCCAAGT TTAAAAAAACT AGTACTCTTG TTAAAACCTCT AAACCTGACT AAATACAGAG GACTGGTAAT TGTACAGTTC TTAAATGTTG TAGTATTAAAT TTCAAAACTA AAAATCGTCA GCACAGAGTA TGTGTAAAAA TCTGTAATAC AAATTTTAA ACTGATGCTT CATTGGCTA CAAAATAATT TGGAGTAAT GTTGATATG ATTTATTAT GAAACCTAAT GAAGCAGAAT TAAATACTGT ATTAACAAATGAA GTTCGCTGTC TTAAACAAA TGGAGATGAC TACTAAGTCA CATTGACTTT AACATGAGGT ATCACTATAC CTTATT	10
rN' -mANGPTL3T	7	SRVPD LSSFDSAPSE PKSRFAMLDD VKILANGLQ LGHGLKDFVH KTKGQINDIF QKLNIFDQSF YDLSLRNEI KEEEKELRRT TSTLQVKNEE VKNMSVELNS KLESLLEEK ALQHKVRALE EQLTNLILSP AGAQEHPEVT SLKSFVEQQD NSIRELLQSV EEQYKQLSQO HMQIKEIEKQ LRKGQIEPS ENSLSSKSRA PRTTPPLQLN ETENTEQDLE HHHHHH	20
rN' -hANGPTL3T	8	DQDNSS FDSLSPPEPKS RFAMLDVKT LANGLLQLGH GLKDFVHKTK GQINDIFQKL NIFDQSFYDL SLOTESEIKEE EKELELRTTYK LQVKNEEVKN MSLELNSKLE SLLEEKILLQ QKVKYLEEQL TNLIQNPET PEHPEVTSNK TFVEKQDNSI KDLLQTVEDQ YKQLNQQHSQ IKEIENQLRR TSIQEPEIS LSSKPRAPRT TPFLQLNEIR NVKHDGIPLE HHHHHH	30

mANGPTL3 SP1 領域	9	EPKSRFAMLDDVKILANGLLQLGHGL	
hANGPTL3 SP1 領域	10	EPKSRFAMLDDVKILANGLLQLGHGL	
S <sup>17</sup> -G <sup>56</sup> ペプチド	11	SRVDPDLSSFD SAPSEP KSRFAM LDDVKILANGL LQLGHGLKDFVHKTG	
D <sup>42</sup> -E <sup>91</sup> ペプチド	12	DVKILANGLLQLGHGLKDFVHKTGQINDIFQKLNI FDQ SFYDLSLRTNE	
Q <sup>67</sup> -M <sup>116</sup> ペプチド	13	QINDIFQKLNI FDQS FYDLSLRTNEIKEEKELR RTTSTLQVKNEEVKNM	10
I <sup>92</sup> -L <sup>141</sup> ペプチド	14	IKEEEKELR RTTSTLQVKNEEVKNM SVELNSKLESLEE KTALQHKVRAL	
S <sup>117</sup> -S <sup>166</sup> ペプチド	15	SVELNSKLESLLEE KTALQHKVR AL EQLTNLIL SPAGAQEHPEVTS LKS	
E <sup>142</sup> -Q <sup>191</sup> ペプチド	16	EEQLTNLIL SPAGAQEHPEVTS LKS FVEQ QD NSIRELLQ SVEEQYKQLSQ	
F <sup>167</sup> -L <sup>216</sup> ペプチド	17	FVEQQDNSIRELLQ SVEEQYKQLS QQHMQI KEIE KQLRK TG I QEPSEN SL	20
Q <sup>192</sup> -D <sup>241</sup> ペプチド	18	QHMQI KEIE KQLRK TG I QEPSEN SL SS KSRAP RTT PPLQ LN ETEN TEQDD	
4. 7. 1 重鎖可変領域	19	MEWSWIFLFL LSGTAGVHSE VQLQQSGPEL VKPGASVKMS CKASGYTFTS YVMHWVKQKP GQGLEWIGYF NPYNDGT KYN EKFKGKATLT SDKSSSTAYM ELSLTSEDS AVYYCAREGD YYGYFDYWGQ GTTLTVSSA	
4. 7. 1 重鎖可変領域 シグナルペプチドなし	20	E VQLQQSGPEL VKPGASVKMS CKASGYTFTS YVMHWVKQKP GQGLEWIGYF NPYNDGT KYN EKFKGKATLT SDKSSSTAYM E LSSLTSEDS AVYYCAREGD YYGYFDYWGQ GTTLTVSSA	30
4. 8. 3 重鎖可変領域	21	MEWSWIFLFL LSGTAGVHSE VQLQQSGPEL VKPGASVKMS CKASGYTFIS CVMHWVKQKP GQGLEWIGYI NPYNDGT KYN EKFKGKATLT SDKSSSTAYM E LSSLTSEDS AVYYCAREGD YYGYFDYWGQ GTTLTVSSA	
4. 8. 3 重鎖可変領域 シグナルペプチドなし	22	E VQLQQSGPEL VKPGASVKMS CKASGYTFIS CVMHWVKQKP GQGLEWIGYI NPYNDGT KYN EKFKGKATLT SDKSSSTAYM E LSSLTSEDS AVYYCAREGD YYGYFDYWGQ GTTLTVSSA	40
4. 9. 1 重鎖可変領域	23	MEWSWIFLFL LSGTAGVHSE VQLQQSGPEL VKPGASVKMS CKASGYTFTS YVMHWVKQKP GQGLEWIGYI NPYNDGT KYN ENFKKGKATLT SDKSSSTAYM EFSSLTSEDS AVYYCAREGD YYGYFDYWGQ GTTLTVSSA	
4. 9. 1 重鎖可変領域 シグナルペプチドなし	24	E VQLQQSGPEL VKPGASVKMS CKASGYTFTS YVMHWVKQKP GQGLEWIGYI NPYNDGT KYN ENFKKGKATLT SDKSSSTAYM EFSSLTSEDS AVYYCAREGD YYGYFDYWGQ GTTLTVSSA	

重鎖可変領域コンセンサス	25	<u>MEWSWIFLFL LSGTAGVHSE VQLQQSGPEL VKPGASVKMS CKASGYTFTS YVMHWVKQKP GQGLEWIGYI NPYNDGKYN EFKKGKATLT SDKSSSTAYM ELSSLTSEDS AVYYCAREGD YYGYFDYWGQ GTTLTVSSA</u>
重鎖可変領域コンセンサス シグナルペプチドなし	26	E VQLQQSGPEL VKPGASVKMS CKASGYTFTS YVMHWVKQKP GQGLEWIGYI NPYNDGKYN EFKKGKATLT SDKSSSTAYM ELSSLTSEDS AVYYCAREGD YYGYFDYWGQ GTTLTVSSA
4.7.1 軽鎖可変領域	27	<u>MSSAQFLGLL LLCFQGTRCD IQMTQTTSSL SASLGDRVTI SCRASQDISN FLNWYQQKPD GTVKLLIYYT SRLHSGVPSR FSGSGSGTDY SLTISNLEQE DIATYFCQQG NTLPPTFGGG TKLEIKR</u>
4.7.1 軽鎖可変領域 シグナルペプチドなし	28	D IQMTQTTSSL SASLGDRVTI SCRASQDISN FLNWYQQKPD GTVKLLIYYT SRLHSGVPSR FSGSGSGTDY SLTISNLEQE DIATYFCQQG NTLPPTFGGG TKLEIKR
4.8.3 軽鎖可変領域	29	<u>MSSAQFLGLL LLCFQGIRCE IQMTQTTSSL SASLGDRVTI SCWASQDINN YLNWYQQKPD GTVKLLIYYT SRLHSGVPSR FSGSGSGTDY SLTISNLKQE DIATYFCQQG NTLPPTFGGG TKLEIKR</u>
4.8.3 軽鎖可変領域 シグナルペプチドなし	30	E IQMTQTTSSL SASLGDRVTI SCWASQDINN YLNWYQQKPD GTVKLLIYYT SRLHSGVPSR FSGSGSGTDY SLTISNLKQE DIATYFCQQG NTLPPTFGGG TKLEIKR
4.9.1 軽鎖可変領域	31	<u>MSSAQFLGLL LLCFQGARCD IQMTQTTSSL SASLGDRVTI SCRASQDIRN YLNWYQQKPD GTVKLLIYYT SRLHSGVPSR FSGSGSGTDY SLTISNLEQE DIATYFCQQG NTLPPTFGGG TKLEIKR</u>
4.9.1 軽鎖可変領域 シグナルペプチドなし	32	D IQMTQTTSSL SASLGDRVTI SCRASQDIRN YLNWYQQKPD GTVKLLIYYT SRLHSGVPSR FSGSGSGTDY SLTISNLEQE DIATYFCQQG NTLPPTFGGG TKLEIKR
軽鎖可変領域コンセンサス	33	<u>MSSAQFLGLL LLCFQGXRCU IQMTQTTSSL SASLGDRVTI SCRASQDXN YLNWYQQKPD GTVKLLIYYT SRLHSGVPSR FSGSGSGTDY SLTISNLEQE DIATYFCQQG NTLPPTFGGG TKLEIKR</u>
軽鎖可変領域コンセンサス シグナルペプチドなし	34	D IQMTQTTSSL SASLGDRVTI SCRASQDXN YLNWYQQKPD GTVKLLIYYT SRLHSGVPSR FSGSGSGTDY SLTISNLEQE DIATYFCQQG NTLPPTFGGG TKLEIKR
4.7.1 重鎖 CDR1	35	GYTFTSYVMH
4.7.1 重鎖 CDR2	36	YFPYNDGKYNFKFG
4.7.1 重鎖 CDR3	37	EGDYGYFDY
4.8.3 重鎖 CDR1	38	GYTFISCVMH
4.8.3 重鎖 CDR2	39	YINPYNDGKYNFKFG
4.8.3 重鎖 CDR3	40	EGDYGYFDY
4.9.1 重鎖 CDR1	41	GYTFTSYVMH
4.9.1 重鎖 CDR2	42	YINPYNDGKYNENFKG
4.9.1 重鎖 CDR3	43	EGDYGYFDY
4.7.1 軽鎖 CDR1	44	RASQDISNFLN
4.7.1 軽鎖 CDR2	45	YTSRLHS
4.7.1 軽鎖 CDR3	46	QQGNTLPPT

10

20

30

40

4.8.3 軽鎖 CDR1	47	WASQDINNYLN
4.8.3 軽鎖 CDR2	48	YTSRLHS
4.8.3 軽鎖 CDR3	49	QQGNTLPPT
4.9.1 軽鎖 CDR1	50	RASQDIRNYLN
4.9.1 軽鎖 CDR2	51	YTSRLHS
4.9.1 軽鎖 CDR3	52	QQGNTLPPT
重鎖 CDR1 コンセンサス	53	GYTFTSYVMH
重鎖 CDR2 コンセンサス	54	YINPYNDGKYNKEFKG
重鎖 CDR3 コンセンサス	55	EGDYGGYFDY
軽鎖 CDR1 コンセンサス	56	RASQDIXNYLN
軽鎖 CDR2 コンセンサス	57	YTSRLHS
軽鎖 CDR3 コンセンサス	58	QQGNTLPPT
マウス ANGPTL3 S <sup>17</sup> -D <sup>240</sup>	59	SRVD PDLSSFDSAP SEPKSRFAML DDVKILANGL LQLGHGLKDF VHKTKGQIND IFQKLNIFDQ SFYDLSLRTN EIKEEEKELR RTTSTLQVKN EEVKNMSVEL NSKLESLEE KTALQHKVRA LEEQLTNLIL SPAGAQEHPE VTSLKSFVEQ QDNSIRELLQ SVEEQYKQLS QQHMQIKEIE KQLRKTGIQE PSENSLSSKS RAPRTTPPLQ LNETENTEQD
ヒト ANGPTL3 D <sup>20</sup> -P <sup>243</sup>	60	D QDNSSFDSLS PEPKSRFAML DDVKILANGL LQLGHGLKDF VHKTKGQIND IFQKLNIFDQ SFYDLSLQTS EIKEEEKELR RTTYKLQVKN EEVKNMSSEL NSKLESLEE KILLQQKVKY LEEQLTNLIQ NQPETPEHPE VTSLKTFVEK QDNSIKDLLQ TVEDQYKQLN QQHSQIKEIE NQLRRTSIQE PTEISLSSKP RAPRTTPFLQ LNEIRNVKHD GIP
マウス ANGPTL3 D <sup>42</sup> -M <sup>116</sup>	61	DVKILANGL LQLGHGLKDF VHKTKGQIND IFQKLNIFDQ SFYDLSLRTN EIKEEEKELR RTTSTLQVKN EEVKNM
SP2-KLH	62	EPKSRFAMLDDVKILANGLLQLGHGLC
5.35 重鎖可変領域	63	MGR LTSSELL LIVEAYVLSQ VTLKESGPGI LHPSQTLTLT CSFSGFSLNT FGLAVGWIRQ PSGKGLEWLG HIWWDDHKYY NGVLKSRLTI SKDSSKKQVF LRIANVDTAD TARYYCARLE TGTGFAYWGQ GTLTVSAA
5.35 重鎖可変領域 シグナルペプチドなし	64	Q VTLKESGPGI LHPSQTLTLT CSFSGFSLNT FGLAVGWIRQ PSGKGLEWLG HIWWDDHKYY NGVLKSRLTI SKDSSKKQVF LRIANVDTAD TARYYCARLE TGTGFAYWGQ GTLTVSAA
5.50 重鎖可変領域	65	MGWSWIFLFL LSGTAGVLSE VQLQQSGPEL VKPGASVKIS CKASGFTFTD YYMNWVKQSH GESLEWIGDI NPNNNGGTIYN QKFRGKATLT VDKSSSTAYM ELRSLTSEDS AVYYCVRLPW YFDVWGTGTT VTVSSA
5.50 重鎖可変領域 シグナルペプチドなし	66	E VQLQQSGPEL VKPGASVKIS CKASGFTFTD YYMNWVKQSH GESLEWIGDI NPNNNGGTIYN QKFRGKATLT VDKSSSTAYM ELRSLTSEDS AVYYCVRLPW YFDVWGTGTT VTVSSA
5.35 軽鎖可変領域	67	MRCLAEFLGL LVLWIPGAIG DIVLTQSTPS VPVTPGESVS ISCRSSKSLL DSNGITYLYW FLQRPGQSPQ LLIYRMSKLA SGVPDRFSGS GSETAFTLRI SRVEAEDVGV YYCMQPLEYP FTFGAGTKLE LNG

10

20

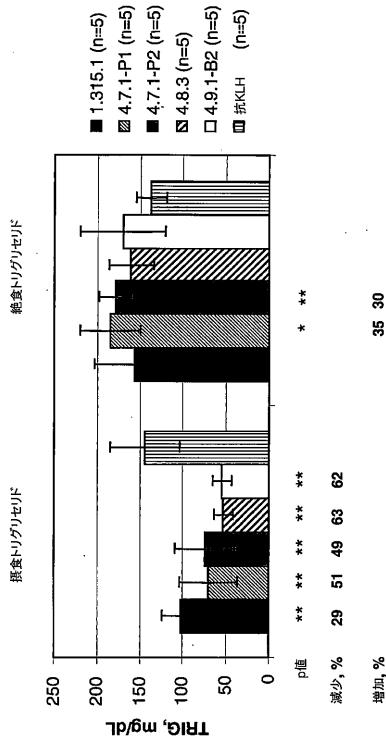
30

40

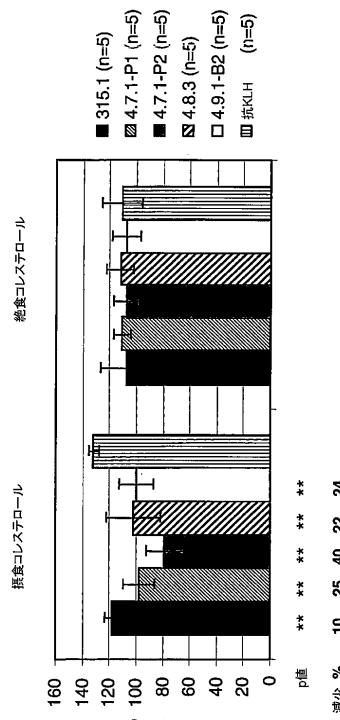
5.35 軽鎖可変領域 シグナルペプチドなし	68	DIVLTQSTPS VPVTPGESVS ISCRSSKSLL DSNGLITYLYW FLQRPGQSPQ LLIYRMSKLA SGVPDRFSGS GSETAFTLRI SRVEAEDVGV YYCMQPLEYP FTFGAGTKLE LNG
5.50 軽鎖可変領域	69	MKLPVRLVL MFWIPASSSD VLMTQTPLSL PVSLGDQASI SCRSSQSILH SNGNTYLEWF LQKPGQSPKL LIYKVSNRFS GVPDRFSGSG SGTDFTLKIS RVEAEDLGVY YCFQGSHVPY TFGGGTKLEI KR
5.50 軽鎖可変領域 シグナルペプチドなし	70	D VLMTQTPLSL PVSLGDQASI SCRSSQSILH SNGNTYLEWF LQKPGQSPKL LIYKVSNRFS GVPDRFSGSG SGTDFTLKIS RVEAEDLGVY YCFQGSHVPY TFGGGTKLEI KR
5.35 重鎖 CDR1	71	GFSLNNTFGLAVG
5.35 重鎖 CDR2	72	HIWWDDHKYYNGVLKS
5.35 重鎖 CDR3	73	LETGTGFAY
5.50 重鎖 CDR1	74	GFTFTDYYMN
5.50 重鎖 CDR2	75	DINPNNGGTIYNQKFRG
5.50 重鎖 CDR3	76	LPWYFDV
5.35 軽鎖 CDR1	77	RSSKSLLDSNGLITY
5.35 軽鎖 CDR2	78	RMSKLAS
5.35 軽鎖 CDR3	79	MQPLEYPFT
5.50 軽鎖 CDR1	80	RSSQSILHSNGNTYLE
5.50 軽鎖 CDR2	81	KVSNRFS
5.50 軽鎖 CDR3	82	FQGSHVPYT
突然変異体 1	83	APKSRFAMLDDVKILANGLLQLGHGL
突然変異体 2	84	EAKSRFAMLDDVKILANGLLQLGHGL
突然変異体 3	85	EPASRFAMLDDVKILANGLLQLGHGL
突然変異体 4	86	EPKARFAMLDDVKILANGLLQLGHGL
突然変異体 5	87	EPKSAFAMLDDVKILANGLLQLGHGL
突然変異体 6	88	EPKSRAAMLDDVKILANGLLQLGHGL
突然変異体 8	89	EPKSRAALDDVKILANGLLQLGHGL
突然変異体 9	90	EPKSRFAMADDVKILANGLLQLGHGL
突然変異体 10	91	EPKSRFAMLADVKILANGLLQLGHGL
突然変異体 11	92	EPKSRFAMLDIVKILANGLLQLGHGL
突然変異体 12	93	EPKSRFAMLDAAVKILANGLLQLGHGL
突然変異体 13	94	EPKSRFAMLDVVAILANGLLQLGHGL
突然変異体 14	95	EPKSRFAMLDVKALANGLLQLGHGL
突然変異体 15	96	EPKSRFAMLDVKIAANGLLQLGHGL
突然変異体 17	97	EPKSRFAMLDVKILAAGLLQLGHGL
突然変異体 18	98	EPKSRFAMLDVKILANALLQLGHGL
突然変異体 19	99	EPKSRFAMLDVKILANGALQLGHGL
突然変異体 20	100	EPKSRFAMLDVKILANGLAQLGHGL
突然変異体 21	101	EPKSRFAMLDVKILANGLLALGHGL
突然変異体 22	102	EPKSRFAMLDVKILANGLLQAGHGL
突然変異体 23	103	EPKSRFAMLDVKILANGLLQLAHGL
突然変異体 24	104	EPKSRFAMLDVKILANGLLQLGAGL
突然変異体 25	105	EPKSRFAMLDVKILANGLLQLGHAL
突然変異体 26	106	EPKSRFAMLDVKILANGLLQLGHGA

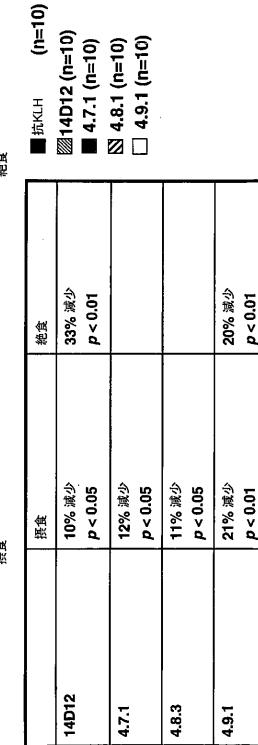
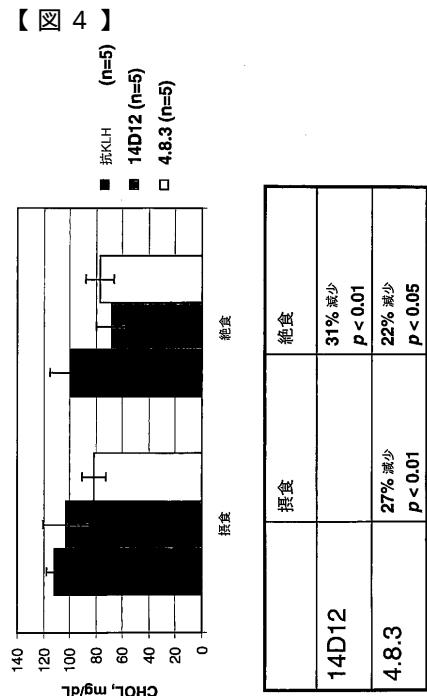
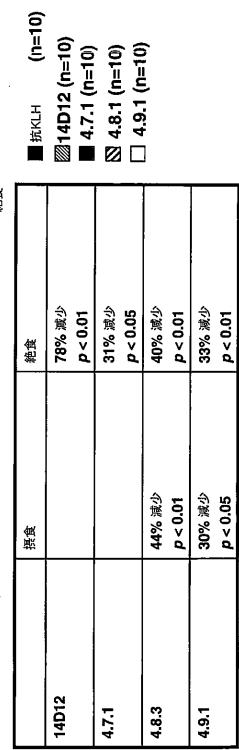
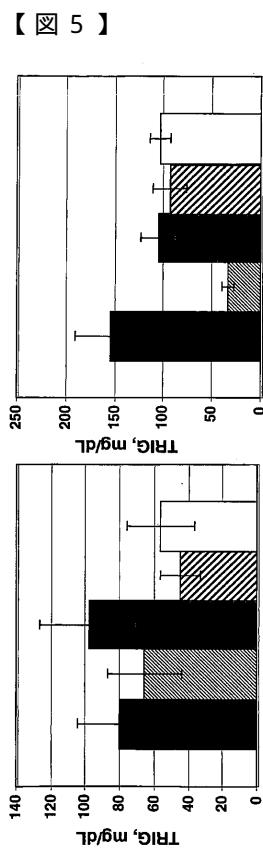
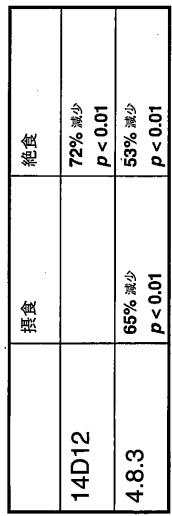
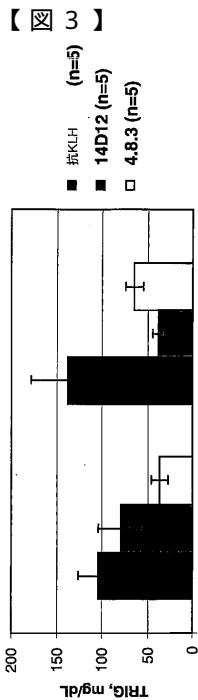
マウス ANGPTL4 (アクセッショ n 番号 NP_065606)	107	mrcaptagaa lvlcaatagl lsaqgrpaqp epprfaswde mnllahgllq lghglrehve rtrgqlgale rrmaacgnac qgpkgkdapf kdsedrvpeg qtpetlqslq tqlkaqnski qqlfqkvaqq qrylskqnlr iqnlqsqidl lapthldngv dktsrgkkls kmtqliglts nathlhrpar dcqelfqege rhsglfqiqp lgspflvnc emtsdggwtv iqrrlnsgsvd fnqsweaykd gfgdpqgef w lglekmhsit gdrgsqlavq lqdwdgnakl lqfpnihlgge dtayslqlte ptanelgatn vspnglslpf stwdqdhdlr gdlncaksls ggwwfgtcsh snlningqyfhs ipqrqrqerkk gifwktwkgr yyplqattll iqpmearaaas
ヒト ANGPTL4 (アクセッショ n 番号 NP_647475)	108	msgaptagaa lmlcaatavl lsaqggpvqs ksprfaswde mnvlahgllq lgqqlrehae rtrsqlsale rrlsacgsac qgtekstdlp lapesrvdpe vlhslqtqlk aqnsriqqlf hkvaqqqrhl ekqhrlrqhl qsqfglldhk hldhevakpa rrkrlpemaq pvdahnvsr lhrlprdcqe lfqvgerqsg lfeiqpqgsp pfvlvncmcts dggwtviqrr hdgsvdfnrp weaykagfd phgefwlgle kvhsitgdrn srlavqlrdw dgnaelqfs vhlgedtay slqltapvag qlgattvpps glsvpfstwd qdhdlrrdkn caksllsgww fgtcshsnln gqyfrsipqq rkqlkkgifw ktwrgryypl qattmliqpm aaeaaas
マウス ANGPTL4 SP1 領域	109	QPEPPRFASW DEMNLLAHGL LQLGHGL
ヒト ANGPTL4 SP1 領域	110	SKSPRFASWD EMNVLAHGLL OLGOGL

【 义 1 】

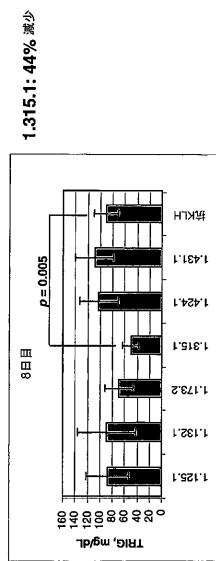
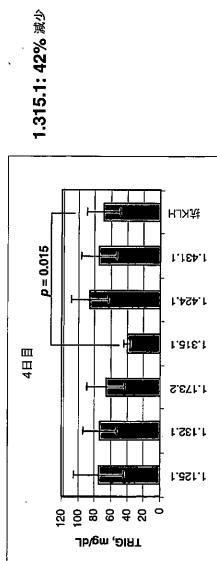


【図2】

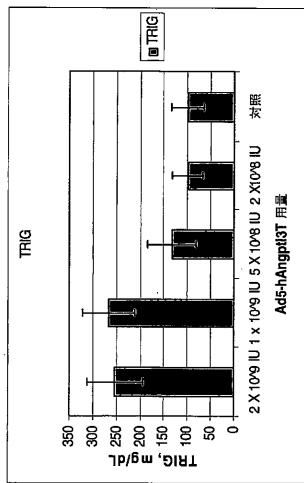




【図 7】



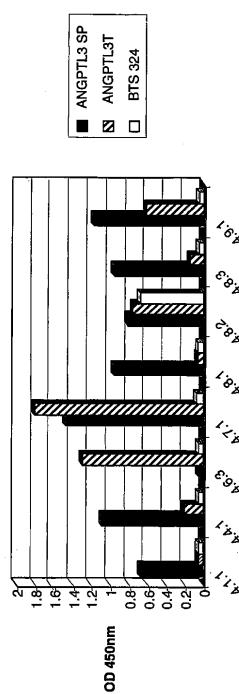
【図 8】



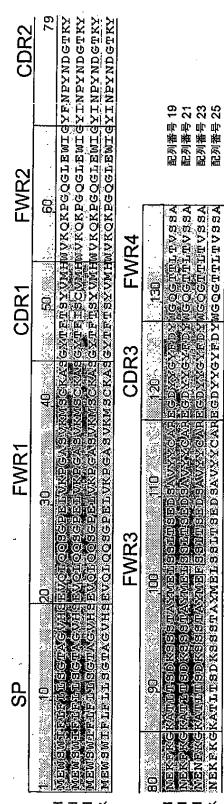
Ad5-Hanprt3T 用量

对照

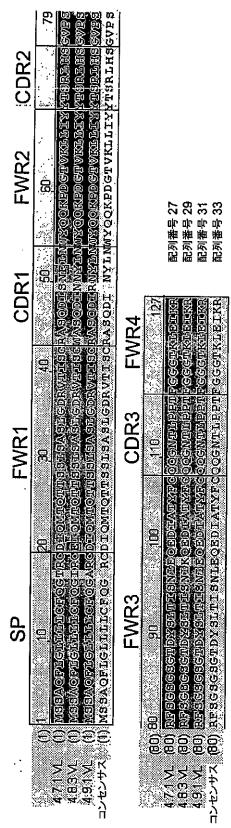
【図 9】



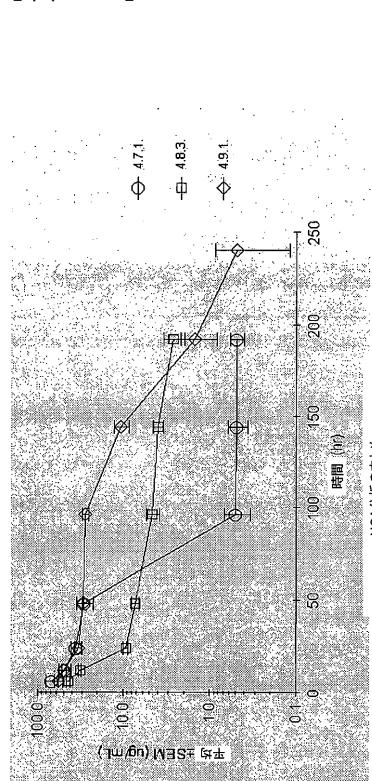
【図 10】



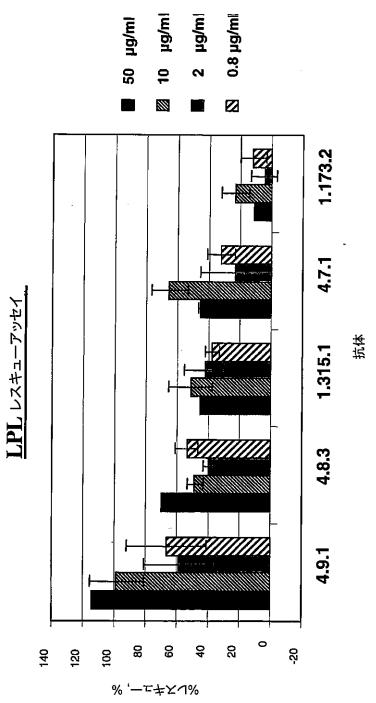
【図 1 1】



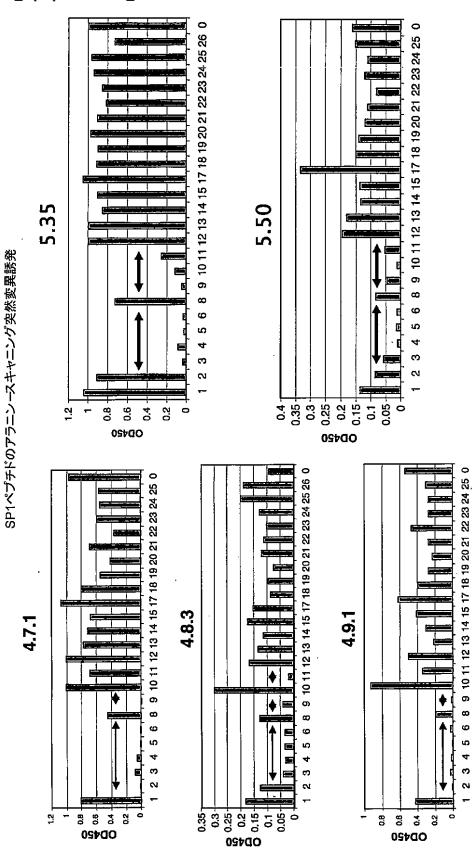
【図 1 3】



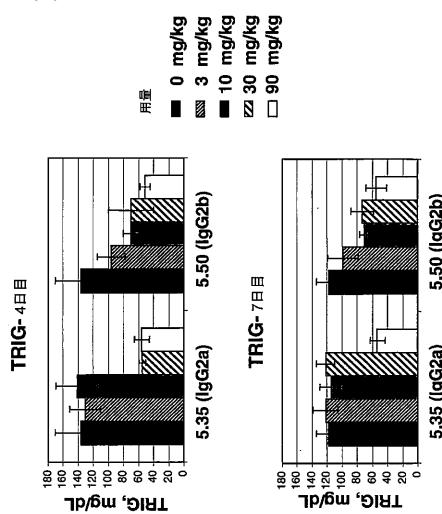
【図 1 2】



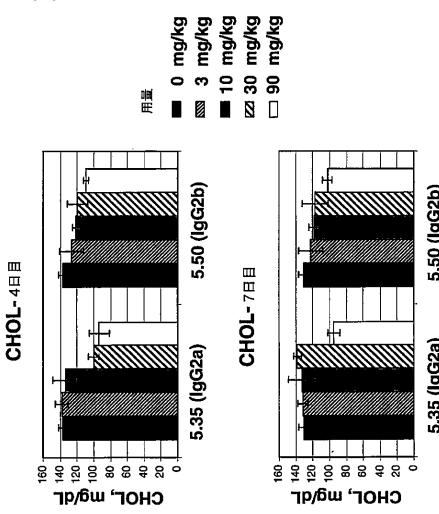
【図 1 4】



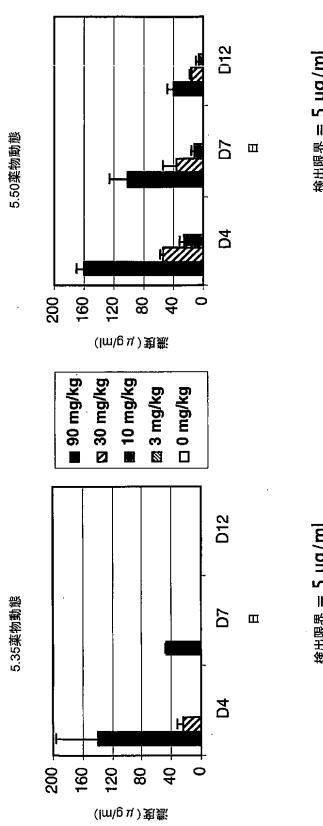
【図15】



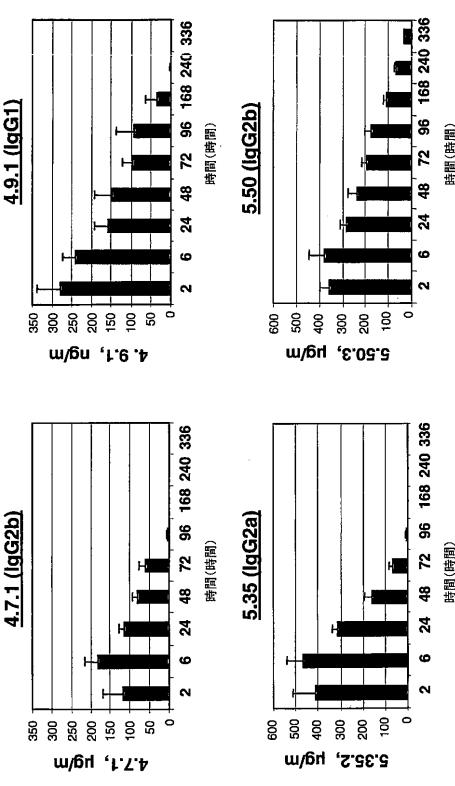
【図16】



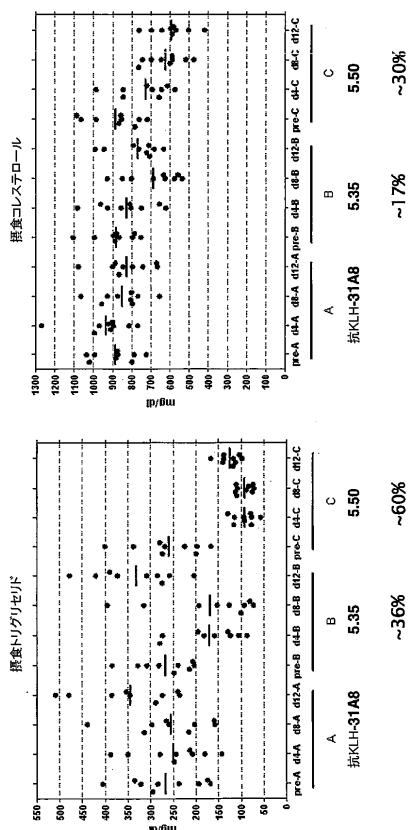
【 図 1 7 】



【 囮 1 8 】



【図 19】



## 【配列表】

0005484063000001.app

---

 フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08

(72)発明者 ランズ, グレゴリー  
アメリカ合衆国 77382 テキサス州, ザ ウッドランズ, シルバーモント ドライブ 35

(72)発明者 ホン, ソックジュ  
アメリカ合衆国 77382 テキサス州, ザ ウッドランズ, ヘロン ホロウ コート 11

(72)発明者 デサイ, ウルヴィ  
アメリカ合衆国 77384 テキサス州, ザ ウッドランズ, コラムベリー コート 14

(72)発明者 パウエル, デヴィッド  
アメリカ合衆国 77096 テキサス州, ハウストン, スティルブルック ドライブ 5327

(72)発明者 シャオ フエン  
アメリカ合衆国 77382 テキサス州, ザ ウッドランズ, イースト コンコード バリ サークル 162

審査官 木原 啓一郎

(56)参考文献 特表2005-521643 (JP, A)  
Trends Mol Med., 2005年10月, Vol.11, No.10, p.473-479

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
C 0 7 K 1 6 / 0 0  
C 1 2 N 1 5 / 0 0  
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I )  
C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / B I O S I S / W P I D S ( S T N )