

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6400471号
(P6400471)

(45) 発行日 平成30年10月3日(2018.10.3)

(24) 登録日 平成30年9月14日(2018.9.14)

(51) Int. Cl.			F I		
C 1 2 N	15/13	(2006.01)	C 1 2 N	15/13	Z N A
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	D
A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 P	1/18	(2006.01)	A 6 1 P	1/16	
A 6 1 P	3/06	(2006.01)	A 6 1 P	1/18	

請求項の数 11 (全 48 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-515976 (P2014-515976)	(73) 特許権者	597160510
(86) (22) 出願日	平成24年6月14日 (2012.6.14)		リジェネロン・ファーマシューティカルズ
(65) 公表番号	特表2014-523739 (P2014-523739A)		・インコーポレイテッド
(43) 公表日	平成26年9月18日 (2014.9.18)		REGENERON PHARMACEU
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/042338		TICALS, INC.
(87) 国際公開番号	W02012/174178		アメリカ合衆国10591-6707ニュ
(87) 国際公開日	平成24年12月20日 (2012.12.20)		ーヨーク州タリータウン、オールド・ソー
審査請求日	平成27年6月1日 (2015.6.1)	(74) 代理人	100127926
審査番号	不服2017-3791 (P2017-3791/J1)		弁理士 結田 純次
審査請求日	平成29年3月15日 (2017.3.15)	(74) 代理人	100140132
(31) 優先権主張番号	61/498, 518		弁理士 竹林 則幸
(32) 優先日	平成23年6月17日 (2011.6.17)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/578, 309		
(32) 優先日	平成23年12月21日 (2011.12.21)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗ANGPTL3抗体及びその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号161のアミノ酸配列を有するヒト ангиオポエチン様タンパク質3 (hANGPTL3) と特異的に結合し、そしてhANGPTL3のLPL阻害活性を中和し、減少させ、又は干渉する、配列番号66/74の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域 (HCVR/LCVR) 配列ペアを含む、単離されたヒト抗体又は抗原結合フラグメント。

【請求項2】

配列番号161のアミノ酸配列を有するヒト ангиオポエチン様タンパク質3 (hANGPTL3) と特異的に結合し、そしてhANGPTL3のLPL阻害活性を中和し、減少させ、又は干渉する、配列番号68/70/72の重鎖相補性決定領域1 (HC DR1) / HC DR2 / HC DR3 配列の組み合わせ及び配列番号76/78/80の軽鎖 CD R1 (LC DR1) / LC DR2 / LC DR3 配列の組み合わせを含む、単離されたヒト抗体又は抗原結合フラグメント。

【請求項3】

カニクイザルANGPTL3と交差反応する、請求項1に記載の抗体又は抗原結合フラグメント。

【請求項4】

マウス又はラットのANGPTL3と交差反応する、請求項1に記載の抗体又は抗原結合フラグメント。

【請求項5】

カニクイザルANGPTL3、マウスANGPTL3、及びラットANGPTL3のいずれかと交差反応する、請求項1に記載の抗体又は抗原結合フラグメント。

【請求項6】

単鎖抗体、Fab、又はF(ab')₂である、請求項1に記載の抗体又は抗原結合フラグメント。

【請求項7】

請求項1又は2に記載の抗体又は抗原結合フラグメント、及び薬学的に許容される担体を含んでなる医薬組成物。

【請求項8】

抗体又は抗原結合フラグメントは、キメラ又は完全ヒト抗体又は抗体フラグメントである、請求項1に記載の抗体又はフラグメント。

10

【請求項9】

ANGPTL3活性の減少又は阻害によって予防され、軽減され、改善され又は阻害される疾患又は障害を処置又は予防するための医薬の製造における、請求項1～6及び8のいずれか1項に記載の抗体又は抗原結合フラグメントの使用。

【請求項10】

疾患又は障害は、高トリグリセリド血症、高コレステロール血症、カイロミクロン血症、アテローム性脂質異常症、混合脂質異常症、心血管疾患及び障害、急性膵炎、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)、糖尿病及び肥満から成る群から選択される、請求項9に記載の使用。

20

【請求項11】

高コレステロール血症が、ホモ接合性家族性高コレステロール血症(HoFH)である、請求項10に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒトアンギオポエチン様タンパク質3(hANGPTL3)を特異的に結合するヒト抗体及びヒト抗体の抗原結合フラグメント、及びそれらの抗体を用いる治療方法に関する。

【背景技術】

30

【0002】

アンギオポエチン様タンパク質3(ANGPTL3)遺伝子は、シグナル配列及び両親媒性ヘリックスに基づくESTデータベースから同定され、そして完全長ANGPTL3cDNAが、その結果ヒト胎児の肝臓/脾臓cDNAライブラリーから分離された(非特許文献1)。推定460アミノ酸のhANGPTL3タンパク質は、76%のアミノ酸配列同一性をマウスANGPTL3と共有し、そしてアンギオポエチンの特性構造；即ち、シグナルペプチド、二量体又は三量体コイルドコイルを形成すると予測される伸長ヘリックスドメイン、ショートリンカーペプチド、及び球状フィブリノーゲン相同性ドメイン(FD)を有する(非特許文献1)。ANGPTL3は、FD内の分子内ジスルフィド結合に關与する4つの保存システイン残基を含有する；しかしながら、ANGPTL3は、血管新生を促進するタンパク質成長因子である、アンギオポエチンのFD(ANG；即ち、ANG1、ANG2及びANG4)中に見出される、2つの更なるシステインも特徴的なカルシウム結合モチーフも含有しない(非特許文献1)。加えて、ANGと異なり、ANGPTL3はTie2に結合しない；しかしながら、それはまたそのC末端FDを介してインテグリン α v β 3に結合することにより血管新生を誘導し得る(非特許文献2)。

40

【0003】

総合的インビボデータは、異常に高いレベルの血漿インスリン、グルコース、及び脂質を伴う中等度の肥満であって、ヒトの2型糖尿病に似た、非近交系KKマウスモデルから得られた(非特許文献3)。しかしながら、垂株マウスの1つ、KK/Sanは、メンデルの劣性として遺伝された異常に低い血漿脂質レベルを示すことが見出された(低脂肪血

50

症)。遺伝子座は染色体4にマップされ、そして最終的にエキソン6中に4bpヌクレオチド配列挿入を含有する、ANGPTL3をコード化する遺伝子であることが同定された(非特許文献3)。逆に、血漿脂質レベルは、アデノウイルス媒介ANGPTL3遺伝子導入後に、又はKK/Sanマウス中の組換えヒトANGPTL3の投与後に増加する。この効果は、コレステロール合成、リポタンパク質クリアランス又はNEFA酸化に関する遺伝子の変化によって媒介されなかった(非特許文献3)。更に、組換えタンパク質のインビトロ解析は、ANGPTL3がリポタンパク質リパーゼ(LPL)活性を直接阻害することを示したことから、LPL活性の阻害を通して超低密度リポタンパク質(VLDL)トリグリセリドレベルを調節する、脂質代謝モジュレーターであることを示唆する(非特許文献4)。ANGPTL3のN末端コイルドコイルドメイン、特にN末端領域残基17-165は(CD末端FDではなく)、マウスの血漿トリグリセリドレベルを増加させるその活性に必要なことを示している(非特許文献5)。

10

【0004】

ヒトANGPTL3のアミノ酸及びヌクレオチド配列は、それぞれ配列番号161及び162に示される。ANGPTL3に対する抗体は、例えば特許文献1及び2に開示される。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】WO2008/073300

20

【特許文献2】US7,935,796

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Conklin et al., 1999, Genomics 62: 477-482

【非特許文献2】Camenisch et al., 2002, J Biol Chem 277:17281-17290

【非特許文献3】Koishi et al., 2002, Nature Genetics 30:151-157

【非特許文献4】Shimizugawa et al., 2002, J Biol Chem 277(37):33742-33748

【非特許文献5】Ono et al., 2003, J Biol Chem 278:41804-41809

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

30

【0007】

第1の態様では、本発明は、ANGPTL3、特にヒトANGPTL3(配列番号161)の少なくとも1つの活性を、特異的に結合及び中和し、阻害し、ブロックし、抑止し、減少させ又は干渉する、完全ヒトモノクローナル抗体(mAb)及びその抗原結合フラグメントを提供する。本発明の抗体又はそのフラグメントにより、中和され、阻害され、ブロックされ、抑止され、減少され又は干渉され得るANGPTL3の活性は、限定されるものではないが、LPL活性の阻害、血管新生の誘導などを含む。1つの実施態様では、本発明の抗体又はそのフラグメントは、hANGPTL3の標的活性に直接関与するhANGPTL3のエピトープに結合することによって、hANGPTL3の活性を中和し、阻害し、ブロックし、停止し、減少させ又は干渉することができる。別の実施態様では、本発明の抗体又はそのフラグメントは、hANGPTL3の標的活性に直接関与しないhANGPTL3のエピトープに結合することによって、hANGPTL3の活性を中和し、阻害し、ブロックし、停止し、減少させ又は干渉することができるが、しかしそこへ結合する抗体又はフラグメントは、hANGPTL3の標的活性を立体的又は配座的に阻害し、ブロックし、停止し、減少させ又は干渉する。尚別の実施態様では、本発明の抗体又はそのフラグメントは、hANGPTL3(即ち、非ブロッキング抗体)の標的活性(例えば、LPL活性を阻害し、血管新生を誘導することなど)に直接関与しないhANGPTL3のエピトープに結合するが、しかしそこへ結合する抗体又はフラグメントは、抗体又はそのフラグメントの不存在下でのhANGPTL3のクリアランスと比べて、循環からのhANGPTL3のクリアランスの強化をもたらす、それによりhANGPTL3の

40

50

活性を間接的に阻害し、ブロックし、停止し、減少させ又は干渉する。循環からの h A N G P T L 3 のクリアランスは、特に h A N G P T L 3 への特異的結合のために互いに競合しない 2 つ又はそれ以上の異なる非ブロッキング抗体を組み合わせることによって強化されることができる。

【 0 0 0 8 】

抗体 (A b) は完全長 (例えば、 I g G 1 又は I g G 4 抗体) であり得て、又は抗原結合部分のみ (例えば、 F a b、 F (a b ')₂ 又は s c F v フラグメント) であってよく、そして機能性に影響を与えるように、例えば残存エフェクタ機能を除去するように修飾され得る (Reddy et al., 2000, J. Immunol. 164:1925-1933)。

【 発明の効果 】

10

【 0 0 0 9 】

1 つの実施態様では、本発明は、配列番号 2、18、34、50、66、82、98、114、130、146 及び 180、又は少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98% 又は少なくとも 99% 配列同一性を有する実質的にその類似配列から成る群から選択される重鎖可変領域 (H C V R) を含んでなる抗体又は抗体の抗原結合フラグメントを含む。別の実施態様では、抗体又はその抗原結合フラグメントは、配列番号 2、18、34、66、82、114、及び 180 から成る群から選択されるアミノ酸配列を有する H C V R を含む。尚別の実施態様では、抗体又はその抗原結合フラグメントは、配列番号 66 のアミノ酸配列を有する H C V R を含む。

【 0 0 1 0 】

20

1 つの実施態様では、抗体又は抗体の抗原結合フラグメントは、配列番号 10、26、42、58、74、90、106、122、138、154 及び 188、又は少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98% 又は少なくとも 99% 配列同一性を有する実質的にその類似配列から成る群から選択される軽鎖可変領域 (L C V R) を含む。別の実施態様では、抗体又は抗体の抗原結合部分は、配列番号 10、26、42、74、90、122 及び 188 から成る群から選択されるアミノ酸配列を有する L C V R を含む。尚別の実施態様では、抗体又は抗体の抗原結合部分は、配列番号 74 のアミノ酸配列を有する L C V R を含む。

【 0 0 1 1 】

更なる実施態様では、抗体又はそのフラグメントは、配列番号 2 / 10、18 / 26、34 / 42、50 / 58、66 / 74、82 / 90、98 / 106、114 / 122、130 / 138、146 / 154 及び 180 / 188 から成る群から選択される H C V R 及び L C V R 配列ペア (H C V R / L C V R) を含む。1 つの実施態様では、抗体又はそのフラグメントは、配列番号 2 / 10、18 / 26、34 / 42、66 / 74、82 / 90、114 / 122 及び 180 / 188 から成る群から選択される H C V R 及び L C V R 配列ペアを含む。別の実施態様では、抗体又はそのフラグメントは、配列番号 66 / 74 の H C V R 及び L C V R 配列ペアを含む。

30

【 0 0 1 2 】

第 2 の態様では、本発明は、配列番号 8、24、40、56、72、88、104、120、136、152 及び 186、又は少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98% 又は少なくとも 99% 配列同一性を有する実質的にその類似配列から成る群から選択される重鎖相補性決定領域 3 (H C D R 3) アミノ酸配列; 及び配列番号 16、32、48、64、80、96、112、128、144、160 及び 194、又は少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98% 又は少なくとも 99% 配列同一性を有する実質的にその類似配列から成る群から選択される軽鎖 C D R 3 (L C D R 3)、を含んでなる抗体又は抗体の抗原結合フラグメントを特徴とする。1 つの実施態様では、抗体又はそのフラグメントは、配列番号 8 / 16、24 / 32、40 / 48、56 / 64、72 / 80、88 / 96、104 / 112、120 / 128、136 / 144、152 / 160 又は 186 / 194 を含んでなる H C D R 3 / L C D R 3 アミノ酸配列ペアを含む。別の実施態様では、抗体又はそのフラグメントは、配列番号 8 / 16、24 / 32、40 /

40

50

48、72/80、88/96、120/128又は186/194を含んでなるHCDR3/LCDR3アミノ酸配列ペアを含む。尚別の実施態様では、抗体又はそのフラグメントは、配列番号72/80を含んでなるHCDR3/LCDR3アミノ酸配列ペアを含む。

【0013】

更なる実施態様では、抗体又はそのフラグメントは、配列番号4、20、36、52、68、84、100、116、132、148及び182、又は少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%又は少なくとも99%配列同一性を有する実質的にその類似配列から成る群から選択される重鎖CDR1(HCDR1)アミノ酸配列；及び配列番号6、22、38、54、70、86、102、118、134、150及び184、又は少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%又は少なくとも99%配列同一性を有する実質的にその類似配列から成る群から選択される重鎖CDR2(HCDR2)を更に含む；そして選択的に、配列番号12、28、44、60、76、92、108、124、140、156及び190、又は少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%又は少なくとも99%配列同一性を有する実質的にその類似配列から成る群から選択される軽鎖CDR1(LCDR1)アミノ酸配列；及び/又は配列番号14、30、46、62、78、94、110、126、142、158及び192、又は少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%又は少なくとも99%配列同一性を有する実質的にその類似配列から成る群から選択される軽鎖CDR2(LCDR2)アミノ酸配列を更に含む。

10

20

【0014】

あるいは、本発明は、配列番号4/6/8、20/22/24、36/38/40、52/54/56、68/70/72、84/86/88、100/102/104、116/118/120、132/134/136、148/150/152及び182/184/186から成る群から選択されるHCDR1/HCDR2/HCDR3組み合わせ；及び/又は配列番号12/14/16、28/30/32、44/46/48、60/62/64、76/78/80、92/94/96、108/110/112、124/126/128、140/142/144、156/158/160及び190/192/194から成る群から選択されるLCDR1/LCDR2/LCDR3組み合わせを含んでなる、抗体又は抗体の抗原結合フラグメントを特徴とする。1つの実施態様では、重鎖及び軽鎖CDRアミノ酸配列は、配列番号4/6/8/12/14/16、20/22/24/28/30/32、36/38/40/44/46/48、52/54/56/60/62/64、68/70/72/76/78/80、84/86/88/92/94/96、100/102/104/108/110/112、116/118/120/124/126/128、132/134/136/140/142/144、148/150/152/156/158/160及び182/184/186/190/192/194から成る群から選択されるCDR組み合わせを含む。1つの実施態様では、重鎖及び軽鎖CDRアミノ酸配列は、配列番号4/6/8/12/14/16、20/22/24/28/30/32、36/38/40/44/46/48、68/70/72/76/78/80、84/86/88/92/94/96、116/118/120/124/126/128又は182/184/186/190/192/194のCDR組み合わせを含む。別の実施態様では、重鎖及び軽鎖CDRアミノ酸配列は、配列番号68/70/72/76/78/80のCDR配列組み合わせを含む。

30

40

【0015】

関連実施態様では、本発明は、hANGPTL3を特異的に結合する抗体又は抗体の抗原結合フラグメントを含み、ここで抗体又はそのフラグメントは、配列番号2/10、18/26、34/42、50/58、66/74、82/90、98/106、114/122、130/138、146/154及び180/188から成る群から選択されるHCVR/LCVRペア内に含有される重鎖及び軽鎖CDRドメインを含む。HCVR及びLCVRアミノ酸配列内でCDRを同定する方法及び技術は当技術分野で公知であり、

50

そして本明細書に開示される特定H C V R及び/又はL C V Rアミノ酸配列内でC D Rを同定するのに適用されることができ、C D Rの境界を同定するのに適用されることができ、従来の定義は、Kabat定義、Chothia定義、及びAbM定義を含む。大まかに言えば、Kabat定義は配列可変性に基づいており、Chothia定義は構造ループ領域の位置に基づいており、そしてAbM定義はKabatとChothiaアプローチ間の折衷案である。例えば、Kabat、「免疫学的に重要なタンパク質の配列」、National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol. 273:927-948 (1997);及びMartin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9268-9272 (1989)を参照されたい。公開データベースはまた抗体内のC D R配列を同定するのに入手可能である。1つの実施態様では、抗体又はそのフラグメントは、配列番号2 / 10、18 / 26、34 / 42、66 / 74、82 / 90、114 / 122又は180 / 188のH C V R及びL C V Rペア内に含有されるC D R配列を含む。別の実施態様では、抗体又はそのフラグメントは、配列番号66 / 74のH C V R及びL C V Rペア内に含有されるC D R配列を含む。

10

【0016】

別の関連実施態様では、本発明は、配列番号2 / 10、/ 26、34 / 42、50 / 58、66 / 74、82 / 90、98 / 106、114 / 122、130 / 138、146 / 154又は180 / 188のH C V R / L C V R配列ペア中に含有される重鎖及び軽鎖C D R配列を含んでなる、抗体又は抗原結合フラグメントとh A N G P T L 3への特異的結合を競合する抗体又はその抗原結合フラグメントを提供する。1つの実施態様では、本発明の抗体又は抗原フラグメントは、配列番号66 / 74のH C V R / L C V R配列ペアを含んでなる抗体又はそのフラグメントとh A N G P T L 3への特異的結合を競合する。別の実施態様では、本発明の抗体又は抗原結合フラグメントは、4 / 6 / 8 / 12 / 14 / 16、20 / 22 / 24 / 28 / 30 / 32、36 / 38 / 40 / 44 / 46 / 48、52 / 54 / 56 / 60 / 62 / 64、68 / 70 / 72 / 76 / 78 / 80、84 / 86 / 88 / 92 / 94 / 96、100 / 102 / 104 / 108 / 110 / 112、116 / 118 / 120 / 124 / 126 / 128、132 / 134 / 136 / 140 / 142 / 144、148 / 150 / 152 / 156 / 158 / 160及び182 / 184 / 186 / 190 / 192 / 194から成る群から選択される重鎖及び軽鎖C D R配列組み合わせを含んでなる、抗体又はそのフラグメントとh A N G P T L 3への特異的結合を競合する。1つの実施態様では、本発明の抗体又はその抗原結合フラグメントは、配列番号68 / 70 / 72 / 76 / 78 / 80の重鎖及び軽鎖C D R配列組み合わせを含んでなる、抗体又はそのフラグメントとh A N G P T L 3への特異的結合を競合する。

20

30

【0017】

別の関連実施態様では、本発明は、配列番号2 / 10、18 / 26、34 / 42、50 / 58、66 / 74、82 / 90、98 / 106、114 / 122、130 / 138、146 / 154又は180 / 188のH C V R / L C V R配列ペアからの重鎖及び軽鎖C D R配列を含んでなる、抗体又はそのフラグメントによって認識されるh A N G P T L 3上に同じエピトープを結合する、抗体又はその抗原結合フラグメントを提供する。1つの実施態様では、本発明の抗体又は抗原結合フラグメントは、配列番号66 / 74のH C V R / L C V R配列ペアを含んでなる、抗体又はそのフラグメントによって認識されるようなh A N G P T L 3上に同じエピトープを結合する。1つの実施態様では、本発明の抗体又はそのフラグメントは、4 / 6 / 8 / 12 / 14 / 16、20 / 22 / 24 / 28 / 30 / 32、36 / 38 / 40 / 44 / 46 / 48、52 / 54 / 56 / 60 / 62 / 64、68 / 70 / 72 / 76 / 78 / 80、84 / 86 / 88 / 92 / 94 / 96、100 / 102 / 104 / 108 / 110 / 112、116 / 118 / 120 / 124 / 126 / 128、132 / 134 / 136 / 140 / 142 / 144、148 / 150 / 152 / 156 / 158 / 160及び182 / 184 / 186 / 190 / 192 / 194から成る群から選択される重鎖及び軽鎖C D R配列組み合わせを含んでなる、抗体又はそのフラグメントによって認識されるh A N G P T L 3上に同じエピトープを結合する。1つの実施態様では、そのようなエピトープは、配列番号68 / 70 / 72 / 76 / 78 / 80の重

40

50

鎖及び軽鎖 C D R 配列組み合わせを含んでなる、抗体又はそのフラグメントによって認識される。

【 0 0 1 8 】

第3の態様では、本発明は、配列番号161の残基17～209におけるN末端コイルドコイル領域内に位置するエピトープに結合する、単離された抗hANGPTL3抗体又はその抗原結合フラグメントを特徴とし、そして少なくとも1つのhANGPTL3の活性を中和し、阻害し、停止し、減少させ又は干渉する。別の実施態様では、本発明は、hANGPTL3(配列番号161)のN末端コイルドコイル領域内に位置するエピトープに特異的に結合する、単離された抗体又は抗体の抗原結合フラグメントをもたらし、そして少なくとも1つのhANGPTL3の活性を中和し、阻害し、停止し、減少させ又は干渉し、但し抗体又はそのフラグメントは、配列番号170(配列番号161のhANGPTL3の残基Glu32～Leu57に対応する)のANGPTL3ペプチドに結合しない。1つの実施態様では、本発明の抗体又はそのフラグメントは、hANGPTL3(配列番号161)の残基17～200、17～100、17～70、17～65、17～60、17～57、又は17～50内のエピトープに特異的に結合し、但し選択的に抗体又はそのフラグメントは配列番号170のANGPTL3ペプチドに結合しない。別の実施態様では、抗体又はそのフラグメントは、hANGPTL3(配列番号161)の残基40～200、40～100、40～70、50～200、50～100、50～70、58～200、58～100、58～70、58～68、又は61～66内のエピトープに特異的に結合し、但し選択的に抗体又はそのフラグメントは配列番号170のANGPTL3ペプチドに結合しない。幾つかの実施態様では、抗体又は抗体フラグメントは、hANGPTL3のN末端コイルドコイル領域内の列挙エピトープ又は残基の1つより多くにかかわり得るエピトープを結合し、但し選択的に抗体又はそのフラグメントは配列番号170のANGPTL3ペプチドに結合しない。

【 0 0 1 9 】

第4の態様では、本発明は、抗ANGPTL3抗体又はそのフラグメント、特に上記のいずれかをコードする核酸分子を提供する。本発明の核酸を運ぶ組換え体発現ベクター、及びそのようなベクターが導入されている宿主細胞、例えば、大腸菌のような細菌細胞、又はCHO細胞のような哺乳動物細胞もまた、抗体の生産を可能にする条件下で宿主細胞を培養することにより抗体を生産し、そして産生抗体の回収する方法のように、本発明によって包含される。

【 0 0 2 0 】

1つの実施態様では、配列番号1、17、33、49、65、81、97、113、129、145及び179、又は少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、又は少なくとも99%その相同性を有する実質的に同一の配列から成る群から選択される核酸配列によってコード化されるHCVRを含んでなる、抗体又はそのフラグメントを提供する。別の実施態様では、抗体又はそのフラグメントは、配列番号1、17、33、65、81、113又は179の核酸配列によってコード化されるHCVRを含む。尚別の実施態様では、抗体又はそのフラグメントは、配列番号65の核酸配列によってコード化されるHCVRを含む。

【 0 0 2 1 】

1つの実施態様では、抗体又はその抗原結合フラグメントは、配列番号9、25、41、57、73、89、105、121、137、153及び187、又は少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、又は少なくとも99%その相同性を有する実質的に同一の配列から成る群から選択される核酸配列によってコード化されるLCVRを含む。別の実施態様では、抗体又はそのフラグメントは、配列番号9、25、41、73、89、121又は187の核酸配列によってコード化されるLCVRを含む。尚別の実施態様では、抗体又はそのフラグメントは、配列番号73の核酸配列によってコード化されるLCVRを含む。

【 0 0 2 2 】

10

20

30

40

50

更なる実施態様では、抗体又はそのフラグメントは、配列番号 1 / 9、17 / 25、33 / 41、49 / 57、65 / 73、81 / 89、97 / 105、113 / 121、129 / 137、145 / 153 及び 179 / 187 から成る群から選択される核酸配列ペアによってコード化される H C V R 及び L C V R (H C V R / L C V R) 配列ペアを含む。1つの実施態様では、抗体又はそのフラグメントは、配列番号 1 / 9、17 / 25、33 / 41、65 / 73、81 / 89、113 / 121 又は 179 / 187 の核酸配列ペアによってコード化される H C V R / L C V R 配列ペアを含む。別の実施態様では、抗体又はそのフラグメントは、配列番号 65 / 73 の核酸配列ペアによってコード化される H C V R / L C V R 配列ペアを含む。

【 0 0 2 3 】

1つの実施態様では、本発明は、配列番号 7、23、39、55、71、87、103、119、135、151 及び 185、又は少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、又は少なくとも 99% その同一性を有する実質的に同一の配列から成る群から選択されるヌクレオチド配列によってコード化される H C D R 3 ドメイン；及び配列番号 15、31、47、63、79、95、111、127、143、159 及び 193、又は少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、又は少なくとも 99% その同一性を有する実質的に同一の配列から成る群から選択されるヌクレオチド配列によってコード化される L C D R 3 ドメインを含んでなる、抗体又は抗体の抗原結合フラグメントを特徴とする。1つの実施態様では、抗体又はそのフラグメントは、配列番号 7 / 15、23 / 31、39 / 47、55 / 63、71 / 79、87 / 95、103 / 111、119 / 127、135 / 143、151 / 159 及び 185 / 193 から成る群から選択される核酸配列ペアによってコード化される H C D R 3 及び L C D R 3 配列ペアを含む。別の実施態様では、抗体又はそのフラグメントは、配列番号 7 / 15、23 / 31、39 / 47、71 / 79、87 / 95、119 / 127 又は 185 / 193 の核酸配列ペアによってコード化される H C D R 3 及び L C D R 3 配列ペアを含む。尚別の実施態様では、抗体又はそのフラグメントは、配列番号 71 / 79 核酸配列ペアによってコード化される H C D R 3 及び L C D R 3 配列ペアを含む。

【 0 0 2 4 】

更なる実施態様では、抗体又はそのフラグメントは更に、配列番号 3、19、35、51、67、83、99、115、131、147 及び 181、又は少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、又は少なくとも 99% その同一性を有する実質的に同一の配列から成る群から選択されるヌクレオチド配列によってコード化される H C D R 1 ドメイン；及び配列番号 5、21、37、53、69、85、101、117、133、149 及び 183、又は少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、又は少なくとも 99% その同一性を有する実質的に同一の配列から成る群から選択されるヌクレオチド配列によってコード化される H C D R 2 ドメインを含む；そして配列番号 11、27、43、59、75、91、107、123、139、155 及び 189、又は少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、又は少なくとも 99% その同一性を有する実質的に同一の配列から成る群から選択されるヌクレオチド配列によってコード化される L C D R 1 ドメイン；及び / 又は配列番号 13、29、45、61、77、93、109、125、141、157 及び 191、又は少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、又は少なくとも 99% その同一性を有する実質的に同一の配列から成る群から選択されるヌクレオチド配列によってコード化される L C D R 2 ドメインを選択的に更に含む。

【 0 0 2 5 】

あるいは、本発明は、配列番号 3 / 5 / 7、19 / 21 / 23、35 / 37 / 39、51 / 53 / 55、67 / 69 / 71、83 / 85 / 87、99 / 101 / 103、115 / 117 / 119、131 / 133 / 135、147 / 149 / 151 及び 181 / 183 / 185 から成る群から選択されるヌクレオチド配列組み合わせによってコード化される、H C D R 1 / H C D R 2 / H C D R 3 組み合わせ；及び / 又は配列番号 11 / 13 /

10

20

30

40

50

15、27/29/31、43/45/47、59/61/63、75/77/79、91/93/95、107/109/111、123/125/127、139/141/143、155/157/159及び189/191/193から成る群から選択されるヌクレオチド配列組み合わせによってコード化される、LCDR1/LCDR2/LCDR3組み合わせを含んでなる、抗体又は抗体の抗原結合フラグメントを特徴とする。1つの実施態様では、抗体又はそのフラグメントは、配列番号67/69/71/75/77/79ヌクレオチド配列組み合わせによってコード化される重鎖及び軽鎖CDR配列を含む。

【0026】

第5の態様では、本発明は、 V_H 、 D_H 及び J_H 生殖細胞系配列から由来するヌクレオチド配列セグメントによってコード化される重鎖可変領域(HCVR)、及び V_K 及び J_K 生殖細胞系配列から由来するヌクレオチド配列セグメントによってコード化される軽鎖可変領域(LCVR)を含んでなる、ヒト抗ANGPTL3抗体又はその抗原結合フラグメントを特徴とし、ここでHCVR及びLCVRは：(i) V_H3-43 、 D_H3-3 、 J_H3 、 V_K1-5 及び J_K2 ；(ii) V_H3-11 、 D_H1-1 、 J_H4 、 V_K1-39 及び J_K4 ；(iii) V_H3-30 、 D_H1-7 、 J_H6 、 V_K1-5 及び J_K1 ；(iv) V_H3-30 、 D_H1-26 、 J_H6 、 V_K1-12 及び J_K3 ；(v) V_H3-30 、 D_H3-10 、 J_H6 、 V_K1-12 及び J_K3 ；及び(vi) V_H3-23 、 D_H3-10 、 J_H4 、 V_K1-5 及び J_K1 から成る群から選択される生殖細胞系遺伝子組み合わせから由来するヌクレオチド配列セグメントによってコード化される。

【0027】

第6の態様では、本発明は、表面プラズモン共鳴アッセイ(例えば、BIACORE(商標))で測定された通り、約7nM以下、約6nM以下、約5nM以下、約4nM以下、約3nM以下、2nM以下、又は約1nM以下の平行解離定数(K_D)でhANGPTL3に特異的に結合する、抗体又はその抗原結合フラグメントを特徴とする。ある実施態様では、本発明の抗体は、約800pM以下、約700pM以下；約600pM以下、約500pM以下；約400pM以下；約300pM以下；約200pM以下；約100pM以下；又は約50pM以下の K_D を示す。

【0028】

第7の態様では、本発明は、配列番号161のhANGPTL3タンパク質を結合する抗hANGPTL3抗体又はその抗原結合フラグメントを提供するが、しかし、本明細書に記載のように、例えば、ELISA、表面プラズモン共鳴アッセイ、又はLUMINEX(登録商標)XMAP(登録商標)技術によって決定されるように、ヒトアンジオポエチン様タンパク質4(hANGPTL4；配列番号164)のような、関連タンパク質と交差反応しない。ANGPTL4は、LPL活性を低下させることが知られている別の分泌タンパク質であり、そしてN末端コイルドコイル領域及びC末端フィブリノーゲン様ドメインを有する(Ge et al., 2004, J Biol Chem 279:2038-2045; Yau et al., 2009, J Biol Chem 284:11942-11952)。関連実施態様では、本発明は、hANGPTL3タンパク質を結合し、そしてhANGPTL4タンパク質と交差反応する抗hANGPTL3抗体又はその抗原結合フラグメントを提供する。ある実施態様では、hANGPTL4タンパク質に対するhANGPTL3抗体又はそのフラグメントの結合親和性は、hANGPTL3タンパク質に対する抗体又はフラグメントの結合親和性の、約75%以下、又は約50%以下である。

【0029】

別の関連実施態様では、本発明は、マウスANGPTL3(mANGPTL3；配列番号163)、又はラットANGPTL3(rANGPTL3；配列番号175)と交差反応しないで、カニクイザル(Macaca fascicularis)ANGPTL3(MfANGPTL3)と、例えば配列番号177(MfANGPTL3の部分アミノ酸配列)のN末端17-170残基と交差反応する、抗hANGPTL3抗体又はその抗原結合フラグメントを提供する。尚別の関連実施態様では、本発明は、MfANGPTL3、mANGPTL3及

10

20

30

40

50

び r A N G T P L 3 と交差反応する、抗 h A N G P T L 3 抗体又はその抗原結合フラグメントを提供する。

【 0 0 3 0 】

本発明は、修飾グリコシル化タンパク質を有する抗 h A N G P T L 3 抗体を包含する。使用目的によっては、望ましくないグリコシル化部位を除去するための修飾、又は例えば抗体依存性細胞傷害 (A D C C) 機能を増加させるためのフコース部分の除去 (Shield et al. (2002) JBC 277:26733参照) は有用であり得る。他の応用では、Nグリコシル化部位の除去は、治療抗体に対する望ましくない免疫反応を減少させ得るか、又は抗体の親和性を増加させ得る。尚他の応用では、ガラクトシル化修飾が、補体依存性細胞傷害 (C D C) を修飾するために行われることができる。

10

【 0 0 3 1 】

第 8 の態様では、本発明は、h A N G P T L 3 及び薬学的に許容される担体の特異的に結合する、組換えヒト抗体又はそのフラグメントを含んでなる医薬組成物を特徴とする。1つの実施態様では、本発明は、互いと交差競合しない本発明の1つ又はそれ以上の抗 A N G P T L 3 抗体又はそのフラグメントを含んでなる医薬組成物、及び薬学的に許容される担体を提供する。1つの実施態様では、本発明の医薬組成物は、h A N G P T L 3 への特異的結合に対して互いと競合しない2つ又はそれ以上の非ブロッキング抗体を含有することができ、そして循環から h A N G P T L 3 をクリアするのに有効である。非ブロッキング抗体の好適な組み合わせは、限定されるものではないが：(i) それぞれ、配列番号 8 2 / 9 0 及び 1 8 0 / 1 8 8 ; (i i) それぞれ、配列番号 1 1 4 / 1 2 2 及び 1 8 0 / 1 8 8 ; (i i i) それぞれ、配列番号 8 2 / 9 0 及び 1 8 / 2 6 ; 又は (i v) それぞれ、配列番号 1 1 4 / 1 2 2 及び 1 8 / 2 6 の、H C V R 及び L C V R 配列ペア (H C V R / L C V R) を含んでなる抗体の組み合わせを含む。

20

【 0 0 3 2 】

関連実施態様では、本発明は、本発明の抗体又はその抗原結合フラグメント、及び第 2 の治療剤の組み合わせである組成物を特徴とする。第 2 の治療剤は、(1) セリバスタチン、アトルバスタチン、シンバスタチン、ピタバスタチン、ロスバスタチン、フルバスタチン、ロバスタチン、プラバスタチンなどのような、3 - ヒドロキシ - 3 - メチルグルタリル - コエンザイム A (H M G - C o A) レダクターゼ阻害剤；(2) コレステロール取込及び/又は胆汁酸再吸収の阻害剤；(3) リポタンパク質異化を増強するナイアシン；(4) 低密度リポタンパク質 (L D L) レベルを減少させ、高密度リポタンパク質 (H D L) 及び T G レベルを改善し、そして非致死的心臓発作の数を減少させる、フィブラート系薬剤又は両親媒性カルボン酸；そして(5) 2 2 - ヒドロキシコレステロールのようなコレステロール除去の役割を果たす L X R 転写因子のアクチベータ、又はエゼチミベ + シンバスタチンのような固定組み合わせ；胆汁樹脂 (例えば、コレステラミン、コレステポール、コレセベラム) とスタチン、ナイアシン + スタチンの固定組み合わせ (例えば、ロバスタチンとナイアシン)；又はオメガ - 3 - 脂肪酸エチルエステル (例えば、オマコール (omacor) と) のような他の脂質低下薬との固定組み合わせなど、1つ又はそれ以上のいずれの薬剤であってよい。更に、第 2 の治療剤は、1つ又はそれ以上の A N G P T L 3 の阻害剤、並びに脂質代謝、特にコレステロール及び/又はトリグリセリドホメオスタシスに關与する、A N G P T L 4、A N G P T L 5、A N G P T L 6 及びプロタンパク質コンベルターゼスプチリシン/ケキシントイプ 9 (P C S K 9) などの他の分子の阻害剤であり得る。これらの分子の阻害剤は、これらの分子に特異的に結合しそしてそれらの活性をブロックする小分子及び抗体を含む。

30

40

【 0 0 3 3 】

関連実施態様では、第 2 の治療剤は、化学療法薬、抗血管新生薬、増殖阻害剤、細胞毒性薬、アポトーシス薬などの1つ又はそれ以上の抗癌剤、及び癌又は他の増殖性疾患又は障害を処置するのに当技術分野で周知の他の薬剤、並びに基礎となる癌/腫瘍に伴う症状を回復及び/又は軽減させるのに、鎮痛薬、C o x - 2 阻害剤のような非ステロイド性抗炎症薬 (N S A I D S) を含む抗炎症薬などであってよい。

50

【 0 0 3 4 】

第9の態様では、本発明の1つ又はそれ以上の抗hANGPTL3抗体又はその抗原結合フラグメントを用いて、hANGPTL3活性を中和し、阻害し、ブロックし、抑止し、減少させ又は干渉する方法を特徴とする。1つの実施態様では、本発明は、治療方法であって、それを必要とする対象(subject)に本発明の1つ又はそれ以上の抗hANGPTL3抗体又はその抗原結合フラグメント、及び選択的に上記の1つ又はそれ以上の更なる治療剤を含んでなる、医薬組成物の医療的有効量を投与することを含んでなる、上記方法を提供する。本発明の抗ANGPTL3抗体又はそのフラグメントは、ANGPTL3に対する中和抗体若しくは非ブロッキング抗体、又はその組み合わせであってよい。

【 0 0 3 5 】

関連実施態様では、本発明は、hANGPTL3に結合するのに互いと競合せず、そして好ましくはhANGPTL3の少なくとも1つの活性をブロックしない(即ち、非ブロッキング抗体)、本発明の少なくとも2つの抗hANGPTL3抗体又はそのフラグメントを対象に投与することを含んでなる、それを必要とする対象の循環からhANGPTL3のクリアランスを強化する方法を提供する。調べられたhANGPTL3の少なくとも1つの活性は、限定されるものではないが、LPL活性を阻害すること、血管新生を誘導することなどを含む。1つの実施態様では、少なくとも2つの非ブロッキング抗hANGPTL3抗体又はそのフラグメントの組み合わせは、抗体又はフラグメントを投与しないのに対して、少なくとも約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、又は約80%だけ循環からのクリアランスを強化する。hANGPTL3の循環レベルは、当技術分野で周知のインビトロアッセイ及び明細書記載の方法で測定されることができる。別の実施態様では、少なくとも2つの非ブロッキング抗hANGPTL3抗体の組み合わせは：(i)それぞれ、配列番号82/90及び180/188；(ii)それぞれ、配列番号114/122及び180/188；(iii)それぞれ、配列番号82/90及び18/26；又は(iv)それぞれ、配列番号114/122及び18/26の、HCVR及びLCVR配列ペア(HCVR/LCVR)を含む。

【 0 0 3 6 】

本発明の方法により処置可能な疾患又は障害は、改善され、軽減され、阻害され又は予防されるいずれもの疾患又は病態であり、又はその発生率は、抗hANGPTL3抗体処置のない場合(例えば、ANGPTL3媒介疾患又は障害)と比べて、ANGPTL3活性を除去し、阻害し、低減し、又はさもなければ干渉することによって減少する。本発明の方法により処置可能な疾患又は障害の例は、限定されるものではないが、例えば、LPL活性低下及び/又はLPL欠乏、LDL受容体(LDLR)活性低下及び/又はLDL受容体欠乏(例えば、LDLR^{-/-}を伴うホモ接合性家族性高コレステロール血症)、ApoC2変質、ApoE欠乏、ApoB増加、超低密度リポタンパク質(VLDL)の産生増加及び/又は除去減少、ある薬物処置(例えば、グルココルチコイド処置誘発脂質異常症、いずれかの遺伝性素因、食事、ライフスタイルなどに起因する、アテローム性脂質異常症、糖尿病性アテローム性脂質異常症、TG>1000 mg/dLの重度高トリグリセリド血症を含む高トリグリセリド血症、高コレステロール血症、カイロミクロン血症、混合脂質異常症(肥満、メタボリックシンドローム、糖尿病など)、リポジストロフィー、脂肪萎縮症を含む、高脂血症、高リポ蛋白質血症及び脂質異常症などの脂質代謝にかかわる疾患を含む。本発明の方法はまた、限定されるものではないが、アテローム性動脈硬化症、動脈瘤、高血圧症、狭心症、卒中、脳血管疾患、鬱血性心不全、冠状動脈疾患、心筋梗塞、末梢血管疾患などの心血管疾患及び障害；急性膵炎；非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)；糖尿病のような血糖障害；肥満などを含み、高脂血症、高リポ蛋白質血症、及び/又は脂質異常症を伴う又はそれから生じる疾患又は障害を阻止又は処置することができる。

【 0 0 3 7 】

本発明の方法によって処置可能な疾患又は障害の他の例は、癌/腫瘍、並びに加齢黄斑変性症、網膜中心静脈閉塞症又は網膜静脈分枝閉塞症、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症な

10

20

30

40

50

どの眼血管由来疾患又は障害を含む、非腫瘍性血管新生関連疾患又は障害、関節炎、関節リウマチ（RA）、乾癬などの炎症性疾患又は障害を含む。

【0038】

他の実施態様は、下記の詳細説明の精査によって明らかになるものである。

【図面の簡単な説明】

【0039】

【図1】 hANGPTL3配列（即ち、配列番号161の残基30～70又はGenBank#NP_055310内）の関連部分に対する抗hANGPTL3抗体結合実験（実施例5）で使用されたペプチド1-3の配列アラインメントを示す。ペプチド1（対照：ANGPTL4ペプチド；配列番号168）；ペプチド2（ANGPTL3ペプチド；配列番号：169）；及びペプチド3（ANGPTL3ペプチド；配列番号：170）。 10

【図2】 hANGPTL3（ペプチド2及び3）又はhANGPTL4（ペプチド

【化1】



イソタイプ対照；及び（H4H1276S抗体）のN末端コイルドコイルペプチドに結合する抗hANGPTL3抗体の結果を示す。

【0040】

本発明が詳細に記載される前に、当然のことながら、方法及び条件は変動し得ることから、本発明は記載される特定の方法及び実験条件に限定されるものではない。また当然のことながら、本明細書に使用される用語は特定の実施態様を記載する目的のためだけであり、そして本発明の範囲は添付請求の範囲だけによって限定され得ることから、限定することを目的とするものではない。 20

【発明を実施するための形態】

【0041】

他に規定されない限り、本明細書に使用されるすべての技術的及び科学的用語は、本発明が所属する当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載のものと同様又は同等のいずれの方法及び材料は本発明の実施又は試験において使用されることができるが、好ましい方法及び材料はこれから記載される。 30

【0042】

定義

本明細書に使用される用語「ヒトアンギオポエチン様蛋白質3」又は「hANGPTL3」は、配列番号162に示される核酸配列及び配列番号161のアミノ酸配列、又は生物学的に活性なそのフラグメントを有するANGPTL3をいう。

【0043】

本明細書に使用される用語「抗体」は、4つのポリペプチド鎖、ジスルフィド結合によって相互連結された2つの重鎖（H）及び2つの軽鎖（L）から成る免疫グロブリン分子をいう。各重鎖は、重鎖可変領域（HCVR）及び重鎖定常領域（C_H；ドメインC_H1、C_H2及びC_H3から成る）から成る。各軽鎖は、軽鎖可変領域（LCVR）及び軽鎖定常領域（C_L）から成る。HCVR及びLCVRは更に、フレームワーク領域（FR）と呼ばれるより保存されている領域が組み入れられている、重鎖相補性決定領域（CDR）と呼ばれる超可変領域に細分されることができる。各HCVR及びLCVRは、下記の順序：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4でアミノ末端からカルボキシ末端まで配列された3つのCDR及び4つのFRから成る。 40

【0044】

1つ又はそれ以上のCDR残基の置換又は1つ又はそれ以上のCDRの欠落も可能である。1つ又は2つのCDRは結合のためになしで済ますことができる抗体が科学文献に記載されている。Padlan et al. (1995 FASEB J. 9:133-139)は、公開結晶構造に基づいて抗体とそれらの抗原間の接触領域を解析し、そしてCDR残基の約1/5～1/3だけが実際に抗原と接触すると結論した。Padlanはまた、1つ又は2つのCDRが抗原と接触し 50

たアミノ酸を有さない多くの抗体を見出した (Vajdos et al. 2002 J Mol Biol 320:415-428をも参照されたい)。

【 0 0 4 5 】

抗原と接触しない C D R 残基は、分子モデルによって及び / 又は経験的に、Chothia C D R の外側にある Kabat C D R の領域から、既研究 (例えば、C D R H 2 中の H 6 0 - H 6 5 はしばしば必要とされない) に基づいて同定されることができる。C D R 又はその 1 つ又は複数の残基が欠落している場合、それは通常別のヒト抗体配列又はそのような配列のコンセンサス中に対応する位置を占めるアミノ酸と置換される。置換しようとする C D R 及びアミノ酸内に置換する位置はまた、経験的に選択されることができる。経験的置換は保存的又は非保存的置換であり得る。

10

【 0 0 4 6 】

本明細書に使用される用語「ヒト抗体」は、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列から由来する可変及び定常領域を有する抗体を含むことを目的としている。本発明のヒト m A b は、例えば C D R 及び特に C D R 3 において、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列 (例えば、インビトロランダム又は部位特異的突然変異誘発によって、又はインビボ体細胞突然変異によって導入される突然変異) によってコード化されないアミノ酸残基を含んでよい。しかしながら、本明細書に使用される用語「ヒト抗体」は、別の哺乳動物種 (例えば、マウス) の生殖細胞系から由来する C D R 配列がヒト F R 配列へグラフトされている、m A b を含むことを目的としていない。

【 0 0 4 7 】

20

本明細書に開示の完全ヒト抗 h A N G P T L 3 抗体は、対応する生殖細胞系配列と比べて、重鎖及び軽鎖の可変ドメインのフレームワーク及び / 又は C D R 領域に 1 つ又はそれ以上のアミノ酸の置換、挿入及び / 又は欠失を含んでよい。そのような突然変異は、本明細書に開示されるアミノ酸配列を、例えば公開抗体配列データベースから得られる生殖細胞系配列と比較することによって容易に確認されることができる。本発明は、本明細書に開示のいずれかのアミノ酸配列から由来する抗体、及びその抗原結合フラグメントを含み、ここで 1 つ又はそれ以上のフレームワーク及び / 又は C D R 領域内の 1 つ又はそれ以上のアミノ酸は、抗体が由来する生殖細胞系配列の対応する 1 つ又は複数の残基に、又は別のヒト生殖細胞系配列の対応する 1 つ又は複数の残基に、又は対応する 1 つ又は複数の生殖細胞系残基の保存的アミノ酸置換に突然変異される (そのような配列変化は本明細書において総称して「生殖細胞系突然変異」といわれる)。本明細書に開示の配列重鎖及び軽鎖可変領域配列を始めとして、当業者は、1 つ又はそれ以上の個々の生殖細胞系復帰突然変異又はその組み合わせを含む、多数の抗体及びその抗原結合フラグメントを容易に産生することができる。ある実施態様では、V_H 及び / 又は V_L ドメイン内のフレームワーク及び / 又は C D R 残基のすべては、抗体が由来する元の生殖細胞系配列に見出される残基に復帰突然変異される。他の実施態様では、ある残基だけ、例えば、F R 1 の最初の 8 アミノ酸内又は F R 4 の最後の 8 アミノ酸内に見出される変異残基だけ、又は C D R 1、C D R 2 又は C D R 3 内に見出される変異残基だけが元の生殖細胞系配列に復帰突然変異される。他の実施態様では、1 つ又はそれ以上のフレームワーク及び / 又は 1 つ又は複数の C D R 残基は、異なる生殖細胞系配列 (即ち、抗体が元々由来する生殖細胞系配列と異なる生殖細胞系配列) の対応する 1 つ又は複数の残基に突然変異される。更に、本発明の抗体は、フレームワーク及び / 又は C D R 領域内の 2 つ又はそれ以上の生殖細胞系突然変異のいずれの組み合わせを含んでもよく、例えば、ここである個々の残基は、特定の生殖細胞系配列の対応する残基に突然変異され、一方で元の生殖細胞系配列と異なる他の残基は維持され、又は異なる生殖細胞系配列の対応する残基に突然変異される。一度得られると、1 つ又はそれ以上の生殖細胞系突然変異を含有する抗体及びその抗原結合フラグメントは、結合特異性改善、結合親和性増加、アンタゴニスト又はアゴニスト生物学的特性の改善又は強化 (場合によっては)、免疫原性低減などのような 1 つ又はそれ以上の望ましい性質を容易に検査されることができる。一般的このようにして得られる抗体及びその抗原結合フラグメント本発明の範囲に包含される。

30

40

50

【 0 0 4 8 】

本発明はまた、1つ又はそれ以上の保存的置換を有する本明細書に開示のいずれかのH C V R、L C V R、及び/又はC D Rアミノ酸配列のバリエーションを含んでなる抗A N G P T L 3抗体を含む。例えば、本発明は、本明細書に開示のいずれかのH C V R、L C V R、及び/又はC D Rアミノ酸配列に対して、例えば、10以下、8以下、6以下、4以下、2又は1の1つ又は複数のアミノ酸置換のH C V R、L C V R、及び/又はC D Rアミノ酸配列を有する抗A N G P T L 3抗体を含む。1つの実施態様では、H C V Rは、それに10以下の保存的アミノ酸置換の配列番号487のアミノ酸配列を含む。別の実施態様では、H C V Rは、それに8以下の保存的アミノ酸置換の配列番号487のアミノ酸配列を含む。別の実施態様では、H C V Rは、それに6以下の保存的アミノ酸置換の配列番号487のアミノ酸配列を含む。別の実施態様では、H C V Rは、それに4以下の保存的アミノ酸置換の配列番号487のアミノ酸配列を含む。尚別の実施態様では、H C V Rは、それに2又は1の1つ又は複数の保存的アミノ酸置換の配列番号487のアミノ酸配列を含む。1つの実施態様では、L C V Rは、それに10以下の保存的アミノ酸置換の配列番号44のアミノ酸配列を含む。別の実施態様では、L C V Rは、それに8以下の保存的アミノ酸置換の配列番号44のアミノ酸配列を含む。別の実施態様では、L C V Rは、それに6以下の保存的アミノ酸置換の配列番号44のアミノ酸配列を含む。別の実施態様では、L C V Rは、それに4以下の保存的アミノ酸置換の配列番号44のアミノ酸配列を含む。尚別の実施態様では、H C V Rは、それに2又は1の1つ又は複数の保存的アミノ酸置換の配列番号44のアミノ酸配列を含む。

10

20

【 0 0 4 9 】

他に具体的に示されない限り、本明細書に使用される用語「抗体」は、当然のことながら、2つの免疫グロブリン重鎖及び2つの免疫グロブリン軽鎖（即ち、「完全抗体分子」）、並びにその抗原結合フラグメントを含んでなる抗体分子を包含する。本明細書に使用される用語、抗体の「抗原結合部分」、抗体の「抗原結合フラグメント」などは、複合体を形成するために抗原を特異的に結合する、いずれの自然発生、酵素的に得られる、合成、又は遺伝子工学によるポリペプチド又は糖タンパク質を含む。抗体の抗原結合フラグメントは、例えば、タンパク質分解のようないずれの好適な標準的技術、又は抗体の可変及び(選択的に)定常ドメインをコードするDNAの操作及び発現にかかわる組換え遺伝子工学技術を用いて、例えば、完全抗体分子から導かれ得る。そのようなDNAは公知であり、及び/又は例えば、商業ソース、DNAライブラリー（例えば、ファージディスプレイ抗体ライブラリーを含む）から容易に得られ、又は合成されることができる。DNAは、例えば、1つ又はそれ以上の可変及び/又は定常ドメインを好適な立体配置に配列するために、又はコドンを導入し、システイン残基を創出し、アミノ酸を修飾し、付加し又は欠失させるなどのために、化学的に及び分子生物学的技術を用いることによって配列決定されそして操作され得る。

30

【 0 0 5 0 】

抗原結合フラグメントの非限定的例は：(i) F a bフラグメント；(i i) F (a b ')₂フラグメント；(i i i) F dフラグメント；(i v) F vフラグメント；(v) 単鎖F v (s c F v)分子；(v i) d A bフラグメント；及び(v i i)抗体の超可変領域（例えば、C D R 3ペプチドのような単離された相補性決定領域(C D R)）、又は束縛F R 3 - C D R 3 - F R 4ペプチドを做するアミノ酸残基から成る最小認識単位を含む。ドメイン特異抗体、単ドメイン抗体、ドメイン欠失抗体、キメラ抗体、C D R グラフト抗体、二量体、三量体、四量体、ミニ体、ナノ体（例えば一価ナノ体、二価ナノ体など）、小分子免疫医薬(S M I P)、及びサメ可変I g N A Rドメインなどの他の改変分子もまた、本明細書に使用される表現「抗原結合フラグメント」内に包含される。

40

【 0 0 5 1 】

抗体の抗原結合フラグメントは、通常少なくとも1つの可変ドメインを含み得る。可変ドメインはいずれものサイズ又はアミノ酸組成から成り得て、そして一般的に1つ又はそれ以上のフレームワークに隣接し又はそれで構成される少なくとも1つのC D Rを含み得

50

る。V_LドメインとかかわるV_Hドメインを有する抗原結合フラグメントでは、V_H及びV_Lドメインはいずれの好適な配列においても互いに対して位置されてよい。例えば、可変領域は二量体であり得て、そしてV_H-V_H、V_H-V_L又はV_L-V_L二量体を含有する。あるいは、抗体の抗原結合フラグメントは単量体のV_H又はV_Lドメインを含有してよい。

【0052】

ある実施態様では、抗体の抗原結合フラグメントは、少なくとも1つの定常ドメインに共有結合された少なくとも1つの可変ドメインを含有してよい。限定されない、本発明の抗体の抗原結合フラグメント内に見出され得る可変及び定常ドメインの例示的立体配置は：
 (i) V_H-C_H1；(ii) V_H-C_H2；(iii) V_H-C_H3；(iv) V_H-C_H1-C_H2；(v) V_H-C_H1-C_H2-C_H3；(vi) V_H-C_H2-C_H3；(vii) V_H-C_L；(viii) V_L-C_H1；(ix) V_L-C_H2；(x) V_L-C_H3；(xi) V_L-C_H1-C_H2；(xii) V_L-C_H1-C_H2-C_H3；(xiii) V_L-C_H2-C_H3；及び(xiv) V_L-C_Lを含む。上記に掲載されたいずれもの例示的立体配置を含む、可変及び定常ドメインのいずれもの立体配置では、可変及び定常ドメインは、互いに直接結合され得るか又は完全若しくは部分ヒンジ又はリンカー領域によって結合され得る。ヒンジ領域は、単一ポリペプチド分子中で隣接した可変及び/又は定常ドメイン間のフレキシブル又はセミフレキシブル結合をもたらす、少なくとも2つ(例えば、5、10、15、20、40、60又はそれ以上)のアミノ酸から成り得る。その上、本発明の抗体の抗原結合フラグメントは、互いと及び/又は1つ又はそれ以上の単量体V_H又はV_Lドメインとの非共有結合(例えば、1つ又は複数のジスルフィド結合による)において、上記に掲載されたいずれもの可変及び定常ドメイン立体配置のホモ二量体又はヘテロ二量体(又は他の多量体)を含んでよい。

【0053】

完全抗体分子と同様に、抗原結合フラグメントは、単一特異性又は多重特異性(例えば、二重特異性)であってよい。抗体の多重特異性抗原結合フラグメントは、通常少なくとも2つの異なる可変ドメインを含み得て、ここで各可変ドメインは別の抗原又は同じ抗原の異なるエピトープに特異的に結合することができる。本明細書に開示の例示的二重特異性抗体フォーマットを含み、いずれの多重特異性抗体フォーマットも、当技術分野で得られるルーチン技術を用いて本発明の抗体の抗原結合フラグメントとの関連で使用するのに適合され得る。

【0054】

ある実施態様では、本発明の抗体又は抗体フラグメントは、細胞毒、化学療法薬、免疫抑制薬又は放射性同位体などの治療剤部分(「免疫複合体」)に結合され得る。

【0055】

用語「特異的に結合する」などは、抗体又はその抗原結合フラグメントが生理的条件下に比較的安定である抗原と複合体を形成することを意味する。特異的結合は、約 1×10^{-6} M未満(即ち、より小さいK_Dはより堅固な結合を示す)の平衡解離定数(K_D)によって特徴付けられることができる。2つの分子が特異的に結合するかを決定する方法は当技術分野で周知であり、そして例えば、平衡透析、表面プラズモン共鳴などを含む。しかしながら、hANGPTL3を特異的に結合する単離された抗体は、他の種からのANGPTL3分子、例えば、カニクイザルANGPTL3、マウスANGPTL3、ラットANGPTL3、及び/又は配列番号164のアミノ酸配列を有するhANGPTL3などの他の抗原に対して交差反応を示す。その上、hANGPTL3及び1つ又はそれ以上の異なる抗原に結合する多重特異性抗体(例えば、二重特異性抗体)は、それでも尚本明細書に使用されるhANGPTL3を「特異的に結合する」抗体と考えられる。

【0056】

用語「高親和性」抗体は、表面プラズモン共鳴、例えば、BIAcore(商標)又は溶液親和性ELISAによって測定された、約 2×10^{-9} M以下、約 1.5×10^{-9} M以下、約 1×10^{-9} M以下、約 0.5×10^{-9} M以下、約 0.25×10^{-9} M以下、約 1×10^{-10} M以下、又は約 0.5×10^{-10} M以下のK_Dで表されるhANGPTL3への結合親和性

10

20

30

40

50

を有するそれらの抗体をいう。

【0057】

本明細書に使用される用語「 K_D 」は、特定の抗体 - 抗原相互作用の平衡解離定数をいうことが目的とされる。

【0058】

用語「低速オフレート」では、「 K_{off} 」又は「 k_d 」は、表面プラズモン共鳴、例えば、BIACORE(商標)によって測定された、 $4 \times 10^{-3} s^{-1}$ 以下、 $3 \times 10^{-3} s^{-1}$ 以下、 $2 \times 10^{-3} s^{-1}$ 以下、 $1 \times 10^{-3} s^{-1}$ 以下、 $1 \times 10^{-4} s^{-1}$ 以下の速度定数でhANGPTL3から解離する抗体を意味する。

【0059】

用語「固有親和定数」又は「 k_a 」では、表面プラズモン共鳴、例えば、BIACORE(商標)によって測定された、約 $1 \times 10^{-3} M^{-1} s^{-1}$ 以上の速度定数でhANGPTL3と結合する抗体を意味する。

【0060】

本明細書に使用される「単離された抗体」は、異なる抗原特異性(例えば、hANGPTL3を特異的に結合する単離された抗体はhANGPTL3以外の抗原を特異的に結合するmAbが実質的に無い)を有する他のmAbが実質的に無い抗体をいうことが目的とされる。しかしながら、hANGPTL3を特異的に結合する単離された抗体は、カニクイザル、マウス、ラットなどの他の種からのANGPTL3分子のような他の抗原、及び/又はヒトANGPTL4のような他の関連タンパク質に対して交差反応性を有し得る。

【0061】

本明細書に使用される用語「中和」、「ブロッキング」又は「停止」抗体(又はANGPTL3活性を「中和し」、「ブロックし」又は「停止する」抗体)は、ANGPTL3へのその結合が当技術分野で公知の標準インビトロアッセイによって評価されるように、ANGPTL3の少なくとも1つの生物活性の直接阻害をもたらす、抗体をいうことが目的とされる(例えば、下記の実施例を参照されたい)。用語「中和する」、「阻害する」、「ブロックする」及び「停止する」は本明細書において同義的に使用され得る。「非ブロッキング」抗体は、ANGPTL3へのその結合が標準インビトロアッセイによって評価されるように、ANGPTL3の標的活性を直接ブロックしない抗体をいうが、しかし尚、ANGPTL3へのその結合が、例えば、循環からのANGPTL3のクリアランスを強化することにより、インビボでANGPTL3の少なくとも1つの生物活性の間接阻害、減少、減弱、又は他の干渉をもたらす「干渉」抗体であってよい。循環からのANGPTL3のクリアランスは、少なくとも2つの非ブロッキング抗体の組み合わせによって特に増強されることができる。ANGPTL3の生物活性の、中和、阻害、停止、減少、減弱又は干渉は、当技術分野で公知の1つ又はそれ以上の幾つかの標準インビトロ又はインビボアッセイにより、ANGPTL3の生物活性の1つ又はそれ以上のインジケータを測定することによって評価されることができる(例えば、下記の実施例を参照されたい)。

【0062】

本明細書に使用される用語「表面プラズモン共鳴」は、例えばBIACORE(商標)システム(Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, N.J.)を用いて、バイオセンサマトリックス内のタンパク質濃度変化の検出により、リアルタイム生物特異的相互作用の解析を可能にする光学的現象をいう。

【0063】

用語「エピトープ」は、抗体によって結合される抗原の領域である。エピトープは構造的又は機能的で定義され得る。機能的エピトープは一般的に構造的エピトープのサブセットであり、そして相互作用の親和性に直接寄与するそれらの残基を有する。エピトープは立体配座的であり、即ち非線状アミノ酸から構成される。ある実施態様では、エピトープは、アミノ酸、糖側鎖、リン酸基、又はスルホニル基などの分子の化学的活性表面グルーピングである決定基を含み得て、そしてある実施態様では、特異的三次元構造特性、及び

10

20

30

40

50

／又は特異的電荷特性を有してよい。

【 0 0 6 4 】

核酸又はそのフラグメントをいうとき、用語「実質的同一性」又は「実質的に同一の」は、別の核酸（又はその相補鎖）により適切なヌクレオチド挿入又は欠失と最適に配列されるとき、下記に検討されるようにFASTA、BLAST又はGAPなど、配列同一性のいずれの周知のアルゴリズムによって測定され、核酸塩基の少なくとも約90%、そしてより好ましくは少なくとも約95%、96%、97%、98%又は99%のヌクレオチド配列同一性があることを示す。

【 0 0 6 5 】

ポリペプチドに適用されるように、用語「実質的類似性」又は「実質的に類似の」は、デフォルトギャップウェイトを用いてプログラムGAP又はBESTFITによるように最適に配列されるとき、2つのペプチド配列が少なくとも90%配列同一性、尚更に好ましくは少なくとも95%、98%又は99%配列同一性を共有することを意味する。好ましくは、同一でない残基位置は、保存的アミノ酸置換だけ異なる。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が、類似の化学的性質（例えば、電荷又は疎水性）の側鎖（R基）を有する別のアミノ酸残基によって置換されるものである。一般に、保存的アミノ酸置換は、タンパク質の機能的性質を実質的に変化し得ない。2つ又はそれ以上のアミノ酸配列が保存的置換によって互いに異なるという場合には、類似性の百分率又は程度は置換の保存的性質を是正するように上方に調整され得る。この調整をする手段は当業者に周知されている。例えば、Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331を参照されたい。類似の化学的性質の側鎖を有するアミノ酸グループの例は、1) 脂肪族側鎖：グリシン、アラニン、バリン、ロイシン及びイソロイシン；2) 脂肪族ヒドロキシル側鎖：セリン及びトレオニン；3) アミド含有側鎖：アスパラギン及びグルタミン；4) 芳香族側鎖：フェニルアラニン、チロシン、及びトリプトファン；5) 塩基性側鎖：リジン、アルギニン、及びヒスチジン；6) 酸性側鎖：アスパラギン酸及びグルタミン酸；及び7) 含硫側鎖：システイン及びメチオニンを含む。好ましい保存的アミノ酸置換基は：バリン - ロイシン - イソロイソ、フェニルアラニン - チロシン、リジン - アルギニン、アラニン - バリン、及びグルタミン酸 - アスパラギン酸、及びアスパラギン - グルタミンである。あるいは、保存的置換は、Gonnet et al. (1992) *Science* 256: 1443-45に開示のPAM250対数尤度マトリックスにおいて正值を有するいずれもの変化である。「中程度に保存的」置換はPAM250対数尤度マトリックスにおいて非負値を有するいずれもの変化である。

【 0 0 6 6 】

ポリペプチドの配列類似性は通常配列解析ソフトウェアを用いて測定される。タンパク質解析ソフトウェアは、保存的アミノ酸置換を含む種々の置換、欠失及び他の修飾に帰属される類似性の尺度を用いて類似の配列をマッチさせる。例えば、GCGソフトウェアは、種々の生物種からの相同ポリペプチドのような密接に関連したポリペプチド間、又は野生型タンパク質とその突然変異タンパク質間の配列相同性又は配列同一性を決定するのに、デフォルトパラメータによって使用されることができGAP及びBESTFITのようなプログラムを含有する。例えば、GCGバージョン6.1を参照されたい。ポリペプチド配列はまた、デフォルト又は推奨パラメータによってFASTA；GCGバージョン6.1中のプログラムを使用して比較されることができ。FASTA（例えば、FASTA2及びFASTA3）は、質問及び検索配列間の最高重複の領域のアラインメント及び百分率配列同一性を提供する（Pearson (2000) *supra*）。本発明の配列を異なる生物からの多数の配列を含有するデータベースと比較するとき、別の好ましいアルゴリズムは、デフォルトパラメータを使用した計算機プログラムのBLAST、特にBLASTP又はTBLASTNである。例えば、Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 and (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402を参照されたい。

【 0 0 6 7 】

語句「治療的有效量」では、それが投与されて望ましい効果をもたらす量を意味する。その正確な量は、処置の目的、処置される対象の年齢及びサイズ、投与経路などによって

10

20

30

40

50

決まり得て、そして公知の技術を用いて当業者によって確かめられ得るものである（例えば、Lloyd (1999) 医薬品配合の技法、科学及び技術を参照されたい）。

【0068】

ヒト抗体の調製

トランスジェニックマウスにおいてヒト抗体を生成する方法は当技術分野で公知である。いずれのそのような公知方法は、ANGPTL3に特異的に結合するヒト抗体を作るために本発明の関連で使用されることができる。

【0069】

モノクローナル抗体を生成するVELOCIMMUNE(商標)技術又はその他の公知の方法を用いて、ヒト可変領域及びマウス定常領域を有するANGPTL3に対する高親和性キメラ抗体が最初に分離される。下記の実験の項におけるように、抗体は特徴付けられ、そして親和性、選択性、エピトープなどを含む望ましい特性で選択される。

【0070】

一般に、本発明の抗体は、固相に固定化されるか又は液相で抗原に結合することにより測定されるとき、通常約 $10^{-12}M$ ～約 $10^{-9}M$ の K_D を持つ高親和性を有する。マウス定常領域は、本発明の完全ヒト抗体を生成するために、望ましいヒト定常領域、例えば、野生型IgG1若しくはIgG4、又は修飾IgG1若しくはIgG4と置換される。選択された定常領域が特殊用途に従って変わり得る一方で、抗体の高親和性抗原結合及び標的の特異性特性は可変領域に存在する。

【0071】

エピトープマッピング及び関連技術

特定のエピトープに結合する抗体をスクリーニングするために、Antibodies, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY)に記載のように、ルーチン交差ブロッキングアッセイは行われることができる。他の方法は、アラニン走査突然変異体、ペプチドプロット (Reineke (2004) Methods Mol Biol 248:443-63)、又はペプチド切断解析を含む。加えて、抗原のエピトープ切除、エピトープ抽出及び化学修飾などの方法が用いられ得る (Tomer (2000) Protein Science 9: 487-496)。

【0072】

用語「エピトープ」はB及び/又はT細胞が応答する抗原上の部位をいう。B細胞エピトープは、タンパク質の三次折り畳みによって並べられる隣接アミノ酸又は非隣接アミノ酸の両方から形成されることができる。隣接アミノ酸から形成されるエピトープは通常変性溶媒に露出時に保持され、一方で三次折り畳みによって形成されるエピトープは通常変性溶媒による処理時に失われる。エピトープは通常、特有の空間立体配座において少なくとも3、及びより通常は、少なくとも5又は8-10アミノ酸を含む。

【0073】

抗原構造ベース抗体プロファイリング (ASAP) とも知られている、修飾支援プロファイリング (MAP) は、各抗体の化学的又は酵素的修飾抗原表面との結合プロファイルの類似性に従った、同じ抗原に対する多数のモノクローナル抗体 (mAb) を分類する方法である (US2004/0101920)。各カテゴリーは、別のカテゴリーによって表されるエピトープと明瞭に区別されるか又は部分的に重複する特有のエピトープを反映し得る。この技術は、特徴付けが遺伝的に異なるmAbに集中されることができるように、遺伝的に同一のmAbの迅速なフィルタリングを可能にする。ハイブリドーマスクリーニングに適用されるとき、MAPは望ましい特性を有するmAbを産生する希少ハイブリドーマクロンの同定を容易にし得る。MAPは、本発明の抗ANGPTL3抗体mAbを、異なるエピトープを結合するmAbの群に選別するのに使用し得る。

【0074】

ANGPTL3はアミノ末端コイルドコイルドメイン及びカルボキシル末端フィブリノーゲン様ドメイン (FD) を含有し、そしてANGPTL3タンパク質は分子間ジスルフィド結合の不存在下にオリゴマーを形成する (Ge et al., 2005, J Lipid Res 46:1484-1490)。N末端コイルドコイルドメインはLPL活性の阻害に重要なことが報告されている (

10

20

30

40

50

Ono et al., 2003, J Biol Chem 278:41804-41809)。このように、ある実施態様では、抗 h A N G P T L 3 抗体又は抗体の抗原結合フラグメントは、h A N G P T L 3 (配列番号 1 6 1) の N 末端コイルドコイルドメイン(残基 1 7 ~ 2 0 9) 内でエピトープを結合し、そして h A N G P T L 3 の少なくとも 1 つの活性を中和する(例えば、L P L 活性の阻害)。別の実施態様では、抗 h A N G P T L 3 抗体又はその抗原結合フラグメントは、h A N G P T L 3 の N 末端コイルドコイルドメイン内でエピトープを結合し、そして h A N G P T L 3 の少なくとも 1 つの活性を中和し、但し、抗体又はそのフラグメントは配列番号 1 7 0 の A N G P T L 3 ペプチドに結合しない。1 つの実施態様では、抗体又はそのフラグメントは、h A N G P T L 3 (配列番号 1 6 1) の残基 1 7 ~ 2 0 0、1 7 ~ 1 0 0、1 7 ~ 7 0、1 7 ~ 6 5、1 7 ~ 6 0、1 7 ~ 5 7、1 7 ~ 5 5、1 7 ~ 5 0、1 7 ~ 4 5、1 7 ~ 4 0、又は 1 7 ~ 3 5 内でエピトープに結合し、但し、選択的にその抗体又はそのフラグメントは配列番号 1 7 0 の A N G P T L 3 ペプチドに結合しない。別の実施態様では、抗体又はそのフラグメントは、h A N G P T L 3 (配列番号 1 6 1) の残基 4 0 ~ 2 0 0、4 0 ~ 1 0 0、4 0 ~ 7 0、5 0 ~ 2 0 0、5 0 ~ 1 0 0、5 0 ~ 7 0、5 8 ~ 2 0 0、5 8 ~ 1 0 0、5 8 ~ 7 0、5 8 ~ 6 8、又は 6 1 ~ 6 6 (「ヘパリン結合モチーフ」として公知) 内でエピトープを特異的に結合し、但し、選択的に抗体又はそのフラグメントは配列番号 1 7 0 の A N G P T L 3 ペプチドに結合しない。幾つかの実施態様では、抗体又は抗体フラグメントは、h A N G P T L 3 の N 末端コイルドコイルドメイン内で列挙エピトープ又は残基の 1 つより多くを含み得るエピトープを結合し、但し、選択的に抗体又はそのフラグメントは配列番号 1 7 0 の A N G P T L 3 ペプチドに結合しない。

10

20

【 0 0 7 5 】

他の実施態様では、h A N G P T L 3 抗体及びそのフラグメントは、h A N G P T L 3 の 1 つ又はそれ以上のフラグメント、例えば、h A N G P T L 3 (配列番号 1 6 1) の少なくとも 5 残基、少なくとも 7 残基、少なくとも 1 0 残基、少なくとも 2 0 残基、少なくとも 3 0 残基、少なくとも 5 0 残基、少なくとも 7 0 残基、少なくとも 1 0 0 残基、少なくとも 1 5 0 残基、又は少なくとも 2 0 0 残基のフラグメントを結合し、但し、選択的に抗体又はそのフラグメントは配列番号 1 7 0 の A N G P T L 3 ペプチドに結合しない。

【 0 0 7 6 】

本発明は、本明細書に記載のいずれかの特異的例示的抗体と同じエピトープに結合する h A N G P T L 3 抗体を含む、同様に、本発明はまた、本明細書に記載のいずれかの特異的例示的抗体と h A N G P T L 3 又は h A N G P T L 3 フラグメントへの結合を競合する抗 h A N G P T L 3 抗体を含む。

30

【 0 0 7 7 】

抗体が当技術分野において公知のルーチン方法を用いることによって参照抗 h A N G P T L 3 抗体と同じエピトープに結合するか、又はそれとの結合を競合するかは、容易に決定することができる。例えば、試験抗体が本発明の参照抗 h A N G P T L 3 抗体と同じエピトープに結合に結合するかを決定するために、参照抗体は、飽和条件下に h A N G P T L 3 タンパク質又はペプチドに結合することが可能にされる。次に、h A N G P T L 3 分子への試験抗体の結合能力が評価される。試験抗体が参照抗 h A N G P T L 3 抗体との飽和結合後に h A N G P T L 3 に結合することができる場合、試験抗体は参照抗 h A N G P T L 3 抗体と異なるエピトープに結合すると結論されることができる。他方で、試験抗体が参照抗 h A N G P T L 3 抗体との飽和結合後に h A N G P T L 3 分子に結合することができない場合、そのとき試験抗体は、本発明の参照抗 h A N G P T L 3 抗体によって結合されるエピトープと同じエピトープに結合し得る。

40

【 0 0 7 8 】

抗体が参照抗 h A N G P T L 3 抗体との結合を競合するかを決定するために、上記結合方法は 2 つの配向で行われる：第 1 の配向では、参照抗体は飽和条件下に h A N G P T L 3 分子に結合することが可能にされ、続いて h A N G P T L 3 分子への試験抗体の結合の評価がなされる。第 2 の配向では、試験抗体は飽和条件下に h A N G P T L 3 分子に結合することが可能にされ、続いて A N G P T L 3 分子への参照抗体の結合の評価がなされる

50

。両方の配向において、第1の(飽和)抗体だけがANGPTL3分子へ結合することができる場合、そのとき試験抗体及び参照抗体はhANGPTL3への結合を競合すると結論される。当業者には当然のことながら、参照抗体との結合を競合する抗体は、参照抗体と同一のエピトープに必ずしも結合し得るとは限らず、重複又は隣接エピトープを結合することにより参照抗体の結合を立体的にブロックし得る。

【0079】

2つの抗体は、各々が抗原への他の結合を競合的に阻害(ブロック)する場合、同じ又は重複するエピトープに結合する。即ち、1、5、10、20、又は100倍過剰の1つの抗体は、競合結合アッセイで測定して少なくとも50%しかし好ましくは75%、90%又は更に尚99%だけ他の結合を阻害する(例えば、Junghans et al., Cancer Res, 1990:50:1495-1502を参照されたい)。

10

【0080】

次いで、更なるルーチン実験(例えば、ペプチドの突然変異及び結合解析)は、試験抗体の結合の実測欠如が実際に参照抗体と同じエピトープへの結合に因るのか、又は立体ブロッキング(又は他の現象)が実測結合の欠如に關与するかを確認するために行われることができる。この種の実験は、ELISA、RIA、表面プラズモン共鳴、フローサイトメトリー又は当技術分野で利用可能な他の定量的若しくは定性的抗体結合アッセイを用いて行われることができる。

【0081】

免疫複合体

20

本発明は、細胞毒、化学療法薬、免疫抑制薬又は放射性同位体など、治療部分(「免疫複合体」)に結合されるヒト抗hANGPTL3モノクローナル抗体を包含する。細胞毒剤は細胞に有害ないずれの薬剤をも含む。免疫複合体を形成するための好適な細胞毒剤及び化学療法薬の例は当技術分野で公知であり、例えばWO05/103081を参照されたい。

【0082】

二重特異性抗体

本発明の抗体は、単一特異性、二重特異性、又は多重特異性であってよい。多重特異性mAbは1つの標的ポリペプチドの異なるエピトープに特異的であり得て、又は1つの標的ポリペプチドより多くに対して特異的な抗原結合ドメインを含有し得る。例えば、Tutt et al. (1991) J. Immunol. 147:60-69を参照されたい。ヒト抗hANGPTL3mAbは別の機能性分子、例えば、別のペプチド又はタンパク質に結合され又はそれと共発現されることができる。例えば、抗体又はそのフラグメントは、第2の結合特異性をもつ二重特異性又は多重特異性抗体を生産するために、別の抗体又は抗体フラグメントのような1つ又はそれ以上の他の分子実体に、機能的に結合されることができる(例えば、化学的カップリング、遺伝的融合、非共有結合などにより)。

30

【0083】

本発明の関連で使用されることができる例示的二重特異性抗体フォーマットは、第1の免疫グロブリン(Ig)C_H3ドメイン及び第2のIgC_H3ドメインの使用を含み、ここで第1及び第2のIgC_H3ドメインは少なくとも1つのアミノ酸だけ互いに異なり、そして少なくとも1つのアミノ酸差は、アミノ酸差を欠いている二重特異性抗体と比べてプロテインAへの二重特異性抗体の結合を減少させる。1つの実施態様では、第1のIgC_H3ドメインはプロテインAを結合し、そして第2のIgC_H3ドメインはH95R修飾(IMGTエキソン付番による; EU付番によるH435R)のようなプロテインA結合を減少させ又は停止する突然変異を含有する。第2のC_H3は更に、Y96F修飾(IMGTによる; EUによるY436F)を含んでよい。第2のC_H3内に見出され得る更なる修飾は: IgG1抗体の場合にD16E、L18M、N44S、K52N、V57M、及びV82I(IMGTによる; EUによるD356E、L358M、N384S、K392N、V397M、及びV422I); IgG2抗体の場合にN44S、K52N、及びV82I(IMGT; EUによるN384S、K392N、及びV422I); 及びIg

40

50

G 4 抗体の場合に Q 1 5 R、N 4 4 S、K 5 2 N、V 5 7 M、R 6 9 K、E 7 9 Q、及び V 8 2 I (I M G T による ; E U による Q 3 5 5 R、N 3 8 4 S、K 3 9 2 N、V 3 9 7 M、R 4 0 9 K、E 4 1 9 Q、及び V 4 2 2 I) を含む。上記の二重特異性抗体フォーマットでの変動は本発明の範囲内とみなされる。

【 0 0 8 4 】

生物学的同等物

本発明の抗 h A N G P T L 3 抗体及び抗体フラグメントは、記載の m A b のものと異なり、しかしヒト A N G P T L 3 を結合する能力を保持するアミノ酸配列を有するタンパク質を包含する。そのような変異 m A b 及び抗体フラグメントは、元の配列と比べると、1 つ又はそれ以上のアミノ酸の付加、欠失、又は置換を含み、しかし本質的に記載 m A b と同等の生物活性を示す。同様に、本発明の抗 h A N G P T L 3 抗体コード化 D N A 配列は、開示配列と比べると 1 つ又はそれ以上のヌクレオチドの付加、欠失、又は置換を含み、しかし本発明の抗 h A N G P T L 3 抗体又は抗体フラグメントに本質的に生物学的に同等である抗 h A N G P T L 3 抗体又は抗体フラグメントをコードする、配列を包含する。そのような変異アミノ酸及び D N A 配列が上記で検討される。

10

【 0 0 8 5 】

2 つの抗原結合タンパク質、又は抗体は、例えば、類似の実験条件下に同じモル用量で、単回用量か又は複数回用量投与されるとき、それらは、吸収速度及び程度が顕著な差を示さない薬学的同等物又は薬学的代替物である。幾つかの抗体は、それらが、それらの吸収程度は同等であるが、それらの吸収速度はそうではない場合、同等物又は薬学的代替物であると考えられ得て、そして尚吸収速度のそのような差は意図的でそしてラベリングに反映され、例えば、長期使用時に有効な体内薬物濃度の達成に必須ではなく、そして特定の試験医薬品にとって医学的に重要ではないことから、生物学的同等性であると考えられ得る。1 つの実施態様では、2 つの抗原結合タンパク質は、それらの安全性、純度、及び有効性において臨床的に有意な差がない場合、生物学的同等性である。

20

【 0 0 8 6 】

1 つの実施態様では、患者がそのような入れ替えのない継続治療と比べて、免疫原性の臨床的に有意な変化、又は有効性低下を含む副作用のリスクの期待された増加なしに、参照製品と生物学的製剤間で 1 回又はそれ以上の回数入れ替えられることができる場合、2 つの抗原結合タンパク質は生物学的に同等性である。

30

【 0 0 8 7 】

1 つの実施態様では、2 つの抗原結合タンパク質は、それらがいずれも、そのような機構が公知の程度に、病態に対して共通機構若しくは作用機構又は使用条件によって作用する場合、生物学的に同等性である。

【 0 0 8 8 】

生物学的同等性はインビトロ及びインビボの方法で実証され得る。生物学的同等性手段は、例えば、(a) 抗体又はその代謝物の濃度が血液、血漿、血清、又は他の体液中で時間の関数として測定される、ヒト又は他の哺乳動物でのインビボテスト ; (b) ヒトインビボバイオアベイラビリティデータと相関されそして合理的に予測されるインビトロテスト ; (c) 抗体の適切な急性薬理効果 (又はその標的) が時間の関数として測定される、ヒト又は他の哺乳動物でのインビボテスト ; 及び (d) 抗体の安全性、有効性、又はバイオアベイラビリティ若しくは生物学的同等性を確立する十分管理された臨床試験を含む。

40

【 0 0 8 9 】

本発明の抗 h A N G P T L 3 抗体の生物学的同等性バリエーションは、例えば、生物活性に不要な、残基又は配列又は欠失末端若しくは内部残基又は配列の種々の置換を行うことにより、構成され得る。例えば、生物活性に必須ではないシステイン残基は、再生時に不要な又は誤った分子内ジスルフィド架橋の形成を防止するために、他のアミノ酸を欠失し置換されることができる。

【 0 0 9 0 】

治療的投与及び製剤

50

本発明は、本発明の抗 h A N G P T L 3 抗体又はその抗原結合フラグメントを含んでなる治療的組成物、及びそれを用いる治療的方法を提供する。本発明に基づく治療的組成物の投与は、移動、送達、耐容性の改善などをもたらすために、製剤へ組み込まれる好適な担体、賦形剤、及び他の薬剤と併せて投与され得る。多数の適切な製剤は、すべての薬学化学者に公知の処方集に見出されることができる：Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA。これらの製剤は、例えば、散剤、ペースト剤、軟膏剤、ジェリー剤、ワックス、オイル、脂質類、ベシクル(LIPOFECTIN(商標)など)を含有する脂質(陽イオン性又は陰イオン性)、DNA複合体、無水吸収ペースト剤、水中油及び油中水乳剤、乳剤カルボワックス(種々の分子量のポリエチレングリコール)、半固形ゲル、及びカルボワックスを含有する半固形混合物を含む。また Powell et al. 「非経口製剤用の賦形剤の概論」 PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311を参照されたい。

10

【0091】

用量は、投与される予定の対象の年齢及びサイズ、標的疾患、処置の目的、病態、投与経路などによって変動し得る。本発明の抗体が、成人患者において、高コレステロール血症を含む B A N G P T L 3 に直接又は間接に関連する種々の病態及び疾患、LDL及びアポタンパク質Bに関連する障害、及び脂質代謝障害などを処置するのに使用されるとき、本発明の抗体を約0.01~約20mg/kg体重、より好ましくは約0.02~約7、約0.03~約5、又は約0.05~約3mg/kg体重の単回用量で静脈内又は皮下投与することは有利である。病態の重度に依存して、処置の頻度及び期間は調整されることができる。ある実施態様では、本発明の抗体又はその抗原結合フラグメントは、少なくとも約0.1mg~約800mg、約1~約500mg、約5~約300mg、又は約10~約200mg、約100mg、又は50mgまでの初回用量として投与されることができる。ある実施態様では、初回用量は、初回用量とほぼ同じか又はそれより少なくてもよい量で、抗体又はその抗原結合フラグメントの第2の又は複数の以後の用量投与が続けられ得て、ここでその後の用量は、少なくとも1日~3日；少なくとも1週、少なくとも2週；少なくとも3週；少なくとも4週；少なくとも5週；少なくとも6週；少なくとも7週；少なくとも8週；少なくとも9週；少なくとも10週；少なくとも12週；又は少なくとも14週で分けられる。

20

【0092】

種々の送達システムは公知であり、そして本発明の医薬品組成物、例えば、リポソーム、微粒子、マイクロカプセル、変異ウイルス、受容体介在エンドサイトーシスを発現することができる組換え細胞でのカプセル化を投与するのに使用されることができる(例えば、Wu et al. (1987) J. Biol. Chem. 262:4429-4432参照)。導入方法は、限定されるものではないが、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻腔内、硬膜外、及び経口経路を含む。組成物はいずれかの従来の経路により、例えば、点滴及びボラス注射により、上皮又は粘膜皮膚ライニング(例えば、口腔粘膜、直腸及び腸粘膜など)を介した吸収により投与され得て、そして他の生理活性物質と併せて投与され得る。投与は全身的又は局所的であり得る。

30

【0093】

医薬組成物はまた、ベシクル、特にリポソームで送達されることができる(Langer (1990) Science 249:1527-1533; Treat et al. (1989) 感染性疾患及び癌の治療におけるリポソーム, Lopez Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365; Lopez-Berestein, ibid., pp. 317-327参照; generally ibid.参照)。

40

【0094】

ある状況では、医薬組成物は制御放出システムで送達されることができる。1つの実施態様では、ポンプが使用され得る(Langer, supra; Sefton (1987) CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201参照)。別の実施態様では、高分子材料が使用されることができる；制御放出の医学応用, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974) 参照。尚別の実施態様では、制御放出システムは組成物の標的の近傍に入れられることが

50

でき、その結果全身用量のわずかだけを必要とする(例えば、Goodson, 制御放出の医学用途, supra, vol. 2, pp. 115-138, 1984を参照されたい)。

【0095】

注射製剤は、静脈内、皮下、皮内及び筋肉内注射、点滴などのための剤形を含んでよい。これらの注射剤は公に知られた方法によって調製され得る。例えば、注射剤は、例えば、上記の抗体又はその塩を通常注射剤に使用される水性媒体又は油性媒体に溶解、懸濁又は乳化することによって調製され得る。注射用水性媒体としては、例えば、生理食塩水、グルコースを含有する等張液、及びアルコール(例えば、エタノール)、多価アルコール(例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール)、非イオン界面活性剤[例えば、ポリソルベート80、HCO-50(硬化ヒマシ油のポリオキシエチレン(50mol)付加物)]などのような適切な可溶化剤と組み合わせて使用され得る他の補助剤などがある。油性媒体としては、例えば、安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどのような可溶化剤と組み合わせて使用され得るゴマ油、ダイズ油などが用いられる。このように調製された注射剤は好ましくは適切なアンプルに充填される。本発明の医薬組成物は、標準針及びシリンジで皮下又は静脈内に送達されることができ、加えて、皮下送達に関しては、ペン送達デバイスは本発明の医薬組成物を送達するのに容易に用途を有する。そのようなペン送達デバイスは再使用可能又は使い捨てであり得る。再使用可能ペン送達デバイスは一般に、医薬組成物を含有する交換可能カートリッジを利用する。一度カートリッジ内のすべての医薬組成物が投与されそしてカートリッジが空になると、空のカートリッジは容易に廃棄されることができ、そして医薬組成物を含有する新しいカートリッジと交換される。ペン送達デバイスはこのように再使用されることができ、使い捨てペン送達デバイスでは、交換可能カートリッジはない。むしろ、使い捨てペン送達デバイスはデバイス内のリザーバ中に保存された医薬組成物をプレフィルドされるようになる。一度リザーバで医薬組成物が空の状態になると、デバイス全体は廃棄される。

【0096】

多数の再使用可能及び自己注射器送達デバイスは、本発明の医薬組成物の皮下送達に適用を有する。例として、勿論限定されるものではないが、AUTOPEN(商標)(Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK)、DISETRONIC(商標)ペン(Disetronic Medical Systems, Burghdorf, Switzerland)、HUMALOG MIX 75/25(商標)ペン、HUMALOG(商標)ペン、HUMALIN 70/30(商標)ペン(Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN)、NOVOPEN(商標)I, II及びIII(Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark)、NOVOPEN JUNIOR(商標)(Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark)、BD(商標)ペン(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)、OPTIPEN(商標)、OPTIPEN PRO(商標)、OPTIPEN STARLET(商標)、及びOPTICLIK(商標)(sanofi-aventis, Frankfurt, Germany)を含む。本発明の医薬組成物の皮下送達に適用を有する使い捨てペン送達デバイス例は、勿論限定されるものではないが、SOLOSTAR(商標)ペン(sanofi-aventis)、FLEXPEN(商標)(Novo Nordisk)、及びKWIKPEN(商標)(Eli Lilly)を含む。

【0097】

有利なこととして、上記に記載の経口又は非経口使用のための医薬組成物は、有効成分の用量を適合させるのに適している単位用量での剤形に調製される。単位用量でのそのような剤形は、例えば、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤(アンプル)、坐剤などを含む。前記の含有抗体の量は一般に、単位用量での剤形当たり約0.1~約800mg;特に注射剤の形態では、前記の抗体は、他の剤形に対して約1~約500mgで、約5~300mgで、約8~200mg、そして10~約100mgで含有される。

【0098】

併用療法

本発明は更に、本発明のhANGPTL3抗体又はそのフラグメントを1つ又はそれ以上の更なる治療剤と組み合わせて投与することにより、hANGPTL3と直接又は間接に関連する疾患又は障害を処置する治療方法を提供する。更なる治療剤は、セリバスタチン、アトルバスタチン、シンバスタチン、ピタバスタチン、ロスバスタチン、フルバスタチン、ロバスタチン、プラバスタチンなどのHMG-CoAレダクターゼ阻害剤;ナイア

シン;フェノフィブラート、ベザフィブラート、シプロフィブラート、クロフィブラート、ゲムフィプロジルなどの種々のフィブラート系薬; LXR転写因子アクチベータなどを含み、1つ又はそれ以上の本発明の抗体又はそのフラグメントと有利に組み合わせられる1つ又はそれ以上のいずれの活性物質であってよい。更に、本発明のhANGPTL3抗体又はそのフラグメントは、他のhANGPTL3阻害剤と、並びに脂質代謝、特にコレステロール及び/又はトリグリセリドホメオスタシスに関与する、ANGPTL4、ANGPTL5、ANGPTL6及びプロタンパク質コンベルターゼスブチリシン/ケキシントタイプ9(PCSK9)などの、他の分子の阻害剤と同時投与されることが出来る。これらの分子の阻害剤は、これらの分子に特異的に結合しそしてそれらの活性をブロックする小分子及び抗体を含む(例えば、U.S. 2010/0166768A1に開示の抗PCSK9抗体を参照されたい)。

10

【0099】

更に、更なる治療剤は、化学療法薬、抗血管新生薬、増殖阻害剤、細胞毒性薬、アポトーシス薬などの1つ又はそれ以上の抗癌剤、及び癌又は他の増殖性疾患又は障害を処置するのに当技術分野で周知の他の薬剤であってよい。抗癌剤の例は、限定されるものではないが、ドセタキセル、パクリタキセルなどのような抗有糸分裂剤; シスプラチン、カルボプラチン、イプロプラチン、オキサリプラチンなどのような白金系化学療法化合物; 又は5-フルオロウラシル、カペシタピン、イリノテカン、ロイコポリン、ゲムシタピンなどの他の従来の細胞毒性剤、及び抗VEGF抗体、例えば、ベバシズマブ(AVASTIN(登録商標), Genentech)のような血管内皮細胞増殖因子(VEGF)アンタゴニスト及びVEGFの受容体ベースブロッカー、例えば、US特許7,070,959に記載の「VEGFトラップ」、U.S.特許出願公開2008/0181899に記載の抗D114抗体のようなデルタ様リガンド4(D114)アンタゴニスト、及びD114の細胞外ドメイン、例えば、U.S.特許出願公開2008/0107648に記載のD114-Fcを含有する融合タンパク質を含む抗血管新生剤; ソラフェニブ(NEXAVAR(登録商標)by Bayer Pharmaceuticals Corp.)、スニチニブ(SUTENT(登録商標) by Pfizer)、パゾパニブ(VOTRIENT(商標) by GlaxoSmithKline)、トセラニブ(PALLADIA(商標) by Pfizer)、バンデタニブ(ZACTIMA(商標)by AstraZeneca)、セジラニブ(RECENTIN(登録商標)by AstraZeneca)、レゴラフェニブ(BAY 73-4506 by Bayer)、アキシチニブ(AG013736 by Pfizer)、レスタウルチニブ(CEP-701 by Cephalon)、エルロチニブ(TARCEVA(登録商標)by Genentech)、ゲフィチニブ(IRESSA(商標) by AstraZeneca)、BIBW 2992 (TOVOK(商標) by Boehringer Ingelheim)、ラパチニブ(TYKERB(登録商標)by GlaxoSmithKline)、ネラチニブ (HKI-272 by Wyeth/Pfizer)などを含む受容体チロシンキナーゼ及び/又は血管新生阻害剤、及び薬学的に許容される塩、酸又は上記のいずれかの誘導体を含む。加えて、鎮痛薬、Cox-2阻害剤のような非ステロイド性炎症薬(NSAIDs)を含む炎症薬などの他の治療剤は、基礎となる癌/腫瘍に伴う症状を軽減し及び/又は減少させるために、本発明のhANGPTL3抗体又はそのフラグメントを同時投与され得る。

20

30

【0100】

本発明のhANGPTL3抗体又はそのフラグメント及び更なる1つ又は複数の治療剤は、併せて又は別々に同時投与されることが出来る。別々の投与製剤が使用される場合、本発明の抗体又はそのフラグメント及び更なる薬剤は、同時に、又はずらした時間に別々に、即ち、逐次的に適切な順序で投与されることが出来る。

40

【0101】

抗体の診断的使用

本発明の抗ANGPTL3抗体はまた、サンプル中のANGPTL3を、例えば、診断目的のために検出及び/又は測定するのに使用されることが出来る。例えば、抗ANGPTL3Ab又はそのフラグメントは、異常発現(例えば、過剰発現、発現不足、発現欠如など)によって特徴付けられる病態及び疾患を診断するのに使用されることが出来る。ANGPTL3の例示的診断的アッセイは、例えば、本発明の抗ANGPTL3Abと患者から得られるサンプルを接触させることを含んでよく、ここで抗ANGPTL3抗体は、

50

検出可能な標識又はレポーター分子で標識され、又は患者サンプル由来のANGPTL3タンパク質を選択的に捕捉しそして分離するのに使用される。あるいは、非標識抗ANGPTL3Abは、それ自体検出可能に標識される二次抗体と組み合わせて診断用途に使用されることができる。検出可能な標識又はレポーター分子は、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{31}I 又は ^{125}I などの放射性同位体；フルオレセインイソチオシアナート、又はローダミンなどの蛍光又は化学発光部分；又はアルカリ性ホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、又はルシフェラーゼなどの酵素であってよい。サンプル中のANGPTL3を検出又は測定するのに使用されることができるアッセイは、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、蛍光細胞分析分離(FACS)などを含む。

10

【実施例】

【0102】

下記の実施例は、本発明の方法及び組成物の作り方及び使用の仕方の完全な開示及び説明を当業者に提供するために提案され、そして発明者らがそれらの発明と見なすものの範囲を限定することを目的とするものではない。使用された数値について正確さを確保するための努力はなされているが、幾つかの実験誤差及び偏差は考慮されるべきである。他に明示されない限り、分子量は平均分子量であり、温度はセ氏度であり、そして圧力は大気圧又はその付近である。

【0103】

〔実施例1〕ヒトANGPTL3に対するヒト抗体の生成

20

VELOCIMMUNE(商標)マウスをヒトANGPTL3で免疫感作し、そして抗体免疫反応をこれらのマウスから得られた血清を用いて抗原特異的イムノアッセイによってモニターした。B細胞を発現する抗hANGPTL3は、抗hANGPTL3抗体タイターを上昇させたことが示される免疫されたマウスの脾臓から回収し、そしてハイブリドーマを形成するためにマウスミエローマ細胞と融合した。ハイブリドーマをスクリーニングし、そして下記のアッセイを用いてhANGPTL3特異的抗体を発現する細胞株を同定するために選択した。アッセイは、キメラ抗hANGPTL3抗体、例えば、H1M896Nを産生する幾つかの細胞株を同定した。

【0104】

ヒトANGPTL3特異的抗体はまた、U.S. 2007/0280945A1に記載の、ミエローマ細胞へ融合のない抗原免疫感作B細胞から直接分離した。重鎖及び軽鎖可変領域をクローン化し、H4H1248P、H4H1250P、H4H1263S、H4H1268S、H4H1276S、H4H1279P、H4H1282P、H4H1292P、H4H1295P及びH4H1296Pで表されたIgG4タイプの完全ヒト抗ANGPTL3抗体を生成させた。安定な組換え抗体発現性CHO細胞株を樹立した。

30

【0105】

〔実施例2〕可変遺伝子利用解析

産性抗体の構造を解析するために、抗体可変領域をコードする核酸をクローン化しそして配列決定した。抗体の核酸配列及び予測アミノ酸配列から、遺伝子利用法を、各重鎖可変領域(HCVR)及び軽鎖可変領域(LCVR)で同定した。表1は、本発明に基づいた選択抗体での利用法を示す。

40

【0106】

【表 1】

表 1

抗体	HCVR			LCVR	
	V _H	D _H	J _H	V _K	J _K
H4H1248P	3-30	1-26	6	1-12	3
H4H1250P	3-30	1-7	6	1-5	1
H4H1263S	3-30	3-10	6	1-12	3
H4H1268S	6-1	6-6	4	1-5	1
H4H1276S	3-43	3-3	3	1-5	2
H4H1279P	3-11	1-1	4	1-39	4
H4H1282P	1-18	3-10	4	1-9	4
H4H1292P	3-11	1-1	4	1-39	4
H4H1295P	1-18	6-25	4	2-30	2
H4H1296P	3-11	1-1	4	1-39	4
H1M896N	3-23	3-10	4	1-5	1

10

20

【 0 1 0 7 】

表 2 は、選択抗 h A N G P T L 3 抗体及び対応する抗体識別子の重鎖及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列ペアを示す。N、P 及び S の記号表示は同一の C D R 配列の、しかし C D R 配列から外れる領域において（即ち、フレームワーク領域において）配列変異の重鎖及び軽鎖を有する抗体をいう。それ故、特定の抗体の N、P 及び S バリエーションは、それらの重鎖及び軽鎖可変領域内に同一の C D R 配列を有し、しかしフレームワーク領域内に修飾を含有する。

【 0 1 0 8 】

【表 2】

30

表 2

名称	HCVR/LCVR SEQ ID NOs	名称	HCVR/LCVR SEQ ID NOs
H4H1248P	2/10	H4H1279P	82/90
H4H1250P	18/26	H4H1282P	98/106
H4H1263S	34/42	H4H1292P	114/122
H4H1268S	50/58	H4H1295P	130/138
H4H1276S	66/74	H4H1296P	146/154
H1M896N	180/188	-	-

40

【 0 1 0 9 】

【実施例 3】 A N G P T L 3 への抗 h A N G P T L 3 抗体結合の速度論的パラメータ

すべての速度論的結合実験は、BIAcore(商標)T200ラベルフリー分子相互作用機器(GE Healthcare)にCM5 センサチップを用いて 25 又は 37 で行った。簡単に言うと、抗原捕獲表面は、抗マウス I g G 特異抗体(抗 m F c ; GE Healthcare; カタログ # B R -

50

1008-38) か又は抗ペンタヒスチジン特異抗体 (Qiagen; カタログ # 34660) を、標準アミンカップリング法を用いてCM5 センサチップの表面に共有結合することによって生成した。実施緩衝液として、HBS-EP (10 mM HEPES、150 mM NaCl、3 mM EDTA、0.05% 界面活性剤 P20、pH 7.4)、又はPBSP (10 mM リン酸ナトリウム、2.7 mM KCl、137 mM NaCl、0.025% 界面活性剤 P20、pH 7.2 又は 5.75) を用いて、4.4 - 46.5 RU の結合反応を実現するまで、オリゴヒスチジntag の ANGPL3 のヒト及び種バリエーションを抗ペンタヒスチジン結合表面で捕獲した。捕獲組換えタンパク質は：C末端デカヒスチジntag [hANGPL3 (17-460) - His; R&D Systems, MN; カタログ # 3829-AN] の完全長成熟ヒト ANGPL3 (即ち、配列番号 161 のアミノ酸残基 17-460)、C末端ヘキサヒスチジntag [hANGPL3 (17-170) - His] を含有する、hANGPL3 のN末端コイルドコイルドメイン (即ち、配列番号 161 のアミノ酸残基 17-170)、myc-myc-ヘキサヒスチジntag [MfANGPL3 (17-170) - mmH; 配列番号 167] を含有する、カニクイザル由来の ANGPL3 のN末端コイルドコイルドメイン [即ち、配列番号 177 のアミノ酸残基 17-170 (カニクイザル ANGPL3 の部分配列)]、C末端デカヒスチジntag [mANGPL3 (17-455) - His; R&D Systems, MN; カタログ # 136-AN] の、ハツカネズミ由来完全長成熟 ANGPL3 (即ち、配列番号 163 のアミノ酸残基 17-455)、ヘキサヒスチジntag [mANGPL3 (17-240) - His; 配列番号 166] を含有する、ハツカネズミ由来の ANGPL3 のN末端コイルドコイルドメイン (即ち、配列番号 163 のアミノ酸残基 17-240)、及び myc-myc-ヒスチジntag [rANGPL3 (17-240) - mmH; 配列番号 176] を含有する、ドブネズミ由来の ANGPL3 のN末端コイルドコイルドメイン (即ち、配列番号 175 のアミノ酸残基 17-240) である。加えて、24.8 ± 1.5 RU の結合反応を実現するまで、C末端Fc融合 [hANGPL3 (17-169) - mFc; 配列番号 165] を含有する、hANGPL3 のN末端コイルドコイルドメイン (即ち、配列番号 161 のアミノ酸残基 17-169) を抗mFc結合表面に捕獲した。抗体/抗原複合体の形成の連結及び解離速度を測定するために、単一 (表3及び7) 及び複数 (表4~6) 濃度の抗体を、50 µl / 分の流速で3分間捕獲タンパク質表面をわたって注入し、そして複合体の解離を20分間モニターした。結合データを処理し、そして Scrubberバージョン 2.0 a (BioLogic Software) で物質移動により 1:1 結合モデルに合わせた。動的半減期 ($t_{1/2}$) を解離速度定数、 k_d から計算した。

【0110】

表3は、HBS-EP緩衝液中pH 7.4、25 で、種々抗 ANGPL3 抗体の hANGPL3 への結合を示す。

【0111】

10

20

30

【表 3】

表 3

Ab クローン	タンパク質	ka (M ⁻¹ s ⁻¹)	kd (s ⁻¹)	K _D (nM)	t _{1/2} (min)
H4H1248P	hANGPTL3(17-169)-mFc	4.57E+05	2.72E-03	5.95	4
	hANGPTL3(17-460)-His	4.40E+05	2.47E-03	5.62	5
H4H1250P	hANGPTL3(17-169)-mFc	1.25E+06	6.51E-04	0.519	18
	hANGPTL3(17-460)-His	9.04E+05	6.57E-04	0.726	18
H4H1263S	hANGPTL3(17-169)-mFc	6.77E+05	4.22E-03	6.23	3
	hANGPTL3(17-460)-His	5.08E+05	1.26E-03	2.47	9
H4H1268S	hANGPTL3(17-169)-mFc	1.16E+06	8.35E-04	0.721	14
	hANGPTL3(17-460)-His	1.29E+06	1.89E-03	1.47	6
H4H1276S	hANGPTL3(17-169)-mFc	5.82E+05	3.83E-04	0.659	30
	hANGPTL3(17-460)-His	3.44E+05	4.64E-04	1.35	25
H4H1279P	hANGPTL3(17-169)-mFc	6.58E+05	5.53E-06	0.00841	2088
	hANGPTL3(17-460)-His	2.88E+05	1.14E-04	0.394	102
H4H1282P	hANGPTL3(17-169)-mFc	1.28E+06	5.92E-05	0.0463	195
	hANGPTL3(17-460)-His	9.57E+05	9.26E-05	0.0968	125
H4H1292P	hANGPTL3(17-169)-mFc	6.86E+05	1.77E-04	0.257	65
	hANGPTL3(17-460)-His	3.41E+05	2.48E-04	0.727	47
H4H1295P	hANGPTL3(17-169)-mFc	3.52E+05	7.95E-05	0.226	145
	hANGPTL3(17-460)-His	3.73E+05	7.35E-05	0.197	157
H4H1296P	hANGPTL3(17-169)-mFc	6.41E+05	3.92E-05	0.0611	295
	hANGPTL3(17-460)-His	3.01E+05	4.12E-05	0.137	280

【 0 1 1 2 】

表 3 に示されるように、抗 h A N G P L T 3 抗体は、96.8 pM から 5.62 nM まで変動する計算平衡解離定数 ($K_D = k_d / k_a$) の C 末端デカヒスチジンタグ [h A N G P T L 3 (1 7 - 4 6 0) - H i s] と完全長タンパク質に、そして 8.41 pM から 6.23 nM まで変動する K_D の C 末端 Fc 融合 [h A N G P T L 3 (1 7 - 1 6 9) - m F c] と N 末端コイルドコイルドメインに結合した。

【 0 1 1 3 】

表 4 及び 5 は、HBS-EP 緩衝液中 pH 7.4 で、それぞれ 25 及び 37 における H4H1276S の A N G P T L 3 への異種結合を示す。表 6 は、PBSP 緩衝液中 pH 5.75 又は pH 7.2 で、25 又は 37 における H4H1276S のヒト又はカニクイザル A N G P T L 3 への結合を示す。

【 0 1 1 4 】

【表 4】

表 4

Ab クローン	タンパク質	25°C			
		ka (M ⁻¹ s ⁻¹)	kd (s ⁻¹)	K _D (nM)	t _{1/2} (min)
H4H1276S	hANGPTL3(17-170)-His	9.73E+05	9.12E-04	0.938	12.7
	hANGPTL3(17-460)-His	5.88E+05	2.89E-04	0.491	40.0
	MfANGPTL3(17-170)-mmH	1.35E+06	5.35E-04	0.396	21.6
	mANGPTL3(17-240)-His	6.70E+05	3.07E-04	0.458	37.6
	mANGPTL3(17-455)-His	1.29E+06	3.46E-04	0.268	33.4
	rANGPTL3(17-240)-mmH	1.35E+06	7.18E-04	0.530	16.1

10

【 0 1 1 5 】

【表 5】

表 5

Ab クローン	タンパク質	37°C			
		ka (M ⁻¹ s ⁻¹)	kd (s ⁻¹)	K _D (nM)	t _{1/2} (min)
H4H1276S	hANGPTL3(17-170)-His	1.59E+06	2.41E-03	1.52	4.8
	hANGPTL3(17-460)-His	6.32E+05	8.12E-04	1.29	14.2
	MfANGPTL3(17-170)-mmH	1.87E+06	1.17E-03	0.625	9.9
	mANGPTL3(17-240)-His	8.19E+05	9.64E-04	1.18	12.0
	mANGPTL3(17-455)-His	1.94E+06	7.91E-04	0.408	14.6
	rANGPTL3(17-240)-mmH	2.05E+06	1.93E-03	0.940	6.0

20

30

【 0 1 1 6 】

【表 6】

表 6

Ab クローン	タンパク質	ka (M ⁻¹ s ⁻¹)	kd (s ⁻¹)	K _D (nM)	t _{1/2} (min)
H4H1276S pH 7.2 25°C	hANGPTL3(17-170)-His	1.00E+06	1.10E-03	1.09	10.5
	hANGPTL3(17-460)-His	5.99E+05	4.02E-04	0.670	28.8
	MfANGPTL3(17-170)-mmH	1.45E+06	5.38E-04	0.370	21.5
H4H1276S pH 5.75 25°C	hANGPTL3(17-170)-His	2.80E+05	6.72E-03	24.0	1.7
	hANGPTL3(17-460)-His	7.32E+04	4.94E-03	67.5	2.3
	MfANGPTL3(17-170)-mmH	2.06E+05	4.32E-03	21.0	2.7
H4H1276S pH 7.2 37°C	hANGPTL3(17-170)-His	1.57E+06	2.73E-03	1.74	4.2
	hANGPTL3(17-460)-His	6.67E+05	1.18E-03	1.76	9.8
	MfANGPTL3(17-170)-mmH	1.94E+06	1.36E-03	0.700	8.5
H4H1276S pH 5.75 37°C	hANGPTL3(17-170)-His	1.22E+06	3.24E-02	26.7	0.4
	hANGPTL3(17-460)-His	4.71E+04	1.07E-02	227	1.1
	MfANGPTL3(17-170)-mmH	2.78E+05	5.21E-03	18.8	2.2

10

20

【 0 1 1 7 】

表 4 ~ 6 に示されるように、抗体 H 4 H 1 2 7 6 S は、ヒト A N G P T L 3 への結合のものと類似した結合親和性及び速度定数のサル、マウス、及びラット由来の A N G P T L 3 への結合を示した。

【 0 1 1 8 】

表 7 は、H B S - E P 緩衝液中 pH 7 . 4、3 7 で、選択抗 A N G P T L 3 抗体の h A N G P T L 3 及び m A N G P T L 3 への結合を示す。NB : 結合せず。

【 0 1 1 9 】

【表 7】

30

表 7

Ab クローン	タンパク質	ka (M ⁻¹ s ⁻¹)	kd (s ⁻¹)	K _D (nM)	t _{1/2} (min)
H1M896N	hANGPTL3(17-460)-His	3.36E+06	5.30E-04	1.58E-10	22
	mANGPTL3(17-455)-His	3.62E+06	2.47E-03	6.82E-10	5
H4H1248P	hANGPTL3(17-460)-His	1.96E+06	1.93E-03	9.86E-10	6
	mANGPTL3(17-455)-His	NB	NB	NB	NB
H4H1250P	hANGPTL3(17-460)-His	3.50E+06	1.13E-03	3.24E-10	10
	mANGPTL3(17-455)-His	3.18E+06	1.55E-03	4.86E-10	7
H4H1263S	hANGPTL3(17-460)-His	4.74E+06	1.81E-03	3.81E-10	6
	mANGPTL3(17-455)-His	NB	NB	NB	NB
H4H1279P	hANGPTL3(17-460)-His	4.74E+06	1.81E-03	3.81E-10	6
	mANGPTL3(17-455)-His	2.15E+06	3.59E-04	1.67E-10	32
H4H1292P	hANGPTL3(17-460)-His	1.89E+06	1.94E-03	1.02E-09	6
	mANGPTL3(17-455)-His	3.92E+06	1.49E-03	3.80E-10	8

40

50

【0120】

表7に示されるように、抗hANGPTL3抗体は、158 pMから1.02 nMまで変動する計算平衡解離定数 ($K_D = k_d / k_a$) のpH7.4及び3.7でC末端デカヒスチジンタグ [hANGPTL3(17-460)-His]と完全長タンパク質に、そしてmANGPTL3に対して検出可能結合を示さなかったH4H1248P及びH4H1263Sを除いて、167 pMから682 pMまで変動する K_D sのマウスANGPTL3 [mANGPTL3(17-455)-His]に結合した。また動的半減期 ($t_{1/2}$)を示す。

【0121】

〔実施例4〕抗ANGPTL3抗体のBiacore交差競合研究

本質的に上記実施例3に記載のBiacoreで25において交差競合研究を実施した。簡単に言えば、実施緩衝液としてHBS-EPを用いて、C末端デカヒスチジンタグ [hANGPTL3(17-460)-His; R&D Systems, MN; カタログ#3829-AN]の完全長hANGPTL3(即ち、配列番号161のアミノ酸残基17-460)を、64 RUの結合反応を実現するまで、抗ペントヒスチジン結合表面に捕獲した。2つの抗体が捕獲ANGPTL3に同時に結合し得るかを決定するために、抗体ペアは各々167 nMで4 μ l/分の流速において15分間逐次的に表面にわたって注入し、そして最大結合反応シグナル(RU)を各結合イベントに対して測定した。結果は表8に、第1の抗体(mAb1)の結合反応、続いて第1の抗体をプレロードしたANGPTL3表面への第2の抗体(mAb2)の結合反応で示す。太字の数は、抗体ペアがhANGPTL3に同時に結合が可能であることを示す。イタリックの数は、他ではなく1つの方向に逐次的に加えられるとき、抗体ペアがhANGPTL3に同時に結合が可能であることを示す。

【0122】

【表8】

表8

Ab クローン	hANGPTL3 (17-460)- His 捕獲 (RU)	25 μ g/ml mAb1 結合反応 (RU)	25 μ g/ml mAb2 結合反応(RU)			
			H1M896N	H4H1250P	H4H1279P	H4H1292P
H1M896N	64 \pm 4	171 \pm 1.8	[-4]	-4	47	50
H4H1250P		210 \pm 8.3	-4	[13]	9	8
H4H1279P		45 \pm 1.8	186	213	[-3]	-1
H4H1292P		48 \pm 0.7	182	220	-3	[-2]
陰性対照		81 \pm 1.8	149	187	47	48

【0123】

表8に示されるように、抗体ペアH1M896N/H4H1279P及びH1M896N/H4H1292Pは、抗体の添加順序に関係なく、固定化ANGPTL3に同時に結合することができた。H4H1250Pは、H4H1279Pとプレ結合したANGPTL3に結合した；しかしながら、抗体の添加順序が逆になったとき、H4H1279Pは、ANGPTL3がH4H1250Pとプレ結合した後に、予想最大反応のほぼ24%の結合シグナルを示した。同様に、H4H1250PはH4H1292Pとプレ結合したANGPTL3に結合した；しかしながら、抗体の添加順序が逆になったとき、H4H1292Pは、ANGPTL3がH4H1250Pとプレ結合した後に、予想最大反応のほぼ20%の結合シグナルを示した。

【0124】

〔実施例5〕ANGPTL3のN末端コイルドコイルペプチドへの抗hANGPTL3抗体結合

ANGPTL3のN末端コイルドコイル領域由来ペプチドへの抗ANGPTL3抗体H4H1276Sの結合を評価するために、標識なしバイオセンサ結合アッセイをOCTET(登録商標)REDシステム(ForteBio, Inc.)を用いて行った。センサペプチドへの固定のために、ペプチドは、N末端ビオチンタグ[ペプチド1及びペプチド2ではフレキシブルリンカー、アミノ酸「AGSSPGG」(配列番号171);及びペプチド3ではアミノ酸「GGGGS」(配列番号172)によって分離された]か、又はC末端ビオチンタグ[ペプチド1及びペプチド2ではフレキシブルリンカー、アミノ酸「GPSSGAPPK」(配列番号173);及びペプチド3ではアミノ酸「GGGGSK」(配列番号174)によって分離された]で標識した。試験したペプチド配列は:陰性対照ペプチド、N末端ビオチンタグ化ペプチド1(配列番号168;配列番号164のヒトANTGPTL4の残基Arg34~Leu66);及びANGPTL3のN末端コイルドコイル領域由来ペプチド、即ち、N末端ビオチンタグ化ペプチド2(配列番号169;配列番号161のhANGPTL3の残基Arg36~Leu68);C末端ビオチンタグ化ペプチド2;N末端ビオチンタグ化ペプチド3(配列番号170;配列番号161のhANGPTL3の残基Glu32~Leu57に対応);及びC末端ビオチンタグ化ペプチド3であった。ペプチド配列はまた図1に示される。ストレプトアビジンコーティングバイオセンサチップはビオチニル化ペプチドでコーティングし、ペプチドに応じて1.22-2.26nmの結合反応単位をもたらした。ペプチドコーティングバイオセンサチップは、次いで1µMの抗ANGPTL3抗体のH4H1276Sか又はイソタイプ適合陰性対照抗体を含有するウェルに浸漬し、そして結合を2.5分間モニターした。各ペプチドへのH4H1276S及びイソタイプ対照抗体の結合反応は、図2にまとめられる。H4H1276Sはペプチド2によって規定されるANGPTL3線状配列に結合し、しかしペプチド3によって規定される重複しかし異なる配列はそうでないことを認めた(図1も参照されたい)。このイソタイプ対照抗体は特異的にhANGPTL4を認識することから、イソタイプ対照抗体はまた、バイオセンサへのペプチド1(即ち、hANGPTL4ペプチド)の負荷に対する陽性対照としての機能を果たした。図2に示されるように、ペプチド1への対照抗体の結合は、ペプチド1がセンサ表面に存在し、そしてそれで他のペプチドであることを確認した。

【0125】

〔実施例6〕LPLバイオアッセイにおける抗hANGPTL3抗体によるhANGPTL3の阻害

リポタンパク質リパーゼ(LPL)はヒトの脂質代謝において重要な役割を果たしている。LPLはトリグリセリドの加水分解を触媒し、そして代謝されるように脂肪酸を放出する。ANGPTL3はLPL活性を阻害し脂質のレベル増加をもたらす(Oike et al., 2005, Trends in Molecular Medicine 11(10):473-479)。ANGPTL3のN末端コイルドコイル領域は、C末端フィブリノーゲン領域なしに発現されるときLPLを阻害し、そしてその結果その阻害機能を与えるように見える。LPL活性のANGPTL3誘導減少を阻害する抗ANGPTL3抗体の能力を測定する無細胞バイオアッセイを開発した。

【0126】

抗ANGPTL3抗体によるhANGPTL3活性の阻害を、CONFLUOLIP(商標)連続蛍光リパーゼ試験(Progen, Germany)を使用して、3つのhANGPTL3タンパク質:C末端デカヒスチジンタグ[hANGPTL3(17-460)-His;R&D Systems,MN;カタログ#3829-AN]の完全長成熟hANGPTL3(即ち、配列番号161のアミノ酸残基17-460)、C末端マウスFc融合[hANGPTL3(17-169)-mFc;配列番号165]のN末端コイルドコイルド領域(即ち、配列番号161のアミノ酸残基17-169)、及びC末端ヘキサヒスチジンタグ[hANGPTL3(17-170)-His]を含有する、hANGPTL3のN末端コイルドコイルドメイン(即ち、配列番号161のアミノ酸残基17-170)、を用いて測定した。

【 0 1 2 7 】

簡単に言えば、PBS中でウシLPL(2 nMの最終濃度)、ヒトApocIII(LPLのコファクタ、0.23 μMの最終濃度)、及びBSA(2 mg/mLの最終濃度)をプレミックスした。hANGPTL3組換タンパク質をApo/LPL混合液(80-100 nMの最終濃度)に加えた。次いでApo/LPL/ANGPTL3タンパク質混合液を連続的に希釈した抗hANGPTL3抗体と併せて加え、そして室温で30分間インキュベートした。インキュベーション後、再構成リパーゼ基質として、100 μlの1-トリニトロフェニル-アミノ-ドデカノイル-2-ピレンデカノイル-3-0-ヘキサデシル-sn-グリセロール(LS-A, Progen)を、96ウェルアッセイプレートで25 μlの抗体混合液に加え、そして37°Cで2時間インキュベートした。次いでFLEXSTATION(登録商標)3マイクロプレートリーダー(Molecular Devices, CA)を用いて、342 nm/400 nm(励起/放出)で蛍光を測定した。蛍光はLPL活性に正比例する。

10

【 0 1 2 8 】

抗体H4H1276SはLPLに対するhANGPTL3の阻害活性の阻害を示した。LPLアッセイでhANGPTL3タンパク質を用いた完全用量反応を、各実験でANGPTL3のEC₅₀を測定するために先ず実施し、そして表8に示すように次いで抗体のIC₅₀測定をANGPTL3タンパク質の一定濃度を用いて実施した。50%最大阻害(IC₅₀)に必要な抗体の濃度は、それぞれ、80 nMのhANGPTL3(17-460)-Hisでは9.6 nM、100 nMのhANGPTL3(17-170)-Hisでは2.9 nM及び80 nMのhANGPTL3(17-169)-mFcでは21 nMであると決定した。抗体濃度は検査ヒトANGPTL3タンパク質で0から300 nMまで変動した。

20

【 0 1 2 9 】

同様に、H4H1276Sについて、異種間オーソログのその阻害能力をLPLバイオアッセイにおいて以下で試験した：C末端myc-myc-ヘキサヒスチジンタグ[MfANGPTL3(17-170)-mmH; 配列番号：167]で発現したカニクイザルのN末端領域(配列番号177のアミノ酸残基17-170)、C末端ヘキサヒスチジンタグ[mANGPTL3(17-240)-His; 配列番号166]のマウスオーソログN末端領域配列番号163のアミノ酸残基17-240、及びC末端デカヒスチジンタグ[mANGPTL3(17-455)-His; R&D Systems, MN; catalog #136-AN]のハツカネズミ由来の完全長成熟ANGPTL3(即ち、配列番号163のアミノ酸残基17-455)。IC₅₀は、500 nM定常MfANGPTL3(17-170)-mmHでは10 nM、80 nM定常mANGPTL3(17-455)-Hisでは14 nM、そして500 nM定常mANGPTL3(17-240)-Hisでは31 nMと決定した。抗体濃度は試験サル及びマウスANGPTL3タンパク質で0から600 nMまで変動した。結果は表9にまとめられる。

30

【 0 1 3 0 】

相同タンパク質ANGPTL4のN末端領域に対する抗体はまた、LPLへのANGPTL4の阻害機能をブロックすることを示している(Lee et al., 2009, J. Biol. Chem. 284:13735-13745)。従って、ANGPTL4に対する交差反応性の可能性を評価するために、阻害性抗ANGPTL3抗体H4H1276Sをまた、ANGPTL3タンパク質に対して上記で実施された、LPLアッセイでヒトANGPTL4に対して試験した。C末端マウスIgG2aのFc融合[hANGPTL4(26-148)-mFc、配列番号178]したヒトANGPTL4(配列番号164の残基26-148)のコイルドコイル領域の組換型は、LPLアッセイで0.2 nMのEC₅₀を示した(表9)。0-600 nMの濃度範囲を通して試験したH4H1276Sはこの阻害をブロックしなかった(NB:結合せず;表9)。

40

【 0 1 3 1 】

【表 9】

表 9

	ヒト ANGPTL3 (17-460) -His	ヒト ANGPTL3 (17-170) -His	ヒト ANGPTL3 (17-169) -mFc	サル ANGPTL3 (17-170) -mmH	マウス ANGPTL3 (17-455) -His	マウス ANGPTL3 (17-240) -His	ヒト ANGPTL4 (26-148) -mFc
EC ₅₀ (nM)	50	91	16	625	33	199	0.2
定常 ANGPTL3 又は 4 (nM)	80	100	80	500	80	500	2
IC ₅₀ (nM)	H4H 1276S	9.6	2.9	21	10	14	NB
	IgG4 cont.	NB	NB	NB	NB	NB	NB

10

【 0 1 3 2 】

上記のように、H4H1276Sは、ヒトANGPTL3（完全長及びN末端）、サルANGPTL3（N末端）タンパク質及びマウスANGPTL3（完全長及びN末端）活性を、約3 - 31 nMのIC₅₀範囲で同程度に阻害した。

20

【 0 1 3 3 】

同時に加えられた2つのANGPTL3非ブロック抗体の組み合わせが、ANGPTL3のLPL阻害活性をブロックし得るかを決定するために、抗体のサブセットをまた試験した。抗体のペアについて、ヒト及びマウスの両方のANGPTL3、即ち、それぞれhANGPTL3（17-169）-mFc及びmANGPTL3（17-240）-HisのN末端ドメインの阻害を試験した。このアッセイで、ANGPTL3タンパク質は、47 nM [hANGPTL3（17-169）-mFcに対して]及び341 nM [mANGPTL3（17-240）-Hisに対して]のLPLブロックのIC₅₀値を示した。下記のペアは、少なくとも200 nMの各抗体の最終濃度で加えたとき、80 nMでhANGPTL3（17-169）-mFcか又は500 nMでmANGPTL3（17-240）-HisによるLPLの阻害をブロックしなかった：H1M896N + H4H1279P；H4H1250P + H4H1279P；H4H1248P + H4H1292P；及びH4H1263S + H4H1292P。この同じアッセイで、H4H1276Sだけが、それぞれ33 nM及び64 nMのIC₅₀でこれらの同じ一定濃度のヒト及びマウスのANGPTL3をブロックした。

30

【 0 1 3 4 】

〔実施例 7.1.〕血清脂質レベルに対する抗ANGPTL3抗体のインビボ効果

血清脂質レベルに対する抗hANGPTL3抗体のH4H1276Sの効果を、C57BL/6マウスで測定した。マウスを実験の7日前にプレ放血し、そして各試験抗体用量に対して各々6マウス群を割り当てた。抗体を、5 mg / kg（H4H1726S）及び10 mg / kg [H4H1726S及び無関係な特異性のイソタイプ適合hIgG4（S108P）対照]用量レベルで、試験の0日目に皮下注射によって投与した。マウスを抗体注射の1、4、7及び12日後に4時間の絶食後に放血し、そして血清脂質レベル（トリグリセリド、総コレステロール、非HDLコレステロール、LDLコレステロール及びHDLコレステロール）を、ADVIA^(R) 1800 Chemistry System (Siemens)によって血清で測定した。各抗体に対してそれぞれの時点での平均値を算出した。（平均 ± SEM）の血清脂質濃度で表した結果を表10 ~ 14に示した。

40

【 0 1 3 5 】

【表 1 0】

表 1 0

注射後の日数	血清トリグリセリド (mg/dL)					
	対照 Ab (10 mg/kg)		H4H1276S (5 mg/kg)		H4H1276S (10 mg/kg)	
	平均	SEM	平均	SEM	平均	SEM
-7	87.83	6.18	89.83	3.65	87.17	5.062
1	123.16	7.02	68.00	2.84	53.83	2.52
4	99.66	10.15	62.16	5.82	50.67	3.51
7	99.83	4.57	55.83	4.95	39.67	2.55
12	82.00	5.75	76.83	10.56	53.00	6.51

10

【 0 1 3 6】

【表 1 1】

表 1 1

注射後の日数	総コレステロール (mg/dL)					
	対照 Ab (10 mg/kg)		H4H1276S (5 mg/kg)		H4H1276S (10 mg/kg)	
	平均	SEM	平均	SEM	平均	SEM
-7	82.50	2.11	80.33	1.15	81.33	2.14
1	87.83	1.87	71.50	5.48	63.67	3.38
4	75.00	2.58	59.50	3.51	51.00	2.98
7	83.50	1.77	67.00	1.79	61.33	2.33
12	87.83	1.82	83.00	4.30	69.33	3.22

20

30

【 0 1 3 7】

【表 1 2】

表 1 2

注射後の日数	非 HDL コレステロール (mg/dL)					
	対照 Ab (10 mg/kg)		H4H1276S (5 mg/kg)		H4H1276S (10 mg/kg)	
	平均	SEM	平均	SEM	平均	SEM
-7	41.18	0.75	38.78	0.81	40.23	1.18
1	42.18	0.55	35.75	3.05	32.70	1.94
4	36.40	1.04	29.63	2.16	27.55	1.78
7	40.82	0.75	34.67	1.83	32.02	1.68
12	41.72	0.87	39.85	2.21	35.13	1.47

40

【 0 1 3 8】

【表 1 3】

表 1 3

注射後の日数	LDL コレステロール (mg/dL)					
	対照 Ab (10 mg/kg)		H4H1276S (5 mg/kg)		H4H1276S (10 mg/kg)	
	平均	SEM	平均	SEM	平均	SEM
-7	4.68	0.35	4.40	0.34	4.47	0.21
1	5.40	0.41	5.20	0.79	5.33	0.71
4	4.80	0.45	4.88	0.67	5.33	0.73
7	5.38	0.46	5.83	0.48	6.40	0.67
12	5.67	0.59	6.12	0.65	5.35	0.48

10

【 0 1 3 9】

【表 1 4】

表 1 4

注射後の日数	HDL コレステロール (mg/dL)					
	対照 Ab (10 mg/kg)		H4H1276S (5 mg/kg)		H4H1276S (10 mg/kg)	
	平均	SEM	平均	SEM	平均	SEM
-7	41.32	1.57	41.55	0.90	41.10	1.37
1	45.65	1.85	35.75	2.54	30.97	2.13
4	38.60	2.26	29.87	1.62	23.45	1.66
7	42.68	1.81	32.33	1.25	29.32	1.72
12	46.12	1.94	43.15	2.52	34.20	1.99

20

30

【 0 1 4 0】

循環 H 4 H 1 2 7 6 S (血清 A b) のレベルも、標準 E L I S A アッセイを用いて測定した。簡単に言えば、プレートは、血清 A b を捕獲するためにヤギ抗ヒト F c 抗体 (Sigma-Aldrich) でコーティングした。次に血清をプレートに加えて、そして捕獲ヒト抗体を、セイヨウワサビペルオキシダーゼ (H R P) 結合ヤギ抗ヒト I g G 抗体 (Sigma-Aldrich) を用いて化学ルミネセンスによって検出した。(平均 ± S E M) で表した結果を表 1 5 に示した。対照：イソタイプ適合対照 A b を受けたマウス。

【 0 1 4 1】

【表 15】

表 15

注射後の日数	血清 Ab (µg/mL)					
	対照 Ab (10 mg/kg)		H4H1276S (5 mg/kg)		H4H1276S (10 mg/kg)	
	平均	SEM	平均	SEM	平均	SEM
1	65.00	8.05	36.38	7.57	126.23	9.96
4	59.16	4.94	29.91	4.32	86.28	6.77
7	58.23	6.02	30.86	5.11	54.24	8.96
12	41.35	9.76	5.48	1.79	39.04	7.08

10

【0142】

C57B1/6 マウスへの 10 mg/kg の H4H1276S の単回投与は、抗体投与の 7 日後に循環トリグリセリドの減少をもたらした（イソタイプ対照と比べて）。H4H1276S の投与はまた、総コレステロール、非 HDL コレステロール及び HDL コレステロールの顕著な減少をもたらした、そして LDL コレステロールへの作用はなかった。脂質レベルの減少も認められたが、しかし 10 mg/kg レベルと比べて 5 mg/kg ではそれほど顕著ではなかった；例えば、血清トリグリセリドは抗体投与の 7 日後に 44% 減少した（イソタイプ対照と比べて）。

20

【0143】

【実施例 7.2.】 血清脂質レベルに対する抗 ANGPTL3 抗体のインビボ効果

血清脂質レベルに対する抗 ANGPTL3 抗体の H4H1276S 及びコンパレータ 4.9.1 のインビボ効果の評価は、C57B1/6 マウスで実施した。抗体 4.9.1 は、US 特許出願公開 2008/0177045 に開示のそしてマウスイソタイプ IgG1 として配列番号 24 (VH) 及び配列番号 32 (VL) のアミノ酸配列に基づいて調製した。マウスを実験の 7 日前にプレ放血し、そして群当り 6 マウスの群に割り当てた。抗体 H4H1276S、4.9.1、及び無関係な特異性のイソタイプ適合陰性対照（それぞれヒト IgG4 及びマウス IgG1）を、10 mg/kg 用量で、試験の 0 日目に皮下注射によって投与した。マウスを抗体投与の 1、7、11 及び 20 日後に 4 時間の絶食後に放血し、そして血清脂質レベル（トリグリセリド、総コレステロール、非 HDL コレステロール、LDL コレステロール及び HDL コレステロール）を、ADVIA（登録商標）1800 Chemistry System (Siemens) を用いて血清で測定した。各抗体に対してそれぞれの時点での平均脂質濃度を算出した。（平均 ± SEM）の血清脂質濃度で表した結果を表 16 ~ 20 に示した。

30

【0144】

【表 1 6】

表 1 6

注射後の 日数	血清トリグリセリド (mg/dL)							
	対照 (IgG4)		H4H1276S		対照 (IgG1)		4.9.1	
	平均	SEM	平均	SEM	平均	SEM	平均	SEM
-7	109.16	9.05	109.16	6.44	112.80	6.87	109.17	7.24
1	81.67	6.76	46.00	3.59	95.20	8.92	41.83	2.42
7	95.67	5.42	49.67	3.86	101.80	7.55	96.00	3.70
11	100.83	6.20	51.00	5.89	117.00	6.00	92.00	4.50
20	82.17	4.36	72.67	3.47	79.40	6.59	73.83	5.03

10

【 0 1 4 5】

【表 1 7】

表 1 7

注射後の 日数	総コレステロール(mg/dL)							
	対照 I (IgG4)		H4H1276S		対照 (IgG1)		4.9.1	
	平均	SEM	平均	SEM	平均	SEM	平均	SEM
-7	80.81	0.95	80.92	3.05	80.32	2.84	79.37	2.76
1	82.82	2.11	67.33	3.60	82.98	2.17	71.35	1.82
7	79.20	1.81	63.58	3.98	85.02	7.27	82.07	4.36
11	89.97	3.18	69.02	2.11	83.92	2.49	84.58	1.08
20	92.43	1.10	80.17	3.20	87.47	2.58	88.40	2.84

20

【 0 1 4 6】

【表 1 8】

表 1 8

注射後の 日数	非 HDL コレステロール(mg/dL)							
	対照 (IgG4)		H4H1276S		対照 (IgG1)		4.9.1	
	平均	SEM	平均	SEM	平均	SEM	平均	SEM
-7	42.44	1.18	42.87	1.03	43.20	2.44	41.73	1.40
1	40.85	1.48	35.33	1.79	40.68	0.87	36.97	1.49
7	39.03	1.04	33.72	2.86	43.30	4.35	40.47	2.35
11	44.68	1.93	35.18	1.64	40.28	0.95	41.38	1.05
20	47.40	0.67	42.10	1.51	44.72	1.66	44.40	1.57

40

【 0 1 4 7】

【表 19】

表 19

注射後の 日数	LDL コレステロール(mg/dL)							
	対照 (IgG4)		H4H1276S		対照 (IgG1)		4.9.1	
	平均	SEM	平均	SEM	平均	SEM	平均	SEM
-7	3.93	0.07	4.20	0.26	4.38	0.26	4.20	0.18
1	3.95	0.28	4.25	0.37	3.92	0.17	4.62	0.37
7	3.75	0.14	5.25	1.08	5.76	1.61	4.57	0.73
11	5.05	0.26	5.47	0.23	4.88	0.27	4.78	0.23
20	5.72	0.34	4.95	0.32	4.97	0.28	5.65	0.46

10

【0148】

【表 20】

表 20

注射後の 日数	HDL コレステロール(mg/dL)							
	対照 (IgG4)		H4H1276S		対照 (IgG1)		4.9.1	
	平均	SEM	平均	SEM	平均	SEM	平均	SEM
-7	38.37	0.95	38.00	2.27	37.12	1.88	37.63	1.52
1	41.97	1.32	32.00	1.89	42.30	2.09	34.38	0.85
7	40.17	0.93	29.87	1.23	41.72	2.97	41.60	2.47
11	45.28	1.80	33.83	1.15	43.64	1.70	43.20	1.57
20	45.03	0.75	38.07	1.79	42.75	1.69	44.00	1.83

20

【0149】

C57BL/6 マウスでの H4H1276S の単回 10 mg / kg 用量は、抗体注射後 1、7、11 及び 20 日でイソタイプ対照と比べて血漿トリグリセリドレベルの減少をもたらした；そしてその効果はコンパレータ 4.9.1 と同じ用量レベルでの単回処置に比べてより持続性であった（表 16）。H4H1276S の投与はまた、C57BL/6 マウスにおいて総コレステロール（表 17）及び HDL コレステロール（表 20）の減少をもたらした。

30

【0150】

【実施例 8】高脂血症 ApoE^{-/-} マウス中の血清脂質レベルに対する H4H1276S のインビボ効果

血清脂質レベルに対する抗 hANGPTL3 抗体 H4H1276S の効果を、ApoE^{-/-} マウスで測定した。これらのマウスは、VLDL 及び LDL の形態で見出される大部分のそれらの循環コレステロールにより高脂血症性である。マウスを実験の 7 日前にプレ放血し、そして群当り 6 マウスの群に割り当てた。抗体、H4H1276S 及び無関係な特異性のイソタイプ適合 (hIgG4) 対照を、10 mg / kg 用量で試験の 0 日目に皮下注射によって投与した。マウスを抗体の注射の 1、4、7 及び 11 日後に 4 時間の絶食後に放血し；そして血清脂質レベル（トリグリセリド、総コレステロール、非 HDL コレステロール、LDL コレステロール及び HDL コレステロール）を、ADVIA（登録商標）1800 Chemistry System (Siemens) を用いて血清中で測定した。各抗体処置群に対してそれぞれの時点で平均脂質濃度を算出した。（平均 ± SEM）の血清脂質濃度で表した結果を表 21 ~ 25 に示した。

40

50

【 0 1 5 1 】

【 表 2 1 】

表 2 1

注射後の日数	血清トリグリセリド (mg/dL)			
	対照 (hlgG4)		H4H1276S	
	平均	SEM	平均	SEM
-7	134.17	11.81	141.67	17.14
1	156.33	19.06	61.33	3.66
4	181.00	7.70	70.50	4.46
7	190.67	27.65	52.50	6.22
11	170.00	28.85	133.00	13.56

10

【 0 1 5 2 】

【 表 2 2 】

表 2 2

注射後の日数	総コレステロール (mg/dL)			
	対照 (hlgG4)		H4H1276S	
	平均	SEM	平均	SEM
-7	450.67	25.68	479.33	13.76
1	497.50	37.77	386.33	28.59
4	395.00	14.37	281.20	20.83
7	447.33	22.18	295.50	12.86
11	463.80	36.01	398.03	23.13

20

【 0 1 5 3 】

【 表 2 3 】

表 2 3

注射後の日数	非 HDL コレステロール(mg/dL)			
	対照 (hlgG4)		H4H1276S	
	平均	SEM	平均	SEM
-7	435.87	25.59	464.53	13.97
1	476.30	37.29	371.25	28.65
4	375.61	14.51	266.26	21.19
7	427.66	21.45	280.75	12.55
11	442.27	34.19	379.55	22.31

40

【 0 1 5 4 】

【表 2 4】

表 2 4

注射後の日数	LDL コレステロール (mg/dL)			
	対照 (hlgG4)		H4H1276S	
	平均	SEM	平均	SEM
-7	14.27	1.63	14.87	0.90
1	17.42	2.94	11.23	1.81
4	10.28	1.52	6.62	0.83
7	11.82	1.40	6.32	0.45
11	13.90	2.54	10.21	1.14

10

【 0 1 5 5】

【表 2 5】

表 2 5

注射後の日数	HDL コレステロール (mg/dL)			
	対照 (hlgG4)		H4H1276S	
	平均	SEM	平均	SEM
-7	14.80	0.37	14.80	0.54
1	21.20	1.00	15.08	0.53
4	19.33	0.94	14.53	0.75
7	19.77	0.78	14.58	0.72
11	21.53	1.89	18.48	1.00

20

【 0 1 5 6】

ApoE^{-/-}マウスへ10mg/kgでのH4H1276Sの単回投与は、抗体投与後7日に循環トリグリセリドの~72% (平均) 減少 (表 2 1) 及びLDLコレステロールの~46% (平均) 減少 (表 2 4) をもたらした (イソタイプ適合対照Ab、即ち、hIgG4と比べて)。H4H1276Sの投与はまた、総コレステロール (表 2 2) 及び非HDLコレステロール (表 2 3) の減少をもたらした。

30

【 0 1 5 7】

循環H4H1276S (血清Ab) のレベルも、標準ELISAアッセイを用いて測定した。簡単に言えば、プレートは、血清Abを捕獲するためにヤギ抗ヒトFc抗体 (Sigma-Aldrich) でコーティングした。次いで血清をプレートに加えて、そして捕獲ヒト抗体を、セイヨウワサビペルオキシダーゼ (HRP) 結合ヤギ抗ヒトIgG抗体 (Sigma-Aldrich) を用いて化学ルミネセンスによって検出した。(平均±SEM) で表した結果を表 2 6 に示した (対照: イソタイプ適合対照Ab、即ち、hIgG4を受けたマウス)。

40

【 0 1 5 8】

【表 2 6】

表 2 6

注射後の日数	血清 Ab (µg/mL)			
	対照 (hIgG4) (10 mg/kg)		H4H1276S (10 mg/kg)	
	平均	SEM	平均	SEM
1	89.98	16.70	115.29	19.75
4	67.18	2.38	86.61	5.32
7	58.52	2.00	39.85	6.91
12	43.26	1.76	3.18	2.64

10

【0159】

〔実施例9〕高脂血症Ldlr^{-/-}マウスでの循環脂質レベルに対するH4H1276Sのインビボ効果

血清脂質レベルに対する抗hANGPTL3抗体H4H1276Sの効果をLdlr^{-/-}マウスで測定した。これらのマウスは、LDLコレステロール取込の主要受容体、LDLRの欠乏に因りLDLの形態で見出される大部分の循環コレステロールにより高脂血症性である。

20

【0160】

マウスを実験の7日前にプレ放血し、そして6マウスの群に割り当てた。抗体、H4H1276S及びイソタイプ適合(hIgG4)陰性対照を、10mg/kg用量で試験の0日目に皮下注射によって投与した。抗体の注射の1、4、7及び11日後に4時間の絶食後に放血し；そして血清脂質レベル(トリグリセリド、総コレステロール、非HDLコレステロール、LDLコレステロール及びHDLコレステロール)を、ADVIA(登録商標)1800 Chemistry System (Siemens)臨床化学分析計を用いて測定した。各抗体に対しそれぞれの時点で平均値を算出した。(平均±SEM)の血清脂質濃度(トリグリセリド、総コレステロール、非HDLコレステロール、LDLコレステロール及びHDLコレステロール)で表した結果を、それぞれ表27~31に示した。(対照=イソタイプ適合対照抗体を受けたマウス)。

30

【0161】

【表 2 7】

表 2 7 血清トリグリセリド (mg/dL)

注射後の日数	抗体			
	対照 (10mg/kg)		H4H1726S (10mg/kg)	
	平均	SEM	平均	SEM
-7	114.50	11.08	110.83	6.89
1	131.50	6.18	74.17	3.30
4	112.67	8.94	68.00	3.91
7	136.67	11.55	92.67	12.16
11	142.33	7.10	95.83	8.67

10

【 0 1 6 2】

【表 2 8】

表 2 8 総コレステロール (mg/dL)

注射後の日数	抗体			
	対照 (10mg/kg)		H4H1726S (10mg/kg)	
	平均	SEM	平均	SEM
-7	237.95	7.33	236.99	5.68
1	241.97	10.58	206.98	9.68
4	229.88	7.61	172.96	4.49
7	234.74	10.49	176.28	7.47
11	251.87	18.82	201.73	10.12

20

30

【 0 1 6 3】

【表 2 9】

表 2 9 非HDLコレステロール (mg/dL)

注射後の日数	抗体			
	対照 (10mg/kg)		H4H1726S (10mg/kg)	
	平均	SEM	平均	SEM
-7	180.81	7.47	182.79	5.93
1	184.35	10.22	155.93	8.74
4	175.13	7.26	130.79	4.66
7	174.84	9.26	126.56	6.63
11	190.00	17.07	145.43	7.34

10

【 0 1 6 4】

【表 3 0】

20

表 3 0 LDLコレステロール (mg/dL)

注射後の日数	抗体			
	対照 (10mg/kg)		H4H1726S (10mg/kg)	
	平均	SEM	平均	SEM
-7	62.75	2.18	62.75	1.81
1	63.25	2.40	53.82	4.09
4	60.97	3.14	49.65	2.72
7	59.52	2.99	46.05	2.13
11	63.23	3.07	54.28	1.67

30

【 0 1 6 5】

【表 3 1】

表 3 1 HDLコレステロール (mg/dL)

注射後の日数	抗体			
	対照 (10mg/kg)		H4H1726S (10mg/kg)	
	平均	SEM	平均	SEM
-7	57.13	1.56	54.20	1.89
1	57.62	0.88	51.05	0.98
4	54.75	2.23	42.17	1.89
7	59.90	2.51	49.72	2.35
11	61.87	2.48	56.30	3.43

10

【0166】

表 2 7~3 1 に示されるように、LDLR^{-/-}マウスに対する H 4 H 1 2 7 6 S の投与は、44%の最大実測減少で血漿トリグリセリドの顕著な減少をもたらした（平均値ベース）。LDLコレステロール（23%まで）、並びに総コレステロール、非HDLコレステロール及びHDLコレステロールの顕著な減少もH4H1276S処置被検体で認められた。LDLコレステロール取込の主要受容体（LDLR）欠乏マウスにおけるLDLコレステロールの減少は、ANGPTL3阻害によるLDLコレステロール減少に対するLDLR非依存性機構を示唆する。

20

【0167】

循環H4H1276S（血清Ab）のレベルもまた、標準ELISAアッセイを用いて測定した。簡単に言えば、プレートは、血清Abを捕獲するためにヤギ抗ヒトFc抗体（Sigma-Aldrich）でコーティングした。次いで血清をプレートに加えて、そして捕獲抗体を、セイヨウワサビペルオキシダーゼ（HRP）結合ヤギ抗ヒトIgG抗体（Sigma-Aldrich）を用いて化学ルミネセンスによって検出した。（平均±SEM）で表した結果を表32に示した。（対照 = イソタイプ適合対照抗体を受けたマウス）。

30

【0168】

【表 3 2】

表 3 2 血清Ab (μg/mL)

注射後の日数	抗体			
	対照 (10mg/kg)		H4H1726S (10mg/kg)	
	平均	SEM	平均	SEM
1	44.59	1.95	58.79	5.95
4	42.28	6.12	47.21	10.24
7	41.76	3.87	28.88	5.97
11	37.25	6.85	21.02	4.86

40

【0169】

表 3 2 に示されるように、H 4 H 1 2 7 6 S の血清レベルは 1 0 m g / k g の抗体をマ

50

ウスに注射後 1 1 日までに約 $2.1 \mu\text{g/mL}$ に減少した。

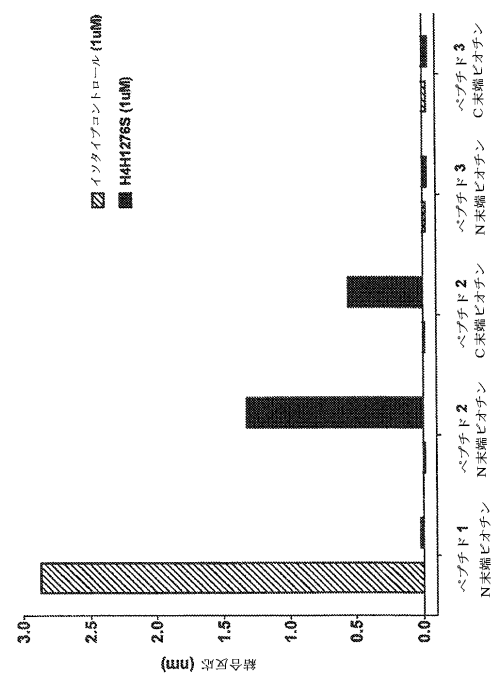
【0170】

本発明は、本明細書に記載の特定の実施態様によってその範囲が限定されるものではない。実際、本明細書に記載のものに加えて、本発明の種々の変更は、前述の明細書及び添付図面から当業者に明らかになるものである。そのような変更は添付の請求の範囲内に含まれる予定のものである。

【図1】

SEQ ID NO	ペプチド
1	EPKSRFAMLDV
2	EPKSRFAMLDV
3	EPKSRFAMLDV
4	EPKSRFAMLDV
5	EPKSRFAMLDV
6	EPKSRFAMLDV
7	EPKSRFAMLDV
8	EPKSRFAMLDV
9	EPKSRFAMLDV
10	EPKSRFAMLDV
11	EPKSRFAMLDV
12	EPKSRFAMLDV
13	EPKSRFAMLDV
14	EPKSRFAMLDV
15	EPKSRFAMLDV
16	EPKSRFAMLDV
17	EPKSRFAMLDV
18	EPKSRFAMLDV
19	EPKSRFAMLDV
20	EPKSRFAMLDV
21	EPKSRFAMLDV
22	EPKSRFAMLDV
23	EPKSRFAMLDV
24	EPKSRFAMLDV
25	EPKSRFAMLDV
26	EPKSRFAMLDV
27	EPKSRFAMLDV
28	EPKSRFAMLDV
29	EPKSRFAMLDV
30	EPKSRFAMLDV
31	EPKSRFAMLDV
32	EPKSRFAMLDV
33	EPKSRFAMLDV
34	EPKSRFAMLDV
35	EPKSRFAMLDV
36	EPKSRFAMLDV
37	EPKSRFAMLDV
38	EPKSRFAMLDV
39	EPKSRFAMLDV
40	EPKSRFAMLDV
41	EPKSRFAMLDV
42	EPKSRFAMLDV
43	EPKSRFAMLDV
44	EPKSRFAMLDV
45	EPKSRFAMLDV
46	EPKSRFAMLDV
47	EPKSRFAMLDV
48	EPKSRFAMLDV
49	EPKSRFAMLDV
50	EPKSRFAMLDV
51	EPKSRFAMLDV
52	EPKSRFAMLDV
53	EPKSRFAMLDV
54	EPKSRFAMLDV
55	EPKSRFAMLDV
56	EPKSRFAMLDV
57	EPKSRFAMLDV
58	EPKSRFAMLDV
59	EPKSRFAMLDV
60	EPKSRFAMLDV
61	EPKSRFAMLDV
62	EPKSRFAMLDV
63	EPKSRFAMLDV
64	EPKSRFAMLDV
65	EPKSRFAMLDV
66	EPKSRFAMLDV
67	EPKSRFAMLDV
68	EPKSRFAMLDV
69	EPKSRFAMLDV
70	EPKSRFAMLDV
71	EPKSRFAMLDV
72	EPKSRFAMLDV
73	EPKSRFAMLDV
74	EPKSRFAMLDV
75	EPKSRFAMLDV
76	EPKSRFAMLDV
77	EPKSRFAMLDV
78	EPKSRFAMLDV
79	EPKSRFAMLDV
80	EPKSRFAMLDV
81	EPKSRFAMLDV
82	EPKSRFAMLDV
83	EPKSRFAMLDV
84	EPKSRFAMLDV
85	EPKSRFAMLDV
86	EPKSRFAMLDV
87	EPKSRFAMLDV
88	EPKSRFAMLDV
89	EPKSRFAMLDV
90	EPKSRFAMLDV
91	EPKSRFAMLDV
92	EPKSRFAMLDV
93	EPKSRFAMLDV
94	EPKSRFAMLDV
95	EPKSRFAMLDV
96	EPKSRFAMLDV
97	EPKSRFAMLDV
98	EPKSRFAMLDV
99	EPKSRFAMLDV
100	EPKSRFAMLDV

【図2】



【配列表】

0006400471000001.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	3/06
A 6 1 P	9/00 (2006.01)	A 6 1 P	3/10
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/00
C 0 7 K	16/26 (2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 1 1
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 0 7 K	16/26
		C 1 2 P	21/08

(72)発明者 マーク・ダブル・スリーマン
オーストラリア連邦ビクトリア州3 1 4 1 .メルボルン .サウスヤラ .トゥーラックロードウエスト9 / 1 6 8

(72)発明者 ヴィクトリア・グサロヴァ
アメリカ合衆国ニューヨーク州1 0 5 7 0 .プレザントビル .スカイトップドライブ1 3 1

(72)発明者 アンドリュー・ジェイ・マーフィ
アメリカ合衆国ニューヨーク州1 0 5 2 0 .クロトン - オン - ハドソン .ニュートンコート1 0

合議体

審判長 大宅 郁治

審判官 中島 庸子

審判官 長井 啓子

(56)参考文献 特表2 0 1 0 - 5 1 2 3 2 0 (J P , A)
CORREIA , I . R . , m A b s , 2 0 1 0 年 , V o l . 2 , N o . 3 , p p 2 2 1 - 2 3 2

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
IPC C12N15/00-15/90