

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-513004  
(P2019-513004A)

(43) 公表日 令和1年5月23日(2019.5.23)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13 Z N A	4 B 0 6 4
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	4 B 0 6 5
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	4 H 0 4 5
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 73 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-540464 (P2018-540464)  
 (86) (22) 出願日 平成29年2月3日 (2017.2.3)  
 (85) 翻訳文提出日 平成30年10月1日 (2018.10.1)  
 (86) 国際出願番号 PCT/CA2017/050127  
 (87) 国際公開番号 WO2017/132772  
 (87) 国際公開日 平成29年8月10日 (2017.8.10)  
 (31) 優先権主張番号 62/290,776  
 (32) 優先日 平成28年2月3日 (2016.2.3)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 515265260  
 ザ ガバニング カウンシル オブ ザ  
 ユニバーシティ オブ トロント  
 カナダ国 エム5ジー 1エル5 オンタ  
 リオ, トロント, カレッジ ストリー  
 ト 100, パンティング インスティ  
 テュート, ルーム 413  
 (71) 出願人 500039463  
 ボード・オブ・リージエンツ, ザ・ユニバ  
 ーシテイ・オブ・テキサス・システム  
 アメリカ合衆国 テキサス 78701,  
 オースティン, ウェスト 7ティーエイチ  
 ストリート 210  
 (74) 代理人 100107342  
 弁理士 横田 修孝

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】  $\alpha$ Klotho に対する抗体およびELISA

(57) 【要約】

抗体および/またはその結合フラグメントであって、  
 軽鎖可変領域と重鎖可変領域を含み、前記軽鎖可変領域  
 が相補性決定領域 (CDR) CDR - L3を含んでなり  
 、前記重鎖可変領域がCDR - H1、CDR - H2およ  
 びCDR - H3を含んでなり、前記CDRのアミノ酸配  
 列が以下に示される配列：

CDR - L3：配列番号123、126~130、1  
 42、148もしくは149のいずれか1つから選択さ  
 れる；

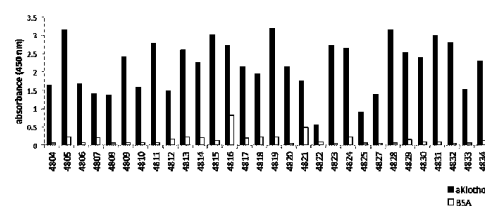
CDR - H1：配列番号121もしくは124；

CDR - H2：配列番号122もしくは125；およ  
 び/または

CDR - H3：配列番号196~226のいずれか1  
 つから選択される

のうち1以上を含んでなる、抗体および/またはその結  
 合フラグメント。

Fig. 10



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

抗体および/またはその結合フラグメントであって、軽鎖可変領域と重鎖可変領域を含んでなり、前記軽鎖可変領域が相補性決定領域(CDR) CDR-L3を含んでなり、前記重鎖可変領域がCDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3を含んでなり、前記CDRのアミノ酸配列が以下に示される配列：

CDR-L3：配列番号123、126～130、142、148もしくは149のいずれか1つから選択される；

CDR-H1：配列番号121もしくは124；

CDR-H2：配列番号122もしくは125；および/または

CDR-H3：配列番号196～226のいずれか1つから選択される、のうち1以上を含んでなる、抗体および/またはその結合フラグメント。

10

## 【請求項 2】

CDRが、場合により、以下に示されるような配列番号142～226から選択されるアミノ酸配列：

軽鎖可変領域：

CDR-L3：配列番号142～156のいずれか1つから選択される；

重鎖可変領域：

CDR-H1：配列番号157～174のいずれか1つから選択される；

CDR-H2：配列番号175～195のいずれか1つから選択される；および/または

20

CDR-H3：配列番号196～226のいずれか1つから選択されるを含んでなる、請求項1に記載の抗体および/またはその結合フラグメント。

## 【請求項 3】

軽鎖可変領域が、以下に示されるアミノ酸配列：

CDR-L1：配列番号140；および/または

CDR-L2：配列番号141

を含んでなるCDR-L1および/またはCDR-L2を含んでなる、請求項1または2に記載の抗体および/またはその結合フラグメント。

30

## 【請求項 4】

抗体および/またはその結合フラグメントが、モノクローナル抗体、免疫グロブリン分子、Fab、Fab'、F(ab)2、F(ab')2、Fv、ジスルフィド結合Fv、scFv、ジスルフィド結合scFv、一本鎖ドメイン抗体、scFab、ダイアボディ、ダイマー、ミニボディ、二重特異性抗体フラグメント、キメラ抗体、ヒト化抗体およびポリクローナル抗体からなる群から選択される、請求項1～3のいずれかに記載の抗体および/またはその結合フラグメント。

## 【請求項 5】

Klothoポリペプチドが、哺乳類 Klothoポリペプチドである、請求項1～4のいずれか一項に記載の抗体および/またはその結合フラグメント。

## 【請求項 6】

哺乳類 Klothoポリペプチドが、ヒト Klothoポリペプチドである、請求項5に記載の抗体および/またはその結合フラグメント。

40

## 【請求項 7】

哺乳動物 Klothoが、齧歯類 Klothoポリペプチドである、請求項5に記載の抗体および/またはその結合フラグメント。

## 【請求項 8】

齧歯類 Klothoポリペプチドが、マウス Klothoポリペプチドまたはラット Klothoポリペプチドである、請求項7に記載の抗体および/またはその結合フラグメント。

## 【請求項 9】

50

K l o t h oポリペプチドが、折り畳まれた K l o t h oポリペプチドおよび/または可溶性 K l o t h oポリペプチドである、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の抗体および/またはその結合フラグメント。

【請求項 10】

抗体および/またはその結合フラグメントが、尿、血漿、および/または血清中に見られる可溶性の折り畳まれた K l o t h oポリペプチドと結合する、請求項 9 に記載の抗体および/またはその結合フラグメント。

【請求項 11】

抗体および/またはその結合フラグメントが、折り畳まれた K l o t h oポリペプチドを含んでなる複合体と結合する、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の抗体および/またはその結合フラグメント。

10

【請求項 12】

折り畳まれた K l o t h oポリペプチドが、線維芽細胞増殖因子 ( F G F ) 受容体、場合により F G F R 1 c と複合体を形成する、請求項 11 に記載の抗体および/またはその結合フラグメント。

【請求項 13】

抗体および/または結合フラグメントが、検出可能なタグで標識される、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の抗体および/または結合フラグメントである。

【請求項 14】

検出可能なタグが、H i s タグ、H A タグ、G S T タグ、または F L A G タグである、請求項 13 に記載の抗体および/または結合フラグメント。

20

【請求項 15】

請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の抗体および/またはその結合フラグメントと K l o t h oポリペプチドとを含んでなり、場合により F G F R 1 c をさらに含んでなる、抗体複合体。

【請求項 16】

エピトープ A と結合する抗体をさらに含んでなる、請求項 15 に記載の抗体複合体。

【請求項 17】

軽鎖可変領域と重鎖可変領域を含んでなり、前記軽鎖可変領域が C D R - L 3 を含んでなり、前記重鎖可変領域が C D R - H 1、C D R - H 2 および C D R - H 3 を含んでなり、前記 C D R のアミノ酸配列が以下に示される配列：

30

C D R - L 3 : 配列番号 1 2 3、1 2 6 ~ 1 3 0、1 4 2、1 4 8 もしくは 1 4 9 のいずれか 1 つから選択される；

C D R - H 1 : 配列番号 1 2 1 もしくは 1 2 4 ；

C D R - H 2 : 配列番号 1 2 2 もしくは 1 2 5 ；および/または

C D R - H 3 : 配列番号 1 9 6 ~ 2 2 6 のいずれか 1 つから選択される、

のうち 1 以上を含んでなる抗体および/またはその結合フラグメントをコードする核酸。

【請求項 18】

配列番号 2 2 9 ~ 3 1 6 ；

(ここで、

40

C D R - L 3 : 配列番号 2 2 9 ~ 2 4 3 のいずれか 1 つから選択される；

C D R - H 1 : 配列番号 2 4 4 ~ 2 6 2 のいずれか 1 つから選択される；

C D R - H 2 : 配列番号 2 6 3 ~ 2 8 5 のいずれか 1 つから選択される；および/または

は

C D R - H 3 : 配列番号 2 8 6 ~ 3 1 6 のいずれか 1 つから選択される)

から選択される核酸配列を含んでなる、請求項 17 に記載の核酸。

【請求項 19】

前記軽鎖可変領域が、以下に示される核酸配列：

C D R - L 1 : 配列番号 2 2 7 および/または

C D R - L 2 : 配列番号 2 2 8

50

を含んでなる C D R - L 1 および / または C D R - L 2 を含んでなる、請求項 17 または 18 に記載の核酸。

【請求項 20】

請求項 17 ~ 19 のいずれか 1 つの核酸を含んでなるベクター。

【請求項 21】

請求項 17 ~ 19 のいずれか一項に記載の核酸または請求項 20 に記載のベクターを含んでなる、請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の抗体および / またはその結合フラグメントを生産する組換え細胞。

【請求項 22】

請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の抗体および / もしくはその結合フラグメント、請求項 17 ~ 19 のいずれか一項に記載の核酸、請求項 20 に記載のベクター、または請求項 21 に記載の組換え細胞を含んでなる、組成物。

10

【請求項 23】

抗体および / またはその結合フラグメントを生産する方法であって、  
工程が

a . 宿主細胞内で請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の抗体および / またはその結合フラグメントのアミノ酸配列をコードする核酸を発現させること ;

b . 前記宿主細胞を培養して抗体および / またはその結合フラグメントを生産すること ; ならびに

c . 前記宿主細胞から抗体および / またはその結合フラグメントを単離および精製すること

20

を含んでなる、方法。

【請求項 24】

前記核酸が、配列番号 229 ~ 316 :

C D R - L 3 : 配列番号 229 ~ 243 ;

C D R - H 1 : 配列番号 244 ~ 262 ;

C D R - H 2 : 配列番号 263 ~ 285 ; および / または

C D R - H 3 : 配列番号 286 ~ 316

から選択される核酸配列を含んでなる、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の抗体および / またはその結合フラグメントを含んでなる、イムノアッセイ。

30

【請求項 26】

イムノアッセイが、酵素結合免疫吸着アッセイ ( E L I S A ) である、請求項 25 に記載のイムノアッセイ。

【請求項 27】

E L I S A が、捕捉抗体および検出抗体を含んでなるサンドイッチ E L I S A であり、前記捕捉抗体および / または検出抗体が請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の抗体および / またはその結合フラグメントである、請求項 26 に記載のイムノアッセイ。

【請求項 28】

前記捕捉抗体および検出抗体が、請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の抗体および / またはその結合フラグメント、ならびにそれぞれ配列番号 11 および 12 のアミノ酸配列を含んでなる軽鎖および重鎖可変領域を有する抗体から選択される、請求項 27 に記載のイムノアッセイ。

40

【請求項 29】

前記捕捉および検出抗体の一方が、請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の抗体および / またはその結合フラグメントであり、かつ、前記捕捉および検出抗体の他方が、それぞれ配列番号 11 および 12 のアミノ酸配列を含んでなる軽鎖および重鎖可変領域を有する抗体である、請求項 27 または 28 に記載のイムノアッセイ。

【請求項 30】

50

イムノアッセイを作製する方法が、

- a . 固相支持体を捕捉抗体でコーティングすること；
  - b . 前記捕捉抗体をサンプルと、捕捉抗体： K l o t h o 複合体を形成する条件下で接触させること；
  - c . 結合していないサンプルを除去すること；
  - d . 捕捉抗体： K l o t h o 複合体を検出抗体と接触させること；
  - e . 結合していない検出抗体を除去すること；および
  - f . 前記捕捉抗体： K l o t h o 複合体を検出および/または測定すること
- を含んでなる、サンプル中の K l o t h o ポリペプチドを検出および/または測定するための、請求項 27 ~ 29 のいずれか一項に記載のイムノアッセイ。

10

【請求項 31】

E L I S A が、競合的 E L I S A である、請求項 26 に記載のイムノアッセイ。

【請求項 32】

サンプル中の K l o t h o ポリペプチドのレベルを検出および/または測定する方法であって、

- a . サンプルを請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の抗体および/またはその結合フラグメントと、抗体： K l o t h o 複合体を形成する条件下で接触させること；および
  - b . 抗体： K l o t h o 複合体を検出および/または測定すること
- を含んでなる、方法。

20

【請求項 33】

可溶性 K l o t h o を検出および/または測定するアッセイであって、方法が、

- a . 体液であるサンプルを請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の抗体および/またはその結合フラグメントと、抗体：可溶性 K l o t h o 複合体を形成する条件下で接触させること；ならびに
  - b . 前記抗体：可溶性 K l o t h o 複合体を検出および/または測定すること
- を含んでなる、アッセイ。

【請求項 34】

抗体： K l o t h o 複合体が、免疫沈降、イムノプロット、免疫組織化学、免疫細胞化学および蛍光活性化細胞選別 ( F A C S ) により検出される、請求項 32 または 33 に記載のアッセイ。

30

【請求項 35】

対象において慢性腎臓病 ( C K D ) および急性腎障害 ( A K I ) から選択される腎臓病態を診断または検出するスクリーニング方法であって、

- a . 対象由来のサンプル中の K l o t h o のレベルを、場合により、請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の抗体もしくはそのフラグメントを用いて、または請求項 25 ~ 34 のいずれか一項に記載のアッセイを用いて測定すること；ならびに
  - b . 前記サンプル中の K l o t h o のレベルを対照と比較すること
- を含んでなり、

対照と比較した前記サンプル中の K l o t h o のレベルの低下が、前記対象が C K D または A K I から選択される腎臓病態を有することを示す、方法。

40

【請求項 36】

前記 C K D が、早期 C K D、場合により、病期 1 または病期 2、または病期 3、病期 4、病期 5 または病期 6 である、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

前記サンプルが、新鮮組織サンプル、冷凍サンプルおよび軽度固定サンプルなどの固定サンプルから選択される、請求項 35 または 36 に記載の方法。

【請求項 38】

K l o t h o のレベルが、免疫沈降により決定される、請求項 35 ~ 37 のいずれか一項に記載の方法。

50

## 【請求項 39】

A K I 後の回復の予後を診断する方法であって、

a . 対象由来のサンプル中の K l o t h o のレベルを、場合により、請求項 1 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の抗体もしくはそのフラグメントを用いて、または請求項 2 5 ~ 3 4 のいずれか一項に記載のアッセイを用いて測定すること；ならびに

b . 前記サンプル中の K l o t h o のレベルを対照と比較すること  
を含んでなり、

対照と比較した前記サンプル中の K l o t h o のレベルの上昇が、前記対象の A K I 後の回復の見込みがより高いことを示す、方法。

## 【請求項 40】

10

A K I 後の長期合併症の予後を診断する方法であって、

a . 対象由来のサンプル中の K l o t h o のレベルを、場合により、請求項 1 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の抗体もしくはそのフラグメントを用いて、または請求項 2 5 ~ 3 4 のいずれか一項に記載のアッセイを用いて測定すること；ならびに

b . 前記サンプル中の K l o t h o のレベルを対照と比較すること  
を含んでなり、

対照と比較した前記サンプル中の K l o t h o のレベルの上昇が、前記対象の A K I 後の長期合併症が少ない見込みがより高いことを示す、方法。

## 【請求項 41】

20

C K D の進行速度の予後を診断する方法であって、

a . 対象由来のサンプル中の K l o t h o のレベルを、場合により、請求項 1 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の抗体もしくはそのフラグメントを用いて、または請求項 2 5 ~ 3 4 のいずれか一項に記載のアッセイを用いて測定すること；ならびに

b . 前記サンプル中の K l o t h o のレベルを対照と比較すること  
を含んでなり、

対照と比較した前記サンプル中の K l o t h o のレベルの上昇が、前記対象の C K D の進行速度がより遅い見込みがより高いことを示す、方法。

## 【請求項 42】

C K D における腎外合併症の予後を診断する方法であって、

a . 対象由来のサンプル中の K l o t h o のレベルを、場合により、請求項 1 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の抗体もしくはそのフラグメントを用いて、または請求項 2 5 ~ 3 4 のいずれか一項に記載のアッセイを用いて測定すること；ならびに

b . 前記サンプル中の K l o t h o のレベルを対照と比較すること  
を含んでなり、

対照と比較した前記サンプル中の K l o t h o のレベルの上昇が、前記対象の C K D 関連の腎外合併症が少ない見込みがより高いことを示す、方法。

## 【請求項 43】

40

請求項 1 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の抗体および/またはその結合フラグメント、参照薬剤ならびに場合によりその使用説明書を含んでなる、キット。

## 【請求項 44】

それぞれ配列番号 1 1 および 1 2 のアミノ酸配列を含んでなる軽鎖および重鎖可変領域を有する抗体および/または結合フラグメントをさらに含んでなる、請求項 4 3 に記載のキット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【関連出願の相互参照】

## 【0001】

本出願は、2016年2月3日に出願された米国仮特許出願第62/290,776号の優先権に基づき35U.S.C. § 119の利益を主張する特許協力条約出願であり、引用することによりその全内容が本明細書の一部とされる。

## 【0002】

50

本発明は、一部にNIH許可第R01DK091392号、第R01DK092461号および第R01DE13686号として米国政府の支援を受けてなされたものである。米国政府は本発明において所定の権利を有し得る。

【技術分野】

【0003】

本開示は、折り畳まれた形態の Klotho に特異的な抗体、ならびに Klotho を検出する方法およびアッセイ、例えば、酵素結合免疫吸着アッセイに関する。

【背景技術】

【0004】

klotho 遺伝子は、最初に早期老化の抑制因子として同定された [1、2 に総説]。Klotho は、主として腎臓、副甲状腺、および脈絡膜叢で発現する 1 回膜貫通タンパク質である [1、3、4]。Klotho および Klotho [5、6] と呼ばれる機能および発現プロファイルが異なるパラログスタンパク質も知られている。

10

【0005】

Klotho は、イオン輸送、Wnt およびインスリンシグナル伝達、レニン-アンジオテンシン系、幹細胞の動員、抗発癌、抗線維症、ならびに抗酸化の調節を含む多様な作用を有する。Klotho の最も高い発現レベルは腎臓におけるものである [1、7、8]。線維芽細胞増殖因子 (FGF) 23 の共受容体であるその膜貫通型 [9~11] に加え、Klotho はまた、転写産物の末端切断型ペプチドへのスプライシング [2] またはセクレターゼによるタンパク質分解放出 [14、15] によって生成される内分泌物質 [7、12、13] として循環、尿、および脳脊髄液中にも放出される。循環 Klotho の実質的部分は腎起源である [16]。遺伝的な Klotho 除去と慢性腎臓病 (CKD) の間の表現型の類似は、Klotho 腎発現の低下が病原であるという概念を裏付ける [1、16]。

20

【0006】

腎臓の Klotho 転写産物またはタンパク質レベル [12、18~24] および血清 Klotho 濃度 [12、20] の低下は、ネフロン縮小手術、虚血性再灌流傷害、免疫複合体系球体腎炎、多遺伝子性またはホルモン性高血圧症、代謝症候群、および糖尿病からの齧歯類 CKD で証明されている [12、18~24]。この収束は、Klotho 欠乏がネフロン喪失の遺伝的帰結であり得ることを示唆する。Klotho の低下は、CKD およびまた CKD 合併症の予後の高感度かつ早期のバイオマーカーである可能性がある [22]。齧歯類での実験的 CKD における Klotho の回復は、腎臓病および腎外合併症を改善する [12、22、23]。Klotho 欠乏はまた、齧歯類およびヒトの両方で急性腎障害 (AKI) においても報告されている [25]。Klotho は、AKI の現在知られているバイオマーカーの変化よりもずっと早期に低下するので、AKI の早期バイオマーカーとして役立つ可能性がある [26]。

30

【0007】

Klotho は、FGF 23 に対する選択的親和性を付与するために FGF 受容体 (FGFR) と構成的二元複合体を形成する [10、27]。Klotho 発現の欠損は、マウス [1、28] およびヒト [29] において FGF 23 耐性およびリン酸塩の保持をもたらす。よって、Klotho および FGF 23 は、リン酸代謝を調節する骨-腎内分泌軸の必須成分として浮上した [30、31]。

40

【0008】

膜係留型の Klotho の細胞外ドメインは、可溶性タンパク質として分泌され得る。可溶型は膜係留型から膜係留プロテアーゼによって生成され、血液および尿中に放出される [13、15]。上記のように、膜係留型 Klotho は FGF 23 受容体複合体の一部として機能するが、分泌型 Klotho は、遠隔器官に作用を発揮して上述のように極めて多面発現的な作用 (イオン輸送、Wnt およびインスリンシグナル伝達、レニン-アンジオテンシン系、幹細胞の動員、抗発癌、抗線維症、および抗酸化の調節) を発揮する内分泌因子として働く [7]。

50

## 【0009】

腎傷害と腎機能の低下を特徴とする進行性CKD（病期4～5）は人口の7%を超える推定260万人のカナダ人を侵している。国家人口動態統計報告書、国民健康栄養調査および米国腎臓データシステムの最近の分析では、白人男性、白人女性、黒人男性、および黒人女性の寿命リスクがそれぞれCKD病期3a+、53.6%、64.9%、51.8%、および63.6%が示された[84]。CKDおよびその関連合併症の人々の生活および医療制度への影響および負担は重大で、今後数年で悪化するであろう[32～34]。CKDを治療するための現行のアプローチには、食餌および投薬による、また腎不全（end stage renal disease: ESRD）の場合には透析および臓器移植によるリスク因子の改善が含まれる。合併症が生じる前に早期段階でCKDの進行を停止または遅延させるためのさらなる療法の差し迫った必要がある。CKDの合併症の大多数は、ミネラル代謝の障害に結びつけられている慢性腎臓病に伴う骨ミネラル代謝異常(CKD-mineral bone disturbance: CKD-MBD)の実体を伴っている。リン酸塩の保持はCKD患者において普遍的に見られ、不良な転帰に関連している[35、36]。高ホスファターゼ血症は通常、疾患が末期への進行に運命付けられる場合の進行ステージのCKDでのみ検出される[37]。最近、腎臓のKlotho発現の低下がCKDにおける最も初期のイベントの1つであることが発見された[12]。

10

## 【0010】

現在、市場で入手可能なKlotho抗体および診断キットがいくつかあるが、既存のKlotho抗体は十分な特異性がなく、ヒト血清からKlothoを免疫沈降させるには効率的でなく、Klothoに関する現行の免疫に基づくアッセイはコストが高く、感度および特異性が十分でない。

20

## 【0011】

末期腎臓の腎摘サンプルからのヒト腎臓およびCKD患者からの生検においてKlotho転写産物およびタンパク質の低いレベルが記載されている[21、38]。免疫に基づくアッセイを用いた研究では、血清Klotho濃度の絶対値（異なる研究室からのレベルでは100倍の範囲）および変CKDおよび年齢による化の方向（上昇、低下、または変化なし）に関して広く異なる結果が示された[21、39～60]。矛盾したデータベースは進行を妨げ、有望な齧歯類でのデータが有意なヒト適用に変換され得るかどうかを決定する能力を無効にした。CKDに加えて、多様な原因からの急性腎障害(AKI)もまた齧歯類の腎臓および血清、ならびにヒトの尿[25]中のKlothoの急速な低下に関連している[25、61～65]。現在のところ、AKIにおけるヒト血清Klothoに関するデータは無い。ヒトにおける腎損傷の早期、高感度および/または特異的マーカーの必要がある[66]。

30

## 【0012】

保存されているタンパク質に対する抗体の作製は、抗体生成のための動物免疫誘導法が自己免疫から保護する機構を受けるので困難である。合成抗体技術は、定義されたイン・ビトロ(in vitro)条件下で適用され、自己反応性抗体を除去する免疫寛容選択を受けていない抗体ライブラリーを使用し、かつ、高い親和性および特異性を有する抗体を生じることが証明されているので有力な代替法を提供する[67～71]。最適化された抗体フレームワーク内で、コンビナトリアル突然変異誘発により相補性決定領域(CDR)に配列多様性が導入される。これらのライブラリーをファージディスプレイと組み合わせる。各ファージ粒子は、内部にコードDNAを保持しつつその表面にユニークな抗原結合フラグメント(Fab)を提示し、従って、表現型-遺伝子型の直接的関連が得られる。対象抗原と結合するFab提示ファージは、固相支持体上での精製抗原との結合選択を用いて濃縮される。結合ファージクローンのCDRはDNAシーケンシングによって同定され、細菌からFabタンパク質が精製されるか、または哺乳動物細胞内で全長IgGに変換される。

40

## 【0013】

Barker et al. 2015 [86]は、合成ヒトFabファージディスプレイ

50

レーライブラリーの複数回のバイオパンニングの後に単離された、K l o t h o と特異的結合親和性を有する抗体 s b 1 0 6 を記載している。この s b 1 0 6 抗体は一桁ナノモル範囲で K l o t h o と結合親和性を有し、下記の C D R 配列を含んでなる ( I M G T C D R 残基に下線が施され、I M G T フレームワーク領域残基には下線が施されず、選択ライブラリーにおいて無作為化された I M G T 位の残基は太字で示される) : Q S V S S A ( C D R - L 1 )、S A S ( C D R - L 2 )、Q Q A G Y S P I T ( C D R - L 3 )、G F N I S Y Y S I ( C D R - H 1 )、Y I S P S Y G Y T S ( C D R - H 2 ) および A R Y Y V Y A S H G W A G Y G M D Y ( C D R - H 3 )。

【 0 0 1 4 】

s b 1 0 6 とは異なるエピトープに結合するさらなる K l o t h o 特異的抗体も記載される。 10

【 発明の概要 】

【 0 0 1 5 】

本開示は、軽鎖可変領域と重鎖可変領域を含んでなり、前記軽鎖可変領域が相補性決定領域 ( C D R ) C D R - L 3 を含んでなり、前記重鎖可変領域が C D R - H 1、C D R - H 2 および C D R - H 3 を含んでなり、前記 C D R のアミノ酸配列が以下に示される配列 :

C D R - L 3 : 配列番号 1 2 3、1 2 6 ~ 1 3 0、1 4 2、1 4 8 もしくは 1 4 9 のいずれか 1 つから選択される ;

C D R - H 1 : 配列番号 1 2 1 もしくは 1 2 4 ; 20

C D R - H 2 : 配列番号 1 2 2 もしくは 1 2 5 ; および / または

C D R - H 3 : 配列番号 1 9 6 ~ 2 2 6 のいずれか 1 つから選択されるのうち 1 以上を含んでなる抗体および / またはその結合フラグメントに関する。

【 0 0 1 6 】

別の態様では、本抗体および / またはその結合フラグメントは、場合により、以下に示されるような配列番号 1 4 2 ~ 2 2 6 から選択されるアミノ酸配列 :

軽鎖可変領域 :

C D R - L 3 : 配列番号 1 4 2 ~ 1 5 6 のいずれか 1 つから選択される ;

重鎖可変領域 :

C D R - H 1 : 配列番号 1 5 7 ~ 1 7 4 のいずれか 1 つから選択される ; 30

C D R - H 2 : 配列番号 1 7 5 ~ 1 9 5 のいずれか 1 つから選択される ; および / または

C D R - H 3 : 配列番号 1 9 6 ~ 2 2 6 のいずれか 1 つから選択されるを含んでなる。

【 0 0 1 7 】

さらなる態様では、本抗体および / またはその結合フラグメントは、それぞれ配列番号 1 4 0 および配列番号 1 4 1 のアミノ酸配列を有する C D R - L 1 および / または C D R - L 2 を含んでなる軽鎖可変領域を含んでなる。

【 0 0 1 8 】

1 つの態様では、本抗体により特異的に結合される K l o t h o ポリペプチドは、折り畳まれた K l o t h o ポリペプチドである。 40

【 0 0 1 9 】

別の側面は、本明細書に記載の抗体および / またはその結合フラグメントをコードする核酸を含む。

【 0 0 2 0 】

さらなる側面は、本明細書に記載の核酸を含んでなるベクターである。

【 0 0 2 1 】

別の側面は、本明細書に記載の抗体および / またはその結合フラグメント、核酸またはベクターを生産する組換え細胞を含む。

【 0 0 2 2 】

別の側面は、1以上の本明細書に記載の抗体および/またはその結合フラグメントを含んでなるまたは用いるイムノアッセイである。

【0023】

1つの態様において、イムノアッセイは酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)である。

【0024】

他の側面は、抗体および/またはその結合フラグメントを生産する方法、サンプル中のKlothoポリペプチドのレベルを測定するアッセイ、可溶性Klothoポリペプチドを検出および/または測定するアッセイ、ならびに対象において慢性腎臓病(CKD)および急性腎障害(AKI)から選択される腎臓病態を診断または検出するスクリーニング方法、および疾患の進行および/または回復の予後を診断する方法を含む。

10

【0025】

本開示の他の特徴および利点は下記の詳細な説明から明らかとなる。しかしながら、この詳細な説明から当業者には本開示の趣旨および範囲の中で様々な変更および修正が明らかとなるので、詳細な説明および具体例は本開示の好ましい態様を示しつつ、単に例示として示されるに過ぎないと理解されるべきである。

【0026】

以下、本開示の態様を図面に関して説明する。

【図面の簡単な説明】

【0027】

20

【図1】図1は、sb106の配列、特異性および親和性を示す。(A)IMGT(国際Immunogeneticsデータベース)ナンバリング法による、抗Klotho sb106のライブラリーFにおける可変のCDR配列およびVHドメインフレームワーク領域残基。IMGT CDR残基に下線が施され、IMGTフレームワーク領域残基には下線が施されず、選択ライブラリーで無作為化を受けたIMGT位の残基は太字である。(B)Fab-ファージELISAによる抗Klotho sb106の特異性の決定: sb106 Fab-ファージを下記の固定化抗原とともにインキュベートした: FGFR1c/Klotho複合体(aKL-R1)、FGFR1c単独(R1)、ヒトKlotho(Hu aKL)およびマウスKlotho(Mu aKL)、または陰性対照としてのニュートラアビジン(NA)およびウシ血清アルブミン(BSA)。結合していないファージを洗い流した後、結合したファージを、HRPコンジュゲート抗ファージ抗体を用いて検出した。比色定量HRP試薬は450nmで吸光度測定を可能とする。(C)競合Fab-ファージELISAによる親和性の評価。sb106 Fab-ファージは、50、5、0.5、0.05、0.005および0.0005nM可溶性ヒトKlothoとともにプレインキュベートした。報告された固定化ヒトKlothoに対する結合シグナルは、2つのデータセットの平均である。固定化Klothoに対する結合の減少は可溶性Klothoと結合した画分を示し、よって、可溶性Klotho濃度が相互作用の $K_D$ にほぼ等しい時にシグナルの50%低下が起こる。

30

【図2】図2は、イムノプロット、免疫組織化学および免疫細胞化学によるsb106-Fabの特性評価を示す。(A)野生型マウス(WT)、同型接合Klotho低次形態マウス(kl/kl)およびトランスジェニックKlotho過剰発現マウス(Tg-Kl)由来の腎溶解液の、モノクローナル抗体KM2076またはsb106-Fabを用いたイムノプロット。GAPDH:グリセルアルデヒドリン酸デヒドロゲナーゼ。(B)正常ラット腎(NRK)細胞、ヒト胎児腎(HEK)細胞、およびKlothoの過剰発現用のプラスミドでトランスフェクトされたHEK細胞由来の溶解液の、モノクローナル抗体KM2076またはsb106-Fabを用いたイムノプロット。(C) -アクチンまたはsb106-IgGに関してファロイジンでプローブした新鮮または固定ラット副甲状腺組織。(D)ベクター対照、またはKlothoもしくはKlothoの過剰発現用のベクターでトランスフェクトされたHEK293T細胞のsb106免疫染色。代表的な細胞を示す。DAPI核染色は「N」と表示する。(スケールバー、1

40

50

0  $\mu\text{m}$ )。Fab sb106によるKlotho染色は、Klothoでトランスフェクトされた細胞にのみ見られ、Klothoでトランスフェクトされた細胞には見られなかった。

【図3】図3は、免疫沈降によるsb106-Fabの特性評価を示す。(A)HEK293細胞をエンブティーベクターまたは種々の量の( $\mu\text{g}$ /ディッシュ)、膜貫通全長Klotho(TM-Klotho)もしくはC末端FLAGエピトープを有するKlothoの可溶性細胞外ドメイン(s-Klotho-FLAG)の発現用のベクターでトランスフェクトした。細胞溶解液または細胞培養培地をsb106-Fabまたは抗FLAGMAbのいずれかで免疫沈降(IP)させた。免疫複合体をSDS-PAGEにより分解し、モノクローナル抗Klotho抗体KM2076でイムノブロットを行った(IB)。(B)ラット、マウス、またはヒトの尿をsb106-Fabで免疫沈降させ、SDS-PAGEによって分解し、KM2076でイムノブロットを行った(IB)(左の3つのレーン)。サイズを選択した尿(100kDカットオフ)に対して直接SDS-PAGEを行い、イムノブロットを行った(右の3つのレーン)。(C)血清からの内因性Klothoの免疫沈降。野生型(WT)マウス、klotho<sup>-/-</sup>マウス、正常ヒト、および透析患者(ESRD)由来の血清サンプルをsb106-Fabとともに4℃で一晩インキュベートした。次に、抗FLAG抗体とコンジュゲートしたセファロースビーズを加え、2時間4℃でインキュベートした。これらのビーズを洗浄し、結合したタンパク質を2xSDSサンプルローディングバッファーで溶出した。イムノブロットは、KM2076、次いで、可視化のための標準抗ラットIgG二次抗体で行った。

【図4】図4は、組換えKlothoを添加したヒト血清を用いたIP-IBアッセイのパリデーションを示す。(A)既知量の可溶性ヒトKlothoエクストドメインを健常ボランティアまたは無腎透析患者(CKD患者)由来の血清に加えた。IP-IBアッセイを用いて血清中のKlothoを測定した。(B)プロテアーゼ阻害剤(AEBSEF 0.1mM、アプロチニン0.3 $\mu\text{M}$ 、ベスタチン10 $\mu\text{M}$ 、E-64 1 $\mu\text{M}$ 、ロイペプチン50 $\mu\text{M}$ 、ペプスタチンA 1 $\mu\text{M}$ )を含む、またはIPから除いた場合で比較を行ったこと以外は(A)と同様の実験。(C)IP-IBにより決定されたKlothoレベル(y軸)を、上記の4つの条件で添加した組換えKlotho(x軸)に対してプロットした。ゼロ添加への延長により、プロテアーゼ阻害剤で処理した血清中の内因性Klothoのレベルが示される。結果が識別不能であった場合には、プロテアーゼ阻害剤を含むまたは含まない健常血清に関して直線が1つだけ示される。

【図5】図5は、慢性腎臓病を有するヒトの血清KlothoのIP-IBアッセイを示す。(A)正常な健常ボランティアおよび従来 of 数字による病期分類を用いたCKD診断所および透析ユニットからの患者由来のヒト血清において、検量線として組換えKlothoを用い、IP-IBアッセイによってKlothoを測定した。バーおよびエラーバーは平均および標準偏差を表す。データはANOVA、次いで、ペアワイズ多重比較のためのスチューデント-ニューマン-コイル検定によって分析した。間で統計的有意性に達したP値を括弧の上に示す。各群の対象の数は一番下に示す。(B)多様なヒト血清中のKlothoの濃度は、同じサンプルでのIP-IB(x軸)または市販のELISA(y軸)により測定した。点線は同一を表す。灰色の菱形は、1回以上の冷凍-解凍サイクルを経た血清(保存)を表し、黒い菱形は、1回だけ解凍した血清(新鮮)を表す。(C)ヒト対象由来の血清をIP-IBおよびELISAによりアッセイした。同じ血清に対して示された回数の反復冷凍-解凍を行った後にアッセイした。各サンプルの結果は、1回だけ解凍した同じサンプルからの測定値に対するパーセンテージとして表した。黒い線は異なる対象の平均を表す。

【図6】図6は、ヒト尿Klothoレベルを示す。健常ボランティアまたは慢性腎臓病病期5(CKD5)を有する患者の尿でKlothoを測定した。(A)定常状態条件下で各群4名の対象を用いた、組換えマウスKlotho(rMK1)を較正として用いる代表的IP-IBアッセイ。IP-IBには等量の尿クレアチニンを使用した。(B)IP-IBアッセイおよび市販のELISAからのデータの概要。バーおよびエラー

10

20

30

40

50

バーは、各群 8 名の対象からの平均および標準偏差を表す。健常ボランティアの平均を 100% の参照とした。

【図 7】図 7 は、s b 1 0 6 - F a b を用いた場合の表面プラズモン共鳴 ( S P R ) センサーグラムを示す。( A ) s b 1 0 6 - F a b ( F s b 1 0 6 ) と K l o t h o - F G F R 1 c 複合体との結合を示す S P R センサーグラム。マウス K l o t h o エクトドメインとヒト F G F R 1 c リガンド結合ドメインの二元複合体をバイオセンサーチップに固定化し、100 nM の F s b 1 0 6 をそのチップ上に注入した。F s b 1 0 6 は K l o t h o - F G F R 1 c 複合体から極めてゆっくり脱離することに留意されたい。( B ) s b 1 0 6 - F a b が F G F 2 3、K l o t h o、および F G F R 1 c 間の三元合体の形成を阻害しないことを示す S P R センサーグラムの重畳。10 nM の K l o t h o - F G F R 1 c 複合体単独および 10 nM の K l o t h o - F G F R 1 c 複合体と 100 nM の F s b 1 0 6 の混合物を、固定化 F G F 2 3 を含有するバイオセンサーチップ上に注入した。

10

【図 8】図 8 は、s b 1 0 6 のアミノ酸配列の模式図である。( A ) s b 1 0 6 の軽鎖配列 ( 配列番号 1 1 )。( B ) 重鎖配列 - F a b ( 配列番号 1 2 )。( C ) 重鎖配列 - I g G 1 ( 配列番号 1 3 )。( D ) 重鎖配列 - I g G 4 ( 配列番号 1 4 )。I M G T C D R 残基に下線が施され、I M G T フレームワーク領域残基には下線が施されず、選択ライブラリーで無作為化を受けた I M G T 位の残基は太字の大きめの書体であり、斜体のアミノ酸は定常ドメインである。

【図 9】図 9 は、s b 1 0 6 F a b の不在下または存在下での F a b フェージクローンと K l o t h o の結合を示す、F a b フェージ E L I S A の吸光度値を示すグラフである。F a b フェージクローンを s b 1 0 6 F a b ( 2 5 u g / m l )、または陰性対照としてのニュートラアビジン ( N A ) の不在下または存在下で固定化 K l o t h o とともにインキュベートした。結合していないフェージを洗い流した後、結合したフェージを、H R P コンジュゲート抗フェージ抗体を用いて検出した。比色定量 H R P 試薬は 4 5 0 n m での吸光度測定を可能とする。

20

【図 10】図 10 は、付加的 K l o t h o 抗体を用いた F a b E L I S A の吸光度値を示すグラフである。精製した F a b [ 5 u g / m l ] を固定化 K l o t h o ( 1 g / m l ) または陰性対照としてのウシ血清アルブミン ( B S A ) とともにインキュベートした。結合していない F a b を洗い流した後、結合した F a b を、R P コンジュゲート抗 F l a g 抗体 ( F a b は軽鎖上に F l a g タグを有する ) を用いて検出した。比色定量 H R P 試薬は 4 5 0 n m での吸光度測定を可能とする。

30

【図 11】図 11 は、さらなる K l o t h o 抗体のエピトープ分類試験の一連のグラフである。K l o t h o 抗原をプレートにコーティングし、ブロッキングした後、10 u g / m l の F a b ( x 軸に示す通り ) とともに 1 時間インキュベートした。結合していない F a b を洗浄した後、F a b の結合した抗原を 2 0 分間 F a b - フェージ ( 各グラフの上に示す ) に曝す。結合していないフェージを洗い流した後、結合したフェージを、H R P コンジュゲート抗フェージ抗体を用いて検出した。比色定量 H R P 試薬は 4 5 0 n m での吸光度測定を可能とする。F a b は、干渉無しの対照、参照シグナルであり、B S A シグナルはバックグラウンド対照である。

40

【図 12】図 12 は、K l o t h o F a b を用いて表面プラズモン共鳴により測定した親和性推定値の一連のグラフである。F a b は、捕捉のための抗 H + L I g G を用いて固定化した。K l o t h o 注入液は、毎回 2 倍希釈で 3 回連続希釈した ; 5 0 u g / m l ( 最高曲線 ) を出発濃度とし、6 . 2 5 u g / m l ( 最低曲線 ) を終濃度とした。曲線はラングミュアモデルに当てはめる。

【図 13】図 13 は、同定された F a b を用いた K l o t h o の免疫沈降を示す一連のイムノプロットである。

【図 14】図 14 は、K l o t h o の 3 つの異なるエピトープを呈する I g G を用いた捕捉 E L I S A の吸光度値を示すグラフである。

【図 15】図 15 は、K l o t h o の 3 つの異なるエピトープを呈する I g G を用いた

50

サンドイッチELISAの吸光度値を示すグラフである。

【図16】図16は、ヒトおよびマウスの両 K l o t h oを用いたF a b E L I S Aの吸光度値を示すグラフである。

【図17】図17は、K l o t h o F a bを選択するためのヒトおよびマウス抗原に対する表面プラズモン共鳴により測定された親和性推定値の一連のグラフである。F a bは抗I g G ( H + L )抗体を用いて捕捉させ、K l o t h oの希釈系を注入した。結合曲線はラングミュアモデルに当てはめた。図17 ( A )は、決定された $K_{on}$ 、 $K_{off}$ および $K_D$ 値を示す。図17 ( B )および ( C )は、それぞれヒトおよびマウス抗原に関する結合曲線を示す。

【発明の具体的説明】

【0028】

I. 定義

本明細書で使用する場合、用語「K l o t h o」または「アルファK l o t h o」は、全長 K l o t h oタンパク質、エクドメインフラグメントなどのそのフラグメントを含むあらゆる既知の天然 K l o t h o分子、ならびに使用するコンテキストから決定可能なように前記タンパク質およびフラグメントをコードする核酸を意味する。可溶性の

K l o t h o (血液またはその画分、尿または脳脊髄液などの体液中に存在し、かつ約130kDaの分子量を有する場合には、「可溶性 K l o t h o」と呼称される、タンパク質切断型ならびに選択的スプライシング型の K l o t h o)ならびに膜係留型の K l o t h oが含まれ、限定されるものではないが、ヒト K l o t h o、または例えばマウスおよびラット K l o t h oを含む齧歯類 K l o t h oといった哺乳動物 K l o t h oが含まれる。

【0029】

用語「急性腎障害」または「AKI」は、本明細書で使用する場合、例えば、尿素および血中の他の化学物質の蓄積をもたらす得、例えば発作の7日以内に発症する、急性の、また持続的な腎機能の損失を意味する。AKIは、骨格筋に対する圧挫損傷などの損傷および投薬により引き起こされ得る。AKIは、リスク(糸球体濾過速度(GFR)の25%の低下)、損傷(GFRの50%の低下)、不全(GFRの75%の低下)、喪失(4週間を超える腎機能の完全な喪失)および腎不全(3か月を超える腎機能の完全な喪失)まで異なる病期に分類される。AKIは無症候性であり得る。

【0030】

用語「早期急性腎障害」は、本明細書で使用する場合、血清クレアチニンの上昇前を意味する。

【0031】

用語「アミノ酸」は、天然アミノ酸ならびに修飾アミノ酸の総てを含む。

【0032】

用語「抗体」は、本明細書で使用する場合、ヒト抗体、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、一本鎖抗体および他のキメラ抗体を含むことが意図される。抗体は、組換え源由来であっても、および/またはトランスジェニック動物で生産されてもよい。1つの態様の抗体は、重鎖相補性決定領域1、重鎖相補性決定領域2および重鎖相補性決定領域3を含んでなる重鎖可変領域または重鎖、ならびに軽鎖相補性決定領域1、軽鎖相補性決定領域2および軽鎖相補性決定領域3を含んでなる軽鎖可変領域または軽鎖を含んでなる。

【0033】

用語「結合フラグメント」は、本明細書で使用する場合、限定されるものではないが、F a b、F a b'、F ( a b' )<sub>2</sub>、s c F v、s c F a b、d s F v、d s - s c F v、ダイマー(例えば、F cダイマー)、ミニボディ、ダイアボディ、およびそれらのマルチマー、多重特異性抗体フラグメントおよびドメイン抗体を含むことが意図される。抗体は従来技術を用いてフラグメント化することができる。例えば、F ( a b' )<sub>2</sub>フラグメントは、抗体をペプシンで処理することにより作製することができる。得られたF ( a b

10

20

30

40

50

’ ) 2 フラグメントにジスルフィド架橋を減らす処理をすると F a b ’ フラグメントが作製できる。パイン消化は F a b フラグメントの形成をもたらし得る。F a b、F a b ’ および F ( a b ’ ) 2、s c F v、s c F a b、d s F v、d s - s c F v、ダイマー、ミニボディ、ダイアボディ、二重特異性抗体フラグメントおよびその他のフラグメントは組換え技術によっても合成することができる。

【 0 0 3 4 】

用語「捕捉抗体」は、本明細書で使用する場合、固相支持体に結合され、かつ、サンプル中の標的抗原、例えば、K l o t h o ポリペプチド、場合により、可溶性 K l o t h o ポリペプチドを、その標的抗原と複合体を形成することにより捕捉するために使用される抗体またはその結合フラグメントを意味する。

10

【 0 0 3 5 】

用語「検出抗体」は、本明細書で使用する場合、標的抗原、例えば、K l o t h o ポリペプチド、場合により、可溶性 K l o t h o ポリペプチド、場合により、すでに捕捉抗体との複合体中にある標的抗原と結合する抗体またはその結合フラグメントを意味する。例えば、検出抗体は、捕捉抗体：K l o t h o 複合体と、その捕捉抗体により認識されるものとは異なる、標的抗原上のエピトープで結合する。

【 0 0 3 6 】

「保存的アミノ酸置換」は、本明細書で使用する場合、あるアミノ酸残基が、そのタンパク質の所望の特性を損なうことなく別のアミノ酸残基で置換されるものである。好適な保存的アミノ酸置換は、類似する疎水性、極性、および R 鎖長を有するアミノ酸で互いに置換することによりなし得る。保存的アミノ酸置換には以下のものが含まれる。

20

【 0 0 3 7 】

【表 1】

保存的置換	
アミノ酸のタイプ	置換可能なアミノ酸
親水性	Ala, Pro, Gly, Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, Thr
スルフヒドリル	Cys
脂肪族	Val, Ile, Leu, Met
塩基性	Lys, Arg, His
芳香族	Phe, Tyr, Trp

30

【 0 0 3 8 】

用語「慢性腎臓病」または「C K D」は、腎機能に進行性の損失を引き起こす疾患を意味する。C D K は、定義された糸球体濾過速度 ( G F R ) に従って決定される 5 つの病期に従って分類される。病期 1 C K D は、 $90 \text{ mL} / \text{分} / 1.73 \text{ m}^2$  の G F R により定義され、病期 2 C D K は、 $60 \sim 89 \text{ mL} / \text{分} / 1.73 \text{ m}^2$  の間の G F R により定義され、病期 3 C K D は、 $30 \sim 59 \text{ mL} / \text{分} / 1.73 \text{ m}^2$  の間の G F R により定義され、病期 4 C K D は、 $15 \sim 29 \text{ mL} / \text{分} / 1.73 \text{ m}^2$  の間の G F R により定義され、病期 5 C K D は、 $15 \text{ mL} / \text{分} / 1.73 \text{ m}^2$  未満の G F R により定義される。正常な腎臓機能は、 $100 \sim 130 \text{ mL} / \text{分} / 1.73 \text{ m}^2$  の間またはタンパク尿が無く  $90 \text{ mL} / \text{分} / 1.73 \text{ m}^2$  の G F R により定義される。

40

【 0 0 3 9 】

用語「対照」は、本明細書で使用する場合、腎臓病を有するもしくは有しないと知られる対象もしくは対象群に由来するサンプル、および / または前記対象群から決定された値 ( そのような値以下の K l o t h o レベルを有する対象はその疾患を有する可能性がある ) を意味する。その疾患は例えば慢性腎臓病 ( C K D ) または急性腎障害 ( A K I ) であり得る。その疾患は、例えば、病期 1 C K D、病期 2 C K D、病期 3 C K D、病期 4 C K D または病期 5 C K D などの C K D の病期であり得、病期が高いほど重篤である。加えて、対照は、例えば、検査される対象のサンプルと同じタイプの組織に由来してもよい。

50

モニタリングに向けられる方法では、対照は、異なる時点で採取された同じ対象由来の組織であってもよく、例えば、対照は、腎臓病に対する処置前に採取された同じ対象由来のサンプルであり得る。

【0040】

用語「早期慢性腎臓病」は、CKDの早期の病期を指し、ある態様では、病期1および/または病期2 CKDを意味する。多くの場合、FGF23、PTH、およびリン酸塩の上昇はない。病期1 CKDの対象には腎障害を示す症状はほとんど存在しない。病期2 CKDの対象には、腎障害を示す症状は必ずしも存在しないが、存在する場合もある。

【0041】

用語「変性した」は、本明細書で使用する場合、例えばSDSサンプルローディングバッファ中での変性条件に曝された場合など、三次および/または二次構造を失ったポリペプチド（例えば、完全非折り畳みタンパク質）を意味する。

10

【0042】

用語「検出可能なタグ」は、本明細書で使用する場合、組換えタンパク質に付加または導入され得るペプチド配列などの部分を意味する。

【0043】

用語「サンドイッチELISA」は、本明細書で使用する場合、固相支持体と固相支持体に固定化された捕捉抗体またはその結合フラグメント（抗原に特異的）を含んでなるELISAを意味する。このようなELISAでは、サンプル中のある量の標的抗原に捕捉抗体（例えば、サンプル中に含まれるK10thoポリペプチド）が結合する。結合した抗原は、二次抗体またはその結合フラグメント、すなわち、捕捉抗体により認識されるものとは異なるエピトープを認識する検出抗体またはその結合フラグメントによって検出される。捕捉抗体：K10tho複合体は、酵素に共有結合させることができる検出抗体により検出されるか、またはそれ自体、酵素に結合された二次抗体の添加により検出され得る。例えば、捕捉抗体および/または検出抗体は、本明細書に開示されるCDR領域を含んでなり得る。

20

【0044】

用語「エピトープ」は、本明細書で使用する場合、本明細書に開示される抗体または結合フラグメントにより認識される、抗原上の部位を意味する。

【0045】

用語「重鎖相補性決定領域」は、本明細書で使用する場合、抗体分子の重鎖可変領域内の超可変領域を意味する。重鎖可変領域は、アミノ末端からカルボキシ末端へと、重鎖相補性決定領域1（CDR-H1）、重鎖相補性決定領域2（CDR-H2）および重鎖相補性決定領域3（CDR-H3）と呼称される3つの相補性決定領域を有する。本明細書に開示される総てのCDRおよびフレームワーク領域（FR）、本明細書に開示されるCDRおよびFRのアミノ酸配列、ならびに本明細書に開示されるCDRをコードするまたはFRをコードする核酸配列は、IMGTナンバリングに従って定義されることが意図される（85）。

30

【0046】

用語「重鎖可変領域」は、本明細書で使用する場合、重鎖相補性決定領域1、重鎖相補性決定領域2および重鎖相補性決定領域3を含んでなる重鎖の可変ドメインを意味する。1以上のアミノ酸またはヌクレオチドが、例えばCDR配列の外側で、修飾、例えば、保存的置換で置換されてもよい。

40

【0047】

用語「宿主細胞」は、組換え細胞を生産するために組換えDNA発現ベクターを導入できる細胞を意味する。宿主細胞は、大腸菌などの細菌細胞であり得るが、いずれのタイプの微生物、酵母、真菌、昆虫または哺乳動物宿主細胞であってもよい。

【0048】

用語「単離された抗体またはその結合フラグメント」または「単離かつ精製された抗体またはその結合フラグメント」は、組換えDNA技術により生産される場合には細胞材料

50

もしくは培養培地、または化学合成される場合には化学前駆体もしくは他の化学物質、および/または例えば異なるエピトープに対する他の抗体を実質的に含まない抗体またはその結合フラグメントを意味する。

【0049】

用語「 $K_D$ 」は、例えば特定の抗体 - 抗原相互作用の複合体の解離定数を意味する。

【0050】

用語「軽鎖相補性決定領域」は、本明細書で使用する場合、抗体分子の軽鎖可変領域内の超可変領域を意味する。軽鎖可変領域は、アミノ末端からカルボキシ末端へと、軽鎖相補性決定領域1、軽鎖相補性決定領域2および軽鎖相補性決定領域3と呼称される3つの相補性決定領域を有する。

10

【0051】

用語「軽鎖可変領域」は、本明細書で使用する場合、軽鎖相補性決定領域1、軽鎖相補性決定領域2および軽鎖相補性決定領域3を含んでなる軽鎖の可変ドメインを意味する。

【0052】

用語「天然」または「天然の折り畳みの」は、本明細書で使用する場合、その天然立体配座（例えば、3D立体配座）にあるか、または例えば、受容体またはリガンドと結合し得る部分的非折り畳みタンパク質を含む、機能の付与に十分な立体配座にあるタンパク質を意味する。例えば、折り畳まれた K l o t h o タンパク質は、F G F R 1 c などの F G F 受容体と結合能があり、F G F R 1 c : K l o t h o 複合体を形成することができる。

20

【0053】

用語「核酸配列」は、本明細書で使用する場合、天然の塩基、糖および糖間（骨格）結合からなるヌクレオシドまたはヌクレオチドモノマーの配列を意味する。この用語はまた、非天然モノマーまたはその一部を含んでなる修飾または置換配列も含む。本出願の核酸配列は、デオキシリボ核酸配列（DNA）またはリボ核酸配列（RNA）であり得、アデニン、グアニン、シトシン、チミジンおよびウラシルを含む天然塩基を含み得る。これらの配列はまた修飾塩基も含み得る。このような塩基の例としては、アザおよびデアザアデニン、グアニン、シトシン、チミジンおよびウラシル；ならびにキサンチンおよびヒポキサンチンが挙げられる。核酸は二本鎖または一本鎖であり得、センス鎖またはアンチセンス鎖を表す。さらに、用語「核酸」は、相補的核酸配列ならびにコドン最適化等価物または同義コドン等価物も含む。用語「単離された核酸配列」は、本明細書で使用する場合、組換えDNA技術により生産される場合には細胞材料もしくは培養培地、または化学合成される場合には化学前駆体もしくは他の化学物質を実質的に含まない核酸を意味する。単離された核酸はまた、その核酸が由来する核酸に天然に隣接する配列（すなわち、核酸の5'および3'末端に位置する配列を実質的に含まない）。

30

【0054】

用語「ポリペプチド」は、本明細書で使用する場合、鎖内でともに結合された多数のアミノ酸残基からなるポリマーを意味する。ポリペプチドはタンパク質の一部または全体を形成し得る。ポリペプチドは、長い、連続でかつ非分岐ペプチド鎖として構成され得る。ポリペプチドはまた、生物学的に機能的な方法で構成され得る。ポリペプチドは、それに定義された活性を付与する特定の三次元構造に折り畳まれ得る。用語「ポリペプチド」は、本明細書で使用する場合、「タンパク質」という用語と互換的に使用される。

40

【0055】

用語「単離されたポリペプチド」は、本明細書で使用する場合、組換えDNA技術により生産される場合には細胞材料もしくは培養培地、または化学合成される場合には化学前駆体もしくは他の化学物質を実質的に含まないことを意味する。

【0056】

用語「参照薬剤」は、本明細書で使用する場合、アッセイで使用される得る、および例えば、慢性腎臓病および急性腎疾患などの腎臓病態を検出する、スクリーニングするまたは診断するために参照として使用される、標準量の K l o t h o タンパク質であり得る

50

薬剤を意味する。

【 0 0 5 7 】

用語「サンプル」は、本明細書で使用する場合、可溶性バイオマーカーなどの K l o t h o に関してアッセイされ得る、対象由来のいずれの体液、細胞または組織サンプルも意味する。例えば、サンプルは尿、血清、血漿または脳脊髄液を含んでなり得る。サンプルは、例えば、「処置後」サンプル（サンプルは、1以上の処置後に得られる）、または「ベースラインサンプル」（例えば、疾患の進行を評価するためにベースラインとして使用される）であり得る。

【 0 0 5 8 】

用語「s b 1 0 6」、「s b 1 0 6 抗体」または「クローン I D 4 8」は、本明細書で使用する場合、以下に示される軽鎖および重鎖アミノ酸配列：

軽鎖可変領域配列（ I M G T C D R 配列に下線が施され、 I M G T フレームワーク領域残基には下線が施されず、選択ライブラリーで無作為化を受けた I M G T 位の残基は太字で示される）：

【 0 0 5 9 】

【 化 1 】

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSG  
SRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQAGYSPITFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA  
SVVCLLNFPYFREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSLSSTLTLSKADYEKHKVYA  
CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 11)

10

20

【 0 0 6 0 】

重鎖可変領域配列（ I M G T C D R 配列に下線が施され、 I M G T フレームワーク領域残基には下線が施されず、選択ライブラリーで無作為化を受けた I M G T 位の残基は太字で示される）：

【 0 0 6 1 】

【 化 2 】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNISYYSIHWRQAPGKGLEWWAYISPSYGYTSYADSV  
KGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARYYYVYASHGWAGYGM DYWGQGLTVTVSSA  
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL  
SSWTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (配列番号 12)

30

【 0 0 6 2 】

を含んでなり、かつ、例えば、以下に示されるアミノ酸配列（ I M G T C D R 配列に下線が施され、 I M G T フレームワーク領域残基には下線が施されず、選択ライブラリーで無作為化を受けた I M G T 位の残基は太字で示される）：

【 0 0 6 3 】

軽鎖可変領域：

C D R - L 1 : Q S V S S A (配列番号 9)

C D R - L 2 : S A S (配列番号 10)

C D R - L 3 : Q Q A G Y S P I T (配列番号 5)

重鎖可変領域：

C D R - H 1 : G F N I S Y Y S I (配列番号 6)

C D R - H 2 : Y I S P S Y G Y T S (配列番号 7)

C D R - H 3 : A R Y Y V Y A S H G W A G Y G M D Y (配列番号 8) .

40

【 0 0 6 4 】

を有する、 I M G T ナンバリングを用いて決定される相補性決定領域を含んでなる抗体を意味する。

【 0 0 6 5 】

s b 1 0 6 の対応する C D R に取って代わる 1 以上の C D R (表 2 に示される通り) を

50

有し、かつ、sb106と同一の非ライブラリーF可変フレームワーク領域（すなわち、IMGT VHドメイン39、55および66番を除く総てのIMGTフレームワーク領域の位置）を有するsb106のサブクローン（例えば、変異体）が同定された。

#### 【0066】

Sb106は、本明細書で開示される抗体および/または結合フラグメントにより認識されるエピトープ（例えば、エピトープBおよびエピトープC）とは異なるKlorthoのエピトープを認識する。従って、sb106ならびにsb106および/またはsb106の変異体のCDRを含んでなる抗体は、検出アッセイ、例えば、サンドイッチELISAなどのELISAで、本明細書に記載の抗体および/またはその結合フラグメント（例えば、エピトープBおよび/またはエピトープCに対するもの）と併用することができる。

10

#### 【0067】

用語「配列同一性」は、本明細書で使用する場合、2つのポリペプチド配列または2つの核酸配列の間の配列同一性のパーセンテージを意味する。2つのアミノ酸配列または2つの核酸配列の同一性パーセントを決定するためには、これらの配列を最適な比較のために整列させる（例えば、第1のアミノ酸または核酸配列の配列に、第2のアミノ酸または核酸配列との最適なアラインメントのためにギャップを導入することができる）。次に、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置でアミノ酸残基またはヌクレオチドを比較する。第1の配列の位置が第2の配列の対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドで占められていれば、それらの分子はその位置で同一である。2配列間の同一性パーセントは、それらの配列により共有される同一の位置の数の関数である（すなわち同一性% = 同一の重複する位置の数 / 位置の総数 × 100%）。1つの態様では、2配列は同じ長さである。2配列間の同一性パーセントの決定は、数学的アルゴリズムを用いて達成することもできる。2配列の比較に使用される数学的アルゴリズムの好ましい限定されない例は、Karlin and Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:5873-5877のように改変されたKarlin and Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:2264-2268のアルゴリズムである。このようなアルゴリズムは、Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403のNB L A S TおよびX B L A S Tプログラムに組み込まれている。B L A S Tヌクレオチド検索は、本出願の核酸分子と相同なヌクレオチド配列を得るためには、例えば、スコア = 100、ワードレングス = 12のNB L A S Tヌクレオチドプログラムパラメーターセットを用いて行うことができる。B L A S Tタンパク質検索は、本発明のタンパク質分子と相同なアミノ酸配列を得るためには、例えば、スコア = 50、ワードレングス = 3のX B L A S Tプログラムパラメーターセットを用いて行うことができる。比較のためにギャップのあるアラインメントを得るためには、Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402に記載されるようにG a p p e d B L A S Tを使用することができる。あるいは、分子間の離れた関係を検出する反復検索を行うために、P S I - B L A S Tを使用することもできる（同著）。B L A S T、G a p p e d B L A S T、およびP S I - B L A S Tプログラムを使用する場合、各プログラム（例えば、X B L A S TおよびNB L A S T）のデフォルトパラメーターが使用できる（例えば、NCBIウェブサイト参照）。配列の比較に使用される数学的アルゴリズムの好ましい限定されない例は、Myers and Miller, 1988, CABIOS 4:11-17のアルゴリズムである。このようなアルゴリズムは、G C G配列アラインメントソフトウェアパッケージの一部であるA L I G Nプログラム（バージョン2.0）に組み込まれている。アミノ酸配列を比較するためにA L I G Nプログラムを使用する場合、P A M 1 2 0 ウェイト・レシジュ・テーブル、ギャップ・レングス・ペナルティー12、およびギャップ・ペナルティー4が使用できる。2配列間の同一性パーセントは、ギャップを許容して、または許容せずに、上記のものと同様の技術を用いて決定することができる。同一性パーセントを計算する際、一般に正確な一致だけが計数される。

20

30

40

#### 【0068】

「少なくとも中等度のストリンジェントのハイブリダイゼーション条件」とは、溶液中

50

の2つの相補的核酸分子の間の選択的ハイブリダイゼーションを促進する条件が選択されることを意味する。ハイブリダイゼーションは、核酸配列分子の全部または一部に見られ得る。ハイブリダイズ部分は一般に、少なくとも15（例えば、20、25、30、40または50）のヌクレオチド長である。当業者ならば、核酸二重鎖、すなわちハイブリッドの安定性が、ナトリウムを含有するバッファー中でのナトリウムイオン濃度と温度の関数である $T_m$  ( $T_m = 81.5 - 16.6 (\log_{10} [Na^+]) + 0.41 (\% (G + C) - 600 / l)$ 、または類似の式)により決定されることを認識するであろう。よって、ハイブリッド安定性を決定する洗浄条件のパラメーターは、ナトリウムイオン濃度と温度である。既知の核酸分子と類似であるが同一でない分子を同定するためには、1%のミスマッチが $T_m$ に約1の低下をもたらすと過程することができ、例えば、核酸分子が>95%の同一性を有することが求められるならば、最終洗浄温度は、約5下げられる。これらの考慮事項に基づき、当業者ならば、適当なハイブリダイゼーション条件を容易に選択することができる。好ましい態様では、ストリンジェントハイブリダイゼーション条件が選択される。例として、ストリンジェントハイブリダイゼーションを達成するために以下の条件が使用できる：上式に基づき、 $T_m - 5$ 、5倍塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム (SSC) / 5倍デンハート液 / 1.0% SDSでのハイブリダイゼーション、その後、60、0.2倍SSC / 0.1% SDSでの洗浄。中等度のストリンジェントのハイブリダイゼーション条件には、42、3倍SSCでの洗浄工程が含まれる。しかしながら、等価なストリンジェンシーが別のバッファー、塩および温度を用いて達成され得ると理解される。ハイブリダイゼーション条件に関するさらなる指針は、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y., 2002、およびSambrook et al., Molecular Cloning: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001に見出せる。

10

20

## 【0069】

用語「対象」は、本明細書で使用する場合、動物界、好ましくは、哺乳動物、より好ましくは、ヒト、またはラットまたはマウスなどの齧歯類を意味する。1つの態様では、対象は、慢性腎臓病 (CKD) または急性腎障害 (AKI) などの腎臓病を有することが疑われる。

## 【0070】

用語「変異体」は、本明細書で使用する場合、配列（それぞれポリペプチドまたは核酸）における1以上のアミノ酸および/またはヌクレオチド修飾、例えば、本明細書に開示される軽鎖および重鎖CDRと実質的に同じ機能を実質的に同様に遂行する、本明細書に開示される軽鎖または重鎖相補性決定領域 (CDR) の1以上の修飾を含む。例えば、本明細書に開示されるCDRの変異体は、折り畳まれたKlothoタンパク質上のエピトープと特異的に結合し得る同じ機能を有するか、またはヌクレオチド修飾の場合には、折り畳まれたKlothoタンパク質上のエピトープと特異的に結合し得る同じ機能を有するCDRをコードする。例えば、コドンが最適化された配列および縮重配列が含まれる。本明細書に開示されるCDRの変異体は、限定されるものではないが、保存的アミノ酸置換ならびに本明細書に開示されるCDR配列への付加および欠失を含む。例えば、付加または欠失は、1、2、3または4個のアミノ酸、および/または対応する数のヌクレオチドであり得る。

30

40

## 【0071】

用語「レベル」は、本明細書で使用する場合、サンプル中で検出可能なまたは測定可能なKlothoタンパク質の量（例えば、相対的量または濃度）を意味する。例えば、可溶性Klothoレベルは、pMなどの濃度、または例えば対照レベルが健常対象の可溶性Klothoのレベルである場合、対照レベルの1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.2、2.4、2.6、2.8、3.0、3.2、3.4、3.6、3.8、4.0、4.2、4.4、4.6、4.8、5.0および/もしくは10倍などの相対的量であり得る。

## 【0072】

50

本開示の範囲を理解する上で、用語「含んでなる」およびその派生語は、本明細書で使用する場合、示された特徴、要素、成分、群、整数、および/または工程の存在を明示するが、示されていない他の特徴、要素、成分、群、整数、および/または工程の存在を排除しないオープンエンドの用語であることが意図される。以上のことはまた、用語「含む」、「有する」およびそれらの派生語などの同様の意味を有する語にも当てはまる。最後に、「実質的に」、「約」および「およそ」などの程度の用語は、本明細書で使用する場合、最終結果が有意に変化しないようなこの修飾語の偏差の合理的な量を意味する。これらの程度の用語は、この偏差がそれが修飾する語の意味を否定しなければ、その修飾語の少なくとも±5%の偏差を含むと解釈されるべきである。

【0073】

本開示の範囲を理解する上で、用語「からなる」およびその派生語は、本明細書で使用する場合、示された特徴、要素、成分、群、整数、および/または工程の存在を明示し、かつ、示されていない他の特徴、要素、成分、群、整数、および/または工程の存在を排除もするクローズエンドの用語であることが意図される。

【0074】

本明細書における終点による数値範囲の列挙は、その範囲内に包含される総ての数字および分数を含む(例えば、1~5は、1、1.5、2、2.75、3、3.90、4、および5を含む)。また、総ての数字およびその分数が用語「約」により修飾されると考えられることも理解されるべきである。さらに、分脈が明らかにそうではないことを示さない限り、「1つ(a)」、「1つ(an)」、および「その(the)」は複数の指示語を含むと理解されるべきである。用語「約」は、参照される数字のプラスまたはマイナス0.1~10%、1~10%、または好ましくは1~5%を意味する。

【0075】

さらに、特定の節で記載される定義および態様は、当業者に理解されるように、それらが適切である本明細書に記載の他の態様に適用可能であることが意図される。例えば、以下の下りでは、本発明の種々の側面がより詳細に定義される。そのように定義される各側面は、そではないことが明示されない限り、他のいずれの1または複数の側面と組み合わせてもよい。特に、好ましいまたは有利であるとして示されるいずれの特徴も、好ましいまたは有利であるとして示される他のいずれの1または複数の特徴と組み合わせてもよい。

【0076】

II. 抗体および/またはその結合フラグメント

本開示は、例えば、腎臓病を診断する、および/または予後を診断する、抗体および/またはその結合フラグメントならびに作製方法および使用に関する。

【0077】

引用することにより本明細書の一部とされる「 - K l o t h oに対する高親和性を有する抗体」という名称の国際出願第PCT/CA2015/050728号は、sb106抗体を開示している。本明細書には、異なるエピトープでK l o t h oと特異的に結合するさらなる抗体が記載される。図10に記載されるように、さらなる抗体は合成抗体ライブラリーから同定され、K l o t h oと結合することが示された。実施例11および図11に示されるように、競合的ELISA法を用いたエピトープ分類試験により、sb106抗体は全く別のエピトープ(Aと識別)と結合するが、今回記載される抗体はエピトープBおよびCと識別される少なくとも2つの異なるエピトープと結合することが明らかとなる。さらに図14には、エピトープAおよびBがK l o t h oのアミノ酸550~981内に位置し、エピトープCはK l o t h oのアミノ酸1~549内に位置することが記載される。これらの試験は、これらの抗体が結合する3つのエピトープが検出アッセイ、例えば、ELISAで使用され得ることを示す。

【0078】

よって、第1の側面は、それぞれ配列番号11および12のアミノ酸配列を含んでなる軽鎖および重鎖可変領域を有する抗体により認識されるものとは異なるエピトープで、K l o t h oポリペプチドと特異的に結合する抗体および/またはその結合フラグメント

10

20

30

40

50

である。

【0079】

ある態様では、「CDR-H1」は、IMGT CDR-H1およびIMGT CDR-H1のカルボキシ末端残基に隣接するIMGT 39位のVHドメイン残基から構成され；「CDR-H2」は、IMGT CDR-H2およびIMGT CDR-H2のアミノ末端残基に隣接するおよびカルボキシ末端残基に隣接するIMGT 55および66位のVHドメイン残基から構成される。

【0080】

ある態様では、本抗体またはその結合フラグメントは、CDR-L1、CDR-L2およびCDR-L3を含んでなる軽鎖可変領域と、CDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3を含んでなる重鎖可変領域を有し、ここで、CDR領域はIMGTナンバリングを用いて決定される。

10

【0081】

ある態様では、本抗体および/またはその結合フラグメントは、配列番号5のアミノ酸配列を有するCDR-L3を含んでなる軽鎖可変領域と、それぞれ配列番号6、7および8のアミノ酸配列を有するCDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3を含んでなる重鎖可変領域を有する抗体またはその結合フラグメントにより認識されるものとは異なるエピトープで、Klothoポリペプチドと結合する。

【0082】

ある態様では、本抗体および/またはその結合フラグメントは、それぞれ配列番号9、10および5のアミノ酸配列を有するCDR-L1、CDR-L2およびCDR-L3を含んでなる軽鎖可変領域と、それぞれ配列番号6、7および8のアミノ酸配列を有するCDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3を含んでなる重鎖可変領域を有する抗体またはその結合フラグメントにより認識されるものとは異なるエピトープで、Klothoポリペプチドと結合する。

20

【0083】

1つの態様では、本抗体および/またはその結合フラグメントは、Klothoのアミノ酸550~981内に位置するエピトープBと結合するが、sb106抗体により認識されるエピトープとは結合しない。

【0084】

ある態様では、本抗体および/またはその結合フラグメントは、Klothoポリペプチドのアミノ酸1~549内で特異的に結合する。

30

【0085】

ある態様では、Klothoポリペプチドは、場合により天然の立体配座で折り畳まれている（例えば、完全に折り畳まれている）。

【0086】

よって、別の側面は、折り畳まれたKlothoポリペプチドのエピトープと特異的に結合し、かつ、それぞれ配列番号11および12のアミノ酸配列を含んでなる軽鎖および重鎖可変領域を有する抗体により認識されるものとは異なるエピトープで、Klothoポリペプチドと特異的に結合する抗体および/またはその結合フラグメントである。

40

【0087】

さらなる側面は、非固定または軽度固定サンプル中のKlothoポリペプチドと特異的に結合し、かつ、それぞれ配列番号11および12のアミノ酸配列を含んでなる軽鎖および重鎖可変領域を有する抗体により認識されるものとは異なるエピトープで、Klothoポリペプチドと特異的に結合する抗体および/またはその結合フラグメントである。

【0088】

ある態様では、非固定または軽度固定サンプル中のKlothoポリペプチドは、折り畳まれたKlothoである。

【0089】

50

実施例 12 に示されるように、本明細書で開示される抗体は、 K l o t h o に対して 240 pM ~ 8.7 nM の範囲の結合親和性を有する。ある態様では、本抗体 および / または結合フラグメントは、競合的 E L I S A アッセイおよび / または S P R イムノアッセイにより測定した場合に、 K l o t h o ポリペプチドに対して約 50 nM 以下、約 40 nM 以下、約 30 nM 以下、約 25 nM 以下、約 20 nM 以下、約 15 nM 以下、約 12 nM 以下、約 10 nM 以下、約 9 nM 以下、約 8 nM 以下、約 7 nM 以下、約 6 nM 以下、約 5 nM 以下、約 4 nM 以下、約 3 nM 以下、約 2 nM 以下、または約 1 nM 以下の解離定数 ( K<sub>D</sub> ) を有する。

【 0090 】

ある態様では、本抗体および / またはその結合フラグメントは軽鎖可変領域と重鎖可変領域を含んでなり、前記軽鎖可変領域は相補性決定領域 C D R - L 3 を含んでなり、前記重鎖可変領域は相補性決定領域 C D R - H 1、C D R - H 2 および C D R - H 3 を含んでなり、前記 C D R のアミノ酸配列は、以下に示される配列：

C D R - L 3 : 配列番号 123、126 ~ 130、142、148 もしくは 149 のいずれか 1 つから選択される；

C D R - H 1 : 配列番号 121 もしくは 124 ；

C D R - H 2 : 配列番号 122 もしくは 125 ；および / または

C D R - H 3 : 配列番号 196 ~ 226 のいずれか 1 つから選択される

のうち 1 以上を含んでなる。

【 0091 】

ある態様では、C D R - H 1 領域は、配列番号 133 または 134 の配列を含んでなる。

【 0092 】

ある態様では、C D R - H 2 領域は、配列番号 135 または 136 の配列を含んでなる。

【 0093 】

ある態様では、相補性決定領域は、場合により、以下に示されるような配列番号 142 ~ 226 ；

C D R - L 3 : 配列番号 142 ~ 156 のいずれか 1 つから選択される；

C D R - H 1 : 配列番号 157 ~ 174 のいずれか 1 つから選択される；

C D R - H 2 : 配列番号 175 ~ 195 のいずれか 1 つから選択される；および / または

C D R - H 3 : 配列番号 196 ~ 226 のいずれか 1 つから選択されるから選択されるアミノ酸配列を含んでなる。

【 0094 】

ある態様では、前記軽鎖可変領域は、以下に示されるアミノ酸配列：

C D R - L 1 : 配列番号 140 および / または

C D R - L 2 : 配列番号 141

を含んでなる相補性決定領域 C D R - L 1 および / または C D R - L 2 をさらに含んでなる。

【 0095 】

ある態様では、本抗体および / またはその結合フラグメントは、表 3 A および 3 D ~ 3 I に示されるような C D R - L 1、- L 2、- L 3、- H 1、- H 2 および - H 3 アミノ酸配列を含んでなる軽鎖可変領域および重鎖可変領域を含んでなる。

【 0096 】

ある態様では、本抗体および / またはその結合フラグメントは、K l o t h o のエピトープ B と結合し、かつ、表 3 A および / または 3 D ~ 3 F に示されるような C D R 領域を含んでなる。

【 0097 】

ある態様では、K l o t h o と特異的に結合する抗体および / またはその結合フラグ

10

20

30

40

50

メントは、表 3 A に示されるようなエピトープ B に特異的として同定された抗体の C D R 領域を含んでなる。

【 0 0 9 8 】

ある態様では、 K l o t h o と特異的に結合する抗体および / またはその結合フラグメントの C D R は、表 3 A に示されるようなクローン 4 8 0 4、4 8 0 5、4 8 0 7、4 8 0 8、4 8 0 9、4 8 1 1、4 8 1 2、4 8 1 3、4 8 1 5、4 8 1 6、4 8 1 8、4 8 2 0、4 8 2 1、4 8 2 2、4 8 2 3、4 8 2 4、4 8 2 5、4 8 2 6、4 8 2 7、4 8 2 9、4 8 3 2、4 8 3 3 および 4 8 3 4 に関して示されるものから選択される。

【 0 0 9 9 】

ある態様では、 K l o t h o と特異的に結合する抗体および / またはその結合フラグメントは、表 3 A および / または 3 G ~ 3 I に示されるようにエピトープ C に特異的として同定された抗体の C D R 領域を含んでなる。

10

【 0 1 0 0 】

ある態様では、 K l o t h o と特異的に結合する抗体および / またはその結合フラグメントは、表 3 A に示されるようにエピトープ C に特異的として同定された抗体の C D R 領域を含んでなる。

【 0 1 0 1 】

ある態様では、 K l o t h o と特異的に結合する抗体および / またはその結合フラグメントの C D R は、表 3 A に示されるようにクローン 4 8 1 4、4 8 1 9、4 8 3 0 および 4 8 3 1 に関して示されるものから選択される。

20

【 0 1 0 2 】

ある態様では、 K l o t h o と特異的に結合する抗体および / または結合フラグメントの C D R は、表 3 A に示されるようにクローン 4 8 0 6、4 8 1 0、4 8 1 7 および 4 8 2 8 に関して示されるものから選択される。

【 0 1 0 3 】

一例として、全長軽鎖および重鎖可変領域のコンテキストにおける抗体 s b 1 7 3 ( クローン i d 4 8 0 8 ) の C D R 配列を表 4 に示す。C D R 領域を表す下線の残基は、例えば、表 3 A に示されるように、本明細書に記載の他の C D R 配列で置換されてもよい。

【 0 1 0 4 】

抗体、場合により、ヒト抗体は、I g M、I g G、I g D、I g A または I g E を含むいずれのクラスの免疫グロブリンでも ; ならびに I g G 1、I g G 2、I g G 3 および I g G 4 を含むいずれのアイソタイプでもよい。

30

【 0 1 0 5 】

いずれの F a b クローンも、例えば、サブクローニングによって、例えば、全長免疫グロブリン分子に挿入可能である。ここで同定された F a b クローンの C D R は、C D R グラフト抗体を作製するために抗体にグラフトすることができる。

【 0 1 0 6 】

ヒト化またはキメラ抗体は、1 以上のアイソタイプまたはクラス由来の配列を含み得る。

【 0 1 0 7 】

さらに、本明細書に記載の抗体は、F a b、F a b'、F ( a b' )<sub>2</sub>、F d、F v および シングルドメイン抗体フラグメントなどの抗原結合フラグメントとして、または重鎖および軽鎖がスパーサーにより連結された一本鎖抗体として生産されてもよい。また、ヒトまたはキメラ抗体は、モノマー型またはポリマー型で存在してもよい。

40

【 0 1 0 8 】

キメラ抗体は、組換え技術を用いて作製することができる。実施例に記載されるように、スクリーニングで同定された F a b は、抗体の軽鎖および重鎖の可変ドメインを哺乳動物発現ベクターにサブクローニングし、例えば、実施例に示されるようにヒト胎児腎臓細胞 ( H E K 2 9 3 T ) を用いて I g G タンパク質を生産することによって、全長 I g G に再構成した。他所に記載されるように、抗体を発現させるのに好適ないずれの細胞種も使

50

用可能である。

【0109】

さらに別の態様では、軽鎖相補性決定領域CDR-L3および重鎖相補性決定領域CDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3は、それぞれ配列番号142~156、配列番号157~174、配列番号175~195、および配列番号196~226と少なくとも70%、少なくとも80%または少なくとも90%の配列同一性を有する。

【0110】

ある態様では、抗体、その結合フラグメント、場合により、CDR配列は1以上の保存的置換を有する。

【0111】

1つの態様では、本抗体および/またはその結合フラグメントは、免疫グロブリン分子、Fab、Fab'、F(ab)2、F(ab')2、Fv、ジスルフィド結合Fv、scFv、ジスルフィド結合scFv、フラグメントscFabを含む一本鎖ドメイン抗体、ダイアボディ、ダイマー、ミニボディ、二重特異性抗体フラグメント、キメラ抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体およびポリクローナル抗体からなる群から選択される。

【0112】

Fab、Fab'およびF(ab')2、scFv、scFab、dsFv、ds-scFv、ダイマー、ミニボディ、ダイアボディ、二重特異性抗体フラグメントおよび他のフラグメントは、合成することができるか、または組換え技術によって発現させることができる。

【0113】

抗体はまた、従来技術を用いてフラグメント化することもできる。例えば、F(ab')2フラグメントは、抗体をペプシンで処理することによって作製することができる。得られたF(ab')2フラグメントにジスルフィド架橋を減らす処理をするとFab'フラグメントが作製できる。パイン消化はFabフラグメントの形成をもたらし得る。

【0114】

ある態様では、抗体はヒト抗体である。

【0115】

ヒト抗体は場合により、トランスジェニック動物から得られる(米国特許第6,150,584号、同第6,114,598号および同第5,770,429号)。このアプローチでは、キメラまたは生殖細胞系突然変異マウスにおいて重鎖連結領域(J<sub>H</sub>)遺伝子が削除される。次に、このような突然変異マウスにヒト生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子アレイを移入する。その後、得られたトランスジェニックマウスは、抗原刺激時にヒト抗体の全レパートリーを生成する能力を有する。

【0116】

ある態様では、抗体は、配列番号140~226から選択される1以上のCDRを含んでなるキメラ抗体である。

【0117】

実施例15に示されるように、本明細書に開示される抗体および/またはその結合フラグメントは、いくつかの種と交差反応性がある。ある態様では、結合したKlothoポリペプチドは、哺乳動物Klothoポリペプチドであり、例えば、Klothoポリペプチドは、ヒトKlothoポリペプチド、またはマウスKlothoポリペプチドもしくはラットKlothoポリペプチドなどの齧歯類Klothoポリペプチドから選択される。

【0118】

ある態様では、本抗体および/またはその結合フラグメントは、マウスKlothoよりもヒトKlothoに優先的に結合する。

【0119】

別の態様では、折り畳まれたKlothoポリペプチドは、可溶性の折り畳まれたKlothoポリペプチドである。例えば、本抗体および/またはその結合フラグメント

10

20

30

40

50

は、尿、血漿、および/または血清中に見られる可溶性の折り畳まれた K l o t h o ポリペプチドと結合する。

【0120】

実施例16に示されるように、本明細書で開示される F a b フラグメントは、 K l o t h o 単独および複合体 ( K l o t h o - F G F R 1 c ) と結合することができた。さらに別の態様では、本抗体および/またはその結合フラグメントは、折り畳まれた K l o t h o ポリペプチドを含んでなる複合体と結合する。例えば、複合体は、折り畳まれた K l o t h o ポリペプチドを線維芽細胞増殖因子 ( F G F ) 受容体、場合により、 F G F R 1 c とともに含んでなり得る。

【0121】

さらなる態様では、本抗体および/または結合フラグメントは、例えば、診断薬を生産するために、標識され、かつ/またはタグとコンジゲートされる。例えば、検出可能なタグは、H i s タグ、H A タグ、G S T タグ、ビオチンまたは F L A G タグなどの精製タグであり得る。

【0122】

標識は、好ましくは、直接または間接的に検出可能なシグナルを生成することができる。例えば、標識は、放射線不透過性もしくは  $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$  などの放射性同位元素；フルオレセインイソチオシアネート、ローダミンもしくはルシフェリンなどの蛍光（蛍光団）もしくは化学発光（発色団）化合物；アルカリ性ホスファターゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼもしくはセイヨウワサビペルオキシダーゼ ( H R P ) などの酵素；造影剤；または金属イオンであり得る。

【0123】

本開示の別の側面は、抗体および/またはその結合フラグメントと K l o t h o を含んでなる、場合により、F G F R 1 c をさらに含んでなる抗体複合体に関する。

【0124】

ある態様では、抗体複合体は、F G F R 1 c を含んでなり、場合により、F G F 2 3 をさらに含んでなる。

【0125】

ある態様では、本抗体および/またはその結合フラグメントは、単離された抗体および/またはその結合フラグメントである。

【0126】

さらに別の側面は、抗体および/またはその結合フラグメント、例えば、本明細書に記載のその結合フラグメントをコードする核酸である。ある態様では、核酸は、軽鎖可変領域と重鎖可変領域を含んでなり、前記軽鎖可変領域が相補性決定領域 C D R - L 1、C D R - L 2 および C D R - L 3 を含んでなり、前記重鎖可変領域が相補性決定領域 C D R - H 1、C D R - H 2 および C D R - H 3 を含んでなり、前記 C D R のアミノ酸配列が以下に示される配列：

C D R - L 3 : 配列番号 1 2 3、1 2 6 ~ 1 3 0、1 4 2、1 4 8 もしくは 1 4 9 のいずれか 1 つから選択される；

C D R - H 1 : 配列番号 1 2 1 もしくは 1 2 4 ；

C D R - H 2 : 配列番号 1 2 2 もしくは 1 2 5 ；および/または

C D R - H 3 : 配列番号 1 9 6 ~ 2 2 6 のいずれか 1 つから選択される

のうち 1 以上を含んでなる抗体および/またはその結合フラグメントをコードする。

【0127】

ある態様では、抗体および/またはその結合フラグメントをコードする核酸は、以下に示される配列：

C D R - L 3 : 配列番号 2 2 9 ~ 2 4 3 のいずれか 1 つから選択される；

C D R - H 1 : 配列番号 2 4 4 ~ 2 6 2 のいずれか 1 つから選択される；

C D R - H 2 : 配列番号 2 6 3 ~ 2 8 5 のいずれか 1 つから選択される；および/または

は

10

20

30

40

50

C D R - H 3 : 配列番号 2 8 6 ~ 3 1 6 のいずれか 1 つから選択される  
をさらに含んでなる。

【 0 1 2 8 】

ある態様では、前記軽鎖可変領域は、以下に示される核酸配列：

C D R - L 1 : 配列番号 2 2 7 および / または

C D R - L 2 : 配列番号 2 2 8

を有する相補性決定領域 C D R - L 1 および / または C D R - L 2 を含んでなる。

【 0 1 2 9 】

異なるエピトープと結合する C D R の変異体が記載される。加えて、遺伝コードの縮重は、異なる核酸が同じアミノ酸配列をコードすることを可能とする。よって、少なくとも中等度のストリンジェントのハイブリダイゼーション条件下で本明細書に開示される抗体および / またはその結合フラグメントをコードする核酸配列とハイブリダイズし、かつ、

K l o t h o ポリペプチドと特異的に結合もする抗体をコードするヌクレオチド配列も含まれる。

【 0 1 3 0 】

また、別の態様では、コドン縮重またはコドン最適化配列も含まれる。別の態様では、核酸配列は、配列番号 2 2 7 ~ 3 1 6 をコードする核酸配列と少なくとも 7 0 %、最も好ましくは少なくとも 8 0 %、さらにより好ましくは少なくとも 9 0 %、いっそう最も好ましくは少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する ( 表 3 B および 3 C に示される通り ) 。

【 0 1 3 1 】

本明細書に記載の抗体は、本明細書に記載の特徴のうち 1 以上を含んでなり得る。

【 0 1 3 2 】

ある態様では、核酸は単離された核酸である。

【 0 1 3 3 】

別の側面は、本明細書に開示される核酸を含んでなるベクターである。ある態様では、ベクターは単離されたベクターである。

【 0 1 3 4 】

ベクターは、例えば、本明細書に記載のベクターを含む、抗体および / またはその結合フラグメントを生産するために好適ないずれのベクターであってもよい。可能性のある発現ベクターとしては、限定されるものではないが、コスミド、プラスミド、または改変ウイルス ( 例えば、複製欠陥レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス ) が含まれる。

【 0 1 3 5 】

さらなる側面は、本明細書に開示される抗体および / もしくはその結合フラグメントまたは本明細書に開示されるベクターを生産する組換え細胞である。

【 0 1 3 6 】

組換え細胞は、ポリペプチドを生産するために好適な、例えば、抗体および / またはその結合フラグメントを生産するために好適ないずれの細胞を用いて作製してもよい。

【 0 1 3 7 】

好適な宿主細胞としては、多様な原核生物および真核生物宿主細胞が含まれる。例えば、本発明のタンパク質は、大腸菌、昆虫細胞 ( パキユロウイルスを使用 )、酵母細胞または哺乳動物細胞などの細菌細胞で発現させることができる。

【 0 1 3 8 】

より詳しくは、組換え抗体生産細胞を生産するために好適な細菌宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌 ( *B. subtilis* )、ネズミチフス菌 ( *Salmonella typhimurium* )、およびシュードモナス属 ( *Pseudomonas* )、放線菌属 ( *Streptomyces* )、およびブドウ状球菌属 ( *Staphylococcus* ) 内の様々な種、ならびに当業者に周知の多くの他の細菌種が含まれる。好適な細菌発現ベクターは、好ましくは、宿主細胞内で機能するプロモーター、1 以上の選択可能な表現型マーカー、および細菌複製起点を含んでなる。代表的なプロモーターとしては、  
- ラクタマーゼ ( ペニシリナーゼ ) およびラクトースプロモーター系、 *t r p* プロモータ

10

20

30

40

50

ーおよびtacプロモーターが含まれる。代表的な選択マーカ―としては、カナマイシンまたはアンピシリン耐性遺伝子などの種々の抗生物質耐性マーカ―が含まれる。好適な発現ベクターとしては、限定されるものではないが、誘導体などのバクテリオファージ、またはpBR322、pUCプラスミドpUC18、pUC19、pUC118、pUC119、およびpNH8A、pNH16a、pNH18a、およびBluescript M13 (Stratagene、ラホヤ、カリフォルニア州)などのプラスミドが含まれる。

#### 【0139】

好適な酵母および真菌宿主細胞としては、限定されるものではないが、サッカロミセス・セレビスエ(Saccharomyces cerevisiae)、シゾサッカロミセス・ポムベ(Schizosaccharomyces pombe)、ピキア属(Pichia)またはクルイベロミセス属(Kluyveromyces)およびアスペルギルス属(Aspergillus)の種々の種が含まれる。酵母S・セレビスエ内での発現のためのベクターの例としては、pYepSec1、pMFA、pJRY88、およびpYES2 (Invitrogen Corporation、サンディエゴ、CA)が含まれる。酵母および真菌の形質転換のためのプロトコルは、当業者に周知である。

#### 【0140】

好適な哺乳動物細胞としては、とりわけ、COS (例えばATCC No. CRL 1650または1651)、BHK (例えばATCC No. CRL 6281)、CHO (ATCC No. CCL 61)、HeLa (例えばATCC No. CCL 2)、293 (ATCC No. 1573)、NS-1細胞およびこれらの株のいずれの誘導体も含まれる。

#### 【0141】

ある態様では、組換え抗体を生産するために使用される哺乳動物細胞は、CHO、HEK293細胞またはFreestyle (商標) 293-F細胞 (Life technologies) から選択される。Freestyle 293-F細胞株は、293細胞株に由来し、Freestyle (商標) MAX 293発現系、Freestyle (商標) 293発現系または他の発現系とともに使用可能である。

#### 【0142】

哺乳動物細胞内で発現を命令するために好適な発現ベクターは一般に、プロモーター (例えば、ポリオーマ、アデノウイルス2、サイトメガロウイルスおよびシミアンウイルス40などのウイルス材料に由来)、ならびに他の転写および翻訳制御配列を含む。

#### 【0143】

ある態様では、ベクターは、軽鎖またはIgG1重鎖の生産用に設計される。

#### 【0144】

好適な昆虫細胞としては、カイコ(Bombyx)またはスポドプテラ(Spodoptera)種に由来する細胞および細胞株が含まれる。培養昆虫細胞 (SF9細胞) 内でのタンパク質発現のために利用可能なバキュロウイルスベクターとしては、pAc種およびpVL種が含まれる。

#### 【0145】

組換え発現ベクターはまた、組換えペプチドの発現または安定性の増強;組換えペプチドの溶解度の増強;および例えば、本明細書に記載のタグおよび標識を含め、アフィニティー精製においてリガンドとして働くことによる標的組換えペプチドの精製の補助を提供する融合部分 (すなわち、「融合タンパク質」) をコードする遺伝子を含有し得る。さらに、融合タンパク質の精製の後に融合部分から組換えタンパク質の分離を可能とするために、標的組換えタンパク質にタンパク質分解切断部位を付加してもよい。典型的な融合発現ベクターとしては、それぞれグルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST)、マルトース結合タンパク質、またはプロテインAを組換えタンパク質と融合するpGEX (Amrad Corp.、メルボルン、オーストラリア)、pMAL (New England Biolabs、ピパリー、MA) およびpRIT5 (Pharmacia、ピスカタウェイ、NJ) が含まれる。

10

20

30

40

50

## 【0146】

「作動可能に連結」とは、核酸が調節配列と、その核酸の発現を可能とする様式で連結されることを意味するものとする。好適な調節配列は、細菌、真菌、ウイルス、哺乳動物、または昆虫遺伝子を含む様々な供給源に由来し得る。適当な調節配列の選択は、選択される宿主細胞によって異なり、当業者ならば容易に達成することができる。このような調節配列の例としては、転写プロモーターおよびエンハンサーまたはRNAポリメラーゼ結合配列、翻訳開始シグナルを含むリボゾーム結合配列が挙げられる。加えて、選択される宿主細胞および使用されるベクターによって、複製起点、付加的DNA制限部位、エンハンサー、および転写の誘導性を付与する配列などの他の配列を発現ベクターに組み込んでよい。

10

## 【0147】

ある態様では、抗体またはその結合フラグメントの発現は、誘導プロモーターの制御下にある。誘導性の非融合発現ベクターの例としては、pTrc(28)およびpET 11dが挙げられる。

## 【0148】

組換え発現ベクターはまた、本発明の換え分子で形質転換されたまたはトランスフェクトされた宿主細胞の選択を容易にするマーカー遺伝子も含有し得る。選択マーカー遺伝子の例は、G418などのタンパク質および特定の薬物に対して耐性を付与するハイグロマイシン、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、ホタル・ルシフェラーゼ、または免疫グロブリンもしくは免疫グロブリン、好ましくは、IgGのFc部分などのその一部をコードする遺伝子である。選択マーカー遺伝子の転写は、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、またはホタル・ルシフェラーゼなどの選択マーカータンパク質の濃度の変化によってモニタリングされる。選択マーカー遺伝子がネオマイシン耐性などの抗生物質耐性を付与するタンパク質をコードする場合、形質転換細胞はG418で選択することができる。選択マーカー遺伝子が組み込まれた細胞は生存するが、その他の細胞を死滅する。これにより本発明の組換え発現ベクターの発現に関して可視化およびアッセイすること、特に、発現および表現型に対する突然変異の効果を決定することが可能となる。選択マーカーは対象とする核酸とは別のベクターで導入することもできることが認識されるであろう。他の選択マーカーとしては、対象とする核酸とともに形質導入され得るGFPなどの蛍光タンパク質が含まれる。

20

30

## 【0149】

さらに別の側面は、抗体および/またはその結合フラグメント、本明細書に開示される核酸または本明細書に開示される組換え細胞を、場合により、好適な希釈剤または担体と組合わせて含んでなる組成物である。

## 【0150】

本組成物は、凍結乾燥粉末または水性もしくは非水性溶液または懸濁液であり得、抗酸化剤、バッファー、静菌剤および溶質をさらに含み得る。このような組成物中に存在し得る他の成分としては、例えば、水、界面活性剤(例えば、Tween)、アルコール、ポリオール、グリセリンおよび植物油が含まれる。

40

## 【0151】

核酸に好適な希釈剤としては、限定されるものではないが、水、生理食塩水およびエタノールが挙げられる。

## 【0152】

抗体もしくはそのフラグメントを含むポリペプチドおよび/または細胞に好適な希釈剤としては、限定されるものではないが、生理食塩水、pH緩衝溶液およびグリセロール溶液またはポリペプチドおよび/もしくは細胞を凍結させるのに好適な他の溶液が挙げられる。

## 【0153】

組成物は、生理学的バッファーに添加される分解防止剤、例えば、還元剤、疎水性添加

50

剤、およびプロテアーゼ阻害剤をさらに含んでなり得る。

【0154】

III. 方法

本開示の別の側面は、Klothoに対して特異的結合親和性を有し、かつ、sb106抗体により認識されるエピトープとは異なる、Klothoのエピトープと結合する、本明細書に記載の抗体および/またはその結合フラグメントを単離または生産する方法である。

【0155】

従前に述べたように、sb106抗体は、それぞれ配列番号9、10および5のアミノ酸配列を有するCDR-L1、CDR-L2およびCDR-L3を含んでなる軽鎖可変領域と、それぞれ配列番号6、7および8のアミノ酸配列を有するCDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3を含んでなる重鎖可変領域とを含んでなる。

【0156】

異なるエピトープと結合するさらなるKlotho特異的抗体は、例えば、検出アッセイを確立するために望ましい。本明細書に記載されるように、Klothoに対する抗体は、飽和レベルの元のsb106 Fabの存在下でヒトKlothoの細胞外ドメイン(ECD)で行った抗体-ファージディスプレイ選択により想定した。この方法を用い、31抗体が、Klothoの全く別のエピトープを認識するとして、また、sb106の存在下および不在下でKlothoと結合するとして同定された(実施例10および図9)。これらの抗体は、表5に示されるように、10nM未満の結合親和性(K<sub>D</sub>)を示す。1つの態様では、この方法は、可溶性Klothoポリペプチドと結合する抗体に関して抗体ライブラリーをスクリーニングすること、および抗体ライブラリーから抗体を単離することを含んでなる。例えば、抗体ライブラリーは、抗体ファージディスプレイライブラリーであり得る。1つの態様では、抗体ファージディスプレイライブラリーは、ヒトFabファージディスプレイライブラリーである。

【0157】

ある態様では、抗体ライブラリーからKlothoポリペプチドと特異的に結合する抗体を単離するために、Klothoポリペプチドを用いる。ある態様では、抗体ライブラリーからKlothoポリペプチドと特異的に結合する抗体を単離するために、エピトープA、BまたはCに特異的なCDR領域を有する抗体または結合フラグメントと複合体を形成したKlothoを用いる。

【0158】

別の態様では、単離および精製された抗体および/またはその結合フラグメントは親和性成熟される。親和性成熟は、例えば、CDR配列の変異体を含んでなるファージライブラリーを用い、プラスチックプレートに吸着させた抗原で、初期選択に関して記載されるように行うことができる。

【0159】

当業者ならば、折り畳まれたKlothoに対して特異的結合親和性を有する抗体および/またはその結合フラグメントを単離および生産するためにいくつかの方法が使用可能であることを認識するであろう。使用可能な方法はファージディスプレイ法である。例えば、抗体および/またはその結合フラグメントを単離および特性評価するために、二元Klotho-FGF1Rc複合体が生成される。ファージは、数回のパンニングの後にヒトFabファージディスプレイライブラリーから選択される。ELISAで決定した場合に、二元Klotho-FGF1Rc複合体に対して特異的結合親和性を有するファージを配列決定し、軽鎖または重鎖の生産用に設計されたベクターにクローニングする。重鎖は、例えば、IgG、またはIgG1もしくはIgG4などのIgGアイソタイプであり得る。次に、抗原結合フラグメントおよびIgGポリペプチドは、例えばプロテインAアフィニティーカラムを使用することによってアフィニティー精製する。

【0160】

別の態様では、抗体および/またはその結合フラグメントを作製するために、本明細書

10

20

30

40

50

に記載の抗体をコードする核酸を宿主細胞で発現させる。ある態様では、本方法は、

a . 宿主細胞内で本明細書に開示される抗体および / またはその結合フラグメントをコードする核酸を発現させること ;

b . 抗体および / またはその結合フラグメントを生産するために前記宿主細胞を培養すること ; ならびに

c . 前記抗体および / またはその結合フラグメントを前記宿主細胞から単離および / または精製すること

を含んでなる。

#### 【 0 1 6 1 】

いくつかの態様では、一本鎖抗体をコードする核酸が発現される。他の態様では、例えば、抗体軽鎖をコードする核酸および抗体重鎖をコードする核酸など、複数の核酸が発現される。

10

#### 【 0 1 6 2 】

好適な宿主細胞およびベクターは上記されている。本明細書に記載の抗体をコードするベクターおよび核酸は、リン酸カルシウムまたは塩化カルシウム共沈降、D E A E - デキストラン媒介トランスフェクション、リポフェクチンおよび他のリポソームに基づくトランスフェクション剤、エレクトロポレーションまたはマイクロインジェクションなどの従来技術によって哺乳動物細胞に導入され得る。

#### 【 0 1 6 3 】

本明細書に記載の抗体をコードする核酸は、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクターおよびDNAウイルスベクターなどの送達ビヒクルを用いて哺乳動物細胞に直接導入され得る。

20

#### 【 0 1 6 4 】

実施例 1 3 に記載されるように、これらの抗体が、ヒト尿サンプルにおいて F a b として、免疫沈降 - イムノプロットアッセイを用いて試験された。結果は、これらの抗体は K l o t h o を免疫沈降させる能力を有することを示す ( 図 1 3 ) 。これらの抗体を、F a b としてヒト患者尿サンプルから K l o t h o を免疫沈降させるそれらの能力に関してアッセイした。

#### 【 0 1 6 5 】

#### V . アッセイ

30

本明細書に開示される K l o t h o 特異的抗体は、異なるエピトープと結合し、サンプル中の K l o t h o と結合し、それを検出および測定するための種々のアッセイで使用することができる。例えば、これらの抗体は、近接ライゲーションアッセイ ( P L A ) ならびに場合によりイムノプロット検出と組合わせた免疫沈降において使用することができる。抗体に基づく検出はまた、例えば、粒子に基づくフローサイトメトリーアッセイのように、質量分析アッセイと組合わせることもできる。

#### 【 0 1 6 6 】

本明細書に記載されるような免疫検出法は一般に、本明細書に開示される抗体および / またはその結合フラグメントを用いた、抗体 : K l o t h o 複合体の検出または測定を含む。このような複合体の検出は当技術分野で周知であり、種々の方法を介して、例えば、放射性タグ、蛍光タグまたは酵素タグなどの検出可能な標識またはマーカーを使用することによって達成され得る。これらの複合体の検出は、K l o t h o に、または抗体 : K l o t h o 複合体に特異的な二次抗体および / またはその結合フラグメントなどのリガンドの使用も含み得る。

40

#### 【 0 1 6 7 】

それらはまた、検出アッセイ、例えば、1つの抗体が K l o t h o を単離するための捕捉試薬として使用でき、全く別のエピトープと結合する別の抗体を検出試薬として使用できる場合にはサンドイッチ E L I S A を作製するために使用することもできる。

#### 【 0 1 6 8 】

エピトープ A および B は、K l o t h o のアミノ酸 5 5 0 ~ 9 8 1 に位置し、エピト

50

ープCは、K l o t h oのアミノ酸1～549に位置する。実施例14、図14に示されるように、異なるエピトープと結合する3つの抗体を、K l o t h oの2つの異なる部分、すなわち、K l o t h oのアミノ酸1～549およびアミノ酸34～981とともにインキュベートした。エピトープAと結合するクローン48(s b 1 0 6)およびエピトープBと結合するクローン4808は両方ともK l o t h oのアミノ酸550～981内で結合し、一方、エピトープCと結合するクローン4831はアミノ酸1～549内で結合する。

【0169】

よって、別の側面は、1以上の本明細書に開示される抗体および/またはその結合フラグメント(例えば、エピトープBまたはCに特異的)を含んでなるイムノアッセイである。

10

【0170】

ある態様では、イムノアッセイは、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)である。抗体および/またはその結合フラグメントは、ELISA、例えば、サンドイッチELISAなどの検出アッセイに関して使用可能である。実施例14および図15に示されるように、これらの抗体は、溶液中のK l o t h oの検出のための捕捉および検出抗体として使用した。エピトープA(s b 1 0 6)、B(s b 1 7 7)またはC(s b 2 0 0)を認識する全長IgGを固定化し、K l o t h oとともにインキュベートした。次に、これらのサンプルを、エピトープA、BまたはCを認識するビオチン化IgGとともにインキュベートした。

20

【0171】

ある態様では、ELISAは、捕捉抗体と検出抗体を含んでなるサンドイッチELISAであり、前記捕捉抗体は、本明細書に特定されるCDRを有しかつ、K l o t h oと特異的に結合する、例えば、エピトープA、BもしくはCと特異的に結合する抗体もしくはその結合フラグメントであり、ならびに/または前記検出抗体は、本明細書に特定されるCDRを有しかつ、K l o t h oと特異的に結合する、例えば、エピトープA、BもしくはCと特異的に結合する抗体もしくはその結合フラグメントであり、前記捕捉抗体および検出抗体は異なるエピトープと結合する。

【0172】

1つの態様では、前記捕捉抗体および検出抗体は、本明細書に開示される抗体および/またはその結合フラグメント、ならびに配列番号11および12のアミノ酸配列を含んでなる軽鎖および重鎖可変領域を有するs b 1 0 6抗体から選択される。

30

【0173】

別の態様では、捕捉抗体および検出抗体の一方は、表3に特定されるCDRを有する本明細書に開示される抗体および/またはその結合フラグメントであり、捕捉抗体および検出抗体の他方は、場合により、それぞれ配列番号11および12のアミノ酸配列を含んでなる軽鎖および重鎖可変領域を有するs b 1 0 6抗体またはその変異体に関して特定されるCDRを有する抗体である。

【0174】

1つの態様では、本イムノアッセイは、K l o t h oのエピトープBまたはCと結合する、本明細書に記載のCDRを有する抗体および/またはその結合フラグメント、ならびにエピトープAと結合すると同定されたs b 1 0 6抗体またはその変異体のCDRを有する抗体を含んでなる。

40

【0175】

例えば、捕捉抗体はエピトープAと結合し、検出抗体はエピトープBと結合する。例えば、捕捉抗体はエピトープAと結合し、検出抗体はエピトープCと結合する。例えば、捕捉抗体はエピトープBと結合し、検出抗体はエピトープAと結合する。例えば、捕捉抗体はエピトープBと結合し、検出抗体はエピトープCと結合する。例えば、捕捉抗体はエピトープCと結合し、検出抗体はエピトープAと結合する。例えば、捕捉抗体はエピトープCと結合し、検出抗体はエピトープBと結合する。

50

## 【0176】

1つの態様では、抗体またはその変異体はsb106-Fab(Fsb106)である。

## 【0177】

1つの態様では、本イムノアッセイは、サンプル中のKlothoポリペプチドを検出および/または測定するためのものであり、イムノアッセイの作製方法は、

- a) 固相支持体を捕捉抗体でコーティングすること；
- b) 捕捉抗体をサンプルと、捕捉抗体：Klotho複合体を形成する条件下で接触させること；
- c) 結合していないサンプル除去すること；
- d) 捕捉抗体：Klotho複合体を検出抗体と接触させること；
- e) 結合していない検出抗体を除去すること；および
- f) 捕捉抗体：Klotho複合体を検出および/または測定すること

を含んでなる。

## 【0178】

ある態様では、ELISAは競合的ELISA法である。ある態様では、ELISAは直接的ELISAである。ある態様では、ELISAは間接的ELISAである。

## 【0179】

本明細書で使用する場合、「固相支持体」には、本明細書に開示されるKlothoポリペプチドおよび抗体および/またはその結合フラグメントが結合し得るいずれの材料も含まれる。例えば、固相支持体は、プラスチック、ガラス、ポリスチレン、ナイロン、ポリプロピレン、ナイロン、ポリエチレン、デキストラン、アミラーゼ、天然および修飾セルロースおよびポリアクリルアミドを含み得る。例えば、固相支持体は、マイクロタイタープレート、磁性ビーズ、ラテックスビーズまたはアレイ表面である。

## 【0180】

例えば、サンプルは、抗体および/またはその結合フラグメントと、適当な条件下、例えば、所与の温度およびKlothoの抗体への有効な結合を可能とする、従って、抗体：Klotho複合体、例えば、捕捉抗体：Klotho複合体の形成を可能とするのに十分な期間接触させる。例えば、接触工程は、室温で約30分間、約60分間、約2時間または約4時間行われる。例えば、接触工程は、約4で一晚行われる。

## 【0181】

例えば、本明細書に開示される抗体および/またはその結合フラグメントは、好適なバッファー中でKlothoと複合体を形成する。例えば、バッファーは、約5.0~約10.0のpHを有する。例えば、バッファーは、4.5、6.5または7.4のpHを有する。例えば、バッファーは、HBS-EPバッファー、KRHバッファーまたはTris緩衝生理食塩水である。例えば、バッファーは、BSAおよび/またはTween20を含んでなる。

## 【0182】

例えば、形成された抗体：Klotho複合体だけが固相支持体上に残るように洗浄することにより、いずれの結合していないサンプルも除去することができる。例えば、結合していないサンプルを、場合によりウシ血清アルブミン(BSA)を含んでなるリン酸緩衝生理食塩水で洗浄する。

## 【0183】

ある態様では、検出抗体は標識および/またはタグとコンジュゲートする。

## 【0184】

例えば、検出抗体は、直接標識および/またはコンジュゲートされる。例えば、検出抗体は、間接的に標識および/またはコンジュゲートされる。間接的標識としては、例えば、蛍光または化学発光タグ、抗体に結合された金属、色素または放射性核種が含まれる。間接的標識としては、例えば、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ(AP)、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼおよびウレアーゼが含まれる。例えば、HRPは、

10

20

30

40

50

発色基質、例えば、過酸化水素の存在下で、450nmで検出可能な可溶性生成物を産生するテトラメチルベンジジンと併用可能である。

【0185】

さらに別の側面は、サンプル中の Klothoポリペプチドを検出するおよび/またはレベルを測定するアッセイであり、このアッセイは、

a) サンプルを本明細書に記載の抗体および/またはその結合フラグメントと、抗体：

Klotho複合体を形成する条件下で接触させること；ならびに

b) 抗体： Klotho複合体を検出および/または測定すること

を含んでなる。

【0186】

さらなる側面は、可溶性 Klothoを検出および/または測定するアッセイであり、この方法は、

a) 体液であるサンプルを本明細書に記載の抗体および/またはその結合フラグメントと、抗体：可溶性 Klotho複合体を形成する条件下で接触させること；ならびに

b) 抗体：可溶性 Klotho複合体を検出および/または測定すること

を含んでなる。

【0187】

ある態様では、アッセイは、折り畳まれた Klothoを検出するためのものであり、アッセイは、非変性または軽度変性条件下で行われる。

【0188】

ある態様では、複合体は直接検出され、例えば、抗体は検出可能なタグまたは融合部分で標識される。ある態様では、複合体は、抗体： Klotho複合体に特異的な二次抗体を用いて間接的に検出される。

【0189】

ある態様では、アッセイは、免疫沈降、イムノプロット、免疫組織化学または免疫細胞化学近接ライゲーションアッセイ (PLA)、質量分析に基づく技術と蛍光活性化細胞選別 (FACS)、近接ライゲーションアッセイ (PLA)、および質量分析に基づく技術である。

【0190】

ある態様では、本方法は、可溶性 Klothoを検出するためのものであり、例えば、サンプルは体液である。

【0191】

検出は、定量的方法を用いて、例えば標準または標準曲線と比較することによって定量または測定される方法を用いて行うことができる。

【0192】

ある態様では、体液サンプルは血液、または血清もしくは血漿などのその一部、または尿である。

【0193】

さらに別の側面は、対象において慢性腎臓病 (CKD) および急性腎障害 (AKI) から選択される腎不全をスクリーニング、診断または検出する方法に関し、この方法は、

a. 場合により本明細書に開示される抗体またはアッセイを用いて、対象由来のサンプル中の Klothoのレベルを測定すること；および

b. サンプル中の Klothoのレベルを対照と比較すること

を含んでなり、対照と比較したサンプル中の Klothoのレベルの低下が、対象がCKDまたはAKIから選択される腎臓病態を有することを示す。

【0194】

ある態様では、対照は、CKDまたはAKIの無い対象群から導かれた参照値、例えば、正常対照である。

【0195】

ある態様では、CKDは、早期CKD、場合により、病期1、病期2、または病期3、

10

20

30

40

50

病期 4、病期 5 または病期 6 CKD である。

【0196】

本開示のさらなる側面は、Klotho 欠乏のレベルを測定することにより評価される、CKD の進行もしくは AKI の進行もしくはそれが無いこと（例えば、疾患の回復または悪化）、または CKD における腎外合併症の予後を診断する方法である。

【0197】

よって、ある側面は、AKI 後の回復の見込みの予後を診断する方法であり、この方法は、

a. 対象由来のサンプル中の Klotho のレベルを測定すること；および

b. サンプル中の Klotho のレベルを対照、例えば、回復しなかったまたは進行した対象群から導かれた対照と比較すること

を含んでなり、対照と比較したサンプル中の Klotho のレベルの上昇が、対象の AKI 後の回復の見込みが高いことを示す。

10

【0198】

ある態様では、対照は、回復しなかった対象群から導かれた対照値であり、対照と比較したサンプル中の Klotho のレベルの低下が、対象の AKI 後の回復の見込みが低いこと、および/または疾病の進行の見込みが高いことを示す。

【0199】

別の側面は、AKI 後の長期合併症の見込みの予後を診断する方法であり、この方法は、

a. 対象由来のサンプル中の Klotho のレベルを測定すること；および

b. サンプル中の Klotho のレベルを対照、長期合併症を有する、もしくは長期合併症の数が多い対象群から導かれた対照値と比較すること

を含んでなり、

対照と比較したサンプル中の Klotho のレベルの上昇が、対象の AKI 後の長期合併症が少ない見込みが高いことを示す。

20

【0200】

ある態様では、対照は、長期合併症を有さないまたは長期合併症が少ない対象群から導かれた対照値であり、対照と比較したサンプル中の Klotho のレベルの低下が、対照の長期合併症を有する見込みが高い、または AKI 後の長期合併症の数が多いことを示す。

30

【0201】

さらなる側面は、CKD の進行の見込みの予後を診断する方法であり、この方法は、

a. 対象由来のサンプル中の Klotho のレベルを測定すること；および

b. サンプル中の Klotho のレベルを対照と比較すること

を含んでなり、

対照と比較したサンプル中の Klotho のレベルの上昇が（ここで、対照は、回復しなかった、または進行した対象群から導かれた対照値である）、前記対象の CKD からの回復の見込みが高いことを示す。

40

【0202】

ある態様では、対照は、回復しなかった対象群から導かれた対照値であり、対照と比較したサンプル中の Klotho のレベルの低下が、対象の CKD 後の回復の見込みが低いこと、および/または疾患進行の見込みが高いことを示す。

【0203】

さらに別の側面は、CKD における腎外合併症の予後を診断する方法であり、この方法は、

a. 対象由来のサンプル中の Klotho のレベルを測定すること；および

b. サンプル中の Klotho のレベルを対照と比較すること

を含んでなり、

対照と比較したサンプル中の Klotho のレベルの上昇が、対象の CKD 関連の腎

50

外合併症が少ない見込みがより高いことを示す。

【0204】

ある態様では、対照は、腎外合併症を有さない、または腎外合併症が少ない対象群から導かれた対照値であり、対照と比較したサンプル中の K l o t h o のレベルの低下が、長期合併症または C K D 後の多数の腎外合併症を有する見込みが高いことを示す。

【0205】

さらなる側面は、C K D または A K I などの腎不全病態を有する対象を経過観察する方法であり、この方法は、

a . 対象由来のサンプル中の K l o t h o のレベルを測定すること ; および

b . サンプル中の K l o t h o のレベルを他の従前の参照サンプルまたは他の対照と比較すること  
を含んでなり、

従前の参照サンプルまたは他の対照と比較したサンプル中の K l o t h o のレベルの上昇が、対象の腎臓病態が改善していること、および従前の参照サンプルまたは他の対照と比較したサンプル中の K l o t h o のレベルの低下が、対象の腎臓病態が悪化していることを示す。

【0206】

サンプルは例えば対象が処置を受けた後に採取され、例えば処置前のサンプルと比較することができる。あるいは、患者は、繰り返し間隔の後に、例えば処置または他の介入が必要であるかどうかを評価するために経過観察することもできる。ある態様では、検査を繰り返し、対象の進行を評価するためにプロットする。

【0207】

ある態様では、サンプルは、体液、例えば、血液、または血漿もしくは血清などのその画分であり、本方法は、例えば、可溶性 K l o t h o を検出する。ある態様では、体液は尿である。

【0208】

別の態様では、サンプルは、新鮮体液サンプルまたは組織サンプルなどの新鮮サンプル（例えば、無冷凍または 1 回冷凍（例えば、サンプル取得時に 1 回の冷凍））および反復冷凍サンプル（例えば、冷凍および解凍および冷凍体液サンプルまたは反復冷凍組織サンプル）から選択される。ある態様では、サンプルは、軽度固定サンプルなどの固定サンプルであり、固定は限定された変性および / または脱折りたたみを誘導する。

【0209】

ある態様では、K l o t h o のレベルが、本明細書に記載の抗体または結合フラグメントを用いて測定される。

【0210】

腎臓病を診断、検出もしくは経過観察する、または疾患合併症の予後を診断する本明細書に開示される方法は、腎臓病の従来診断技術に加えて、またはそれらと組合せて使用することができる。

【0211】

本明細書または実施例に記載されるいずれの抗体または抗体の組合せも、前記アッセイで使用可能である。

【0212】

I V . キット

さらなる側面は、滅菌バイアルなどのバイアルまたは他のハウジングに含まれ本明細書に開示される i ) 抗体および / もしくはその結合フラグメント、i i ) 核酸、i i i ) 組成物、または i v ) 組換え細胞と場合により参照薬剤および / またはその使用説明書を含んでなるキットに関する。

【0213】

ある態様では、本キットは、それぞれ配列番号 9、10 および 5 のアミノ酸配列を有する C D R - L 1、C D R - L 2 および C D R - L 3 を含んでなる軽鎖可変領域と、それぞ

10

20

30

40

50

れ配列番号 6、7 および 8 のアミノ酸配列を有する C D R - H 1、C D R - H 2 および C D R - H 3 を含んでなる重鎖可変領域とを有する付加的抗体および / またはその結合フラグメントをさらに含んでなる。例えば、付加的抗体および / またはその結合フラグメントは、s b 1 0 6 抗体および / またはその結合フラグメントである。

【 0 2 1 4 】

ある態様では、本キットは、成分を含んでなり、かつ / または本明細書に記載のアッセイの実施において使用するためのものである。

【 0 2 1 5 】

例えば、本キットは、E L I S A キットであり、第 1 の抗体、例えば、捕捉抗体、例えば、固相支持体に結合されたもの、および K l o t h o および / または捕捉抗体： K l o t h o 複合体と結合し、検出可能な標識とコンジュゲートされた第 2 の抗体、例えば、検出抗体を含んでなり得る。

10

【 0 2 1 6 】

本明細書に記載の抗体のいずれの組合せも使用可能である。

【 0 2 1 7 】

ある態様では、本キットは、診断キットであり、前記説明書は本明細書に記載の方法に向けられる。

【 0 2 1 8 】

上記の開示は一般に、本出願を説明する。下記の具体例を参照すれば、より完全な理解が得られる。これらの実施例は単に例示のために記載されるものであり、本出願の半を限定することは意図されない。状況が好都合であることを示唆すれば、または表せば、形態の変化および当業者物の置換が企図される。本明細書では特定の用語が使用されているが、このような用語は、説明の意味であって限定を目的としないことが意図される。

20

【 0 2 1 9 】

下記の限定されない例は、本開示の例示である。

【 実施例 】

【 0 2 2 0 】

実施例 1

合成抗体ライブラリーをスクリーニングし、ヒトおよび齧歯類 K l o t h o に対して高親和性を有する抗原結合フラグメント ( F a b ) を作製した。この新規な抗体 s b 1 0 6 を、組換えタンパク質、培養細胞、ならびにヒトおよび齧歯類由来の体液および組織を用いて特性評価した。ヒトおよび齧歯類の血清および尿中の K l o t h o レベルは正確に定量することができ、早期ヒト C K D では、血清および尿両方の K l o t h o が劇的に低下していることが示される。s b 1 0 6 抗体は、K l o t h o の型に特異的であり、現行の市販の K l o t h o 検出試薬に比べて、明瞭かつ特異的な方法で患者血清サンプルから K l o t h o を上手く捕捉することが最初に知られたものである。細胞において、この抗体は K l o t h o を免疫沈降させ、それを免疫細胞化学により標識することができる。動物では、この抗体は、血漿から K l o t h o を免疫沈降させるのに効果的である。s b 1 0 6 抗体の、体液から少量の K l o t h o を検出する能力は、この抗体を、K l o t h o のレベルが異常な疾患の診断のための有価な試薬とする。さらに、s b 1 0 6 抗体は、F G F 2 3 により媒介されるシグナル伝達経路を含む生理学的状態および病的状態の研究において研究試薬として有価である。この抗体は、酵素結合免疫吸着アッセイ ( E L I S A )、近接ライゲーションアッセイ ( P L A )、および質量分析に基づく技術などの様々な技術を用いる、血清などのヒトおよび齧歯類サンプル中の可溶性 K l o t h o に関する特異的アッセイで使用可能である。

30

40

【 0 2 2 1 】

実施例 2 : 二元 K l o t h o - F G F R 1 c 複合体の調製

ヒト F G F R 1 c のリガンド結合ドメイン ( D 1 4 2 ~ R 3 6 5 ) は、大腸菌 ( E . c o l i ) で発現され、封入体からイン・ピトロで再折り畳みされ、公開されている方法 [ 7 2、7 3 ] により精製した。マウス K l o t h o の細胞外ドメイン ( A 3 5 ~ K 9 8 2 ) は、

50

C末端FLAGタグとともにHEK293細胞で発現させ、KlothoエクストドメインとFGFR1cリガンド結合ドメインの二元複合体は記載のように作製した[9]。

#### 【0222】

##### sb106の単離および特性評価

Sb106は、合成ヒトFabファージディスプレイライブラリー(ライブラリーF)から単離された[74]。結合選択、ファージELISAおよびFabタンパク質精製は記載のように行った[67、75、76]。簡単に述べれば、96ウェルMaxisorp Immunoplates (Fisher Scientific、ネビアン、ON、カナダ)にて捕捉標的としてKlotho細胞外ドメインFGFR1cリガンド結合ドメインの二元複合体で複数回パンニングすることによりライブラリーFからのファージを循環させた。5回の選択後、96ウェル形式で増殖させた個々のクローンからファージを生成し、特異的結合クローンを検出するためにファージELISAを行った。結合を示したクローンに対してDNAシーケンシングを行った。競合的結合ELISAは、sb106-ファージを可溶性ヒトKlothoの希釈系(50~0.0005nM×1時間)とともにプレインキュベートした後、ヒトKlothoでコーティングしたELISAプレートに結合させることにより行った。sb106の重鎖可変および軽鎖ドメインをコードする遺伝子をそれぞれ軽鎖またはIgG1重鎖の生産用に設計されたベクターにクローニングし、sb106-IgGを293F細胞(InvivoGen、サンディエゴ、CA、USA)から発現させた。FabおよびIgGタンパク質をプロテインAアフィニティーカラム(GE Healthcare、ミシサガ、ON、カナダ)でアフィニティー精製した。

10

20

#### 【0223】

##### タンパク質の精製

FGFR1cリガンド結合ドメインとマウスKlothoエクストドメインの二元複合体(Klotho-FGFR1c複合体と呼称)を公開されているプロトコール[9]によって作製した。N末端ヘキサヒスチジンタグを有する成熟型のヒトFGF23(Y25~I251)を公開されているプロトコール[73、74、77]により、大腸菌で発現させ、精製した。

#### 【0224】

##### SPR分光法によるKlotho-FGFR1c複合体に対するFab結合の分析

リアルタイムタンパク質-タンパク質相互作用を、Biacore 2000表面プラズモン共鳴(SPR)分光計(Biacore AB/GE Healthcare)を用い、25、HBS-EPバッファー(10mM HEPES-NaOH、pH7.4、150mM NaCl、3mM EDTA、0.005%(v/v)ポリソルベート20)中で測定した。タンパク質は、研究級のCM5バイオセンサーチップ(Biacore AB/GE Healthcare)のカルボキシメチル(CM)デキストランに、それらの遊離アミノ基を介して共有結合させた。タンパク質をバイオセンサーチップ上に、流速50 $\mu$ l分<sup>-1</sup>で注入し、各タンパク質注入(180秒)の終了時に、解離をモニタリングするために180秒間、HBS-EPバッファー(50 $\mu$ l分<sup>-1</sup>)をチップに流した。タンパク質注入間で、10mM酢酸ナトリウム中2.0M NaCl、pH4.5、または10mMリン酸ナトリウム/カリウム、pH6.5を注入してチップ表面を再生した。データはBiaEvaluationソフトウェアバージョン4.1(Biacore AB/GE Healthcare)で処理した。各タンパク質注入で、対照フローチャンネルに関して記録された非特異的SPR応答をサンプルフローチャンネルに関して記録された応答から差し引いた。

30

40

#### 【0225】

ELISAにより選択されたFabがKlotho-FGFR1c複合体と結合するかどうかを調べるために、二元受容体複合体をCM5チップに固定化した(チップフローチャンネル約42fmolmm<sup>-2</sup>)。非特異的結合の対照とするために、Klothoの2つの細胞外グリコシダーゼ様ドメインのそれぞれと構造上関連のあるウシ-グル

50

クロニダーゼ (Sigma - Aldrich) をチップの対照フローチャンネルに結合させた (フローチャンネル約  $45 \text{ fmol mm}^{-2}$ )。100 nM の各 Fab をチップ上に注入した。対照として、GF23 の固定化 Klotho - FGFR1c 複合体への結合を調べた。

#### 【0226】

Fab が GF23 と競合し得るか、かつ/または Klotho - FGFR1c 複合体に結合し得るかを調べるために、GF23 を CM5 チップに固定化した (チップフローチャンネル約  $16 \text{ fmol mm}^{-2}$ )。FGF と構造上類似するが sFGFR 結合は示さない FHF1B [77] を、非特異的結合の対照として使用した (対照フローチャンネル約  $15 \text{ fmol mm}^{-2}$ )。10 nM の Klotho - FGFR1c 複合体 (HBS - EP バッファー) を混合した 100 nM の Fab をチップ上に注入した。対照として、溶液中で競合因子として GF23 を用い、結合競合を行った。

10

#### 【0227】

#### 細胞培養、動物およびヒト研究

細胞株：天然に Klotho を発現する正常ラット腎 (NRK) 細胞 (ATCC、マナサス、VA、USA)、およびベクター単独、全長膜貫通マウス Klotho、C 末端 FLAG タグを有するマウス Klotho の細胞外ドメイン、または全長マウス Klotho でトランスフェクトされた HEK293 細胞 [78]。細胞は 37、95 % 空気、5 % CO<sub>2</sub> 雰囲気中で培養し、10 % ウシ胎児血清、ペニシリン (100 U/ml)、およびストレプトマイシン (100 mg/ml) を添加した高グルコース (450 mg/dl) DMEM 中で継代培養した。

20

#### 【0228】

動物試験は、テキサス大学サウスウェスタン医療センター施設内動物実験委員会により承認された。動物は総て動物資源センターで飼育し、実験は完全に承認を受けた実験室で行った。使用した種は、Sprague - Dawley ラット (Harlan、インディアナポリス、IN)、Klotho トランスジェニック過剰発現体 (Tg - Klotho ; EFmKL46 系統) [79]、同型接合 Klotho 低次形態マウス (Kl/Kl) [80]、およびそれらの野生型同腹子 (129sv バックグラウンド) を含む。

#### 【0229】

臨床歴および慣例の検査データは電子カルテから取得した。前肘静脈穿刺からの血液サンプルを回転させ、血清を -80 で凍凍した。新鮮尿は、4,000 g で回転させ、上清を -80 で凍凍した。

30

#### 【0230】

#### 免疫細胞化学および免疫組織化学

HEK293 細胞をベクターまたは示されている Klotho プラスミドでトランスフェクトし、ポリリシンで前処理した 12 ウェルのカバーガラス上に播種し ( $1.8 \times 10^5$  細胞/ml)、一晚増殖させた。細胞を洗浄し (4 PBS x 3)、3% パラホルムアルデヒドで固定し (4 x 10 分)、洗浄し (氷冷 PBS x 3)、1% BSA (PBS 44 x 10 分) でブロッキングし、sb106 - Fab (1% BSA、PBS 中 5 ug/ml) とともにインキュベートし、洗浄し (PBS 4 x 5)、抗 FLAG - Alexa488 (Cell Signaling; 1% BSA を含有する PBS で 1:400 希釈; 1 時間; 20) とともにインキュベートし、洗浄し (PBS; 4 x 4)、次いで、DAPI (Invitrogen) とともに 1 滴の退色防止剤を含むスライドガラス上に逆さに置き、暗所、室温で乾燥させた。24 時間後、これらのスライドを -20 で保存した。画像は WaveFX スピニングディスク型共焦顕微鏡で取得した。

40

#### 【0231】

副甲状腺および甲状腺 (気管と一体) を成体 Sprague Dawley ラットから得た。非固定新鮮副甲状腺の場合には、組織を OCT 媒体に包埋し、すぐに液体 N<sub>2</sub> 中で予冷したイソペンタンを用いて凍凍した。固定副甲状腺サンプルの場合には、組織を BS pH 7.4 中 4% パラホルムアルデヒド中に 4 で一晚浸漬し、PBS で洗浄し、OC

50

T媒体に包埋し、液体N<sub>2</sub>中で予冷したイソペンタンを用いて冷凍した。4 μm厚のクリオスタット切片を作製し、PBS中で洗浄し(15分)、0.1% Triton X-100中で透過処理を施した(10分)。標識については、切片をブロッキングし(PBS、1.5% BSA、10% ヤギ血清; 40分)、一次抗体sb106(ブロッキング溶液中21 μg/ml; 4で一晚)とともにインキュベートした。洗浄後(PBS)、切片をAlexa 546ヤギ抗ヒトIgG(1:800希釈、Invitrogen)とともに室温で1時間インキュベートした。PBSでさらに洗浄した後、切片をPBS中4%パラホルムアルデヒドで固定し、PBSで洗浄し、マウントし、Zeiss LSM510顕微鏡で可視化した。

【0232】

#### 実施例3: Klothoアッセイおよび詳細な方法

ELISAは、製造者(Immuno-Biological Laboratory、日本)が説明しているように行った。IP-IBアッセイについては、一般に、50 μlの血清または尿をKRHバッファー[25 mM Hepes-NaOH(pH7.4)、120 mM NaCl、5 mM KCl、1.2 mM MgSO<sub>4</sub>、1.3 mM CaCl<sub>2</sub>、1.3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]で希釈して終容量0.5 mlとし、低結合シリコン処理チューブにて、2 μgのsb106-Fabとともに一晚4でインキュベートした。KRHバッファーで3回予備洗浄した、抗FLAG抗体(50% v/v)をコンジュゲートしたセファロースビーズ(50 μL)を加え、インキュベートし、(4 × 2時間)、洗浄した(KRH-チューブ当たり500 μl 3回; 22)。免疫複合体を2 × SDSサンプルローディングバッファー(50 μl; 100 × 3分; 4 × 3分; 回転)で溶出させ、SDS-PAGEで分画し、ニトロセルロース膜に転写し、抗KL1抗体(KM2076、1:4000または3.1 mg/ml、1:10000希釈)および希釈剤(Dako #S3022、カービンテリア、CA、USA)で一晩(4、揺動器)でプロットした。膜を洗浄し(3回、0.1% Tweenを含むTris緩衝生理食塩水; TBS-T)、抗ラットIgG2A(LSBio cat #LS-C59051、5% 乳汁/2% ヤギ血清/TBS-T中1:20000 × 1時間)に曝し、洗浄した(×3 TBS-T)。化学発光については、膜をSuperSignal West Femto Maximum Sensitivity基質(Thermo Scientific、ロックフォード、IL、USA)で覆い、30~90秒間露光した。130 kDのバンドをスキャンし、Adobe Photoshop CS4を用い、既知量のKlothoの内部対照サンプルと比較した。

【0233】

#### 実施例4: 抗Klotho合成Fabの同定

線維芽細胞増殖因子受容体(FGFR)1cのリガンド結合ドメインとの組換えKlothoエクトドメイン複合体に対するファージディスプレイ合成Fabライブラリーの複数回のバイオパンニングの後、いくつかの結合ファージを同定した。クローンsb106(図1A)をさらなる特性評価のために選択した。ファージELISA(図1B)において、sb106-ファージはヒトおよびマウス両方のKlothoと結合し、このことは種交差反応性を示し、また、Klotho単独またはFGFR1cとの複合体いずれかと結合し、このことはそのエピトープが補助受容体複合体の形成によって隠されていないことを示す。sb106-ファージは、FGFR1c単独、ニュートラアビジン(NAV)またはウシ血清アルブミン(BSA)とは結合しなかった。sb106は、ヒトKlothoと一桁ナノモルの範囲の親和性で結合する(IC<sub>50</sub> = 1.7 nM、図1C)。sb106-Fabはまた、バイオセンサーチップ上に固定化されている二元Klotho-FGFR1c複合体とも高い親和性で結合し(図7A)、それはFGF23、KlothoおよびFGFR1cの間の三元複合体の形成に干渉しない(図7B)。

【0234】

#### 実施例5: 抗KlothoFab sb106の特性評価

sb106のユニークなCDR配列(図1A)を用い、Fabおよび全長IgGタンバ

10

20

30

40

50

ク質の両方を生産した（例えば、Fabは細菌細胞で、IgGタンパク質は293F細胞で生産した）。sb106は、天然条件下でKlothoに対して反応性が高かった。変性条件下でのマウス、ラット、およびヒト腎組織に対するイムノプロットシグナルは弱かったが、Klothoを過剰発現するトランスジェニックマウス由来のサンプル[79]では、sb106-Fabは、Klothoの全長細胞外ドメインに相当するバンドを検出した（図2A）。培養細胞では、sb106-Fabは、天然Klothoを発現するNRK細胞を用いた変性条件下でのイムノプロットではKlothoを検出できなかったが、KlothoでトランスフェクトされたHEK293細胞からの細胞溶解液では過剰発現抗原を検出できた（図2B）。新鮮冷凍非固定ラット副甲状腺組織（およびKlothoを発現することが知られる他の組織Iを用いた免疫組織化学では、sb106-IgGはKlothoを検出したが、同じ組織が固定された場合には陰性であり（図2C）、このことはsb106が天然の折り畳みのFGFR1-Klotho複合体と結合することを示唆する（図1B）。新鮮固定細胞を用いた免疫細胞化学染色では、Klothoを異種過剰発現するHEK293細胞で明白な染色が得られたが、Klothoを過剰発現する細胞では見られなかった（図2D）。細胞をポリリシンで処理した12ウェルカバーガラス上に $1.8 \times 10^5 / \text{ml}$ で播種し、一晚増殖させた。細胞を氷冷PBSで3回洗浄し、氷上で10分間固定し（3%パラホルムアルデヒド）、冷PBSで3回洗浄し、10分間ブロッキングした（冷PBS中1%BSA）。次に、細胞をsb106-Fab（PBS中1%BSA中 $5 \mu\text{g} / \text{ml}$ ）とともに1時間インキュベートした。細胞を冷PBSで5回洗浄し（各2分）、次いで、抗FLAG-Alexa488（Fab軽鎖のC末端はFlagエピトープタグを含む）とともに光から保護しながら1時間インキュベートした（PBS中1%BSA中1:400）。細胞を冷PBSで4回洗浄した（各5分）。次に、カバーガラスを、DAPIとともに1滴の退色防止剤を含むスライドガラス上に逆さに置いた。画像はスピニングディスク型共焦顕微鏡で取得した。Klothoを過剰発現する細胞であっても、固定の延長はsb106による染色を著しく低下または無効にした。これらのデータは、sb106が天然の折り畳みのヒト、ラット、およびマウスKlothoと特異的に反応し、変性したKlothoタンパク質とは反応しないことを示す。

【0235】

#### 実施例6：Klothoの免疫沈降

sb106-Fabの可溶性Klothoを沈降させる能力を、一連の免疫沈降-イムノプロット(IP-IB)アッセイを用いて試験した。sb106-Fabは、全細胞溶解液および馴化細胞培養培地およびKlotho過剰発現細胞からのKlothoを捕捉した（図3A）。捕捉されたsb106-Fabを、HEK293細胞において、C末端FLAGタグを有する可溶性Klothoを用い、抗FLAG抗体の場合と比較した。sb106-Fabおよび抗FLAGは、正確に同じ電気泳動移動度のタンパク質を沈降させた。

【0236】

sb106-Fabは、ヒト、マウス、およびラット血清から、抗Klotho抗体KM2076と反応した約130kDaのタンパク質を沈降させた（図3B）。尿由来のIPもまた130kDaのバンドを示したが（図3B）、IP後の尿サンプルはイムノプロットにおいてそのようなバンドを示さなかった。sb106によるIP-IBバンドの真正性をさらに裏づけるために、このバンドの強度を正常者とCKD病期5の患者由来のヒト血清および野生型マウスと同型接合Klotho低次形態由来の血清で検討した（図3C）。ヒト進行性CKDでは約130kDaのバンドのみが低下しており（図3C）、Klotho欠損マウス(k1/k1)には存在しなかった[80]。

【0237】

#### 実施例7：ヒトCKDにおけるKlothoレベル

IP-IB法がCKD患者の単一施設データベースから血清Klothoレベルを相対的に決定できるかどうかを判定するために、この方法を試験した。アッセイの直線性な

10

20

30

40

50

らびに延長される y 切片を調べるために、組換えヒト Klotho を既知量で添加した。IP-IB は、一定範囲の異なる濃度の組換え Klotho を添加した正常健常ボランティアおよび病期 5 CKD の患者からの血清を用いて行った (図 4 A)。漸増接種される外因性 Klotho とともにシグナルの段階的増強が見られた。CKD 患者由来の血清もまた外因性 Klotho の増加とともにシグナルの増強を示したが、任意の所与の Klotho 濃度では、シグナル強度は正常血清より低かった。

#### 【0238】

興味深いことに、健常ボランティア由来の血清は、プロテアーゼ阻害剤カクテルの不在下または存在下で同じシグナルを与えたが、CKD 患者由来の血清は、プロテアーゼ阻害剤の存在下で測定された Klotho レベルに顕著な上昇を示した (図 4 B)。これらの所見は、尿毒症の安定な定常状態では内因性 Klotho が存在し、一方、外から加えた Klotho は毒症血清中ではタンパク質分解を受け得るが、正常血清では受けないことを示唆する。この添加実験の定量概要を図 4 C に示す。健常および CKD 血清は両方とも、Klotho 接種に対して直線的応答を示したが、CKD 血清からのシグナルは傾きがより低かった。プロテアーゼ阻害剤が含まれた場合、CKD 直線の傾きはその切片に影響を与えずに健常対照の傾きに近づいた。ゼロ接種への延長は、正常個体由来の血清が 31.1 pM の Klotho を有し、CKD 患者由来の血清は 8.5 pM の Klotho を有していたことを示した。同様の推定が、正常腎機能を有するまたは CKD を有する他の複数の対象から得られた。

10

#### 【0239】

CKD 診療所から動員された患者の性質は、糖尿病および高血圧症が優勢である CKD の全国的プロフィールに類似している (表 1)。分散しているにもかかわらず、CKD の病期とともに Klotho の明瞭な段階的低下が見られる (図 5 A)。血清 Klotho の低下は CKD の早期に見られ、高い FGF 23、高い PTH、および高リン酸塩血に先立った (表 1)。同じサンプルを用い、IP-IB アッセイを市販の Klotho ELISA キットと直接比較した (図 5 B)。全体的に見れば、二者の間で相関が見られるが、一致ラインの両側に分離が見られる。新鮮サンプルでは、ELISA は、IP-IB より高い値を示すが (一致ラインの左側に灰色の菱形、図 5 B)、1 回以上の冷凍-解凍を経たサンプルでは、ELISA 値はずっと低い (一致ラインの左側に黒い菱形、図 5 B)。全く同じサンプルを反復冷凍-解凍の前後に 2 つの方法により試験した場合、IP-IB アッセイはより安定な結果を示したが、ELISA 値は急速に落ち込んだ (図 5 C)。

20

30

#### 【0240】

尿を直接免疫プロットすることにより、ヒト CKD 患者における低い尿 Klotho が従前に記載されている [12]。sb106-Fab を用いた IP-IB アッセイは、CKD 患者における尿 Klotho の劇的な低下を示した (図 6 A)。血清からの対比において、ELISA では尿で IP-IB アッセイにより匹敵する値が得られたが、Klotho 濃度の低下の規模は、ELISA よりも IP-IB アッセイにより検出した場合により劇的である (図 6 B)。これらの結果は、ヒト CKD が血清および尿の両方において Klotho 欠乏の状態であることを示す。

40

#### 【0241】

ゆえに、免疫沈降-イムノプロット (IP-IB) アッセイを用いて、全長可溶性 Klotho の血清および尿の両レベルをヒトで測定し、ヒト CKD が血清および尿中の Klotho 欠乏と関連することが確認された。Klotho レベルは、CKD 病期とともに段階的低下するミネラル代謝およびレベルの他のパラメーターの障害に先立って早期 CKD で検出可能に低下した。外から加えた Klotho は、CKD 環境においては本質的に不安定である。

#### 【0242】

抗体に基づく試薬は、研究および臨床現場の両方で、タンパク質の検出、タンパク質単離および精製、および多くの下流適用のために有価なツールである。Klotho 検

50

出に利用可能な市販の試薬に限られており、例えば、天然の折り畳みの K l o t h o タンパク質を特異的に検出するための抗体は存在しない。さらに、K l o t h o 検出用の市販の E L I S A キットでは価値の高い結果が得られる。

#### 【0243】

設計された抗原結合部位を有する合成抗体は、標的の莫大なレパートリーの分子認識のために微調整および仕立てることができる。イン・ビトロファージディスプレイと組み合わせ、自己反応性抗体を排除する免疫寛容機構の不在下で選択が行われる。抗体ライブラリーを用いた選択により、天然の折り畳みのヒト、マウスおよびラット K l o t h o に特異性を有する抗体として s b 1 0 6 が得られた。

#### 【0244】

ミネラル代謝におけるその役割に加え、可溶性 K l o t h o は、多くの体液中に循環し、体中で細胞の健全性を維持する複数の「ハウスキーピング」機能を有する。可溶性 K l o t h o の作用機序は不十分な理解に留まっているが、K l o t h o 欠乏の生物学的影響は疑う余地無く示されている [ 8 1 ]。K l o t h o 転写産物は複数の臓器に存在するが、はるかに腎臓が最高の発現を示す [ 8 0 ]。C K D は複数の代謝の混乱状態であり、排泄不足の内因性および外因性毒素の蓄積ならびに健康の維持を担う物質の欠乏からの複合症候群である。

#### 【0245】

試験動物において、A K I および C K D の両方が全身性の K l o t h o 欠乏の状態であるという証拠がある。これは早期かつ高感度のバイオマーカーとなるだけでなく、K l o t h o の回復は腎機能障害を改善することができる。その腎保護効果とは独立に、K l o t h o はまた C K D の腎外合併症も軽減することができる [ 1 2、8 2 ]。前臨床データに基づけば、抗 K l o t h o 抗体は、診断値と予後値の両方を持ち得る。

#### 【0246】

#### I P - I B アッセイのバリデーションおよび市販の E L I S A との比較

K l o t h o に関して利用可能な市販のアッセイには、それらの間に一貫した相関がない [ 4 6、8 3 ]。E L I S A に基づく健常ヒトおよび C K D 患者における研究 [ 5 8 ] からは矛盾した結果が得られている。正常および C K D における K l o t h o の絶対レベルは 0 . 4 [ 4 7 ] ~ 2 0 0 0 p g / m l 超 [ 4 1 ] までの範囲であり、ほとんどの測定値は 1 0 0 代の半ばから後半である [ 4 8、5 0、5 5、5 8 ~ 6 0、8 3 ]。このアッセイに基づけば、K l o t h o レベルは糸球体濾過速度 ( G F R ) の低下とともに低くなる [ 4 8、5 2、5 4、5 7 ~ 6 0 ]、関連は無い [ 4 0、4 1、5 0、5 1、5 3 ] または上昇すらする [ 4 4、4 7 ] ことが記載されている。同様に、K l o t h o レベルは、年齢とともに変化しない、低下することも報告されている [ 4 2、5 3、5 8、5 9 ]。このことはヒト K l o t h o データの解釈をほぼ不能とし、異なる施設から得られた収集データには価値がない。

#### 【0247】

天然の折り畳みの立体配座にある K l o t h o を認識する高親和性合成抗体 ( 図 1 ~ 3 ) を作製した。s b 1 0 6 - F a b または I g G は、細胞溶解液、培養培地、血清、および尿から K l o t h o を捕捉する。付加的なバンドは K l o t h o のより短いフラグメントであり得るが、これらのバンドの強度は k l / k l マウスで低下せず、この可能性については議論がある。約 1 3 0 k D a のバンドはどれが全長可溶性 K l o t h o であるか、時には、E L I S A が達成できないことについて分析された。

#### 【0248】

添加実験の直線性は、接種された K l o t h o の総てが検出されることを示す ( 図 4 )。予期されなかった発見は、外から加えた組換え K l o t h o は尿毒症血清中でタンパク質分解を受けるが、正常血清ではこのような現象は見られなかったということであった。このことは、腎臓病における低 K l o t h o が単に生産の低下によるものであって、さらなる機構および研究のための新たな道を拓くという見解に異議を投げかける。C K D における K l o t h o 欠乏の新たな機構を明らかにすることに加え、これは組換え

10

20

30

40

50

Klothoの置き換えに関して重要な遺伝子を持ち得る。

【0249】

CKDの進行とともに血清 Klothoには段階的な低下が見られる(図5A)。IP-IBアッセイの変動係数は、血清では4%、尿では7%であった。IP-IBアッセイはまた、進行したCKDでは極めて低い尿 Klothoを示した(図6)。実際に、この尿 Klothoの低下は血清におけるものよりも劇的であり、CKDのより高感度のマーカーと言える。

【0250】

IP-IBおよび市販のELISAは両方とも、CKDにおいて低い尿 Klothoを検出したが、Klothoの絶対レベルはELISAアッセイで悠に高く、低下パーセントはIP-IBアッセイの場合と同じではない。CKDにおける尿 Klothoレベルの激的な低下では、これら2つのアッセイは、量的な違いはあるものの同じ結論を出した。血清中の状態は異なる。全体的として正の相関があるものの、これらの2つのアッセイの比較は完全に2群に分離した(図5B)。新鮮サンプルはELISAでより高い測定値を示したが、保存サンプルはELISAで極めて低い結果を出した。1つの可能性は、ELISAが Klothoおよび新鮮サンプル中で反応中の他のいくつかのアクチンを測定しているということである。IP-IBアッセイは反復冷凍-解凍によっていくらか有効性を失っていたが、これはELISAの場合にはるかに重大な問題となる。

【0251】

IP-IBアッセイのもう1つの利点は、それがヒトおよび齧歯類の両方で等しく十分に Klothoを測定できるということであるが、齧歯類において現在利用可能なELISAの使用は、それは汎 Klotho欠乏の状態であるCKDを有するラットで極めて高い循環 Klothoレベルを検出するので、問題となる可能性がある[68]。

【0252】

実施例 8

付加的CDR配列を表2に示す。相同な突然変異が各アミノ酸位置に導入されたが、これは、各位置に関して、元のアミノ酸が保持されたか、またはそのアミノ酸に最も近い「ホモログ」(例えば、保存的アミノ酸変化)が導入され、新たなFabファージライブラリーが構築されたことを意味する。Klotho-FGFR1c複合体を抗原として用い、新たなライブラリーを用いて選択を行った。抗原に結合したクローンを単離し、配列決定を行い、表2に示す。結合親和性はSb106と同等またはそれより良好であると思われる。

【0253】

実施例 9：ヒト試験

右心カテーテル法を受けた9名のヒト対象(49.066.2歳)を本試験に登録した。右心カテーテル留置中に、腎上部および腎下部大静脈血液サンプルを得、4 で遠心分離後すぐに血清を分離し、その後の試験のために-80 で保存した。血清 Klothoを、本明細書に記載の免疫沈降-イムノプロットアッセイにより決定した。簡単に述べれば、0.1mlの血清を合成抗 Klotho Fab(sb106)で免疫沈降させ、免疫複合体をLaemmliサンプルバッファーで溶出させ、KM2076抗体でイムノプロットを行った。130kDの移動度に基づくオートラジオグラム上の特異的シグナルを、ImageJプログラム(National Institutes of Health(NIH)、ベテスダ、メリーランド州)で定量した。

【0254】

動物試験

Klotho低次形態(kl/kl)マウス、kl/klマウスおよびそれらの野生型(WT)同腹子をテキサス大学サウスウェスタン医療センターの動物研究センターで維持した。当時点で、総てのマウスが129 S1/SV1mJ(129 SV)バックグラウンドで、6~8週間である。正常Sprague-Dawley(SD)ラット(体重220~250g)はCharles River Laboratories(ウェ

10

20

30

40

50

ルミントン、MA)から購入した。Klothoクリアランス試験では、ラットに両側腎摘(無腎ラット)または腎臓の手動操作を伴う開腹(シャムラット)を施した。ラットまたはマウスに、用量0.1mg/kg体重の組換えマウスKlothoタンパク質(rMK1)の標識全長細胞外ドメイン(R&D Systems、ミネアポリス、MN)を静脈内または腹腔内に1回注射した。セクレターゼが血中Klothoを調節するかどうかを調べるため、塩酸ドキシクリン(Sigma-Aldrich、セントルイス、MO)、25mg/kg/日のセクレターゼ阻害剤、および/または2.5mg/kg/日のセクレターゼ阻害剤III(Calbiochem、ビレリカ、MA)を正常WTマウスの腹腔内に、2日間毎日注射し、48時間の時点で血液および腎臓を採取し、血清および腎臓のKlothoを決定した。

10

【0255】

抗体

ラットモノクローナル抗ヒトKlotho抗体KM20761, 2を免疫プロット法および免疫電子顕微鏡に使用し、合成抗Klotho抗体sb10663を血清Klothoの免疫沈降に用いた。

【0256】

ラットおよびマウスにおける標識Klothoのクリアランス

正常Munich Wistarラット(BW220~250g)をイナクチン(100mg/kg BW)で麻酔し、標識Klothoボラスを頸静脈から注射した(0.1mg/kg BW)。125I標識Klothoまたは125I標識アルブミンの注射試験では、ボーマン嚢のフリーフロー微小穿刺および近位尿細管による体液回収を、公開されている方法を用いて行った。簡単に述べれば、左腎を露出させ、左尿管に尿回収のためのカテーテル留置を行った。リサミングリーン色素注射後にそれらの特徴的な輪郭により近位尿細管を特定し、ガラスキャピラリーで穿刺した。体液の容量は校正済みの定孔径ガラスキャピラリーで測定した。体液の放射活性は、シンチレーション計数で決定し、体液容量に対して正規化した。明示された時点で、眼窩後静脈洞から血液を採取し、スポット尿を採取した。採取した尿および血清中の125I標識Klothoまたは125I標識アルブミンをシンチレーション計数により定量した。種々の臓器のホモジネートを作製し、臓器ホモジネート中の放射活性をシンチレーション計数により測定し、臓器ホモジネート中のタンパク質に対して正規化した。臓器切片(10mm)に対してオートラジオグラフィーを行った。

20

30

【0257】

免疫電子顕微鏡

マウス組換えKlothoタンパク質(0.1mg/kg BW)をkl/klマウスの腹腔内に注射し、注射24時間後にマウスを犠牲にした。腎臓を採取し、大動脈灌流により2.5%パラホルムアルデヒドで固定し、取り出し、4%パラホルムアルデヒド中で後固定した(4時間)。超薄冷凍組織切片の免疫金標識を記載ように行った。21の腎皮質に2.3Mスクロースを一晩潤させ、液体窒素中で冷凍し、70~80nm厚の切片を作製し(Ultramicrotome Reichert Ultracut E; Leica Microsystems、ウェットラー、ドイツ)、ホルムバルコーティングニッケルグリッドにマウントした。これらの切片をKM2076抗体とともにインキュベートした後、金コンジュゲートプロテインA(10nm金粒子、Sigma-Aldrich)とともに60分間インキュベートした。酢酸ウラニル染色の後、切片をJeol 1200 EX透過型電子顕微鏡(Jeol Ltd.、昭島、日本)で可視化した。

40

【0258】

結果

循環Klothoの生産および運用における腎臓の役割を調べた。直接穿刺による正常ラットの腎上部および腎下部大静脈中の、および右心カテーテル法を受けたヒト対象のKlothoタンパク質の血清レベル。総ての患者がeGFR 60ml/分/1.7

50

3 m<sup>2</sup>を示した。ラットおよびヒト血清サンプルの両方で、同等の静脈洞 Klotho レベルの腎下部 / 腎上部増分が見られた。血清 Klotho レベルを周知の腎由来ホルモンである血清エリスロポエチンに対してプロットし、血清エリスロポエチンが上昇すると、および腎下部 / 腎上部大静脈からの血清クレアチニン (SCr) が低下し、一方。

Klotho は層化することが見出され、このことは臓が循環中に Klotho を分泌することを示す。

#### 【0259】

ラットから両腎臓を除去した場合、血清 Klotho レベルは、1日ですべて正常レベルの約半分に著しく低下した。無腎状態は、試験を40～50時間より長く継続することを許容しなかった。

#### 【0260】

循環からの Klotho クリアランスの方法を調べた。無腎ラットの循環外因性 Klotho タンパク質のレベルは、注射直後の正常ラットの場合と同等であったが、正常ラットにおける外因性 Klotho タンパク質の半減期は、無腎ラットの場合よりもはるかに短く、腎摘時の内因性 Klotho の半減期は、無腎ラットの外因性 Klotho の場合に極めて近似している。静注した外因性標識 Klotho の解剖学的運命を調べるさらなる試験は、Klotho の取り込みならびにその排泄の主要な臓器であり得ることを裏づけた。

#### 【0261】

注射された標識 Klotho タンパク質は、主として腎臓および脾臓、わずかながら心臓に分布し、大動脈、脳、および筋肉では検出できなかった。血清および尿中の放射性標識された外因性 Klotho のクリアランスを追跡するさらなる試験は、Klotho タンパク質が血液から腎臓を経て尿へ排除されることを裏づけた。

#### 【0262】

これらの、またさらなる試験に基づき、(1) 腎臓は可溶性 Klotho を生産し、Klotho のエクストドメインの、セクレターゼを介した放出によって体循環へ放出すること、(2) 腎臓は可溶性 Klotho を循環から排除するための重要な臓器であること、(3) Klotho は、腎尿細管を通過して基底外側から細胞内部へ移動し、その後、頂端膜を経て尿管腔内へ分泌されることが決定付けられた。

#### 【0263】

#### 実施例 10: Klotho と結合するさらなる抗体の同定

Klotho に対する元の抗体試薬 sb106 (クローン 48)、ならびに sb106 に由来する CDR 変異体は総て、単一の共通エピトープに結合する。検出アッセイを確立するためには、1つの表面 / エピトープはタンパク質を単離または捕捉するために使用されるが、検出試薬のためには第2の全く別のエピトープが必要とされるので、異なるエピトープを有する抗体が必要である。よって、sb106とは異なり、全く別のエピトープと結合する抗体を同定するための別の選択戦略を行った。Klotho に対するこれらの抗体は、ヒト Klotho の細胞外ドメイン (ECD) に対して、飽和レベルの sb106 Fab (50 μg/ml) の存在下で行われる抗体ファージディスプレイ選択により同定した。R&D Systems (5334-KL) から購入したタンパク質は

#### 【0264】

合成抗体ライブラリー (Persson et al, 2013 J Mol Biol) から合計 31 の新たな抗体が同定され、最初の Klotho 抗体である sb106 の存在下および不在下で Klotho と結合することが示された (図 9)。これらのクローンの CDR を表 3 に示し (3A にアミノ酸配列、および 3B および 3C にヌクレオチド配列)、全長配列の例を表 4 に示す。これらのクローンにまず名称を与え、次に ID 番号を与えた。ここでは両方を参照のために示す。

#### 【0265】

総ての配列を Fab 発現ベクター (RH2.2) にサブクローニングし、発現させ、精

10

20

30

40

50

製した。ファージの場合と同様に、総ての Fab クローンが ELISA により標的抗原と結合する (図 10)。

【0266】

#### 実施例 11：エピトープ分類

このさらなる抗体のセット内に Klotho 上の少なくとも 2 つの新たなエピトープが存在する。競合 ELISA 戦略を用い、エピトープ分類試験を行った。このセット内に多数のクローンが得られたので、予備試験で、sb106 (48) が結合するものとは別の 2 つの全く別のエピトープが明らかになった。これらのエピトープの代表的なもの (4804 および 4819) を次に、セット内の各クローンの評価のために sb106 (48) とともに使用した (図 11)。sb106 (48) がエピトープ A を表す場合、新規クローンのうち 23 がエピトープ B に分類され、エピトープ C に関しては 4 クローンが見出された (図 11 および表 5 に要約)。3 つのクローン (4806、4810 および 4817) については、ファージによる問題のために決定はされなかった。クローン 4828 は、提示された 3 つのエピトープのいずれとも競合を示さなかった。

10

【0267】

#### 実施例 12：親和性評価

各抗体に関する親和性評価は、表面プラズモン共鳴 (SPR) によって決定した。Fab を、抗 H+L 抗体を用いて固定化し、Klotho の希釈系を注入した。結合曲線を図 12 に示し、結合親和性 (KD) を表 5 に要約する。親和性は 240 pM ~ 8.7 nM の範囲である。

20

【0268】

#### 実施例 13：免疫沈降

抗体を、ヒト患者尿サンプルから Fab として Klotho を免疫沈降させるそれらの能力に関してアッセイした (図 13)。正常ボランティアからの 50 uL のヒト尿サンプルを、4 で一晩、1 ug/ml の Fab (sb173-203、sb106) を含む 400 uL の KRH バッファー内でインキュベートした。次に、50 uL の M2 抗 FLAG セファロースビーズを加え、4 で 2 時間インキュベートした (Fab 軽鎖の C 末端は FLAG エピトープタグを含む)。これらのビーズを 500 uL の KRH バッファーで 3 回洗浄し、結合したタンパク質を 100 mM DTT を含有する 2x LDS サンプルローディングバッファーで溶出させた。イムノプロットは、市販の一次ラット抗 Klotho 抗体 (KM2076)、次いで、可視化のための標準抗ラット IgG 二次抗体で行った。Super Signal West Femto 基質を化学発光基質として使用した。半数を超えるクローンが sb106 と同じかより良好に挙動した。

30

【0269】

#### 実施例 14：ELISA

新規エピトープ (B では 4808、および C では 4831) を呈する選択クローンを全長 IgG にサブクロニングし、発現させ、精製し、さらに sb106 (48) とともに特性評価を行った。全長 IgG を 1 ug/ml で固定化し (捕捉)、1% BSA を含有するバッファーでブロックした後、捕捉バッファー (Tris 緩衝生理食塩水 pH 7.4 + 0.1% BSA + 0.05% Tween 20) 中 20 ng のビオチン化 Klotho (aa34~981)、20 ng のビオチン化 Klotho (aa1~549) のいずれかとともに、または捕捉バッファー単独 (BSA) で、室温で 1 時間インキュベートした。PBS + 0.05% Tween 20 で洗浄した後、捕捉されたビオチン化 Klotho を、HRP-ストレプトアビジン試薬を用いて検出した。比色定量 HRP 試薬は 450 nm での吸光度の測定を可能とする。3 つの IgG は総て、予想通り、溶液から Klotho を捕捉したが (図 14)、4831 だけが Klotho の末端切断型の ECD を検出でき、sb106 とのエピトープ認識の違いをさらに特徴付けた。

40

【0270】

最後に、溶液中での Klotho の検出のために、3 つの全く別のエピトープクローンのそれぞれを捕捉および検出抗体が互いに対として使用されるように ELISA のマト

50

リックスを実施した(図15)。全長IgGを1ug/mlで固定化し(捕捉)、PBS+5%BSAでブロッキングし、次いで、5nMのKlothoとともに室温で1時間インキュベートした。PBS+0.05%Tween20で洗浄した後、次に、サンプルを同じIgGのビオチン化調製物とともに室温で30分間インキュベートした(検出、\*b)。再び洗浄した後、結合したIgGを、HRP-ストレプトアビジン試薬を用いて検出した。比色定量HRP試薬は、450nmでの吸光度の測定を可能とする。二反復のデータ点を示す。灰色は自己に対する自己を強調する。これらの試験は、抗体が結合する3つのエピトープが、好適には、診断キットにおける所望の使用目的に関して互いに適合することを示す。

【0271】

実施例15：ヒトおよびマウス Klotho に対する交差反応性

ヒトおよびマウス Klotho に対する交差反応性を評価するために、ヒトおよびマウス Klotho の両方を用いて Fab ELISA を行った(図16)。Fab(5ug/ml)を、固定化した Klotho ヒト、マウス、または陰性対照としてのニュートラアビジン(NA)およびSBAとともにインキュベートした。結合していないFabを洗い流した後、結合したFabを、HRPコンジュゲート抗Flag抗体(Fabはそれらの軽鎖の末端にFlagタグを有する)を用いて検出した。比色定量HRP試薬は、450nmでの吸光度の測定を可能とする。

【0272】

Klotho Fabを選択するための、ヒトおよびマウス抗原に対する推定親和性は、Protein XPR36に対する表面プラズモン共鳴によって得た(図17)。Fabを、抗IgG(H+L)抗体を用いて捕捉し、Klothoの希釈系を注入した。結合曲線はラングミュアモデルに当てはめた。(A)決定されたKon、KoffおよびKD値。(B)および(C)それぞれヒトおよびマウス抗原に関する結合曲線。

【0273】

実施例16：Klotho - FGFR1c 複合体に対する Fab 結合

Fabタンパク質(クローン4804~4824、4826~4834)をELISAプレート(Maxisorb)に15ug/mlの濃度で、室温で1時間吸着させた後、PBS+0.5%BSAで、室温で1時間ブロッキングした。このプレートをPBS+0.05%Tween20で洗浄した後、2ug/mlの以下のタンパク質：Klotho(Fcダイマー)、aKlotho - FGFR1c複合体(Fc複合体)、Fc単独、またはPBSとともに室温で1時間インキュベートした。結合していない抗原をPBS+0.05%Tween20の6回の洗浄洗い流した後、これらのウェルをヤギ抗マウス(mG2a、Jackson ImmunoResearch Laboratories)とともに室温で30分間インキュベートした。結合していない抗マウス抗体をPBS+0.05%Tween20の6回の洗浄で洗い流した後、これらのウェルを抗ヤギHRP試薬とともに室温で30分間インキュベートした。結合していない抗ヤギHRP抗体をPBS+0.05%Tween20の6回の洗浄で洗い流した後、比色定量HRP試薬(TMB基質および停止溶液)を用い、450nmで吸光度を測定した。

【0274】

これらの結果は、Klotho抗体(クローン4804~4824、4826~4834)がKlotho単独および複合体(Klotho - FGFR1c)に結合することを示す。sb106(クローン48)を、Klotho単独および複合体(Klotho - FGFR1c)の両方に対して結合の対照として使用した。

【0275】

10

20

30

40

【表2】

表1:ヒト対象の特徴

対象	n	年齢	性別 (M/F)	PCr (mg/dl)	血清 Pi (mg/dl)	血清 HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mM)	血清 PTH (pg/ml)	FGF23 (pg/ml)	25(OH)ビタミン D (ng/ml)	CKDの病因(対象数*)
健常	34	50 ± 17	14/20	0.9 ± 0.2	3.6 ± 0.6	23 ± 2	59 ± 25	30 ± 10	32 ± 10	無し
CKD1	10	43 ± 10	7/3	0.9 ± 0.1	3.9 ± 0.5	25 ± 2	47 ± 19	61 ± 23	26 ± 7	DM (1) HTN (3) GN (7)
CKD2	11	50 ± 22	4/7	1.1 ± 0.2	3.6 ± 0.5	26 ± 2	56 ± 22	70 ± 27	21 ± 13	DM (2), HTN (4), GN (4), RK (3)
CKD3	10	57 ± 17	5/5	1.7 ± 0.4 <sup>e</sup>	3.2 ± 0.8	25 ± 3	86 ± 51	79 ± 18 <sup>e</sup>	25 ± 8	DM (3), HTN (7), GN (3), IN (1)
CKD4	14	62 ± 13	8/6	2.7 ± 0.6 <sup>a</sup>	3.5 ± 0.9	24 ± 3	202 ± 101 <sup>a</sup>	204 ± 173 <sup>a</sup>	21 ± 8	DM (4), HTN (10), GN (3), RK (1)
CKD5	11	62 ± 12	5/6	4.7 ± 2.0 <sup>e</sup>	5.1 ± 3.5 <sup>d</sup>	21 ± 3	223 ± 188 <sup>e</sup>	580 ± 427 <sup>e</sup>	21 ± 9 <sup>e</sup>	DM (7), HTN (7), GN (2)
透析	14	50 ± 12	6/8	11.9 ± 15.6 <sup>f</sup>	4.8 ± 1.7 <sup>e</sup>	22 ± 5	500 ± 650 <sup>b</sup>	760 ± 288 <sup>b</sup>	26 ± 8	DM (7), HTN (10), GN (5), PKD (1)

n=対象数; PCr=血漿クレアチニン; GFR=推定糸球体濾過速度; 血清 Pi=血清リン; 血清 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>=血清重炭酸塩  
 PTH=副甲状腺ホルモン; FGF23+ 線維芽細胞増殖因子 23; DM=真性糖尿病; HTN=高血圧; GN=糸球体腎炎; RK=残存腎臓; IN=間質性腎炎; PKD=多発性嚢胞腎疾患; \*一部の患者は2つ以上の診断を有する。  
 結果は平均±標準偏差で示す。#p<0.05 健常ボランティアとの比較 ANOVA

10

【0276】

【表3】

表2: CDR 配列バリエーション (示される配列は選択ライブラリーにおいて変動のある位置に相当する。L3 列の下に挙げられている配列は CDR-L3 を表すが、IMGT CDR の 1 番目と 2 番目のアミノ末端アミノ酸残基およびカルボキシル末端アミノ酸残基は除かれている。H1 列の下に挙げられている配列は CDR-H1 を表すが、IMGT CDR-H1 の最初の 3 つのアミノ末端アミノ酸残基は除かれ、そのカルボキシル末端アミノ酸残基は、IMGT VH ドメイン 39 番に相当する。H2 列の下に挙げられている配列は IMGT VH ドメイン 55~66 番に相当し、これは 55 番および 66 番に CDR-H2 およびフレームワーク領域残基を含む。H3 列の下に挙げられている配列は IMGT CDR-H3 を表すが IMGT CDR-H3 の最初の 2 つのアミノ末端アミノ酸と最後の 2 つのカルボキシル末端アミノ酸を欠いている。IMGT CDR アミノ酸残基自体には下線が施されている。可変 FR アミノ酸残基には下線が施されていない。)

20

	L3	ID	H1	ID	H2	ID
sb106	<u>A</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>I</u> 5	5	<u>I</u> <u>S</u> <u>Y</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>I</u> 6	6	<u>Y</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>Y</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>I</u> <u>S</u> 7	7
E12	<u>A</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>I</u> 15	15	<u>I</u> <u>A</u> <u>Y</u> <u>Y</u> <u>A</u> <u>V</u> 16	16	<u>F</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>Y</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>S</u> 17	17
E2	<u>A</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>I</u> 19	19	<u>I</u> <u>S</u> <u>Y</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>V</u> 20	20	<u>F</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>Y</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>I</u> <u>A</u> 21	21
C12	<u>A</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>V</u> 23	23	<u>I</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>Y</u> <u>A</u> <u>V</u> 24	24	<u>F</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>Y</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>I</u> <u>S</u> 25	25
E3	<u>S</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>V</u> 27	27	<u>V</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>I</u> 28	28	<u>Y</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>Y</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>A</u> 29	29
D7	<u>A</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>V</u> 31	31	<u>V</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>I</u> 32	32	<u>Y</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>Y</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>S</u> 33	33
E4	<u>A</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>I</u> 35	35	<u>I</u> <u>S</u> <u>Y</u> <u>Y</u> <u>A</u> <u>V</u> 36	36	<u>F</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>Y</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>S</u> 37	37
E6	<u>A</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>V</u> 39	39	<u>E</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>I</u> 40	40	<u>F</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>Y</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>I</u> <u>A</u> 41	41
E10	<u>A</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>V</u> 43	43	<u>I</u> <u>S</u> <u>Y</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>I</u> 44	44	<u>Y</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>I</u> <u>A</u> 45	45
C9	<u>A</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>V</u> 47	47	<u>I</u> <u>S</u> <u>Y</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>I</u> 48	48	<u>F</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>S</u> 49	49
D11	<u>A</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>I</u> 51	51	<u>I</u> <u>A</u> <u>Y</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>I</u> 52	52	<u>Y</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>Y</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>I</u> <u>S</u> 53	53
E1	<u>A</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>I</u> 55	55	<u>I</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>I</u> 56	56	<u>Y</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>Y</u> <u>A</u> <u>Y</u> <u>I</u> <u>A</u> 57	57
D5	<u>A</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>I</u> 59	59	<u>V</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>I</u> 60	60	<u>S</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>Y</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>I</u> <u>Y</u> 61	61
D12	<u>A</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>V</u> 63	63	<u>V</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>I</u> 64	64	<u>S</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>Y</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>I</u> <u>Y</u> 65	65
E8	<u>S</u> <u>A</u> <u>Y</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>V</u> 67	67	<u>V</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>I</u> 68	68	<u>F</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>Y</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>A</u> 69	69
E11	<u>A</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>V</u> 71	71	<u>I</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>I</u> 72	72	<u>F</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>Y</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>I</u> <u>A</u> 73	73
F1	<u>S</u> <u>A</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>V</u> 75	75	<u>I</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>I</u> 76	76	<u>F</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>Y</u> <u>A</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>A</u> 77	77
D1	<u>A</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>V</u> 79	79	<u>E</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>I</u> 80	80	<u>Y</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>Y</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>A</u> 81	81
C10			<u>V</u> <u>S</u> <u>Y</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>I</u> 83	83	<u>S</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>Y</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>I</u> <u>S</u> 84	84
D6	<u>S</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>V</u> 86	86	<u>I</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>V</u> 87	87	<u>F</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>S</u> 88	88
D8	<u>A</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>V</u> 90	90	<u>V</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>I</u> 91	91	<u>Y</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>Y</u> <u>A</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>A</u> 92	92
C11			<u>I</u> <u>S</u> <u>Y</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>V</u> 94	94	<u>Y</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>S</u> 95	95
F2	<u>A</u> <u>A</u> <u>Y</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>V</u> 97	97	<u>V</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>V</u> 98	98	<u>S</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>Y</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>I</u> <u>A</u> 99	99
D9	<u>A</u> <u>A</u> <u>Y</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>V</u> 101	101	<u>I</u> <u>A</u> <u>Y</u> <u>Y</u> <u>A</u> <u>V</u> 102	102	<u>F</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>Y</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>I</u> <u>S</u> 103	103
E5	<u>A</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>V</u> 105	105	<u>I</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>Y</u> <u>A</u> <u>V</u> 106	106	<u>Y</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>Y</u> <u>A</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>A</u> 107	107
D10	<u>A</u> <u>A</u> <u>Y</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>V</u> 109	109	<u>V</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>I</u> 110	110	<u>Y</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>Y</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>I</u> <u>S</u> 111	111
D3	<u>S</u> <u>A</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>V</u> 113	113	<u>V</u> <u>A</u> <u>Y</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>I</u> 114	114	<u>Y</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>S</u> 115	115
D4	<u>A</u> <u>A</u> <u>Y</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>I</u> 117	117	<u>V</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>Y</u> <u>A</u> <u>V</u> 118	118	<u>S</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>Y</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>I</u> <u>Y</u> 119	119

30

40

表 2 続き

sb106	H3															ID
	Y	Y	V	Y	A	S	H	G	W	A	G	Y	G	M	8	
E12	F	Y	V	Y	A	S	N	A	W	A	G	Y	G	M	18	
E2	F	Y	V	Y	A	A	N	G	W	A	G	Y	G	M	22	
C12	F	Y	V	Y	A	A	N	G	W	A	G	Y	G	M	26	
E3	F	Y	V	Y	A	A	H	G	W	A	G	Y	G	M	30	
D7	F	Y	V	Y	A	A	N	G	W	A	G	Y	G	M	34	
E4	F	F	V	Y	A	A	H	G	W	A	G	Y	G	M	38	
E6	F	F	V	Y	S	S	H	G	W	A	G	Y	G	M	42	
E10	F	Y	V	Y	S	S	H	G	W	A	G	Y	G	M	46	
C9	F	Y	V	Y	A	A	N	G	W	A	G	Y	G	M	50	
D11	F	Y	V	Y	S	A	N	G	W	A	G	Y	G	M	54	
E1	F	Y	V	Y	A	A	H	G	W	A	G	Y	G	M	58	
D5	F	Y	V	Y	A	S	N	G	W	A	G	Y	G	M	62	
D12	F	Y	V	Y	S	S	H	G	W	A	G	Y	G	M	66	
E8	F	F	V	Y	A	A	H	G	W	A	G	Y	G	M	70	
E11	F	Y	V	Y	S	A	N	G	W	A	G	Y	G	M	74	
F1	F	Y	V	Y	S	A	N	G	W	A	G	Y	G	M	78	
D1	F	F	V	Y	S	A	N	A	W	S	G	Y	G	M	82	
C10	F	F	V	Y	A	A	H	G	W	A	G	Y	G	M	85	
D6	F	Y	V	Y	A	A	H	G	W	A	G	Y	G	M	89	
D8	Y	F	V	Y	A	S	N	G	W	A	G	Y	G	M	93	
C11	F	F	V	Y	S	A	H	G	W	A	G	Y	G	M	96	
F2	F	Y	V	Y	A	A	H	G	W	A	G	Y	G	M	100	
D9	F	Y	V	Y	S	S	H	G	W	A	G	F	G	M	104	
E5	F	Y	V	Y	S	A	H	G	W	A	G	Y	G	M	108	
D10	F	Y	V	Y	S	A	H	G	W	A	G	Y	G	M	112	
D3	F	Y	V	Y	A	A	N	G	W	A	G	Y	G	M	116	
D4	Y	Y	V	Y	A	A	H	G	W	A	G	Y	G	M	120	

10

20

【 0 2 7 7 】

【 表 4 】

表 2A

配列番号 1	$X_1X_2X_3X_4PX_5$ 式中、 $X_1$ はAまたはSであり、 $X_2$ はGまたはAであり、 $X_3$ はYまたはFであり、 $X_4$ はSまたはAであり、 $X_5$ はIまたはVである
配列番号 2	$X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$ 式中、 $X_6$ はIまたはVであり、 $X_7$ はSまたはAであり、 $X_8$ はY、FまたはSであり、 $X_9$ はY、FまたはSであり、 $X_{10}$ はSまたはAであり、 $X_{11}$ はIまたはVである
配列番号 3	$X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}X_{16}X_{17}X_{18}X_{19}X_{20}X_{21}$ 式中、 $X_{12}$ はY、FまたはSであり、 $X_{13}$ はIまたはVであり、 $X_{14}$ はSまたはAであり、 $X_{15}$ はPまたはSであり、 $X_{16}$ はSまたはAであり、 $X_{17}$ はYまたはFであり、 $X_{18}$ はGまたはAであり、 $X_{19}$ はYまたはFであり、 $X_{20}$ はTまたはSであり、 $X_{21}$ はS、AまたはYである
配列番号 4	$X_{22}X_{23}VYX_{24}X_{25}X_{26}X_{27}WX_{28}GX_{29}GM$ 式中、 $X_{22}$ はYまたはFであり、 $X_{23}$ はYまたはFであり、 $X_{24}$ はAまたはSであり、 $X_{25}$ はSまたはAであり、 $X_{26}$ はHまたはNであり、 $X_{27}$ はGまたはAであり、 $X_{28}$ はAまたはSであり、 $X_{29}$ はYまたはFである。

30

40

【 0 2 7 8 】

【表 5】

表 3A:さらなる αKlotho 抗体に関する CDR アミノ酸配列 (CDR-H1 列の下に挙げられている配列のカルボキシ末端アミノ酸残基は IMGT VH ドメイン 39 番に相当し、CDR-H2 列の下に挙げられているアミノ末端残基およびカルボキシ末端残基残基はそれぞれ IMGT VH ドメイン 55 番および 66 番に相当する。IMTG CDR のアミノ酸残基に下線が施され、IMGT フレームワーク領域のアミノ酸残基には下線が施されておらず、選択ライブラリーにおいて無作為化された IMGT 位の残基は太字である)

Table with columns: クローン ID, 名称, CDR-L1 配列番号, CDR L2 配列番号, CDR-L3 配列番号, CDR-H1 配列番号, CDR-H2 配列番号, CDR-H3 配列番号. Rows list various antibody clones and their CDR sequences.

10

20

【 0 2 7 9 】

【表 6】

表 3B:さらなる αKlotho 抗体の軽鎖 CDR ヌクレオチド配列

Table with columns: クローン ID, 名称, CDR-L1 配列番号, CDR-L2 配列番号, CDR-L3 配列番号. Rows list antibody clones and their light chain CDR nucleotide sequences.

30

40

50



【表 8】

表 3D: αKlotho の軽鎖 CDR-L3 アミノ酸配列 - 抗体結合エピトープ B

クローン ID	名称	CDR-L3	配列番号	一般式	
4804	sb173	QQSSYSLIT	142		
4807	sb176	QQSSYSLIT	142		
4808	sb177	QQSSYSLIT	142		
4815	sb184	QQSSYSLIT	142		
4816	sb185	QQSSYSLIT	142		
4821	sb190	QQSSYSLIT	142		
4822	sb191	QQSSYSLIT	142		
4823	sb192	QQSSYSLIT	142		
4824	sb193	QQSSYSLIT	142		
4825	sb194	QQSSYSLIT	142		
4827	sb196	QQSSYSLIT	142		
4832	sb201	QQSSYSLIT	142		
4834	sb203	QQSSYSLIT	142		
4811	sb180	QQGYALFT	145		QQGX <sub>1</sub> X <sub>2</sub> LX <sub>3</sub> T (配列番号 126)
4812	sb181	QQGYWLFT	146		式中、X <sub>1</sub> は Y または G であり、X <sub>2</sub> は W、A または G であり、X <sub>3</sub> は F または I である
4829	sb198	QQGGGLIT	153		
4813	sb182	QQAAWGGAPIT	147	QQAX <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub> X <sub>5</sub> PIT (配列番号 127)	
4826	sb195	QQAGFFSYFIT	152	式中、X <sub>1</sub> は A または G であり、X <sub>2</sub> は W または F であり、X <sub>3</sub> は G または F であり、X <sub>4</sub> は G または S であり、X <sub>5</sub> は A または Y である	
4820	sb189	QQSPWGAFLIT	151	QQSX <sub>1</sub> X <sub>2</sub> GX <sub>3</sub> YX <sub>4</sub> IT (配列番号 129)	
4833	sb202	QQSSHGHPIT	156	式中、X <sub>1</sub> は S または P であり、X <sub>2</sub> は H または W であり、X <sub>3</sub> は H または A であり、X <sub>4</sub> は P または L である	
4809	sb178	QQSGWAYHPIT	144	QQSX <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> YHX <sub>4</sub> X <sub>5</sub> X <sub>6</sub> T (配列番号 130)	
4805	sb174	QQSSGWYHFLFT	143	式中、X <sub>1</sub> は S または G であり、X <sub>2</sub> は G または W であり、X <sub>3</sub> は W または A であり、X <sub>4</sub> は F または P であり、X <sub>5</sub> は L または I であり、X <sub>6</sub> は F であるかまたは存在しない	
4818	sb187	QQPYSPIT	149		

10

20

【 0 2 8 2 】

【表 9】

表 3E: αKlotho の重鎖 CDR-H1 アミノ酸配列 - 抗体結合エピトープ B (CDR-H1 列の下に挙げられている配列のカルボキシ末端アミノ酸残基は IMGT VHドメイン 39 番に相当する。IMTG CDR のアミノ酸残基に下線が施され、IMGT フレームワーク領域のアミノ酸残基には下線が施されていない。選択ライブラリーにおいて無作為化された IMGT 位の残基は太字である)

クローン ID	名称	CDR-H1	配列番号	一般式 A	一般式 B
4813	sb182	<u>GFNLYSSSI</u>	166		GFNX <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub> X <sub>5</sub> X <sub>6</sub> (配列番号 121) 式中、X <sub>1</sub> は F または I であり、X <sub>2</sub> は Y または S であり、X <sub>3</sub> は S または Y であり、X <sub>4</sub> は S または Y であり、X <sub>5</sub> は S または Y であり、X <sub>6</sub> は I または M である
4825	sb194	<u>GFNLYSSSI</u>	166		
4811	sb180	<u>GFNLYYSYM</u>	164		
4821	sb190	<u>GFNLYYSYM</u>	164		
4808	sb177	<u>GFNFSSSSI</u>	161		
4815	sb184	<u>GFNFSSSSI</u>	161		
4816	sb185	<u>GFNFSSSSI</u>	161		
4822	sb191	<u>GFNFSSSSI</u>	161		
4823	sb192	<u>GFNFSSSSI</u>	161		
4827	sb196	<u>GFNFSSSSI</u>	161		
4832	sb201	<u>GFNFSSSSI</u>	161		
4834	sb203	<u>GFNFSSSSI</u>	161		
4820	sb189	<u>GFNISSYYM</u>	170		
4826	sb195	<u>GFNISSYYM</u>	170		
4809	sb178	<u>GFNIYSYYI</u>	162		
4818	sb187	<u>GFNISYSSI</u>	168	式中、X <sub>1</sub> は Y または S であり、X <sub>2</sub> は Y または S であり、X <sub>3</sub> は Y または S であり、X <sub>4</sub> は Y または S である	
4829	sb198	<u>GFNISSYYI</u>	171		
4804	sb173	<u>GFNLYYSYI</u>	157	GFNLX <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub> X <sub>5</sub> (配列番号 134)	
4805	sb174	<u>GFNLSSYSM</u>	158	式中、X <sub>1</sub> は Y または S であり、X <sub>2</sub> は Y または S であり、X <sub>3</sub> は Y または S であり、X <sub>4</sub> は Y または S であり、X <sub>5</sub> は M または I である	
4807	sb176	<u>GFNLSSYSYM</u>	160		
4812	sb181	<u>GFNLSSYSYM</u>	165		
4833	sb202	<u>GFNLSSYYM</u>	174		
4824	sb193	<u>GFNLSSSSI</u>	163		

30

40

【 0 2 8 3 】

【表 1 0】

表 3F:αKlotho の重鎖 CDR-H2 アミノ酸配列 - 抗体結合エピトープ B (CDR-H2 列の下に挙げられている配列のアミノ末端残基およびカルボキシ末端残基はそれぞれ IMGT VHドメイン 55 番および 66 番に相当する。IMTG CDR のアミノ酸残基に下線が施され、IMGT フレームワーク領域のアミノ酸残基には下線が施されていない)

クローン ID	名称	CDR-H2	配列番号	一般式 A	一般式 B
4804	sb173	<u>YISSSSGSIY</u>	175	YIX <sub>1</sub> SSX <sub>2</sub> GX <sub>3</sub> TX <sub>4</sub> (配列番号 135)	X <sub>1</sub> IX <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub> X <sub>5</sub> X <sub>6</sub> X <sub>7</sub> TX <sub>8</sub> (配列番号 122)
4823	sb192	<u>YIYSSYGTY</u>	188	式中、X <sub>1</sub> は S または Y であり、X <sub>2</sub> は S または Y であり、X <sub>3</sub> は S または Y であり、X <sub>4</sub> は S または Y である。	式中、X <sub>1</sub> は Y または S であり、X <sub>2</sub> は Y または S であり、X <sub>3</sub> は S または P であり、X <sub>4</sub> は S または Y であり、X <sub>5</sub> は S または Y であり、X <sub>6</sub> は G または S であり、X <sub>7</sub> は Y または S であり、X <sub>8</sub> は Y または S である
4827	sb196	<u>YISSSSGSTS</u>	190		
4832	sb201	<u>YISSSYGYS</u>	194		
4806	sb177	<u>SISSSYGTY</u>	179		
4815	sb184	<u>SISSSYGTY</u>	179		
4816	sb185	<u>SISSSYGTY</u>	179		
4822	sb191	<u>SISSSYGTY</u>	179		
4824	sb193	<u>SISSSYGTY</u>	179		
4826	sb195	<u>SISSSYGTY</u>	179		
4834	sb203	<u>SISSSYGTY</u>	179		
4813	sb182	<u>SI SPYSGTY</u>	184	SIX <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub> X <sub>5</sub> X <sub>6</sub> TX <sub>7</sub> (配列番号 136)	式中、X <sub>1</sub> は S または Y であり、X <sub>2</sub> は S または P であり、X <sub>3</sub> は Y または S であり、X <sub>4</sub> は Y または S であり、X <sub>5</sub> は G または S であり、X <sub>6</sub> は S または Y であり、X <sub>7</sub> =Y または S
4818	sb187	<u>SI SPYSGTY</u>	184		
4805	sb174	<u>SISSYSGTY</u>	176		
4807	sb176	<u>SIYPSYGSTS</u>	178		
4809	sb178	<u>SIYSYGSTS</u>	180		
4811	sb180	<u>SIYSSSYTS</u>	182		
4812	sb181	<u>SISSYSGYS</u>	183		
4820	sb189	<u>SIYSSYSTY</u>	186		
4821	sb190	<u>SI SPYSGTY</u>	187		
4825	sb194	<u>SI SPYYSYTY</u>	189		
4829	sb198	<u>SIYSSYGYS</u>	191		
4833	sb202	<u>SIYPSYSTY</u>	195		

10

20

【 0 2 8 4】

【表 1 1】

表 3G:αKlotho の軽鎖 CDR-L3 アミノ酸配列 - 抗体結合エピトープ C (選択ライブラリーにおいて無作為化された IMGT 位の残基は太字である)

クローン ID	名称	CDR-L3	配列番号	一般式
4819	sb188	<b>QQGSYYWWSPIT</b>	150	QQX <sub>1</sub> SX <sub>2</sub> YX <sub>3</sub> X <sub>4</sub> SPIT (配列番号 123) 式中、X <sub>1</sub> は G または Y であり、X <sub>2</sub> は Y または W であり、X <sub>3</sub> は W または Y であり、X <sub>4</sub> は W、Y または A である
4830	sb199	<b>QQYSWYWYSPIT</b>	154	
4831	sb200	<b>QQYSYYASPIT</b>	155	
4814	sb183	<b>QQSSPPIT</b>	148	

30

【 0 2 8 5】

【表 1 2】

表 3H:αKlotho の重鎖 CDR-H1 アミノ酸配列 - 抗体結合エピトープ C (CDR-H1 列の下に挙げられている配列のカルボキシ末端アミノ酸残基 IMGT VHドメイン 39 番に相当する。IMTG CDR-H1 のアミノ酸残基に下線が施され、IMGT フレームワーク領域のアミノ酸残基には下線が施されていない。選択ライブラリーにおいて無作為化された IMGT 位の残基は太字である)

クローン ID	名称	CDR-H1	配列番号	一般式
4830	sb199	<u>G<b>FN</b>IY<b>SS</b>I</u>	172	GFNX <sub>1</sub> YX <sub>2</sub> X <sub>3</sub> SX <sub>4</sub> (配列番号 124) 式中、X <sub>1</sub> は I または L であり、X <sub>2</sub> は Y または S であり、X <sub>3</sub> は S または Y であり、X <sub>4</sub> は I または M である
4831	sb200	<u>G<b>FN</b>IY<b>SS</b>I</u>	173	
4819	sb188	<u>G<b>FN</b>IY<b>SS</b>M</u>	169	
4814	sb183	<u>G<b>FN</b>L<b>Y</b>S<b>SS</b>M</u>	167	

40

【 0 2 8 6】

【表 1 3】

表 3I:αKlotho の重鎖 CDR-H2 アミノ酸配列 - 抗体結合エピトープ C (CDR-H2 列の下に挙げられている配列のアミノ末端残基およびカルボキシ末端残基はそれぞれ IMGT VHドメイン 55 番および 66 番に相当する。IMTG CDR-H2 のアミノ酸残基に下線が施され、IMGT フレームワーク領域のアミノ酸残基には下線が施されていない)

クローン ID	名称	CDR-H2	配列番号	一般式
4819	sb188	<u>SIY<b>PSS</b>SYTY</u>	185	SIX <sub>1</sub> PX <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub> YTY (配列番号 125) 式中、X <sub>1</sub> は S または Y であり、X <sub>2</sub> は S または Y であり、X <sub>3</sub> は S または Y であり、X <sub>4</sub> は S または G である
4830	sb199	<u>SIY<b>P</b>YSYTY</u>	192	
4831	sb200	<u>SIY<b>P</b>YSYTY</u>	193	
4814	sb183	<u>SI SPYSGTY</u>	184	

50

【 0 2 8 7 】

【 表 1 4 】

表 4:さらなる αKlotho 抗体の全長配列の例

<p>軽鎖(hK)アミノ酸配列:配列番号 317  DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSVSSAVAWYQKPKGKAPKLLIYSASSLSYGVPSRFSGSRSGTDF  TLTISSLQPEDFATYYCQQSSYSLITFGQGTKEIKRTVAAPSFIFFPPSDEQLKSGTASVCLLNFFYPREA  KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>	10
<p>軽鎖(hK)核酸配列:配列番号 318  GATATCCAGATGACCCAGTCCCGAGCTCCCTGTCCGCTCTGTGGGCGATAGGGTCACCATCACCTGCCGTGCCAGTCAGTC  CGTGTCCAGCGCTGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGAAAAGCTCCGAAGCTTCTGATTTACTCGGCATCCAGCCTCTAC  TCTGGAGTCCCTTCTCGCTTCTGGTAGCCGTTCCGGACGGATTTCACTCTGACCATCAGCAGTCTGCAGCCGGAAGACTT  CGCAACTTATTACTGTCAAGCAATCTCTTATTCTGATCAGCTTCCGACAGGGTACCAAGTGGAGATCAACCGTACGGT  GGCTGCACCACTGTCTTCACTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAATGCCTCTGTTGTGTGCCCTGCTGAATAACT  TCTATCCCAAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGAC  AGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCGCGAAGT  CACCCATCAGGGCTGAGCTCCGCCGTACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT</p>	10
<p>重鎖(hG1)アミノ酸配列:配列番号 319  EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNLYSYSIHWWRQAPGKLEWVAYISSSSGTYADSVKGRFTI  SADTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCARGWGGGYWYFYPVYIDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLA  PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV  NHKPSNTKVDKVKVEPKSCKDHTHTPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV  KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQP  REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK  SRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK</p>	10
<p>重鎖(hG1)核酸配列:配列番号 320  GAGGTTCAAGCTGGTGGAGTCTGGCGGTGGCCCTGGTGCAGCCAGGGGGCTCACTCCGTTTGTCTGTGCAGCTTCTGGCTTCA  ACCTCTATTCTTATTCTATCCACTGGGTGCGTCAGGCCCGGGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGCATATATTCTTCTTCT  TCTGGCTCTACTTATTATGCCGATAGCGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTA  CAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTCTCGCGGTGGGGTGGTGGTACTGGTTCTACCC  GGTTTACGGTATTGACTACTGGGGTCAAGGAACCTGGTCAACCGTCTCCTCGGCTAGCACCAAGGGGCCATCGGCTTTCCCC  TGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCAGGTCAGCGTG  TCGTGGAACCTCAGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG  GTGACCGGTGCCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAAGAA  AGTTGAGCCCAAATCTTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACCTCCTGGGGGACCGTCAAGTCTTCTCT  TCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGAGTGAAGCCAGGACCCCT  GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAA TGCCAAGACAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGT  ACCGTGTGGTCAAGCTCTCACCCTGTCACCAAGGACTGGCTGAA TGCCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTC  CAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAGGGCAGCCCGAGAACCAAGGTTACACCTGCCCCCATCCCGGGAGGA</p>	20
<p>GATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGC  AGCCGGAGAACAACCTACAAGACCAGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACC GTGGACAAG  AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCCTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCT  GTCTCCGGGTAAA</p>	20
<p>下線は CDR 配列を示す:太字は選択ライブラリーで無作為にされた IMGT 位の残基を示す(ここでは例として抗体#4804を示す):斜体は定常ドメイン配列を表す</p>	

【 0 2 8 8 】

## 【表 15】

表 5:さらなる  $\alpha$ Klotho 抗体の結合特性の要約

ID	名称	親和性	エピトープ群	ID	名称	親和性	エピトープ群
48	sb106	1.9 nM	A	4819	sb188	550 pM	C
4804	sb173	770 pM	B	4820	sb189	2.7 nM	B
4805	sb174	240 pM	B	4821	sb190	5.1 nM	B
4806	sb175	2.7 nM	nd	4822	sb191	8.7 nM	B
4807	sb176	6.1 nM	B	4823	sb192	1.6 nM	B
4808	sb177	1.6 nM	B	4824	sb193	3.5 nM	B
4809	sb178	845 pM	B	4825	sb194	nd	B
4810	sb179	1.9 nM	nd	4826	sb195	3.3 nM	B
4811	sb180	2.3 nM	B	4827	sb196	5.6 nM	B
4812	sb181	885 pM	B	4828	sb197	4.9 nM	nd
4813	sb182	5.2 nM	B	4829	sb198	1.8 nM	B
4814	sb183	4.7 nM	C	4830	sb199	2.9 nM	C
4815	sb184	360 pM	B	4831	sb200	1.6 nM	C
4816	sb185	3.7 nM	B	4832	sb201	515 pM	B
4817	sb186	4.1 nM	nd	4833	sb202	1.4 nM	B
4818	sb187	2.1 nM	B	4834	sb203	1.1 nM	B

10

20

## 【0289】

本出願をこれまでのところ好ましい例と考えられるものを参照して説明してきたが、本出願は開示されている例に限定されないと理解されるべきである。逆に、本出願は、添付の特許請求の範囲の趣旨および範囲内に含まれる様々な改変および等価の配置を包含することが意図される。

## 【0290】

刊行物、特許および特許出願は総て、各個の刊行物、特許および特許出願が具体的かつ個々に引用することによりそれらの全内容が本明細書の一部とされることが示される場合と同じ程度で、引用することによりそれらの全内容が本明細書の一部とされる。特に、例えば、表または他所に示される受託番号および/またはバイオマーカー配列（例えば、タンパク質および/または核酸）を含め、本明細書に示される各受託番号に関連する配列は、引用することによりそれらの全内容が本明細書の一部とされる。

30

## 【0291】

本明細書に引用される参考文献

1. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, et al. (1997) Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 390: 45-51.
2. Nabeshima Y. (2002) *Klotho*: a fundamental regulator of aging. *Ageing Res Rev* 1: 627-638.
3. Matsumura Y, Aizawa H, Shiraki-Iida T, Nagai R, Kuro-o M, Nabeshima Y. (1998) Identification of the human *klotho* gene and its two transcripts encoding membrane and secreted *klotho* protein. *Biochem Biophys Res Commun* 242: 626-630.
4. Ben-Dov IZ, Galitzer H, Lavi-Moshayoff V, Goetz R, Kuro-o M, Mohammadi M, Sirkis R, Naveh-Many T, Silver J. (2007) The parathyroid is a target organ for FGF23 in rats. *J Clin Invest* 117: 4003-4008.
5. Ito S, Kinoshita S, Shiraishi N, Nakagawa S, Sekine S, Fujimori T, Nabeshima YI. (2000) Molecular cloning and expression analyses of mouse *betaklotho*, which encodes a novel *Klotho* family protein. *Mech Dev* 98: 115-119.
6. Kuro-o M. (2012) *Klotho* and *betaKlotho*. *Adv Exp Med Biol* 728: 25-40. 10
7. Hu MC, Shi M, Zhang J, et al. *Klotho*: a novel phosphaturic substance acting as an autocrine enzyme in the renal proximal tubule. *FASEB J* 2010;24(9):3438-3450
8. Kato Y, Arakawa E, Kinoshita S, et al. Establishment of the anti-*Klotho* monoclonal antibodies and detection of *Klotho* protein in kidneys. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;267(2):597-602
9. Goetz R, Nakada Y, Hu MC, et al. Isolated C-terminal tail of FGF23 alleviates hypophosphatemia by inhibiting FGF23-FGFR-*Klotho* complex formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(1):407-412
10. Kurosu H, Ogawa Y, Miyoshi M, et al. Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by *klotho*. *J Biol Chem* 2006;281(10):6120-6123
11. Urakawa I, Yamazaki Y, Shimada T, et al. *Klotho* converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature* 2006;444(7120):770-774
12. Hu MC, Shi M, Zhang J, et al. *Klotho* deficiency causes vascular calcification in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2011;22(1):124-136
13. Imura A, Iwano A, Tohyama O, et al. Secreted *Klotho* protein in sera and CSF: implication for post-translational cleavage in release of *Klotho* protein from cell membrane. *FEBS Lett* 2004;565(1-3):143-147 20
14. Bloch L, Sineshcckova O, Reichenbach D, et al. *Klotho* is a substrate for alpha-, beta- and gamma-secretase. *FEBS Lett* 2009;583(19):3221-3224
15. Chen CD, Podvin S, Gillespie E, et al. Insulin stimulates the cleavage and release of the extracellular domain of *Klotho* by ADAM10 and ADAM17. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(50):19796-19801
16. Hu MC, Shi M, Zhang J, et al. Renal production and metabolism of circulating *Klotho*. Submitted
17. Hu MC, Kuro-o M, Moe OW. Secreted *klotho* and chronic kidney disease. *Adv Exp Med Biol* 2012;728:126-157
18. Aizawa H, Saito Y, Nakamura T, et al. Downregulation of the *Klotho* gene in the kidney under sustained circulatory stress in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;249(3):865-871
19. Cheng MF, Chen LJ, Cheng JT. Decrease of *Klotho* in the kidney of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Biomed Biotechnol* 2010;2010:513853
20. Haruna Y, Kashihara N, Satoh M, et al. Amelioration of progressive renal injury by genetic manipulation of *Klotho* gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(7):2331-2336 30
21. Koh N, Fujimori T, Nishiguchi S, et al. Severely reduced production of *klotho* in human chronic renal failure kidney. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;280(4):1015-1020
22. Mitani H, Ishizaka N, Aizawa T, et al. In vivo *klotho* gene transfer ameliorates angiotensin II-induced renal damage. *Hypertension* 2002;39(4):838-843
23. Wang Y, Sun Z. *Klotho* gene delivery prevents the progression of spontaneous hypertension and renal damage. *Hypertension* 2009;54:810-817
24. Zhao Y, Banerjee S, Dey N, et al. *Klotho* depletion contributes to increased inflammation in kidney of the db/db mouse model of diabetes via RelA (serine)536 phosphorylation. *Diabetes* 2011;60(7):1907-1916

25. Hu MC, Shi M, Zhang J, *et al.* Klotho deficiency is an early biomarker of renal ischemia-reperfusion injury and its replacement is protective. *Kidney Int* 2010;78(12):1240-1251
26. Hu MC, Moe OW. Klotho as a potential biomarker and therapy for acute kidney injury. *Nat Rev Nephrol* 2012;8(7):423-429
27. Goetz R, Beenken A, Ibrahimi OA, *et al.* (2007) Molecular insights into the klotho-dependent, endocrine mode of action of fibroblast growth factor 19 subfamily members. *Mol Cell Biol* 27: 3417-3428.
28. Shimada T, Kakitani M, Yamazaki Y, Hasegawa H, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, Tomizuka K, Yamashita T. (2004) Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. *J Clin Invest* 113: 561-568.
29. Ichikawa S, Imel EA, Kreiter ML, *et al.* (2007) A homozygous missense mutation in human KLOTHO causes severe tumoral calcinosis. *J Clin Invest* 117: 2684-2691.
30. Kuro-o M. (2010) Overview of the FGF23-Klotho axis. *Pediatr Nephrol* 25: 583-590.
31. Kurosu H, Kuro OM. (2009) The Klotho gene family as a regulator of endocrine fibroblast growth factors. *Mol Cell Endocrinol* 299: 72-78.
32. Ayodele OE, Alebiosu CO. (2010) Burden of chronic kidney disease: an international perspective. *Adv Chronic Kidney Dis* 17: 215-224.
33. Soni RK, Weisbord SD, Unruh ML. (2010) Health-related quality of life outcomes in chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 19: 153-159.
34. Trivedi H. (2010) Cost implications of caring for chronic kidney disease: are interventions cost-effective? *Adv Chronic Kidney Dis* 17: 265-270.
35. Ganesh SK, Stack AG, Levin NW, Hulbert-Shearon T, Port FK. (2001) Association of elevated serum PO(4), Ca x PO(4) product, and parathyroid hormone with cardiac mortality risk in chronic hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 12: 2131-2138.
36. Tonelli M, Curhan G, Pfeffer M, Sacks F, Thadhani R, Melamed ML, Wiebe N, Muntner P. (2009) Relation between alkaline phosphatase, serum phosphate, and all-cause or cardiovascular mortality. *Circulation* 120: 1784-1792.
37. Gutierrez O, Isakova T, Rhee E, Shah A, Holmes J, Collerone G, Juppner H, Wolf M. (2005) Fibroblast growth factor-23 mitigates hyperphosphatemia but accentuates calcitriol deficiency in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 16: 2205-2215.
38. Asai O, Nakatani K, Tanaka T, *et al.* Decreased renal alpha-Klotho expression in early diabetic nephropathy in humans and mice and its possible role in urinary calcium excretion. *Kidney Int* 2012;81(6):539-547
39. Akimoto T, Kimura T, Watanabe Y, *et al.* The impact of nephrectomy and renal transplantation on serum levels of soluble Klotho protein. *Transplant Proc* 2013;45(1):134-136
40. Akimoto T, Shiizaki K, Sugase T, *et al.* The relationship between the soluble Klotho protein and the residual renal function among peritoneal dialysis patients. *Clin Exp Nephrol* 2012;16(3):442-447
41. Akimoto T, Yoshizawa H, Watanabe Y, *et al.* Characteristics of urinary and serum soluble Klotho protein in patients with different degrees of chronic kidney disease. *BMC Nephrol* 2012;13:155
42. Carpenter TO, Insogna KL, Zhang JH, *et al.* Circulating Levels of Soluble Klotho and FGF23 in X-Linked Hypophosphatemia: Circadian Variance, Effects of Treatment, and Relationship to Parathyroid Status. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95(11):E352-357
43. Crasto CL, Semba RD, Sun K, *et al.* Relationship of low-circulating "anti-aging" klotho hormone with disability in activities of daily living among older community-dwelling adults. *Rejuvenation Res* 2012;15(3):295-301
44. Devaraj S, Syed B, Chien A, *et al.* Validation of an immunoassay for soluble klotho protein: decreased levels in diabetes and increased levels in chronic kidney disease. *Am J Clin Pathol* 2012;137(3):479-485
45. Fliser D, Seiler S, Heine GH, *et al.* Measurement of serum soluble Klotho levels in CKD 5D patients: useful tool or dispensable biomarker? *Nephrol Dial Transplant* 2012;27(5):1702-1703
46. Heijboer AC, Blankenstein MA, Hoenderop J, *et al.* Laboratory aspects of circulating alpha-Klotho. *Nephrol Dial Transplant* 2013;28(9):2283-2287
47. Kacso IM, Bondor CI, Kacso G. Soluble serum Klotho in diabetic nephropathy: relationship to VEGF-A. *Clin Biochem* 2012;45(16-17):1415-1420

48. Kim HR, Nam BY, Kim DW, *et al.* Circulating alpha-Klotho levels in CKD and relationship to progression. *Am J Kidney Dis* 2013;61(6):899-909
49. Kitagawa M, Sugiyama H, Morinaga H, *et al.* A decreased level of serum soluble Klotho is an independent biomarker associated with arterial stiffness in patients with chronic kidney disease. *PLoS One* 2013;8(2):e56695
50. Komaba H, Koizumi M, Tanaka H, *et al.* Effects of cinacalcet treatment on serum soluble Klotho levels in haemodialysis patients with secondary hyperparathyroidism. *Nephrol Dial Transplant* 2012;27(5):1967-1969
51. Pavik I, Jaeger P, Ebner L, *et al.* Soluble klotho and autosomal dominant polycystic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2012;7(2):248-257
52. Pavik I, Jaeger P, Ebner L, *et al.* Secreted Klotho and FGF23 in chronic kidney disease Stage 1 to 5: a sequence suggested from a cross-sectional study. *Nephrol Dial Transplant* 2013;28(2):352-359 10
53. Seiler S, Wen M, Roth HJ, *et al.* Plasma Klotho is not related to kidney function and does not predict adverse outcome in patients with chronic kidney disease. *Kidney Int* 2013;83(1):121-128
54. Shimamura Y, Hamada K, Inoue K, *et al.* Serum levels of soluble secreted alpha-Klotho are decreased in the early stages of chronic kidney disease, making it a probable novel biomarker for early diagnosis. *Clin Exp Nephrol* 2012;16(5):722-729
55. Siahnidou T, Garatzioti M, Lazaropoulou C, *et al.* Plasma soluble alpha-Klotho protein levels in premature and term neonates: correlations with growth and metabolic parameters. *Eur J Endocrinol* 2012;167(3):433-440
56. Sugiura H, Tsuchiya K, Nitta K. Circulating levels of soluble alpha-Klotho in patients with chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol* 2011;15(5):795-796
57. Wan M, Smith C, Shah V, *et al.* Fibroblast growth factor 23 and soluble klotho in children with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2013;28(1):153-161
58. Yamazaki Y, Imura A, Urakawa I, *et al.* Establishment of sandwich ELISA for soluble alpha-Klotho measurement: Age-dependent change of soluble alpha-Klotho levels in healthy subjects. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;398(3):513-518 20
59. Yokoyama K, Imura A, Ohkido I, *et al.* Serum soluble alpha-Klotho in hemodialysis patients. *Clin Nephrol* 2012;77(5):347-351
60. Semba RD, Cappola AR, Sun K, *et al.* Plasma klotho and mortality risk in older community-dwelling adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2011;66(7):794-800
61. Doi S, Zou Y, Togao O, *et al.* Klotho inhibits transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) signaling and suppresses renal fibrosis and cancer metastasis in mice. *J Biol Chem* 2011;286(10):8655-8665
62. Ohyama Y, Kurabayashi M, Masuda H, *et al.* Molecular cloning of rat klotho cDNA: markedly decreased expression of klotho by acute inflammatory stress. *Biochemical And Biophysical Research Communications* 1998;251(3):920-925
63. Sugiura H, Yoshida T, Mitobe M, *et al.* Klotho reduces apoptosis in experimental ischaemic acute kidney injury via HSP-70. *Nephrol Dial Transplant* 2010;25(1):60-68
64. Sugiura H, Yoshida T, Tsuchiya K, *et al.* Klotho reduces apoptosis in experimental ischaemic acute renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 2005;20(12):2636-2645 30
65. Moreno JA, Izquierdo MC, Sanchez-Nino MD, *et al.* The inflammatory cytokines TWEAK and TNFalpha reduce renal klotho expression through NFKappaB. *J Am Soc Nephrol* 2011;22(7):1315-1325
66. Goldstein SL. Acute kidney injury biomarkers: renal angina and the need for a renal troponin I. *BMC Med* 2011;9:135
67. Fellouse FA, Esaki K, Birtalan S, *et al.* High-throughput generation of synthetic antibodies from highly functional minimalist phage-displayed libraries. *J Mol Biol* 2007;373(4):924-940
68. Gao J, Sidhu SS, Wells JA. Two-state selection of conformation-specific antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(9):3071-3076
69. Koellhoffer JF, Chen G, Sandesara RG, *et al.* Two synthetic antibodies that recognize and neutralize distinct proteolytic forms of the ebola virus envelope glycoprotein. *Chembiochem* 2012;13(17):2549-2557 40

70. Li B, Russell SJ, Compaan DM, *et al.* Activation of the proapoptotic death receptor DR5 by oligomeric peptide and antibody agonists. *J Mol Biol* 2006;361(3):522-536
71. Uysal S, Vasquez V, Tereshko V, *et al.* Crystal structure of full-length KcsA in its closed conformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(16):6644-6649
72. Ibrahimi OA, Zhang F, Eliseenkova AV, *et al.* Biochemical analysis of pathogenic ligand-dependent FGFR2 mutations suggests distinct pathophysiological mechanisms for craniofacial and limb abnormalities. *Hum Mol Genet* 2004;13(19):2313-2324
73. Plotnikov AN, Hubbard SR, Schlessinger J, *et al.* Crystal structures of two FGF-FGFR complexes reveal the determinants of ligand-receptor specificity. *Cell* 2000;101(4):413-424
74. Persson H, Ye W, Wernimont A, *et al.* CDR-H3 diversity is not required for antigen recognition by synthetic antibodies. *J Mol Biol* 2013;425(4):803-811
75. Rajan S, Sidhu SS. Simplified synthetic antibody libraries. *Methods Enzymol* 2012;502:3-23
76. Colwill K, Graslund S. A roadmap to generate renewable protein binders to the human proteome. *Nat Methods* 2011;8(7):551-558
77. Olsen SK, Garbi M, Zampieri N, *et al.* Fibroblast growth factor (FGF) homologous factors share structural but not functional homology with FGFs. *J Biol Chem* 2003;278(36):34226-34236
78. Kurosu H, Choi M, Ogawa Y, *et al.* Tissue-specific expression of betaKlotho and fibroblast growth factor (FGF) receptor isoforms determines metabolic activity of FGF19 and FGF21. *J Biol Chem* 2007;282(37):26687-26695
79. Kurosu H, Yamamoto M, Clark JD, *et al.* Suppression of aging in mice by the hormone Klotho. *Science* 2005;309(5742):1829-1833
80. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, *et al.* Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 1997;390(6655):45-51
81. Hu MC, Shiizaki K, Kuro-o M, *et al.* Physiology and pathophysiology of an endocrine network of mineral metabolism. *Ann Rev Phys* 2013;75:503-533
82. Hu MC, Kuro-o M, Moe OW. Renal and extrarenal actions of Klotho. *Semin Nephrol* 2013;33(2):118-129
83. Pedersen L, Pedersen SM, Brasen CL, *et al.* Soluble serum Klotho levels in healthy subjects. Comparison of two different immunoassays. *Clin Biochem* 2013;46(12):1079-1083
84. Grams ME, Chow EK, Segev DL, Coresh J. Lifetime incidence of CKD stages 3-5 in the United States. *Am J Kidney Dis.* 2013 Aug;62(2):245-52.
85. Lefranc *et al.* IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains. *Development and Comparative Immunology.* 2003;27:55-77.
86. Barker SL, Pastor J, Carranza D, *et al.* The demonstration of  $\alpha$ Klotho deficiency in human chronic kidney disease with a novel synthetic antibody. *Nephrology Dialysis Transplantation.* 2015 Feb;30(2):223-33.

【 図 1 - 1 】

**A**

CDR-L1 Q S V S S A (配列番号 9)

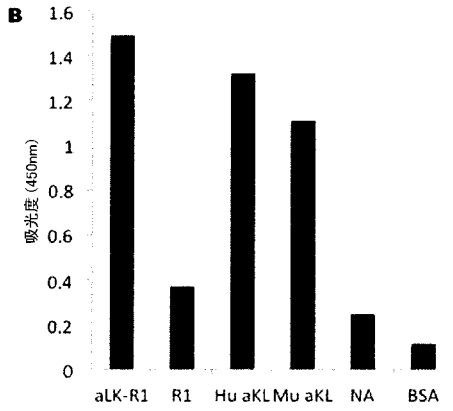
CDR-L2 S A S (配列番号 10)

CDR-L3 Q Q A G Y S F I T (配列番号 5)

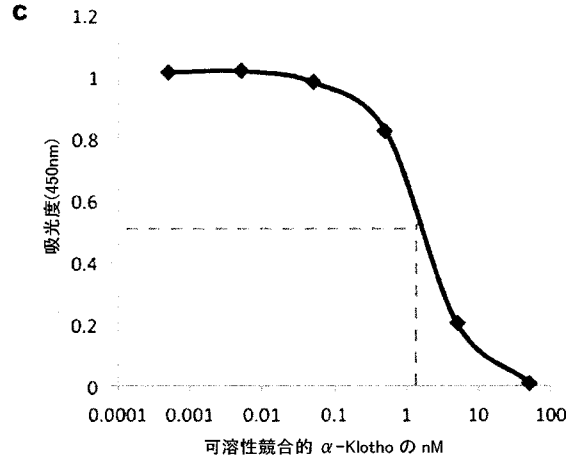
CDR-H1 G F N I S Y Y S I (配列番号 6)

CDR-H2 Y I S P S Y G Y T S (配列番号 7)

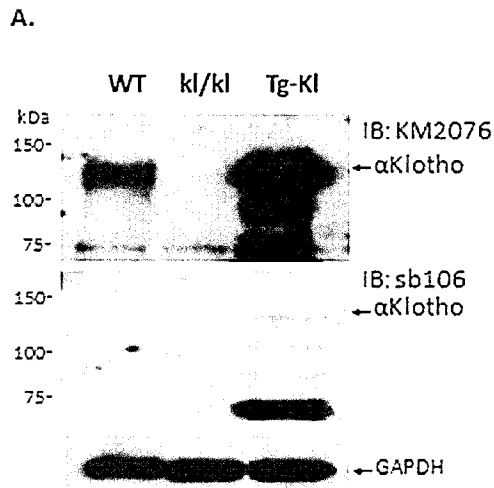
CDR-H3 A R Y Y V Y A S H G W A G Y G M D Y (配列番号 8)



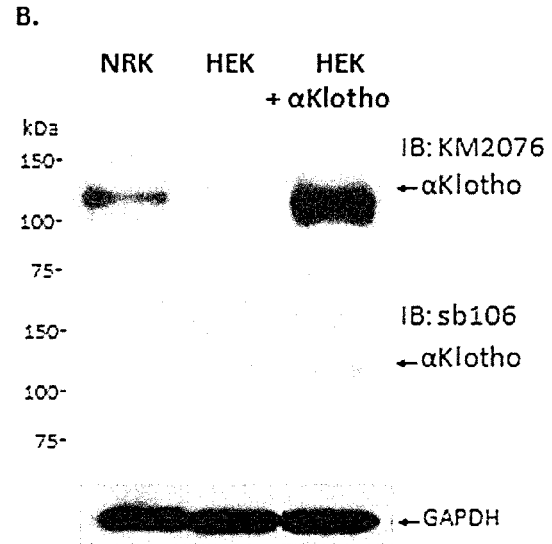
【 図 1 - 2 】



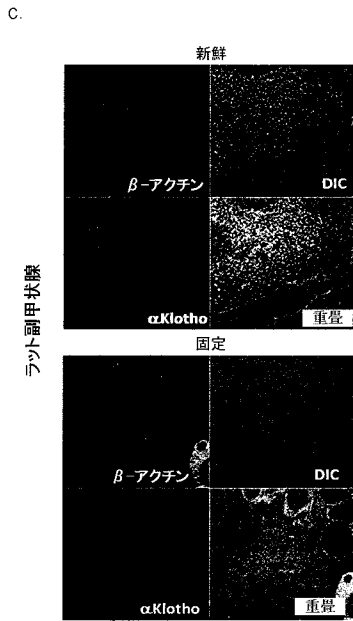
【 図 2 - 1 】



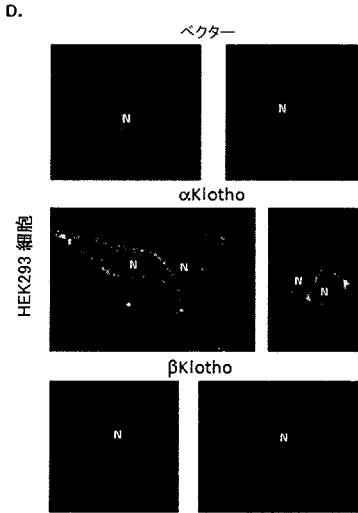
【 図 2 - 2 】



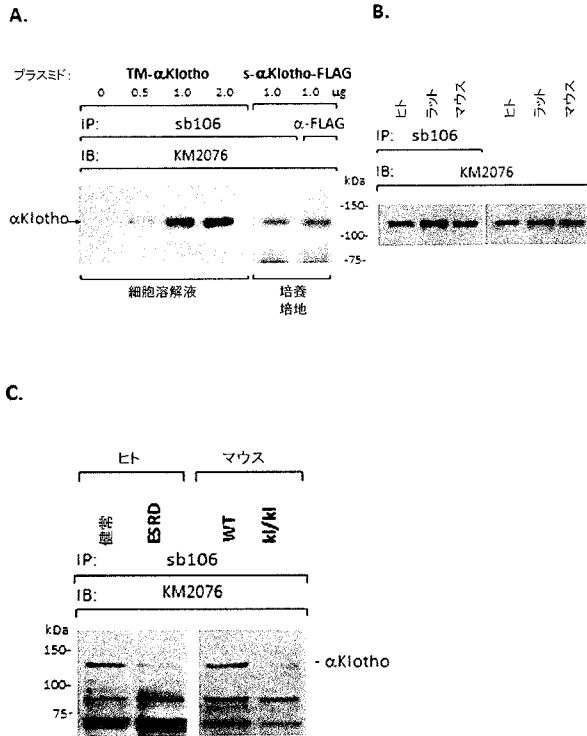
【 図 2 - 3 】



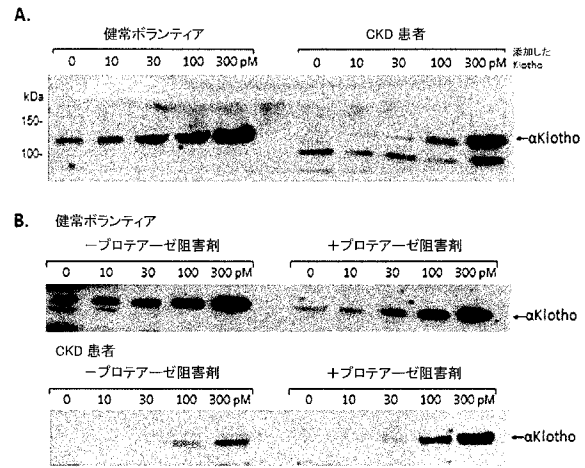
【 図 2 - 4 】



【 図 3 】

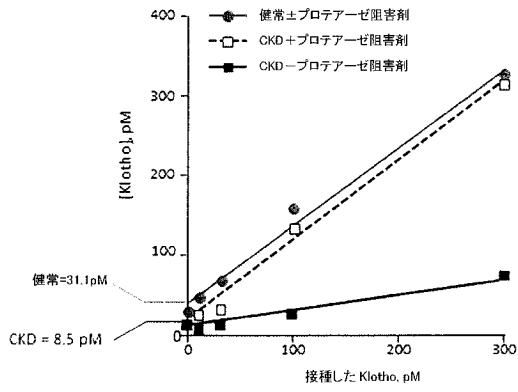


【 図 4 - 1 】



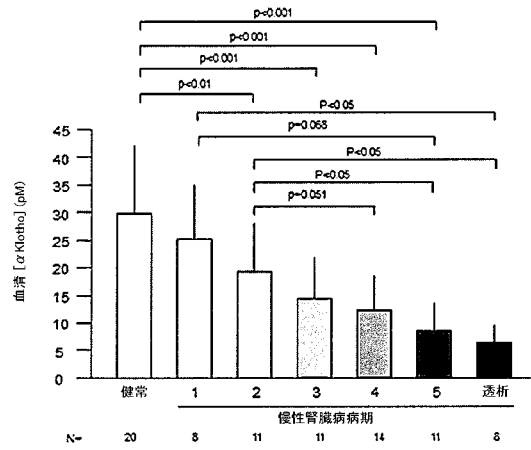
【 図 4 - 2 】

C.



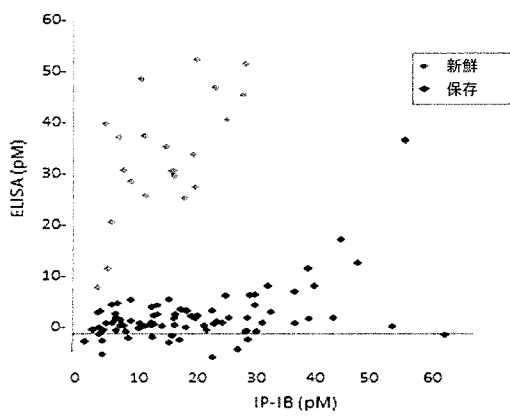
【 図 5 - 1 】

A.



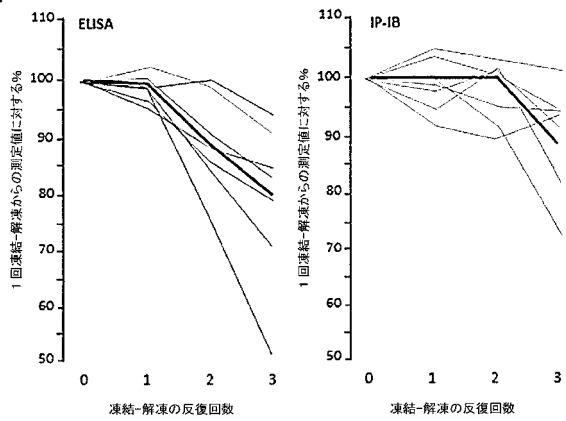
【 図 5 - 2 】

B.

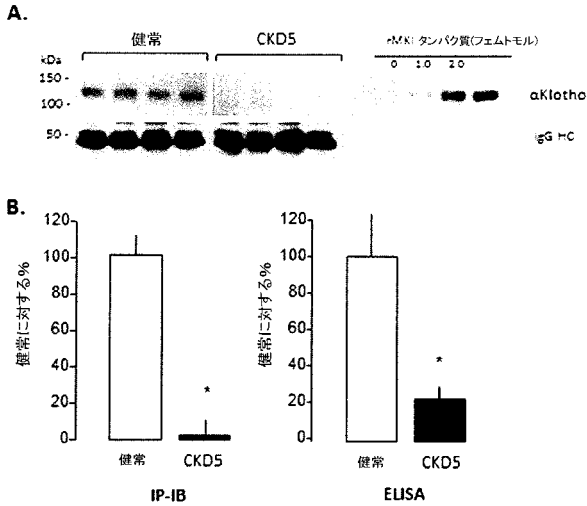


【 図 5 - 3 】

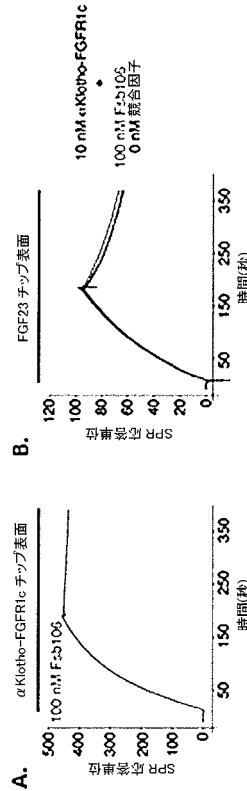
C.



【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】

A. 軽鎖配列 (配列番号 11)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQSVSSAVAWYQQKPKGKAPKLLIYSASSLYSGV  
 PSRFSGSRSGDFTLTISSLQPEDFATYYCQQAGYSPITFGQGTKEIKRTVAAPSFV  
 IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSY  
 SLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

B. 重鎖配列-Fab (配列番号 12)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNISYSIIHWWRQAPGKGLEWVAIYISPSY  
 GYTSYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARYYVYASHGWA  
 GYGM<sup>D</sup>YWGQGLTVVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV  
 SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK  
 VEPKSCDKHT

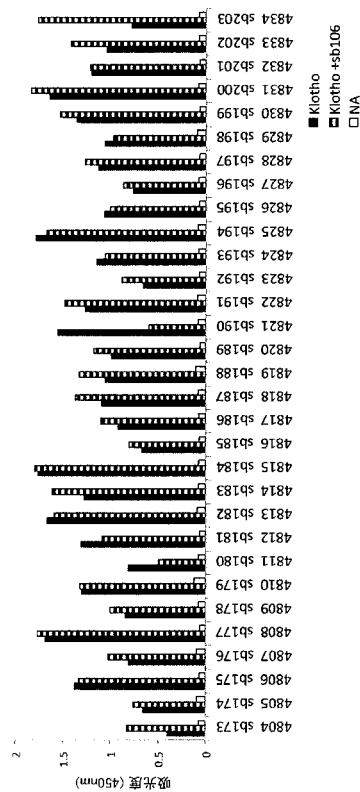
C. 重鎖配列-IgG1 (配列番号 13)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNISYSIIHWWRQAPGKGLEWVAIYISPSY  
 GYTSYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARYYVYASHGWA  
 GYGM<sup>D</sup>YWGQGLTVVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV  
 SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK  
 VEPKSCDKHTCPPEPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE  
 VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL  
 PAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ  
 PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK

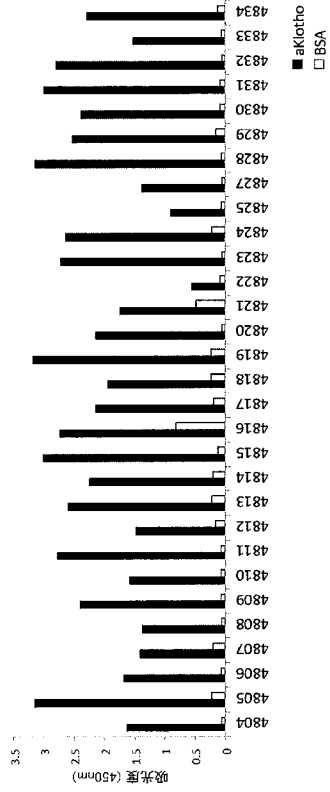
D. 重鎖配列-IgG4 (配列番号 14)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNISYSIIHWWRQAPGKGLEWVAIYISPSY  
 GYTSYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARYYVYASHGWA  
 GYGM<sup>D</sup>YWGQGLTVVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTV  
 SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK  
 RVESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQ  
 FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS  
 SIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE  
 NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK

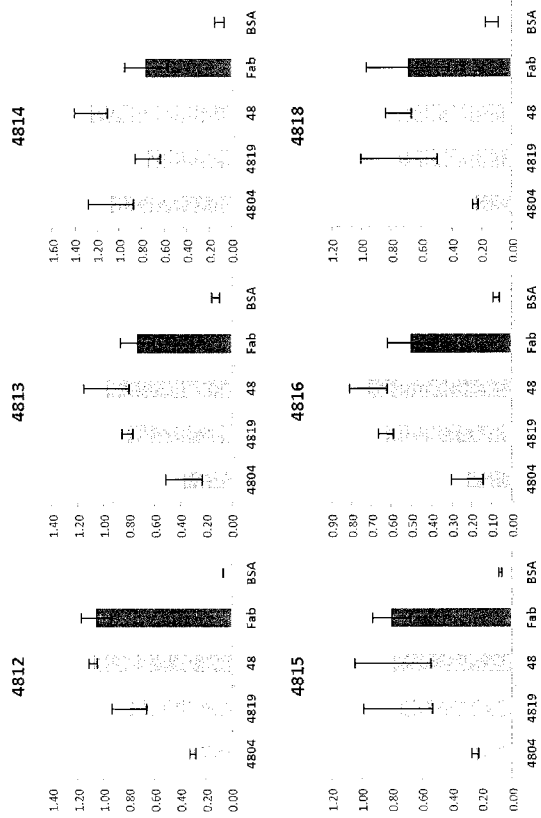
【 図 9 】



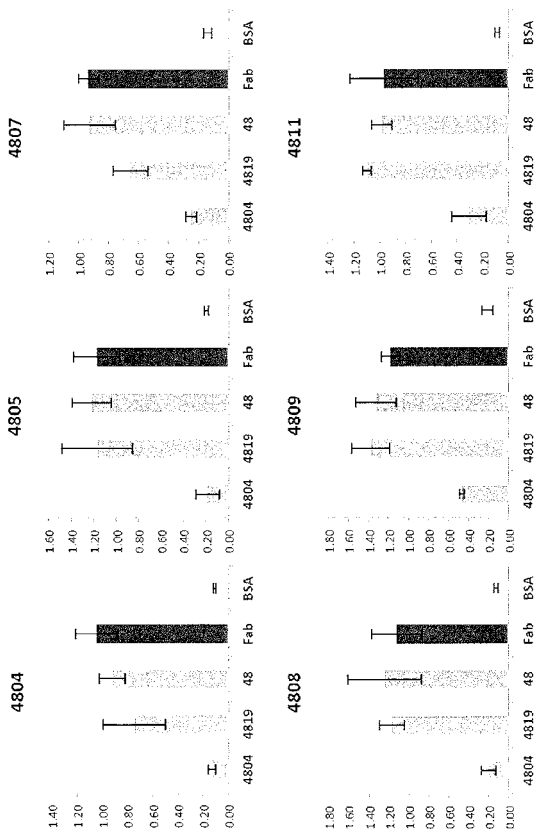
【 ☒ 1 0 】



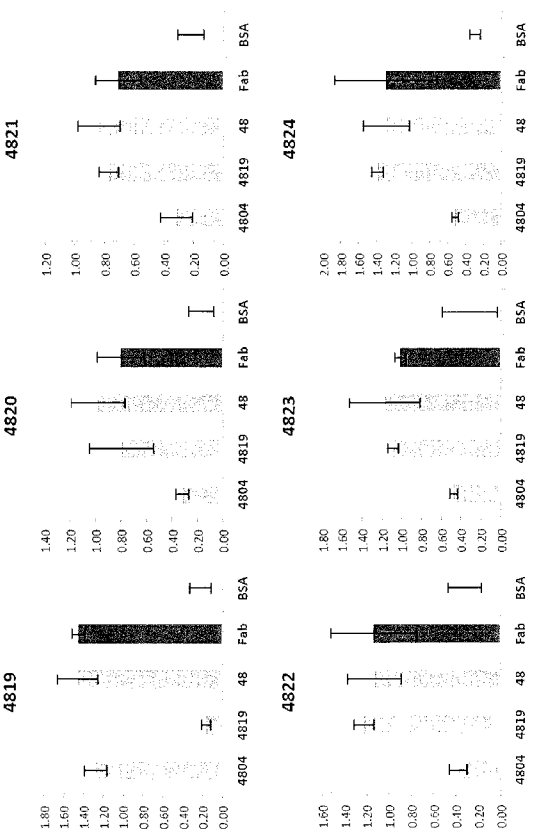
【 ☒ 1 1 - 2 】



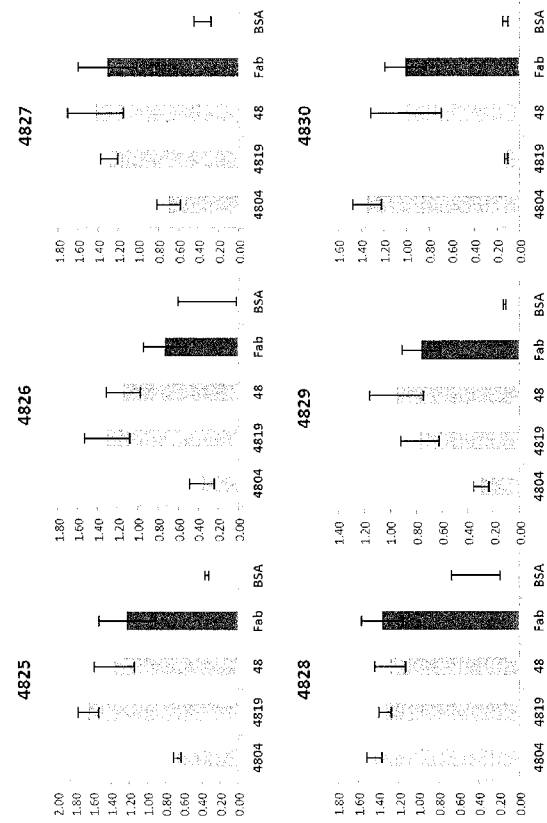
【 ☒ 1 1 - 1 】



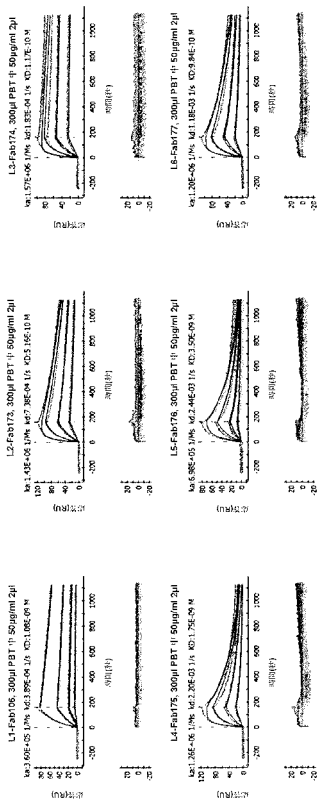
【 ☒ 1 1 - 3 】



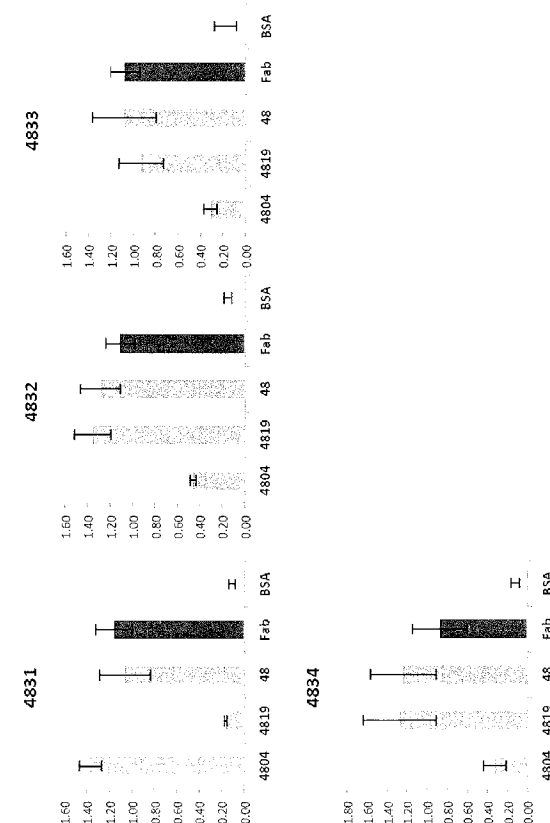
【 ☒ 1 1 - 4 】



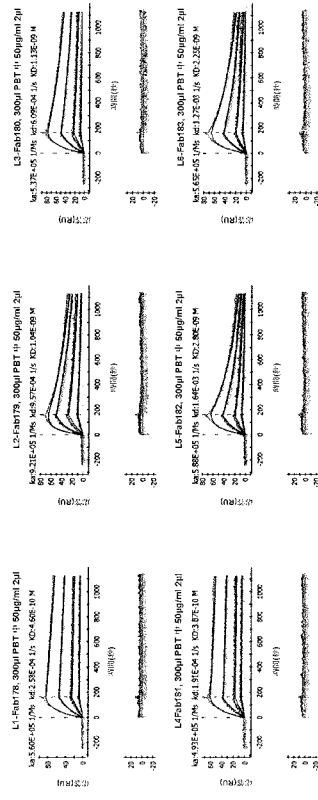
【 ☒ 1 2 - 1 】



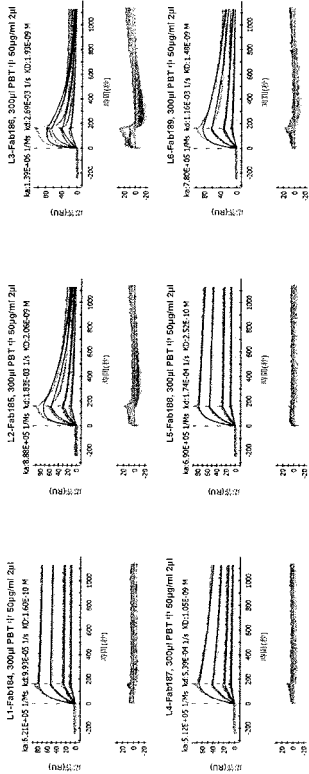
【 ☒ 1 1 - 5 】



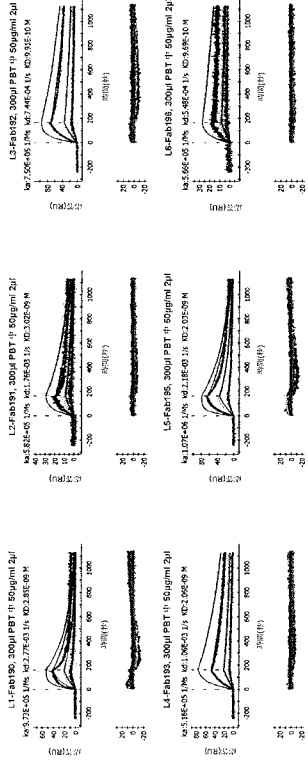
【 ☒ 1 2 - 2 】



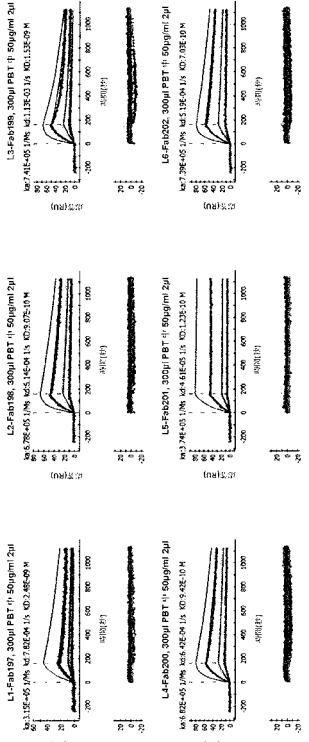
【 1 2 - 3 】



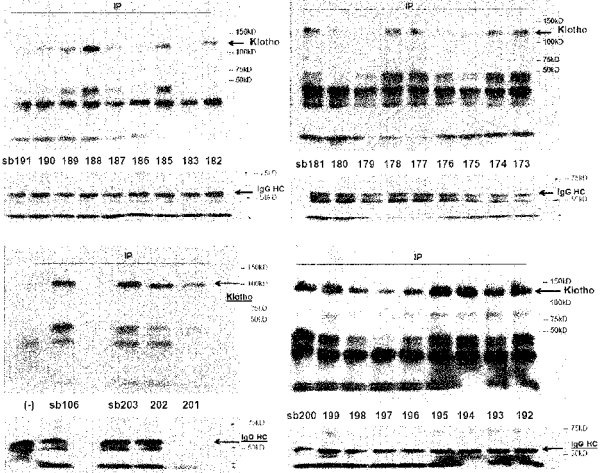
【 1 2 - 4 】



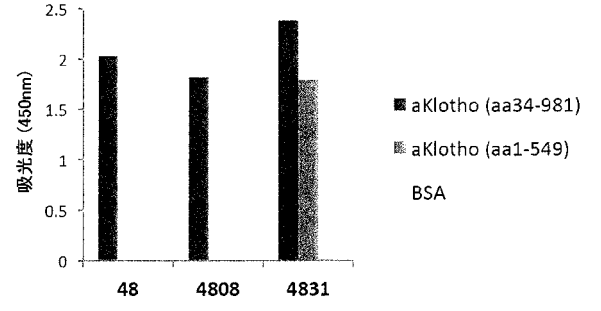
【 1 2 - 5 】



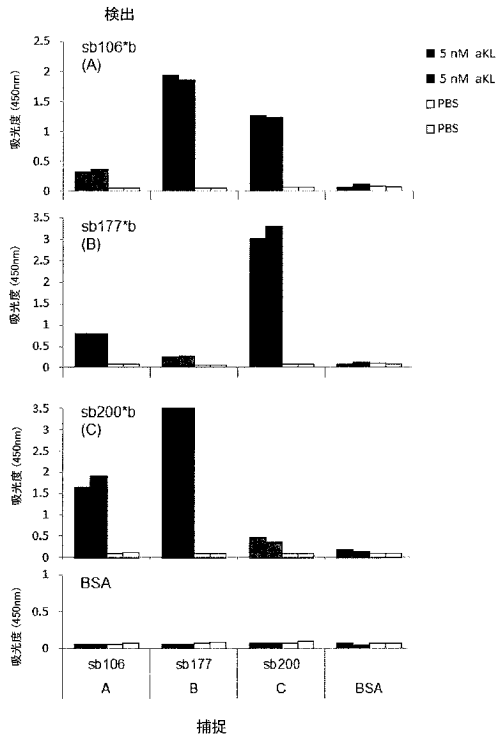
【 1 3 】



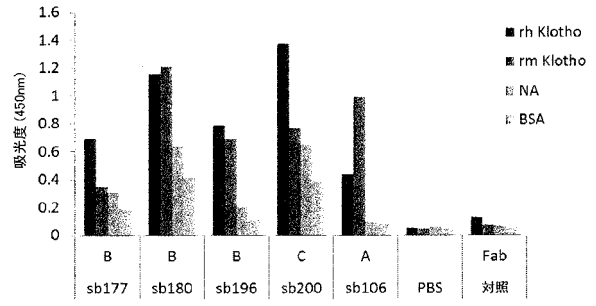
【 1 4 】



【 図 1 5 】



【 図 1 6 】

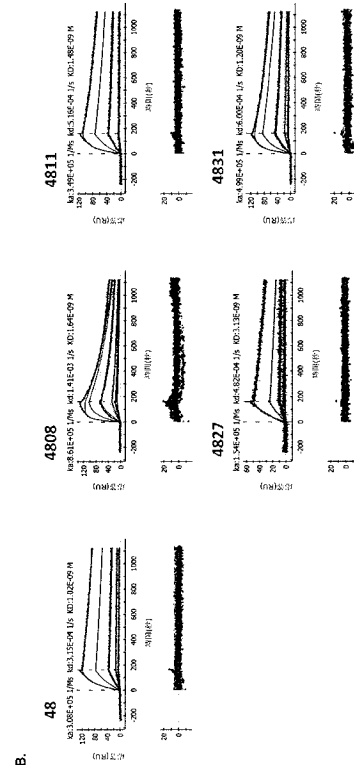


【 図 1 7 - 1 】

ID	名称	ヒト $\alpha$ Klotho		マウス $\alpha$ Klotho	
		$K_{on}$	$K_{off}$	$K_{on}$	$K_{off}$
48	sb106	3.08E+05	3.15E-04	2.02E+05	1.59E-04
4808	sb177	8.61E+05	1.41E-03	2.93E+05	1.12E-02
4811	sb180	3.49E+05	5.16E-04	2.73E+05	5.45E-03
4827	sb196	1.54E+05	4.82E-04	1.03E+05	3.75E-03
4831	sb200	4.99E+05	6.00E-04	3.21E+05	1.21E-02

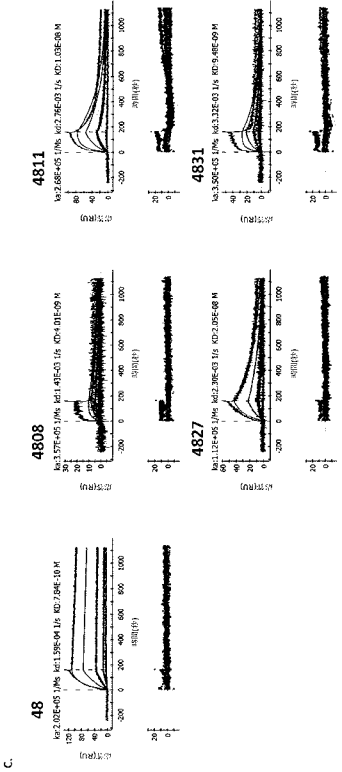
A

【 図 1 7 - 2 】



B

【 17 - 3】



【配列表】

2019513004000001.app

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. <b>PCT/CA2017/050127</b>
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC: <i>C12N 15/13</i> (2006.01), <i>A61K 39/395</i> (2006.01), <i>C07K 16/00</i> (2006.01), <i>C07K 16/18</i> (2006.01), <i>G01N 33/573</i> (2006.01) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) All IPCs		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms used) Questel Orbit, Scopus, GenomeQuest, Keywords: Klotho, antibody, Chronic kidney disease, acute kidney injury, diagnosis, prognosis Authors: Sidhu, S.; Barker, S.; Moe, O.; Kuro-o, M.; and Pastor, J.		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HU, M.C. et al., " <i>The emerging role of Klotho in clinical nephrology</i> ". Nephrology, dialysis, transplantation, 1 July 2012 (01-07-2012), Vol. 27, No. 7, pp. 2650-2657, ISSN 0931-0509 <doi: 10.1093/ndt/gfs160>, The whole document.	35, 36 and 38-42
Y	BARKER, S. L. et al., " <i>The demonstration of <math>\alpha</math>Klotho deficiency in human chronic kidney disease with a novel synthetic antibody</i> ", Nephrology, dialysis, transplantation, 15 October 2014 (15-10-2014), Vol. 30, No. 2, pp. 223-233, ISSN 0931-0509, <doi: 10.1093/ndt/> The whole document.	35-42
Y	SEO, M.Y. et al., " <i>Renal Klotho expression in patients with acute kidney injury is associated with the severity of the injury</i> ". The Korean journal of internal medicine, July 2015, Vol. 30, No. 4, pp. 489-495, ISSN 1226-3303, <doi: 10.3904/kjim.2015.30.4.489>, The whole document	37
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 10 May 2017 (10-05-2017)		Date of mailing of the international search report 10 May 2017 (10-05-2017)
Name and mailing address of the ISA/CA Canadian Intellectual Property Office Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT 50 Victoria Street Gatineau, Quebec K1A 0C9 Facsimile No.: 819-953-2476		Authorized officer  Ali Abdallah (819) 639-7686

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/CA2017/050127**

<b>Box No. II</b>	<b>Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of the first sheet)</b>
<p>This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <p>1. <input type="checkbox"/> Claim Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:</p> <p>2. <input checked="" type="checkbox"/> Claim Nos.: 1-44 because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically: The search has been restricted to antibodies that are adequately supported and sufficiently disclosed by the instant specification and that solve the technical problem of specifically binding <math>\alpha</math>Klotho. These antibodies are produced by clones 4804-4834 and defined by their six CDRs as shown in Table 3A.</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Claim Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p>	
<b>Box No. III</b>	<b>Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)</b>
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: The claims are directed to a plurality of inventive concepts as follows: Each one of the antibodies disclosed in Table 3A is considered as a separate inventive concept. The only linking feature between the different inventive concepts is an antibody that specifically binds <math>\alpha</math>Klotho. Said concept is known in the prior art (see BARKER, S. L. et al., Nephrology, dialysis, transplantation, 15 October 2014 (15-10-2014), Vol. 30, No. 2, pp. 223-233). Thus, the claims must be limited to one inventive concept as set out in PCT Rule 13.</p> <p>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.</p> <p>2. <input checked="" type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.</p> <p>3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claim Nos.:</p> <p>4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim Nos.:</p> <p><b>Remark on Protest</b></p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.</p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.</p> <p><input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/CA2017/050127**

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO2016/015162 A1 (SHDHU, S.S.), 4 February 2016 (04-02-2016). The whole document.	35, 36 and 38-44
A	HU, M.C. et al., " <i>Klotho as a potential biomarker and therapy for acute kidney injury</i> ". <i>Nature Reviews Nephrology</i> , July 2012 (07-2012), Vol. 8, No 7, pp. 423-429, ISSN 0085-2538, <doi:10.1038/nrneph.2012.92>, The whole document.	32-44
A	HU, M.C. et al., " <i>Secreted Klotho and Chronic Kidney Disease</i> ". <i>Advances in Experimental Medicine and Biology</i> , 2012, Vol. 728, pp. 126-157, ISSN 0065-2598, <doi:10.1007/978-1-4614-0887-1_9>, The whole document.	32-44

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
**PCT/CA2017/050127**

Patent Document Cited in Search Report	Publication Date	Patent Family Member(s)	Publication Date
WO2016015162A1	04 February 2016 (04-02-2016)	WO2016015162A1 CA2955039A1	04 February 2016 (04-02-2016) 04 February 2016 (04-02-2016)

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
G 0 1 N	33/543 (2006.01)	G 0 1 N	33/543	5 5 1 A
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	D

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N
2. T r i t o n

(74) 代理人 100155631

弁理士 榎 保孝

(74) 代理人 100137497

弁理士 大森 未知子

(74) 代理人 100207907

弁理士 赤羽 桃子

(72) 発明者 ザッデブ、エス・シドゥ

カナダ国オンタリオ州、トロント、ブランスウィック、アベニュー、135

(72) 発明者 サラ、エル・パーカー

カナダ国オンタリオ州、トロント、バークリー、ストリート、391、ユニット、3

(72) 発明者 オーソン、ダブリュ・モー

アメリカ合衆国テキサス州、ダラス、ラプトン、ドライブ、7108

(72) 発明者 黒尾 誠

栃木県下野市薬師寺3311-1 自治医科大学内

(72) 発明者 ヨハンネ、パストール

アメリカ合衆国テキサス州、フラワー、マウンド、ミルフォード、ドライブ、2101

Fターム(参考) 4B064 AG27 CA19 CC24 DA13

4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AA94Y AB01 BA02 CA25 CA46

4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 DA76 EA50 FA74

专利名称(译)	针对αKlotho的抗体和ELISA		
公开(公告)号	<a href="#">JP2019513004A</a>	公开(公告)日	2019-05-23
申请号	JP2018540464	申请日	2017-02-03
[标]申请(专利权)人(译)	多伦多大学		
申请(专利权)人(译)	多伦多大学的Gabaningu委员会 Rijientsu董事会，德州系统的通用名称		
[标]发明人	ザッデブエスシドゥ サラエルパーカー オーソンダブリュモー 黒尾誠		
发明人	ザッデブ、エス.シドゥ サラ、エル.パーカー オーソン、ダブリュ.モー 黒尾 誠 ヨハンネ、パストール		
IPC分类号	C12N15/13 C07K16/28 C07K19/00 C12N15/63 C12P21/08 C12N1/15 C12N1/21 C12N1/19 C12N5/10 G01N33/543 G01N33/53		
CPC分类号	C07K16/18 C07K16/28 C07K2317/21 C07K2317/33 C07K2317/55 C07K2317/92 C07K2319/32 G01N33/541 G01N33/573 G01N33/6893 G01N33/74 G01N2800/347 G01N2800/52 G01N2800/56		
FI分类号	C12N15/13.ZNA C07K16/28 C07K19/00 C12N15/63.Z C12P21/08 C12N1/15 C12N1/21 C12N1/19 C12N5/10 G01N33/543.551.A G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA72X 4B065/AA87X 4B065/AA94Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	62/290776 2016-02-03 US		
其他公开文献	JP2019513004A5 JP6682641B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

抗体和/或其结合片段，其包含轻链可变区和重链可变区，其中所述轻链可变区包含互补决定区 ( CDR ) CDR-L3，并且所述重链可变区包含包含 CDR-H1，CDR-H2和CDR-H3的序列，其中所述CDR的氨基酸序列如下所示： CDR-L3：选自SEQ ID NO：123、126-130、142、148或149中的任何一个； CDR-H1：SEQ ID NO：121或124； SEQ ID NO：121或124。 CDR-H2：SEQ ID NO：122或125；和/或 CDR-H3：选自SEQ ID NO：196至226中的任何一个。 抗体和/或其结合片段，其包含以下一种或多种：

Fig. 10

