

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-502984

(P2021-502984A)

(43) 公表日 令和3年2月4日 (2021. 2. 4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 16/36 (2006.01)	C 0 7 K 16/36 Z N A	4 C 0 8 5
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	4 H 0 4 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	
A 6 1 P 7/04 (2006.01)	A 6 1 P 7/04	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09 Z	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 46 頁)		

(21) 出願番号	特願2020-526504 (P2020-526504)	(71) 出願人	509091848
(86) (22) 出願日	平成30年11月15日 (2018. 11. 15)		ノヴォ ノルディスク アー／エス
(85) 翻訳文提出日	令和2年5月14日 (2020. 5. 14)		デンマーク、ハウスヴェア ディーケー
(86) 国際出願番号	PCT/EP2018/081296		2 8 8 0, ノヴォ アレー
(87) 国際公開番号	W02019/096874	(74) 代理人	100108453
(87) 国際公開日	令和1年5月23日 (2019. 5. 23)		弁理士 村山 靖彦
(31) 優先権主張番号	17201762.6	(74) 代理人	100110364
(32) 優先日	平成29年11月15日 (2017. 11. 15)		弁理士 実広 信哉
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100133400
(31) 優先権主張番号	18174634.8		弁理士 阿部 達彦
(32) 優先日	平成30年5月28日 (2018. 5. 28)	(72) 発明者	ヤコブ・ルンド
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)		デンマーク・2 8 8 0・ハウスヴェア・ノ ヴォ・アレー・(番地なし)
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 F X活性化を促進する第X因子結合剤

(57) 【要約】

本出願は、血友病の治療において有用である抗体およびその断片などの類を見ない F X 結合分子に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

F X に結合することができる抗体またはその抗原結合性断片であって、前記抗体または抗原結合性断片が、

- a . F X 活性化を刺激することができるか、
- b . F I X a による F X 活性化を刺激することができるか、
- c . F X 活性化を刺激するか、
- d . F I X a による F X 活性化を刺激するか、
- e . F X をよりタンパク質分解しやすくすることができるか、または
- f . F X を F I X a によってよりタンパク質分解しやすくすることができる、抗体またはその抗原結合性断片。

10

【請求項 2】

前記 F X の活性化 / タンパク質分解が、本明細書の実施例 3 に説明されるように決定される、請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項 3】

前記抗体またはその抗原結合性断片が、F X の活性化ペプチド（配列番号 2 のアミノ酸残基 1 4 3 ~ 1 9 4）に結合することができる、請求項 1 または 2 に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項 4】

前記抗体またはその抗原結合性断片が、前記 F X の活性化ペプチドに結合することができる、ペプチドアレイにより決定される共通最小エピトープが、アミノ酸残基「L L」（配列番号 2 のアミノ酸残基 1 7 7 ~ 1 7 8）を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

20

【請求項 5】

F X に結合することができる抗体またはその抗原結合性断片であって、

- a . m A b 0 0 9 1 6 の重鎖可変ドメイン（配列番号 4）および軽鎖可変ドメイン（配列番号 5）を含むか、
- b . m A b 0 0 9 1 6 の前記重鎖可変ドメイン（配列番号 4）の 3 つの C D R および前記軽鎖可変ドメイン（配列番号 5）の 3 つの C D R を含むか、
- c . m A b 1 3 F 6 2 の重鎖可変ドメイン（配列番号 6）および軽鎖可変ドメイン（配列番号 7）を含むか、
- d . m A b 1 3 F 6 2 の前記重鎖可変ドメイン（配列番号 6）の 3 つの C D R および前記軽鎖可変ドメイン（配列番号 7）の 3 つの C D R を含むか、
- e . 配列番号 8、9、1 0、1 1、5 4、5 5、5 6 もしくは 5 7 を含むか、または
- f . 配列番号 8、9、1 0、1 1、5 4、5 5、5 6 もしくは 5 7 の 3 つの C D R を含む、抗体またはその抗原結合性断片。

30

【請求項 6】

前記抗体またはその抗原結合性断片が、配列番号 8、9、1 0、1 1、5 4、5 5、5 6、または 5 7 により識別された配列に対して、それぞれ少なくとも 9 0、9 1、9 2、9 3、9 4、9 5、9 6、9 7、9 8、または 9 9 % 同一である重鎖可変ドメインを含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

40

【請求項 7】

F X に結合することができる抗体またはその抗原性結合断片であって、請求項 5 に記載の参照抗体またはその抗原結合性断片と競合する、抗体またはその抗原性結合断片。

【請求項 8】

前記抗体または抗原結合性断片が、

- a . F X 活性化を刺激することができるか、
- b . F I X a による F X 活性化を刺激することができるか、
- c . F X 活性化を刺激するか、
- d . F I X a による F X 活性化を刺激するか、

50

e . F X をよりタンパク質分解しやすくすることができるか、または

f . F X を F I X a によってよりタンパク質分解しやすくすることができる、請求項 5 または 7 に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項 9】

前記抗体またはその抗原結合性断片が、F I X a 結合剤の存在と無関係に、F I X a による F X 活性化を刺激する、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項 10】

前記抗体または抗原結合性断片が、10 μ M 未満、例えば 9 μ M 未満、例えば 8 μ M 未満、例えば 7 μ M 未満、例えば 6 μ M 未満、例えば 5 μ M 未満、例えば 4 μ M 未満、例えば 3 μ M 未満、または例えば 2 μ M 未満の平衡解離定数 (K_D) として決定される結合親和性を有する、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

10

【請求項 11】

前記抗体または抗原結合性断片が、一価であり、例えば免疫グロブリン単一可変ドメインまたはその抗原結合性断片、N a n o b o d y (登録商標)、 $V_H H$ 、ヒト化 $V_H H$ 、ラクダ化 V_H ドメイン、例えば F a b、s c F a b、F v または s c F v である、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項 12】

前記抗体またはその抗原結合性断片が、二価であり、例えば全長 m A b または F a b ' ₂ である、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

20

【請求項 13】

請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片を含む、二重特異性または多重特異性抗体。

【請求項 14】

阻害物質を有するか、または有しない、血友病 A または B などの血友病の治療において使用するための薬品の製造のための、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片の使用。

【請求項 15】

阻害物質を有するか、または有しない、血友病 A または B などの血友病の治療において使用するための、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、凝固第 X 因子結合剤、および血友病などの凝固障害の治療におけるそれらの使用に関する。

【0002】

配列表の参照による組み込み

本出願は、電子形式の配列表と共に提出される。配列表の内容全体は、参照により本明細書に組み込まれる。

40

【背景技術】

【0003】

血友病 A および B を有するヒトなどの凝固障害を有する患者では、凝固カスケードの様々な工程が、例えば、凝固因子が欠如しているかまたは存在が不十分であることに起因して、機能不全となる。そのような凝固カスケードの一部の機能不全は、不十分な血液凝固および潜在的に生命を脅かす出血、または関節などの内部器官への損傷をもたらす。

【0004】

一般的に血友病 A と呼ばれる凝固第 V I I I 因子 (F V I I I) 欠損症は、世界中の約 4 2 0 , 0 0 0 人に影響を及ぼす先天性出血障害であり、そのうち約 1 0 5 , 0 0 0 人が現在診断されている。

50

【 0 0 0 5 】

血友病 A を有する患者は、外因性 F V I I I などの凝固因子補充療法を受ける場合がある。従来の治療は、出血エピソードの予防法または要求に応じた治療として提供される、補充療法からなる。重度の血友病 A を有する患者のケアの現行基準は、血漿由来 F V I I I もしくは組み換え F V I I I、またはそれらの長時間作用型変異体のいずれかをを用いた、1 週間あたり最高 3 回までの予防的な静脈注射である。

【 0 0 0 6 】

しかしながら、そのような患者は、そのような外因性因子に対する中和抗体、いわゆる「阻害物質 (inhibitor)」を発症し、以前有効であった療法を無効にするリスクがある。「阻害物質」(すなわち、F V I I I に対する同種抗体)を有する血友病 A 患者は、部分的に先天性であり、部分的に後天性である、凝固障害の非限定的な例である。F V I I I に対する「阻害物質」を発症している患者は、予防として、または要求に応じてのいずれにせよ、従来の補充療法を受けることができない。

10

【 0 0 0 7 】

さらに、外因性凝固因子は、静脈内でのみ投与され得、これは患者に対して相当な不便および不快をもたらす。例えば、乳児および幼児は、静脈へのアクセスを確実にするために、静脈内カテーテルを胸部静脈中に外科的に挿入させる必要があり得る。これにより、細菌感染症を発症するリスクが非常に高まる。

【 0 0 0 8 】

出血している個体では、血管外 T F が血液中の活性化 F V I I (F V I I a) にさらされると、組織因子 / 第 V I I a 因子 (T F / F V I I a) 複合体によって凝固が開始される。T F / F V I I a 複合体の形成は、第 X 因子 (F X) の活性化第 X a 因子 (F X a) への活性化をもたらす、活性化第 V 因子 (F V a) と共に、限定量のトロンビンを生成する。

20

【 0 0 0 9 】

少量のトロンピンが血小板を活性化する。活性化された血小板は、活性化第 V I I I 因子 (F V I I I a) および活性化第 I X 因子 (F I X a) から構成されるテナーゼ複合体の構築および結合を支持する。テナーゼ複合体は、F X 活性化の非常に有効な触媒であり、この第 2 の工程において生成される F X a は、最終的なトロンビンバーストの要因である F V a / F X a プロトロンビナーゼ複合体中の活性プロテアーゼとして機能する。トロンピンは、フィブリノゲンを切断してフィブリンモノマーを生成し、これは重合してフィブリンネットワークを形成し、漏れている血管を封鎖して、出血を止める。急速かつ広範囲のトロンビンバーストは、頑丈かつ安定なフィブリン血栓形成の必要条件である。

30

【 0 0 1 0 】

凝固第 F V I I I 因子活性の不在により生じる不適切な F X a 形成およびトロンビン生成の低下は、血友病 A 患者の出血素因の根底にある素因である。

【 0 0 1 1 】

述べたように、F X の酵素活性形態 F X a へのタンパク質分解変換は、F I X a およびその補因子 F V I I I a を含む固有の F X 活性化複合体によって達成することができる。補因子結合は、F I X a の酵素活性を約 5 桁増加させ、S c h e i f l i n g e r らの (2 0 0 8) J Thromb Haemost , 6 : 3 1 5 - 3 2 2 で概説されるように、複数のメカニズムを通じて生じると考えられている。特に、F V I I I a は、F X に対するタンパク質分解活性を増加させた F I X a の構造を安定化させることがわかっている (K o l k m a n J A , M e r t e n s K (2 0 0 0) B i o c h e m i s t r y , 3 9 : 7 3 9 8 - 7 4 0 5 , Z o g g T , B r a n d s t e t t e r H (2 0 0 9)

40

B i o l C h e m , 3 9 0 : 3 9 1 - 4 0 0) 。この観察に基づき、抗体が様々なタンパク質間相互作用を模倣できる多用途の結合タンパク質であることを認識し、S c h e i f l i n g e r らは、リン脂質表面およびカルシウムの存在下で、ただし天然補因子 F V I I I a の非存在下で、F I X a による F X 活性化を強化する能力を特徴とするアゴニスト抗 F I X a 抗体のスクリーニングを実施した。5 2 8 0 のハイブリドーマ上清のスク

50

リーニングから、88の抗体が異なる程度のF I X a アゴニスト活性を示すことが見出された。

【0012】

第X / X a 因子に結合する抗体は以前に特徴付けられており (U S 8 , 0 6 2 , 6 3 5)、A C E 9 1 0 として既知のエミシズマブ (U S 9 , 3 3 4 , 3 3 1) は、一方のアームで第I X / I X a 因子に、そして他方のアームで第X / X a 因子に結合することによってF V I I I a の作用を模倣するバイパス剤として認証されている。エミシズマブの抗F X アームは、F X の軽鎖に結合し、酵素前駆体の特異的ではなく、むしろ匹敵する親和性でF X およびF X a に結合する。抗F X アームは、主にF X を動員し、それをF I X a に近づけると考えられている。

10

【0013】

したがって、F V I I I a の全体的活性を模倣する一方で、F V I I I 模倣化合物エミシズマブは、F V I I I a の固有の特異性および機能の一部が欠如していると思われる。具体的には、F V I I I a は、リン脂質表面上のF I X a および酵素前駆体F X に結合することによって機能し、F I X a 活性を約200,000倍刺激し、その後F X a を放出することによってF X 活性化を促進する。

【0014】

機能改善を有すると明記されているA C E 9 1 0 の変異体が、W O 2 0 1 8 / 0 2 1 4 5 0 に開示されている。

【0015】

さらなる二特異性抗F I X / 抗F X F V I I I 模倣化合物が、W O 2 0 1 8 / 0 9 8 3 6 3 に開示されている。

20

【0016】

本発明は、F X a の生成を刺激するF X 結合剤に関する。したがって、そのような分子は、個別の化合物として、またはF V I I I 模倣化合物の構成要素としてのいずれかで、潜在的に有用な治療薬である。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0017】

本発明は、F X の活性化、すなわち、F X からのF X a の生成を刺激することができるF X 抗体またはその断片などのF X 結合剤の群、ならびにそのようなF X 結合剤の特定に関する。

30

【0018】

本発明はさらに、活性化F X (F X a) ではなく酵素前駆体に結合することができる、N a n o b o d i e s (登録商標) などの免疫グロブリン単一可変ドメインを含む、抗体およびその抗原結合性断片を含むF X 結合剤の群に関する。

【0019】

本明細書に開示されるF X 結合剤によるF X の結合は、それに続くF I X a によるF X の活性化を刺激する。一態様では、結合は、F X の活性化ペプチドにおけるペプチド伸長によって生じる。したがって、本明細書に開示されるF X 結合剤は、F X をよりF I X a 媒介活性化しやすくすることによってF X 活性化を刺激することが観察されている。

40

【0020】

一態様では、活性化された形態 (F X a) に対するF X の酵素前駆体形態の特異的結合は、発生したF X a に対するF X 結合剤の捕捉を阻止し、それにより酵素前駆体F X との相互作用に利用できるF X 結合剤の量が増加する。さらに、酵素前駆体F X への特異的結合は、F X a 活性 (プロトンピナーゼ複合体の構築との干渉など) に対する潜在的阻害効果を回避する。

【0021】

本明細書に開示されるF X 結合剤は、F X をF I X a によってよりタンパク質分解しやすくする様式でF X に結合することにより、予想外の機能的特性を示す。F I X a による

50

F Xのタンパク質分解の増加が、F XをF I X aによってよりタンパク質分解しやすくし、結果としてより活性化しやすくする様式でのF Xの結合によって達成できることは、発明者らによる驚くべき所見である。当該技術分野では、F XのF X aへの変換のために、F I X aタンパク質分解活性を刺激する抗F I X a化合物の例がある。しかしながら、出願者の知る限りでは、F Xに結合することができ、F XをF I X aによってよりタンパク質分解しやすくすることによりF X活性化を刺激することができる化合物はこれまでに知られていない。

【0022】

本発明の一態様は、抗体またはその抗原結合性断片などのF X結合剤に関し、抗体またはその抗原結合性断片は、F X活性化を刺激することができる。本発明の別の態様は、そのような化合物の特定に関する。

10

【0023】

本発明のさらなる態様は、治療の方法におけるそのようなF X結合剤の使用、場合によっては、ただし独占的ではなく、F V I I I模倣化合物の一部としての使用に関連する。F X活性化の刺激は凝固の刺激に有用であり、したがってそのような分子は、血友病AおよびBを含む血友病などの凝固障害の治療に好適である。

【0024】

配列表の概要

配列番号1 - ヒト第I X因子酵素前駆体

Y N S G K L E E F V	Q G N L E R E C M E	E K C S F E E A R E	V F E N T E R	20
T T E F W K Q Y V D G D Q	C E S N P C L N G G	6 0		
S C K D D I N S Y E	C W C P F G F E G K	N C E L D V T C N I	K N G R C E Q	
F C K N S A D N K V V C S	C T E G Y R L A E N	1 2 0		
Q K S C E P A V P F	P C G R V S V S Q T	S K L T R A E A V F	P D V D Y V N	
S T E A E T I L D N I T Q	S T Q S F N D F T R	1 8 0		
V V G G E D A K P G	Q F P W Q V V L N G	K V D A F C G G S I	V N E K W I V	
T A A H C V E T G V K I T	V V A G E H N I E E	2 4 0		
T E H T E Q K R N V	I R I I P H H N Y N	A A I N K Y N H D I	A L L E L D E	
P L V L N S Y V T P I C I	A D K E Y T N I F L	3 0 0		
K F G S G Y V S G W	G R V F H K G R S A	L V L Q Y L R V P L	V D R A T C L	30
R S T K F T I Y N N M F C	A G F H E G G R D S	3 6 0		
C Q G D S G G P H V	T E V E G T S F L T	G I I S W G E E C A	M K G K Y G I	
Y T K V S R Y V N W I K E	K T K L T			

配列番号2 - ヒト第X因子酵素前駆体

A N S F L E E M K K	G H L E R E C M E E	T C S Y E E A R E V	F E D S D K T	
N E F W N K Y K D G D Q C	E T S P C Q N Q G K	6 0		
C K D G L G E Y T C	T C L E G F E G K N	C E L F T R K L C S	L D N G D C D	
Q F C H E E Q N S V V C S	C A R G Y T L A D N	1 2 0		
G K A C I P T G P Y	P C G K Q T L E R R	K R S V A Q A T S S	S G E A P D S	
I T W K P Y D A A D L D P	T E N P F D L L D F	1 8 0		40
N Q T Q P E R G D N	N L T R I V G G Q E	C K D G E C P W Q A	L L I N E E N	
E G F C G G T I L S E F Y	I L T A A H C L Y Q	2 4 0		
A K R F K V R V G D	R N T E Q E E G G E	A V H E V E V V I K	H N R F T K E	
T Y D F D I A V L R L K T	P I T F R M N V A P	3 0 0		
A C L P E R D W A E	S T L M T Q K T G I	V S G F G R T H E K	G R Q S T R L	
K M L E V P Y V D R N S C	K L S S S F I I T Q	3 6 0		
N M F C A G Y D T K	Q E D A C Q G D S G	G P H V T R F K D T	Y F V T G I V	
S W G E G C A R K G K Y G	I Y T K V T A F L K	4 2 0		
W I D R S M K T R G	L P K A K S H A P E	V I T S S P L K		

下線：活性化ペプチド（a a 143～194）。太字：「C共通最小エピトープ」（a

50

a 177 ~ 178)

配列番号3 - FX上の「共通最少エピトープ」(配列番号2 に太字で示される)

LL

配列番号4 - 重鎖可変ドメインmAb 00916

Q S V E E S G G R L V T P G T P L T L T C T V S G F S L S S Y A M S W V R

Q A P G K G L E W I G I I S T S G S T F Y A T 60

W A K G R F T I S K T S T T V D L K I I S P T I E D T A T Y F C A R D M W

A G S R Y D F N I W G P G T L V T V S S 117

配列番号5 - 軽鎖可変ドメインmAb 00916

A D I V M T Q T P A S V E A A V G G T V T I K C Q A S Q S I S S Y L A W Y

Q Q K P G Q R P K L L I Y R A S T L E S G V P 60

S R F K G S G S G T Q F T L T I S D L E C A D A A T Y Y C Q T Y Y Y S G G

G S Y A S A F G G G T E V V V K 113

配列番号6 - 重鎖可変ドメインmAb 13F62

E V Q L V E S G G G Q V K P G G S L R L S C A A S G F T F S T S S I Y W V

R Q A P G K G L E W V S S I S S G S S Y I F Y 60

A D S V K G R F T I S R D N A K N S L F L Q M N S L R A E D T A V Y Y C V

S G Y S R L L D Y W G Q G T L V T V S S 117

配列番号7 - 軽鎖可変ドメインmAb 13F62

D V V M T Q S P L S L P V T L G Q P A S I S C R S S Q S L V Y S D G N T Y

L N W F Q Q R P G Q S P R R L I Y K V S N R D 60

S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G F Y Y C M Q G T

H W P L T F G G G T K V E I K 112

配列番号8 - Nb 701B09

E V Q L V E S G G G V V Q P G G S L R L S C A A S G R T F S T Y A M G W F R Q A

P G K E R E F V A A I S W S G S R T Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T V Y

L Q M N S L R P E D T A L Y Y C A A D A T P A N G E L D Y W G Q G T L V T V S S

配列番号9 - Nb 701C06

E V Q L V E S G G G V V Q P G G S L R L S C A A S G R T F S T Y A M G W F R Q A

P G K E R E F V A A I S R R G G R T Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T V Y

L Q M N S L R P E D T A L Y Y C A A D A T A R D G L L D Y W G Q G T L V T V S S

配列番号10 - Nb 702C12

E V Q L V E S G G G V V Q P G G S L R L S C V A S G R T F S R Y A M G W F R Q A

P G K E R E F V A A I S R R G G S T N Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T V Y

L Q M N S L R P E D T A L Y Y C A A D Y S S G D G Y L D Y W G Q G T L V T V S S

配列番号11 - Nb 701D07

E V Q L V E S G G G V V Q P G G S L R L S C A A S G G T L S R Y A M G W F R Q A

P G K E R E F V A A I T R R G S R T Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T V Y

L Q M N S L R P E D T A L Y Y C A A D L A P G D Y A L D Y W G Q G T L V T V S S

配列番号12 - Nb 501A02

E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S N Y E M S W V R Q A

P G K G L E W V S D I G S G G G V S T Y Y A D S V K G R F T I S R D N A K N T L

Y L Q M N S L K P E D T A M Y Y C A R G W T Y G S D G M D Y W G K G T L V T V S

S

配列番号13 ~ 53は、実施例5の表5に列挙される配列に対応する。

配列番号54 - Nb 721E08

E V Q L V E S G G G V V Q P G G S L R L S C A A S G R T F S T Y S M G W F R Q A

P G K E R E F V A A I T R R G S R T Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T V Y

L Q M N S L R P E D T A L Y Y C A A D R R P A D S Y L D Y W G Q G T L V T V S S

配列番号55 - Nb 729A04

10

20

30

40

50

EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMSWVRQA
 PGKGLEWVSGITSGGGRTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLY
 LQMNSLRPEDTALYYCAAAVRTLGLRGSYDYWGQGTLVTVS
 S

配列番号 56 - Nb 729C08

EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMSWVRQA
 PGKGLEWVSGITGGGGRTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYL
 QMNSLRPEDTALYYCAAAAILTRTRRTYDYWGQGTLVTVSS

配列番号 57 - Nb 730C03

EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVAVSGFTFSDYAMSWVRQA
 PGKGLEWVSGITSGSGRTYYADSVKGRFTISRDNSaKNTV
 YLQMNSLRPEDTALYYCAAAAILRGYRKTYDYWGQGTLVTV
 SS

10

【0025】

下線の付いた配列が、Kabattナンバリングおよび定義を使用してmAbのCDRを表すのに対し、Nanobodies（登録商標）（Nbs）のCDRは、KontermannおよびDubel（2010, Eds., Antibody Engineering, vol 2, Springer Verlag Heidelberg Berlin, Martin, Chapter 3, pp. 33 - 51）に説明されるようなKabattナンバリングおよびAbM定義を使用して決定される。

20

【発明を実施するための形態】

【0026】

FIXは、第VII因子、プロトロンビン、FX、およびタンパク質Cと構造的に類似したビタミンK依存性凝固因子である。循環する酵素前駆体は、N末端 - カルボキシグルタミン酸リッチ（Gla）ドメイン、2つのEGFドメイン、およびC末端トリプシン様セリンプロテアーゼドメインを含む、4つの異なるドメインに分割された415個のアミノ酸からなる。FIXは、単鎖酵素前駆体（配列番号1）として血漿中で循環する。FIXの活性化は、Arg145およびArg180での限定的タンパク質分解によって生じ、活性化ペプチドを放出する（配列番号1の残基146～180）。したがって、活性化FIX（FIXa）は、配列番号1の残基1～145（軽鎖）および配列番号1の残基181～415（重鎖）から構成される。

30

【0027】

FIXaは、テナーゼ複合体の一部として、凝固中に適切なトリロンビン形成を支持するために必要なFXaのほとんどを生成することにより、止血において重要な役割を果たす、トリプシン様セリンプロテアーゼである。

【0028】

FXは、第VII因子、プロトロンビン、FIX、およびタンパク質Cと構造的に類似したビタミンK依存性凝固因子である。これは、分泌のためにタンパク質を標的とする疎水性シグナル配列を含有するプレプロ配列を用いて合成される。プロペプチドは、 - カルボキシル化をFXの軽鎖に導くために重要である。ヒトFX酵素前駆体は、N末端ガンマカルボキシグルタミン酸リッチ（Gla）ドメイン、2つのEGFドメイン、それぞれEGF1（残基46～82）およびEGF2（残基85～125）、およびC末端トリプシン様セリンプロテアーゼドメイン（残基195～448）を含む、4つの異なるドメインを含む。FXは、配列番号2の残基1～139（軽鎖）および配列番号2の残基143～448（重鎖）を含む、二鎖酵素前駆体として血漿中で循環する。FXの活性化は、Arg194での限定されたタンパク質分解によって生じ、活性化ペプチドの放出をもたらす（残基143～194）。したがって、活性化FX（FXa）は、配列番号2の残基1～139（軽鎖）および配列番号2の残基195～448（活性化重鎖）から構成される。

40

【0029】

50

本明細書で使用される場合、「結合剤」という用語は、その最も広範な意味で理解され、例えば、レクチン、タンパク質、ポリペプチドおよびペプチド、ならびにすべてのFX結合分子または物質を含む。FX結合分子は、例えば、抗体およびその抗原結合性断片（例えば、単一可変ドメイン抗体、Nanobodies（登録商標）、Fab、Fab'₂、Fv、およびscFvなどであるが、それらに限定されない）、アフィボディ、アドネクチン、アンチカリン、DARPin、アビマーを含む。

【0030】

本明細書において使用される場合、「抗体」という用語は、抗原またはその一部分に結合することができる免疫グロブリン配列に由来するタンパク質を指す。抗体という用語は、任意のクラス（またはアイソタイプ）、すなわち、IgA、IgD、IgE、IgG、IgM、および/またはIgYの全長抗体を含むが、これらに限定されない。抗原、またはその断片に特異的に結合する抗体は、その抗原、またはその一部もしくは断片に排他的に結合し得るか、または限られた数の相同抗原に結合し得る。通常、単純な用語「結合」または「に結合」が使用され、抗体またはその断片の結合が「特異的」結合であることが一般的に理解される。エピトープが相同抗原間で共有される場合、抗体がさらにそのような高度に相同な抗原に結合し得ることは論理的である。抗体という用語は、多価、例えば、二重特異性抗体などの二価である抗体を含む。

【0031】

天然全長抗体は、少なくとも4つのポリペプチド鎖：ジスルフィド結合によって結合される2つの重鎖（HC）および2つの軽鎖（LC）を含む。いくつかの場合では、天然抗体は、軟骨魚綱に見られるIgNARの場合のように、4つ未満の鎖を含む。特定の薬学的な利益がある免疫グロブリンの1つのクラスはIgGである。ヒトにおいて、IgGクラスは、それらの重鎖定常領域の配列に基づいて、4つのサブクラスであるIgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4に分類され得る。軽鎖は、それらの配列組成物の差異に基づいて、カッパ鎖およびラムダ鎖の2種類に分類することができる。IgG分子は、2つ以上のジスルフィド結合によって連結された2つの重鎖、および各々がジスルフィド結合によって重鎖に結合した2つの軽鎖から構成されている。IgG重鎖は、重鎖可変ドメイン（V_H）および最大3つの重鎖定常（C_H）ドメイン：C_H1、C_H2、およびC_H3を含み得る。軽鎖は、軽鎖可変ドメイン（V_L）および軽鎖定常ドメイン（C_L）を含み得る。V_HおよびV_Lドメインは、フレームワーク領域（FR）と呼ばれるより保護された領域が点在する、相補性決定領域（CDR）または超可変領域（HVR）と呼ばれる超可変性の領域へとさらに細分化することができる。V_HおよびV_Lドメインは、典型的に3つのCDRおよび4つのFRから構成され、アミノ末端からカルボキシ末端まで以下の順序で配置される：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。超可変領域（CDR）を含有する重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインは、抗原と相互作用することができる構造を形成する一方で、抗体の定常領域は、免疫グロブリンの宿主組織または因子への結合を媒介し得る。この宿主組織または因子には、免疫系の様々な細胞（エフェクター細胞）、Fc受容体、および第1の構成成分である、古典的補体系のC1複合体のC1qなどが含まれるが、これらに限定されない。

【0032】

本発明の抗体は、単一B細胞からまたはB細胞のクローン集団によって発現される一連のユニークな重鎖可変ドメイン配列および軽鎖可変ドメイン配列を表すという意味で、モノクローナル抗体（mAbs）であり得る。本発明の抗体は、当業者に既知の様々な方法を使用して生成および精製され得る。例えば、抗体はハイブリドーマ細胞から生成され得る。抗体は、B細胞増殖によって生成され得る。抗体またはその断片は、哺乳類または微生物の発現系において、またはインビトロ翻訳によって、組み換え発現され得る。また、抗体またはその断片は、例えば、ファージディスプレイ、細菌表示、酵母表示、哺乳類細胞表示、またはリボソームもしくはmRNA表示によって、細胞表面結合分子として組み換え発現され得る。

【0033】

本発明の抗体は単離されてもよい。「単離抗体」という用語は、それが生成された環境中の他の（別の）構成成分（複数可）から分離および／もしくは回収されている抗体、ならびに／またはそれが生成された環境中に存在する構成成分の混合物から精製されている抗体を指す。

【0034】

抗体のある特定の抗原結合性断片は、抗体の抗原結合機能が全長抗体の断片によって実施され得ることが示されているため、本発明の文脈において好適であり得る。抗体の「抗原結合性断片」という用語は、本明細書に説明されるように、F Xまたは別の標的分子などの抗原に結合するか、またはこれらの抗原を認識する能力を保持する抗体の1つ以上の断片を指す。抗原結合性断片の例には、F a b、F a b'、F a b₂、F a b'₂、F v（典型的には、抗体の単一アームのV_LドメインおよびV_Hドメインの組み合わせ）、単鎖F v（s c F v）（例えば、Birdら、Science 1988；242：423-426、およびHustonら、PNAS 1988；85：5879-5883を参照されたい）、d S f v、F d（典型的には、V_HおよびC_H1ドメイン）、単一のV_Hおよび単一のV_L鎖を含む一価分子、ミニボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、およびカップボディ（例えば、Illら、(1997) Protein Eng 10：949-57を参照されたい）、ならびに1つ以上の単離されたC D Rまたは機能的パラトープが含まれ（ただしこれらに限定されない）、単離されたC D Rまたは抗原結合残基もしくはポリペプチドを、関連付けるかまたは一緒に結合して、機能性抗体断片を形成することができる。これらの抗体断片は、当業者に既知の従来の技法を使用して得てもよく、断片は、インタクト抗体と同一の様式で有用性についてスクリーニングされ得る。

【0035】

「F a b」および「F a b'₂」断片を含む、抗体の「F a b断片」は、抗体の重鎖を接続するヒンジシステイン残基のN末端またはC末端上のヒンジ領域における重鎖の開裂によって、該抗体から派生し得る。「F a b」断片は、軽鎖の可変ドメインおよび定常ドメイン、ならびに重鎖の可変ドメインおよびC_H1ドメインを含む。「F a b'₂」断片は、それらのヒンジシステインによって一般に共有結合された一对の「F a b」断片を含む。F a b'は、形式的には、F a b'₂での重鎖を接続するヒンジジスルフィド結合の開裂によって、F a b'₂断片から派生する。抗体断片のジスルフィド結合以外の他の化学的結合も当該技術分野で既知である。F a b断片は、潜在的に低親和性で、その抗原に結合する親抗体の能力を保持する。F a b'₂断片が二価の結合をすることができる一方、F a b断片およびF a b'断片は一価で結合することができる。一般に、F a b断片は、定常C_H2ドメインおよびC_H3ドメイン、すなわちF c受容体とC1qとの相互作用が発生することになるF c部が欠如している。したがって、F a b断片は一般にエフェクター機能を欠いている。F a b断片は、例えば、F a bを得るためにパバインを使用するか、またはF a b'₂を得るためにペプシンを使用するかのいずれかの抗体の酵素開裂により、当該技術分野で既知の方法によって生成され得、F a b、F a b'、F a b'₂を含むF a b断片は、当業者には周知の技法を使用して組み換えで生成され得る。

【0036】

「F v」（断片可変）断片は、完全な抗原認識および結合部位を含有する抗体断片であり、一般に、例えば、単鎖可変ドメイン断片（s c F v）において、自然に共有結合することに関連して、1つの重鎖および1つの軽鎖可変ドメインの二量体を含む。この構成では、各可変ドメインの3つの超可変領域が相互作用して、V_H-V_L二量体の表面上に抗原結合部位を画定する。集合的に、6つの超可変領域またはそのサブセットは、抗体に抗原結合特異性を付与する。

【0037】

「単鎖F v」または「s c F v」抗体は、抗体のV_HドメインおよびV_Lドメインを含み、これらのドメインは単一ポリペプチド鎖中に存在する。一般に、F vポリペプチドは、V_HドメインとV_Lドメインとの間にポリペプチドリッカーをさらに含み、s c F vが

抗原結合のための所望の構造を形成することを可能にする。s c F v のレビューについては、Pluckthun, 1994, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol. 113, Rosenburg および Moore 編, Springer-Verlag, New York, pp. 269 - 315 を参照されたい。

【0038】

「単鎖 Fab」または「s c Fab」抗体は、抗体の V_H 、 C_H1 、 V_L および C_L ドメインを含み、これらのドメインは単一ポリペプチド鎖中に存在する。一般に、Fab ポリペプチドは、s c Fab が抗原結合のための望ましい構造を形成することを可能にする、 V_H ドメインと C_L ドメインとの間、または V_L ドメインと C_H1 ドメインとの間のいずれかのポリペプチドリンカーをさらに含む (Koerber ら、(2015) J Mol Biol. 427: 576 - 86)。

【0039】

「ダイアボディ」という用語は、2つの抗原結合部位を有する小さな抗体断片を指し、ここで断片は、同一のポリペプチド鎖 (V_H および V_L) 内で軽鎖可変ドメイン (V_L) に接続されている重鎖可変ドメイン (V_H) を含む。同一の鎖上の2つの可変ドメイン間のペアリングを可能にするには短すぎるリンカーを使用することによって、可変ドメインは、別の鎖の相補的ドメインと強制的にペアリングされ、2つの抗原結合部位を作製する。

【0040】

「線形抗体」という表現は、Zapata ら、(1995) Protein Eng. 8: 1057 - 1062 に説明されるような抗体を指す。簡潔に述べると、これらの抗体は、相補的軽鎖ポリペプチドと共に、一对の抗原結合領域を形成する、一对のタンデム Fd セグメント ($V_H - C_H1 - V_H - C_H1$) を含有する。線形抗体は、二重特異性または単一特異性であり得る。

【0041】

抗体断片は、従来の組み換え技法またはタンパク質操作技法を使用して得られる場合があり、断片は、インタクト抗体と同一の様式で Fx などの抗原への結合についてスクリーニングすることができる。

【0042】

本発明の抗体断片は、切頭によって、例えば、ポリペプチドの N 末端および / または C 末端からの 1 つ以上のアミノ酸の除去によって、作製され得る。また、断片は、1 つ以上の内部欠失によって生成され得る。

【0043】

本発明の抗体は、抗体の断片、もしくは本明細書に開示される抗体のうちのいずれか 1 つの変異体であり得るか、またはそれを含み得る。本発明の抗体は、これらの抗体のうちの 1 つの抗原結合部分、もしくはその変異体であり得るか、またはそれを含み得る。例えば、本発明の抗体は、これらの抗体のうちの 1 つの Fab 断片、もしくはその変異体であり得、またはこれらの抗体のうちの 1 つに由来する単鎖抗体、もしくはその変異体であり得る。また、本発明の抗体は、全長抗体およびその断片の組み合わせであり得る。

【0044】

しかしながら、抗原に特異的な 3 つの高可変領域のみを含む単一の可変ドメインでさえ、通常は結合部位全体よりも低い親和性ではあるが、抗原を認識し高い親和性で結合する能力を保持することができる (Cai および Garen (1996) PNAS 93: 6280 - 6285)。重鎖可変ドメインのみを有する自然発生的なラクダ科抗体 ($V_H H$) は、抗原に結合することができる (Desmyter ら、(2002) J. Biol. Chem. 277: 23645 - 23650、Bond ら、(2003) J. Mol. Biol. 332: 643 - 655)。IgNAR (または V_{NAR}) と同様に、軟骨魚類から単一ドメイン抗体結合領域が提供される。代替物は、骨格としてヒト第 10 フィブロネクチン FN3 ドメイン (10FN3 ドメイン) を使用する Creative Bio

10

20

30

40

50

l a b s によって提供される。そのような抗体分子は、単一可変ドメイン、免疫グロブリン単一可変ドメイン、または単一可変ドメイン断片と呼ばれる。分子は単量体であり、典型的には 12 ~ 15 k D a のサイズである。

【 0 0 4 5 】

特に、免疫グロブリン単一可変ドメインまたは単一可変ドメインは、（本明細書で定義されるような）N a n o b o d y（登録商標）またはその好適な断片であり得る。N a n o b o d i e s（登録商標）の概説については、W O 2 0 0 8 / 0 2 0 0 7 9（16 ページ）などを参照する。

【 0 0 4 6 】

「単一可変ドメイン」と交換可能に使用される「免疫グロブリン単一可変ドメイン」という用語は、抗原結合部位が存在し、単一免疫グロブリンドメインによって形成される分子を定義する。これにより、免疫グロブリン単一可変ドメインは、「従来型」免疫グロブリンまたはそれらの断片（例えば、F a b、s c F v など）から離れて設定されるが、上記のように、2つの免疫グロブリンドメイン、特に2つの可変ドメイン（重鎖可変ドメイン（ V_H ）および軽鎖可変ドメイン（ V_L ）は、相互作用して抗原結合部位を形成する。対照的に、免疫グロブリン単一可変ドメインの結合部位は、単一の V_H または V_L ドメインによって形成される。したがって、免疫グロブリン単一可変ドメインの抗原結合部位は、3個以下の C D R によって形成される。

【 0 0 4 7 】

したがって、「免疫グロブリン単一可変ドメイン」および「単一可変ドメイン」という用語は、抗原結合部位の形成のために少なくとも2つの可変ドメインとの相互作用を必要とする、従来型免疫グロブリンまたはそれらの断片を含まない。しかしながら、これらの用語は、従来型免疫グロブリンの断片を含み、ここで抗原結合部位は単一可変ドメインによって形成される。

【 0 0 4 8 】

一般的に、単一可変ドメインは、4つのフレームワーク領域（それぞれ、F R 1 ~ F R 4）および3つの相補性決定領域（それぞれ、C D R 1 ~ C D R 3）から実質的になるポリペプチド配列、またはそのようなポリペプチド配列の好適な断片（通常、C D R の少なくとも1つを形成するアミノ酸残基の少なくとも一部を含有する）である。免疫グロブリン配列、特にN a n o b o d y（登録商標）などの免疫グロブリン単一可変ドメインのアミノ酸配列および構造は、それらに限定されるものではないが、当該技術分野および本明細書において「フレームワーク領域1」もしくは「F R 1」、「フレームワーク領域2」もしくは「F R 2」、「フレームワーク領域3」もしくは「F R 3」、および「フレームワーク領域4」もしくは「F R 4」とそれぞれ呼ばれている4つのフレームワーク領域または「F R」からなり、フレームワーク領域は、当該技術分野において「相補性決定領域1」もしくは「C D R 1」、「相補性決定領域2」もしくは「C D R 2」、および「相補性決定領域3」もしくは「C D R 3」とそれぞれ呼ばれている3つの相補性決定領域または「C D R」によって分断されていると考えることができる。

【 0 0 4 9 】

免疫グロブリン単一可変ドメインの全長は、通常、例えば110 ~ 120個のアミノ酸残基の領域におけるN a n o b o d y（登録商標）については、好ましくは112 ~ 115個、最も好ましくは113個のアミノ酸残基である。

【 0 0 5 0 】

そのような単一可変ドメインおよび断片は、免疫グロブリンフォールドを含むか、または好適な条件下で、免疫グロブリンフォールドを形成することができるため、最も好ましい。そのため、単一可変ドメインは、単一抗原結合ユニット（すなわち、例えば、別の可変ドメインと（例えば、 V_H / V_L 相互作用を介して）相互作用して機能性抗原結合ドメインを形成する必要がある、従来型の抗体およびs c F v フラグメントに存在する可変ドメインについての場合のように、単一抗原結合ドメインが別の可変ドメインと相互作用して機能性抗原結合ユニットを形成する必要があるような、単一可変ドメインから本質的に

なる機能性抗原結合ユニット)を形成することができる限り、例えば、軽鎖可変ドメイン配列(例えば、 V_L 配列)もしくはその好適な断片、または重鎖可変ドメイン配列(例えば、 V_H 配列もしくは $V_H H$ 配列)もしくはその好適な断片を含んでもよい。

【0051】

本発明の一実施形態では、免疫グロブリン単一可変ドメインは、軽鎖可変ドメイン配列(例えば、 V_L 配列)、または重鎖可変ドメイン配列(例えば、 V_H 配列)であり、より具体的には、免疫グロブリン単一可変ドメインは、従来型4鎖抗体に由来する重鎖可変ドメイン配列、または重鎖抗体に由来する重鎖可変ドメイン配列であり得る。

【0052】

例えば、単一可変ドメインまたは免疫グロブリン単一可変ドメイン(または免疫グロブリン単一可変ドメインとしての使用に好適なアミノ酸配列)は、(単一)ドメイン抗体、「dAb」もしくは「sdAb」またはNanobody(登録商標)($V_H H$ 、ヒト化 $V_H H$ 、またはラクダ化 V_H ドメインを含むがこれらに限定されない)、その他の単一可変ドメイン、またはそれらのうちのいずれか1つの好適な断片として言及され得る。(単一)ドメイン抗体の概説については、EP0368684なども参照する。「dAb」という用語については、例えば、Wardら、1989(Nature 341:544)、Holtら、2003(Trends Biotechnol. 21:484)、ならびにDomantis Ltd.の、例えば、WO2004/068820、WO2006/030220、WO2006/003388他の、公開された特許出願を参照する。

【0053】

したがって、本発明の意味では、「免疫グロブリン単一可変ドメイン」または「単一可変ドメイン」という用語は、非ヒト源、好ましくはラクダ科、好ましくはラクダ科重鎖抗体由来のポリペプチドを含む(例えば、 $V_H H_s$)。それらはヒト化されてもよい(例えば、ヒト化 $V_H H_s$)。さらに、用語は、例えば、マウスまたはヒトなどの非ラクダ科源由来のポリペプチドを含み、これらは、例えば、DaviesおよびRiechmann、1994(FEBS 339:285)、1995(Biotechnol. 13:475)および1996(Prot. Eng. 9:531)、ならびにRiechmann およびMuyldermans、1999(J. Immunol. Methods 231:25)に説明されるように、「ラクダ化」されている(例えば、ラクダ化 V_H ドメイン)。

本明細書で使用される場合、「単一特異性」抗体という用語は、1つの特定のエピトープ(二価の抗体を含むがこれらに限定されない)に結合することができる抗体を指す。

【0054】

本明細書で使用される場合、「二重特異性」抗体という用語は、2つの異なる抗原または同一の抗原上の2つの異なるエピトープに結合することができる抗体を指す。

【0055】

本明細書で使用される場合、「三重特異性」抗体という用語は、3つの異なる抗原、または同一の抗原上の3つの異なるエピトープ、または2つの異なる抗原上に存在する3つの異なるエピトープに結合することができる抗体を指す。

【0056】

本明細書で使用される場合、「多重特異性」抗体という用語は、2つ以上の異なる抗原または同一の抗原上の2つ以上の異なるエピトープに結合することができる抗体を指す。したがって、多重特異性抗体は、二重特異性抗体および三重特異性抗体を含む。

【0057】

全長IgG型の二重特異性抗体は、2つの個別ハイブリドーマの融合によって生成され、二重特異性ヘテロ二量体化抗体の断片を含む抗体の混合物を生成する、ハイブリッドクアドローマを形成することができる(Cheilius D.ら、MAbs. 2010 May-Jun; 2(3):309-319)。二重特異性ヘテロ二量体化抗体は、代替的に、組み換え技術を使用することにより生成され得る。また、ヘテロ二量体化は、Fc領域の二量体化インターフェースを操作してヘテロ二量体化を促進することによって達成す

ることにもできる。この一例は、いわゆるノブインホール変異であり、立体的に嵩高い側鎖（ノブ）が、対向するFc上の立体的に小さい側鎖（ホール）に一致する1つのFcに導入され、それによってヘテロ二量体化を促進する立体的相補性を作製する。操作されたヘテロ二量体化Fcインターフェースの他の方法は、静電相補性、非IgGヘテロ二量体化ドメインへの融合、またはヘテロ二量化を制御するためのヒトIgG4の天然Fabアーム交換現象の利用である。ヘテロ二量体化二重特異性抗体の例は、文献、例えば、(Klein C.ら、Mabs. 2012 Nov - Dec; 4(6): 653 - 663)に詳しく説明されている。ヘテロ二量体抗体の軽鎖には、特別な注意を払う必要がある。LCとHCとの正しいペアリングは、共通の軽鎖の使用によって達成することができる。この場合も、LC/HCインターフェースの操作を使用して、Cross Mabの場合のように、ヘテロ二量体化または軽鎖クロスオーバー操作を促進することができる。適切な変異を含有する2つの個別のIgGからの穏やかな還元条件下での抗体のインビトロ再構築を使用して、二重特異性を生成することもできる（例えば、Labrijnら、PNAS, 110, 5145 - 5150 (2013)）。また、正しい軽鎖のペアリングを確実にするための、天然Fabアーム交換方法も報告されている。

10

20

30

40

50

【0058】

多重特異性抗体ベースの分子はまた、IgGの天然モジュールを組み合わせた融合タンパク質として組み換え発現され、文献に説明されるような多重特異性および多価抗体誘導体を形成し得る。融合抗体の例は、DVD-Ig、IgG-scFV、ダイアボディ、DARTなどである。特定の検出タグまたは精製タグ、半減期延長部分またはその他の構成要素を、融合タンパク質に組み込むことができる。追加的な非IgGモダリティーもまた融合タンパク質に組み込まれ得る。Fcヘテロ二量化に基づく二重特異性全長抗体は、LCペアリング法に関わらず、一般的に非対称IgGと呼ばれる。一般的に、二重特異性抗体は、Brinkmannらによって概説された様々な分子形式で生成され得る (Brinkmannら、The making of bispecific antibodies. Mabs 9, 182 - 212 (2017))。

【0059】

多重特異性抗体ベースの分子はまた、文献に説明されるように、個別の全長IgGの化学結合もしくはカップリング、またはIgG断片のカップリングによっても生成され、多重特異性抗体誘導体および多価抗体誘導体を形成し得る。融合抗体の例には、化学結合型Fab₂、IgG二量体などが挙げられる。特定の検出タグまたは精製タグ、半減期延長分子またはその他の構成要素を、複合体タンパク質に組み込むことができる。追加的な非IgGポリペプチドもまた融合タンパク質に組み込まれ得る。多重特異性分子は、上述のものを含む組み換え型および化学的方法を組み合わせることによっても生成され得る。

【0060】

本明細書に開示される抗FX抗体またはその抗原結合性断片は、多重特異性血液凝固促進抗体の一部として使用することができる。したがって、本発明の一態様は、二重特異性血液凝固促進抗体などの多重特異性血液凝固促進抗体における使用に好適な、個別の構成要素（中間体）抗FX抗体またはその抗原結合性断片に関する。一態様では、そのような二重特異性（または多重特異性）抗体は、FIXおよび/またはその活性化形態であるFIXa、およびFXに結合することができる。

【0061】

一態様では、本発明の抗体は、キメラ抗体、ヒト抗体、またはヒト化抗体である。そのような抗体は、例えば、好適な抗体表示または免疫化プラットフォーム、または当該分野で既知のその他の好適なプラットフォームまたは方法を使用することによって生成することができる。本明細書で使用される場合、「ヒト抗体」という用語は、フレームワーク領域の少なくとも一部分および/またはCDRの少なくとも一部分が、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する、可変ドメインを有する抗体を含むことが意図される。（例えば、ヒト抗体は、フレームワークおよびCDRの両方がヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する、可変ドメインを有し得る。）さらに、抗体が定常領域を含有する場合、定常領

域またはその一部分もまた、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する。本発明のヒト抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基を含んでもよい（例えば、インビトロでの無作為もしくは部位特異的変異誘発、またはインビボでの体細胞変異によって導入された変異）。

【0062】

一態様では、そのようなヒト抗体は、ヒトモノクローナル抗体である。そのようなヒトモノクローナル抗体は、遺伝子導入非ヒト動物（例えば、不死化細胞に融合されたヒト免疫グロブリン重鎖および軽鎖の遺伝子セグメントレパートリーを含むゲノムを有する遺伝子導入マウス）から得られたB細胞を含むハイブリドーマによって生成され得る。

【0063】

ヒト抗体は、ヒト生殖系列配列の選択に基づいて構築された配列ライブラリから単離されてもよく、天然および合成の配列多様性でさらに多様化されている。

【0064】

ヒト抗体は、ヒトリンパ球のインビトロでの免疫化に続いて、リンパ球のエプスタイン・バーウイルスでの形質転換によって調製され得る。

【0065】

「ヒト抗体誘導体」という用語は、抗体と別の化合物または抗体との複合体など、ヒト抗体の任意の修飾形態を指す。

【0066】

本明細書で使用される場合、「ヒト化抗体」という用語は、非ヒト免疫グロブリンに由来する配列（CDRまたはその部分）を含有するヒト/非ヒトキメラ抗体を指す。したがって、ヒト化抗体は、ヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）であり、少なくともレシピエントの超可変領域からの残基が、所望の特異性、親和性、配列組成および機能性を有するマウス、ラット、ウサギまたは非ヒト霊長類など非ヒト種（ドナー抗体）からの抗体の超可変領域からの残基によって置換される。いくつかの事例では、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク（FR）残基は、対応する非ヒト残基によって置換される。そのような修飾の例は、1つ以上のいわゆる逆突然変異の導入であり、これは典型的にはドナー抗体に由来するアミノ酸残基である。抗体のヒト化は、当業者に既知の組み換え技法を使用して実施されてもよい（例えば、Antibody Engineering, Methods in Molecular Biology, vol. 248, Benny K. Lo編を参照されたい）。軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインの両方に対する好適なヒトレシピエントフレームワークは、例えば、配列または構造相同性によって特定され得る。代替的に、例えば、構造、生物物理学特性および生化学特性の知識に基づいて、固定レシピエントフレームワークを使用してもよい。レシピエントフレームワークは、生殖系列由来または成熟抗体配列由来であり得る。ドナー抗体からのCDRは、CDR移植によって移植することができる。CDR移植ヒト化抗体は、ドナー抗体からのアミノ酸残基の再導入（逆突然変異）がヒト化抗体の特性に有益な影響を与える重要なフレームワーク位置の特定により、例えば、親和性、機能性、および生物物理学特性をさらに最適化することができる。ドナー抗体由来の逆突然変異に加えて、ヒト化抗体を、CDRまたはフレームワーク領域への生殖系列残基の導入、免疫原性エピトープの除去、部位特異的変異誘発、または親和性成熟などによって操作することができる。

【0067】

さらなる態様では、ヒト化抗体は、レシピエント抗体においても、またはドナー抗体においても見られない、残基を含む。これらの修飾は、抗体性能をさらに精緻化するためになされる。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインを含み、その中ですべてのまたは実質的にすべてのCDRが、非ヒト免疫グロブリンのものと対応し、その中ですべてのまたは実質的にすべてのFR残基が、ヒト免疫グロブリン配列のものである。ヒト化抗体はまた、任意に、免疫グロブリン定常領域（Fc）の少なくとも一部分、典型的にはヒト免疫グロブリンの部分も含むことができる。

【0068】

10

20

30

40

50

「ヒト化抗体誘導体」という用語は、抗体と化学的化合物との複合体、または抗体と別の抗体との複合体など、ヒト化抗体の任意の修飾形態を指す。

【0069】

「キメラ抗体」という用語は、本明細書で使用される場合、2種以上の種に由来する抗体の部分を含む抗体を指す。例えば、そのような抗体をコードする遺伝子は、可変ドメインをコードする遺伝子、および2つの異なる種から生じた定常領域をコードする遺伝子を含む。例えば、マウスモノクローナル抗体の可変セグメントをコードする遺伝子は、ヒト起源の抗体の定常領域をコードする遺伝子に結合されてもよい。

【0070】

抗体の断片結晶可能領域（「Fc領域」/「Fcドメイン」）は、抗体のC末端領域であり、これはヒンジおよび定常C_H2およびC_H3ドメインを含む。Fcドメインは、Fc受容体と呼ばれる細胞表面受容体、ならびに補体系のいくつかのタンパク質と相互作用する場合がある。Fc領域は、抗体が免疫系と相互作用することを可能にする。本発明の一態様では、抗体は、とりわけ血清半減期、補体固定、Fc受容体結合、タンパク質の安定性、および/または抗原依存性細胞障害活性、またはそれらの欠如など、典型的にはその機能特性の1つ以上を変更するために、Fc領域内に修飾を含むように操作され得る。さらに、本発明の抗体は、ここでもまた、抗体の機能的特性の1つ以上を変更するために、化学的に修飾されるか（例えば、1つ以上の化学的部分を抗体に取り付けることができる）、またはそのグリコシル化を変更するために修飾され得る。IgG1抗体は、ある特定のFcガンマ受容体（L234A、L235E、およびG237A）への親和性の低下、およびC1q介在性補体固定（A330SおよびP331S）（EU指標による残基ナンバリング）の減少を、それぞれ結果として生じるであろう、1つ以上の、およびおそらくすべての以下の突然変異を含む、修飾Fcドメインを担持し得る。

10

20

【0071】

本発明の抗体のアイソタイプは、IgG、例えばIgG1、例えばIgG2、例えばIgG4であり得る。所望であれば、抗体のクラスは、既知の技法によって「スイッチ」されてもよい。例えば、元々IgM分子として生成された抗体は、IgG抗体にクラススイッチされる場合がある。クラススイッチング技法は、例えば、IgG1からIgG2もしくはIgG4へ、IgG2からIgG1もしくはIgG4へ、またはIgG4からIgG1もしくはIgG2へと、あるIgGサブクラスを別のサブクラスに変換するためにも使用され得る。異なるIgGサブクラスからの領域の組み合わせによって、定常領域キメラ分子を生成する抗体の操作を実施することもできる。

30

【0072】

一実施形態では、C_H1のヒンジ領域は、ヒンジ領域内のシステイン残基の数が増加するように、例えば、増加または減少するように修飾される。このアプローチは、例えば、Bodmerらによる米国特許第5,677,425号にさらに説明されている。

【0073】

定常領域は、抗体を安定化させるように、例えば、二価の抗体が2つの一価のVH-VL断片に分離するリスクを低減させるように修飾され得る。例えば、IgG4定常領域では、残基S228（EUNanバリング指数およびKabatatによるS241による）は、ヒンジにおける重鎖間ジスルフィド架橋形成を安定化するためのプロリン（P）残基に変異してもよい（例えば、Angalら、Mol Immunol. 1993; 30: 105-8を参照されたい）。

40

【0074】

抗体またはその断片は、それらの相補性決定領域（CDR）の観点から画定され得る。「相補性決定領域」または「超可変領域」という用語は、本明細書で使用される場合、抗原結合に関与するアミノ酸残基が位置する抗体の領域を指す。超可変性の領域またはCDRは、抗体可変ドメインのアミノ酸アライメントの最も高い可変性を有する領域として特定することができる。データベースは、KabatatデータベースなどのCDR識別に使用でき、このCDRは、例えば、軽鎖可変ドメインのアミノ酸残基24~34（L1）、5

50

0 ~ 56 (L2)、および89 ~ 97 (L3)、ならびに重鎖可変ドメインの31 ~ 35 (H1)、50 ~ 65 (H2)、および95 ~ 102 (H3)を含むものとして定義されている (Kabatら、1991; Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、U.S. Department of Health and Human Services、NIH公開番号91 ~ 3242)。代替的には、CDRは、「超可変ループ」からのこれらの残基として定義され得る (軽鎖可変ドメインの残基26 ~ 33 (L1)、50 ~ 52 (L2)、および91 ~ 96 (L3)、ならびに重鎖可変ドメインの26 ~ 32 (H1)、53 ~ 55 (H2)、および96 ~ 101 (H3); ChothiaおよびLesk、J. Mol. Biol. 1987; 196: 901 - 917)。典型的には、この領域におけるアミノ酸残基のナンバリングは、上述のKabatらに説明される方法によって実施される。本明細書において、「Kabat位置」、「Kabat残基」、および「Kabatによれば」などの語句は、重鎖可変ドメインまたは軽鎖可変ドメインのためのこのナンバリングシステムを指す。Kabatナンバリングシステムを使用すると、ペプチドの実線形アミノ酸配列は、可変ドメインのフレームワーク (FR) もしくはCDRの短縮化、またはそれらへの挿入に対応する、より少ないか、または追加のアミノ酸を含有し得る。例えば、重鎖可変ドメインは、CDR H2の残基52の後のアミノ酸挿入 (Kabatによる、残基52a、52b、および52c)、および重鎖FR残基82の後に挿入された残基 (例えば、Kabatによる、残基82a、82b、および82cなど) を含み得る。残基のKabatナンバリングは、抗体の配列と「標準」Kabatナンバリング配列との相同性領域でのアライメントにより、所与の抗体について決定され得る。

【0075】

V_HHドメインのアミノ酸残基は、例えば、RiechmannおよびMuyldermans (1999, J. Immunol. Methods 231: 25 - 38) の図2に示されるように、ラクダ科からのV_HHドメインに適用される、Kabatらにより与えられるV_Hドメインの一般的なナンバリングに従ってナンバリングされてもよい。類似の方法でV_HHドメインにも適用することができる、VHドメインのアミノ酸残基をナンバリングするための代替方法は、当該技術分野において既知である。CDRの決定は、異なる方法によっても行われ得る。KabatによるCDR決定において、V_HHのFR1は、位置1 ~ 30のアミノ酸残基を含み、V_HHのCDR1は、位置31 ~ 35のアミノ酸残基を含み、V_HHのFR2は、位置36 ~ 49のアミノ酸を含み、V_HHのCDR2は、位置50 ~ 65のアミノ酸残基を含み、V_HHのFR3は、位置66 ~ 94のアミノ酸残基を含み、V_HHのCDR3は、位置95 ~ 102のアミノ酸残基を含み、V_HHのFR4は、位置103 ~ 113のアミノ酸残基を含む。

【0076】

本文書において、単一可変ドメイン抗体 (Nanobodies (登録商標)) のCDR配列は、KontermannおよびDubel (2010, Eds., Antibody Engineering, vol 2, Springer Verlag Heidelberg Berlin, Martin, Chapter 3, pp. 33 - 51) によるAbM定義を使用して決定される。この方法によれば、FR1は、位置1 ~ 25のアミノ酸残基を含み、CDR1は、位置26 ~ 35のアミノ酸残基を含み、FR2は、位置36 ~ 49のアミノ酸を含み、CDR2は、位置50 ~ 58のアミノ酸残基を含み、FR3は、位置59 ~ 94のアミノ酸残基を含み、CDR3は、位置95 ~ 102のアミノ酸残基を含み、FR4は、位置103 ~ 113のアミノ酸残基を含む (Kabatナンバリングによる)。

【0077】

本文書において、IgG抗体 (全長IgG抗体およびそのFab断片を含む) のCDR配列は、KontermannおよびDubel (2010, Eds., Antibody Engineering, vol 2, Springer Verlag Heidelberg Berlin, Martin, Chapter 3, pp. 33 - 51)

による K a b a t 定義を使用して決定される。この方法によると、軽鎖可変ドメインの C D R は、位置 2 4 ~ 3 4 (C D R 1)、位置 5 0 ~ 5 6 (C D R 2)、および位置 8 9 ~ 9 7 (C D R 3) として定義され、一方、重鎖可変ドメインの C D R は、位置 3 1 ~ 3 5 (C D R 1)、位置 5 0 ~ 6 5 (C D R 2)、位置 9 5 ~ 1 0 2 (C D R 3) として定義される。

【 0 0 7 8 】

「フレームワーク領域」または「F R」残基という用語は、本明細書に定義されるように、C D R 内ではないこれらの V_H または V_L アミノ酸残基を指す。

【 0 0 7 9 】

一実施形態では、本発明の抗体またはその抗原結合性断片は、本明細書に開示される特定の抗体のうちの 1 つ以上からの C D R を含み得る。

10

【 0 0 8 0 】

「血液凝固促進抗体」という用語は、例えば、血液凝固のプロセスを加速することによって、および / または 1 つ以上の凝固因子の酵素活性を増加させることによって、血液凝固を増強する抗体を指す。

【 0 0 8 1 】

「血液凝固促進活性」という用語は、例えば、血液凝固のプロセスを加速することによって、および / または 1 つ以上の凝固因子の酵素活性を増加させることによって、血液凝固を増強する抗体などの化合物の能力を指す。

【 0 0 8 2 】

V_H ドメインおよび V_H H ドメインについて、当該技術分野において周知であるように、各 C D R 中のアミノ酸残基の総数は異なる場合があり、K a b a t ナンバリングによって示されるアミノ酸残基の総数に対応していない場合がある (つまり、K a b a t ナンバリングによる 1 つ以上の位置が、実際の配列中に占拠していない場合がある、または実際の配列が、K a b a t ナンバリングにより許容される数よりも多いアミノ酸残基を含有する場合がある) ことに留意されたい。つまり、概して、K a b a t によるナンバリングは、実際の配列におけるアミノ酸残基の実際のナンバリングに対応しているか、または対応していない場合があることを意味する。V_H ドメインおよび V_H H ドメインにおけるアミノ酸残基の総数は、通常 1 1 0 ~ 1 2 0 の範囲内であり、1 1 2 ~ 1 1 5 の範囲であることが多い。しかしながら、より小さくより長い配列が、本明細書に説明される目的に好適である場合もあることに留意されたい。本発明の抗体は、本明細書に開示される特定の抗体のうちの 1 つ以上からの C D R を含み得る。

20

30

【 0 0 8 3 】

「抗原」(A g) という用語は、A g を認識する抗体 (A b) を生成するために、免疫応答性の脊椎動物の免疫化のために使用される分子実体を指す。本明細書において、A g はより広範に称され、かつ A b によって特異的に認識される標的分子を含むことが一般に意図されており、したがって、A b を生成するために使用される、免疫化プロセス、または、例えば、ファージディスプレイなどの他のプロセスにおいて使用される分子の断片または模倣物を含む。

【 0 0 8 4 】

本明細書で使用される場合、「エピトープ」という用語は、抗体 (A b) およびその対応する抗原 (A g) などの「抗原結合ポリペプチド」間の分子相互作用の文脈において定義される。一般に、「エピトープ」は、A b が特異的に結合する A g 上の区域または領域、すなわち A b と物理的接触する区域または領域を指す。物理的接触は、A b 分子および A g 分子内の原子に対する、様々な基準 (例えば、3 など、3 . 5 など、4 など、4 . 5 など、5 などの 2 ~ 6 の距離カットオフ、または溶媒露出度) を使用して定義され得る。

40

【 0 0 8 5 】

F X / F X a は、多数の異なるエピトープを含んでもよく、そのようなエピトープは (1) 直鎖ペプチドエピトープ、(2) 成熟 F X / F X a 構造において相互に近接して位置

50

する1つ以上の非連続アミノ酸からなる構造エピトープ、および(3)炭水化物基などのFX/FXaに共有結合した分子構造の全部または一部のいずれかからなるエピトープを含み得るが、これらに限定されない。

【0086】

所与の抗体(Ab)/抗原(Ag)対のエピトープは、様々な実験的および計算的なエピトープマッピング方法を使用して、異なるレベルの詳細さで説明し、特徴付けることができる。実験方法には、変異誘発法、X線結晶法、核磁気共鳴(NMR)分光法、水素重水素交換質量分析法(HDX-MS)および様々な競合結合方法、当該分野で既知の方法が含まれる。各方法が独特の原理に依存するため、エピトープの説明は、それが決定された方法と密接な関連がある。したがって、用いられるエピトープマッピング方法に応じて、所与のAb/Ag対のエピトープは異なる説明をされ得る。

10

【0087】

所与の抗体(Ab)/抗原(Ag)対のエピトープおよびパラトープは、日常的な方法によって特定され得る。例えば、エピトープの一般的な位置は、FXの異なる断片または変異体に結合する抗体の能力を評価することによって決定されてもよい。また、抗体(エピトープ)と接触するFX内の特定のアミノ酸、およびFX(パラトープ)と接触する抗体における特定のアミノ酸は、日常的な方法を使用して決定されてもよい。本発明による抗体は、FXに結合するために、自然発生的なリガンドもしくは受容体または別の抗体などの別の分子と競合することができる場合がある。

【0088】

標的への抗体の結合が別の抗体などのその標的の別のリガンドによる標的の結合と比較される、競合結合アッセイを行うことができる。

20

【0089】

同じ抗原に結合する抗体は、それらの共通抗原に同時に結合する能力に関して特徴付けることができ、「競合結合」/「ビニング」の対象となる場合がある。本文脈では、「ビニング」という用語は、同一の抗原に結合する抗体をグループ化する方法を指す。抗体の「ビニング」は、標準技法に基づくアッセイにおけるそれらの共通抗原に対する2つの抗体の競合結合に基づいてもよい。

【0090】

抗体の「ピン」は、参照抗体を使用して定義される。第2の抗体が参照抗体と同時に抗原に結合することができない場合、第2の抗体は、参照抗体と同一の「ピン」に属すると言われる。この場合、参照抗体および第2の抗体は、抗原の同一部分に競合的に結合し、「競合抗体」と見なされる。第2の抗体が参照抗体と同時に抗原に結合することができる場合、第2の抗体は、別個の「ピン」に属すると言われる。この場合、参照抗体および第2の抗体は、抗原の同一部分に競合的に結合せず、「非競合抗体」と見なされる。

30

【0091】

抗体「ビニング」は、エピトープに関する直接情報を提供しない。

【0092】

競合抗体、すなわち、同一の「ピン」に属する抗体は、同一のエピトープ、重複するエピトープ、またはさらには別個のエピトープを有してもよい。後者は、抗原上のそのエピトープに結合した参照抗体が、第2の抗体が抗原上のそのエピトープに接触するために必要な空間を占有する場合である(「立体障害」)。非競合抗体は一般に別個のエピトープを有する。したがって、いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、本明細書に特異的に開示される抗体のうちの少なくとも1つと同一のエピトープに結合することになる。

40

【0093】

抗体が本明細書に開示される抗FX抗体と同一のエピトープに結合するかどうか、または結合するためにそれらと競合するかどうかを決定するための競合アッセイは、当該技術分野で既知である。例示的な競合アッセイとしては、免疫アッセイ(例えば、ELISAアッセイ、RIAアッセイ)、表面プラズモン共鳴解析(例えば、BIACore(商標)機器を使用して)、バイオレイヤー干渉法、およびフローサイトメトリーが挙げられる

50

。典型的には、競合アッセイは、固体表面に結合した、または細胞表面上に発現した抗原、試験 F X 結合抗体、および参照抗体の使用を含む。参照抗体は標識化され、試験抗体は標識化されない。競合阻害は、試験抗体の存在下で固体表面または細胞に結合した標識化された参照抗体の量を判定することによって測定される。通常、試験抗体は、参照抗体よりも過剰に存在する（例えば、1 倍、5 倍、10 倍、20 倍、100 倍、1000 倍、10000 倍または 100000 倍）。競合アッセイで競合的であると特定された抗体（すなわち、競合抗体）は、参照抗体と同一のエピトープ、または重複するエピトープに結合する抗体、および立体障害を生じるために参照抗体によって結合されるエピトープに十分に近位の隣接するエピトープに結合する抗体を含む。

【0094】

例示的な競合アッセイでは、参照抗 F X または抗 F X a 抗体は、市販の試薬を使用してビオチン化される。ビオチン化参照抗体は、試験抗体または標識化されていない参照抗体の段階希釈液と混合して（自己競合対照）、標識化された参照抗体に対して、試験抗体（または標識化されていない参照抗体）の様々なモル比（例えば、1、5、10、20、100、1000、10000 または 100000 倍）の混合物を得られる。抗体混合物を、F X または F X a ポリペプチド被覆 E L I S A プレートに添加する。次いで、プレートを洗浄し、検出試薬としてセイヨウワサビペルオキシダーゼ（H R P）- ストレプトアビジン（s t r e p a v i d i n）をプレートに添加する。標的抗原に結合した標識化された参照抗体の量は、当該技術分野で既知である、発色基質（例えば、T M B（3，3'，5，5'-テトラメチルベンジジン）または A B T S（2，2'-アジノ-ジ-（3-エチルベンズチアゾリン-6-スルホナート））の添加後に検出される。光学密度読み取り値（O D 単位）は、分光計（例えば、S p e c t r a M a x（登録商標）M 2 分光計（分子装置））を使用して測定される。ゼロパーセント阻害に対応する応答（O D 単位）は、いかなる競合抗体も含まないウェルから決定される。100% 阻害、すなわち、アッセイバックグラウンドに対応する応答（O D 単位）は、いかなる標識化された参照抗体または試験抗体も含まないウェルから決定される。各濃度での試験抗体（または標識化されていない参照抗体）による F X または F X a に対する標識化された参照抗体の阻害パーセントは、以下のように計算される： $\% \text{阻害} = (1 - (\text{O D 単位} - 100\% \text{阻害}) / (0\% \text{阻害} - 100\% \text{阻害})) * 100$ 。

【0095】

当業者は、2 つ以上の抗 F X / F X a 抗体が、結合領域、ピンを共有し、かつ / または競合的に抗原に結合するかどうかを決定するために、類似のアッセイを実施し得ることを理解する。当業者はまた、競合アッセイが、当該技術分野で既知の様々な検出システムを使用して実施することができることも理解する。

【0096】

競合結合アッセイにおいて測定されたときに、過剰な 1 つの抗体（例えば、1、5、10、20、100、1000、10000 または 100000 倍）が他の抗体の結合を、例えば、少なくとも 50%、75%、90%、95%、または 99% 阻害する場合、試験抗体は、抗原と結合するために参照抗体と競合する。競合アッセイの例は、方法セクション 5 に提供される。

【0097】

「結合親和性」という用語は、本明細書では、2 つの分子間、例えば、抗体またはその断片と抗原との間の非共有相互作用の強度の測定として使用される。「結合親和性」という用語は、一価の相互作用を説明するために使用される。

【0098】

2 つの分子間、例えば、抗体またはその断片と抗原との間の結合親和性は、一価の相互作用により、平衡解離定数（ K_D ）を決定することによって定量化され得る。 K_D は、複合体形成および解離の動態の、例えば、S P R 法による測定によって、決定することができる。一価の複合体の会合および解離に対応する速度定数は、それぞれ、会合速度定数 k_a （または k_{on} ）、および解離速度定数 k_d （または k_{off} ）と呼ばれる。 K_D は、

10

20

30

40

50

式 $K_D = k_d / k_a$ を介して、 k_a および k_d と関連する。

【0099】

上記の定義にしたがって、所与の抗原に対する異なる抗体の結合親和性の比較など、異なる分子相互作用に関連する結合親和性は、個別の抗体 / 抗原複合体の K_D 値の比較によって比較されてもよい。

解離定数の値は、周知の方法によって直接決定することができる。標的に向かう抗体などのリガンドの結合能力を評価するための標準アッセイは、当該技術分野で既知であり、例えば、ELISA、ウエスタンブロット、RIA、およびフローサイトメトリー解析を含む。抗体の結合動態および結合親和性も、SPRなどの当該技術分野で既知の標準アッセイによって評価することができる。SPR結合アッセイの例を、本明細書の実施例2に提供する。

10

【0100】

本発明による抗体またはその断片などのFX結合剤は、その標的の 1×10^{-4} M以下、 1×10^{-5} M以下、 1×10^{-6} M以下、 1×10^{-7} M以下、 1×10^{-8} M以下、または 1×10^{-9} M以下、または 1×10^{-10} M以下、 1×10^{-11} M以下、 1×10^{-12} M以下、 1×10^{-13} M以下、または 1×10^{-14} M以下の K_D を有し得る。一実施形態では、本発明による抗体の K_D は、 $100 \mu\text{M}$ 、例えば $50 \mu\text{M}$ 未満、例えば $10 \mu\text{M}$ 未満であり得る。一実施形態では、 K_D は、 $9 \mu\text{m}$ 未満、例えば $8 \mu\text{m}$ 未満、例えば $7 \mu\text{m}$ 未満、例えば $6 \mu\text{m}$ 未満、例えば $5 \mu\text{m}$ 未満である。一実施形態では、 K_D は、 $4 \mu\text{m}$ 未満、例えば $3 \mu\text{m}$ 未満、例えば $2 \mu\text{m}$ 未満、例えば $1 \mu\text{m}$ 未満である。

20

【0101】

同一性

当該技術分野で既知の「同一性」という用語は、配列を比較することによって決定される、2つ以上のポリペプチドの配列間の関係を指す。当該技術分野では、「同一性」はまた、2つ以上のアミノ酸残基の文字列の間の一致の数によって決定されるような、ポリペプチド間の配列の関連性の程度も意味する。「同一性」は、特定の数学的モデルまたはコンピュータプログラム（すなわち、「アルゴリズム」）によって対処されたギャップアラインメント（存在する場合）を有する2つ以上の配列の小さい方の間の完全一致の割合を測定する。関連するポリペプチドの同一性は、既知の方法によって容易に計算することができる。

30

【0102】

本発明では、EMBOSS - 6.6.0からのNeedleman (Needlemanら、J. Mol. Biol. 1970; 48: 443 - 453) を使用し、ギャップ開始およびギャップ伸長についてそれぞれパラメータ10および0.5を使用して (gap open = 10、gap extend = 0.5)、類似性および同一性が決定された。

【0103】

医薬製剤

別の態様では、本発明は、本明細書に説明される抗体などの本発明の化合物を含む組成物および製剤を提供する。例えば、本発明は、薬学的に許容される担体と共に製剤化された、本発明の抗体またはその抗原結合性断片を含む、医薬組成物を提供する。

40

【0104】

したがって、本発明の1つの目的は、 $0.1 \text{ mg/mL} \sim 500 \text{ mg/mL}$ の濃度で存在するそのような抗体またはその抗原結合性断片を含む、医薬製剤を提供することであり、当該製剤は2.0 ~ 10.0のpHを有する。製剤は、緩衝系、保存剤、等張化剤、キレート剤、安定剤、または界面活性剤、ならびにそれらの様々な組み合わせのうちの1つ以上をさらに含んでもよい。医薬組成物に保存剤、等張剤、キレート剤、安定剤、および界面活性剤を使用することは、当業者には周知である。Remington: The Science and Practice of Pharmacy、第19版、1995が参照され得る。

【0105】

50

一実施形態では、医薬製剤は水性製剤である。そのような製剤は典型的には溶液または懸濁液であるが、コロイド、分散剤、乳濁液、および多相材料も含み得る。用語「水性製剤」は、少なくとも50% w/wの水を含む製剤として定義される。同様に、「水溶液」という用語は、少なくとも50% w/wの水を含む溶液として定義され、「水性懸濁液」という用語は、少なくとも50% w/wの水を含む懸濁液として定義される。

【0106】

別の実施形態では、医薬製剤は、使用前に溶媒および/または希釈剤が添加される凍結乾燥製剤である。

【0107】

さらなる態様では、医薬製剤は、そのような抗体の水溶液、およびこの抗体が0.1 mg/mL以上の濃度で存在する緩衝液を含み、当該製剤は約2.0～約10.0のpHを有する。

10

【0108】

一実施形態では、本発明は当該組成物の内容物を有する注入装置に関する。いくつかの実施形態では、本発明の医薬組成物は、注入装置における使用および/または注入装置内への収容が意図されている。いくつかの実施形態では、注入装置は、使い捨て、事前充填式、複数回投与式のFlexTouch（登録商標）型のペン（供給元：Novo Nordisk A/S, Denmark）である。いくつかの実施形態では、注入装置は、単一ショット装置である。

【0109】

いくつかの実施形態では、注入装置は、複数の所定の用量の薬剤を送達するように構成されたものなどの固定用量装置であり、時として複数の固定用量装置または固定用量、複数ショット装置と呼ばれる。

20

【0110】

投与

本発明の化合物、例えば、抗体もしくはその抗原結合性断片、またはそのような化合物を含む組成物は、静脈内、筋肉内、皮下など、非経口的に投与されてもよい。代替的に、本発明の化合物、例えば、抗体もしくはその抗原結合性断片、またはそのような化合物を含む組成物は、経口的または局所的など、非経口経路を介して投与されてもよい。化合物または組成物は、予防的に投与されてもよい。代替的に、化合物または組成物は、（要求に応じて）治療的に投与されてもよい。

30

【0111】

投与量

送達される化合物の用量は、1日あたり約0.01 mg～500 mgの化合物、好ましくは1日あたり約0.1 mg～250 mg、より好ましくは1日あたり約0.5 mg～約250 mgであってもよく、状態の重症度に応じて、初回量および維持量として、1日、1週間、2週間、または1か月に1回でもよい。また、好適な用量は、特定の化合物について、そのインビボ半減期または平均滞留時間およびその生物活性を含む、その化合物の特性に基づいて調整され得る。例えば、送達される化合物は、一実施形態では1週間に1回、または別の実施形態では1週間おきに1回、または別の実施形態では1か月に1回投与されてもよく、当該実施形態のいずれかにおいて、例えば体重1 kgあたり0.1、0.25、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、または10 mgの用量で投与されてもよい。

40

【0112】

本明細書に開示される化合物を含有する組成物は、予防的な処置のために、および/または一部の実施形態では治療的な処置のために投与することができる。治療的な用途では、組成物は、上述のような何らかの出血障害などの疾患を既に患っている対象に、疾患およびその合併症を治癒、緩和、または部分的に阻止するのに十分な量で投与される。これを達成するのに十分な量は、「治療有効量」として定義される。当業者によって理解され

50

るように、この目的のために有効な量は、疾患または傷害の重度、ならびに対象の体重および全身状態に依存する。

【0113】

一態様では、本発明は、FXの活性化を刺激してFXaを生成することができるFX結合分子に関する。上述したように、そのような機能性は、特に血友病患者の凝固機能を改善するための新規および改善された治療の探求において望ましい。

【0114】

一実施形態では、本発明は、ヒトFXに結合し、FX活性化を刺激する抗体またはその抗原結合性断片などのFX結合剤に関する。

【0115】

一実施形態では、本発明は、抗体またはその抗原結合性断片などのFX結合剤に関し、FX結合剤、抗体またはその抗原結合性断片は、ヒトFXに結合し、FX活性化を刺激することができる。

観察された活性化が、FXとFIXaを一緒にするFIXa結合剤を含む、FVIIまたはFVII模倣化合物などのFIX接合部分の不在においても生じることは、特に興味深い。一実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片などのFX結合剤は、ヒトFXに結合し、それによって、FXaを生成するFIXaによるFXのタンパク質分解を刺激する。

【0116】

一実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、FIXa結合部分の存在と無関係に、FXa生成を刺激する。一実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、FIXa結合部分の存在と無関係に、FXa生成を刺激することができる。

【0117】

一実施形態では、FXに結合することができる抗体またはその抗原結合性断片などのFX結合剤は、FIXa結合部分の存在と無関係に、FXをよりタンパク質分解しやすることができる。一実施形態では、FXに結合することができる抗体またはその抗原結合性断片などのFX結合剤は、FXをFIXaによってよりタンパク質分解しやすることができる。一実施形態では、FXに結合することができる抗体またはその抗原結合性断片などのFX結合剤は、FIXa結合部分の存在と無関係に、FXをよりタンパク質分解しやすることができる。

【0118】

FXa生成を刺激するFX結合剤の能力は、当業者に既知の好適なアッセイによって試験され得る。所与のFX結合剤の活性化機能を試験するのに好適なインビトロアッセイを提供する、本明細書の実施例3を参照する。一実施形態では、FXに結合することができる抗体またはその抗原結合性断片などのFX結合剤は、実施例3によって決定されるようにFX活性化を刺激する。FX結合剤は、FX結合剤または非活性化FX結合剤を用いずに実施された同等のアッセイと比較して、当該FX結合剤の存在下でFXaの増加が測定されたときに、刺激性であるか、またはFX活性化を刺激することができる。

【0119】

FIXa媒介性FX活性化を促進するFX結合剤の能力は、FX結合剤が存在しない場合、すなわちFX活性化の倍増加が、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、または1.9など、1を超えて観察された場合と比較して、所与のFX結合剤について本明細書の実施例3によるアッセイにおいて説明されるようにFX活性化速度における増加が観察された場合に、存在すると考えられる。好ましい実施形態では、観察されたFX活性化の倍増加は2倍超、例えば、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90または100倍以上である。一実施形態では、FX活性化の倍増加は2~100,000倍である。そのような一実施形態では、FX活性化の倍増加は2~500倍である。そのような一実施形態では、FX活性化の倍増加は3~500倍である。別のそのような実施形態では、FX活性化の倍増加は4~500倍である。別のそのような実施形態では、FX活性化の増加は5~100倍であ

10

20

30

40

50

る。別の実施形態では、F X 活性化の増加は10～100倍、例えば10～83倍である。

【0120】

F X 結合剤の結合活性が本明細書の実施例3に説明されるようなアッセイの測定値に影響を与えることを避けるために、アッセイは、一価のF X 結合剤を使用することにより実施されるのが好ましい。F X 結合剤が二価または多価のF X 結合剤である場合、活性化アッセイは、その一価の抗原結合性断片を使用して実施されるべきである。

【0121】

本発明の一態様は、F X a よりも強いヒトF X に結合する抗体またはその抗原結合性断片などのF X 結合剤に関する。一実施形態では、F X 結合剤はF X a に結合しない。別の実施形態では、F X 結合剤はF X a に対して優先的にF X に結合する。そのような一実施形態では、F X 結合剤は低親和性でF X a に結合する。F X が活性化ペプチドの存在によってF X a と区別される場合、本発明は、一態様では、ヒトF X の活性化ペプチドに結合する抗体またはその抗原結合性断片などのF X 結合剤に関する。ヒトF X の活性化ペプチドは、配列番号2のアミノ酸残基143～194によって定義される。

【0122】

一実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号2のアミノ酸残基143～194によって特定されるF X の活性化ペプチドに結合する。さらなる実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号2によって特定されるF X の活性化ペプチド内のアミノ酸残基170～185に結合する。

実施例5に説明されるように実施されたペプチド配列に基づき、特定されたF X 活性化F X 結合剤の共有結合部位が特定された。共通最小ペプチドエピトープが決定され、配列番号2によって特定されるヒトF X のアミノ酸残基177～178に対応するF X の活性化ペプチド内にペプチド「LL」を含むことが見出された。

【0123】

一実施形態では、本発明は、配列番号2によって特定されるヒトF X のアミノ酸残基177～178に対応するF X の活性化ペプチド内の「LL」に結合することができる、抗体またはその抗原結合性断片などのF X 結合剤に関する。

【0124】

一実施形態では、本発明は、F X の活性化ペプチドに結合することができる抗体またはその抗原結合性断片などのF X 結合剤に関し、ペプチド配列によって決定される共通最小エピトープは、「LL」（配列番号2のアミノ酸残基177～178）によって構成される。

【0125】

一実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片などのF X 結合剤は、配列番号2のアミノ酸残基143～194によって特定されるF X の活性化ペプチドに結合し、ペプチド配列によって決定される共通最小エピトープは、「LL」（配列番号2のアミノ酸残基177～178）によって構成される。

【0126】

抗原結合分子が様々な形態をとり得ることは、当該技術分野では周知である。一連の周知の分子形態の種類が本明細書に説明されているが、これは網羅的なリストと見なされるべきではないこと、かつ当業者は本出願の教示をその好ましい分子形態に困難なく適用することができることにも留意されたい。

【0127】

一実施形態では、F X 結合剤は一価である。そのような一実施形態では、F X 結合剤は、例えば、（単一）ドメイン抗体もしくはその抗体断片、またはNanobody（登録商標）、V_HH、ヒト化V_HH、またはラクダ化V_Hドメインなどの免疫グロブリン単一可変ドメインである。一実施形態では、F X 結合剤はFabである。一実施形態では、F X 結合剤は二価である。一実施形態では、F X 結合剤はモノクローナル抗体全体（mAb）またはmAbの抗原結合性断片である。

【 0 1 2 8 】

本発明の態様は、F X 活性化を刺激することができる F X 結合剤の特定に関する。そのような一実施形態では、以下の工程：a) F X 結合剤を提供する工程、b) 所与の F X 結合剤の F X 活性化機能を試験するのに好適なインビトロアッセイにおいて、F X 結合剤を試験する工程、および c) F X 活性化を刺激することができる F X 結合剤を選択する工程を含む方法が提供される。

【 0 1 2 9 】

上述のように、F X 活性化を刺激することができる F X 結合剤は、二重特異性分子、または三重特異性分子、またはさらには多重特異性分子に含まれる望ましい要素であり得る。

10

【 0 1 3 0 】

したがって、本発明の一態様は、F X 刺激を提供する少なくとも 1 つの F X 結合部分を含む抗体分子（またはその抗原結合性断片）などの、二重、三重、および多重特異性分子に関する。

【 0 1 3 1 】

本発明の態様は、薬品の製造のための本明細書に説明される抗体またはその抗原結合性断片などの分子の使用に関する。

【 0 1 3 2 】

本発明の態様は、治療方法における使用のための、本明細書に説明される抗体またはその抗原結合性断片などの分子に関する。

20

【 0 1 3 3 】

本発明の態様は、血友病などの凝固障害の治療について本明細書に説明される抗体またはその抗原結合性断片などの分子の使用に関する。

【 0 1 3 4 】

本発明の態様は、治療を必要とする個人に、治療有効用量の本明細書に説明される抗体またはその抗原結合性断片などの分子を投与する工程を含む治療方法に関する。一実施形態では、方法は、血友病などの凝固障害、特に阻害物質を有するか、または有しない、血友病 A を患う患者を治療するためのものである。一実施形態では、方法は、阻害物質を有するか、または有しない、血友病 B を患う患者を治療するためのものである。

【 0 1 3 5 】

30

実施形態

1. 配列番号 2 のアミノ酸残基 143 ~ 194 によって特定される F X の活性化ペプチドに結合することができる、抗体またはその抗原結合性断片。

【 0 1 3 6 】

2. 配列番号 2 によって特定される F X の活性化ペプチド内のアミノ酸残基 170 ~ 185 のうちの 1 つ以上に結合することができる、抗体またはその抗原結合性断片。

【 0 1 3 7 】

3. 配列番号 2 によって特定されるヒト F X の位置 177 ~ 178 のアミノ酸残基に対応する F X の活性化ペプチド内の「LL」に結合することができる、抗体またはその抗原結合性断片。

40

【 0 1 3 8 】

4. F X の活性化ペプチドに結合することができる抗体またはその抗原結合性断片であって、ペプチドアレイにより決定される共通最小エピトープが「LL」（配列番号 2 の A A 177 ~ 178）を含む、抗体またはその抗原結合性断片。

【 0 1 3 9 】

5. F X に結合することができる抗体またはその抗原結合性断片であって、F X 活性化を刺激することができる、抗体またはその抗原結合性断片。

【 0 1 4 0 】

6. F X に結合することができる抗体またはその抗原結合性断片であって、F I X a による F X 活性化を刺激することができる、抗体またはその抗原結合性断片。

50

【 0 1 4 1 】

7．F Xに結合することができる抗体またはその抗原結合性断片であって、F I X a 結合剤の存在と無関係に、F I X a によるF X 活性化を刺激することができる、抗体またはその抗原結合性断片。

【 0 1 4 2 】

8．実施形態1～4のいずれか1つに記載のF Xに結合することができる抗体またはその抗原結合性断片であって、F X 活性化を刺激することができる、抗体またはその抗原結合性断片。

【 0 1 4 3 】

9．抗体またはその抗原結合性断片の、F X 活性化を刺激することができる能力が、本明細書の実施例3に説明されるように決定される、実施形態5～8のいずれか1つに記載のF Xに結合することができる抗体またはその抗原結合性断片。

10

【 0 1 4 4 】

10．F Xに結合することができる抗体またはその抗原結合性断片であって、F I X a 結合部分の存在と無関係に、F I X a によるF X 活性化を刺激する、抗体またはその抗原結合性断片。

【 0 1 4 5 】

11．F X 活性化の刺激が、本明細書の実施例3に説明されるように決定される、実施形態5～10のいずれか1つに記載のF Xに結合することができる抗体またはその抗原結合性断片。

20

【 0 1 4 6 】

12．F Xに結合することができる抗体またはその抗原結合性断片であって、F X をより活性化しやすくすることができる、抗体またはその抗原結合性断片。

【 0 1 4 7 】

13．F Xに結合することができる抗体またはその抗原結合性断片であって、F X をF I X a によってよりタンパク質分解しやすくすることができる、抗体またはその抗原結合性断片。

【 0 1 4 8 】

14．F Xに結合することができる抗体またはその抗原結合性断片であって、F I X a 結合部分の存在と無関係に、F X をF I X a によってよりタンパク質分解しやすくすることができる、抗体または抗原結合性断片。

30

【 0 1 4 9 】

15．抗体またはその抗原結合性断片の、F X をよりタンパク質分解しやすくすることができる能力が、本明細書の実施例3に説明されるように決定される、実施形態12～14のいずれか1つに記載のF Xに結合することができる抗体またはその抗原結合性断片。

【 0 1 5 0 】

16．抗体またはその抗原結合性断片が、実施形態5～11のいずれか1つに記載のF X 活性化を刺激することができる、実施形態1～4のいずれか1つに記載のF Xに結合することができる抗体またはその抗原結合性断片。

【 0 1 5 1 】

17．抗体またはその抗原結合性断片が、実施形態5～11のいずれか1つに記載のF X 活性化を刺激する単一可変ドメイン抗体である、実施形態1～4のいずれか1つに記載の抗体またはその抗原結合性断片。

40

【 0 1 5 2 】

18．抗体またはその抗原結合性断片が、実施形態12～15のいずれか1つに記載のF X をよりタンパク質分解しやすくすることができる単一可変ドメイン抗体である、実施形態1～4のいずれか1つに記載のF Xに結合することができる抗体またはその抗原結合性断片。

【 0 1 5 3 】

19．その一価の抗原結合性断片が、

50

- a . F X 活性化を刺激するか、
- b . F I X a による F X 活性化を刺激するか、
- c . F X 活性化を刺激することができるか、
- d . F I X a による F X 活性化を刺激することができるか、
- e . F X をよりタンパク質分解しやすくすることができるか、または
- f . F X を F I X a によってよりタンパク質分解しやすくすることができる、実施形態 5 ~ 18 のいずれか 1 つに記載の F X に結合することができる抗体またはその抗原結合性断片。

【 0 1 5 4 】

20 . 抗体または抗原結合性断片が、10 μ M 未満、例えば 9 μ M 未満、例えば 8 μ M 未満、例えば 7 μ M 未満、例えば 6 μ M 未満、例えば 5 μ M 未満、例えば 4 μ M 未満、例えば 3 μ M 未満、または例えば 2 μ M 未満の平衡解離定数 (K_D) として決定される結合親和性を有する、実施形態 1 ~ 19 のいずれか 1 つに記載の F X に結合することができる抗体またはその抗原結合性断片。

10

【 0 1 5 5 】

21 . 抗体または抗原結合性断片が一価である、実施形態 1 ~ 20 のいずれか 1 つに記載の抗体またはその抗原結合性断片。

【 0 1 5 6 】

22 . 抗体またはその抗原結合性断片が、免疫グロブリン単一可変ドメインまたはその抗体断片、例えば、ドメイン抗体、N a n o b o d y (登録商標)、 $V_H H$ 、ヒト化 $V_H H$ 、またはラクダ化 V_H ドメインである、実施形態 1 ~ 21 のいずれか 1 つに記載の抗体またはその抗原結合性断片。

20

【 0 1 5 7 】

23 . 抗体またはその抗原結合性断片が、F a b、s c F a b、F v、または s c F v である、実施形態 1 ~ 22 のいずれか 1 つに記載の抗体またはその抗原結合性断片。

【 0 1 5 8 】

24 . 抗体またはその抗原結合性断片が二価である、実施形態 1 ~ 15 のいずれか 1 つに記載の抗体またはその抗原結合性断片。

【 0 1 5 9 】

25 . 抗体または抗原結合性断片が、F a b ' ₂ の m A b である、実施形態 24 に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

30

【 0 1 6 0 】

26 . 重鎖可変ドメインが、配列番号 8、9、10、11、54、55、56 または 57 よって特定された配列に対して、それぞれ少なくとも 90、91、92、93、94、95、96、97、98、または 99 % 同一である、実施形態 1 ~ 25 のいずれか 1 つに記載の抗体またはその抗原結合性断片。

【 0 1 6 1 】

- 27 . 抗体またはその抗原結合性断片が、
- a . 配列番号 8 によって特定された重鎖可変ドメインの 3 つの C D R 配列と比較して、最大で 10 個のアミノ酸残基変化を有する 3 つの重鎖 C D R 配列か、
 - b . 配列番号 9 によって特定された重鎖可変ドメインの 3 つの C D R 配列と比較して、最大で 10 個のアミノ酸残基変化を有する 3 つの重鎖 C D R 配列か、
 - c . 配列番号 10 によって特定された重鎖可変ドメインの 3 つの C D R 配列と比較して、最大で 10 個のアミノ酸残基変化を有する 3 つの重鎖 C D R 配列か、
 - d . 配列番号 11 によって特定された重鎖可変ドメインの 3 つの C D R 配列と比較して、最大で 10 個のアミノ酸残基変化を有する 3 つの重鎖 C D R 配列か、
 - e . 配列番号 54 によって特定された重鎖可変ドメインの 3 つの C D R 配列と比較して、最大で 10 個のアミノ酸残基変化を有する 3 つの重鎖 C D R 配列か、
 - f . 配列番号 55 によって特定された重鎖可変ドメインの 3 つの C D R 配列と比較して、最大で 10 個のアミノ酸残基変化を有する 3 つの重鎖 C D R 配列か、

40

50

g. 配列番号 56 によって特定された重鎖可変ドメインの 3 つの CDR 配列と比較して、最大で 10 個のアミノ酸残基変化を有する 3 つの重鎖 CDR 配列か、または

配列番号 57 によって特定された重鎖可変ドメインの 3 つの CDR 配列と比較して、最大で 10 個のアミノ酸残基変化を有する 3 つの重鎖 CDR 配列を含む、実施形態 1 ~ 25 のいずれか 1 つに記載の抗体またはその抗原結合性断片。

【0162】

28. 3 つの重鎖 CDR 配列が、特定された配列番号の 3 つの CDR と比較して、最大で 9 個、例えば 8 個、例えば 7 個、または例えば 6 個のアミノ酸変化を有する、実施形態 27 に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

【0163】

29. 3 つの重鎖 CDR 配列が、特定された配列番号の 3 つの CDR と比較して、最大で 5 個、例えば 4 個、例えば 3 個、例えば 2 個、または最大 1 個のアミノ酸変化を有する、実施形態 28 に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

【0164】

30. 配列番号 8、9、10、11、54、55、56、もしくは 57 を含むか、またはそれらからなる、抗体またはその抗原結合性断片。

【0165】

31. 配列番号 8、9、10、11、54、55、56、または 57 の 3 つの CDR を含む、抗体またはその抗原結合性断片。

【0166】

32. 抗体またはその抗原結合性断片であって、配列番号 8、9、10、11、54、55、56、もしくは 57 を含むか、またはそれらからなる、参照抗体または抗原結合性断片と競合する、抗体または抗原結合性断片。

【0167】

33. mAb 00916 の重鎖可変ドメイン (配列番号 4) および軽鎖可変ドメイン (配列番号 5) を含む、抗体またはその抗原結合性断片。

【0168】

34. mAb 13F62 の重鎖可変ドメイン (配列番号 6) および軽鎖可変ドメイン (配列番号 7) を含む、抗体またはその抗原結合性断片。

【0169】

35. mAb 00916 の重鎖可変ドメイン (配列番号 4) の 3 つの CDR と、軽鎖可変ドメイン (配列番号 5) の 3 つの CDR とを含む、抗体またはその抗原結合性断片。

【0170】

36. mAb 13F62 の重鎖可変ドメイン (配列番号 6) の 3 つの CDR と、軽鎖可変ドメイン (配列番号 7) の 3 つの CDR とを含む、抗体またはその抗原結合性断片。

【0171】

37. 抗体またはその抗原結合性断片であって、mAb 00916 の重鎖可変ドメイン (配列番号 4) および軽鎖可変ドメイン (配列番号 5) を含む参照抗体または抗原結合性断片と競合する、抗体またはその抗原結合性断片。

【0172】

38. 抗体またはその抗原結合性断片であって、mAb 13F62 の重鎖可変ドメイン (配列番号 6) および軽鎖可変ドメイン (配列番号 7) を含む参照抗体または抗原結合性断片と競合する、抗体またはその抗原結合性断片。

【0173】

39. 抗体または抗原結合性断片が、実施形態 5 ~ 9 のいずれか 1 つに記載の FX 活性化を刺激することができる、実施形態 26 ~ 38 のいずれか 1 つに記載の抗体またはその抗原結合性断片。

【0174】

40. 抗体または抗原結合性断片が、実施形態 9 ~ 11 のいずれか 1 つに記載の FX 活性化を刺激する、実施形態 26 ~ 38 のいずれか 1 つに記載の抗体またはその抗原結合

10

20

30

40

50

性断片。

【0175】

41．抗体または抗原結合性断片が、実施形態12～15のいずれか1つに記載のFXをよりタンパク質分解しやすくすることができる、実施形態26～38のいずれか1つに記載の抗体またはその抗原結合性断片。

【0176】

42．実施形態1～41のいずれか1つに記載の、抗体または抗原結合性断片を含む、二重、三重、または多重特異性分子。

【0177】

43．当該抗体またはその抗原結合性断片が単一可変ドメイン抗体である、実施形態1～42のいずれか1つに記載の、抗体またはその抗原結合性断片を含む、二重、三重、または多重特異性分子。

【0178】

44．実施形態1～43のいずれか1つに記載の抗体またはその抗原結合性断片、および任意で1つ以上の薬学的に許容可能な担体（複数可）を含む、医薬組成物。

【0179】

45．阻害物質を有するか、もしくは有しない、血友病Aなどの、または阻害物質を有するか、もしくは有しない、血友病Bなどの、凝固障害の治療において使用するため薬品の製造のための、実施形態1～44のいずれか1つに記載の抗体もしくはその抗原結合性断片または組成物の使用。

【0180】

46．阻害物質を有するか、もしくは有しない、血友病Aなどの、または阻害物質を有するか、もしくは有しない、血友病Bなどの、凝固障害の治療において使用するための、実施形態1～44のいずれか1つに記載の抗体もしくはその抗原結合性断片または組成物。

【0181】

47．血友病などの血液凝固障害を患っている対象を治療する方法であって、実施形態1～46のいずれか1つに記載の抗体もしくはその抗原結合性断片または組成物を当該対象に投与することを含む、方法。

【0182】

48．実施形態47に記載の方法であって、凝固障害または血液凝固障害が、阻害物質を有するか、または有しない、血友病AまたはBである、方法。

【0183】

49．実施形態1～25のいずれか1つに記載の抗体を特定するための方法であって、a) FX結合剤を提供する工程と、b) 工程aで提供されたFX結合剤のFX活性化機能を試験するのに好適なインビトロアッセイにおいて、FX結合剤を試験する工程と、c) FX活性化を刺激することができるFX結合剤を選択する工程とを含む、方法。

【0184】

50．実施形態5～23のいずれか1つに記載の抗体を特定するための方法であって、a) FX結合剤を提供する工程と、b) 工程aで提供されたFX結合剤のFX活性化機能を試験するのに好適なインビトロアッセイにおいて、FX結合剤を試験する工程と、c) FXを、例えばFIXaによって、よりタンパク質分解しやすくすることができるFX結合剤を選択する工程とを含む、方法。

【0185】

51．実施形態1～43のいずれか1つに記載の、抗体またはその抗原結合性断片を発現する、真核細胞。

【0186】

52．実施形態1～44のいずれかに1つに記載の抗体もしくはその抗原結合性断片または組成物、および使用説明書を含む、キット。

【0187】

10

20

30

40

50

実施例および方法

一般的な方法

F X 結合 Nanobodies の調製

一般分子生物学

一般的な分子生物学技術については、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第3版, 2001, Sambrook, Fritsch および Maniatis 編, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY) を参照されたい。

【0188】

1. 免疫化およびライブラリ

Ethical Committee of the Ablynx Camelid Facility (LA1400575) の承認後、1頭のラマおよび1頭のアルパカを、FX (Haemotologic Technologies, VT USA) で免疫化した。

【0189】

重鎖のみの抗体断片レパートリーのクローニングおよびファージ免疫ライブラリの調製を以下のように実施した。

【0190】

最終免疫原注射後、血液試料を採取した。これらの血液飼料から、末梢血単核細胞 (PBMC) を、製造業者 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, US) の指示に従って Ficoll - Hypaque を使用して調製した。PBMC から全 RNA を抽出し、RT - PCR の出発材料として使用して、本質的に WO 2005 / 044858 に説明されるように、V_H H / Nanobody (登録商標) コード DNA セグメントを増幅した。簡潔に述べると、Nanobody (登録商標) コード DNA セグメントを、ファージミドベクター pAX212 にクローニングし、His₆ および FLAG₃ タグで融合された Nanobodies (登録商標) を表示するファージ粒子の生成を可能にした。その後、ファージを標準プロトコルに従って調製し、保管した。

【0191】

合成ライブラリ

合成ライブラリは、合成 Nanobody (登録商標) 遺伝子断片をファージミドベクター pAX190 にクローニングすることによって生成され、これは上述の pAX212 と同一の特徴を有するが、複数のクローニング部位において差異を有した。

【0192】

F X に結合する Nanobodies のライブラリスクリーニング

Nanobody (登録商標) ファージディスプレイの選択は、生成された免疫および合成ライブラリで実施した。ライブラリは、固定化ヒト FX (Haemotologic Technologies, VT USA) および カニクイザル FX (Novo Nordisk 自社生産) の異なる組み合わせに対して、1 ~ 4 個の連続した富化ラウンドを受けた。

【0193】

FXa に対し FX に選択的な Nanobodies を特異的に富化するために、特定の試験では、固定化された FX を用いたライブラリのインキュベーション中の競合のために過剰な可溶性 FXa を使用した。

【0194】

他の構造的に関連する凝固因子に対し FX に選択的な Nanobodies を特異的に富化するために、特定の試験では、固定化された FX を用いたライブラリのインキュベーション中の競合のために過剰な可溶性 F I X を使用した。

【0195】

選択出力からの約 4500 個の個別のクローンを、ヒトおよび カニクイザル FX、FX

10

20

30

40

50

a、またはF I Xに対して、E L I S Aで結合するためにスクリーニングした(N a n o b o d i e sを発現するE . c o l i細胞からのペリプラズム抽出物を使用した)。ヒトF X / F X aへの特異的結合を示した約1 5 0 0個のクローンを選定し、その大部分はカニクイザルF Xへの交差結合を示した。一部のクローンは、F X aに対してF Xへの優先的結合を示した。E L I S A陽性クローンの配列解析は、F X / F X aに結合するN a n o b o d i e sの約7 0 0個のユニーク配列を選定した。

【0196】

2. N a n o b o d y (登録商標) 発現構築物の生成

ファージディスプレイ選択出力からのN a n o b o d i e sの配列解析を、一般的に公知の手順に従って行った(P a r d o nら(2014)N a t P r o t o c 9:674)。

【0197】

ユニークな制限部位を各々担持するフォワードF R 1プライマーおよびリバースF R 4プライマーの特定の組み合わせを用いたP C Rにより得られたN a n o b o d y (登録商標)含有DNA断片を、適切な制限酵素を用いて消化し、N a n o b o d y (登録商標)発現ベクターの一致するクローニングカセットにライゲーションした(以下に説明する)。次いで、ライゲーション混合物を、エレクトロコンピテント E s c h e r i c h i a c o l i T G 1 (60502, L u c i g e n , M i d d l e t o n , W I)またはT O P 1 0 (C404052, T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c , W a l t h a m , M A)細胞に変換し、次いでそれらを適切な抗生物質選択圧(カナマイシンまたはゼオシン)の下で増殖させた。抵抗性クローンを、プラスミドDNAのS a n g e r シークエンシング(L G C G e n o m i c s , B e r l i n , G e r m a n y)により検証した。

【0198】

一価のN a n o b o d i e sを、l a cプロモータを含有するプラスミド発現ベクターからのE . c o l i T G 1、カナマイシンの耐性遺伝子、E . c o l i複製元、およびO m p Aシグナルペプチドのコード配列によって先行されるN a n o b o d y (登録商標)クローニング部位において発現させた。N a n o b o d y (登録商標)コード配列とインフレームで、ベクターはC末端F L A G 3およびH I S 6タグをコードする。シグナルペプチドは、発現されたN a n o b o d i e sを細菌宿主のペリプラズム区画に導く。

【0199】

N a n o b o d i e sの発現および精製

E . c o l iにおけるN a n o b o d i e sの一般的な発現

目的のN a n o b o d y (登録商標)構築物を含有するE . c o l i T G - 1細胞を、37で2時間、その後、30で29時間、「5052」自動誘導培地(0.5%グリセロール、0.05%グルコース、0.2%ラクトース+3mMのM g S O₄)を含有するバッフル付き振盪機フラスコ中で増殖させた。一晚凍結させたE . c o l i発現培養物からの細胞ペレットを、次いでP B S (元の培養物の体積の1/12.5)中に溶解し、穏やかに攪拌しながら4で1時間インキュベーションする。最後に、細胞をもう一度ペレット化し、ペリプラズム空間内に分泌されたタンパク質を含有する上清を保管する。

【0200】

P . p a s t o r i sにおけるN a n o b o d i e s (登録商標)の一般的な発現

目的のN a n o b o d y (登録商標)構築物を含有するP . p a s t o r i s細胞を、B G C M培地中で2日間(30で、200rpm)増殖させた。3日目に、培地をB M C Mに切り替え、構築物をさらに増殖させて(30、200rpm)、8時間後に0.5%v/vメタノールを用いて誘導した。翌日、構築物を、0.5%v/vメタノールを用いて、午前中、正午、および夕方に誘導した。5日目に、細胞を遠心分離し、上清(分泌されたN a n o b o d y (登録商標)を含有する)を収集した。

【0201】

N a n o b o d i e s (登録商標)の一般的な精製

10

20

30

40

50

H I S 6 タグ付き N a n o b o d i e s (登 録 商 標) を、N i - E x c e l (G E H e a l t h c a r e) または N i - I D A / N T A (G e n s c r i p t) 樹 脂 の い ず れ か で、イミダゾール (前者用) または酸性溶出 (後者用) を用いた固定化金属親和性クロマトグラフィー (I M A C) に よ っ て、その 後、P B S 中 の 脱 塩 工 程 (S e p h a d e x G 2 5 樹 脂 を 用 い た P D コ ラ ム、G E H e a l t h c a r e)、お よ び も し 必 要 で あ れ ば、ゲル濾過クロマトグラフィー (S u p e r d e x コ ラ ム、G E H e a l t h c a r e) に よ っ て 精 製 し た。

【 0 2 0 2 】

3 . 熱シフトアッセイ

抗 F X N a n o b o d i e s (登 録 商 標) の 熱 安 定 性 を、L i g h t C y c l e r 4 8 0 I I 機 器 (R o c h e) 上 の 9 6 ウェルプレート内で実施される熱シフトアッセイ (T S A) を 使 用 し て 決 定 し た。1 列 ごと に、1 つ の N a n o b o d y (登 録 商 標) を、以下の pH 範 囲 : 3 . 5 / 4 / 4 . 5 / 5 / 5 . 5 / 6 / 6 . 5 / 7 / 7 . 5 / 8 / 8 . 5 / 9 に 従 っ て 分 析 し た。1 ウェル ごと に、5 μ L の N a n o b o d y (登 録 商 標) の 試 料 (P B S 中 0 . 8 m g / m L) を、5 μ L の S y p r o O r a n g e (M i l l i Q 水 中 で 4 0 倍、I n v i t r o g e n カ タ ロ グ 番 号 S 6 5 5 1) お よ び 1 0 μ L の 緩 衝 液 (1 0 0 m M の リ ン 酸 塩、1 0 0 m M の ホ ウ 酸 塩、1 0 0 m M の ク エ ン 酸 塩、お よ び 1 1 5 m M の N a C l、p H 範 囲 3 . 5 ~ 9) に 添 加 し た。適 用 さ れ た 温 度 勾 配 (0 . 0 3 / 秒 の 速 度 で 3 7 ~ 9 9) は、N a n o b o d i e s の 展 開 を 誘 発 し、それ によ っ て それらの疎水性パッチが露出される。S y p r o O r a n g e は、それらの疎水性パッチに結合し、蛍光強度の増加をもたらす (E x / E m = 4 6 5 / 5 8 0 n m)。p H 7 で の 蛍 光 強 度 曲 線 の 一 次 導 関 数 の 変 曲 点 は、溶 融 温 度 (T m) の 尺 度 と し て の 役 目 を 果 た す。

10

20

【 0 2 0 3 】

4 . 分析用サイズ排除クロマトグラフィー

N a n o b o d i e s (登 録 商 標) の 凝 集 お よ び オ リ ゴ マ ー 化 の 潜 在 的 な 発 生 を、分 析 用 サイズ 排 除 ク ロ マ ト グ ラ フ ィ ー (S E C) に よ っ て 調 査 し た。この 目的 の た め に、8 μ g の N a n o b o d y (登 録 商 標) 試 料 (P B S 中 0 . 5 m g / m L) お よ び 1 0 μ L の B i o R a d 標 準 (カ タ ロ グ 番 号 1 5 1 ~ 1 9 0 1、P B S 中 で 1 / 1 0 に 希 釈) を、D i o n e x U l t i m a t e 3 0 0 0 を 介 し て W a t e r s X b r i d g e カ ラ ム (粒 径 : 3 . 5 μ m、孔 径 2 0 0 、内 径 7 . 8 m m) に 注 入 し た。アルギニン緩衝液 [1 0 m M の リ ン 酸 塩 + 1 5 0 m M の アルギニン + 1 0 % の 1 - プ ロ パ ノ ール + 0 . 0 2 % の N a N ₃ (p H 7 . 0)] を 移 動 相 と し て 使 用 し、0 . 5 m L / 分 の 流 速 を 適 用 し た。全 体 的 な S E C の 動 作 を、1 . 3 5 k D a の B i o R a d 標 準 ピ ーク 対 する 3 つ の パ ラ メ ー タ : 主 ピ ーク の ピ ーク 面 積 (9 0 % 超 = 合 格)、回 収 率 (8 0 % 超 = 合 格)、お よ び 保 持 時 間 を 考 慮 す る こ と に よ っ て 決 定 し た。

30

【 0 2 0 4 】

5 . 競合アッセイ

同 一 ま た は 類 似 の エ ピ ト ー プ に 結 合 す る 抗 体 (N a n o b o d i e s (登 録 商 標) な ど) は、以下 の よ う に 実 施 さ れ 得 る 競 合 ア ャ セ イ を 使 用 し て 特 徴 付 け る こ と が で き る。

40

【 0 2 0 5 】

2 5 μ L (1 μ g / m L) の ヒ ト 血 漿 由 来 F X (H a e m a t o l o g i c T e c h n o l o g i e s I n c , U S A) を、マイクロタイタープレート (N u n c , W i e s b a d e n , G e r m a n y) 内 に 固 定 す る。ウェルの洗浄およびブロッキングの後、「ビニング」 m A b (m A b 0 0 9 1 6) を、5 0 m M H E P E S p H 7 . 4、2 . 5 m M C a C l ₂、1 % B S A、お よ び 0 . 0 5 % T w e e n 2 0 (S i g m a) を 含 有 す る 緩 衝 液、ま た は 緩 衝 液 の み を 用 い た 対 照 に、1 μ M の 濃 度 で 添 加 し、被 覆 ヒ ト F X で 3 0 分 間 プ レ イ ン キ ュ ベ ー ト す る。その 後、試 験 抗 体 (こ こ で は 異 な る N a n o b o d i e s (登 録 商 標)) を 添 加 し、1 時 間 結 合 を 許 容 す る。未 結 合 試 験 抗 体 (N a n o b o d y (登 録 商 標)) お よ び 結 合 m A b を 洗 浄 し、結 合 N a n o b o d y (登 録 商

50

標)を、セイヨウワサビペルオキシダーゼ(HRP)複合化抗FLAG mAb(Sigma、カタログ番号A8592)およびそれに続く基質esTMB(3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン)(SDT, Brussels, Belgium)の存在下での酵素反応を使用して検出する。

【0206】

「ピニング」mAbについて、試験抗体(Nanobody(登録商標))の各々の存在下で観察された阻害パーセントを、以下の式により計算する。

【数1】

$$\% \text{ 阻害} = 100 - \left(\frac{1 \mu\text{MのOD450nm試験抗体(またはNanobody)}}{\text{OD450nm参照}} \right) \times 100\%$$

10

【0207】

抗体分子は、50%を超える阻害が観察された場合には一般的に競合すると考えられる。

【0208】

[実施例1~5]

実施例1:抗FX Nanobodies(登録商標)

抗FX Nanobodiesのプールから、FX酵素前駆体を選択的に結合するNanobodiesの群(FXおよび非FXa)を、さらなる研究のために選択した。Nanobodiesの配列は、配列番号8~11および54~57により定義される。「ピニング」抗体としてのmAb 00916(IgG1アイソタイプ、配列番号4および5により特定される可変配列)との競合実験を実施し、Nanobodies Nb 701B09、Nb 701C06、Nb 702C12、Nb 701D07、Nb 721E08、Nb 729A04、Nb 729C08およびNb 730C03は、すべてmAb 00916と競合することが示された。FXの異なる領域に結合する制御Nanobody(登録商標)、Nb 501A02(配列番号12)も含まれ、このNanobody(登録商標)についてはmAb 00916との競合は観察されなかった。結果を以下の表1に示し、Nb 501A02を除くすべての化合物が、FXに結合するために、すなわち、mAb 00916と同一または重複するFX上のエピトープに結合するために、mAb 00916と競合していることを示す。

20

30

【表 1】

表 1 : F X 酵素前駆体に結合し、mAb 00916 と競合する Nanobody (登録商標) (Nb)

Nanobody (登録商標) ID	mAb 00916 との競合
Nb 701B09 (配列番号 8)	+
Nb 701C06 (配列番号 9)	+
Nb 702C12 (配列番号 10)	+
Nb 701D07 (配列番号 11)	+
Nb 501A02 (配列番号 12)	—
Nb 721E08 (配列番号 54)	+
Nb 729A04 (配列番号 55)	+
Nb 729C08 (配列番号 56)	+
Nb 730C03 (配列番号 57)	+

10

20

【0209】

実施例 2 : F X に結合する抗 F X Nanobody (登録商標) の SPR 分析

精製された抗 F X Nanobodies (Nb) のヒト血漿由来 F X (Haematologic Technologies Inc, USA) への結合を、Surface Plasmon Resonance (SPR) (Biacore T200) によりプローブした。

【0210】

簡潔に述べると、標準アミンカップリング化学を使用して、抗 His mAb (R&D systems 製の MAB050) を CM4 センサーチップ上に固定した。表 3 に従い、抗 F X Nanobodies (10 nM) を、10 μ L / 分の流速で 1 分間注入した。その後、4096、1024、256、64、16、4、および 0 nM の F X を 30 μ L / 分の流速で 4 分間注入し、抗 F X Nb への結合を許容し、続いて、泳動用緩衝液 (10 mM HEPES、150 mM NaCl、5 mM CaCl₂、0.05% (v/v) Surfactant P20、1 mg/mL のウシ血清アルブミン、pH 7.4) を 5 分間注入して、抗 F X Nanobody (登録商標) からの解離を許容した。泳動用緩衝液はまた、抗 F X Nb および F X 試料の希釈にも使用された。チップの再生を、3 M の MgCl₂ からなる再生緩衝液、30 秒間の接触時間、および 30 μ L / 分の流速を使用して達成した。結合データを 25 で収集し、製造者 (Biacore AB, Uppsala, Sweden) により供給された BiaEvaluation 4.1 を使用する 1 : 1 モデルにより解析した。

30

40

【0211】

すべての場合において、結合センソグラムは、運動分析に基づく K_D 決定を除外する運動プロファイルに結合する迅速なオンおよび迅速なオフを示した。したがって、報告された K_D 値を、定常状態解析に基づいて決定する。解析により、表 2 に報告された結合定数を得た。特定された最も強い結合剤は Nb 702C12 であり、一方、試験された他の Nanobodies (登録商標) は、わずかに高い K_D および低い R_{max} で F X に結合する。

【表 2】

表2：SPR解析により決定された場合の、抗FX Nanobodies（登録商標）のヒト血漿由来FXとの相互作用についての定常状態解析に基づく推定結合定数

FX結合剤	K _D	R _{max}
Nb 701B09	2.1 μM	17
Nb 701C06	0.96 μM	14
Nb 701D07	2.4 μM	15
Nb 702C12	1.2 μM	30

10

【0212】

実施例3：FXa生成アッセイにおける抗FX Nanobodiesの活性

FIXa媒介型FX活性化を促進する一価の抗FX Nanobody（登録商標）（Nb）の能力を、Scheifflingerら（2008）J Thromb Haemost, 6:315-322で概説されるように、複数のメカニズムを通じて生じると考えられている。また、同じく活性化ペプチドに結合することが見出されたmAb 13F62のFab（IgG1アイソタイプ、配列番号6および7により特定された可変配列）も、比較のために含んだ。さらに、ACE910の抗FXアームに対応する、US9,334,331（当該公報のJ327およびL404-k）、ならびにより最近ではWO2018/021450（当該公報のJ327 D31HおよびJYL280）およびWO2018/098363（配列番号427により表されるBIIB-12-917および当該公報の615）に開示されるような抗FX抗体は、抗FIX/抗FX二特異性FVII模倣化合物の一部としての使用に好適であると明記されており、それらをさらに比較のために含んだ。

20

【0213】

各化合物を、0~1000 nM、0~2000 nM、0~4000 nMまたは0~8000 nMの濃度範囲で、1~1.5 nMのヒト血漿由来FIXa（Haematologic Technologies Inc, USA）およびアッセイ緩衝液（50 mM HEPES、100 mM NaCl、5 mM CaCl₂、0.1%（w/v）PEG8000、1 mg/mL ウシ血清アルブミン、pH 7.3）中の500 μMの25:75の比率のホスファチジルセリン：ホスファチジルコリンリン脂質小胞（Haematologic Technologies Inc, USA）で10分間ブレインキュベートすることにより、個別に試験した。ヒト血漿由来FX（Haematologic Technologies Inc, USA）の100 nMの最終濃度および50 μLの反応物体積への添加により反応を開始した。攪拌（1000 RPM）しながら室温で20分間活性化した後、25 μLのクエンチ緩衝液（50 mM HEPES、100 mM NaCl、60 mM EDTA、0.1%（w/v）PEG8000、1 mg/mL ウシ血清アルブミン、pH 7.3）の添加により、反応物をクエンチした。25 μLの2 mMのS-2765発色基質（Chromogenix, Sweden）を添加することにより、生成されたFXaの量を決定し、続いて、マイクロプレートリーダーで10分間、405 nmでの吸光度を測定することにより、発色基質変換を決定した。405 nmの吸光度（Abs 405 / 分）において観察された変化を、二次結合方程式（式1）に適合して、ピーク刺激活性およびEC50を得た。

30

40

【0214】

表3は、FXa生成速度の適合最大増大（FX活性化における倍増）および適合K_D値を列挙している。試験されたNanobodiesのほとんどは、FIXa媒介性FX活

50

性化 (F I X a 単独に対して約 4 ~ 約 8 3 倍) を刺激し、一方、m A b 1 3 F 6 2 の F a b は、1 . 5 倍の活性化を示し、N b 5 0 1 A 0 2 は活性化を示さなかった。1 3 F 6 2 の F a b および F I X a 単独については、適合 E C 5 0 値は提供されない。
【数 2】

式 1 :

$$Y_i = \frac{[FX] + [\text{結合剤}]_i + K_D - \sqrt{([FX] + [\text{結合剤}]_i + K_D)^2 - 4 \cdot [FX] \cdot [\text{結合剤}]_i}}{2 \cdot [FX]} \cdot (Y_{\max} - Y_0) + Y_0$$

10

【 0 2 1 5 】

式中、 Y_i は、所与の F X 結合剤濃度 (i) で観察された基質変換 (A b s 4 0 5 / 分) であり、 $[FX]$ および $[\text{結合剤}]$ は、それぞれ総濃度 F X および F X 結合剤であり、 K_D は、F X 結合剤の明確な解離定数であり、 Y_{\max} および Y_0 は、それぞれ最大および初期シグナル (A b s 4 0 5 / 分) である。

【表 3】

表3：F I X a 媒介F X活性化に対するF X結合剤の効果。推定 K_D （平均値 \pm SD、 $n=3$ ）およびF I X a 単独に対するF X活性化における増加（平均値 \pm SD、 $n=3$ ）。

FX結合剤	推定 K_D (nM)	FX活性化における増加 (倍数)
Nb 701B09	72. 3 \pm 16. 3	83. 0 \pm 13. 1
Nb 701C06	41. 9 \pm 8. 1	26. 0 \pm 6. 7
Nb 701D07	66. 1 \pm 25. 0	17. 2 \pm 6. 2
Nb 702C12	75. 4 \pm 34. 2	18. 9 \pm 3. 0
Nb 721E08	約1700	25より大きい
Nb 729A04	83. 2 \pm 39. 4	4. 1 \pm 0. 1
Nb 729C08	約1400	32より大きい
Nb 730C03	63. 9 \pm 41. 5	9. 2 \pm 0. 3
Nb 501A02	802 \pm 505	0. 8 \pm 0. 1
mAb 13F62のFab	3. 1 \pm 2. 9	1. 5 \pm 0. 1
Fab ACE910 抗FX (J327/L404-k) *	約3900	0. 6より小さい
一価のJ327 D31H/ JYL280**	62. 3 \pm 52. 7	0. 45 \pm 0. 4
一価のBIIB-12- 917***	N/A	効果なし
FIXa単独	N/A	1. 0

N/Aは、FX結合剤の不在および存在を比較する際に、FX活性化に対する効果が観察されない場合を指す。FXを所与のFX結合剤で飽和できない場合、したがってプラトーに達することができない場合には、FX活性化に対する効果を、観察された最大効果「より大きい」／「より小さい」として示し、推定 K_D を「約」で示す。*はUS9, 334, 331を参照、**はW02018/021450を参照、***はW02018/098363を参照されたい。

【0216】

実施例4：F X a アミド分解活性に対する抗F X Nanobodies の効果
 実施例3において観察された活性化における倍増が、F X a アミド分解活性に対するNanobodies の陽性効果に起因する可能性を除外するために、F X a アミド分解活性を刺激する一価の抗F X Nanobodies の能力を以下のとおり調査した。5 nM ヒト血漿由来F I X a (Haematologic Technologies Inc, USA) を、アッセイ緩衝液 (50 mM HEPES、100 mM NaCl、5 mM CaCl₂、0. 1% (w/v) PEG 8000、1 mg/mL ウシ血清アルブミン、pH 7. 3) 中の50 μ Mの25：75の比率のホスファチジルセリン：ホスファチジルコリンリン脂質小胞 (Haematologic Technologies Inc, USA) で10分間ブレインキュベートした。ヒト血漿由来FX (Haematologic Technologies Inc, USA) を、100 nMの最終濃度および40 μ Lの最終活性化体積で反応物に添加した。攪拌 (1000 RPM) しながら室温で20分間インキュベートした後、25 μ Lのクエンチ緩衝液 (50 mM HEPES、100 mM NaCl、60 mM EDTA、0. 1% (w/v) PEG 8000、1 mg

/mL ウシ血清アルブミン、pH 7.3) の添加により、FX 活性化反応を終了した。その後、10 μL の 25 μM の個々の FX 結合剤を、生成された FXa に添加して、25 μL の 2 mM S-2765 発色基質 (Chromogenix, Sweden) を添加し、マイクロプレートリーダーにおいて 405 nm での吸光度 (Abs 405 / 分) の測定により、発色基質変換を決定した。相対的 FXa アミド分解活性 (a_{rel}) は、以下の式 2 を使用して計算され、

【数 3】

$$a_{rel} = \frac{a_{FXa \cdot \text{結合剤}}}{a_{FXa}}$$

10

式 2 :

【0217】

結合剤は、FXa / FX 結合剤複合体のアミド分解活性であり、 a_{FXa} は、FXa 単独のアミド分解活性である。

【0218】

表 4 は、個々の FX 結合剤についての相対的な FXa アミド分解活性を示し、増加した FX 活性化は、増加した FXa アミド分解活性を有する Nanobodies (登録商標) によるものではないことが結論付けられた。

20

【表 4】

表 4 : 遊離 FXa に対する FX 結合剤の存在下での FXa アミド分解活性 (平均値 ± SD、n = 2 - 3)

FX 結合剤	FXa アミド分解活性 (遊離 FXa に対して、倍数)
Nb 701B09	1.06 ± 0.10
Nb 701C06	1.06 ± 0.15
Nb 701D07	1.05 ± 0.63
Nb 702C12	1.05 ± 0.04
Nb 721E08	1.07 ± 0.01
Nb 729A04	1.11 ± 0.01
Nb 729C08	1.09 ± 0.05
Nb 730C03	1.01 ± 0.03
mAb 13F62	0.94 ± 0.06
Fab ACE910 抗FX (J327/L404-k) *	1.02 ± 0.05
一価の J327 D31H/JYL280 **	0.98 ± 0.004
一価の BIIB-12-917 ***	0.95 ± 0.02
遊離 FXa	1.00 ± 0.02

30

40

* US9, 334, 331 参照

** W02018/021450 参照

*** W02018/098363 参照

50

【0219】

実施例5：抗FX Nanobodies（登録商標）の結合エピトープ

抗FX Nanobodies（登録商標）およびmAb 13F62抗体の結合エピトープがヒトFXの活性化ペプチド（AP）内に位置しているかどうかを判定するために、ELISAアッセイをセットアップした。

【0220】

1つのアミノ酸間隔を有する活性化ペプチドの52個の残基にわたる41個のユニークな12量体ペプチド断片を、マイクロタイタープレートウェル中に固定し、続いて、Nanobody（登録商標）/抗体を用いたインキュベーションを行って試験し、二次HRP標識抗体の添加により結合リガンドの検出を実施した。

10

【0221】

ペプチドをビオチンにC末端結合し、50 μ Lの1 μ g/mLペプチド溶液を使用して、1 μ g/mLのストレプトアビジンで予め被覆されたマイクロタイタープレートの個別ウェル中に固定した。各ウェルを洗浄緩衝液（10 mM Tris、150 mM NaCl、2.5 mM CaCl_2 、0.05% Tween 20、pH 8.60）で洗浄し、続いて50 μ Lの2 μ g/mLのFLAGタグ付き抗FX Nanobody（登録商標）を添加して試験した。1時間後、非結合型Nanobody（登録商標）/抗体を、洗浄緩衝液を使用して洗浄した。

【0222】

結合抗FX活性化ペプチドリガンドを、まずHRP標識二次抗体（FLAGタグ付けNanobodiesについてはAnti-FLAG mAb M2-Peroxidase（HRP）（Sigma Aldrich, US）、抗体についてはFc Fragment Specific Peroxidase AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Human IgG（Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., US）またはPeroxidase AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG（Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., US）を1時間結合し、次いで100 μ LのTMB-1 ELISA基質（Kem-En-Tec Diagnostics, Denmark）を添加することにより検出した。

20

30

【0223】

次いで、各FX結合剤による一組のペプチド（表5）結合に含まれる共通配列を特定することにより、ベースラインを上回るシグナルを生じさせる一組のペプチドから最小エピトープを推定した。エピトープの第1の残基を、第1の連続的なELISA陽性ペプチドにおける最後のアミノ酸により定義し、一方で、エピトープの最後の残基を、最後の連続的なELISA陽性ペプチドの第1の残基として定義した。

【0224】

したがって、表5は、いくつかの異なる抗FX Nanobodies（登録商標）（Nb）および抗FX mAb 13F62についてのFX AP全体にわたる連続ペプチドからのELISAシグナルを示す。ELISAシグナルは、バックグラウンドシグナル（bbg）に対して正規化されている。灰色の領域は、最小エピトープを決定するために使用される陽性結合シグナルを示す。

40

【表 5 - 1】

表 5 : エピトープ/特定

エピトープ/特定	配列番号	13F62	701B09	701C06	701D07	702C12	501A02	721E08	729A04	729C08	730C03
空		1. 00	1. 00	1. 00	1. 00	1. 00	1. 00	1. 00	1. 00	1. 00	1. 00
SVAAATSSSGEA	13	2. 55	0. 76	0. 92	0. 76	0. 96	0. 74	2. 25	0. 92	1. 14	1. 21
VAAATSSSGEAP	14	2. 70	0. 73	0. 93	0. 84	1. 02	0. 88	2. 13	0. 99	1. 09	1. 24
AQATSSSGEAPD	15	1. 89	0. 75	0. 91	0. 89	0. 97	0. 79	1. 92	1. 08	1. 17	1. 19
QAATSSSGEAPDS	16	1. 82	0. 77	0. 94	0. 81	0. 96	0. 82	1. 97	1. 08	1. 12	1. 14
ATSSSGEAPDSI	17	3. 20	0. 82	0. 91	0. 86	0. 98	0. 82	2. 27	1. 24	1. 13	1. 19
TSSSSGEAPDSII	18	0. 68	0. 97	0. 87	0. 75	0. 77	0. 76	2. 20	1. 12	1. 06	1. 20
SSSGEAPDSIITW	19	0. 77	0. 84	0. 90	0. 73	0. 86	0. 82	1. 99	1. 24	1. 10	1. 21
SSSGEAPDSIITWK	20	0. 73	0. 89	0. 89	0. 74	0. 88	0. 71	2. 01	0. 96	1. 06	1. 22
SGEAPDSIITWKP	21	0. 82	0. 84	0. 88	0. 78	0. 88	0. 76	2. 15	0. 98	1. 07	1. 18
GEAPDSIITWKPY	22	1. 50	0. 86	0. 90	0. 80	0. 93	0. 94	2. 26	1. 05	1. 15	1. 24
EAPDSIITWKPYD	23	1. 64	0. 79	0. 89	0. 76	0. 97	0. 76	2. 35	1. 01	1. 11	1. 24
APDSIITWKPYDA	24	1. 59	0. 82	0. 96	0. 90	1. 06	0. 74	2. 29	1. 04	1. 09	1. 16
PDSIITWKPYDAA	25	1. 89	0. 83	0. 92	0. 84	1. 05	0. 79	2. 40	0. 95	1. 17	1. 24
DSIITWKPYDAAAD	26	3. 61	0. 76	0. 93	0. 89	1. 08	0. 79	2. 18	1. 05	1. 09	1. 22
SITWKPYDAAUL	27	7. 95	0. 84	0. 94	1. 04	1. 08	0. 71	2. 28	1. 13	1. 11	1. 18
ITWKPYDAAULD	28	4. 23	0. 83	1. 03	0. 89	1. 10	0. 74	2. 08	1. 28	1. 06	1. 20
TWKPYDAAULDLP	29	1. 95	0. 92	1. 00	0. 91	1. 13	0. 74	2. 26	0. 99	1. 17	1. 26
WKPYDAAULDPT	30	1. 18	1. 14	0. 99	0. 85	0. 89	0. 74	1. 83	1. 20	1. 08	1. 14
KPYDAAULDPTIE	31	0. 77	0. 88	0. 90	0. 73	0. 80	0. 82	1. 89	1. 33	1. 10	1. 17
PYDAAULDPTEN	32	0. 84	0. 88	0. 82	0. 73	0. 83	0. 79	2. 05	1. 06	1. 08	1. 20
YDAAULDPTENP	33	0. 84	0. 81	0. 85	0. 75	0. 87	0. 71	2. 21	1. 06	1. 09	1. 28
DAADLDPTENPF	34	0. 77	0. 81	0. 85	0. 70	0. 88	0. 88	2. 30	1. 10	1. 18	1. 24
AADLDPTENPFD	35	0. 77	0. 79	0. 82	0. 69	0. 88	0. 79	2. 22	1. 05	1. 17	1. 21
ADLDPTENPFDL	36	1. 25	0. 73	0. 87	0. 77	0. 91	0. 71	2. 34	0. 98	1. 11	1. 25
DLDPTEPFLL	37	26. 45	0. 82	0. 88	0. 74	1. 00	0. 79	2. 48	1. 06	1. 21	1. 26
LDPTENPFLLD	38	31. 00	0. 84	0. 94	0. 80	1. 11	0. 91	2. 29	1. 91	1. 58	1. 30
DPTENPFLLDF	39	29. 75	2. 87	1. 51	1. 39	4. 16	0. 88	2. 27	4. 03	1. 95	1. 68

10

20

30

40

【表 5 - 2】

エпитープ残基	配列番号	13F62	701B09	701C06	701D07	702C12	501A02	721E08	729A04	729C08	730C03
PTENPFLLDFN	40	30.11	3.91	1.61	1.29	4.58	0.88	2.35	5.18	2.06	1.62
TENPFLLDFNQ	41	29.68	4.38	1.74	1.44	4.84	1.09	2.54	9.12	3.14	2.10
ENPFLLDFNQT	42	28.68	3.43	1.56	1.27	4.00	0.82	2.88	17.83	8.06	6.57
NPFLLDFNQIQ	43	28.61	2.16	1.29	0.96	3.13	0.94	2.28	8.27	3.41	2.82
PFLLDFNQIQP	44	29.73	3.48	1.50	1.13	4.95	0.79	2.50	1.41	1.18	1.23
FLDFNQIQPE	45	30.57	3.27	1.41	0.99	4.38	0.85	3.01	1.58	1.15	1.28
DLDFNQIQPER	46	0.82	1.17	1.13	0.81	3.08	0.76	2.45	1.12	1.22	1.18
LLDFNQIQPERG	47	0.86	1.09	1.03	0.80	1.88	0.79	2.30	1.10	1.13	1.10
LDNFQIQPERGD	48	0.80	0.82	0.93	0.79	0.97	0.74	2.21	0.98	1.12	1.14
DLDFNQIQPER	49	1.23	0.87	0.87	0.75	0.94	0.71	2.25	0.97	1.10	1.16
FNQIQPERGDNN	50	1.77	0.89	0.88	0.82	1.00	0.71	2.16	1.05	1.08	1.16
NOTQPERGNNL	51	2.45	0.79	0.85	0.87	0.92	0.71	2.02	1.13	1.09	1.22
QIQPERGNNLI	52	1.95	0.72	0.93	0.79	0.88	0.76	1.96	1.11	1.04	1.10
TOPERGNNLIIR	53	8.86	0.93	0.97	0.88	1.05	0.85	1.97	1.09	1.37	1.06

10

20

30

40

【0225】

各 F X 結合剤について、最小エピトープを E L I S A 陽性ペプチド間に共通なアミノ酸配列として定義した。決定された A P 内の最小エピトープを表 6 に要約する。

【表 6】

表6：抗FX Nanobodies（登録商標）およびmAb13F62の最小エピトープ配列

FX結合剤	APにおけるエピトープ	最小エピトープ配列
Nb 701B09	33～38	FDLLDF
Nb 701C06	33～38	FDLLDF
Nb 701D07	32～38	PFDLLDF
Nb 702C12	35～38	LLDF
Nb 721E08	33～40	FDLLDFNQ
Nb 729A04	33～37	FDLLD
Nb 729C08	31～37	NPFDLLD
Nb 730C03	31～38	NPFDLLDF
mAb13F62	33～36	FDLL
Nb 501A02	APにおいてエピトープは検出されなかった	

10

【0226】

20

表5および6のデータを表3のデータと関連させることにより、FX上の最小エピトープが例えば「PFDLLDF」であるFX結合剤について、FX活性化を刺激する能力が観察されることが観察される。

【0227】

続いて、表6から、共通最小エピトープを「LL」として特定することができる。

【0228】

本明細書では、本発明の特定の特徴が例示および説明されているが、当業者には多数の修正、置換、変更、および同等物が思い浮かぶであろう。したがって、添付の特許請求の範囲が、本発明の真の趣旨の範囲内にあるそのようなすべての修正および変更を網羅することを意図していることが理解されるべきである。

30

【配列表】

2021502984000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2018/081296

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/36
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2007/041978 A1 (HATTORI KUNIHIRO [JP] ET AL) 22 February 2007 (2007-02-22) cited in the application column 3	1-4, 6-9, 11-15
A	----- SCHEIFLINGER F ET AL: "Enhancement of the enzymatic activity of activated coagulation factor IX by anti-factor IX antibodies", JOURNAL OF THROMBOSIS AND HAEMOST, WILEY INTERSCIENCE, ENGLAND, vol. 6, no. 2, 1 February 2008 (2008-02-01), pages 315-322, XP008122315, ISSN: 1538-7836 cited in the application ----- -/-	1-15

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 February 2019

Date of mailing of the international search report

18/02/2019

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Scheffzyk, Irmgard

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2018/081296

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 3 159 006 A1 (CHUGAI PHARMACEUTICAL CO LTD [JP]) 26 April 2017 (2017-04-26) claims 1-15 -----	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2018/081296

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2007041978 A1	22-02-2007	AT 518952 T	15-08-2011
		AU 2003271174 A1	27-04-2005
		AU 2004280421 A1	21-04-2005
		BR P10415230 A	12-12-2006
		CA 2541671 A1	21-04-2005
		CN 1890369 A	03-01-2007
		DK 1688488 T3	26-09-2011
		EP 1688488 A1	09-08-2006
		EP 2289944 A2	02-03-2011
		EP 3085783 A1	26-10-2016
		ES 2370250 T3	13-12-2011
		IL 174794 A	30-11-2011
		KR 20060111497 A	27-10-2006
		KR 20130018932 A	25-02-2013
		MX PA06003831 A	03-07-2006
		NO 338686 B1	26-09-2016
		NZ 546509 A	26-03-2010
		RU 2006115614 A	20-11-2007
		TW I354676 B	21-12-2011
		UA 95438 C2	10-08-2011
		US 2007041978 A1	22-02-2007
		WO 2005035753 A1	21-04-2005
		WO 2005035756 A1	21-04-2005
EP 3159006 A1	26-04-2017	AU 2015275440 A1	12-01-2017
		BR 112016029316 A2	20-02-2018
		CA 2951622 A1	23-12-2015
		CN 106559987 A	05-04-2017
		EP 3159006 A1	26-04-2017
		JP W02015194233 A1	20-04-2017
		KR 20170015517 A	08-02-2017
		SG 11201610581R A	27-01-2017
		TW 201625299 A	16-07-2016
		US 2017253663 A1	07-09-2017
		WO 2015194233 A1	23-12-2015

フロントページの続き

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

(72)発明者 カリーナ・トアン

デンマーク・2880・バウスヴェア・ノヴォ・アレー・(番地なし)

(72)発明者 ミッケル・ノルス・ハーンダール

デンマーク・2880・バウスヴェア・ノヴォ・アレー・(番地なし)

(72)発明者 マリー・アンジュ・ピュイセ

ベルギー・9820・メレルベーク・ブルゲ・エー・ロンセストラート・23

(72)発明者 エヴリン・デ・タヴェルニエ

ベルギー・9831・ドゥールレ・ヴェインハールト・16

(72)発明者 ソレン・ステフェンセン

ベルギー・1040・エテルベーク・リュ・アントワヌ・ゴーティエ・66

Fターム(参考) 4C085 AA14 BB14 BB50 CC21 DD61 EE01

4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA65 DA75 DA76 EA20 EA50 FA71

FA74 GA26