

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6612324号
(P6612324)

(45) 発行日 令和1年11月27日(2019.11.27)

(24) 登録日 令和1年11月8日(2019.11.8)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13 Z N A
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21

請求項の数 21 (全 55 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-505099 (P2017-505099)	(73) 特許権者	515265260
(86) (22) 出願日	平成27年7月31日 (2015.7.31)		ザ ガバニング カウンシル オブ ザ
(65) 公表番号	特表2017-524362 (P2017-524362A)		ユニバーシティ オブ トロント
(43) 公表日	平成29年8月31日 (2017.8.31)		カナダ国 エム5ジー 1エル5 オンタ
(86) 国際出願番号	PCT/CA2015/050728		リオ, トロント, カレッジ ストリー
(87) 国際公開番号	W02016/015162		ト 100, パンティング インスティ
(87) 国際公開日	平成28年2月4日 (2016.2.4)		テュート, ルーム 413
審査請求日	平成30年7月30日 (2018.7.30)	(73) 特許権者	500039463
(31) 優先権主張番号	62/031,477		ボード・オブ・リージェンツ, ザ・ユニバ
(32) 優先日	平成26年7月31日 (2014.7.31)		ーシティ・オブ・テキサス・システム
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		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
		(74) 代理人	100107342
			弁理士 横田 修孝

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 αK l o t h o に対して高親和性を有する抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

K l o t h o ポリペプチドのエピトープ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って、下記の相補性決定領域 (C D R) の配列:

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 1 0)

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

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

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

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)

を含む軽鎖可変領域および重鎖可変領域を含んでなる、抗体および/またはその結合フラグメント。

【請求項2】

競合的 E L I S A アッセイにより測定した場合に、抗体および/またはその結合フラグメントが、10 nM以下の解離定数 (K_D) で K l o t h o ポリペプチドのエピトープと特異的に結合する、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】

競合的 E L I S A アッセイにより測定した場合に、抗体および/またはその結合フラグメントが、2 nM以下の解離定数 (K_D) で K l o t h o ポリペプチドのエピトープと特異的に結合する、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 4】

前記軽鎖可変領域が配列番号 1 1 中の前記領域に対して少なくとも 70% の配列同一性を有し、重鎖可変領域が配列番号 1 2 の前記領域に対して少なくとも 70% の配列同一性を有する、請求項 1 ~ 3 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 5】

配列番号 1 1 中に記載の軽鎖可変領域のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域と、配列番号 1 2 中に記載の重鎖可変領域のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域とを含んでなる、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】

配列番号 1 1 に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖を含んでなり、かつ、配列番号 1 2 に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含んでなる、請求項 1 ~ 5 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 7】

配列番号 1 3 または配列番号 1 4 に示される前記アイソタイプのアミノ酸配列を有する重鎖 I g G 1 または I g G 4 アイソタイプを含んでなる、請求項 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。

【請求項 8】

モノクローナル抗体、免疫グロブリン分子、F a b、F a b'、F (a b) 2、F (a b') 2、F v、ジスルフィド結合 F v、s c F v、ジスルフィド結合 s c F v、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 ~ 7 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 9】

H i s タグ、H A タグ、G S T タグおよび F L A G タグからなる群から選択される検出可能なタグで標識された、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】

請求項 1 ~ 9 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 とを含んでなる、抗体複合体。

【請求項 11】

F G F R 1 c および/または F G F 2 3 をさらに含んでなる、請求項 10 に記載の抗体複合体。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 9 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コードする核酸。

【請求項 13】

請求項 1 2 の核酸を含んでなるベクター。

【請求項 14】

請求項 1 2 の核酸または請求項 1 3 に記載のベクターを含んでなる、請求項 1 ~ 9 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産生する組換え細胞。

【請求項 15】

請求項 1 ~ 9 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 1 2 に記載の核酸、請求項 1 3 に記載のベクターまたは請求項 1 4 に記載の細胞を含んでなる組成物。

【請求項 16】

請求項 1 ~ 9 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であって、酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A) である、イムノアッセイ。

【請求項 17】

10

20

30

40

50

請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の K l o t h o ポリペプチドのエピトープ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生産する方法であって、下記工程：

a . 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のアミノ酸配列をコードする核酸を宿主細胞内で発現させること、

b . 前記抗体および/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、および

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精製すること

を含んでなる、方法。

10

【請求項 18】

サンプル中の K l o t h o ポリペプチドのレベルを測定するためのアッセイであって、

a . サンプルと請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の抗体とを、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 複合体を検出すること

を含んでなる、アッセイ。

【請求項 19】

サンプルが 血液もしくはその画分、尿および脳脊髄液からなる群から選択される体液である、請求項 18 に記載のアッセイ。

20

【請求項 20】

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するためまたは検出するためのスクリーニング方法であって、

a . 対象由来のサンプルにおける K l o t h o のレベルを、請求項 1 ~ 9 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、あるいは、請求項 18 もしくは 19 に記載のアッセイを用いて測定すること、

b . 前記サンプルにおける K l o t h o 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における 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し、

30

対照と比較した前記サンプルにおける K l o t h o のレベルの上昇が、前記対象が A K I 後の長期合併症がより少ないというより高い見込みを有することを示し、

対照と比較した前記サンプルにおける K l o t h o のレベルの上昇が、前記対象が C K D から回復する高い見込みを有することを示し、および/または

対照と比較した前記サンプルにおける K l o t h o のレベルの上昇が、前記対象が C K D に関連する腎外合併症がより少ないというより高い見込みを有することを示す、方法

。

【請求項 21】

請求項 1 ~ 9 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、参照薬剤およびその使用のための説明書を含んでなるキット。

40

【発明の詳細な説明】

【関連出願の相互参照】

【0001】

これは 2014 年 7 月 31 日に出願された米国仮特許出願第 62 / 031 , 477 号の優先権に基づき 35 U . 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】

本発明は、N I H グラント第 R 0 1 D K 0 9 1 3 9 2 号、同第 R 0 1 D K 0 9 2 4 6 1 号および同第 R 0 1 D E 1 3 6 8 6 号の下、一部は米国政府の支援でなされたものである

50

。米国政府は本発明について所定の権利を持ち得る。

【技術分野】

【0003】

Klothoポリペプチド内のエピトープと特異的に、例えば、競合的ELISAアッセイにより測定した場合に約2 nM以下の解離定数(K_D)で結合する抗体および/またはその結合フラグメント、ならびに例えば、腎臓病を診断するための前記抗体の作製方法および使用方法。

【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、総説としては2]。Klothoは主として腎臓、副甲状腺、および脈絡膜叢で発現される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タンパク質も知られている。

【0005】

Klothoは、イオン輸送の調節、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、ならびに抗酸化を含む多様な作用を持つ。最高レベルのKlotho発現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性放出[14、15]により生じる内分泌物質[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性は、Klotho腎発現の低下が病原であるという概念を裏づける[1、16]。

【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]の低下がネフロン縮小手術、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]。この集束は、Klotho欠乏がネフロン喪失の遺伝的結果であり得ることを示唆する。Klothoの低下はおそらくCKDの高感度かつ早期バイオマーカーであり、CKD合併症の予後のバイオマーカーでもある[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、齧歯類およびヒト両方の急性腎障害(AKI)でも報告されている[25]。Klothoは、現在知られているAKIのバイオマーカーの変化よりもはるかに早期に減少するので、おそらくAKIの早期バイオマーカーとして役立つ可能性がある[26]。

【0007】

Klothoは、FGF23に対する選択的親和性を付与するためにFGF受容体(FGFR)と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FGF23耐性およびリン酸保持をもたらす。従って、KlothoおよびFGF23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]。

【0008】

膜係留型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。この可溶型は、膜係留型から膜係留プロテアーゼにより生成され、血液および尿中に放出される[13、15]。上述のように、膜係留型KlothoはFGF23受容体複合体の一部として働くが、分泌型Klothoは、上述のように多面発現性の高い作用(イオン輸送の調節、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)を発揮するように遠隔器官で作用を発揮する内分泌因子として働く[7]。

10

20

30

40

50

【0009】

腎障害および腎機能の低下を特徴とする進行性CKD（ステージ4～5）は、推計260万人のカナダ人を侵し、集団の7%を越える。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、および黒人女性の生涯リスク、それぞれCKDステージ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荷は大きく、数年後に増悪する[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、末期腎臓病（ESRD）に対して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、ミネラル代謝の異常に結びつけられているCKD-骨ミネラル代謝異常(CKD-mineral bone disturbance)（CKD-MBD）の実体の中に包含される。リン酸保持はCKD患者に普遍的に見られ、不良な転帰に関連している[35、36]。高リン血症は通常、この疾患が末期への進行を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]。

10

【0010】

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つであることが見出された[12]。

【0011】

現在のところ、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有効でなく、Klothoに関する現行の免疫に基づくアッセイは高くつき、感度および特異性が十分でない。

20

【0012】

低Klotho転写産物およびタンパク質レベルは、末期腎臓の腎摘出術サンプルからのヒト腎臓およびCKD患者からの生検で記載されている[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（異なる研究室でレベルにおいて100倍位の範囲）およびCKDおよび年齢による変化の方向（増加、減少、または変化無し）に関して広く分散した結果が示された[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義なヒト適用に変換されるかどうかを決定する能力を無効にした。CKDに加え、様々な原因からの急性腎障害（AKI）もまた、腎臓における[25、61～65]、また、齧歯類の血清中およびヒトの尿中の[25] Klothoの急速な低下に関連している。これまでにAKIにおけるヒト血清Klothoに関するデータは無い。ヒトにおける腎障害の早期の、高感度かつ/または特異的なマーカーの必要がある[66]。

30

【0013】

抗体開発のための動物の免疫誘導法は自己免疫から保護する機構を受けるので、保存されているタンパク質に対する抗体を作製することは難しい。合成抗体技術は、定義されたイン・ビトロ条件下で適用され、自己反応性抗体を除去する免疫寛容選択を受けている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[67～71]なので、有力な選択肢である。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）に配列の多様性が導入される。これらのライブラリーはファージディスプレイと組み合わせられ、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、直接的な表現型-遺伝子型関係を達成する。対象抗原と結合するFab提示ファージは、固相支持体上の精製抗原による結合選択を用いて富化される。結合ファージクローンのCDRはDNAシーケンシングにより同定され、Fabタンパク質は細菌から精製されるか、または哺乳類細胞において全長IgGに変換される。

40

【発明の概要】

【0014】

50

本発明開示は、 K l o t h o タンパク質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に関する。

【 0 0 1 5 】

1つの態様は、単離または精製された抗体および/またはその結合フラグメントを含み、前記抗体および/またはその結合フラグメントは、 K l o t h o ポリペプチドのエピトープと、競合的 E L I S A アッセイにより測定した場合に約 2 n M 以下の解離定数 (K_D) で特異的に結合する。

【 0 0 1 6 】

1つの実施形態では、抗体が特異的に結合する 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。

10

【 0 0 1 7 】

さらなる態様は、軽鎖可変領域と重鎖可変領域とを含んでなり、前記軽鎖可変領域が相補性決定領域 C D R - L 3 を含んでなり、かつ、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：

a . C D R - L 3 ; $X_1 X_2 X_3 X_4 P X_5$ (配列番号 1)

(ここで、 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)；

b . C D R - H 1 : $X_6 X_7 X_8 X_9 X_{10} X_{11}$ (配列番号 2)

(ここで、 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、かつ、 X_{11} は I または V である)；

20

c . C D R - H 2 ; $X_{12} X_{13} X_{14} X_{15} X_{16} X_{17} X_{18} X_{19} X_{20} X_{21}$
(配列番号 3)

(ここで、 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、かつ、 X_{21} は S、A または Y である)；および/または

d . C D R - H 3 : $X_{22} X_{23} V Y X_{24} X_{25} X_{26} X_{27} W X_{28} G X_{29} G M$
(配列番号 4)

30

(ここで、 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、かつ、 X_{29} は Y または F である) 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である。

【 0 0 1 8 】

別の態様は、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 1 9 】

さらなる態様は、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 0 】

40

別の態様は、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産生する組換え細胞を含む。

【 0 0 2 1 】

別の態様は、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含んでなるまたは使用するイムノアッセイである。

【 0 0 2 2 】

他の態様は、本明細書に記載の K l o t h o ポリペプチドのエピトープ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生産する方法、サンプルにおける K l o t h o ポリペプチドのレベルを測定するためのアッセイ、可溶性 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アッセイ、ならびに対象に

50

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スクリーニング、診断または検出する方法、ならびに疾患の進行および/または回復の予後診断を行う方法を含む。

【0023】

本開示の他の特徴および利点は、以下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内の様々な変化および改変が明らかとなるので、詳細な説明および具体例は、本開示の好ましい実施形態を示しつつ、単に例として示されると理解されるべきである。

【0024】

以下、本開示の実施形態を図面に関して記載する。

10

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】図1は、IMGTナンバリング法で抗 K l o t h o s b 1 0 6 の s b 1 0 6 (A) CDR配列の配列、特異性および親和性を示す。(B) Fab - ファージELISAによる抗 K l o t h o s b 1 0 6 の特異性の決定: s b 1 0 6 Fab - ファージを、以下の固定化抗原とともにインキュベートした: FGFR1c / K l o t h o 複合体の複合体 (aKL - R1)、FGFR1c 単独 (R1)、ヒト K l o t h o (Hu aKL) およびマウス K l o t h o (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結合抗ファージ抗体を用いて検出した。比色定量HRP試薬が450nmでの吸光度の読み取りを可能とする。(C) 競合 Fab - ファージELISAによる親和性の評価。s b 1 0 6 Fab - ファージを50、5、.5、.05、.005および.0005nMの可溶性ヒト K l o t h o とともにプレインキュベートした。報告される固定化ヒト K l o t h o 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 K l o t h o への結合の減少が可溶性 K l o t h o に結合した画分を示し、従って、可溶性 K l o t h o 濃度が相互作用の K_D とほぼ等しい場合には、シグナルに50%の減少が生じる。

20

【図2】図2は、免疫プロット、免疫組織化学および免疫細胞化学による s b 1 0 6 - F a b の 特性を示す。(A) 野生型マウス (WT)、同型接合 K l o t h o 矮小型マウス (kl / kl) およびトランスジェニック K l o t h o 過剰発現マウス (Tg - Kl) 由来の腎臓溶解液の、モノクローナル抗体 KM2076 または s b 1 0 6 - F a b を用いた免疫プロット。GAPDH: グリセルアルデヒドリン酸デヒドロゲナーゼ (B) 正常ラット腎臓 (NRK) 細胞、ヒト胎児腎臓 (HEK) 細胞、および K l o t h o の過剰発現のため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 s b 1 0 6 - F a b を用いた免疫プロット。(C) - アクチンまたは s b 1 0 6 - I g G q をファロイジンでプロービングした新鮮なまたは固定したラット副甲状腺組織。(D) ベクター対照、または K l o t h o もしくは K l o t h o の過剰発現のためのベクターでトランスフェクトされた HEK293T 細胞の s b 1 0 6 免疫染色。代表的な細胞を示す。DAPI核染色を「N」で示す。(スケールバー、10 μ m)。Fab s b 1 0 6 による K l o t h o 染色は、K l o t h o でトランスフェクトされた細胞でのみ見られ、K l o t h o でトランスフェクトされた細胞では見られなかった。

30

40

【図3】図3は、免疫沈降による s b 1 0 6 - F a b の 特性を示す。(A) HEK293 細胞を、エンブティーベクター、または種々の量 (μ g / ディッシュ) の、膜貫通全長 K l o t h o (TM - K l o t h o) もしくはC末端FLAGエピトープ (s - K l o t h o - F L A G) を有する K l o t h o の可溶性細胞外ドメインの発現のため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 s b 1 0 6 - F a b または抗FLAG MA b のいずれかで免疫沈降 (IP) させた。免疫複合体をSDS - PAGEにより分離し、モノクローナル抗 K l o t h o 抗体 KM2076 で免疫プロット法 (IB) を行った。(B) ラット、マウス、またはヒトからの尿を s b 1 0 6 - F a b

50

で免疫沈降させ、SDS-PAGEで分離し、KM2076で免疫ブロッキング(IB)を行った(左の3つのレーン)。サイズ選択した尿(カットオフ100kDa)にそのままSDS-PAGEを行い、免疫プロット法を行った(右の3つのレーン)。(C)血清由来の内因性 Klothoの免疫沈降。野生型(WT)マウス、klotho^{-/-}マウス、正常ヒト、および透析患者(ESRD)からの血清サンプルをsb106-Fabとともに4で一晩インキュベートした。次に、抗FLAG抗体が結合された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。これらのビーズを洗浄し、結合したタンパク質を2×SDSサンプルローディングバッファーで溶出させた。免疫プロット法をKM2076で、次いで、可視化のために標準的二次抗ラットIgG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アッセイのバリデーションを示す。(A)既知量の可溶性ヒト Klothoエクドメインを、健康なボランティアまたは無腎の透析患者(CKD患者)からの血清に加えた。IP-IBアッセイを用い、血清において Klothoを測定した。(B)プロテアーゼ阻害剤(AEBSF 0.1mM、アプロチニン0.3μM、ベスタチン(ベスタチン)10μM、E-64 1μM、ロイペプチン50μM、ペプスタチンA 1μM)を含めてまたはIPから除いて比較を行ったこと以外は、(A)と同様の試験。(C)上記の4条件で、IP-IBにより決定された Klothoレベル(y軸)を添加した組換え Klotho(x軸)に対してプロットした。無添加への外挿は、プロテアーゼ阻害剤で処理した血清における内因性の Klothoのレベルを示す。プロテアーゼ阻害剤を含むまたは含まない健康な血清に関しては、結果が区別できなかったので1本の線のみが示されている。

【図5】図5は、慢性腎臓病を有するヒトにおける血清 KlothoのIP-IBアッセイを示す。(A)検量線として組換え Klothoを用いた従来の数値による病期分類を用い、正常健康なボランティアおよびCKD診療および透析装置からの患者のヒト血清においてIP-IBアッセイにより 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-コイルス検定により分析した。群間の統計的有意性に達するP値を括弧の上に示す。各群の対象の数を一番下に示す。(B)多様なヒト血清中の Klothoの濃度を同じサンプルにおいてIP-IB(x軸)または市販のELISA(y軸)のいずれかにより決定した。点線は識別ラインを示す。グレーの菱形は、1回以上の凍結-解凍サイクルを経た(保存されていた)血清を表し、黒い菱形は、1回のみ解凍した(新鮮な)血清を表す。(C)ヒト対象からの血清をIP-IBおよびELISAによりアッセイした。同じ血清に示された回数の反復凍結-解凍を施した後にアッセイした。各サンプルの結果を、1回のみ解凍した同じサンプルからの読み取りに対するパーセンテージとして表した。黒い線は種々の対象の平均を表す。

【図6】図6は、ヒト尿の Klothoレベルを示す。健康なボランティアまたは慢性腎臓病ステージ5(CKD5)の患者の尿で Klothoを測定した。(A)定常状態条件下で各群4名を対象で、較正として組換えマウス Klotho(rMK1)を用いた代表的IP-IBアッセイ。等量の尿クレアチンをIP-IBに用いた。(B)IP-IBアッセイおよび市販のELISAからのデータの概要。バーおよびエラーバーは各群8名を対象からの平均および標準偏差を表す。健康なボランティアの平均を、参照を100%として示した。

【図7】図7は、sb106-Fabを用いたSPRセンサーグラムを示す。(A) Klotho-FGFR1c複合体に対するsb106-Fab(Fsb106)の結合を示すSPRセンサーグラム。マウス KlothoエクドメインおよびヒトFGFR1c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、100nMのFsb106をそのチップ上に注入した。Fsb106は Klotho-FGFR1c複合体から極めてゆっくり解離することを注記しておく。(B)sb106-FabはFGF23と KlothoとFGFR1cの間の三元複体の形成を阻害しないことを示すSPRセンサーグラムの重畳(オーバーレイ)。10nMの Klotho-FGFR

10

20

30

40

50

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。

【図8】図8は、s b 1 0 6 のアミノ酸配列を示す。(A) s b 1 0 6 の軽鎖配列(配列番号11)。(B) 重鎖配列 - F a b (配列番号12)。(C) 重鎖配列 - I g G 1 (配列番号13)。(D) 重鎖配列 - I g G 4 (配列番号14)。下線のアミノ酸は C D R 配列であり; 太字のアミノ酸は可変 C D R 配列(L3、H1、H2およびH3)であり; 斜体のアミノ酸は定常ドメインである。

【発明の具体的説明】

【0026】

10

I. 定義

用語「K l o t h o」または「アルファ-K l o t h o」は、本明細書で使用する場合、用いられている文脈から決定可能なように、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、総て既知の天然 K l o t h o 分子、ならび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。可溶型(タンパク質分解切断された) K l o t h o、ならびに血液もしくはその画分、尿または脳脊髄液などの体液中に存在する場合に「可溶性 K l o t h o」と呼ばれ、約130 kDaの分子量を有する選択的スプライシング型 K l o t h o、ならびに膜係留型の K l o t h o、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 などの哺乳類 K l o t h o が含まれる。

20

【0027】

用語「急性腎臓障害」または「A K I」は、本明細書で使用する場合、剥離、および例えば、血中の尿素および他の化学物質の蓄積をもたらし得る、例えば傷害7日以内に生じる、腎機能の持続的低下を意味する。A K Iは、疾患、骨格筋に対する挫傷などの損傷および投薬によって起こり得る。A K Iは、リスク(糸球体濾過速度(GFR)の25%の低下)から、障害(GFRの50%の低下)、不全(GFRの75%の低下)、喪失(4週間を越える腎機能の完全な喪失)および末期腎臓病(3か月を越える腎機能の完全な喪失)まで異なるステージに分類される。A K Iは無症候性の場合もある。

30

【0028】

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

【0029】

用語「アミノ酸」は、天然アミノ酸ならびに改変アミノ酸の総てを含む。

【0030】

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、一本鎖抗体およびその他のキメラ抗体を含むものとする。抗体は、組換え源由来であってもよく、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つの実施形態の抗体は、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。

40

【0031】

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')₂、s c F v、d s F v、d s - s c F v、二量体、ミニボディ、ダイアボディ、およびその多量体、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ものとする。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')₂フラグメントは、抗体をペプシンで処理することにより生成することができる。得られたF(a b')₂フラグメントを、ジスルフィド橋を還元するように処理するとF a b'フラグメントを生成することができる。パパイン消化はF a bフラ

50

グメントの形成をもたらし得る。Fab、Fab'およびF(ab')₂、scFv、dsFv、ds-scFv、二量体、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り合成することもできる。

【0032】

「保存的アミノ酸置換」は、本明細書で使用する場合、タンパク質の所望の特性を損なうことなくあるアミノ酸残基が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、類似の疎水性、極性、およびR鎖長を有するアミノ酸で相互に置換することにより行うことができる。保存的アミノ酸置換の例としては、以下のものが挙げられる。

【0033】

【表1】

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

10

20

【0034】

用語「対照」は、本明細書で使用する場合、腎臓病を有することまたはその疾患を有さないことが知られている対象または対象群からのサンプル、および/または前記対象群から決定された値を意味し、このような値以下のKlothoレベルを有する対象はこの疾患を有する可能性がある。この疾患は例えば、慢性腎臓病（CKD）または急性腎障害（AKI）であり得る。この疾患はまた、例えば、ステージ1 CKD、ステージ2 CKD、ステージ3 CKD、ステージ4 CKDまたはステージ5 CKDなどのCKDのステージであり得、ステージが高いほど重篤である。加えて、対照は例えば、処置される対象のサンプルと同じタイプの組織に由来し得る。経過観察のために指示される方法では、対照はまた、異なる時点で採取された同じ対象由来の組織であり得、例えば、対照は、腎臓病の処置前に採取された同じ対象からのサンプルであり得る。

30

【0035】

用語「慢性腎臓病」または「CKD」は、腎機能に進行性の喪失を生じる疾患を意味する。CKDは、定義された糸球体濾過速度（GFR）に従って決定される5段階のステージにより分類される。ステージ1 CKDは、90 mL / 分 / 1.73 m²のGFRにより定義され、ステージ2 CKDは60 ~ 89 mL / 分 / 1.73 m²の間のGFRにより定義され、ステージ3 CKDは30 ~ 59 mL / 分 / 1.73 m²の間のGFRにより定義され、ステージ4 CKDは15 ~ 29 mL / 分 / 1.73 m²の間のGFRにより定義され、ステージ5 CKDは15 mL / 分 / 1.73 m²未満のGFRにより定義される。正常な腎機能は、100 ~ 130 mL / 分 / 1.73 m²の間またはタンパク尿のない90 mL / 分 / 1.73 m²により定義される。

40

【0036】

用語「早期慢性腎臓病」は、初期段階のCKDを意味し、ある実施形態では、ステージ1および/またはステージ2 CKDが早期CKDであることを意味する。多くの場合、FGF23、PTH、およびリン酸塩の上昇はない。ステージ1 CKDの対象は、腎障害を示す症状をほとんど呈さない。ステージ2 CKDの対象は、腎障害を示す症状を必ずしも呈さないが、呈する場合もある。

50

【 0 0 3 7 】

用語「変性」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変性条件に曝された場合に、三次構造および/または二次構造（例えば、完全に折り畳まれていないタンパク質）を喪失したポリペプチドを意味する。

【 0 0 3 8 】

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。

【 0 0 3 9 】

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される抗原上の部位を意味する。

10

【 0 0 4 0 】

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、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）と呼ばれる3つの相補性決定領域を有する。本明細書で用いられるナンバリングは、IMGTナンバリングである。

【 0 0 4 1 】

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は、例えばCDR配列の外側で、改変する、例えば保存的置換で置換することができる。

20

【 0 0 4 2 】

用語「宿主細胞」は、組換え細胞を作出するために組換えDNA発現ベクターが導入され得る細胞を意味する。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、昆虫または哺乳類宿主細胞であってもよい。

【 0 0 4 3 】

当技術分野で認識される、用語「IMGTナンバリング」または「Immunogeneticsデータベースナンバリング」は、抗体、またはその抗原結合部分の重鎖および軽鎖可変領域の他のアミノ酸残基よりも変動の大きい（すなわち、超可変）アミノ酸残基をナンバリングするシステムを意味する（85）。重鎖可変領域では、超可変領域は、CDR-H1がアミノ酸32～38番、CDR-H2がアミノ酸55～64番、CDR-H3がアミノ酸107～117番の範囲である。軽鎖可変領域では、超可変領域は、CDR-L1がアミノ酸24～39番、CDR-L2がアミノ酸56～69番、CDR-L3がアミノ酸105～117番の範囲である。

30

【 0 0 4 4 】

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「単離および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もしくは培養培地を、または化学的に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。

40

【 0 0 4 5 】

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。

【 0 0 4 6 】

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、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と呼ばれる3つの相補性決定領域を有する。

【 0 0 4 7 】

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。

50

【0048】

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、その天然コンフォメーション（例えば、3Dコンフォメーション）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に折り畳まれていないタンパク質を含め、官能性を付与するのに十分なコンフォメーションの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 受容体と結合することができ、F G F R 1 c : K l o t h o 複合体を形成し得る。

【0049】

用語「核酸配列」は、本明細書で使用する場合、天然の塩基、糖鎖および糖間（骨格）結合からなるヌクレオシドまたはヌクレオチド単量体の配列を意味する。この用語はまた、非天然単量体またはその部分を含んでなる改変または置換配列を含む。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）であってよく、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改変塩基も含み得る。このような改変塩基の例としては、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のいずれかであり得、センス鎖またはアンチセンス鎖に相当する。さらに、用語「核酸」は、相補的核酸配列ならびに最適化されたコドンまたは同義コドン等価物を含む。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を、または化学的に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その核酸に天然に隣接する配列（すなわち、その核酸の5'末端および3'末端に位置する配列）も実質的に含まない。

【0050】

用語「ポリペプチド」は、本明細書で使用する場合、一鎖内にと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部を形成し得る。ポリペプチドは、長い、連続でかつ分岐していないペプチド鎖で構成され得る。ポリペプチドはまた、生物学的に機能的な様式で構成されてもよい。ポリペプチドは、それが定義された活性を付与する特定の3次元構造に折り畳まれていてもよい。用語「ポリペプチド」は、本明細書で使用する場合、用語「タンパク質」という用語と互換的に使用される。

【0051】

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を、または化学的に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。

【0052】

用語「参照薬剤」は、本明細書で使用する場合、アッセイで使用可能な、および例えば、慢性腎臓病および急性腎臓病などの腎臓病態を検出、スクリーニングまたは診断するために参照として使用される、例えば、標準的な量の K l o t h o タンパク質であり得る薬剤を意味する。

【0053】

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 に関してアッセイ可能な、対象由来の体液、細胞または組織サンプルを意味する。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、1以上の処置後に得られる「処置後」サンプル、または例えば疾病進行を評価するためのベースラインとして使用される「ベースラインサンプル」であり得る。

【0054】

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、それらの配列を最適な比較の目的で

10

20

30

40

50

アラインする（例えば、第2のアミノ酸配列または核酸配列との最適なアラインメントのために第1のアミノ酸配列または核酸配列の配列中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のアミノ酸残基またはヌクレオチドを比較する。第1の配列中の位置が、第2の配列中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、それらの配列が共通に持つ同一の位置の数の関数である（すなわち、同一性% = 同一の重なる位置の数 / 位置の総数 × 100%）。一実施形態では、これら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また、数学的アルゴリズムを用いて達成することもできる。2配列の比較のため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として、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のアルゴリズムがある。このようなアルゴリズムは、Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403のNBLASTおよびXBLASTプログラムに組み込まれている。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、BLASTヌクレオチド検索は、例えば、スコア = 100、ワードレングス = 12に関するNBLAST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。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、BLASTタンパク質検索は、例えば、スコア = 50、ワードレングス = 3に対するXBLAST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。比較目的でギャップアラインメントを得るためには、ギャップBLASTをAltschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402に記載の通りに使用することができる。あるいは、分子間の遠縁関係を検出する反復検索を行うためにPSI-BLASTを使用することができる（同著者）。BLAST、ギャップBLAST、およびPSI-BLASTプログラムを使用する場合、各プログラムの（例えば、XBLASTおよびNBLASTの）デフォルトパラメーターを使用することができる（例えば、NCBIウェブサイト参照）。配列比較のために使用される数学的アルゴリズムの別の好ましい限定されない例としては、Myers and Miller, 1988, CABIOS 4:11-17のアルゴリズムがある。このようなアルゴリズムは、GCG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ALIGN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ALIGNプログラムを使用する場合、PAM120ウエ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には、一般に、正確な一致のみを計数する。

【0055】

「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、溶液中で2つの相補的核酸分子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生じ得る。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）ヌクレオチド長である。当業者は、核酸二重鎖、またはハイブリッドの安定性は T_m により決定されると認識し、これはナトリウム含有バッファーでは、ナトリウムイオン濃度と温度の関数である（ $T_m = 81.5 - 16.6 (\log_{10} [Na^+]) + 0.41 (\% (G + C) - 600 / l)$ 、または類似の式）。よって、ハイブリッドの安定性を決定する洗浄条件におけるパラメーターは、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はない分子を同定するために、1%のミスマッチは T_m に約1の低下をもたらすと仮定することができ、例えば、>95%の同一性を有する核酸分子が求められる場合には、最終洗浄温度は約5%低くなる。これらの考慮に基づき、当業者は、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。好ましい実施形態では、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、以下の条件が、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使用され得る：5×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム（SSC）/5×デンハート液/1.0% S

10

20

30

40

50

D Sにて、上式に基づきT m - 5 でハイブリダイゼーション、次いで、6 0 、 0 . 2 × S S C / 0 . 1 % S D S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は、4 2 、 3 × S S Cでの洗浄工程を含む。しかしながら、同等の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ものと理解される。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, and in: Sambrook et al., Molecular Cloning: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001に見出すことができる。

【 0 0 5 6 】

用語「対象」は、本明細書で使用する場合、動物界、好ましくは、哺乳類、より好ましくは、ヒトまたはラットもしくはマウスなどの齧歯類のいずれのメンバーも意味する。1つの実施形態では、対象は、慢性腎臓病（C K D）または急性腎障害（A K I）などの腎臓病を有することが疑われる。

10

【 0 0 5 7 】

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改変、例えば、本明細書に開示される軽鎖および重鎖C D Rと実質的に同じ機能を実質的に同様の様式で実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（C D R）の1以上の改変を含む。例えば、本明細書に開示されるC D Rの変異体は、折り畳まれた K l o t h oタンパク質上のエピトープと特異的に結合することができるという同じ機能を有する。1つの実施形態では、本明細書に開示されるC D R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を含む。C D Rの変異体はまた、本明細書に開示されるC D R配列に対する付加および欠失も含む。加えて、変異体ヌクレオチド配列およびポリペプチド配列は、その類似体および誘導体を含む。

20

【 0 0 5 8 】

用語「レベル」は、本明細書で使用する場合、サンプルにおいて検出または測定可能な K l o t h o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 K l o t h oレベルは、p Mなどの濃度または対照レベル（ここで、例えば、対照レベルは健康な対象における可溶性 K l o t h oのレベルである）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/または1 0倍などの相対的量であり得る。

30

【 0 0 5 9 】

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、本発明で使用する場合、示されている特徴、要素、成分、基、整数、および/または工程の存在を明示するが、示されていないその他の特徴、要素、成分、基、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ものとする。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類似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、最終結果を有意に変化されないような修飾された用語の合理的変動量を意味する。これらの程度の用語は、この変動が、それが修飾する語の意味を否定しない限り、修飾された用語の少なくとも± 5 %の変動を含むものと解釈されるべきである。

40

【 0 0 6 0 】

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、基、整数、および/または工程の存在を明示し、また、示されていないその他の特徴、要素、成分、基、整数および/または工程の存在を排除するクローズエンドの用語であるものとする。

【 0 0 6 1 】

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および分数を含む（例えば、1 ~ 5 は、1、1 . 5、2、2 . 7 5、3、3 . 9 0、4、およ

50

び5を含む)。また、総ての数およびその分数は用語「約」により修飾されるものと仮定されると理解されるべきである。さらに、「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その(the)」は、文脈がそうではないことを明示しない限り、複数の指示物を含むと理解されるべきである。用語「約」は、参照される数値のプラスまたはマイナス0.1~50%、5~50%、または10~40%、好ましくは10~20%、より好ましくは10%または15%を意味する。

【0062】

さらに、特定の節に記載されている定義および実施形態は、当業者により理解されているようにそれらが好適であることが記載されている本明細書の他の実施形態に当てはまり得るものとする。例えば、以下の節では、本発明の種々の態様が詳細に定義される。そのように定義される各態様は、そうではないことが明示されない限り、いずれの他の1または複数の態様と組み合わせてもよい。特に、好ましいまたは有利であることが示されているいずれの特徴も、好ましいまたは有利であることが示されている他のいずれの1または複数の特徴と組み合わせてよい。

10

【0063】

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、腎臓病を診断するためおよび/または予後診断を行うための抗体および/またはその結合フラグメントならびに製造方法および使用方法に関する。

【0064】

よって、第1の態様は、競合的ELISAアッセイにより測定した場合に約10nM以下の解離定数(K_D)でKlothoポリペプチドのエピトープ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。以下の実施例に示されるように、競合的ELISAアッセイは、Klothoに結合する抗Klotho sb106の用量反応曲線を示し、相互作用の親和性は1~2nM前後であると見積もられた(図1C)。

20

【0065】

1つの実施形態において、Klothoポリペプチドは折り畳まれ、場合により天然のコンフォメーション(例えば、完全な折り畳み)である。本明細書に示されるように、抗Klotho sb106抗体は、天然の折り畳みのKlothoなどの折り畳まれたKlothoに対して特異的結合親和性を有する。例えば、実施例5に示されるように、sb106抗体は、天然条件下ではKlothoに対して高い結合親和性を有するが、変性条件下ではKlothoに対する結合親和性がはるかに弱いかまたは結合親和性を持たない。

30

【0066】

よって、別の態様は、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する抗体および/またはその結合フラグメントである。

【0067】

さらに、抗Klotho sb106は、新たに調製されたまたは軽度固定細胞において高い結合親和性を有する。

【0068】

よって、さらなる態様は、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する抗体および/またはその結合フラグメントである。

40

【0069】

1つの実施形態では、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。

【0070】

sb106のCDR領域は決定されており、図1Aに示されている。さらに、相同な突然変異がSB106 CDRの各アミノ酸位に導入されている(例えば、各位置に関して、元のアミノ酸が保持されているかまたは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ている)。選択は、抗原としてアルファ-Klotho-FGFR1c複合体を用い、新たなライブラリーを用いて行われた。抗原に結合した

50

クローンが単離され、配列が決定され、表 2 に示される。

【 0 0 7 1 】

よって、別の態様は、軽鎖可変領域と重鎖可変領域とを含んでなり、前記軽鎖可変領域が相補性決定領域 C D R - L 3 を含んでなり、かつ、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 1 以上が以下に示されるアミノ酸配列：

a . C D R - L 3 ; X ₁ X ₂ X ₃ X ₄ P X ₅ (配列番号 1)

(ここで、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) ；

b . C D R - H 1 : X ₆ X ₇ X ₈ X ₉ X ₁₀ X ₁₁ (配列番号 2)

(ここで、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、かつ、X ₁₁ は I または V である) ；

c . C D R - H 2 ; X ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁

(配列番号 3)

(ここで、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、かつ、X ₂₁ は S、A または Y である) ； および / または

d . C D R - H 3 : X ₂₂ X ₂₃ V Y X ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ W X ₂₈ G X ₂₉ G M

(配列番号 4)

(ここで、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、かつ、X ₂₉ は Y または F である)

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含む。

【 0 0 7 2 】

表 2 に記載されるような C D R 配列を有する抗体フラグメントが単離された。1 つの実施形態では、抗体またはその結合フラグメントは、表 2 に挙げられている配列番号 1 5 ~ 1 2 0 から選択される C D R - L 3、C D R - H 1、C D R - H 2 および C D R - H 3 である。

【 0 0 7 3 】

1 つの実施形態では、抗体は、配列番号 1 から選択される配列を有する C D R - L 3、配列番号 2 から選択される配列を有する C D R H 1、配列番号 3 から選択される配列を有する C D R - H 2 および / または配列番号 4 から選択される C D R - H 3 を含んでなり、約 1 0 n M 未満、約 9 n M 未満、約 8 n M 未満、約 7 n M 未満、約 6 n M 未満、約 5 n M 未満、約 4 n M 未満、約 3 n M 未満、約 2 n M 未満または約 1 n M 未満の、K l o t h o 特異的結合に関する K_D を示す。

【 0 0 7 4 】

述べたように、F a b 抗 K l o t h o s b 1 0 6 C D R L 3 および C D R H 1、2、3 の配列は本明細書 (図 1 A) の配列番号 5 ~ 8 に示されている。クローンの結合特異性をさらに特徴付けるために、抗 K l o t h o s b 1 0 6 抗体を、個々に精製した成分のパネルに対してアッセイした (図 1 B)。抗 K l o t h o s b 1 0 6 は、K l o t h o 単独に、または F G F R 1 c / K l o t h o 複合体に対して結合し、ヒトおよびマウスの両種に交差反応性がある。抗 K l o t h o s b 1 0 6 はまた、ラット種にも交差反応性がある。

【 0 0 7 5 】

よって、別の実施形態では、相補性決定領域は、以下に示されるアミノ酸配列：

軽鎖可変領域：

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：

10

20

30

40

50

CDR - H 1 : G F N I S Y Y S (配列番号 6)

CDR - H 2 : I S P S Y G Y T (配列番号 7)

CDR - 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)

を含んでなる。

【0076】

さらなる実施形態では、軽鎖可変領域は、以下に示されるアミノ酸配列：

CDR - L 1 : Q S V S S A (配列番号 9)

CDR - L 2 : S A S (配列番号 10)

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。

【0077】

別の実施形態では、相補性決定領域は、配列番号 5 ~ 8、または 15 ~ 120 に示されるようなアミノ酸配列のうち 1 以上を含んでなる。1 つの実施形態では、CDR 領域は、CDR - L 3、CDR - H 1、CDR - H 2 および C D R - H 3 を含んでなる。

【0078】

別の実施形態では、抗体および / またはその結合フラグメントは、以下に示されるアミノ酸配列：

【化 1】

軽鎖配列：

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASSLYSGVP
SRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQAGYSPITFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFP
PSDEQLKSGTASVCLLNFPYFREAKVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 11)

を有する軽鎖を含んでなる。

【0079】

別の実施形態では、抗体および / またはその結合フラグメントは、以下に示されるアミノ酸配列：

【化 2】

重鎖可変領域配列：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNISIYYSIHVWRQAPGKGLEWYAYISPSYGYT
SYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARYYVYASHGWAGYGM DYW
GQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHT
T (配列番号 12)

を有する重鎖可変領域を含んでなる。

【0080】

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 を含む免疫グロブリンの任意のクラス；ならびに I g G 1、I g G 2、I g G 3 および I g G 4 を含む任意のアイソタイプであり得る。

【0081】

ヒト化またはキメラ抗体は、1 または 2 以上のアイソタイプまたはクラスに由来する配列を含み得る。

【0082】

さらに、本明細書に記載の抗体は、F a b、F a b'、F (a b')₂、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、または重鎖と軽鎖がスパーサーにより連結されている一本鎖抗体として作製され得る。また、ヒトまたはキメラ抗体は、単量体形態またはポリマー形態で存在してもよい。

【0083】

10

20

30

40

50

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。実施例に記載のとおり、スクリーニングにより特定された Fab を、抗体の軽鎖および重鎖の可変ドメインを哺乳類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 (HEK293T) を用いて IgG タンパク質を産生することにより、全長 IgG へと再構成した。他所に記載するように、抗体を発現させるのに好適ないずれの細胞種も使用することができる。

【0084】

さらに別の実施形態では、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アイソタイプのアミノ酸配列：

【化3】

IgG1:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNISYYSIHWRQAPGKGLEWVAYISPSYGYT
SYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARYVYASHGWAGYGMMDYW
GQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTH
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK (配列番号 13)

IgG4:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNISYYSIHWRQAPGKGLEWVAYISPSYGYT
SYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARYVYASHGWAGYGMMDYW
GQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVESKYGPPC
PSCPAPPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK (配列番号 14)

を有する重鎖 IgG1 または IgG4 アイソタイプを含んでなる。

【0085】

さらに別の実施形態では、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 5 ~ 8 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。特異的 CDR 配列は、配列番号 5 ~ 8 と少なくとも 70% 配列同一性を含む、表 2 に示されるように配列番号 15 ~ 120 で示される。

【0086】

1 つの実施形態では、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。

【0087】

さらに別の実施形態では、抗体は、それぞれ配列番号 1 ~ 4 に示される配列を有する軽鎖相補性決定領域 CDR-L3 と重鎖相補性決定領域 CDR-H1、CDR-H2 および CDR-H3 を含んでなり、場合により、軽鎖可変領域、重鎖可変領域は、それぞれ配列番号 11 および 12 と少なくとも 70%、少なくとも 80% または少なくとも 90% の配列同一性を有し、または場合により、重鎖 IgG1 または IgG4 に関しては、配列番号 13 および 14 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。例えば、本明細書に記載の 1 以上の (one of more) CDR を最適化または選択された抗体、抗体鎖または可変領域にグラフトすることができる。

【0088】

1 つの実施形態では、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

10

20

30

40

50

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、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。

【0089】

Fab、Fab'およびF(ab')₂、scFv、dsFv、ds-scFv、二量体、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り合成できる。

【0090】

抗体はまた、従来の技術を用いてフラグメント化できる。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り作製できる。結果として得られるF(ab')₂フラグメントにジスルフィド橋を還元する処理を施すと、Fab'フラグメントが得られる。パイン消化はFabフラグメントの形成をもたらす得る。

【0091】

1つの実施形態では、抗体はヒト抗体である。

【0092】

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_H)遺伝子が欠失される。次に、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子アレイがこのような突然変異マウスに導入される。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完全なレパートリーを生成することができる。

【0093】

1つの実施形態では、抗体は、配列番号1~10または配列番号15~120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。

【0094】

前述のように、図1Cは、例えば、抗Klotho sb106が、Klotho単独に、またはFGFR/Klotho複合体、例えば、FGFR1c/Klotho複合体に対して結合することを示す。抗Klotho sb106とKlothoの間の相互作用の親和性は、競合的ELISAアッセイにより測定した場合に、1桁のナノモルの範囲である(IC₅₀ = 1.7 nM)。

【0095】

1つの実施形態では、抗体および/またはその結合フラグメントは、約10 nM未満、約9 nM未満、約8 nM未満、約7 nM未満、約6 nM未満、約5 nM未満、約4 nM未満、約3 nM未満、約2 nM未満または約1 nM未満の、Klotho特異的結合に対するK_Dを有する。

【0096】

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、数種に対して交差反応性がある。1つの実施形態では、結合したKlothoポリペプチドは、哺乳類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ポリペプチドまたはラット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。

【0097】

別の実施形態では、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、抗体および/またはその結合フラグメントは、尿、血漿、および/または血清中に見出される可溶性の折り畳まれたKlothoポリペプチドと結合する。

【0098】

さらに別の実施形態では、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Klothoポリペプチドを含んでなる複合体と結合する。例えば、折り畳まれたK

10

20

30

40

50

l o t h oポリペプチドは、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。

【 0 0 9 9 】

さらなる実施形態では、抗体および/または結合フラグメントは、例えば、診断薬を製するためにタグで標識、および/またはタグに結合される。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。

【 0 1 0 0 】

標識は、好ましくは、直接的または間接的に検出可能なシグナルを生成し得る。例えば、標識は、放射線不透過性であるか、または³H、¹⁴C、³²P、³⁵S、¹²³I、¹²⁵I、¹³¹I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、ローダミンまたはルシフェリンなどの蛍光（蛍光団）または化学発光（発色団）化合物；アルカリ性ホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼまたはセイヨウワサビペルオキシダーゼなどの酵素；造影剤；または金属イオンであり得る。

10

【 0 1 0 1 】

本開示の別の態様は、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に関する。

【 0 1 0 2 】

1つの実施形態では、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を含んでなる。

20

【 0 1 0 3 】

1つの実施形態では、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。

【 0 1 0 4 】

さらに別の態様は、抗体および/またはその一部、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。1つの実施形態では、核酸は、軽鎖可変領域と重鎖可変領域とを含んでなり、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、かつ、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：

30

C D R - L 3 ; X₁ X₂ X₃ X₄ P X₅ (配列番号1)

(ここで、X₁はAまたはSであり、X₂はGまたはAであり、X₃はYまたはFであり、X₄はSまたはAであり、X₅はIまたはVである)；

C D R - H 1 : X₆ X₇ X₈ X₉ X₁₀ X₁₁ (配列番号2)

(ここで、X₆はIまたはVであり、X₇はSまたはAであり、X₈はY、FまたはSであり、X₉はY、FまたはSであり、X₁₀はSまたはAであり、かつ、X₁₁はIまたはVである)；

C D R - H 2 ; X₁₂ X₁₃ X₁₄ X₁₅ X₁₆ X₁₇ X₁₈ X₁₉ X₂₀ X₂₁ (配列番号3)

(ここで、X₁₂はY、FまたはSであり、X₁₃はIまたはVであり、X₁₄はSまたはAであり、X₁₅はPまたはSであり、X₁₆はSまたはAであり、X₁₇はYまたはFであり、X₁₈はGまたはAであり、X₁₉はYまたはFであり、X₂₀はTまたはSであり、かつ、X₂₁はS、AまたはYである)；

40

C D R - H 3 : X₂₂ X₂₃ V Y X₂₄ X₂₅ X₂₆ X₂₇ W X₂₈ G X₂₉ G M (配列番号4)

(ここで、X₂₂はYまたはFであり、X₂₃はYまたはFであり、X₂₄はAまたはSであり、X₂₅はSまたはAであり、X₂₆はHまたはNであり、X₂₇はGまたはAであり、X₂₈はAまたはSであり、かつ、X₂₉はYまたはFである)

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。

【 0 1 0 5 】

50

重鎖または軽鎖をコードする、例えば、本明細書に記載の C D R - H 1、C D R - H 2 および/もしくは C D R - H 3 領域を含んでなる重鎖をコードする、または本明細書に記載の C D R - L 1、C D R - L 2 および/もしくは C D R - L 3 領域を含んでなる軽鎖をコードする核酸も提供される。

【 0 1 0 6 】

本開示はまた、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の変異体も提供する。例えば、この変異体は、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をコードする核酸配列と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、またはコドン縮重または最適化配列とハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む。別の実施形態では、変異体核酸配列は配列番号 1 ~ 1 2 0 をコードすると少なくとも 7 0 %、最も好ましくは少なくとも 8 0 %、いっそう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。

10

【 0 1 0 7 】

本明細書に記載の抗体は、本明細書に記載の特徴の 1 以上を含んでなる。

【 0 1 0 8 】

1 つの実施形態では、核酸は単離された核酸である。

【 0 1 0 9 】

別の態様は、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。1 つの実施形態では、ベクターは単離されたベクターである。

20

【 0 1 1 0 】

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のに好適な任意のベクターであり得る。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)が挙げられる。

【 0 1 1 1 】

さらなる態様は、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 1 2 】

組換え細胞は、ポリペプチドを生産するのに好適な、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のに好適ないずれの細胞を用いて作出することもできる。

30

【 0 1 1 3 】

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、大腸菌などの細菌細胞、昆虫細胞(バキュロウイルスを使用)、酵母細胞または哺乳類細胞で発現されてよい。

【 0 1 1 4 】

より詳しくは、組換え抗体産生細胞を生産するのに好適な細菌宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌(*B. subtilis*)、マウスチフス菌(*Salmonella typhimurium*)、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、 λ -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、*trp*プロモーターおよび *tac*プロモーターが含まれる。代表的な選択マーカーとしては、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ーが含まれる。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 p B R 3 2 2、p U C プラスミド p U C 1 8、p U C 1 9、p U C 1 1 8、p U C 1 1 9、および p N H 8 A、p N H 1 6 a、p N H 1 8 a、および B l u e s c r i p t M 1 3 (S t r a t a g e n e、ラホヤ、カリフォルニア州)などのプラスミドが含まれる。

40

50

【0115】

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ールは、当業者に周知である。

【0116】

好適な哺乳類細胞としては、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任意の誘導体が含まれる。

10

【0117】

1つの実施形態では、組換え抗体を生産するために使用される哺乳類細胞は、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併用可能である。

20

【0118】

哺乳類細胞において発現を指示するための好適な発現ベクターには、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する)、ならびに他の転写および翻訳制御配列が含まれる。

【0119】

1つの実施形態では、ベクターは、軽鎖またはIgG1重鎖の生産のために設計される。

【0120】

好適な昆虫細胞としては、カイコガ属(*Bombyx*)またはスポドテラ属(*Spodotera*)種由来の細胞および細胞株が含まれる。培養昆虫細胞 (SF9細胞) でのタンパク質の発現のために利用可能なバキュロウイルスベクターには、pAc種およびpVL種が含まれる。

30

【0121】

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むアフィニティ精製の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もたらす融合部分 (すなわち、「融合タンパク質」) をコードする遺伝子も含み得る。さらに、タンパク質分解による切断部位は、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付加され得る。典型的な融合発現ベクターとしては、グルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST)、マルトースE結合タンパク質、またはタンパク質Aをそれぞれ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、ベヴァリー、MA) およびpRIT5 (Pharmacia、ピスカタウェイ、NJ) が含まれる。

40

【0122】

「作動可能に連結」とは、核酸がその核酸の発現を可能とする様式で調節配列に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、哺乳類、または昆虫遺伝子を含む種々の起源に由来し得る。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、当業者により容易に達成され得る。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、リボソ

50

ーム結合配列（翻訳開始シグナルを含む）が含まれる。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応じて、複製起点、付加的DNA制限部位、エンハンサー、および転写誘導能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。

【0123】

1つの実施形態では、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pET11dが挙げられる。

【0124】

組換え発現ベクターはまた、本発明の組換え分子で形質転換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み得る。選択マーカー遺伝子の例としては、特定の薬物に対する耐性を付与するG418およびハイグロマイシンなどのタンパク質、 α -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がある。選択マーカー遺伝子の転写は、 α -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経過観察される。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ている細胞は生存し、他の細胞は死滅する。これにより、本発明の組換え発現ベクターの発現の可視化およびアッセイ、特に、発現および表現型に対する突然変異の影響の決定が可能となる。選択マーカーは対象核酸とは別のベクターに導入することができると認識される。他の選択マーカーとしては、対象核酸と共形質導入され得るGFPなどの蛍光タンパク質が含まれる。

【0125】

さらに別の態様は、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み合わせ含んでなる組成物である。

【0126】

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もしくは懸濁液であり得、酸化防止剤、緩衝剤、静菌剤および溶質をさらに含有してもよい。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、ツィーン）、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。

【0127】

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含まれる。

【0128】

抗体またはそのフラグメントおよび/または細胞を含め、ポリペプチド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するために好適な他の溶液が含まれる。

【0129】

本組成物は、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、疎水性添加剤、およびプロテアーゼ阻害剤をさらに含んでなり得る。

【0130】

1つの実施形態では、本ポリペプチドは、溶液中に約0.5mg/mL以上の濃度で含まれる。

【0131】

別の態様は、以下にさらに記載するように、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を含んでなるイムノアッセイである。

【0132】

10

20

30

40

50

1つの実施形態では、イムノアッセイは、酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A) である。例えば、E L I S A は、サンドイッチ E L I S A である。1つの実施形態では、アッセイは、近接ライゲーションアッセイ (P L A) である。1つの実施形態では、アッセイは、場合により免疫プロット検出と組み合わせた免疫沈降である。1つの実施形態では、イムノアッセイは、質量分光光度アッセイと組み合わせられる。1つの実施形態では、イムノアッセイは、粒子に基づくフローサイトメトリーアッセイである。

【0133】

実施例に記載されるように、抗 K l o t h o s b 1 0 6 抗体は、K l o t h o の細胞結合型および非結合型の両方を認識する。細胞結合試験では、抗 K l o t h o s b 1 0 6 は K l o t h o を発現する H E K 2 9 3 T 細胞と結合するが、そのパラログ K l o t h o とは結合しない (図 2 A)。抗 K l o t h o s b 1 0 6 抗体はまた、ヒトおよびマウス両血清から非結合型の K l o t h o を免疫沈降させることもできる (図 2 B)。この抗体は、付加的バンド無く、高い親和性および特異性で K l o t h o を免疫沈降させることができる。

10

【0134】

1つの実施形態では、イムノアッセイは、ハイスループット診断アッセイである。

【0135】

I I I . 方法

本開示の別の態様は、折り畳まれた K l o t h o ポリペプチドのエピトープ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生産する方法である。

20

【0136】

一実施形態では、抗体は、抗体ライブラリーから単離される。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つの実施形態では、抗体ファージディスプレイライブラリーは、ヒト F a b ファージディスプレイライブラリーである。

【0137】

以下に記載するように、ハイスループット、ファージディスプレイ技術を、以下の実施例に記載される抗 K l o t h o s b 1 0 6 抗体を作製するために使用をした。ファージディスプレイ合成抗体ライブラリーを、確立された方法 [6 7 , 7 5] を用い、抗原でスクリーニングした。抗体結合剤 (ファージディスプレイまたは精製) を E L I S A により試験した。一次スクリーニングおよびその後の E L I S A のための精製抗原は、マウス K l o t h o、ヒト F G F R 1 c またはヒト F G F R 1 c / マウス K l o t h o 複合体を含み、作製したか、または R & D S y s t e m s (ヒト K l o t h o) から購入した。実施例に記載されるように、F a b ' の抗体結合領域 (抗体軽鎖および重鎖の相補性決定領域、または C D R) の配列は、ユニークな結合ファージが保持している D N A から解読した。使用した合成抗体ライブラリーにおいて無作為化した C D R 領域は、軽鎖 3 (C D R - L 3) ならびに重鎖 1、2、および 3 (C D R - H、- H 2、- H 3) であった。K l o t h o と例えば少なくとも 1 0 n M または 2 n M またはそれ未満の結合親和性で結合する抗 K l o t h o 抗体は、記載のようにファージライブラリーを用いて単離

30

40

【0138】

1つの実施形態では、方法は、C D R - L 1 および/または C D R - L 2 を無作為化 (ランダム化) することをさらに含んでなる。

【0139】

以下の例に記載されるように、抗 K l o t h o s b 1 0 6 抗体は、K l o t h o の分泌型および膜係留型の両方に存在する K l o t h o 細胞外領域を標的とすることにより作製した。抗 K l o t h o s b 1 0 6 抗体は、マウス K l o t h o とヒト F G F R 1 c 受容体の精製複合体 (F G F R 1 c / K l o t h o) が合成抗体ファージディスプレイライブラリーに曝される選択から得られた。

50

【0140】

1つの実施形態では、K1othoポリペプチドを、K1othoポリペプチドと特異的に結合する抗体を抗体ライブラリーから単離するために使用する。1つの実施形態では、FGFR1cと複合体を形成したK1othoを、K1othoポリペプチドと特異的に結合する抗体を抗体ライブラリーから単離するために使用する。

【0141】

別の実施形態では、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、例えば実施例8に記載されるように、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を用いて最初の選択に関して記載した通りに実行することができる。

10

【0142】

当業者ならば、折り畳まれたK1otho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作製するためにはいくつかの方法が使用でき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。簡単に述べれば、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決定するために、二元K1otho-FGF1Rc複合体を作製する(実施例1に記載の通り)。ヒトFabファージディスプレイライブラリーからのファージを、数回のパニングの後に選択する。ELISAで決定されるように二元K1otho-FGF1Rc複合体に対して特異的結合親和性を有するファージの配列を決定し、軽鎖または重鎖の作製のため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IgGアイソタイプ、例えば、IgG1またはIgG4であり得る。次に、抗原結合フラグメントおよびIgGポリペプチドを、例えば、Aタンパク質アフィニティーカラムを用いてアフィニティー精製する。

20

【0143】

別の実施形態では、本明細書に記載の抗体をコードする核酸を宿主細胞で発現させて、抗体および/またはその結合フラグメントを作製する。1つの実施形態では、この方法は、

a. 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宿主細胞内で発現させること、

b. 前記抗体および/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、および

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精製すること

を含んでなる。

30

【0144】

いくつかの実施形態では、一本鎖抗体をコードする核酸が発現される。他の実施形態では、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をコードする、複数の核酸が発現される。

【0145】

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澱法、DEAE-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類細胞に導入され得る。

40

【0146】

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類細胞に直接導入され得る。

【0147】

実施例に記載されるように、sb106抗体は、細胞モデルおよび動物モデルを以下の

50

ように試験した：齧歯類（マウスおよびラット）、ならびに正常者およびCKD患者からのヒト血漿および尿サンプルにおいて、抗体を、天然 Klothoを発現するかまたは Klothoでトランスフェクトした培養細胞においてスクリーニングする。試験手順には、免疫プロット、免疫沈降、免疫組織化学、免疫細胞化学、および蛍光活性化細胞選別（FACS）を含んだ。

【0148】

本明細書に開示される抗体および/または結合フラグメントの、可溶性 Klothoを沈降させる能力は、実施例6に記載されるような一連の免疫沈降-免疫プロットアッセイを用いて決定することができる。

【0149】

さらなる態様は、サンプルにおいて Klothoポリペプチドを検出するためのアッセイであり、このアッセイは、

- a) サンプルと本明細書に記載の抗体または結合フラグメントとを、抗体： Klotho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： Klotho複合体を検出すること
- を含んでなる。

【0150】

1つの実施形態では、本アッセイは、折り畳まれた Klothoを検出するためのものであり、本アッセイは、非変性または軽度変性条件下で実施される。

【0151】

1つの実施形態では、前記複合体は例えば直接検出され、この場合、抗体は検出可能なタグまたは融合部分で標識される。1つの実施形態では、前記複合体は、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。

【0152】

1つの実施形態では、本アッセイは、免疫沈降、免疫プロット、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および蛍光活性化細胞選別（FACS）、近接ライゲーションアッセイ（PLA）、ならびに質量分析に基づく技術である。本明細書に記載の抗体は、Klothoポリペプチドを免疫沈降させるのに十分なものであり、KM2076および本発明者らが試験した他のもの[13]などの抗体よりもはるかに良好である。

【0153】

1つの特定の実施形態では、本方法のアッセイは、一連の免疫沈降-免疫プロット（IP-IB）である。IP-IBは、例えば以下の実施例に記載されるように実施することができる。

【0154】

1つの実施形態では、本方法は、例えば可溶性 Klothoを検出するためのものであり、この場合、サンプルは体液である。

【0155】

さらなる態様は、可溶性 Klothoを検出および/または測定する方法を含み、その方法は、

- a) 体液であるサンプルと本明細書に記載の抗体または結合フラグメントとを、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、および
 - 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。

【0156】

検出は、定性的方法、または例えば標準もしくは標準曲線と比較することによる定量的方法を用いて測定される方法を用いて実施することができる。

【0157】

1つの実施形態では、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、あるいは尿である。

10

20

30

40

50

【 0 1 5 8 】

1つの実施形態では、アッセイは診断アッセイである。例えば、実施例7に記載されるように、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を含んでなるIP-IBアッセイが、その直線性を検定するため、およびそれが慢性腎臓病（CKD）患者の血清 Klothoレベルを確かに検出できるかどうかを決定するために評価される。従って、健康なボランティア由来の血清とともにグレード1 CKDからグレード5 CKDまで異なる、所定量の組換え Klothoを使用する。これらの結果は、血清レベルとCKDステージの間の増加関係を示す。さらに、図6Bに示されるように、sb106を用いたIP-IBアッセイは、CKD患者の尿 Klothoの重要な低下を示す。

10

【 0 1 5 9 】

さらに別の態様は、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病態をスクリーニング、診断または検出する方法に関し、その方法は、

a. Klotho対象由来のサンプルにおけるレベルを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測定すること、および

b. サンプルにおける Klothoのレベルを対照と比較すること
を含んでなり、

対照と比較した前記サンプルにおける Klothoのレベルの低下が、前記対象が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。

20

【 0 1 6 0 】

1つの実施形態では、対照は、CKDまたはAKIを持たない対象、例えば正常対照の群から導かれた対照値である。

【 0 1 6 1 】

1つの実施形態では、CKDは、早期CKD、場合により、ステージ1、ステージ2、ステージ3、ステージ4、ステージ5またはステージ6 CKDである。

【 0 1 6 2 】

本開示のさらなる態様は、Klotho欠乏のレベルを測定することによって評価されるCKD進行またはAKI進行またはそれがなく（例えば、疾患の回復または増悪）、またはCKDの腎外合併症の予後を診断する方法である。

30

【 0 1 6 3 】

よって、1つの態様は、AKI後の回復の見込みの予後を診断する方法であり、その方法は、

a. 対象由来のサンプルにおける Klothoのレベルを測定すること、および

b. 前記サンプルにおける Klothoのレベルを対照、例えば、回復または進行しなかった対象の群から導かれた対照値と比較すること
を含んでなり、

対照と比較した前記サンプルにおける Klothoのレベルの上昇が、前記対象がAKI後の回復の高い見込みを有することを示す。

【 0 1 6 4 】

1つの実施形態では、対照は、回復した対象の群から導かれた対照値であり、対照と比較した前記サンプルにおける Klothoのレベルの低下が、前記対象がAKI後の回復の低い見込みおよび/または疾患進行の高い見込みを有することを示す。

40

【 0 1 6 5 】

別の態様は、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、その方法は、

a. 対象由来のサンプルにおける Klothoのレベルを測定すること、および

b. 前記サンプルにおける Klothoのレベルを対照、例えば、長期合併症を有するまたは長期合併症の数が多い対象の群から導かれた対照値と比較すること
を含んでなり、

50

対照と比較した前記サンプルにおける K l o t h o のレベルの上昇が、前記対象が、A K I 後の長期合併症がより少ないというより高い見込みを有することを示す。

【 0 1 6 6 】

1つの実施形態では、対照は、長期合併症の無いまたは長期合併症が少ない対象の群から導かれた対照値であり、対照と比較した前記サンプルにおける K l o t h o のレベルの低下が、前記対象が A K I 後に長期合併症を有するまたは長期合併症の数が多い高い見込みを有することを示す。

【 0 1 6 7 】

さらなる態様は、C K D の進行の見込みの予後を診断する方法であり、その方法は、
a . 対象由来のサンプルにおける K l o t h o のレベルを測定すること、および
b . 前記サンプルにおける 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、

10

対照（ここで、例えば、対照は、対象の群から導かれた対照値、例えば、回復しなかったまたは進行した対象の群から導かれた対照値である）と比較した前記サンプルにおける K l o t h o のレベルの上昇が、前記対象が、C K D から回復する高い見込みを有することを示す。

【 0 1 6 8 】

1つの実施形態では、対照は、回復した対象の群から導かれた対照値であり、対照と比較した前記サンプルにおける K l o t h o のレベルの低下は、前記対象が C K D 後の回復の低い見込みおよび / または疾患進行の高い見込みを有することを示す。

20

【 0 1 6 9 】

さらに別の態様は、C K D における腎外合併症の予後を診断する方法であり、その方法は、

a . 対象由来のサンプルにおける K l o t h o のレベルを測定すること、および
b . 前記サンプルにおける 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における K l o t h o のレベルの上昇が、前記対象が、C K D に関連する腎外合併症がより少ないというより高い見込みを有することを示す。

【 0 1 7 0 】

1つの実施形態では、対照は、腎外合併症が無または腎外合併症が少ない対象の群から導かれた対照値であり、対照と比較した前記サンプルにおける K l o t h o のレベルの低下は、前記対象が C K D 後の長期合併症を有するまたは腎外合併症の数が多い高い見込みを有することを示す。

30

【 0 1 7 1 】

さらなる態様は、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、その方法は、

a . 対象由来のサンプルにおける K l o t h o のレベルを測定すること、および
b . 前記サンプルにおける K l o t h o のレベルを従前の参照サンプルその他の対照と比較すること
を含んでなり、

40

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における K l o t h o のレベルの上昇が、前記対象が改善中の腎臓病態を有することを示し、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における K l o t h o のレベルの低下が、前記対象が増悪中の腎臓病態を有することを示す。

【 0 1 7 2 】

サンプルは、例えば対象が処置を受けた後に採取し、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、処置または他の介入が必要かどうかを評価するために反復間隔の後に経過観察することができる。1つの実施形態では、試験を反復し、対象の進行を評価するためにプロットする。

【 0 1 7 3 】

50

1つの実施形態では、サンプルは、血液、または血漿もしくは血清などのその画分などの体液であり、本方法は、例えば、可溶性 K l o t h oを検出する。1つの実施形態では、体液は尿である。

【 0 1 7 4 】

別の実施形態では、サンプルは、新鮮な体液サンプルまたは組織サンプルなどの新鮮なサンプル（例えば、凍結されていないまたは1回凍結（例えば、サンプル入手時に1回の凍結）を含む）および反復凍結サンプル（例えば、凍結および解凍ならびに凍結体液サンプルまたは反復凍結組織サンプル）から選択される。1つの実施形態では、サンプルは、固定が限定された変性および/または折り畳みの解除を誘導する軽度固定サンプルなどの固定サンプルである。

10

【 0 1 7 5 】

1つの実施形態では、K l o t h oのレベルは、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。

【 0 1 7 6 】

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

【 0 1 7 7 】

I V . キット

さらなる態様は、無菌バイアルなどのバイアルまたは他の外被内に含まれる、本明細書に開示される i) 抗体および/また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) 組換え細胞ならびに場合により参照薬剤および/またはその使用のための説明書を含んでなるキットに関する。

20

【 0 1 7 8 】

1つの実施形態では、キットは診断キットであり、説明書は本明細書に記載の方法を対象とする。

【 0 1 7 9 】

上記の開示は一般に本出願を記載する。より完全な理解は、以下の具体例を参照することにより得られる。これらの例は単に例示のために記載され、本出願の範囲を限定するものではない。状況が示唆し得る、または便宜とし得る場合には、形態の変更および等価物との置換が企図される。本明細書で特定の用語を使用してきたが、このような用語は説明のためのものであり、限定を目的とするものではない。

30

【 0 1 8 0 】

本発明は以下の通りである。

[1] 競合的 E L I S A アッセイにより測定した場合に、約 1 0 n M 以下の解離定数 (K_D) で K l o t h o ポリペプチドのエピトープ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。

[2] 前記 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 ポリペプチドである、上記 [1] に記載の抗体および/またはその結合フラグメント。

[3] 競合的 E L I S A アッセイにより測定した場合に約 2 n M 以下の解離定数 (K_D) で K l o t h o ポリペプチドのエピトープと特異的に結合する、上記 [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。

40

[4] 抗体またはその結合フラグメントが軽鎖可変領域と重鎖可変領域とを含んでなり、前記軽鎖可変領域が相補性決定領域 C D R - L 3 を含んでなり、かつ、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：

a . C D R - L 3 ; X₁ X₂ X₃ X₄ P X₅ (配列番号 1)

(ここで、X₁ は A または S であり、X₂ は G または A であり、X₃ は Y または F であり、X₄ は S または A であり、X₅ は I または V である) ；

b . C D R - H 1 : X₆ X₇ X₈ X₉ X₁₀ X₁₁ (配列番号 2)

50

(ここで、 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、かつ、 X_{11} はIまたはVである)；

c. CDR - H2 ; $X_{12} X_{13} X_{14} X_{15} X_{16} X_{17} X_{18} X_{19} X_{20} X_{21}$
(配列番号3)

(ここで、 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、かつ、 X_{21} はS、AまたはYである)；および/または

d. CDR - H3 : $X_{22} X_{23} V Y X_{24} X_{25} X_{26} X_{27} W X_{28} G X_{29} G M$
(配列番号4)

(ここで、 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、かつ、 X_{29} はYまたはFである)

のうち1以上を含んでなる、上記[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。

[5] 軽鎖可変領域と重鎖可変領域とを含んでなり、前記軽鎖可変領域が相補性決定領域CDR - L3を含んでなり、かつ、前記重鎖可変領域が相補性決定領域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：

a. CDR - L3 ; $X_1 X_2 X_3 X_4 P X_5$ (配列番号1)

(ここで、 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)；

b. CDR - H1 : $X_6 X_7 X_8 X_9 X_{10} X_{11}$ (配列番号2) (ここで、 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、かつ、 X_{11} はIまたはVである)；

c. CDR - H2 ; $X_{12} X_{13} X_{14} X_{15} X_{16} X_{17} X_{18} X_{19} X_{20} X_{21}$
(配列番号3)

(ここで、 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、かつ、 X_{21} はS、AまたはYである)；および/または

d. CDR - H3 : $X_{22} X_{23} V Y X_{24} X_{25} X_{26} X_{27} W X_{28} G X_{29} G M$
(配列番号4)

(ここで、 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、かつ、 X_{29} はYまたはFである)

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。

[6] 前記相補性決定領域が、配列番号5～120から選択される、場合により以下に示されるようなアミノ酸配列：

軽鎖可変領域：CDR - L3 : A G Y S P I (配列番号5)；

重鎖可変領域：CDR - H1 : 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)；および/または

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

を含んでなる、上記[4]または[5]に記載の抗体および/またはその結合フラグメント。

[7] 前記軽鎖可変領域が、以下に示されるアミノ酸配列：

CDR - L1 : Q S V S S A (配列番号9) および/または

CDR - L2 : S A S (配列番号10)

を含んでなる相補性決定領域CDR - L1および/またはCDR - L2をさらに含んでな

10

20

30

40

50

- る、上記 [4] ~ [6] 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。
- [8] 配列番号 1 1 に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖を含んでなる、上記 [1] ~ [7] 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。
- [9] 配列番号 1 2 に示されるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含んでなる、上記 [1] ~ [8] 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。
- [1 0] 配列番号 1 3 または配列番号 1 4 に示される前記アイソタイプのアミノ酸配列を有する重鎖 I g G 1 または I g G 4 アイソタイプを含んでなり、上記 [1] ~ [9] 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。
- [1 1] 前記軽鎖相補性決定領域 C D R - L 3 および重鎖相補性決定領域 C D R - H 1、C D R - H 2 および C D R - H 3 が、それぞれ配列番号 1 ~ 4 と少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 % または少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する、上記 [1] に記載の抗体および/またはその結合フラグメント。
- [1 2] モノクローナル抗体、免疫グロブリン分子、F a b、F a b'、F (a b) 2、F (a b') 2、F v、ジスルフィド結合 F v、s c F v、ジスルフィド結合 s c F v、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、上記 [1] ~ [1 1] 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。
- [1 3] 前記 K l o t h o ポリペプチドが、哺乳類 K l o t h o ポリペプチドである、上記 [1] ~ [1 2] 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。
- [1 4] 前記哺乳類 K l o t h o ポリペプチドが、ヒト K l o t h o ポリペプチドである、上記 [1 3] に記載の抗体および/またはその結合フラグメント。
- [1 5] 前記哺乳類 K l o t h o が、齧歯類 K l o t h o ポリペプチドである、上記 [1 3] に記載の抗体および/またはその結合フラグメント。
- [1 6] 前記齧歯類 K l o t h o ポリペプチドが、マウス K l o t h o ポリペプチドまたはラット K l o t h o ポリペプチドである、上記 [1 5] に記載の抗体および/またはその結合フラグメント。
- [1 7] 前記折り畳まれた K l o t h o ポリペプチドが、可溶性の折り畳まれた K l o t h o ポリペプチドである、上記 [1] ~ [1 6] 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。
- [1 8] 尿、血漿、および/または血清に見出さ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、上記 [1 7] に記載の抗体および/またはその結合フラグメント。
- [1 9] 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、上記 [1] ~ [1 8] 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。
- [2 0] 前記折り畳まれた 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、上記 [1 9] に記載の抗体および/またはその結合フラグメント。
- [2 1] 検出可能なタグで標識される、上記 [1] ~ [2 0] 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。
- [2 2] 前記検出可能なタグが、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、上記 [2 1] に記載の抗体および/またはその結合フラグメント。
- [2 3] 上記 [1] ~ [2 2] 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と K l o t h o 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。
- [2 4] 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、上記 [2 3] に記載の抗体複合体。
- [2 5] 軽鎖可変領域と重鎖可変領域とを含んでなり、前記軽鎖可変領域が相補性決定領域 C D R - L 3 を含んでなり、かつ、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：

10

20

30

40

50

a . C D R - L 3 ; X ₁ X ₂ X ₃ X ₄ P X ₅ (配列番号 1)
(ここで、 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) ;

b . C D R - H 1 : X ₆ X ₇ X ₈ X ₉ X ₁₀ X ₁₁ (配列番号 2)
(ここで、 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、 かつ、 X ₁₁ は I または V である) ;

c . C D R - H 2 ; X ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁
(配列番号 3)
(ここで、 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、 かつ、 X ₂₁ は S、 A または Y である) ;

d . C D R - H 3 : X ₂₂ X ₂₃ V Y X ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ W X ₂₈ G X ₂₉ G M
(配列番号 4)
(ここで、 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、 かつ、 X ₂₉ は Y または F である)

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。
[2 6] 上記 [2 5] の核酸を含んでなるベクター。

[2 7] 上記 [2 5] の核酸または上記 [2 6] に記載のベクターを含んでなる、 上記 [1] ~ [2 2] 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を産生する組換え細胞。

[2 8] 上記 [1] ~ [2 2] 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、 上記 [2 5] に記載の核酸、 上記 [2 6] に記載のベクターまたは上記 [2 7] に記載の細胞を含んでなる組成物。

[2 9] 上記 [1] ~ [2 2] 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を含んでなるイムノアッセイ。

[3 0] 前記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、 上記 [2 9] に記載のイムノアッセイ。

[3 1] 前記 E L I S A がサンドイッチ E L I S A である、 上記 [3 0] に記載のイムノアッセイ。

[3 2] 上記 [1] ~ [2 2] のいずれかに記載の K l o t h o ポリペプチドのエピトープ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生産する方法であって、 その工程が

a . 上記 [1] ~ [1 1] 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のアミノ酸配列をコードする核酸を宿主細胞内で発現させること、

b . 前記抗体および / 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、 および

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精製すること
を含んでなる、 方法。

[3 3]

サンプル中の K l o t h o ポリペプチドのレベルを測定するためのアッセイであって、

a . サンプルと上記 [1] ~ [2 2] のいずれかに記載の抗体とを、 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 複合体を検出すること
を含んでなる、 アッセイ。

[3 4] 可溶性 K l o t h o を検出および / または測定するためのアッセイであって、

10

20

30

40

50

a . 体液であるサンプルと本明細書に記載の抗体または結合フラグメントとを、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、および

b . 抗体：可溶性 K l o t h o 複合体を検出すること
を含んでなる、方法。

[3 5] 前記抗体： K l o t h o 複合体が、免疫沈降、免疫プロット、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、上記 [3 3] または [3 4] に記載のアッセイ。

[3 6] 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するためまたは検出するためのスクリーニング方法であって、

a . 対象由来のサンプルにおける K l o t h o のレベルを、場合により、上記 [1] ~ [2 2] のいずれかに記載の抗体もしくはそのフラグメントを用いて、あるいは、上記 [3 3] もしくは [3 4] に記載のアッセイを用いて測定すること、

b . 前記サンプルにおける K l o t h o 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における 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。

[3 7] 前記 C K D が、早期 C K D、場合により、ステージ 1、ステージ 2、ステージ 3、ステージ 4、ステージ 5 またはステージ 6 である、上記 [3 6] に記載の方法。

[3 8] 前記サンプルが、新鮮組織サンプル、凍結サンプル、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、上記 [3 6] または [3 7] に記載の方法。

[3 9] K l o t h o のレベルが、免疫沈降により決定される、上記 [3 6] ~ [3 8] のいずれか一項に記載の方法。

[4 0] 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における K l o t h o のレベルを決定すること、および

b . 前記サンプルにおける 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における K l o t h o のレベルの上昇が、前記対象が A K I 後の回復のより高い見込みを有することを示す、方法。

[4 1] 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における K l o t h o のレベルを決定すること、および

b . 前記サンプルにおける 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における K l o t h o のレベルの上昇が、前記対象が、A K I 後の長期合併症がより少ないというより高い見込みを有することを示す、方法。

[4 2] 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における K l o t h o のレベルを決定すること、および

b . 前記サンプルにおける 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における K l o t h o のレベルの上昇が、前記対象がのより高い見込みを有することを示す、方法。

[4 3] 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における K l o t h o のレベルを決定すること、および

b . 前記サンプルにおける 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における K l o t h o のレベルの上昇が、前記対象が、C K D に関連する腎外合併症がより少ないというより高い見込みを有することを示す、方法。

[4 4] 上記 [1] ~ [2 2] 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、参照薬剤および場合によりその使用のための説明書を含んでなるキット。

以下の限定されない例は、本開示の例示である。

10

20

30

40

50

【実施例】

【0181】

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 Klotho に対して高い親和性を有する抗原結合フラグメント (Fab) を作製した。この新規な抗体 sb106 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 Klotho レベルは正確に定量することができ、血清および尿の両方で、早期ヒト CKD では Klotho が劇的に低下していることが実証される。sb106 抗体は、Klotho の型に特異的であり、現在市販されている Klotho 検出試薬に比べて、クリーンかつ特異的な様式で患者血清サンプルから Klotho を上手く取り出すことが最初に知られたものである。細胞において、それは Klotho 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。動物において、この抗体は血漿から Klotho を免疫沈降させるのに十分である。体液から少量の Klotho を検出する sb106 抗体の能力は、それを Klotho のレベルが異常な疾患の診断に有価な試薬とする。さらに、sb106 抗体は、いずれかの FGF23 介在シグナル伝達経路を含む生理学および病理学的状態の研究で、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 (ELISA)、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 Klotho に特異的なアッセイで使用することができる。

10

20

【0182】

実施例 2二元 Klotho - FGF R1c 複合体の作製

ヒト FGF R1c のリガンド結合ドメイン (D142 ~ R365) は大腸菌 (E. coli) で発現させ、封入体からイン・ビトロで再折り畳みし、公開されている方法 [72, 73] によって精製した。マウス Klotho の細胞外ドメイン (A35 ~ K982) は、C 末端 FLAG タグを用いて HEK293 細胞で発現させ、Klotho エクトドメインと FGF R1c リガンド結合ドメインの二元複合体を記載のように [9] 作製した。

【0183】

sb106 の単離および特性評価

Sb106 を合成ヒト Fab ファージディスプレイライブラリー (ライブラリー F) から単離した [74]。結合選択、ファージ ELISA および Fab タンパク質の精製は記載のように行った [67, 75, 76]。簡単に述べれば、ライブラリー F 由来のファージを、キャプチャーターゲットとしての 96 ウェル Maxisorp Immunoplate (Fisher Scientific、ネピアン、ON、カナダ) 上での、Klotho 細胞外ドメインと FGF R1c リガンド - 結合ドメインの二元複合体を用いた複数回のパンニングにより循環させた。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産し、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シーケンシングを行った。競合的結合 ELISA は、sb106 - ファージを、ヒト Klotho でコーティングした ELISA プレートに結合させる前に、可溶性ヒト Klotho の連続希釈液とともにプレインキュベートすることによって (50 ~ 0.0005 nM x 1 時間) 行った。sb106 の重鎖可変ドメイン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 重鎖の生産向けに設計したベクターにクローニングし、sb106 - IgG を 293 F 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 A タンパク質アフィニティーカラム (GE Healthcare、ミシソーガ、ON、カナダ) でアフィニティー精製した。

30

40

【0184】

タンパク質の精製

FGF R1c リガンド結合ドメインとマウス Klotho エクトドメインの二元複合

50

体 (K l o t h o - F G F R 1 c 複合体と呼称) は、公開されているプロトコール [9] によって作製した。N末端にヘキサヒスチジンタグを有する成熟型のヒト F G F 2 3 (Y 2 5 ~ I 2 5 1) を大腸菌で発現させ、公開されているプロトコール [7 3 , 7 4 , 7 7] により精製した。

【 0 1 8 5 】

S P R 分光法による K l o t h o - F G F R 1 c 複合体に結合する F a b の分析

リアルタイムタンパク質 - タンパク質相互作用は、25、HBS - EPバッファ (1 0 m M H E P E S - N a O H 、 p H 7 . 4 、 1 5 0 m M N a C l 、 3 m M E D T A 、 0 . 0 0 5 % (v / v) ポリソルベート 2 0) 中で、2000表面プラズモン共鳴 (S P R) 分光計 (B i a c o r e A B / G E H e a l t h c a r e) を用いて測定した。タンパク質をそれらの遊離アミノ基を介して研究グレードのCM5バイオセンサーチップ (B i a c o r e A B / G E H e a l t h c a r e) のカルボキシメチル (C M) デキストランに共有結合させた。タンパク質を50 μ l / 分の流速でバイオセンサーチップに注入し、各タンパク質注入 (1 8 0 秒) の終了時にHBS - EP バッファ (5 0 μ l / 分) をチップに流し、180秒間、解離をモニタリングした。タンパク質注入間には、10mM酢酸ナトリウム、pH4.5中、または10mMリン酸ナトリウム / カリウム、pH6.5中、2.0M NaClを注入してチップ表面を再生した。データはB i a E v a l u a t i o n ソフトウェアバージョン4.1 (B i a c o r e A B / G E H e a l t h c a r e) で処理した。各タンパク質注入に関して、対照フローチャネルに対して記録された非特異的S P R 応答をサンプルフローチャネルに対して記録された応答から差し引いた。

【 0 1 8 6 】

E L I S A により選択されたF a b が K l o t h o - F G F R 1 c 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 (フローチャネル約42 f m o l / m m ²) 。非特異的結合に関する対照とするために、K l o t h o のこれら2つの細胞外グリコシダーゼ様ドメインのそれぞれに構造的に関連するウシ - グルクロニダーゼ (S i g m a - A l d r i c h) をチップの対照フローチャネルに結合させた (約45 f m o l / m m フローチャネル) 。100 n M の各F a b をチップに注入した。対照として、固定化された K l o t h o - F G F R 1 c 複合体に対するF G F 2 3 の結合を調べた。

【 0 1 8 7 】

F a b が F G F 2 3 とおよび / または K l o t h o - F G F R 1 c 複合体に対する結合と競合し得るかどうかを試験するために、F G F 2 3 をCM5チップに固定化した (約16 f m o l / m m チップフローチャネル) 。構造上F G F に類似するがF G F R 結合の無いF H F 1 B [7 7] を非特異的結合に関する対象として使用した (約15 f m o l / m m 対照フローチャネル) 。10 n M の K l o t h o - F G F R 1 c 複合体と混合した100 n M のF a b (H B S - E P バッファ) をチップに注入した。対照のため、結合競合は溶液中の競合因子F G F 2 3 を用いて行った。

【 0 1 8 8 】

細胞培養、動物およびヒト試験

細胞株：天然 K l o t h o 発現を有する正常ラット腎臓 (N R K) 細胞 (A T C C 、 マナサス、V A 、 U S A) 、 およびベクター単独、全長膜貫通マウス K l o t h o 、 C 末端 F L A G タグを有するマウス K l o t h o の細胞外ドメイン、もしくは全長マウス K l o t h o でトランスフェクトされたH E K 2 9 3 細胞 [7 8] 。細胞を37、95%空気、5%CO₂ 雰囲気中で培養し、10%ウシ胎仔血清、ペニシリン (1 0 0 U / m l) 、 およびストレプトマイシン (1 0 0 m g / m l) を添加した高グルコース (4 5 0 m g / d l) D M E M で継代培養した。

【 0 1 8 9 】

動物試験は、テキサス大学サウスウェスタン医学センター所内動物実験委員会により承認されたものである。動物は総て、動物試験センターで飼育し、実験は完全に承認された

10

20

30

40

50

実験質で実施した。用いた種には、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種(Tg-Klotho; EFmKL46系統)[79]、同型接合型Klotho低次形態マウス(K1/K1)[80]、およびそれらの野生型同腹子(129svバックグラウンド)を含んだ。

【0190】

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で凍結させた。新鮮な尿を4,000gで回転させ、上清を-80で凍結させた。

【0191】

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た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ウェルカバーガラスに播種し(1.8×10^5 細胞/ml)、一晚増殖させた。これらの細胞を洗浄し($4 \times \text{PBS} \times 3$)、3%パラホルムアルデヒドで固定し(4×10 分)、洗浄し(氷冷PBS $\times 3$)、1%BSAでブロッキングし($\text{PBS} \ 4 \times 10$ 分)、sb106-Fab(1%BSA、PBS中、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)とともにインキュベートし、洗浄し($\text{PBS} \ 4 \times 5$)、抗FLAG-Alexa488(Cell Signaling; 1%BSAを含有するPBS中に1:400希釈; 1時間; 20 $^\circ\text{C}$)とともにインキュベートし、洗浄し(PBS; 4×4)、次いで、1滴のアンチフェードをDAPI(Invitrogen)とともに含むスライドガラス上で反転させ、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共焦顕微鏡で得た。

【0192】

副甲状腺および甲状腺(気管と総称)は成体Sprague-Dawleyラット由来のものであった。非固定新鮮副甲状腺の場合、組織をOCT媒体に包埋し、即、イソペンタン予冷し、液体N₂中で凍結させた。固定副甲状腺サンプルの場合、組織をPBS pH7.4中、4%パラホルムアルデヒドに4で一晚浸漬し、PBSで洗浄し、OCT媒体に包埋し、イソペンタン予冷して、液体N₂中で凍結させた。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%TritonX-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 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 4で一晚)とともにインキュベートした。洗浄(PBS)後、切片をAlexa546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、Zeiss LSM510顕微鏡に取り付け、観察した。

【0193】

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)により説明されている通りに実施した。IP-IBアッセイでは、一般に、50 μl の血清または尿をKRHバッファー[25mM Hepes-NaOH(pH7.4)、120mM NaCl、5mM KCl、1.2mM MgSO₄、1.3mM CaCl₂、1.3mM KH₂PO₄]で希釈して最終容量0.5mlとし、低結合性のシリコン処理済みチューブ中、4で一晚、2 μg のsb106-Fabとともにインキュベートした。KRHバッファーで3回前洗浄した抗FLAG抗体(50%v/v)を結合させたセファロースビーズ(50 μl)を加え、インキュベートした(4×2 時間)、洗浄し(チューブ当たりKRH-500 μl 3回; 22 $^\circ\text{C}$)。免疫複合体を2 \times SDSサンプルローディングバッファー(50 μl ; 100 \times 3分; 4 \times 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3.1mg/ml、1:10000希釈)および希釈剤

10

20

30

40

50

(Dako # S3022、カーピンテリア、CA、USA)で一晩(4、ロッカー)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%ミルク/2%ヤギ血清/TBS-T中1:20000×1時間)に曝し、洗浄した(3回、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。130kD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密度を比較した。

【0194】

実施例4：抗 Klotho合成Fabの同定

組換え Klothoエクドメインと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ニングの後に、いくつかの結合ファージが同定された。クローン sb106(図1A)がさらなる特性評価のために選択された。ファージELISA(図1B)で、ヒトおよびマウスの両 Klothoと結合したsb106-ファージは交差種反応性を示し、Klotho単独またはFGFR1cとの複合体のいずれかと結合したsb106-ファージは、そのエピトープが共受容体複合体形成により隠されていないことを示唆する。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1桁のナノモル範囲(IC50 = 1.7 nM、図1C)の親和性で結合する。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)、FGF23とKlothoとFGFR1cの間の三元複合体の形成を妨げない(図7B)。

【0195】

実施例5：抗 KlothoFab sb106の特性評価

sb106のユニークなCDR配列を用い(図1A)、Fabおよび全長IgGタンパ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に対して高い反応性を有した。変性条件下でのマウス、ラット、およびヒト腎臓組織に対する免疫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[79]からのサンプルでは、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細胞からの溶解液を用いた変性条件下での免疫プロットではKlothoを検出することができなかったが、Klothoでトランスフェクトされた細胞HEK293からの細胞溶解液では過剰発現した抗原を検出することができた(図2B)。新たに凍結された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)を用いた免疫組織化学では、sb106-IgGはKlothoを検出したが、同じ組織が固定した場合には陰性であり(図2C)、これは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)。新たに固定した細胞を用いた免疫細胞化学染色では、Klothoを異種的に過剰発現するHEK293細胞では鮮明な染色が見られたが、Klothoを過剰発現する細胞ではそうではなかった(図2D)。これらの細胞を、ポリリシンで処理した12ウェルカバーガラスに $1.8 \times 10^5 / \text{ml}$ で播種し、一晩増殖させた。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末端にFlagエピトープタグを含む)(PBS中1%BSAで1:400)とともに1時間、光から保護しながらインキュベートした。細胞を冷PBSで4回洗浄した(各5分

10

20

30

40

50

)。その後、カバーガラスを、1滴の退色防止剤をD A P Iとともに含むスライドガラス上で反転させた。画像はスピニングディスク共焦顕微鏡で得た。K l o t h oを過剰発現する細胞でさえ、長期固定はs b 1 0 6による染色を大幅に低下させるか、失わせた。これらのデータは、s b 1 0 6は天然の折り畳みのヒト、ラット、およびマウス K l o t h oと特異的に反応するが、変性した K l o t h oタンパク質とは反応しないことを示す。

【0196】

実施例6： K l o t h oの免疫沈降

可溶性 K l o t h oを沈降させるs b 1 0 6 - F a bの能力を、連続免疫沈降 - 免疫プロット (I P - I B) アッセイを用いて試験した。S b 1 0 6 - F a bは、全細胞溶解液および馴化細胞培養培地、ならびに K l o t h o過剰発現細胞から K l o t h oを取り出した (図3 A)。s b 1 0 6 - F a bの取り出しを、H E K 2 9 3細胞においてC末端F L A Gタグを有する可溶性 K l o t h oを用い、抗F L A G抗体の場合と比較した。s b 1 0 6 - F a bおよび抗F L A Gは、正確に同じ電気泳動移動度を有するタンパク質を沈降させた。

10

【0197】

s b 1 0 6 - F a bは、抗 K l o t h o抗体K M 2 0 7 6と反応したヒト、マウス、およびラット血清から約130kDaのタンパク質を沈降させた (図3 B)。尿からのI Pも約130kDaのバンドを示したが (図3 B)、I P後尿サンプルは免疫プロットにおいてこのようなバンドを示さなかった。s b 1 0 6によるI P - I Bバンドが真正であることをさらに裏づけるために、このバンドの強度を正常者とC K Dステージ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型 K l o t h o低次形態由来の血清で検討した (図3 C)。約30kDaのバンド (図3 C)はヒト進行性C K Dでのみ減少し、K l o t h o欠損マウス (k l / k l) [8 0]には存在しなかった。

20

【0198】

実施例7：ヒトC K Dにおける K l o t h oレベル

I P - I B法がC K D患者の一施設データベースからの血清 K l o t h oレベルを確実に決定できるかどうかを試験した。アッセイの直線性ならびに外挿されるy切片を試験するために組換えヒト K l o t h oを既知量で添加した。一定範囲の異なる濃度の組換え K l o t h oを添加した正常健康ボランティアおよびステージ5のC K D患者由来の血清でI P - I Bを実施した (図4 A)。外因性 K l o t h oの漸増接種に伴いシグナルに段階的増強が見られた。C K D患者由来の血清も、外因性 K l o t h oの漸増に伴ってシグナルの増強を示したが、与えられたいずれの濃度の K l o t h oでも、シグナル強度は正常血清より低かった。

30

【0199】

興味深いことに、健康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は不在でも存在しても同じシグナルを示し、一方、C K D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 K l o t h oレベルに顕著な増加を示した (図4 B)。これらの所見は、内因性 K l o t h oは尿毒症において安定な定常状態で存在するが、外から加えられた K l o t h oは、尿毒症血清中ではタンパク質分解を受ける可能性があり、正常血清ではそうではないことを示唆する。添加実験の量的概要を図4 Cに示す。健康血清とC K D血清の両方で、K l o t h o接種に対して直線的応答が示されたが、C K D血清からのシグナルは傾きが小さい。プロテアーゼ阻害剤が含まれた場合には、C K D直線の傾きが、その切片に影響を及ぼすことなく健康対象の傾きに近づいた。無接種に対する外挿は、正常個体由来の血清は31.1pMの K l o t h oを含み、一方、C K D患者由来の血清は8.5pMの K l o t h oを含んでいたことを示した。同様の外挿が、正常腎機能またはC K Dを有する他の複数名の対象から得られた。

40

【0200】

C K D診療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C K Dの全国的特性と類似している (表1)。拡散しているものの、C K Dのステージとともに

50

Klothoの明らかな段階的低下が見られる(図5A)。血清 Klothoの低下はCKDの早期に見られ、高FGF23、高PTH、および高リン酸塩血症に先行した(表1)。IP-IBアッセイでは、同サンプルで、市販の Klotho ELISAキットと直接比較した(図5B)。全体的に見れば、二者の間に相関が見られるが、直線の両側に同一直線からの分離がある。新鮮サンプルでは、ELISAはIP-IBよりも高い値を示すが(識別ライン(the line of identity)の左側のグレーの菱形、図5B)、1回以上の凍結-解凍を経たサンプルでは、ELISA値ははるかに低い(識別ラインの右側の黒い菱形、図5B)。厳密に同じサンプルが反復凍結-解凍前および後にこれらの2つの方法で試験された場合、IP-IBアッセイはより安定な結果を示すが、ELISA値は急速に下降した(図5C)。

10

【0201】

尿の直接免疫プロットにより、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6A)。血清とは対照的に、ELISAは、尿においてIP-IBアッセイにより匹敵する値を生じたが、ELISAよりもIP-IBアッセイにより検出した場合に、Klotho濃度の低下の規模はより劇的である(図6B)。これらの結果は、ヒトCKDは血清および尿の両方でKlotho欠乏の状態であることを示す。

【0202】

ゆえに、免疫沈降-免疫プロット(IP-IB)アッセイを用いて、全長可溶性 Klothoの血清レベルおよび尿レベルの両方をヒトで測定し、ヒトCKDは血清および尿のKlotho欠乏と関連していることが確認された。Klothoレベルは、CKDステージに伴う無機物代謝の他のパラメーターの妨害および段階的に低下するレベルに先行して早期CKDで検出可能に低かった。外から加えた KlothoはCKD環境では本質的に不安定である。

20

【0203】

抗体に基づく試薬は、タンパク質の検出、タンパク質の単離および精製、ならびに多くの下流適用のために、研究および臨床現場の両方で有価である。Klotho検出に利用可能な市販の試薬は限定され、例えば、天然の折り畳みの Klotho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、Klotho検出用の市販のELISAキットは得られる結果が大きく変動する。

30

【0204】

設計された抗原結合部位を有する合成抗体は、膨大な標的レパートリーの分子認識のために微調整し、適合させることができる。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を行う。抗体ライブラリーを用いた選択から、天然の折り畳みのヒト、マウスおよびラット Klothoに特異性を有する抗体であるsb106が得られた。

【0205】

無機物代謝におけるその役割に加え、可溶性 Klothoは多くの体液中を循環し、体中の細胞の完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 Klothoの作用機序はまだ十分に理解されていないが、Klotho欠乏の生物学的影響は毎核に示される[81]。Klotho転写産物は複数の器官に存在するが、圧倒的に腎臓が最高の発現を持つ[80]。CKDは多重代謝障害の状態であり、排泄不足の内因性および外因性の毒素の蓄積ならびに健康維持を担う物質の欠乏からの複合症候群である。

40

【0206】

試験動物において、AKIおよびCKDは両方とも全身的 Klotho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であるだけでなく、Klothoの回復は腎機能障害を改善し得る。その腎保護効果とは非依存的に、KlothoはCKDにおける腎外合併症を軽減することができる[12, 82]。前臨床デー

50

タに基づけば、抗 K l o t h o 抗体は診断的価値および予後的価値の両方を持ち得る。

【 0 2 0 7 】

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 に関する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無い [4 6、8 3]。ある E L I S A に基づく健常者と C K D 患者の研究 [5 8] では、相反する結果が得られている。正常および C K D の K l o t h o の絶対的レベルは、3桁半ばから後半のほとんどの読み取りで 0 . 4 [4 7] ~ 2 0 0 0 p g / m l を越える [4 1] までの範囲にあった [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 レベルは低い [4 8、5 2、5 4、5 7 ~ 6 0]、糸球体濾過速度 (G F R) の低下と無関係 [4 0、4 1、5 0、5 1、5 3] または G F R の低下につれ増加とさえ [4 4、4 7] 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または低下すると報告されている [4 2、5 3、5 8、5 9]。これはヒト 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集合データに価値が無いことになる。

【 0 2 0 8 】

その天然折り畳みコンフォメーションにある K l o t h o を認識する高親和性合成抗体 (図 1 ~ 3) が作製された。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 を取り出す。付加的バンドは K l o t h o の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 マウスでは低下しておらず、この可能性に対しては議論がある。約 1 3 0 k D a のバンドが全長可溶性 K l o t h o であるか分析したが、E L I S A では達成できないことがあった。

【 0 2 0 9 】

添加実験の直線性は、接種された K l o t h o が総て検出されることを示す (図 4)。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減少は見られなかったことは予期されない所見であった。腎臓病における低い K l o t h o はもっぱら生産の低下から起こるものであり、さらなる機能および本発明の新たな達成方法を開く展望を喚起する。C K D における K l o t h o 欠乏のまだ明らかにされていない新たな機構に加え、これは組換え K l o t h o n の代替という点で重要な意味を持ち得る。

【 0 2 1 0 】

C K D が進行するにつれ血清 K l o t h o に段階的低下が見られる (図 5 A)。I P - I B アッセイの変動係数は血清で 4 %、尿で 7 % であった。I P - I B アッセイはまた、進行性 C K D において極めて低い尿 K l o t h o を示した (図 6)。実際に、尿 K l o t h o の低下は血清よりも劇的であり、より高感度の C K D マーカーと言える。

【 0 2 1 1 】

I P - I B および市販の E L I S A は両方とも、C K D において低い尿 K l o t h o を検出したが、K l o t h o の絶対レベルは E L I S A アッセイを用いた場合にはるかに高く、低下率は I P - I B アッセイと同じではない。C K D における尿 K l o t h o レベルの劇的な低下では、これら 2 つのアッセイは、量的には異なるが、同じ結論を示した。血清での状況は異なる。全体的には正の相関が見られるが、これらの 2 つのアッセイを比較すると、完全に 2 群に分離した (図 5 B)。新鮮サンプルは、E L I S A のほうが高い読み取りを示したが、保存サンプルは E L I S A で極めて低い結果を示した。1 つの可能性は、E L I S A が K l o t h o と新鮮サンプル中の他のいくつかの反応性タンパク質を測定しているということである。I P - I B アッセイは、反復凍結 - 解凍によりいくらか有効性を失ったが、これは E L I S A ではるかに重大な問題である。

【 0 2 1 2 】

I P - I B アッセイももう 1 つの利点は、それがヒトと齧歯類両方の K l o t h o を同等に良好に測定できるということであるが、現行利用可能な E L I S A の齧歯類における使用は、全体的な K l o t h o 欠乏の状態である C K D を有するラットでは極めて高い循環 K l o t h o レベルを検出するので、問題がある可能性がある [6 8]。

【0213】

実施例 8

さらなるCDR配列を表2に示す。相同突然変異が各アミノ酸位に導入され、これは、各位置に関して、元のアミノ酸が保持されているか、またはそのアミノ酸に最も近い「ホモログ」（例えば、保存的アミノ酸変異）が導入されたことを意味し、新たなFab-ファージライブラリーが構築された。選択は、この新たなライブラリーを用い、抗原としてKlotho-FGFRC複合体を用いて行った。抗原に結合したクローンを単離し、配列を決定し、表2に示す。結合親和性はSb106と同等または良好であると予想される。

【0214】

実施例 9ヒト試験

右心カテテル法を受けた9名のヒト対象(49.066.2歳)を本試験に登録した。右心カテテル法の際に、副腎および腎臓下大静脈血液サンプルを採取し、すぐに4での遠心分離後に血清を分離し、その後の試験のために-80で保存した。血清Klothoは、本明細書に記載の免疫沈降-免疫プロットアッセイで決定した。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抗体を用いて免疫プロットを行った。130kDの移動度に基づき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)、ベセズダ、メリーランド州)で定量した。

【0215】

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学センターの動物試験センターで維持した。この時、総てのマウスが129 S1/SV1mJ(129 SV)バックグラウンドで、6~8週齢である。正常なSprague-Dawley(SD)ラット(体重220~250g)をCharles River Laboratories(ウェルミントン、MA)から購入した。Klothoクリアランス試験では、ラットに両側腎摘出術(無腎ラット)または腎臓のマニュアルマニピュレーションを伴う開腹術(偽手術ラット)を施した。ラットまたはマウスに、組換えマウスKlothoタンパク質(rMK1)(R&D Systems、ミネアポリス、MN)の標識された全細胞外ドメインを0.1mg/kg体重の用量で1回、静脈内または腹腔内注射した。セクレターゼが血液Klothoを調節するかどうかを調べるため、塩酸ドキシサイクリン(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、ビルリカ、MA)を正常WTマウスに2日毎日、腹腔内注射し、血清および腎臓のKlothoを測定するために48時間目に血液および腎臓を採取した。

【0216】

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用い、合成抗Klotho抗体sb10663を血清Klothoの免疫沈降に用いた。

【0217】

ラットおよびマウスにおける標識 Klothoのクリアランス

正常なMunich Wistarラット(体重220~250g)をイナクチン(100mg/kg体重)で麻酔し、標識Klothoのポーラス(a bonus of)を頸静脈から注入した(0.1mg/kg体重)。125I標識Klothoまたは125I標識アルブミンの注射試験では、本発明らの公開済みの方法を用い、ポーマン嚢腔および近位尿管のフリーフロー微小穿刺による液体収集を行った。簡単に述べると、左腎を露出さ

10

20

30

40

50

せ、尿収集のために左尿管にカテーテルを留置した。近位尿細管はリサミングリーン色素注射の後にそれらの特徴的な構造により特定し、ガラスキャピラリーで穿刺した。較正済みの一定ボアガラスキャピラリーで液体量を測定した。液体の放射活性はシンチレーション計数により決定し、液体量に対して正規化した。示された時点で血液を眼窩後静脈叢から抜き取り、スポット尿を採取した。採取した尿および血清中の ^{125}I 標識 Klothoまたは ^{125}I 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。種々の器官のホモジネートを作製し、器官ホモジネートの放射活性をシンチレーション計数により測定し、器官ホモジネート中のタンパク質に対して正規化した。器官切片(10mm)に対してオートラジオグラフィを行った。

【0218】

免疫電子顕微鏡

マウス組換えKlothoタンパク質(0.1mg/kg体重)をkl/klマウスに1回腹腔内注射し、注射24時間後にマウスを犠牲にした。腎臓を採取し、大動脈灌流を介して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(4で4時間)で後固定した。超薄凍結組織切片の免疫金標識を記載のように行った21。腎皮質に2.3Mスクロースを一晩浸潤させ、液体窒素中で凍結させ、70~80nm厚の切片とし(Ultramicrotome Reichert Ultracut E; Leica Microsystems、ウエツラー、ドイツ)、ホルムバルコートニングニッケルグリッドに取り付けた。これらの切片をKM2076抗体とともにインキュベートした後、金結合Aタンパク質(10nm金粒子、Sigma-Aldrich)とともに60分間インキュベーションを行った。酢酸ウラニルで染色した後、切片をJeol 1200 EX透過型電子顕微鏡(日本電子株式会社(Jeol Ltd.)、昭島、日本)で観察した。

【0219】

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。正常ラット(直接穿刺による)および右心カテーテル法を受けたヒト対象の副腎および腎臓下静脈叢におけるKlothoタンパク質の血清レベル。総ての患者がeGFR 60ml/分/1.73m²であった。ラットおよびヒトの両血清サンプルで、大静脈Klothoレベルに同等の腎臓下/副腎増加が見られた。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たところ、血清エリスロポエチンは、腎臓下/副腎下大静脈から上昇し、血清クレアチニン(SCr)は低下していたが、Klothoは増加していたことが判明し、これは腎臓が循環中にKlothoを分泌することを示す。

【0220】

ラットから両腎臓を摘出した場合には、血清Klothoレベルは、1日で正常レベルの約半分に有意に低下した。無腎状態では、試験は、40~50時間より長く継続できなかった。

【0221】

循環からのKlothoクリアランスの方法を検討した。無腎ラットにおける循環中の外因性Klothoタンパク質のレベルは、注射直後の正常ラットにおけるレベルと同等であったが、正常ラットにおける外因性Klothoタンパク質の半減期は、無腎ラットでの半減期よりもはるかに短く、腎摘出術時の内因性Klothoの半減期は無腎ラットにおける外因性Klothoの半減期と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実験は、腎臓がKlothoの取り込みならびにその排泄の主要な器官であり得ることを裏づけた。

【0222】

注射した標識Klothoタンパク質は、顕著に腎臓および脾臓に、少量ながら心臓に分布し、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実験は、Klothoタンパク質が血液から腎臓を

10

20

30

40

50

経て尿へと排出されることを裏づけた。

【0223】

これらのまたさらなる実験に基づき、(1)腎臓は可溶性 Klothoを生産し、セクレターゼにより媒介される Klothoのエクトドメインの放出により体循環中へ放出されること、(2)腎臓は可溶性 Klothoを循環から排除するための重要な器官であること、(3) Klothoは腎尿細管を通過して基底外側から細胞内の場所へ移動し、その後、頂端膜を通過して尿管腔へ分泌されることが決定付けられた。

【0224】

【表2】

対照	n	年齢	性別 (M/F)	PCr (mg/dl)	血清 Pi (mg/dl)	血清 HCO ₃ ⁻ (mM)	血清 PTH (pg/ml)	FGF23 (pg/ml)	25(OH)D ₃ (ng/ml)	CKD の病因(患者数*)
健康	34	50 ± 17	14/20	0.8 ± 0.2	3.6 ± 0.6	23 ± 2	59 ± 25	30 ± 10	32 ± 10	None
CKD1	10	43 ± 10	7/3	0.8 ± 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 [#]	3.2 ± 0.8	25 ± 3	86 ± 51	79 ± 18 [#]	25 ± 8	DM (3), HTN (7), GN (3), IN (1)
CKD4	14	62 ± 13	8/6	2.7 ± 0.6 [#]	3.5 ± 0.9	24 ± 3	202 ± 101 [#]	204 ± 173 [#]	21 ± 8	DM (4), HTN (10), GN (3), RK (1)
CKD5	11	62 ± 12	5/6	4.7 ± 2.0 [#]	5.1 ± 3.5 [#]	21 ± 3	223 ± 188 [#]	580 ± 427 [#]	21 ± 9 [#]	DM (7), HTN (7), GN (2)
透析	14	50 ± 12	6/8	11.9 ± 15.6 [#]	4.8 ± 1.7 [#]	22 ± 5	500 ± 650 [#]	760 ± 286 [#]	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 HCO₃⁻=血清重碳酸塩
PTH=副甲状腺ホルモン; FGF23+繊維芽細胞増殖因子 23; DM=糖尿病; HTN=高血圧; GN=糸球体腎炎; RK=残りの腎臓; IN=間質性
腎炎; PKD=多発性嚢胞性腎疾患。*一部の患者は2つ以上の診断を有する。
結果は平均±標準偏差として示す。#健康なボランティアと比較した場合の P<0.05 ANOVA。

表 1: ヒト対象の特徴

10

20

30

40

50

【 0 2 2 5 】
【 表 3 】

表 2: CDR配列のバリエーション

sb106	L3	H1	ID	H2	ID	H1	ID	H2	ID
E12	CGA	GFNI	5	6	16	GFNI	5	6	16
E2	AG	GFNI	15	16	20	GFNI	15	16	20
C12	AG	GFNI	19	16	24	GFNI	19	16	24
E3	AG	GFNI	23	16	28	GFNI	23	16	28
D7	AG	GFNI	27	16	32	GFNI	27	16	32
E4	AG	GFNI	31	16	36	GFNI	31	16	36
E6	AG	GFNI	35	16	40	GFNI	35	16	40
E10	AG	GFNI	39	16	44	GFNI	39	16	44
C9	AG	GFNI	43	16	48	GFNI	43	16	48
D11	AG	GFNI	47	16	52	GFNI	47	16	52
E1	AG	GFNI	51	16	56	GFNI	51	16	56
D5	AG	GFNI	55	16	60	GFNI	55	16	60
D12	AG	GFNI	59	16	64	GFNI	59	16	64
E8	AG	GFNI	63	16	68	GFNI	63	16	68
E11	AG	GFNI	67	16	72	GFNI	67	16	72
F1	AG	GFNI	71	16	76	GFNI	71	16	76
D1	AG	GFNI	75	16	80	GFNI	75	16	80
C10	AG	GFNI	79	16	84	GFNI	79	16	84
D6	AG	GFNI	86	16	87	GFNI	86	16	87
D8	AG	GFNI	90	16	91	GFNI	90	16	91
C11	AG	GFNI	94	16	98	GFNI	94	16	98
F2	AG	GFNI	97	16	102	GFNI	97	16	102
D9	AG	GFNI	101	16	106	GFNI	101	16	106
E5	AG	GFNI	105	16	110	GFNI	105	16	110
D10	AG	GFNI	109	16	114	GFNI	109	16	114
D3	AG	GFNI	113	16	118	GFNI	113	16	118
D4	CGA	GFNI	117	16	118	GFNI	117	16	118

10

20

30

40

表 2 続き

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

10

20

30

40

【 0 2 2 6 】

本出願を目下のところ好ましい例と考えられるものに関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。対照的に、本出願は添付の特許請求の範囲の趣旨および範囲に含まれる様々な改変および等価な配置を包含することが

50

意図される。

【 0 2 2 7 】

総ての刊行物、特許および特許出願は、各個の刊行物、特許または特許出願が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ことが具体的かつ個々に示される場合と同程度に、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。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の全内容が本明細書の一部とされる。

【 0 2 2 8 】

参照文献

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-Manly 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.
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
14. Bloch L, Sineshchekova 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
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

10

20

30

40

50

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 KLOTTHO 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. 10
31. Kurosaki 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 PO₄, Ca x PO₄ 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. 20
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 30
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 40
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
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. Siahianidou 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
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
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

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. Ibrahim 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

10

20

30

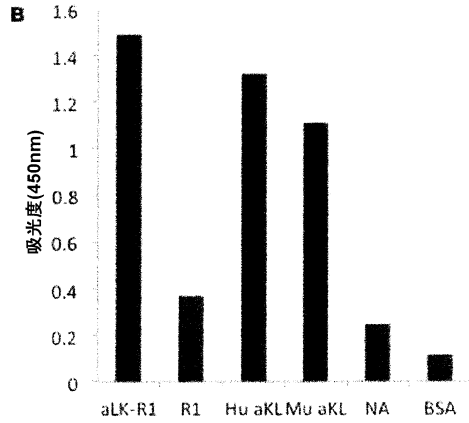
40

【 図 1 A 】

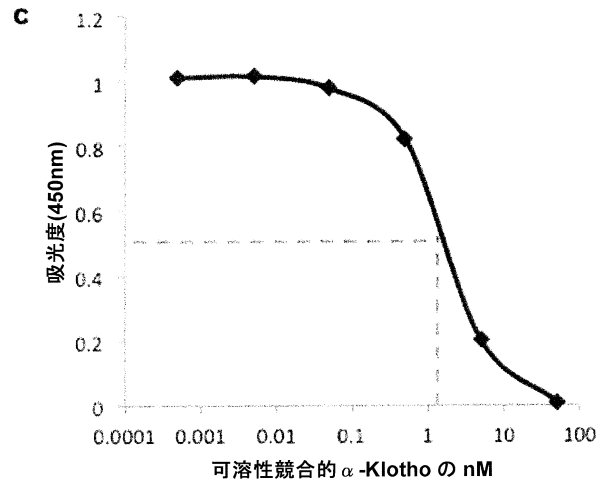
A

CDR-L1	27 28 29 30 31 32	Q S V S S A (配列番号 9)
	35 36 37	
CDR-L2		S A S (配列番号 10)
	105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117	
CDR-L3		Q Q A G Y S P I T (配列番号 5)
	27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38	
CDR-H1		G F N I S Y Y S (配列番号 6)
	56 57 58 59 60 61 62 63 64 65	
CDR-H2		I S P S Y G Y T (配列番号 7)
	105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117	
CDR-H3		A R Y Y Y Y A S H G W A G Y G M D Y (配列番号 8)

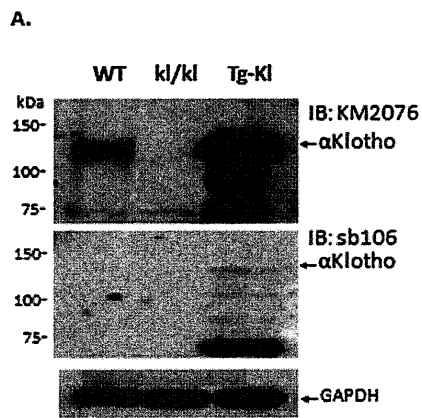
【 図 1 B 】



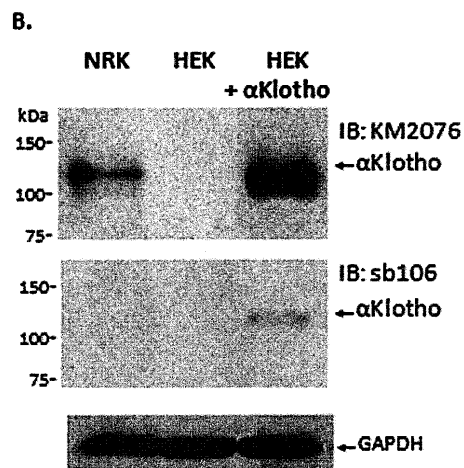
【 図 1 C 】



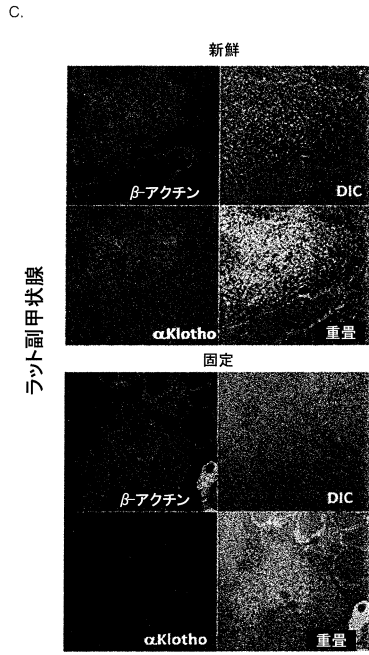
【 図 2 A 】



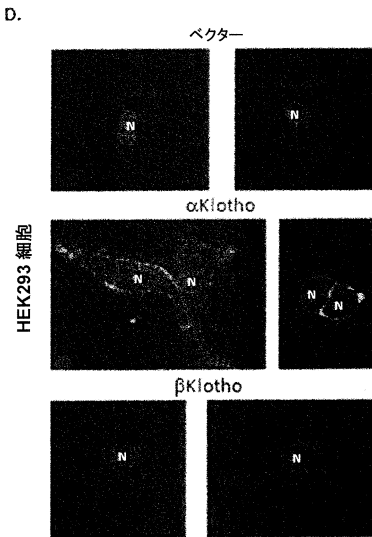
【 図 2 B 】



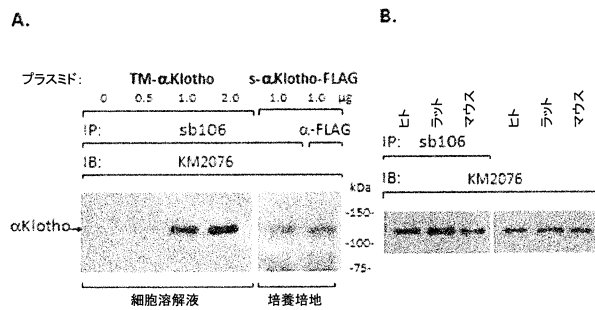
【 図 2 C 】



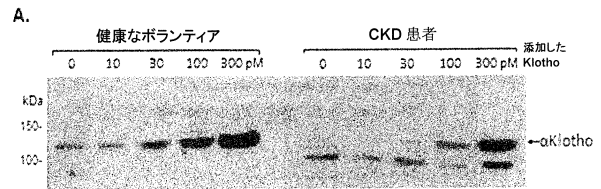
【 図 2 D 】



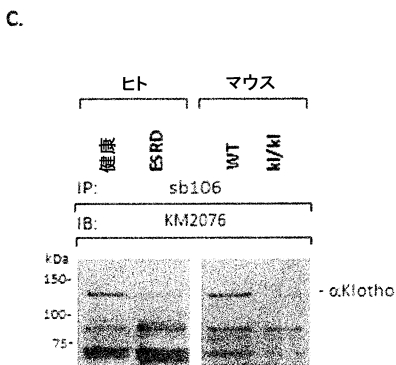
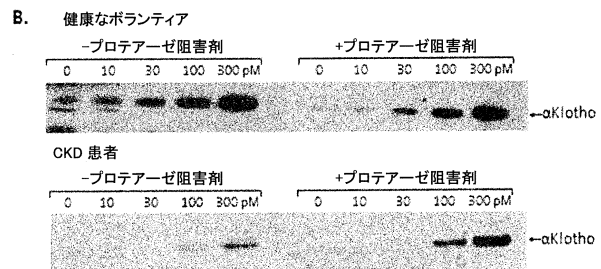
【 図 3 】



【 図 4 A 】

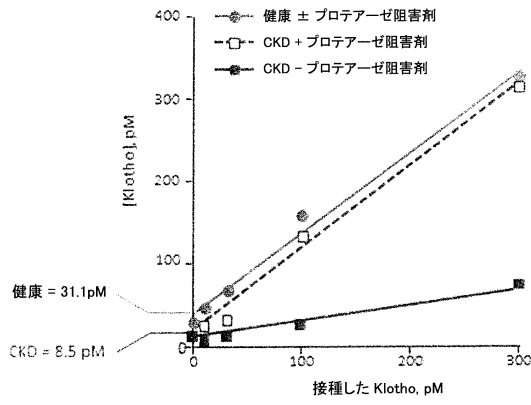


【 図 4 B 】



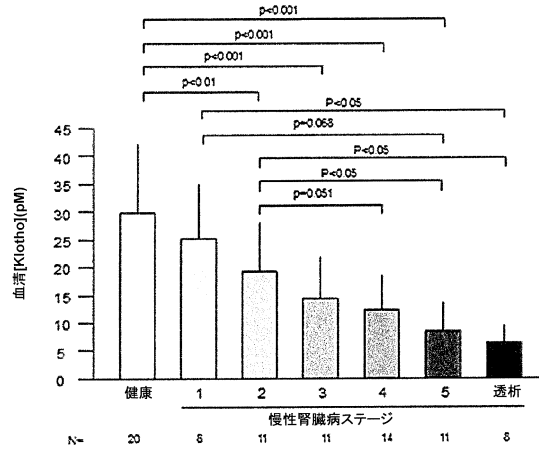
【 図 4 C 】

C.



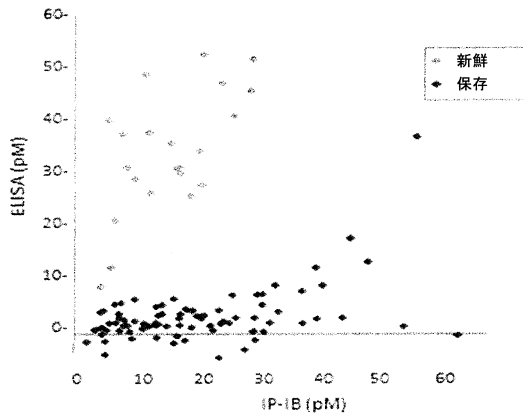
【 図 5 A 】

A.



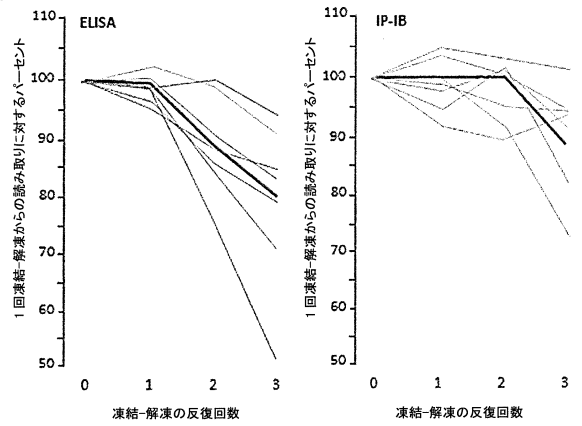
【 図 5 B 】

B.

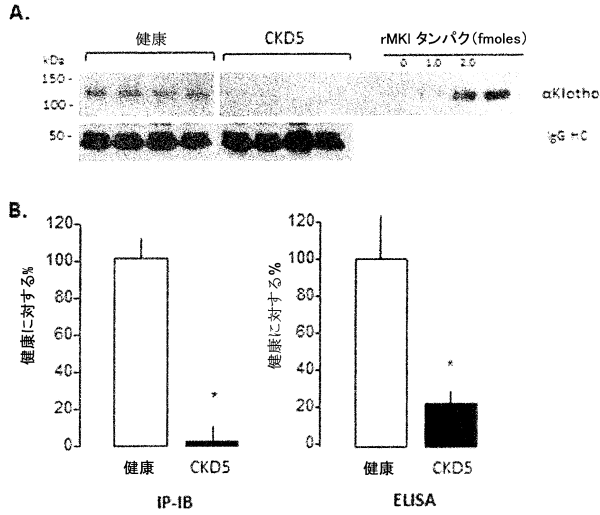


【 図 5 C 】

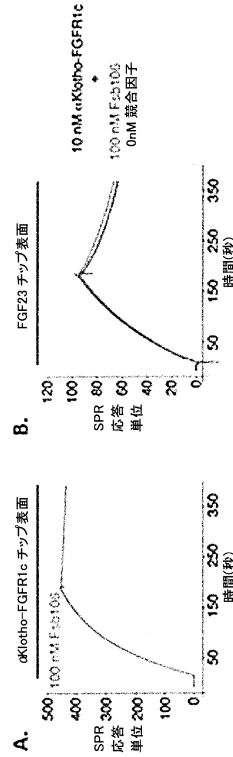
C.



【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】

A. 軽鎖配列 (配列番号 11)

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSVSSAYAWYQOKPKAPKLLIYSASSLSYGV
 PSRFSGSRSGDFTLTIISLQPEDFATYYCQAGYSPITFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIF
 PPSDEQLKSGTASVCLLNNFPPKEAKVQIKWIKIDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSL
 SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

B. 重鎖配列-Fab (配列番号 12)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNISYYSIHWRQAPGKGLEWVAYISPSYGY
 TSYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRADETAVYYCARYYVYASHGWAGYGM
 YWGQGLTVVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
 LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTOTYICNVNHKPSNTKVDKVKPEKSC
 DKHTHT

C. 重鎖配列-IgG1 (配列番号 13)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNISYYSIHWRQAPGKGLEWVAYISPSYGY
 TSYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRADETAVYYCARYYVYASHGWAGYGM
 YWGQGLTVVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
 LTVSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTOTYICNVNHKPSNTKVDKVKPEKSC
 DKHTHTPCPPAPELGGPSVFLFPPKPKDLMISRTEVTCVVDVSDPEVQFHWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
 SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 TTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

D. 重鎖配列-IgG4 (配列番号 14)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNISYYSIHWRQAPGKGLEWVAYISPSYGY
 TSYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRADETAVYYCARYYVYASHGWAGYGM
 YWGQGLTVVSSASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
 LTVSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTOTYICNVNHKPSNTKVDKRVESKYG
 PPSVCPAPELGGPSVFLFPPKPKDLMISRTEVTCVVDVSDPEVQFHWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI
 AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

【配列表】

0006612324000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
C 0 7 K	16/18 (2006.01)	C 0 7 K	16/18
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53 D
G 0 1 N	33/543 (2006.01)	G 0 1 N	33/543 5 0 1 A
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	G 0 1 N	33/53 Y
		A 6 1 K	39/395 H

(74)代理人 100155631

弁理士 榎 保孝

(74)代理人 100137497

弁理士 大森 未知子

(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、パークリー、ストリート、391

(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

アメリカ合衆国テキサス州、ダラス、ハリー、ハインズ、ブルバード、5323

審査官 清野 千秋

(56)参考文献 国際公開第2013/184218(WO, A1)

HU et al., Kidney International, 2010年, Vol.78, No.12, p.1240-1251

HU et al., Nat Rev Nephrol., 2013年, Vol.8, No.7, p.423-429

Alexandra Scholze et al., J Clin Endocrinol Metab, 2014年, Vol.99, No.5, p.E855-E861

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 15/09 - 15/90

C 0 7 K 16/18

C 0 7 K 19/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS
(STN)

专利名称(译)	对αklotho具有高亲和力的抗体		
公开(公告)号	JP6612324B2	公开(公告)日	2019-11-27
申请号	JP2017505099	申请日	2015-07-31
[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		
当前申请(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	ザッデブエスシドウ サラエルバーカー オーソンドブリュモ 黒尾誠		
发明人	ザッデブ、エス.シドウ サラ、エル.バーカー オーソン、ダブリュ.モ 黒尾 誠		
IPC分类号	C12N15/13 C12N15/63 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K16/18 C07K19/00 G01N33/53 G01N33/543 A61K39/395		
CPC分类号	C07K16/28 C07K2317/92 C12N9/2402 C12Y302/01031 G01N33/6872 G01N2800/347 G01N2800/52 C07K14/71 C07K16/40 C07K2317/51 C07K2317/515 C07K2317/56 C07K2317/565 G01N33/573 G01N2333/924		
FI分类号	C12N15/13.ZNA C12N15/63.Z C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K16/18 C07K19/00 G01N33/53.D G01N33/543.501.A G01N33/53.Y A61K39/395.H		
优先权	62/031477 2014-07-31 US		
其他公开文献	JP2017524362A JP2017524362A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

抗体和/或其结合片段，其中所述抗体和/或其结合片段与αklotho多肽的表位特异性结合，所述αklotho多肽的表位任选地为折叠的αklotho，或任选地具有约2nM或更小的解离常数（KD）通过竞争性ELISA法，制备并用于诊断肾脏疾病的方法。

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 特許公報(B2)	(11) 特許番号 特許第6612324号 (P6612324)
(45) 発行日 令和1年11月27日(2019.11.27)	(24) 登録日 令和1年11月8日(2019.11.8)	
(51) Int. Cl.	F I	
C 1 2 N 1 5 / 1 3 (2 0 0 6 . 0 1)	C 1 2 N 1 5 / 1 3	Z N A
C 1 2 N 1 5 / 6 3 (2 0 0 6 . 0 1)	C 1 2 N 1 5 / 6 3	Z
C 1 2 N 1 / 1 5 (2 0 0 6 . 0 1)	C 1 2 N 1 / 1 5	
C 1 2 N 1 / 1 9 (2 0 0 6 . 0 1)	C 1 2 N 1 / 1 9	
C 1 2 N 1 / 2 1 (2 0 0 6 . 0 1)	C 1 2 N 1 / 2 1	
請求項の数 21 (全 55 頁) 最終頁に続く		
(21) 出願番号 特願2017-505099 (P2017-505099)	(73) 特許権者 515265260	
(86) (22) 出願日 平成27年7月31日(2015.7.31)	ザ ガバニング カウンシル オブ ザ	
(65) 公表番号 特表2017-524362 (P2017-524362A)	ユニバーシティ オブ トロント	
(43) 公表日 平成29年8月31日(2017.8.31)	カナダ国 エム5ジー 1エル5 オンタ	
(86) 国際出願番号 PCT/CA2015/050728	リオ、 トロント、 カレッジ ストリ	
(87) 国際公開番号 W02016/015162	ート 100、 バンティング インスティ	
(87) 国際公開日 平成28年2月4日(2016.2.4)	テュート、 ルーム 413	
審査請求日 平成30年7月30日(2018.7.30)	(73) 特許権者 500039463	
(31) 優先権主張番号 62/031,477	ボード・オブ・リーゼンツ、ザ・ユニバ	
(32) 優先日 平成26年7月31日(2014.7.31)	ーシティ・オブ・テキサス・システム	
(33) 優先権主張国・地域又は機関 米国(US)	アメリカ合衆国 テキサス 78701、	
	オースティン、ウエスト 7ティールイ	
	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】 α K l o t h o に対して高親和性を有する抗体