

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6584397号
(P6584397)

(45) 発行日 令和1年10月2日(2019.10.2)

(24) 登録日 令和1年9月13日(2019.9.13)

(51) Int.Cl.	F 1
C07K 16/18	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)
A61P 7/04	(2006.01)
C12N 15/13	(2006.01)
C07K	16/18
A61K	39/395
A61P	7/04
C12N	15/13

請求項の数 6 (全 51 頁)

(21) 出願番号	特願2016-526655 (P2016-526655)	(73) 特許権者	509091848 ノヴォ・ノルディスク・アー/エス デンマーク、パウスヴェア・ディーケー- 2880、ノヴォ・アレー
(86) (22) 出願日	平成26年7月18日(2014.7.18)	(74) 代理人	100108453 弁理士 村山 靖彦
(65) 公表番号	特表2016-525519 (P2016-525519A)	(74) 代理人	100110364 弁理士 実広 信哉
(43) 公表日	平成28年8月25日(2016.8.25)	(74) 代理人	100133400 弁理士 阿部 達彦
(86) 國際出願番号	PCT/EP2014/065491	(72) 発明者	イエス・トアン・クラウセン デンマーク・DK-2880・パウスヴェ ア・ノヴォ・アレー・(番地なし)・ノヴ オ・ノルディスク・アー/エス
(87) 國際公開番号	W02015/007880		
(87) 國際公開日	平成27年1月22日(2015.1.22)		
審査請求日	平成29年7月14日(2017.7.14)		
(31) 優先権主張番号	13177184.2		
(32) 優先日	平成25年7月19日(2013.7.19)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	歐州特許庁(EP)		
(31) 優先権主張番号	61/856,869		
(32) 優先日	平成25年7月22日(2013.7.22)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】凝血促進活性を誘発することができる組織因子経路インヒビターのN末端部分を認識する抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒトTFPI(配列番号1)のアミノ酸残基1~79に存在するエピトープに特異的に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントであって、

重鎖が、

- 配列番号4のアミノ酸31~35(SYGVH)であるCDR1配列、
- 配列番号4のアミノ酸50~65(VIWRGGSTDFNAAFMS)であるCDR2配列、及び
- 配列番号4のアミノ酸98~110(NSHGNVGYAMDY)であるCDR3配列

を含み、

軽鎖が、

- 配列番号5のアミノ酸24~34(KASENVGAAVA)であるCDR1配列、
- 配列番号5のアミノ酸50~56(SASNRYT)であるCDR2配列、及び
- 配列番号5のアミノ酸89~96(QQYTNYPT)であるCDR3配列

を含み、前記抗原結合フラグメントが、ヒトTFPI(配列番号1)のアミノ酸残基1~79に存在するエピトープに特異的に結合しTFPI活性を阻害する能力を維持している、抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項2】

ヒトTFPI(配列番号1)のアミノ酸残基1~79に存在するエピトープに特異的に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントであって、

重鎖が、

10

20

- 配列番号6のアミノ酸31～35(NYGVH)であるCDR1配列、
- 配列番号6のアミノ酸50～65(VIWRGGSIDYNAAFMS)であるCDR2配列、及び
- 配列番号6のアミノ酸98～110(NSHGNVGYAMDY)であるCDR3配列

を含み、

軽鎖が、

- 配列番号7のアミノ酸24～34(KASQSVGPAA)であるCDR1配列、
- 配列番号7のアミノ酸50～56(SASNRYT)であるCDR2配列、及び
- 配列番号7のアミノ酸89～96(QQYTSYPT)であるCDR3配列

を含み、前記抗原結合フラグメントが、ヒトTFPI(配列番号1)のアミノ酸残基1～79に存在するエピトープに特異的に結合しTFPI活性を阻害する能力を維持している、抗体又はその抗原結合フラグメント。

10

【請求項3】

Fab、Fab'、Fab₂、Fab'₂、FabS、Fv、単鎖Fv(scFv)、及びdsFvフラグメントからなる群から選択され、単離されたCDR又は抗原結合残基若しくはポリペプチドが、機能的な抗体フラグメントを形成するように、一緒に会合又は連結されることができる、請求項1又は2に記載の抗原結合フラグメント。

【請求項4】

請求項1から3のいずれか一項に記載の単離された抗体又はその抗原結合フラグメントと、少なくとも1つの薬学的に許容できる賦形剤とを含む、医薬製剤。

20

【請求項5】

医薬としての使用のための、請求項1から3のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント又は請求項4に記載の医薬製剤。

【請求項6】

先天性、後天性及び/又は医原性凝血障害を治療するための、請求項1から3のいずれか一項に記載の抗体若しくはその抗原結合フラグメント又は請求項4に記載の医薬製剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、組織因子経路インヒビター(TFPI)のN末端部分にあるエピトープに特異的に結合することができる凝血促進性抗体及びその組成物に関する。本発明は、そのような抗体の薬学上及び治療上の使用にも関する。

30

【背景技術】

【0002】

出血している個体において、血管外TFが血中のFVIIaに曝露されると、組織因子(TF)/活性型第VII因子(FVIIa)複合体によって凝固が開始される。TF/FVIIa複合体の形成により、第X因子(FX)のFXaへの活性化がもたらされ、FXaは、活性型第V因子(FVa)と共に僅かな量のトロンビンを生成する。初期量のトロンビンが血小板を活性化すると、それにより活性型第VIII因子(FVIIIa)及び活性型第IX因子(FIXa)からなるテナーゼ複合体の会合並びに結合を支援する血小板リン脂質が表面曝露される。テナーゼ複合体は、FXの活性化に非常に効果的な触媒であり、このステップで生成されるFXaは、最終的なトロンビンバーストに関与するFVa/FXa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。トロンビンは、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、フィブリンモノマーは重合してフィブリンネットワークを形成する。急速で大規模なトロンビンバーストは、固形で安定したフィブリン凝塊の形成の必要条件である。

40

【0003】

FVIII又はFIX欠損に起因する不十分なFXa伝播及びトロンビン生成はそれぞれ、A又はB型血友病患者における出血性素因の根本的な原因である。血友病の人々において、FXa生成は、TF/FVIIa複合体によって主に駆動され、FVIII又はFIX欠損は、テナーゼ複合体による未発達なFXa生成をもたらす。しかしながら、組織因子経路インヒビター(TFPI)が、自己調節ループにおいてTF/FVIIa複合体を阻害するので、FXからFXaへのTF/FVIIa媒介活性

50

化は一時的である。フィードバック阻害により、TF/FVIIa/FXa/TFPI複合体が形成される。TFPI阻害の減弱は、凝固を開始する間のFXのTF/FVIIa媒介活性化を延長し、止血を促進する。血友病患者は、例えば、FVIII又はFIX欠損によるテナーゼ活性の低下を患う。これらの患者におけるTFPI阻害の遮断は、不十分なFXa生成を補償し、出血性素因を正常化することができる。

【0004】

TFPIは、遅い密に結合する競合インヒビターであり、FXaとTF/FVIIa複合体の両方の阻害を通してFXの活性化を調節する。TFPIは、直列に配置された3つのクニツツ(Knitz)型ブロテアーゼインヒビタードメイン(KPI 1~3)を含有する。KPI-2がFXaの活性部位に結合し、それを遮断する場合、FXaのTFPI阻害が二相性反応で起こり、その反応は不安定なTFPI-FXa複合体を最初に生じ、次いで密に結合したTFPI-FXa複合体へとゆっくり再配置する。凝固の開始後、TF/FVIIa媒介FXa生成は、TFPIによって強固に下方制御される。FXaが、TF/FVIIa複合体に結合しているか又は細胞膜上でTF/FVIIa複合体の近傍に結合しているかいずれかの場合、FXaのTFPI阻害に関係するように見える過程においてTF/FVIIaは、律速段階としてTFPIによって阻害される(Baughら、J Biol Chem. 1998年；273(8):4378~86頁)。KPI-1は、密なTFPI-FXa複合体の形成に寄与し、TF結合FVIIaの活性部位に直接結合し、また遮断する(Girardら、Nature 1989年；338:518~520頁；Peraramelliら、Thromb. Haemost. 2012年；108:266~276頁)。

【0005】

*in vivo*において、TFPIはいくつかの細胞区画に見出される。TFPIの主要な画分は血管内皮と結合しており、少量の画分は血中を循環している。ヒトには、TFPIの2つのスライスバリアント、即ちTFPIアルファ(TFPI_α)及びTFPIベータ(TFPI_β)が、存在すると記述されている。内皮細胞は、TFPI産生の主要な部位であり、両方のバリアントを発現する。内皮細胞表面における優性形態は、おそらくTFPI_αである。TFPI_αは、血漿中に分泌されるか又は細胞内貯蔵に見出されるかのいずれかであり、特定の刺激に応じて遊離され得る。分泌されたTFPI_αは、全長タンパク質として(10%)又は異なる分子量を持つ修飾タンパク質として(90%)のいずれかで血中を循環し、後者は、例えば、C末端領域の短縮又はリボタンパク質との結合による場合がある。分泌されたTFPI_αは、例えばグリコアミノグリカンとの相互作用によって内皮細胞表面に結合することもできる。TFPI_βは、血小板によつても産生され、その中に貯蔵される。

【0006】

ヒトにおけるTFPIの半減期は、約60~120分間であることが公知であり、正常ヒト血漿の全TFPIの濃度は、約1.0~2.5nMであることが公知である。それに対し、ヒトにおける抗体の半減期は長いことが公知であり、免疫グロブリンサブタイプ、起源及び特異的アミノ酸組成に応じて最長で数週間である。Augustssonら、J Thromb Haemost. 2013年、11:s2、PA 4.14-2に開示されているmAb 0001抗体など特定の公知のTFPI抗体が循環中のTFPIと複合体を形成する場合、血漿中の全TFPIの濃度(遊離TFPI+TFPI/抗体複合体)は、20~40nM程度の高濃度まで上昇することがある(上記Augustssonら)。従ってTFPI抗体の*in vivo*投与により、TFPI/抗体複合体を、投与前の血漿中TFPI濃度より非常に高い濃度にまで蓄積させることができる。TFPI/抗体複合体の阻害活性が完全には中和されない場合、蓄積は、本来凝血促進性であるTFPI抗体の効果を逆転させ、正味の抗凝血効果を得ることができる。

【0007】

本発明者らは、本明細書に開示される抗体及びそれを含む医薬組成物が、そのような制限を解決できると想定する。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】WO2005040219

【特許文献2】米国特許出願第20050238646号

10

20

30

40

50

- 【特許文献 3】米国特許出願第20020161201号
 【特許文献 4】欧州特許第404,097号
 【特許文献 5】WO 93/11161
 【特許文献 6】米国特許第5,677,425号
 【特許文献 7】WO2010/017196
 【特許文献 8】WO2012/135671
 【特許文献 9】WO2012/001087
 【特許文献 10】WO2010/072691
 【非特許文献】
 【0 0 0 9】10
 【非特許文献 1】Baughら、J Biol Chem. 1998年; 273(8):4378 ~ 86頁
 【非特許文献 2】Girardら、Nature 1989年; 338:518 ~ 520頁
 【非特許文献 3】Peraramelliら、Thromb. Haemost. 2012年; 108:266 ~ 276頁
 【非特許文献 4】Augustssonら、J Thromb Haemost. 2013年、11:s2、PA 4.14-2
 【非特許文献 5】Birdら、Science 1988年; 242:423 ~ 426頁
 【非特許文献 6】HustonらPNAS 1988年; 85:5879 ~ 5883頁
 【非特許文献 7】IIIらProtein Eng 1997年; 10:949 ~ 57頁
 【非特許文献 8】Holliger及びHudson、Nat Biotechnol 2005年; 23:1126 ~ 1136頁
 【非特許文献 9】Cai及びGaren、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、93: 6280 ~ 6285頁、1996年20
 【非特許文献 10】Desmyterら、J. Biol. Chem. 277: 23645 ~ 23650頁、2002年
 【非特許文献 11】Bondら、J. Mol. Biol. 2003年; 332: 643 ~ 655頁
 【非特許文献 12】Pharmacology of Monoclonal Antibodies、第113巻、Rosenburg及びMoore編、Springer-Verlag、New York中のPluckthun、1994年:269 ~ 315頁
 【非特許文献 13】Hollingerら、1993年、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90:6444 ~ 6448頁
 【非特許文献 14】Zapataら、1995年、Protein Eng. 8(10):1057 ~ 1062頁
 【非特許文献 15】Antibody Engineering、Methods in Molecular Biology、第248巻、Benny K. C. Lo編
 【非特許文献 16】Angalら、Mol. Immunol. 1993年; 30:105 ~ 8頁30
 【非特許文献 17】Kabatら、(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、U.S. Department of Health and Human Services、NIH出版、91-3242号
 【非特許文献 18】Chothia及びLesk、J. Mol. Biol. 1987年; 196:901 ~ 917頁
 【非特許文献 19】Remington: The Science and Practice of Pharmacy、第19版、1995年
 【非特許文献 20】Durocherら、Nucleic Acid Research、2002年
 【非特許文献 21】Mastら、Arterioscler Thromb Vasc Biol. (2002年) 22:2099 ~ 2104頁
 【非特許文献 22】Kabsch, W.、J.Appl.Crystallogr. (1993)、第26巻、795 ~ 800頁
 【非特許文献 23】Yin, J.ら、Proc Natl Acad Sci U S A. 2003年2月4日(100)第100巻、856 ~ 861頁40
 【非特許文献 24】Berman, H. M. ら、Nucleic Acids Res.、(2000)、第28巻、235 ~ 242頁
 【非特許文献 25】Vagin, A. ら、J.Appl.Crystallogr. (1997)第30巻、1022 ~ 1025頁
 【非特許文献 26】Collaborative Computational Project, N., Acta crystallographic a. Section D. Biological crystallography、(1994)、第50巻、760 ~ 763頁
 【非特許文献 27】Langer, G. ら、Nat Protoc. (2008)、第3巻、1171 ~ 1179頁
 【非特許文献 28】Murshudov, G.N. ら、Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography、(2011)、第67巻、355 ~ 367頁
 【非特許文献 29】Emsley, P. ら、Acta Crystallogr. Sect.D-Biol.Crystallogr.、(2004)、第60巻、2126 ~ 2132頁50

【非特許文献 30】Lee, B.ら、J Mol Biol、(1971)、第55巻、379～400頁

【非特許文献 31】Saff, E. B.ら、Math Intell、(1997)、第19巻、5～11頁

【非特許文献 32】Mastら、Arterioscler Thromb Vasc Biol. (2002) 22:2099～2104頁

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明は、組織因子経路インヒビターのN末端部分にあるエピトープに特異的に結合する抗体に関する。

【課題を解決するための手段】

【0011】

一態様において、本発明は、配列番号1の以下のN末端アミノ酸残基Leu16、Pro17、Leu19、Lys20、Leu21、Met22、Phe25、Cys35、Ala37、Met39、Arg41、Tyr56、Gly57、Gly58、Cys59、Glu60、Gly61、Asn62、Gln63、Arg65、Phe66、Glu67、Glu71及びMet75の少なくとも1つを含むTFPIエピトープに結合するTFPI抗体に関する。

【0012】

本発明の一態様において、TFPI抗体のエピトープは、配列番号1の以下のN末端アミノ酸残基Arg41、Arg65及びGlu67を含む。

【0013】

一態様において、本発明による抗体は、例えば、TFPI-KPI-1への結合についてTF/FVIIaと競合することにより、TF/FVIIa複合体のTFPI阻害を中和する。TFPI(配列番号1)上のTF/FVIIa結合表面又はその部分に結合し、保護し又は立体構造的に修飾し、それによってTFPI-TF/FVIIa相互作用を機能的に遮断するTFPI(1～79)結合抗体は、TF/FVIIa複合体のTFPI阻害を中和することができる。

【0014】

別の態様において、本発明による抗体は、TFPI KPI-2とFXaとが緊密な複合体を形成する反応に対するTFPI KPI-1の刺激効果を中和する。

【0015】

別の態様において、本発明によるTFPI(1～79)抗体は、TFPIの全ての形態に結合し、それを中和する。

【0016】

一態様において、本発明による抗体は、循環中の全TFPIレベルが上昇する状況下でもTFPIを中和し、更にこれらの条件下でトロンビン生成を正常化する。

【0017】

本発明は、TFPI(1～79)にあるエピトープに特異的に結合することができる少なくとも1つの抗体及び少なくとも1つの薬学的に許容できる賦形剤を含む医薬製剤にも関する。

【0018】

本発明の抗体又はそれを含む医薬製剤は、凝血障害の対象の治療においてなど、薬剤として使用することができる。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】100 μg/mL FVIII抗体を添加することによって得られたA型血友病様条件下の正常ヒト血漿(NHP)のプールを使用して測定される、トロンビン生成に対するいくつかのTFPI(1～79)抗体の効果(TGTアッセイ)を示す図である。

【図2】5nM組換え全長TFPI をNHPに添加することによって得られた高TFPI レベルの条件下のNHPのプールを使用して測定される、トロンビン生成に対するいくつかのTFPI(1～79)抗体の効果(TGTアッセイ)を示す図である。A型血友病様条件、100 μg/mL FVIII抗体の添加によって得られた。

【発明を実施するための形態】

【0020】

配列の簡単な説明

10

20

30

40

50

配列番号1は、ヒトTFPI のアミノ酸配列を表す。

配列番号2は、TFPI(1～79)のアミノ酸配列を表す。

配列番号3は、TFPI(1～161)のアミノ酸配列を表す。

配列番号4は、モノクローナル抗体(mAb)2F3の可変重鎖のアミノ酸配列を表す。

配列番号5は、モノクローナル抗体(mAb)2F3の可変軽鎖のアミノ酸配列を表す。

配列番号6は、モノクローナル抗体(mAb)2F22の可変重鎖のアミノ酸配列を表す。

配列番号7は、モノクローナル抗体(mAb)2F22の可変軽鎖のアミノ酸配列を表す。

配列番号8は、モノクローナル抗体(mAb)2F45の可変重鎖のアミノ酸配列を表す。

配列番号9は、モノクローナル抗体(mAb)2F45の可変軽鎖のアミノ酸配列を表す。

配列番号10は、モノクローナル抗体(mAb)1F91の可変重鎖のアミノ酸配列を表す。

10

配列番号11は、モノクローナル抗体(mAb)1F91の可変軽鎖のアミノ酸配列を表す。

配列番号12は、モノクローナル抗体(mAb)2F35の可変重鎖のアミノ酸配列を表す。

配列番号13は、モノクローナル抗体(mAb)2F35の可変軽鎖のアミノ酸配列を表す。

配列番号14は、抗体重鎖をクローニングするために使用したプライマーの核酸配列を表す。

配列番号15は、抗体軽鎖をクローニングするために使用したプライマーの核酸配列を表す。

配列番号16は、Fab 0296の短縮型マウス-ヒトキメラ重鎖のアミノ酸配列を表す。

配列番号17は、モノクローナル抗体mAb 0294及びFab 0296のマウス-ヒトキメラの軽鎖のアミノ酸配列を表す。

20

配列番号18は、タグ付けされたTFPI KPI-1/N末端のアミノ酸配列を表す。

配列番号19は、モノクローナル抗体mAb 0294のマウス-ヒトキメラ重鎖のアミノ酸配列を表す。

配列番号20は、Fab 0295の短縮型マウス-ヒトキメラ重鎖のアミノ酸配列を表す。

【0021】

成熟ヒトTFPI は、酸性N末端領域、リンカー領域が間にある3つ直列のクニッツ型プロテアーゼインヒビタードメイン(KPI-1、KPI-2及びKPI-3)及び塩基性C末端領域からなる276アミノ酸のタンパク質(配列番号1)である。KPI-1、KPI-2及びKPI-3はそれぞれ、配列番号1の残基26～76、残基97～147並びに残基189～239と定義される。成熟TFPI は、最初の181アミノ酸がTFPI と同一である(配列番号1の残基1～181に対応する)グリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)に固定された193アミノ酸のタンパク質であるが、C末端の12アミノ酸の配列はTFPI とは無関係であり、残基193に付加されたGPI-結合を有する。

30

【0022】

本発明は、TFPIの酸性N末端領域及びKPI-1ドメイン又はその任意の部分を表すTFPIの領域を結合することができる抗体に関する。

【0023】

本明細書では、用語「TFPI」は、任意の適当な生物から得ることができるTFPIの天然に存在する任意の形態を包含する。例えば、本明細書に記載の通り使用するTFPIは、ヒト、マウス、ウサギ、ラット、靈長類、ウシ、ヒツジ又はブタTFPIなど哺乳動物のTFPIであることができる。好ましくは、TFPIはヒトTFPIである。TFPIは、適当な細胞の中で翻訳後ブロセッシングを受けたTFPIタンパク質などTFPIの成熟形態であることができる。そのような成熟TFPIタンパク質は、例えば、グリコシル化されてもよい。TFPIは、完全長TFPIタンパク質であってもよい。用語TFPIは、そのようなTFPI分子のバリアント、アイソフォーム及び他のホモログも包含する。TFPIバリアント分子は、FXaの触媒活性を中和する能力又はTF/FVIIa複合体若しくはTF/FVIIa/FXaの3成分複合体を阻害する能力など、天然に存在するTFPIと同じ型の活性を有することによって特徴づけることができる。

40

【0024】

本明細書において用語「抗体」とは、生殖細胞系免疫グロブリン配列から得られるタンパク質のことを指し、抗原又はその部分:即ちTFPI(1～79)に特異的に結合することができる。用語抗体は、任意のクラス(又はアイソタイプ)の完全長抗体、即ちIgA、IgD、IgE、I

50

gG、IgM及び/又はIgYを含む。抗原又はその部分に特異的に結合する抗体は、その抗原又はその部分に独占的に結合することができ、又は限られた数の相同抗原又はその部分に結合することができる。

【0025】

天然の全長抗体は、ジスルフィド結合によって接続される少なくとも4つのポリペプチド鎖:2つの重鎖(H)及び2つの軽鎖(L)を通常含む。一部の場合において、ラクダ科の動物に見られる重鎖のみの抗体(V_H Hフラグメント)及び軟骨魚類に見られるIgNARの場合のように、自然抗体は、4つより少ない鎖からなる。特定の製薬対象の免疫グロブリンの一クラスは、IgGのクラスである。ヒトにおいて、IgGクラスは、重鎖定常領域の配列に基づいて4つのサブクラス: IgG1、IgG2、IgG3及びIgG4に分けることができる。軽鎖は、配列構成の違いに基づいて2つの型: 及び鎖に分けることができる。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る2つの重鎖、及びジスルフィド結合によってそれぞれ重鎖に結合している2つの軽鎖からなる。IgG重鎖は、重鎖可変領域(VH)並びに最大3つの重鎖定常領域(CH):CH1、CH2及びCH3を含むことができる。軽鎖は、軽鎖可変領域(VL)及び軽鎖定常領域(CL)を含むことができる。VH及びVL領域は、フレームワーク領域(FR)と称されるより保存されている領域が間にある相補性決定領域(CDR)又は超可変領域(HVR)と称される超可変性の領域に更に再分割することができる。VH及びVL領域は、以下の順序: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4でアミノ末端からカルボキシ末端へと配置される3つのCDR並びに4つのFRから一般に構成される。重鎖及び軽鎖の超可変領域を持つ可変ドメインは、抗原と相互作用することができるドメインを形成し、一方で抗体の定常領域は、宿主組織又は免疫系の様々な細胞(エフェクター細胞)、Fc受容体並びに古典的な補体系のC1複合体の第1成分(C1q)を含むがそれには限らない因子への免疫グロブリンの結合を媒介することができる。

【0026】

本発明の抗体は、単離されていてもよい。用語「単離された抗体」とは、それが産生された環境中の他の成分から分離及び/若しくは回収された並びに/又はそれが産生された環境中に存在する成分の混合物から精製された抗体のことを指す。

【0027】

単一のB細胞から又はB細胞のクローン集団によって発現される固有の重鎖及び軽鎖可変ドメイン配列の組を表すという意味で、本発明の抗体はモノクローナル抗体であることができる。本発明の抗体は、当業者に公知である様々な方法を使用して産生され、精製され得る。例えば、抗体はハイブリドーマ細胞から産生され得る。抗体は、B細胞増殖によって産生され得る。抗体又はそのフラグメントは、哺乳動物若しくは微生物発現系において、又はin vitro翻訳によって組換的に発現され得る。抗体又はそのフラグメントは、例えば、ファージディスプレイ、細菌ディスプレイ、酵母ディスプレイ、哺乳動物細胞ディスプレイ、リボソーム又はmRNAディスプレイにより細胞表面結合分子として組換的に発現され得る。一旦産生されたら、抗体は、TFPI(1~79)(配列番号2)などのサブドメインを含めたTFPIを結合する能力についてスクリーニングできる。

【0028】

全長抗体のフラグメントによって抗体の抗原結合機能を実施できることが示された通り、抗体の様々な抗原結合フラグメントが、本発明による抗体であってもよい。用語、抗体の「抗原結合フラグメント」とは、ヒトTFPI(1~79)若しくは本明細書に記載の別の標的分子などの抗原に特異的に結合する又はそれを認識する能力を保持する抗体の1つ以上のフラグメントのことを指す。抗原結合フラグメントの例には、Fab、Fab'、Fab₂、Fab'₂、FabS、Fv(一般に抗体の1つのアームのVL及びVHドメイン)、単鎖Fv(scFv;例えばBirdら、Science 1988年; 242:423~426頁;及びHustonら、PNAS 1988年; 85:5879~5883頁を参照のこと)、dsFv、Fd(一般にVH及びCH1ドメイン)、並びにdAb(一般にVHドメイン)フラグメント; VH、VL、VH及びV-NARドメイン; 単一のVH及び単一のVL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、テトラボディ及びボディ(例えば、IIIらProtein Eng 1997年; 10:949~57頁を参照のこと); ラクダIgG; IgNAR; 並びに1つ以上の単離されたCDR又

10

20

30

40

50

は機能的パラトープがあり、単離されたCDR又は抗原結合残基若しくはポリペプチドは、機能的抗体フラグメントを形成するように、一緒に会合又は連結され得る。例えば、抗体フラグメントの様々な型については、Holliger及びHudson、Nat Biotechnol 2005年；23：1126～1136頁；WO2005040219並びに米国特許出願第20050238646号及び第20020161201号に記述又は概説されている。これらの抗体フラグメントは、当業者に公知の従来技術を使用して得ることができ、そのフラグメントは、完全な抗体と同じ方法での有用性についてスクリーニングすることができる。

【0029】

抗体の「Fab」、「Fab'」及び「Fab'₂」フラグメントを含めた「Fabフラグメント」は、抗体の重鎖を接続しているヒンジシステイン残基のN末端又はC末端側でのヒンジ領域における重鎖の切断によって前記抗体から得られる。「Fab」フラグメントは、軽鎖の可変及び定常ドメイン並びに重鎖の可変ドメイン及び第1定常ドメイン(CH1)を含む。「Fab'₂」フラグメントは、そのヒンジシステインによって一般に共有結合されている一対の「Fab'」フラグメントを含む。Fab'は、Fab'₂において重鎖を接続しているヒンジジスルフィド結合の切断によってFab'₂フラグメントから形式的に得られる。抗体フラグメントのジスルフィド結合以外の他の化学的結合も、当業者に公知である。Fabフラグメントは、抗原に結合する親抗体の能力を、場合によってはより低い親和性で保持する。Fab'₂フラグメントは二価結合できるが、Fab及びFab'フラグメントは一価で結合することができる。一般に、Fabフラグメントは定常CH2及びCH3ドメイン、即ちFc部分を欠くが、Fc受容体との相互作用は起こる。従って、Fabフラグメントは、一般にエフェクター機能がない。Fabフラグメントは、当技術分野において公知の方法、即ち抗体の酵素的切断、例えばペプシンを使用してFabを得るか又はペプシンを使用してFab'₂を得るかいずれかによって產生することができ、Fab、Fab'、Fab'₂を含めたFabフラグメントは、当業者に周知の技術を使用して組換的に產生することもできる。

【0030】

「Fv」フラグメントは、完全な抗原認識及び結合部位を含有する抗体フラグメントであり、1つの重鎖及び1つの軽鎖可変ドメインからなる二量体を、本来共有結合であるはずの結合で一般に含み；例えば、一本鎖可変ドメインフラグメント(scFv)である。この構成において、各可変ドメインの3つの超可変領域が相互作用して、VH-VL二量体の表面に抗原結合部位を定義する。全体で、6つの超可変領域又はそのサブセットが、抗体に抗原結合特異性を付与する。しかしながら、完全な結合部位より通常低い親和性だが、抗原に特異的な超可変領域を3つしか含まない单一可変ドメインでも抗原を認識し、結合する能力を保持することができる(Cai及びGaren、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、93：6280～6285頁、1996年)。例えば、重鎖可変ドメイン(VHH)しかない天然に存在するラクダ抗体は、抗原を結合することができる(Desmyterら、J. Biol. Chem. 277：23645～23650頁、2002年；Bondら、J. Mol. Biol. 2003年；332：643～655頁)。

【0031】

「単鎖Fv」又は「scFv」抗体フラグメントは、抗体のVH及びVLドメインを含み、これらのドメインが单一ポリペプチド鎖中に存在する。一般に、Fvポリペプチドは、VHとVLドメインの間にscFvが抗原結合のための所望の構造を形成できるようにするポリペプチドリンクを更に含む。scFvの総説については、Pharmacology of Monoclonal Antibodies、第13巻、Rosenburg及びMoore編、Springer-Verlag、New York中のPlueckthun、1994年：269～315頁を参照のこと。

【0032】

用語「ダイアボディ」とは、2つの抗原結合部位を持つ小さな抗体フラグメントのことを指し、フラグメントは、同じポリペプチド鎖(VH及びVL)内に軽鎖可変ドメイン(VL)に接続された重鎖可変ドメイン(VH)を含む。同じ鎖上にある2つの可変ドメイン間での対合できるには短過ぎるリンクを使用することにより、可変ドメインは、別の鎖の相補ドメインと対合せざる負えず、2つの抗原結合部位が形成される。ダイアボディについては、例えば、欧州特許第404,097号；WO 93/11161；及びHollingerら、1993年、Proc. Natl. Acad.

10

20

30

40

50

. Sci. USA, 90:6444 ~ 6448頁により詳細に説明されている。

【0033】

表現「直鎖状抗体」とは、Zapataら、1995年、Protein Eng. 8(10):1057 ~ 1062頁に記載の抗体のことを指す。簡潔には、これらの抗体は、相補的軽鎖ポリペプチドと共に一対の抗原結合領域を形成する一対の直列のFd部分(VH-CH1-VH-CH1)を含有する。

【0034】

本明細書で使用される用語「モノボディ」とは、重鎖可変ドメインを持ち軽鎖可変ドメインは持たない抗原結合分子のことを指す。モノボディは、軽鎖なしで抗原に結合することができ、3つの超可変領域、例えば、CDRH1、CDRH2及びCDRH3と指定されるCDRを一般に有する。重鎖IgGモノボディは、ジスルフィド結合によって接続された2つの重鎖抗原結合分子を有する。重鎖可変ドメインは、1つ以上の超可変領域、好ましくはCDRH3又はHVL-H3領域を含む。

【0035】

本明細書では用語「抗原」とは、免疫能力のある脊椎動物の免疫化に使用して、抗原を認識する抗体又はそのフラグメントを產生する実体のことを指すことができる。本発明の文脈において、免疫化に適當な抗原には、完全長ヒトTFPI、ヒトTFPI(1 ~ 79)及びヒトTFPI(1 ~ 161)がある。それ以外の場合には、用語抗原は、抗体によって特異的に認識される標的分子を含むことが意図され、従って、免疫化過程において使用される、又は抗体を単離/生成及び特徴づける他の方法、例えばファージディスプレイ、ELISA若しくはSPRに使用される分子のフラグメント若しくは模倣体を含む。

【0036】

本発明による抗体は、TFPIへの結合について天然に存在するリガンド若しくは受容体又は別の抗体など別の分子と競合可能であり、それにより、これらの相互作用と関連する機能に影響を及ぼすことができる。天然リガンド/受容体と競合する抗体の能力は、TFPI阻害に関する見かけの K_i に対する効果を測定する様々な活性アッセイによって評価することができる。次いで K_D 値は、見かけの K_i 値から導き出すことができる。

【0037】

従って抗体フラグメントは、従来の組換え又はタンパク質工学技術を使用して得ることができ、そのフラグメントは、完全抗体と同じ様式でTFPI又はヒトTFPI(1 ~ 79)などそのサブドメインへの結合についてスクリーニングすることができる。

【0038】

本発明の抗体フラグメントは、短縮によって、例えば、ポリペプチドのN及び/又はC端末端からの1つ以上のアミノ酸の除去によって作ることができる。フラグメントは、1つ以上の内部欠失によって生成することもできる。

【0039】

本発明の抗体は、ヒト又はヒト化抗体であることができる。本明細書では用語「ヒト抗体」は、フレームワーク領域の少なくとも一部及び/又はCDR領域の少なくとも一部がヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列から得られる可変領域を有する抗体を含むものとする(例えば、ヒト抗体は、フレームワークとCDR領域の両方がヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列から得られる可変領域を有することができる)。更に、抗体が定常領域を含有する場合、定常領域もヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列から得られる。本発明のヒト抗体は、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列にコードされないアミノ酸残基(例えば、in vitroでランダムな若しくは部位特異的変異生成によって又はin vivoで体細胞変異によって導入された変異)を含むことができる。

【0040】

そのようなヒト抗体は、ヒトモノクローナル抗体であることができる。そのようなヒトモノクローナル抗体は、ハイブリドーマによって產生することができ、そのハイブリドーマは、非ヒトトランスジェニック動物、例えば、ヒト免疫グロブリン重鎖及び軽鎖遺伝子部分レパートリーを含むゲノムを有するトランスジェニックマウスから得られ、不死化細胞に融合されたB細胞を含む。

10

20

30

40

50

【0041】

ヒト抗体は、ヒト生殖細胞系配列の選択に基づいて構築した配列ライブラリから単離され、天然及び合成の配列多様性により更に多様化させることができる。

【0042】

ヒト抗体は、ヒトリンパ球を *in vitro* 免疫化した後に、エプスタインバー (Epstein-Barr) ウィルスでリンパ球を形質転換することによって調製できる。

【0043】

用語「ヒト抗体誘導体」とは、ヒト抗体の修飾された任意の形態、即ちその抗体と別の薬剤又は抗体とのコンジュゲートなどを指す。

【0044】

本明細書では用語「ヒト化抗体」とは、非ヒト免疫グロブリンから得られる配列 (CDR領域又はその部分) を含有するヒト/非ヒトキメラ抗体のことを指す。従ってヒト化抗体は、ヒト免疫グロブリン (レシピエント抗体) であり、レシピエントの超可変領域由来の少なくとも数残基が、マウス、ラット、ウサギ又は非ヒト靈長類など非ヒト種の抗体 (ドナー抗体) の超可変領域由来の残基によって置き換えられており、所望の特異性、親和性、配列構成及び機能を有する。一部の例において、ヒト免疫グロブリンのFR残基が、対応する非ヒト残基によって置き換えられる。そのような修飾の一例は、1つ以上のいわゆる復帰変異の導入であり、一般にドナー抗体から得られるアミノ酸残基である。抗体のヒト化は、当業者に公知の組換え技術を使用して実行することができる (例えば Antibody Engineering, Methods in Molecular Biology、第248巻、Benny K. C. Lo 編を参照のこと)。軽鎖と重鎖両方の可変ドメインに対して適当なヒトレシピエントフレームワークは、例えば、配列又は構造ホモロジーによって同定することができる。別法として、例えば、構造、生物物理学的及び生化学的特性の知見に基づいて、固定のレシピエントフレームワークを使用することができる。レシピエントフレームワークは、生殖細胞系由来である、又は成熟した抗体配列から得ることができる。ドナー抗体由来CDR領域は、CDR移植によって移すことができる。ドナー抗体由来アミノ酸残基の再導入 (復帰変異) がヒト化抗体の特性に有益な影響を及ぼす重要なフレームワークの位置を同定することによって、CDR移植したヒト化抗体を、例えば、親和性、機能性及び生物物理学的特性について更に最適化することができる。ドナー抗体由来復帰変異に加えて、ヒト化抗体は、CDR又はフレームワーク領域における生殖細胞系残基の導入、免疫原性エピトープの除去、部位特異的変異誘発、親和性成熟などによって操作することができる。

10

20

30

【0045】

更にヒト化抗体は、レシピエント抗体にもドナー抗体にも見られない残基を含むことができる。これらの修飾を行って、抗体の性能を更に洗練する。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、一般に2つの可変ドメインを含むことになり、その可変ドメインにおいてCDR領域の全て又は実質的に全ては非ヒト免疫グロブリンに対応しており、FR残基の全て又は実質的に全てはヒト免疫グロブリン配列である。ヒト化抗体は、任意選択で、免疫グロブリン、一般にヒト免疫グロブリンの定常領域 (Fc) の少なくとも一部も含み得る。

【0046】

用語「ヒト化抗体誘導体」とは、ヒト化抗体の修飾された任意の形態、即ちその抗体と別の薬剤又は抗体とのコンジュゲートなどを指す。

40

【0047】

本明細書では用語「キメラ抗体」とは、軽鎖及び重鎖遺伝子が、一般に遺伝子工学によって異なる種に由来する免疫グロブリン可変並びに定常領域遺伝子から構築された抗体のことを指す。例えば、マウスモノクローナル抗体由来遺伝子の可変部分が、ヒト定常領域に接続され得る。

【0048】

抗体のフラグメント結晶化可能領域 (「Fc領域」/「Fcドメイン」) は、抗体のC末端領域であり、定常ドメインCH2及びCH3を含む。Fcドメインは、Fc受容体と呼ばれる細胞表面レセプター及び補体系の一部のタンパク質と相互作用することができる。Fc領域により、抗

50

体は免疫系と相互作用することが可能になる。本発明の一態様において、抗体を操作してFc領域の中に修飾を含め、それにより血中半減期、補体結合、Fc受容体結合、タンパク質安定性及び/又は抗原依存的細胞性細胞毒性、中でも特にその欠失などの機能特性の1つ以上を一般に改変することができる。更に、本発明の抗体は、化学修飾されてもよく(例えば、1つ以上の化学的部分を抗体に結合させることができる)又は修飾してそのグリコシル化を改変し、抗体の1つ以上の機能特性を再度改変してもよい。IgG1抗体は、特定のFc受容体に対する親和性の低下(L234A、L235E及びG237A)及びC1q媒介補体結合の減少(A330S及びP331S)をそれぞれもたらすことになる変異のうち1つ以上、恐らく全てを含む修飾されたFcドメインを保有することができる(EUインデックスによる残基番号付け)。

【0049】

10

本発明の抗体のアイソタイプは、IgG1など、IgG2など、IgG4などのIgGであることができる。必要に応じて、抗体のクラスは、公知の技術によって「スイッチする」ことができる。例えば、IgM分子として当初產生された抗体を、IgG抗体にクラススイッチすることができる。クラススイッチ技術を使用して、1つのIgGサブクラスを別のものへ、例えば:IgG1からIgG2若しくはIgG4へ; IgG2からIgG1若しくはIgG4へ; 又はIgG4からIgG1若しくはIgG2へと変換することもできる。抗体を操作して、異なるIgGサブクラス由来領域の組合せにより定常領域キメラ分子を生成することもできる。

【0050】

一実施形態において、ヒンジ領域中にあるシステイン残基の数が改変される、例えば増減するように、CH1のヒンジ領域は修飾される。この手法については、例えば、Bodmerらによる米国特許第5,677,425号に更に記述されている。

20

【0051】

定常領域を修飾して、抗体を安定化させる、例えば、二価抗体が2つの一価VH-VLフラグメントに分離する危険性を減少させることができる。例えば、IgG4定常領域において、残基S228(EUインデックスによる残基番号付け)に変異を加えてプロリン(P)残基にして、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ことができる(例えばAngalら、Mo I. Immunol. 1993年; 30:105~8頁を参照のこと)。

【0052】

抗体又はそのフラグメントは、その相補性決定領域(CDR)によって定義することができる。本明細書において使用される場合、用語「相補性決定領域」又は「超可変領域」とは、抗原結合に關係するアミノ酸残基が位置している抗体の領域のことを指す。超可変性又はCDRの領域は、抗体可変ドメインのアミノ酸の整列化において最も高い可変性を持つ領域として同定することができる。Kabatデータベースなどのデータベースを使用して、CDRを同定することができ、CDRは、軽鎖可変ドメインのアミノ酸残基24~34(L1)、50~56(L2)及び89~97(L3)並びに重鎖可変ドメイン中の31~35(H1)、50~65(H2)及び95~102(H3)を含むと定義される(Kabatら、(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、U.S. Department of Health and Human Services、NIH出版、91-3242号)。別法として、CDRは、「超可変ループ」の残基(軽鎖可変ドメイン中の残基26~33(L1)、50~52(L2)及び91~96(L3)並びに重鎖可変ドメイン中の26~32(H1)、53~55(H2)及び96~101(H3); Chothia及びLesk、J. Mol. Biol. 1987年; 196:901~917頁)と定義できる。一般に、この領域におけるアミノ酸残基の番号付けは、上記Kabatらに記述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」及び「Kabatによる」などのフレーズは、重鎖可変ドメイン又は軽鎖可変ドメインに対するこの付番方式のことを指す。Kabat付番方式を使用する場合、ペプチドの実際の直鎖状アミノ酸配列は、可変ドメインのフレームワーク(FR)若しくはCDRの短縮、又はそれへの挿入に対応してより少ない若しくは追加のアミノ酸を含有することができる。例えば、重鎖可変ドメインは、CDR H2の残基52の後にアミノ酸挿入(Kabatによる残基52a、52b及び52c)及び重鎖FRの残基82の後に挿入された残基(例えばKabatによる残基82a、82b及び82cなど)を含むことができる。「標準的な」Kabat付番した配列を持つ抗体の配列の相同な領域での整列化によって、所与の抗体について残基のKabat付番を決定することができる。

30

40

50

【0053】

抗体の元のCDRを操作して、例えば、その親和性、機能性及び生物物理学的特性を改善することができる。抗体のCDRは、任意の位置における生殖細胞系残基又は非生殖細胞系残基の導入若しくは付加によって操作することができる。CDRアミノ酸組成の修飾により、予測される免疫原性エピトープの排除、粘性、凝集などの生物物理学的特性の最適化、脱アミド、イソアスパラギン酸形成又はメチオニン酸化部位など修飾ホットスポットの排除を行うことができる。CDRにおけるシステイン残基の除去も、異常なジスルフィド結合の形成又はシャフリングを予防するので望ましい。抗体の生化学的プロファイルの最適化は、例えば、潜在的グリコシル化部位の排除によって得ることもできる。CDR領域の最適化により、产生プロファイルを改善することもできる。パラトープの最適化又は再設計によって、CDR修飾により抗体-抗原界面を最適化することもできる。そのような最適化は、アミノ酸の導入を含むことができ、側鎖化学によって抗原との新規相互作用が可能になる。最適化により、パラトープ-エピトープ相互作用における立体障害の排除又はCDRループ配置、柔軟性若しくは剛性の最適化を得ることもできる。

10

【0054】

前記変異は、例えば、部位特異的変異誘発を使用する設計によって、或は例えば変異性PCR又は合成的に多様化させたDNAフラグメント若しくはPCRプライマーによってランダムにCDR領域に導入することができる。修飾は、同じ抗原に特異的に結合する他の抗体のCDR配列をシャフリングすることにより導入することもできる。

20

【0055】

本明細書に定義されるように、用語「フレームワーク領域」又は「FR」残基とは、CDR内ではないVH又はVLアミノ酸残基のことを指す。

【0056】

本発明の抗体は、Kabat又はChothia付番を使用して又は本明細書に開示される連続的なアミノ酸付番に従って定義されるように、配列番号4～13にあるCDR領域など本明細書に開示される特定の抗体の1つ以上に由来するCDR領域を含むことができる。

【0057】

本発明による抗体は、

- ・配列番号4のアミノ酸31～35(SYGVH)に対応するCDR1配列であり、これらアミノ酸残基の1つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列;及び/又は
- ・配列番号4のアミノ酸50～65(VIWRGGSTDFNAAFMS)に対応するCDR2配列であり、これらアミノ酸の1つ、2つ又は3つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列;及び/又は
- ・配列番号4のアミノ酸98～110(NSHGNVGYAMDY)に対応するCDR3配列であり、これらアミノ酸残基の1つ又は2つが、異なるアミノ酸によって置換されてもよい配列を含む重鎖を有することができる。

30

【0058】

本発明による抗体は、

- ・配列番号5のアミノ酸24～34(KASENVGAAVA)に対応するCDR1配列であり、これらアミノ酸残基の1つ、2つ又は3つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列;及び/又は
- ・配列番号5のアミノ酸50～56(SASNRYT)に対応するCDR2配列であり、これらアミノ酸残基の1つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列;及び/又は
- ・配列番号5のアミノ酸89～96(QQYTNYPT)に対応するCDR3配列であり、これらアミノ酸残基の1つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列を含む軽鎖を有することができる。

40

【0059】

本発明による抗体は、

- ・配列番号6のアミノ酸31～35(NYGVH)に対応するCDR1配列であり、これらアミノ酸残基の1つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列;及び/又は

50

・配列番号6のアミノ酸50～65(VIWRGGS1DYNAAFMS)に対応するCDR2配列であり、これらアミノ酸の1つ、2つ又は3つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列；及び/又は

・配列番号6のアミノ酸98～110(NSHGNVGYAMDY)に対応するCDR3配列であり、これらアミノ酸残基の1つ又は2つが、異なるアミノ酸によって置換されてもよい配列を含む重鎖を有することができる。

【0060】

本発明による抗体は、

・配列番号7のアミノ酸24～34(KASQSVGPAVA)に対応するCDR1配列であり、これらアミノ酸残基の1つ、2つ又は3つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列；及び/又は

・配列番号7のアミノ酸50～56(SASNRYT)に対応するCDR2配列であり、これらアミノ酸残基の1つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列；及び/又は

・配列番号7のアミノ酸89～96(QQYTSYPT)に対応するCDR3配列であり、これらアミノ酸残基の1つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列を含む軽鎖を有することができる。

【0061】

本発明による抗体は、

・配列番号8のアミノ酸31～35(GYGVH)に対応するCDR1配列であり、これらアミノ酸残基の1つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列；及び/又は

・配列番号8のアミノ酸50～65(VIWRGGS1DYNAAFMS)に対応するCDR2配列であり、これらアミノ酸の1つ、2つ又は3つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列；及び/又は

・配列番号8のアミノ酸98～110(NSHGNVGYAMDY)に対応するCDR3配列であり、これらアミノ酸残基の1つ又は2つが、異なるアミノ酸によって置換されてもよい配列を含む重鎖を有することができる。

【0062】

本発明による抗体は、

・配列番号9のアミノ酸24～34(KASQNVGTAVA)に対応するCDR1配列であり、これらアミノ酸残基の1つ、2つ又は3つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列；及び/又は

・配列番号9のアミノ酸50～56(SASNRYT)に対応するCDR2配列であり、これらアミノ酸残基の1つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列；及び/又は

・配列番号9のアミノ酸89～96(QQYTSYPT)に対応するCDR3配列であり、これらアミノ酸残基の1つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列を含む軽鎖を有することができる。

【0063】

本発明による抗体は、

・配列番号10のアミノ酸31～36(SDYAWN)に対応するCDR1配列であり、これらアミノ酸残基の1つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列；及び/又は

・配列番号10のアミノ酸51～66(YISYSGSTSYNPSLKS)に対応するCDR2配列であり、これらアミノ酸の1つ、2つ又は3つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列；及び/又は

・配列番号10のアミノ酸99～104(WAYDGP)に対応するCDR3配列であり、これらアミノ酸残基の1つが、異なるアミノ酸によって置換されてもよい配列を含む重鎖を有することができる。

【0064】

本発明による抗体は、

・配列番号11のアミノ酸24～33(RASSSVSHMH)に対応するCDR1配列であり、これらアミノ酸残基の1つ又は2つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列；及び/又は

10

20

30

40

50

- 配列番号11のアミノ酸49～55(ATSNLAS)に対応するCDR2配列であり、これらアミノ酸残基の1つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列;及び/又は
- 配列番号11のアミノ酸88～96(QQWSSNPFT)に対応するCDR3配列であり、これらアミノ酸残基の1つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列を含む軽鎖を有することができる。

【0065】

本発明による抗体は、

- 配列番号12のアミノ酸31～35(DYYIH)に対応するCDR1配列であり、これらアミノ酸残基の1つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列;及び/又は
- 配列番号12のアミノ酸50～66(WIDPENGNTIFDPKFQG)に対応するCDR2配列であり、これらアミノ酸の1つ、2つ又は3つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列;及び/又は
- 配列番号12(RWYAMDY)のアミノ酸99～105に対応するCDR3配列であり、これらアミノ酸残基の1つが、異なるアミノ酸によって置換されてもよい配列を含む重鎖を有することができる。

【0066】

本発明による抗体は、

- 配列番号13のアミノ酸24～39(KSSQSLLYTNGKTYLN)に対応するCDR1配列であり、これらアミノ酸残基の1つ、2つ又は3つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列;及び/又は
- 配列番号13のアミノ酸55～61(LVSKLDS)に対応するCDR2配列であり、これらアミノ酸残基の1つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列;及び/又は
- 配列番号13のアミノ酸94～102(LQSTHFPWT)に対応するCDR3配列であり、これらアミノ酸残基の1つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列を含む軽鎖を有することができる。

【0067】

本明細書では用語「エピトープ」は、抗体などの「抗原結合ポリペプチド」と対応する抗原と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」とは、抗体が特異的に結合する抗原上のエリア又は、領域、即ち抗体と物理的接触するエリア又は領域のことを指す。物理的接触は、抗体及び抗原分子における原子に関する様々な基準(例えば、3 など、4 など、5 など2～6 のカットオフ距離;又は溶媒接触性)を使用して定義することができる。タンパク質エピトープは、抗体への結合に直接関係する抗原中のアミノ酸残基(エピトープの免疫優性成分とも呼ばれる)、並びに抗体によって効果的に遮断される抗原のアミノ酸残基、即ち抗体の「溶媒排除表面」及び/又は「フットプリント」内のアミノ酸残基など結合に直接関係しない他のアミノ酸残基を含むことができる。

【0068】

特に明記しない限り、本明細書において用語「エピトープ」は、TFPI抗体に特異的に結合するTFPIの任意の領域、又は本発明による別のTFPI特異的薬剤にある結合領域の両方の型を含む。TFPIは、異なるエピトープをいくつか含むことができ、そのエピトープには、それだけには限らないが、(1)直鎖ペプチドエピトープ(2)成熟したTFPI配置において互いに近くに位置する1つ以上の不連続なアミノ酸からなる立体配座エピトープ;及び(3)炭水化物基など、TFPIに共有結合している分子構造の全体又は一部分に存在する翻訳後エピトープがあり得る。

【0069】

所与の抗体/抗原対に関するエピトープは、様々な実験的及びコンピュータによるエピトープマッピング法を使用して異なるレベルの詳細さで記述し、特徴づけることができる。実験的 методには、当業者に公知の方法である;変異生成、X線結晶学、核磁気共鳴(NMR)分光法、水素-重水素交換質量分析(HX-MS)及び様々な競合結合法がある。各方法は固有の原理を利用するので、エピトープの説明は、決定された方法と深く関連する。従って、利用されるエピトープマッピング法によって、所与の抗体/抗原対に関するエピトープは、

10

20

30

40

50

異なって記述されることがある。

【0070】

その最も詳細なレベルでは、抗原と抗体との相互作用に関するエピトープは、抗原抗体相互作用に存在する原子接触を定義する空間座標、及び結合熱力学へのその相対的寄与度に関する情報によって記述できる。より詳細でないレベルでは、エピトープは、抗原と抗体との原子接触を定義する空間座標によって特徴づけることができる。更により詳細でないレベルでは、エピトープは、抗体:抗原複合体における原子間距離又は原子の溶媒接触性など特定の基準によって定義されるように、それが含むアミノ酸残基によって特徴づけることができる。更により詳細でないレベルでは、エピトープは、機能によって、例えば、他の抗体との競合結合により特徴づけることができる。エピトープは、別のアミノ酸による置換が抗体と抗原との相互作用の特徴を改変することになるアミノ酸残基を含むとして、より一般的に定義することもできる。

10

【0071】

抗体、例えばFabフラグメントとその抗原との複合体の空間座標によって定義されるX線由来結晶構造の文脈において、本明細書において用語エピトープは、文脈によって特に明記又は否定しない限り、抗体内の重原子(即ち非水素原子)から4 の範囲の距離に重原子を有するTFPI残基と特に定義される。

【0072】

使用したエピトープマッピング法に応じてエピトープの説明及び定義が異なるレベルの詳細さで得られるという事実から、同じ抗原上にある異なる抗体に対するエピトープの比較は、異なるレベルの詳細さで同様に行い得ることになる。

20

【0073】

例えばX線構造から決定されたアミノ酸レベルで記述されるエピトープは、それらが同じ組のアミノ酸残基を含有する場合、同一であると言われる。少なくとも1つのアミノ酸がエピトープによって共有されている場合、エピトープは重なっていると言われる。どのアミノ酸残基もエピトープによって共有されない場合、エピトープは分離している(固有である)と言われる。

【0074】

用語「パラトープ」の定義は、観点を逆転させることによって、上記の「エピトープ」の定義から得られる。従って、用語「パラトープ」とは、抗原が特異的に結合する、即ち抗原に物理的に接触する抗体上のエリア又は領域のことを指す。

30

【0075】

同じ抗原に結合する抗体は、共通の抗原に同時に結合する能力に関して特徴づけることができ、「競合結合」/「ビニング」に供することができる。本文脈において、用語「ビニング」とは、同じ抗原に結合する抗体をグループ化する方法のことを指す。抗体の「ビニング」は、表面プラズモン共鳴(SPR)、バイオレイヤー干渉法、ELISA又はフローサイトメトリーなど標準的な技術に基づくアッセイにおける共通の抗原に対する2つの抗体の競合結合に基づくことができる。

【0076】

抗体の「ピン」は、単一の参照抗体又は、別法として、一群の参照抗体を使用して定義することができる。所与の抗体に対する「ピン」同定の分解能は、使用する参照抗体の数と共に増加することになる。単一の参照抗体を使用するとき、第2の抗体が抗原に参照抗体と同時に結合できない場合、第2の抗体は参照抗体と同じ「ピン」に属すると言われる。この場合、参照及び第2の抗体は、抗原の同じ部分に競合的に結合する、「競合抗体」とされる。第2の抗体が、抗原に参照抗体と同時に結合できる場合、第2の抗体は別々の「ピン」に属すると言われる。この場合、参照及び第2の抗体は、抗原の同じ部分に競合的に結合することはなく、「非競合抗体」とされる。「ピン」同定に一群の参照抗体を使用する場合、群内の各抗体を、抗原結合に対する群の各メンバーとの競合についてアッセイする場合、参照抗体の前記群は公知の又は新規の抗体の群を含むことができ、その群を使用して交差競合分析により個々の抗体「ピン」を定義することができる。抗体A及びBが、

40

50

交差競合分析において同じパターンの結合を呈する場合、抗体Aは抗体Bと同じ「ピン」に属すると言われる。抗体A及びBが、参照群中の個々の抗体の1つ以上に対して異なる競合結合プロファイルを呈する場合、抗体Aは抗体Bと異なる「ピン」に属すると言われる。群内の各抗体を、抗原を群の別のメンバーと同時に結合する能力についてアッセイする場合、競合結合プロファイルは、編集されたデータの組である。例えば、抗体1、2及び3の参照群に関連する抗体Aの抗原結合プロファイルは、以下の通りである: A+1=Aによる結合なし; A+2=Aによる結合あり; A+3=Aによる結合あり。抗体Bは、抗体Aと比較して異なる競合結合プロファイルを有し、以下の場合2つの抗体は異なる「ピン」に属すると言われる: B+1=Bによる結合あり; B+2=Bによる結合あり; B+3=Bによる結合あり。抗体Cは、抗体Aと比較して類似の結合プロファイルを有し、以下の場合2つの抗体は同じ「ピン」に属していると言われる: C+1=Cによる結合なし; C+2=Cによる結合あり; C+3=Cによる結合あり。記載の通り、所与の抗体に対する「ピン」同定の分解能は、使用する参照抗体の数と共に増加することになる。競合結合アッセイは、結合親和性に関する情報を提供しない。アッセイは、試験される抗体

が、結合競合物として機能するのに十分に抗原を別個に結合できるように、設計されなければならない。

【0077】

変異、短縮、欠失、挿入を有するなどの抗原のバリエント及び抗原ホモログ(例えば種ホモログ)に結合する抗体をアッセイすることは、抗体「ビニング」に又は抗体「ビニング」の分解能を高めるために使用することもできる。

【0078】

抗体「ビニング」は、エピトープについて直接的な情報を提供しない。競合抗体、即ち、同じ「ピン」に属する抗体は、同一のエピトープ、重なり合うエピトープ又は別々のエピトープさえも有することができる。後者は、抗原上のエピトープに結合している参照抗体が、第2の抗体が抗原上のエピトープに接触するために必要とする空間を塞ぐ場合(「立体障害」)である。非競合抗体は、別々のエピトープを一般に有する。

【0079】

本明細書において用語「結合親和性」は、2つの分子、例えば、抗体又はそのフラグメントと抗原との非共有結合性相互作用の強度の尺度として使用される。用語「結合親和性」は、一価の相互作用(固有活性)について記述するために使用される。

【0080】

一価の相互作用による2分子間の結合親和性、例えば、抗体又はそのフラグメントと抗原は、平衡解離定数(K_D)を決定することによって定量化することができる。同様に、 K_D は、例えばSPR法による、複合体形成及び解離の速度論の測定によって決定することができる。一価複合体の結合及び解離に対応する速度定数は、それぞれ結合速度定数 k_a (又は k_{on})並びに解離速度定数 k_d (又は k_{off})と称される。 K_D は、方程式 $K_D = k_d/k_a$ により k_a 及び k_d と相關する。

【0081】

上記の定義に従って、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する結合親和性を、個々の抗体/抗原複合体に対する K_D 値の比較によって比較できる。

【0082】

本発明による抗体は、TFPIへの結合について天然に存在するリガンド若しくは受容体又は別の抗体など別の分子と競合可能な場合がある。従って、本発明による抗体は、TFPIを同様に結合できる別の分子より高い親和性でTFPIを結合できる可能性がある。抗原への結合について天然のリガンド/受容体と競合する抗体の能力は、抗体と抗原との特異的相互作用など、対象の相互作用に対する K_D 値を決定し、対象でない相互作用の K_D 値の能力と比較することによって評価することができる。一般に、標的に対する抗体の K_D は、環境中の無関係な物質又は付随的な物質など他の標的外の分子に対する K_D の2分の1、好ましくは5分の1、より好ましくは10分の1である。より好ましくは、 K_D は、50分の1、例えば100分の

10

20

30

40

50

1、又は200分の1であり、更に一層好ましくは、500分の1、例えば1,000分の1、又は10,000分の1である。

【0083】

この解離定数の値は、周知の方法によって直接決定することができる。標的に対する抗体などのリガンドの結合能力を評価するための標準的なアッセイは当業者に公知であり、例えば、ELISA、ウェスタンプロット、RIA及びフローサイトメトリー分析がある。抗体の結合速度論及び結合親和性は、SPRなど当業者に公知の標準的なアッセイによって評価することができる。

【0084】

競合結合アッセイを行うことができ、それにおいて標的に対する抗体の結合は、別の抗体など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。

【0085】

本発明の抗体は、その標的に対して 1×10^{-7} M若しくはそれ未満、 1×10^{-8} M若しくはそれ未満、 1×10^{-9} M若しくはそれ未満、又は 1×10^{-10} M若しくはそれ未満、 1×10^{-11} M若しくはそれ未満、又は 1×10^{-12} M若しくはそれ未満の K_D を有することができる。本発明の抗体の K_D は、0.8nM未満、例えば0.7nM未満、例えば0.6nM未満、例えば0.5nM未満、例えば0.4nM未満、例えば0.3nM未満、例えば0.2nM未満、例えば0.1nM未満、例えば0.05nM未満、例えば0.025nM未満、例えば0.015nM未満、例えば0.015nM～0nMであることができる。

【0086】

別の態様において、本発明は、本明細書に記述される抗体など本発明の分子を含む組成物及び製剤を提供する。例えば、本発明は、少なくとも1つの薬学的に許容できる賦形剤と一緒に製剤化された本発明のTFPI抗体を1つ以上含む医薬組成物を提供する。

【0087】

従って、本発明の一目的は、0.25mg/mL～250mg/mLの濃度で存在するそのようなTFPI抗体を含む医薬製剤を提供することであり、前記製剤は、2.0～10.0のpHを有する。製剤は、1つ以上の緩衝液系、防腐剤、等張化剤、キレート化剤、安定剤又は界面活性剤、及びその様々な組合せを更に含むことができる。医薬組成物における防腐剤、等張剤、キレート化剤、安定剤及び界面活性剤の使用は、当業者に周知である。Remington: The Science and Practice of Pharmacy、第19版、1995年を参照してもよい。

【0088】

一実施形態において、医薬製剤は水性製剤である。そのような製剤は一般に溶液又は懸濁液であるが、コロイド、分散液、乳液及び多相物質であることもできる。用語「水性製剤」は、少なくとも50%w/w水を含む製剤と定義される。同様に、用語「水溶液」は、少なくとも50%w/w水を含む溶液と定義され、用語「水性懸濁液」は、少なくとも50%w/w水を含む懸濁液と定義される。

【0089】

別の実施形態において、医薬製剤は、使用前に医師又は患者が溶媒及び/又は希釈剤を添加する凍結乾燥製剤である。

【0090】

更なる態様において、医薬製剤はそのような抗体の水溶液及び緩衝液を含み、抗体は、1mg/mLからそれ以上の濃度で存在し、前記製剤は、約2.0～約10.0のpHを有する。

【0091】

本発明による抗体又はそれを含む製剤は、凝血障害の対象を治療するために使用することができる。

【0092】

本明細書では、用語「対象」は、任意のヒト患者又は非ヒト脊椎動物を含む。

【0093】

本明細書では、用語「凝血障害」とは、正常な凝固カスケードの任意の前凝固性成分の任意の定性的若しくは定量的欠損又はフィブリン溶解の任意の上方制御に起因し得る出血傾向の増大のことを指す。そのような凝血異常は、先天性及び/又は後天性及び/又は医原

10

20

30

40

50

性である場合があり、当業者によって同定される。

【0094】

先天性低凝血異常の非限定的な例は、A型血友病、B型血友病、第VII因子欠損症、第X因子欠損症、第XI因子欠損症、フォン・ヴィルブラント病並びにグランツマン血小板無力症及びベルナルスリーエル症候群などの血小板減少症である。前記A又はB型血友病は、重度、中等度又は軽度でありえる。血友病の臨床的重症度は、血中FIX/FVIIIの機能単位の濃度によって決定され、軽度、中等度又は重度に分類される。重度血友病は、正常レベルの<1%に対応する<0.01U/mLの凝固因子レベルによって定義され、一方で中等度及び軽度患者は、それぞれ1~5%及び>5%のレベルを有する。「インヒビター」(即ち、第VIII因子に対する同種異系抗体)保有A型血友病及び「インヒビター」(即ち、第IX因子に対する同種異系抗体)保有B型血友病は、一部が先天性であり、一部が後天性である凝血異常の非限定的な例である。

10

【0095】

後天性凝血障害の非限定的な例は、ビタミンK欠乏症に起因するセリンプロテアーゼ欠損症であり;そのようなビタミンK欠乏症は、ワーファリンなどのビタミンKアンタゴニストの投与に起因することがある。後天性凝血障害は、大規模な外傷の後にも起こり得る。この場合、別名「血性悪循環」として公知であるそれは、血液希釈(希釈性の血小板減少症及び凝固因子の希釈)、低体温、凝固因子の消費及び代謝障害(アシドーシス)によって特徴づけられる。輸液療法及びフィブリリン溶解の増大は、この状況を悪化させことがある。前記出血は、身体の任意の部分からあり得る。

20

【0096】

医原性凝血障害の非限定的な例は、血栓塞栓性疾患を治療するために処方されることがあるヘパリン、アスピリン、ワーファリン及び他の血小板凝集阻害薬など抗凝固性薬物の過剰摂取である。医原性凝血障害の第2の非限定的な例は、輸血によって誘導されることがある凝血障害など、過剰な及び/又は不適切な輸液療法によって誘導される凝血障害である。

【0097】

本発明の一実施形態において、出血はA又はB型血友病と関連する。別の実施形態において、出血は後天性インヒビター保有A又はB型血友病と関連する。別の実施形態において、出血は血小板減少症と関連する。別の実施形態において、出血はフォン・ヴィルブラント病と関連する。別の実施形態において、出血は重度組織損傷と関連する。別の実施形態において、出血は重度外傷と関連する。別の実施形態において、出血は手術と関連する。別の実施形態において、出血は出血性胃炎及び/又は腸炎と関連する。別の実施形態において、出血は胎盤早期剥離においてなど大量子宮出血である。別の実施形態において、出血は頭蓋内、口腔内又は眼内など機械的な止血の可能性が限定される器官において起こる。別の実施形態において、出血は抗凝固薬療法と関連する。

30

【0098】

本明細書では用語「治療」とは、それを必要とする任意のヒト又は他の脊椎動物対象の医薬療法のことを指す。前記対象は、医師又は獣医師による物理的検査を受けたと期待され、その医師は、前記特定の治療の使用が前記ヒト又は他の脊椎動物の健康に有益であることを指示する旨の又は確定の診断を下した。前記治療の時期及び目的は、対象の健康の現状により個人によって異なり得る。従って、前記治療は、予防的、対症的、徴候的及び/又は治癒的であり得る。本発明によれば、予防的、対症的、徴候的及び/又は治癒的治療は、本発明の別々の態様を表すことができる。

40

【0099】

本発明の抗体は、静脈内など、筋肉内など、皮下など非経口的に投与することができる。別法として、本発明の抗体は、経口的など、非経口的ではない経路によって又は局所的に投与することができる。本発明の抗体は、予防的に投与することができる。本発明の抗体は、治療的に投与することができる(必要に応じて)。

【0100】

50

以下は、本発明の実施形態の非限定的なリストである：

実施形態

1. ヒトTFPI(配列番号1)のアミノ酸残基1～79に存在するエピトープに特異的に結合することができる抗体又はそのフラグメント。

2. ヒトTFPIのアミノ酸残基26～76(KPI-1)に存在するエピトープを結合することができる、実施形態1に記載の抗体又はそのフラグメント。

3. 表面プラズモン共鳴を使用して決定される場合、1E-08M以下のK_dを有する、実施形態1又は2のいずれか1つに記載の抗体又はそのフラグメント。

4. 重鎖が、

・配列番号4のアミノ酸31～35(SYGVH)に対応するCDR1配列であり、これらアミノ酸残基の1つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列；及び/又は

・配列番号4のアミノ酸50～65(VIWRGGSTDFNAAFMS)に対応するCDR2配列であり、これらアミノ酸の1つ、2つ又は3つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列；及び/又は

・配列番号4のアミノ酸98～110(NSHGNVGYAMDY)に対応するCDR3配列であり、これらアミノ酸残基の1つ又は2つが、異なるアミノ酸によって置換されてもよい配列を含む、実施形態1から3のいずれか1つに記載の抗体又はそのフラグメント。

5. 重鎖が、

・配列番号6のアミノ酸31～35(NYGVH)に対応するCDR1配列であり、これらアミノ酸残基の1つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列；及び/又は

・配列番号6のアミノ酸50～65(VIWRGGSIDYNAAFMS)に対応するCDR2配列であり、これらアミノ酸の1つ、2つ又は3つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列；及び/又は

・配列番号6のアミノ酸98～110(NSHGNVGYAMDY)に対応するCDR3配列であり、これらアミノ酸残基の1つ又は2つが、異なるアミノ酸によって置換されてもよい配列を含む、実施形態1から3のいずれか1つに記載の抗体又はそのフラグメント。

6. 重鎖が、

・配列番号8のアミノ酸31～35(GYGVH)に対応するCDR1配列であり、これらアミノ酸残基の1つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列；及び/又は

・配列番号8のアミノ酸50～65(VIWRGGSIDYNAAFMS)に対応するCDR2配列であり、これらアミノ酸の1つ、2つ又は3つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列；及び/又は

・配列番号8のアミノ酸98～110(NSHGNVGYAMDY)に対応するCDR3配列であり、これらアミノ酸残基の1つ又は2つが、異なるアミノ酸によって置換されてもよい配列を含む、実施形態1から3のいずれか1つに記載の抗体又はそのフラグメント。

7. 軽鎖が、

・配列番号5のアミノ酸24～34(KASENVGAAVA)に対応するCDR1配列であり、これらアミノ酸残基の1つ、2つ又は3つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列；及び/又は

・配列番号5のアミノ酸50～56(SASNRYT)に対応するCDR2配列であり、これらアミノ酸残基の1つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列；及び/又は

・配列番号5のアミノ酸89～96(QQYTNYPT)に対応するCDR3配列であり、これらアミノ酸残基の1つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列を含む、実施形態4から6のいずれか1つに記載の抗体又はそのフラグメント。

8. 軽鎖が、

・配列番号7のアミノ酸24～34(KASQSVGPAAVA)に対応するCDR1配列であり、これらアミノ酸残基の1つ、2つ又は3つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列；及び/又は

・配列番号7のアミノ酸50～56(SASNRYT)に対応するCDR2配列であり、これらアミノ酸残基の1つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列；及び/又は

10

20

30

40

50

・配列番号7のアミノ酸89～96(QQYTSYPT)に対応するCDR3配列であり、これらアミノ酸残基の1つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列を含む、実施形態4から6のいずれか1つに記載の抗体又はそのフラグメント。

9. 軽鎖が、

・配列番号9のアミノ酸24～34(KASQNVGTAVA)に対応するCDR1配列であり、これらアミノ酸残基の1つ、2つ又は3つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列;及び/又は

・配列番号9のアミノ酸50～56(SASNRYT)に対応するCDR2配列であり、これらアミノ酸残基の1つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列;及び/又は

・配列番号9のアミノ酸89～96(QQYTSYPT)に対応するCDR3配列であり、これらアミノ酸残基の1つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列

を含む、実施形態4から6のいずれか1つに記載の抗体又はそのフラグメント。

10. 重鎖が、

・配列番号10のアミノ酸31～36(SDYAWN)に対応するCDR1配列であり、これらアミノ酸残基の1つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列;及び/又は

・配列番号10のアミノ酸51～66(YISYSGSTSYPNPSLKS)に対応するCDR2配列であり、これらアミノ酸の1つ、2つ又は3つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列;及び/又は

・配列番号10のアミノ酸99～104(WAYDGP)に対応するCDR3配列であり、これらアミノ酸残基の1つが、異なるアミノ酸によって置換されてもよい配列

を含む、実施形態1から3のいずれか1つに記載の抗体又はそのフラグメント。

11. 軽鎖が、

・配列番号11のアミノ酸24～33(RASSSVSHMH)に対応するCDR1配列であり、これらアミノ酸残基の1つ又は2つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列;及び/又は

・配列番号11のアミノ酸49～55(ATSNLAS)に対応するCDR2配列であり、これらアミノ酸残基の1つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列;及び/又は

・配列番号11のアミノ酸88～96(QQWSSNPFT)に対応するCDR3配列であり、これらアミノ酸残基の1つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列

を含む、実施形態10に記載の抗体又はそのフラグメント。

12. 重鎖が、

・配列番号12のアミノ酸31～35(DYYIH)に対応するCDR1配列であり、これらアミノ酸残基の1つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列;及び/又は

・配列番号12のアミノ酸50～66(WIDPENGNTIFDPKFQG)に対応するCDR2配列であり、これらアミノ酸の1つ、2つ又は3つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列;及び/又は

・配列番号12のアミノ酸99～105(RWYAMDY)に対応するCDR3配列であり、これらアミノ酸残基の1つが、異なるアミノ酸によって置換されてもよい配列

を含む、実施形態1から3のいずれか1つに記載の抗体又はそのフラグメント。

13. 軽鎖が、

・配列番号13のアミノ酸24～39(KSSQSLLYTNKTYLN)に対応するCDR1配列であり、これらアミノ酸残基の1つ、2つ又は3つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列;及び/又は

・配列番号13のアミノ酸55～61(LVSKLDS)に対応するCDR2配列であり、これらアミノ酸残基の1つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列;及び/又は

・配列番号13のアミノ酸94～102(LQSTHFPWT)に対応するCDR3配列であり、これらアミノ酸残基の1つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列

を含む、実施形態12に記載の抗体又はそのフラグメント。

14. 重鎖が、

・配列番号4のアミノ酸31～35(SYGVH)、配列番号6のアミノ酸31～35(NYGVH)又は配列番号8のアミノ酸31～35(GYGVH)に対応するCDR1配列;及び

10

20

30

40

50

- 配列番号4のアミノ酸50～65(VIWRGGSTDFNAAFMS)、配列番号6のアミノ酸50～65(VIWRGGSIDYNAAFMS)又は配列番号8のアミノ酸50～65(VIWRGGSIDYNAAFMS)に対応するCDR2配列；及び
- 配列番号4のアミノ酸98～110、配列番号6のアミノ酸98～110又は配列番号8のアミノ酸98～110(NSHGNVGYAMDY)に対応するCDR3配列

を含み、

軽鎖が、

- 配列番号5のアミノ酸24～34(KASENVGAAVA)、配列番号7のアミノ酸24～34(KASQSVGPAAVA)又は配列番号9のアミノ酸24～34(KASQNVGTAVA)に対応するCDR1配列；及び
- 配列番号5のアミノ酸50～56、配列番号7のアミノ酸50～56又は配列番号9のアミノ酸50～56(SASNRYT)に対応するCDR2配列；及び
- 配列番号5のアミノ酸89～96(QQYTNYPT)、配列番号7のアミノ酸89～96(QQYTSYPT)又は配列番号9のアミノ酸89～96(QQYTSYPT)に対応するCDR3配列

を含む、実施形態1から3のいずれか1つに記載の抗体又はそのフラグメント。

15. 重鎖が、

- 配列番号10のアミノ酸31～36(SDYAWN)に対応するCDR1配列；及び
- 配列番号10のアミノ酸51～66(YISYSGSTSYPNPSLKS)に対応するCDR2配列；及び
- 配列番号10のアミノ酸99～104(WAYDGP)に対応するCDR3配列

を含み、

軽鎖が、

- 配列番号11のアミノ酸24～33(RASSSVSHMH)に対応するCDR1配列；及び
- 配列番号11のアミノ酸49～55(ATSNLAS)に対応するCDR2配列；及び
- 配列番号11のアミノ酸88～96(QQWSSNPFT)に対応するCDR3配列

を含む、実施形態10に記載の抗体又はそのフラグメント。

16. 重鎖が、

- 配列番号12のアミノ酸31～35(DYYIH)に対応するCDR1配列；及び
- 配列番号12のアミノ酸50～66(WIDPENGNTIFDPKFQG)に対応するCDR2配列；及び
- 配列番号12のアミノ酸99～105(RWYAMDY)に対応するCDR3配列

を含み、

軽鎖が、

- 配列番号13のアミノ酸24～39(KSSQSLLYTNGKTYLN)に対応するCDR1配列；及び
- 配列番号13のアミノ酸55～61(LVSKLDS)に対応するCDR2配列；及び
- 配列番号13のアミノ酸94～102(LQSTHFPWT)に対応するCDR3配列

を含む、実施形態12に記載の抗体又はそのフラグメント。

17. バイオレイヤー干渉法を使用して決定される場合、TFPI(1～79)への結合について実施形態1から16のいずれか1つに記載の抗体と競合する抗体又はそのフラグメント。

18. バイオレイヤー干渉法を使用して決定される場合、実施形態1から17のいずれか1つに記載の抗体と同じビンに属する抗体又はそのフラグメント。

19. モノクローナル抗体である、実施形態1から18のいずれか1つに記載の抗体又はそのフラグメント。

20. ヒト化抗体である実施形態1から19のいずれか1つに記載の抗体又はそのフラグメント。

。

21. Fab、Fab'、Fab₂、Fab'₂及びscFvフラグメントからなる群から選択される、実施形態1から19のいずれか1つに記載の抗体フラグメント。

22. 実施形態1から21のいずれか1つに記載の抗体又はそのフラグメント及び少なくとも1つの薬学的に許容できる賦形剤を含む医薬製剤。

23. 医薬としての使用のための、実施形態1から21のいずれか1つに記載の抗体又はそのフラグメント又は実施形態22に記載の医薬製剤。

24. 凝血障害の対象の治療に使用する実施形態1から21のいずれか1つに記載の抗体又はそのフラグメント又は実施形態22に記載の医薬製剤。

25. 前記対象が、インヒビター保有又は非保有A型血友病及びインヒビター保有又は非保有

10

20

30

40

50

B型血友病などの任意の先天性、後天性及び/又は医原性凝血障害を有する、実施形態24に規定の使用のための抗体又はそのフラグメント。

26. 前記対象に実施形態1から21のいずれか1つに記載の抗体又はそのフラグメントを投与することを含む、凝血障害の対象を治療する方法。

本発明は、以下の態様によって更に、例示される：

【0101】

1. ヒトTFPI(配列番号1)のアミノ酸残基1~79に存在するエピトープに特異的に結合する単離された抗体又はそのフラグメント。

2. ヒトTFPI(配列番号1)のアミノ酸残基26~76(KPI-1)に存在するエピトープに特異的に結合する、態様1に記載の抗体又はそのフラグメント。 10

3. ヒトTFPIに存在するエピトープに特異的に結合し、前記エピトープが、配列番号1のL16、P17、L19、K20、L21、M22、F25、C35、A37、M39、R41、Y56、G57、G58、C59、E60、G61、N62、Q63、R65、F66、E67、E71及びM75のアミノ酸残基のうち少なくとも1つを含む、態様1に記載の抗体又はそのフラグメント。

4. ヒトTFPIに存在するエピトープに特異的に結合し、前記エピトープが、配列番号1のアミノ酸残基R41、R65及びE67のうち少なくとも1つを含む、態様3に記載の抗体又はそのフラグメント。

5. 表面プラズモン共鳴を使用して決定される場合、1E-08M以下のK_dを有する、態様1に記載の抗体又はそのフラグメント。

6. ヒトTFPIに特異的に結合する単離された抗体であって、前記抗体の重鎖が配列番号16のアミノ酸残基 20

2位に対応する位置にV、

27位に対応する位置にF、

32位に対応する位置にY、

52位に対応する位置にW、

53位に対応する位置にR、

54位に対応する位置にG、

55位に対応する位置にG、

56位に対応する位置にS、

57位に対応する位置にI、

58位に対応する位置にD、

59位に対応する位置にY、

61位に対応する位置にA、

64位に対応する位置にM、

97位に対応する位置にK、

99位に対応する位置にS、

100位に対応する位置にH、

102位に対応する位置にN、

103位に対応する位置にY、

104位に対応する位置にV、

105位に対応する位置にG、 40

及び106位に対応する位置にY

を含み、前記抗体の軽鎖が、配列番号17のアミノ酸残基

31位に対応する位置にP、

32位に対応する位置にA、

49位に対応する位置にY、

50位に対応する位置にS、

53位に対応する位置にN、

55位に対応する位置にY、

56位に対応する位置にT、 50

91位に対応する位置にY、
 92位に対応する位置にT、
 93位に対応する位置にS、
 及び94位に対応する位置にY

を含む抗体。

7. 重鎖が、

・配列番号4のアミノ酸31～35(SYGVH)、配列番号6のアミノ酸31～35(NYGVH)又は配列番号8のアミノ酸31～35(GYGVH)に対応するCDR1配列であり、これらアミノ酸残基の1つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列；及び/又は

・配列番号4のアミノ酸50～65(VIWRGGSTDFNAAFMS)、配列番号6のアミノ酸50～65(VIWRGGS1DYNAAFMS)又は配列番号8のアミノ酸50～65(VIWRGGS1DYNAAFMS)に対応するCDR2配列であり、これらアミノ酸の1つ、2つ又は3つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列；及び/又は

・配列番号4のアミノ酸98～110(NSHGNVGYAMDY)、配列番号6又は配列番号8のアミノ酸98～110(NSHGNVGYAMDY)に対応するCDR3配列であり、これらアミノ酸残基の1つ又は2つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列

を含む、態様1に記載の抗体。

8. 軽鎖が、

・配列番号5のアミノ酸24～34(KASENVGAAVA)、配列番号7のアミノ酸24～34(KASQSVGPABA)又は配列番号9のアミノ酸24～34(KASQNVGTAVA)に対応するCDR1配列であり、これらアミノ酸残基の1つ、2つ又は3つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列；及び/又は

・配列番号5のアミノ酸50～56(SASNRYT)、配列番号7又は配列番号9のアミノ酸50～56(SASNRYT)に対応するCDR2配列であり、これらアミノ酸残基の1つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列；及び/又は

・配列番号5のアミノ酸89～96(QQYTNYPT)、配列番号7のアミノ酸89～96(QQYTSYPT)又は配列番号9のアミノ酸89～96(QQYTSYPT)に対応するCDR3配列であり、これらアミノ酸残基の1つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列

を含む、態様1又は7に記載の抗体又はそのフラグメント。

9. 重鎖が、

・配列番号4のアミノ酸31～35(SYGVH)、配列番号6のアミノ酸31～35(NYGVH)又は配列番号8のアミノ酸31～35(GYGVH)に対応するCDR1配列；及び

・配列番号4のアミノ酸50～65(VIWRGGSTDFNAAFMS)、配列番号6のアミノ酸50～65(VIWRGGS1DYNAAFMS)又は配列番号8のアミノ酸50～65(VIWRGGS1DYNAAFMS)に対応するCDR2配列；及び

・配列番号4、配列番号6又は配列番号8のアミノ酸98～110(NSHGNVGYAMDY)に対応するCDR3配列

を含み、

軽鎖が、

・配列番号5のアミノ酸24～34(KASENVGAAVA)、配列番号7のアミノ酸24～34(KASQSVGPABA)又は配列番号9のアミノ酸24～34(KASQNVGTAVA)に対応するCDR1配列；及び

・配列番号5、配列番号7又は配列番号9のアミノ酸50～56(SASNRYT)に対応するCDR2配列；及び

・配列番号5のアミノ酸89～96(QQYTNYPT)、配列番号7のアミノ酸89～96(QQYTSYPT)又は配列番号9のアミノ酸89～96(QQYTSYPT)に対応するCDR3配列

を含む、態様1に記載の抗体又はそのフラグメント。

10. 重鎖が、

・配列番号6のアミノ酸31～35(NYGVH)に対応するCDR1配列；及び

・配列番号6のアミノ酸50～65(VIWRGGS1DYNAAFMS)に対応するCDR2配列；及び

・配列番号6のアミノ酸98～110(NSHGNVGYAMDY)に対応するCDR3配列

を含み、

10

20

30

40

50

軽鎖が、

- ・配列番号7のアミノ酸24～34(KASQSVGPAVA)に対応するCDR1配列；及び
- ・配列番号7のアミノ酸50～56(SASNRYT)に対応するCDR2配列；及び
- ・配列番号7のアミノ酸89～96(QQYTSYPT)に対応するCDR3配列

を含む、態様1に記載の抗体又はそのフラグメント。

11. 重鎖が、

- ・配列番号10のアミノ酸31～36(SDYAWN)に対応するCDR1配列であり、これらアミノ酸残基の1つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列；及び/又は
- ・配列番号10のアミノ酸51～66(YISYSGSTSYNPSLKS)に対応するCDR2配列であり、これらアミノ酸の1つ、2つ又は3つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列；及び/又は
- ・配列番号10のアミノ酸99～104(WAYDGP)に対応するCDR3配列であり、これらアミノ酸残基の1つが、異なるアミノ酸によって置換されてもよい配列

を含み、

軽鎖が、

- ・配列番号11のアミノ酸24～33(RASSSVSHMH)に対応するCDR1配列であり、これらアミノ酸残基の1つ又は2つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列；及び/又は
- ・配列番号11のアミノ酸49～55(ATSNLAS)に対応するCDR2配列であり、これらアミノ酸残基の1つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列；及び/又は
- ・配列番号11のアミノ酸88～96(QQWSSNPFT)に対応するCDR3配列であり、これらアミノ酸残基の1つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列

を含む、態様1に記載の抗体又はそのフラグメント。

12. 重鎖が、

- ・配列番号10のアミノ酸31～36(SDYAWN)に対応するCDR1配列；
- ・配列番号10のアミノ酸51～66(YISYSGSTSYNPSLKS)に対応するCDR2配列；及び
- ・配列番号10のアミノ酸99～104(WAYDGP)に対応するCDR3配列

を含み、

軽鎖が、

- ・配列番号11のアミノ酸24～33(RASSSVSHMH)に対応するCDR1配列；
- ・配列番号11のアミノ酸49～55(ATSNLAS)に対応するCDR2配列；及び
- ・配列番号11のアミノ酸88～96(QQWSSNPFT)に対応するCDR3配列

を含む、態様11に記載の抗体又はそのフラグメント。

13. 重鎖が、

- ・配列番号12のアミノ酸31～35(DYYIH)に対応するCDR1配列であり、これらアミノ酸残基の1つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列；及び/又は
- ・配列番号12のアミノ酸50～66(WIDPENGNTIFDPKFQG)に対応するCDR2配列であり、これらアミノ酸の1つ、2つ又は3つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列；及び/又は
- ・配列番号12のアミノ酸99～105(RWYAMDY)に対応するCDR3配列であり、これらアミノ酸残基の1つが、異なるアミノ酸によって置換されてもよい配列

を含み、

軽鎖が、

- ・配列番号13のアミノ酸24～39(KSSQSLLYTNGKTYLN)に対応するCDR1配列であり、これらアミノ酸残基の1つ、2つ又は3つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列；及び/又は

・配列番号13のアミノ酸55～61(LVSKLDS)に対応するCDR2配列であり、これらアミノ酸残基の1つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列；及び/又は

- ・配列番号13のアミノ酸94～102(LQSTHFPWT)に対応するCDR3配列であり、これらアミノ酸残基の1つが、異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい配列

を含む、態様1に記載の抗体又はそのフラグメント。

10

20

30

40

50

14. 重鎖が、

- ・配列番号12のアミノ酸31～35(DYYIH)に対応するCDR1配列；及び
- ・配列番号12のアミノ酸50～66(WIDPENGNTIFDPKFQG)に対応するCDR2配列；及び
- ・配列番号12のアミノ酸99～105(RWYAMDY)に対応するCDR3配列；を含み、

軽鎖が、

- ・配列番号13のアミノ酸24～39(KSSQSLLYTNGKTYLN)に対応するCDR1配列；及び
- ・配列番号13のアミノ酸55～61に対応するCDR2配列(LVSKLDS)；及び
- ・配列番号13のアミノ酸94～102に対応するCDR3配列(LQSTHFPWT)

を含む、態様13に記載の抗体又はそのフラグメント。

15. バイオレイヤー干渉法を使用して決定される場合、TFPI(1～79)への結合について態様 10
3から10のいずれか1つに記載の抗体と競合する単離された抗体又はそのフラグメント。

16. バイオレイヤー干渉法を使用して決定される場合、態様1から14のいずれか1つに記載
の抗体と同じビンに属する単離された抗体又はそのフラグメント。

17. 態様1から16のいずれか1つに記載の少なくとも1つの抗体又はそのフラグメント及び少
なくとも1つの薬学的に許容できる賦形剤を含む医薬製剤。

18. 医薬としての使用のための、態様1から16のいずれか1つに記載の抗体又はそのフラグ
メント又は態様17に記載の医薬製剤。

19. 凝血障害の対象の治療に使用する態様1から16のいずれか1つに記載の抗体又はそのフ
ラグメント。

20. 前記対象が、インヒビター保有又は非保有A型血友病及びインヒビター保有又は非保有
B型血友病など先天性、後天性及び/又は医原性凝血障害を有する、態様19に規定の使用の
ための抗体又はそのフラグメント。

21. 前記対象に態様1から16のいずれか1つに記載の抗体又はそのフラグメントを投与する
ことを含む、凝血障害の対象を治療する方法。

【0102】

本発明は、更なる制限と解釈されるべきでない以下の実施例によって更に例示される。
全ての図並びに全ての参照、特許及び本出願の全体を通じて引用される公開された特許出
願の内容を、参照により明示的に本明細書に組み込む。

【実施例】

【0103】

(実施例1)

免疫化、融合及びスクリーニング

RBFマウスを、ヒトTFPI (配列番号1)又はTFPI(1～161)(配列番号3)で免疫した。マウ
スは、皮下に注射した:1回目の注射用として20 μgヒトTFPIをフロイント完全アジュvant
と混合した。その後の免疫化用として、フロイント不完全アジュvantを同じ濃度の抗
原と共に使用した。最後の免疫化の10日後に、ELISAを使用してヒトTFPI特異的抗体につ
いて、マウスの眼血液をスクリーニングした。陽性血清力値を持つマウスを、静注によっ
て10 μgヒトTFPI 又はTFPI(1～161)で追加免疫し、3日後に屠殺した。脾臓を無菌的に取
り出し、分散させて单一細胞懸濁液にした。脾臓細胞と骨髄腫細胞の融合を、PEG法又は
電気融合によって行った。得られたハイブリドーマ細胞を、マイクロタイタープレート中
での限界希釈によってクローニングした。個々のハイブリドーマからの上清を、全長TFPI 40

又はTFPI(1～161)に結合できる抗体の発現についてELISAにより最初にスクリーニング
した。TFPI(1～79)に特異的な抗体を産生するハイブリドーマを同定するために、全長TFP
I 又はTFPI(1～161)への結合について陽性のハイブリドーマを、TFPI-KPI-2フラグメン
ト(配列番号1のアミノ酸残基97～147によって表される)への結合についてカウンタースク
リーニングした。TFPI(1～161)への結合について陽性でありTFPI-KPI-2フラグメントへの
結合について陰性のハイブリドーマを、抗体産生のために単離し、増殖させた。

【0104】

抗体を標準的なプロテインAアフィニティークロマトグラフィーによって上清から精製
し、それを使用してヒトTFPI 及びTFPI(1～79)に対する結合及び親和性並びに血漿中で

10

20

30

40

50

のTFPI中和活性を決定した(TGTアッセイ)。対象の抗体、即ちTFPI(1～79)に特異的な抗体を産生するハイブリドーマを、限界希釀によってサブクローニングし、元の抗体プロファイルを、サブクローニングしたハイブリドーマからの材料について検証した。サブクローニングしたハイブリドーマからの細胞を使用してRNAを単離し、その後抗体をクローニングし、配列同定した。

【0105】

(実施例2)

マウス抗ヒトTFPI(1～79)特異的mAbのクローニング及びシーケンシング

この実施例は、TFPI抗体mAb 2F3、mAb 2F22、mAb 2F45、mAb 1F56、mAb 1F91及びmAb 2F35のマウス重鎖及び軽鎖配列のクローニング並びにシーケンシングについて説明する。
10 全RNAを、Qiagen社製RNeasy Mini Kitを使用してハイブリドーマ細胞から抽出し、cDNA合成の鑄型に使用した。cDNAを、Clontech社製SMART(商標)RACE cDNA增幅キットを使用する5'-RACE反応で合成した。HC及びLC配列のその後の標的增幅は、Phusion Hot Startポリメラーゼ(Finnzymes社)並びにフォワードプライマーとしてSMART(商標) RACEキットに含まれるユニバーサルプライマー混合物(UPM)を使用して、PCRにより実施した。配列番号14に示される配列を持つリバースプライマーをHC(VHドメイン)增幅に使用し、配列番号15に示される配列を持つリバースプライマーをLC增幅に使用した。PCR産物を、ゲル電気泳動によって分離し、GE Healthcare Bio-Sciences社製のGFX PCR DNA & Gel Band Purification Kitを使用して抽出し、Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit及び化学的にコンピテントにしたTOP10大腸菌(E. coli)(Life Technologies社)を使用してシーケンシングのためにクローニングした。コロニーPCRを、Applied Biosystems社製AmpliTaq Gold Master Mix及びM13uni/M13revプライマーを使用して、選択したコロニーに対して実施した。コロニーPCRのクリーンアップを、ExoSAP-IT酵素混合物(USB社)を使用して実施した。シーケンシングを、ドイツ、マーチンスリードのMWG Biotech社でM13uni(-21)/M13rev(-29)シーケンシングプライマーを使用して実施した。配列を、Vector NTI Advance 11プログラム(Life Technologies社)を使用して分析し、注釈付け(アノテーション)した。全てのキット及び試薬は、製造業者の説明書に従って使用した。

【0106】

単一で固有のマウス型LC及び单一で固有のマウスHC、サブクラスmIgG1を、ハイブリドーマ: mAb 2F3、mAb 2F22、mAb 2F45、mAb 1F91及びmAb 2F35のそれぞれについて同定した。mAb 1F56のLC及びHC配列は、この抗体が、配列においてmAb 1F91と同一であることを示した。可変重鎖及び可変軽鎖配列のアミノ酸配列(リーダーペプチド配列を除く)を、配列番号4～13に示す。配列番号を、表1に挙げる。

【0107】

抗体LC及びHC発現ベクターの生成

mAb 2F22のマウスヒトキメラ版の一過性発現用としてCMVプロモータに基づく発現ベクター(pTTベクター)を生成した。pTTベクターは、Yves Durocherによって一過性のタンパク質発現用として開発される(Durocherら、Nucleic Acid Research、2002年)。pTTに基づくベクターは、CMVプロモータに加えて、pMB1複製起点、EBV複製起点及びAmp耐性遺伝子を含有する。

【0108】

発現ベクターを、マウス2F22軽鎖可変領域及びヒト定常領域を有するキメラmAb 2F22軽鎖(配列番号17)の発現用として生成した。発現ベクターを、mAb 0294(配列番号19)発現のためにはマウス2F22重鎖可変領域及び完全長ヒトIgG4(S241P)定常領域を有するキメラmAb 2F22重鎖又はFab 0296(配列番号16)発現若しくはFab 0295(配列番号20)発現のためには短縮型ヒトIgG4定常領域を発現用として生成した。配列番号を、表1に挙げる。

【0109】

pTTに基づくLC発現ベクターを、キメラmAb 2F22抗体及び抗体フラグメントの一過性発現用として生成した。最初に、mAb 2F22のVLドメインに対応する領域を、N及びC末端配列に特異的なプライマーを使用して、元のTOPOシーケンシングクローンからツーステップ反

10

20

30

40

50

応でPCR増幅した。元のマウスシグナルペプチドを、ツーステップオーバーラッピングPCRにより、ヒトCD33シグナルペプチドと交換した。一次センスプライマーは、CD33シグナルペプチド配列のC末端部を有し、二次センスプライマーは、クローニング目的のHindIII制限部位、ATG開始コドンの直ぐ上流のKozak配列(5'-GCCGCCACC-3')及びCD33シグナルペプチド配列のN末端部分を含有した。アンチセンスプライマーは、VL/CL移行配列に読み枠を合わせた(インフレームの)BsiWI制限部位を含有した。増幅フラグメントを、ヒト CLドメインの配列を含有する線状化したpTTに基づくベクターにクローニングし、その後選択のために大腸菌に形質転換した。最終構築物の配列を、DNAシーケンシングによって検証した。

【0110】

pTTに基づくHC発現ベクターを、キメラmAb 2F22及びFab 2F22フラグメントの一過性発現用として生成した。キメラmAb及びFabフラグメントは、それぞれmAb 0294、Fab 0296及びFab 0295と称される。最初に、mAb 2F22のVHドメインに対応する領域を、N及びC末端配列に特異的なプライマーを使用して、元のTOPOシーケンシングクローニングからツーステップ反応でPCR増幅した。元のマウスシグナルペプチドを、ツーステップオーバーラッピングPCRにより、ヒトCD33シグナルペプチドと交換した。一次センスプライマーは、CD33シグナルペプチド配列のC末端部を有し、二次センスプライマーは、クローニング目的のHindIII制限部位、ATG開始コドンの直ぐ上流のKozak配列(5'-GCCGCCACC-3')及びCD33シグナルペプチド配列のN末端部分を含有した。アンチセンスプライマーは、VH/CH移行で読み枠を合わせたNheI制限部位を含有した。完全長HC発現ベクター(mAb 0294のHC)の生成の場合、生成されたVHドメインPCRフラグメントを、制限消化し、ヒトIgG4(S241P)定常領域の配列を含有する線状化したpTTに基づくベクターにクローニングした。セリン241をプロリンにするIgG4ヒンジ変異を含ませて、半抗体の形成を排除することによってIgG4抗体を安定させる。変異を入れたヒンジ位置は、Kabatに従って付番された場合S241P、別法としてEUインデックスに従って付番された場合S228Pと称される。

【0111】

Fab 0296発現用の短縮型HC発現ベクターの生成の場合、生成されたVHドメインPCRフラグメントを、制限消化し、短縮型ヒトIgG4定常領域の配列を含有する線状化したpTTに基づくベクターにクローニングした。Fab 0296 HCの配列(配列番号16)に見られる通り、IgG4に基づくHCを、ヒトIgG4ヒンジリジンの後のヒンジ領域で短縮した。クローニング反応物を、その後選択のために大腸菌に形質転換した。最終構築物の配列を、DNAシーケンシングによって検証した。

【0112】

Fab 0295発現用の短縮型HC発現ベクターの生成の場合、生成されたVHドメインPCRフラグメントを、制限消化し、第2の短縮型ヒトIgG4定常領域の配列を含有する線状化したpTTに基づくベクターにクローニングした。Fab 0295 HCの配列(配列番号20)に見られる通り、Fab 0295のIgG4に基づくHCを、ヒトIgG4ヒンジの第1のシステインの後のヒンジ領域で短縮した。クローニング反応物を、その後選択のために大腸菌に形質転換した。最終構築物の配列を、DNAシーケンシングによって検証した。

【0113】

mAb及びFabフラグメントの発現並びに精製

pTTに基づくLC並びにHC発現ベクターの同時トランスフェクションにより、抗TFPI抗体及びFabフラグメントを、EXPI293F細胞(Life Technologies社)の懸濁培養で一過性に発現させた。以下の手順は、懸濁適応EXPI293F細胞に使用する一般的なトランスフェクション手順について説明している。

【0114】

EXPI293Fトランスフェクション

1)別々のDNAの希釈及びトランスフェクション試薬を最初に調製する。

a)細胞培養1mL当たり合計1μgのベクターDNA(0.5μg LCベクター及び0.5μg HCベクター)を使用する。DNAをOpti-MEM培地(Gibco社)に50μL培地/μg DNAになるように希釈し、

10

20

30

40

50

混合し、室温(23~25℃)で5分間インキュベートする。

b)トランスフェクション試薬としてExpifectamin(商標)293(Life Technologies社)を1μg DNA当たり2.7μLの濃度で使用する。Opti-MEM培地(Gibco社)にExpifectamin(商標)溶液を18.5×希釀し、混合し、室温(23~25℃)で5分間インキュベートする。

2)DNAとExpifectamin(商標)293希釀物とを混合し、放置して室温(23~25℃)で10分間インキュベートする。

3)DNA-Expifectamin(商標)293混合物をEXPI293F細胞培養に直接添加する。

a)トランスフェクション時に、EXPI293F培養の細胞密度は、2.8~3.2×10⁶個細胞/mLであるべきである。

4)トランスフェクションした細胞培養を36.5℃、8% CO₂、85~125rpmのオービタルシェイカーインキュベーターへ移す。 10

5)トランスフェクションの18時間後に、5μL Expifectamin(商標)293トランスフェクションエンハンサー1/mL培養及び50μL Expifectamin(商標)293トランスフェクションエンハンサー2/mL培養を添加し、36.5℃、8% CO₂、85~125rpmのオービタルシェイカーインキュベーターに培養を戻す。

6)トランスフェクションの5日後に、細胞培養上清を遠心分離によって採取し、その後0.22μmのPESフィルタ装置(Corning社)によって濾過する。

【0115】

一般的な精製手順

mAbバリアントを、GE Healthcare社製MabSelectSuRe樹脂を製造業者の説明書に従って使用する標準的なアフィニティークロマトグラフィーによって精製した。精製した抗体を、PBS緩衝液pH7.2に緩衝液交換した。 20

【0116】

Fabフラグメントを、GE Healthcare社によって開発されたKappaSelect樹脂を使用する標準的なアフィニティークロマトグラフィーによって精製した。精製したFabフラグメントを、PBS緩衝液pH7.2に緩衝液交換した。品質評価及び濃度決定は、SEC-HPLCによって行った。

【0117】

【表1】

表1. 同定した抗体及び抗体フラグメントの配列の概要

抗体 ID(mAb) ドメイン/鎖	配列番号	
2F3	4	10
VH	5	
2F22	6	10
VH	7	
HC Fab 0296	16	
HC Fab 0295	20	
HC mAb 0294	19	
LC Fab 0296, Fab 0295 & mAb 0294	17	
2F45	8	20
VH	9	
1F91	10	20
VH	11	
2F35	12	40
VH	13	

VH:重鎖可変ドメイン、VL:軽鎖可変ドメイン、HC:重鎖、LC:軽鎖。

【0118】

(実施例3)

結合相互作用分析

結合相互作用データを、Biacore T200機器で表面プラズモン共鳴により得た。ウサギボリクローナル抗マウス免疫グロブリン(Mouse Antibody Capture Kit、GE Healthcare社)を、Biacore T-200制御ソフトウェアバージョン2.0(GE Healthcare社)で利用可能なアミンカップリング手順及びAmine Coupling Kit(GE Healthcare社)で提供される試薬を使用して、Series S CM4センサーチップ(GE Healthcare社)のフローセル1~4に固定した。関連するマウスモノクローナル抗体を、一定濃度でフローセル2、3又は4に捕捉した。異なる濃度のヒトTFPI 又はTFPI(1~79)を、ランニングバッファー(10mM HEPES、pH7.4、300 mM NaCl、5mM CaCl₂、0.05% Surfactant P20、1mg/mL BSA)にサンプルを希釈することによって試験した。各サンプルを、30 μL/分の流速で300秒間の接触時間、その後420~600秒間の解離時間を使用してアッセイした。緩衝液プランクも、アッセイした。センサー表面を、10mMグリシンpH1.7を用いて流速30 μL/分で180秒間か又は流速30 μL/分で30秒間をそれぞれ2サイクルかいたずれかで再生した。

【0119】

マウスモノクローナル抗ヒトIgG(Human Antibody Capture Kit、GE Healthcare社)を、Biacore T-200制御ソフトウェア(GE Healthcare社)で利用可能なアミンカップリング手順及びAmine Coupling Kit(GE Healthcare社)で提供される試薬を使用して、Series S CM4センサーチップ(GE Healthcare社)のフローセル1~2に固定した。関連する抗体Bay 2A8、Bay 2A8-K95L又はmAb 0294(配列番号19及び17)を、一定濃度でフローセル2に捕捉した。上記の通りに、異なる濃度のヒトTFPI 又はTFPI(1~79)を試験した。センサー表面を、3 M MgCl₂を用いて流速30 μL/分で180秒間か又は流速30 μL/分で30秒間をそれぞれ2サイクルかいたずれかで再生した。

30

40

50

【0120】

ヒトFab Binder(Human Fab Capture Kit、GE Healthcare社)を、Biacore T-200制御ソフトウェア(GE Healthcare社)で利用可能なアミンカップリング手順及びAmine Coupling Kit(GE Healthcare社)で提供される試薬を使用して、9000～10000反応単位(RU)でSeries S CM4センサーチップ(GE Healthcare社)のフローセル1～4に固定した。関連するFabフラグメント、Fab 0295(配列番号20及び17)又はFab 0296(配列番号16及び17)を、一定濃度(0.2 μg/mL)で、流速10 μL/分でフローセル2、3又は4に180秒間注入した。これによりおよそ70～80RUの応答が得られるべきである。異なる濃度のヒトTFPI¹⁰を、ランニングバッファー(10mM HEPES、pH7.4、300mM NaCl、5mM CaCl₂、0.05% Surfactant P20、1mg/mL BSA)にサンプルを希釈することによって試験した。各サンプルを、50 μL/分の流速で300秒間の接触時間、その後600秒間の解離時間を使用してアッセイした。緩衝液ブランクも、アッセイした。センサー表面を、10mMグリシンpH2.1を用いて流速50 μL/分で30秒間をそれぞれ2サイクルで再生した。分析温度は25¹⁰及びサンプル区画温度は10¹⁰であった。

【0121】

Biacore T200 Evaluationソフトウェア(バージョン2.0)を使用して、データを分析した。結合定数(k_a 、 k_d 、 K_D)の決定を、TFPIと対象のモノクローナル抗体との1:1相互作用と仮定して得た。

【0122】

表2のデータは、試験した本発明の抗体(mAb 1F56、1F91、2F3、2F17、2F22、2F35、2F37、2F39、2F45、2F48)が、高親和性で酸性N末端ペプチド及びTFPI-KPI-1ドメインを含むするヒトTFPI(1～79)内のエピトープに結合することを実証する。²⁰

【0123】

表3のデータは、キメラ抗体mAb 0294:(配列番号17及び19)として発現されるmAb 2F22並びにキメラFabフラグメント、Fab 0296(SEQ ID 17及び16)及びFab 0295(SEQ ID 17及び20)が、TFPIに対して高親和性結合を保有することを実証する。

【0124】

【表2】

表2：結合定数

結合定数(k_a 、 k_d 、 K_D)を、ヒトTFPI α 又はTFPI(1~79)と対象の抗体との1:1相互作用と仮定して得た。Bay 2A8は、WO2010/017196に開示されている2A8 FabのヒトIgG4抗体バリアント(S241P)である。Bay 2A8-K95Lは、HC CDR3にK95L置換(Kabat付番)を有するBay 2A8のヒトIgG4抗体バリアント(S241P)であり、WO2012/135671に開示されている通り、2A8と比較して「Fab B」に見られる置換と同一である。

化合物	ヒトTFPI α			ヒトTFPI(1~79)		
	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
1F56	3.68E+05	3.61E-03	9.81E-09	3.75E+05	5.05E-03	1.35E-08
1F91	3.47E+05	3.49E-03	1.00E-08	3.30E+05	5.00E-03	1.51E-08
2F3	1.72E+05	7.69E-05	4.48E-10	2.74E+05	1.54E-04	5.61E-10
2F17	3.03E+05	1.39E-03	4.57E-09	3.61E+05	1.69E-03	4.68E-09
2F22	2.08E+05	1.43E-04	6.88E-10	2.42E+05	2.34E-04	9.65E-10
2F35	2.24E+05	1.41E-03	6.27E-09	1.88E+05	2.51E-03	1.33E-08
2F37	1.92E+05	9.50E-04	4.94E-09	1.69E+05	1.84E-03	1.09E-08
2F39	2.96E+05	1.37E-03	4.62E-09	2.84E+05	2.21E-03	7.79E-09
2F45	1.32E+05	2.88E-04	2.19E-09	1.42E+05	6.36E-04	4.48E-09
2F48	2.88E+05	0.002269	7.88E-09	2.95E+05	0.004377	1.48E-08
Bay 2A8	1.36E+06	7.72E-03	5.68E-09	結合なし	結合なし	結合なし
Bay 2A8-K95L	8.22E+05	3.99E-04	4.85E-10	結合なし	結合なし	結合なし

表3：結合定数

結合定数(k_a 、 k_d 、 K_D)を、ヒトTFPI α 又はTFPI(1~79)と対象の抗体又はFabフラグメントとの1:1相互作用と仮定して得た。n.d.:未決定

化合物	ヒトTFPI α			ヒトTFPI(1~79)		
	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
0294	2.7E05	1.2E-04	4.6E-10	1.6E06	4.3E04	2.7E-10
0295	3.3E05	1.3E-04	4.1E-10	n.d.	n.d.	n.d.
0296	2.6E05	1.9E04	7.2E-10	n.d.	n.d.	n.d.

【0125】

(実施例4)

抗体ビニング

全長TFPIへの結合についてTFPI抗体1F91、2F3、2F22、2F35、2F45、Bay 2A8-K95L、MBS532510(MyBioSource.com社)と10R-T141A(Fitzgerald Industries International社)との競合をバイオレイヤー干渉法(ForteBio Octet RED384 instrument、PALL Life Sciences社)を使用して測定した。mAb 1F91、mAb 2F3、mAb 2F22、mAb 2F35、mAb 2F45及びBay 2A8-K95Lを、1:1.2のモルmAb:モルビオチン-試薬(Thermo Scientific社 cat #21335)比を使用してリジン残基においてビオチンでランダムに標識し、それ以外は製造業者の指定に

10

20

30

40

50

従った。ビオチン標識化抗体を、Fortebio社ストレプトアビジンセンサー・チップ(PALL Life Sciences社)に捕捉し、続いてヒトTFPI₁を結合させ、続いてmAb 1F91、mAb 2F3、mAb 2F22、mAb 2F35、mAb 2F45、Bay 2A8-K95L、MBS532510又は10R-T141Aを結合させた。結果を表4に示す(黒色は、mAbがTFPI₁への結合について競合することを意味する。灰色は、mAbがTFPI₁への結合について競合しないことを意味する)。これらのデータは、抗体が異なる4つのピンに分類されることを示し、それらが異なる結合エピトープを有することを指示する。Bin 1: mAb 1F91、MBS532510及び10R-T141A。Bin 2: mAb 2F3、2F22及び2F45。Bin 3: mAb 2F35。Bin4: Bay2A8 K95L。

【0126】

【表3】

10

表4: TFPIへの結合について指示したTFPI抗体間の競合								
第2のmAb	1F91	2F3	2F22	2F35	2F45	Bay2A8-K95L	MBS532510	10R-T141A
第1のmAb								
ビオチン-1F91								
ビオチン-2F3								
ビオチン-2F22								
ビオチン-2F35								
ビオチン-2F45								
ビオチン-Bay2A8-K95L								

20

【0127】

(実施例5)

ヒトFVIII中和血漿におけるTF誘導トロンビン生成に対するTFPI(1~79)特異的TFPI抗体の効果

トロンビン生成に対する抗体の効果を、正常ヒト血漿(NHP、CryoCheck Normal Plasma)において試験した。凝固の開始は、再石灰化及び4 μMリン脂質小胞を伴う1pM TFの添加によって誘導された(PPP-Reagent low、Thrombinoscope社)。A型血友病様の血漿を、100 μg/mLヒツジ抗ヒトFVIII抗体の添加によって得た(Haematologic Technologies Inc.社、PAH FVIII-S)。トロンビン活性を、Bachem社(ブーベンドルフ、スイス)製の発蛍光性基質Z-Gly-Gly-Arg-AMC.HCl(I-1140)の変換後に連続的に評価した。蛍光を、それぞれ368及び460nmの励起並びに発光波長設定でマイクロタイタープレートFluorskan Ascent蛍光測定器(Thermo Labsystems社、ヘルシンキ、フィンランド)で測定した。キャリブレーターを使用することにより、形成されたトロンビンの量の算出並びに内部フィルタ効果及び発蛍光性基質の消費について得られた相対的蛍光単位の補正が可能になった。加えて、トロンビン-

2-マクログロブリン複合体による基質変換への寄与を減算した。これらの補正を、Thrombinoscope BV社(マーストリヒト、オランダ)によって提供される校正自動化トロンボグラム(CAT)コンピュータソフトウェア(バージョン5.0.0.745)を用いて自動的に実施した。トロンビン生成曲線を得られるデータの一次導関数を取得することにより、i)遅延時間、ii)全曲線下面積、内在性トロンビン潜在性(ETP)、iii)トロンビンピーク高(ピーク)、iv)ピークに達する時間(ttピーク)及びv)トロンビン生成の最大速度(Rate)を算出できるようになる。

【0128】

図1(曲線(a))は、NHPによるトロンビン生成曲線を示す。A型血友病様の症状をシミュレートするためのNHPへの100 μg/mLヒツジ抗ヒトFVIII抗体の添加は、トロンビン生成を強く減少させた(曲線(b))。FVIIIの中和の結果得られたトロンビン生成の抑制は、10nM TFPI-1 mAb 1F91(曲線(c))、mAb 2F3(曲線(d))、又はmAb 2F22(曲線(e))の添加により効果的に逆転した。図1の曲線から並びに追加のTFPI(1~79)抗体について得られるトロンビンピーク高(ピーク)及びピークに達する時間(ttピーク)のパラメーターを、表5に挙げる。図1及び表5に示すデータは、1)いくつかのTFPI(1~79)抗体がTFPI活性に対して阻害性

30

40

50

であり、2)個々の阻害性TFPI(1~79)抗体が異なる程度でトロンビンピーク高を高め、ピークに達する時間を短縮させることを示唆している。

【0129】

図2(曲線(a))は、NHPによるトロンビン生成曲線を示す。NHPは、約1.6nM TFPIを含有し、そのうち僅か約0.2nMが完全長ヒトTFPIとして存在する。図2は、FVIII中和血漿への5nM全長組換えヒトTFPIの添加が、測定可能なトロンビン生成を完全に妨げたことを示す(曲線(b))。KPI-1(mAb 1F91)に対する高親和性抗体10nMの添加は、5nM TFPIの存在下で有意なトロンビン生成を行うことが完全にできなかった(曲線(e))。しかしながら、驚くべきことに、これらの抗体濃度でmAb 2F22(曲線(d))及びより小さい程度でmAb 2F3(曲線(c))は、正常ヒト血漿におけるトロンビン生成と同等の強力なトロンビン生成を行うことができた。

【0130】

図2の曲線並びに追加のTFPI(1~79)mAbから得られるトロンビンピーク高(ピーク)及びピークに達する時間(ttピーク)のパラメーターを、表5に挙げる。データは、全てではないが一部のTFPI抗体が、高いTFPIレベルの条件でTFPI阻害を効率的に中和し、NHPと同等のレベルにトロンビン生成を再び行うことを示唆している。選択した抗体(200nM)を20nMの高いTFPI濃度で試験した場合、類似の結果が見られた(表6)。高いTFPIレベル(20nM)でTFPI阻害を中和する能力について、TFPI抗体2F22を、以前に記載されている異なるTFPI抗体(10R-T141A (Fitzgerald社)、MBS532510 (MyBioSource社)、ADG4903 (American Diagnostics GmbH社)、2H8(Mastら、Arterioscler Thromb Vasc Biol. (2002年) 22:2099~2104頁))と比較した。トロンビン生成のパラメーターを表7に挙げる。データは、TFPI抗体mAb 2F22が高いTFPIレベルでTFPI阻害を効率的に中和することを示すが、以前に記載されているTFPI KPI-1抗体は、これらの条件でTFPI阻害を中和することができなかった。mAb 2F22を、キメラ抗体mAb 0294並びにキメラ抗体フラグメントFab 0295及びFab 0296として発現させた。表8のデータは、mAb 0294/mAb 2F22の代表であるFabフラグメント0295(Fab 0295:配列番号17及び20)が、正常な又は高いTFPIレベルでのFVIII中和血漿においてTFPI阻害の高い中和能力を保持していることを示す。

【0131】

【表4】

表5：FVIII中和血漿において5nM TFPI α の有り又は無しで得られるトロンビン生成曲線から得たトロンビンピーク高さ(ピーク)及びピークに達する時間(ttピーク)

FVIII中和血漿		ピーク(nM)	ttピーク(分)	
TFPI 濃度 (nM)	化合物 (10nM)			
5	1F56	3.7	47.8	10
5	1F91	3.6	51.8	
5	2F3	28.6	13.8	
5	2F16	2.5	112.5	
5	2F17	1.9	91.9	
5	2F22	46.5	11.3	
5	2F35	3.6	70.3	
5	2F37	6.1	37.5	
5	2F39	9.8	15.8	
5	2F45	23.1	13.7	
5	2F48	5.0	44.5	20
5	-	1.9	112.2	
FVIII中和血漿		ピーク(nM)	ttピーク(分)	
TFPI 濃度 (nM)	化合物 (10nM)			
0	1F56	35.2	8.9	30
0	1F91	34.6	9.0	
0	2F3	88.4	9.3	
0	2F16	31.6	8.0	
0	2F17	36.2	9.0	
0	2F22	100.4	9.1	
0	2F35	30.4	9.6	
0	2F37	40.3	9.4	
0	2F39	68.9	10.0	
0	2F45	77.8	9.2	
0	2F48	35.5	9.6	
0	-	6.5	27.2	
正常血漿		ピーク(nM)	ttピーク(分)	
		59.1	11.4	40

【0 1 3 2】

【表5】

表6：20nM TFPI α 含有FVIII中和血漿で得られたトロンビン生成曲線から誘導されたトロンビンピーク高さ(ピーク)及びピークに達する時間(ttピーク)

FVIII中和血漿		ピーク(nM)	ttピーク(分)
TFPI 濃度 (nM)	化合物 (200nM)		
20	1F91	0.0	n.a
20	2F3	20.9	14.6
20	2F22	23.7	13.6
20	2F35	0	n.a
20	2F45	7.2	23.62
20	-	0	n.a
正常血漿		ピーク(nM)	ttピーク(分)
71			11.6

10

表7：20nM TFPI α 含有FVIII中和血漿で得られたトロンビン生成曲線から誘導されたトロンビンピーク高さ(ピーク)及びピークに達する時間(ttピーク)

FVIII中和血漿		ピーク(nM)	ttピーク(分)
TFPI 濃度 (nM)	化合物 (200nM)		
20	2F22	36.6	13.7
20	2H8	1.9	68.0
20	AD4903	2.4	66.2
20	10R-T141A	0	n.a
20	MBS532510	0	n.a
20	-	0	n.a
正常血漿		ピーク(nM)	ttピーク(分)
57.6			12.9

20

30

【0133】

【表6】

表8：20nM TFPI α 含有及び非含有FVIII中和血漿で得られたトロンビン生成曲線から誘導されたトロンビンピーク高さ(ピーク)及びピークに達する時間(ttピーク)

FVIII中和血漿		ピーク(nM)	ttピーク(分)	
TFPI 濃度 (nM)	化合物 濃度 (nM)	Fab 0295	Fab 0295	
20	200	26.6	14.7	10
20	100	26.7	16.3	
20	50	21.2	19.8	
20	25	11.9	29.0	
20	0	0.0	n.a.	
FVIII中和血漿		ピーク(nM)	ttピーク(分)	
TFPI 濃度 (nM)	化合物 濃度 (nM)	0295	0295	
0	200	117.7	8.3	20
0	100	112.8	8.5	
0	50	113.7	8.3	
0	25	108.8	8.7	
0	0	8.2	24.7	
正常血漿		ピーク(nM)	ttピーク(分)	
		61.1	13.8	

【0134】

(実施例6)

mAb 2F22のFabフラグメントとの複合体におけるTFPIクニッツプロテアーゼインヒビタードメイン1の結晶構造

mAb 2F22のFabフラグメント、Fab 0296(配列番号16及び17)との複合体における、酸性N末端領域及びクニッツ型プロテアーゼインヒビタードメイン1(KPI-1)(配列番号2)からなるヒトTFPI(1~79)のN末端部分の三次元構造を、X線結晶構造解析を使用して高分解能に決定した。その結果は、抗体が、TFPIのKPI-1及び先行するN末端側の部分を結合できることを実証する。得られたヒトTFPIエピトープ残基は、Leu16、Pro17、Leu19、Lys20、Leu21、Met22、Phe25、Cys35、Ala37、Met39、Arg41、Tyr56、Gly57、Gly58、Cys59、Glu60、Gly61、Asn62、Gln63、Arg65、Phe66、Glu67、Glu71及びMet75(配列番号2)を含む。

【0135】

材料及び方法

結晶学的目的の場合、実施例2に記載の通り、結晶解析のためにCMVプロモータに基づく発現ベクター(pTTベクター)を、mAb 2F22抗体フラグメントに対応するFabフラグメントの一過性発現用として生成した。

【0136】

実施例2に記載の通り、mAb 2F22のFabフラグメントをEXP1293F細胞中でマウス-ヒトキメラ形態Fab 0296(配列番号16及び17)で発現させ、KappaSelect樹脂を使用する標準的なアフィニティクロマトグラフィーによって精製した。

【0137】

ヒトTFPIのN末端部分、更にN末端に結合したGSSGSSGタグ(配列番号18)を含むヒトTFPI

30

40

50

KPI-1並びに配列番号17に対応する軽鎖及び配列番号16に対応する重鎖フラグメントからなるFab 0296(どちらもリン酸緩衝食塩水(PBS)緩衝液(2リットルの水に4錠、GIBCO社カタログ番号18912-014、Invitrogen Corporation社)中)を、僅かにモル過剰(1.1:1)のTFPI種と混合した。次いで複合体を、10,000Daの分子量カットオフを持つAmicon Ultra-4遠心フィルタを使用して約10.0mg/mLにまで濃縮した。結晶を、TTP Lab Tech社製96ウェルTTP IQプレート番号4150-05800及びウェル当たり100 μLの沈殿溶液を使用するシッティングドロップ技術によって成長させた。沈殿溶液は、20% w/v PEG 3350、200mMギ酸カリウムを含有し、3:1の比でタンパク質溶液と混合された。初期の全滴サイズは200nLであり、結晶は数日後に現れた。沈殿溶液75%及びグリセロール25%を含有する冷凍溶液混合物1 μLを、結晶を含有する滴へ移すことによって、結晶を低温凍結用として調製した。約2分間浸漬させた。次いで結晶を引き上げ、液体窒素中で急速冷凍し、データ収集の間、低温N₂ガス流によって100Kの温度で保った。結晶学的データを、MAX-lab、ルンド、スウェーデンによるビームラインBL911-3で、1.65 の分解能で収集した。空間群決定、データの統合及び拡大縮小を、XDSソフトウェアパッケージ[Kabsch, W.、J.Appl.Crystallogr. (1993)、第26巻、795～800頁]によって行った。空間群を、C2であると決定し、シンクロトロンデータの格子パラメーターを、それぞれ89.010、66.660、106.110 、及び 角111.18°であると決定した。1.65 分解能に対するR-symは、8.4%であり、完全性は99.5%であった。固有の反射の強度/シグマ(強度)の平均は、およそ1.8 の分解能で2.0に等しかった。

【0138】

Protein Data Bank(PDB) [Berman, H. M. ら、Nucleic Acids Res.、(2000)、第28巻、235～242頁]のアクセションコード1NGZ [Yin, J. ら、Proc Natl Acad Sci U S A. 2003年2月4日(100)第100巻、856～861頁]を持つFab分子の座標を使用する構造決定に、分子置換(MR)法を使用した。Fab分子を2つのドメイン、即ち可変及び定常ドメインに分け、それぞれをMR算出における探索モデルとして使用した。CCP4パッケージCCP4 [Collaborative Computational Project, N.、Acta crystallographica.Section D, Biological crystallography、(1994)、第50巻、760～763頁]のMolrepソフトウェア[Vagin, A. ら、J.Appl.Crystallogr. (1997)第30巻、1022～1025頁]を使用して定常及び可変Fabドメインの位置を調査した。MR工程においてKPI-1ドメインは見られなかつたが、差電子密度マップは、この段階におけるKPI-1ドメイン分子のおおよその位置を指し示した。CCP4ソフトウェアパッケージのDMソフトウェアによる電子密度改良後の、ARP-wARPソフトウェアを使用する自動化モデルの構築並びに位相改良により[Langer, G. ら、Nat Protoc. (2008)、第3巻、1171～1179頁][Murshudov, G.N. ら、Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography、(2011)、第67巻、355～367頁]、Fab 0296分子とKPI-1ドメイン構造及びKPI-1ドメインに先行するN末端部分の両方のほぼ完全な構造を得た。TFPI(配列番号2)の場合、残基15～77は、KPI-1ドメインに加えてKPI-1のN末端の一部の残基(残基26～76)も含むX線モデルに含まれる。Fab 0296フラグメントの場合、軽鎖残基1～212及び重鎖残基1～221が観察される。Cootソフトウェアプログラム[Emsley, P. ら、Acta Crystallogr. Sect.D-Bio. Crystallogr.、(2004)、第60巻、2126～2132頁]を使用する電子密度マップのコンピュータグラフィックス検査、モデル補正及び構築の後に、CCP4ソフトウェアパッケージのソフトウェアプログラムRefmac5[Murshudov, G. N. ら、Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography、(2011)、第67巻、355～367頁]を使用する結晶学的精密化を行う手順を挿入した。そのモデルに対してそれ以上有意な改良が得られなくなるまで、手順を繰り返した。1.65 分解能に対する全データについての最終的なR有り及びR無しは、それぞれ0.192並びに0.220であった。

【0139】

結果

CCP4プログラムセット[Collaborative Computational Project, N.、Acta crystallographica.Section D, Biological crystallography、(1994)、第50巻、760～763頁]のソフトウェアプログラムAreaimol[Lee, B. ら、J Mol Biol. (1971)、第55巻、379～400頁][Saff, E. B. ら、Math Intell. (1997)、第19巻、5～11頁]によってペアワイズ相互作用にお

10

20

30

40

50

いて除外された平均面積を算出することにより、結晶構造1195 \AA^2 のヒトTFPIフラグメント/抗TFPI 2F22 Fab分子複合体を得た。

【 0 1 4 0 】

Fab 0296とTFPIフラグメント分子の間で4.0 \AA のカットオフ距離を使用してCCP4プログラムセット[Bailey, S.、Acta Crystallogr. Sect. D-Biol. Crystallogr. (1994)、第50巻、760～763頁]のContactsソフトウェアを実行することにより、結晶構造において観察されたTFPIのN末端部分を含めたTFPI KPI-1(配列番号2)とFab 0296(配列番号16及び17)との直接の接触を同定した。可溶性TFPIフラグメント/Fab 0296複合体結晶構造の結果を、表9に示す。

【 0 1 4 1 】

Fab 0296に対する、TFPI N末端領域を含むTFPI KPI-1の得られたエピトープは、TFPIの以下の残基(配列番号2と同じ配列番号付けを使用する): Leu16、Pro17、Leu19、Lys20、Leu21、Met22、Phe25、Cys35、Ala37、Met39、Arg41、Tyr56、Gly57、Gly58、Cys59、Glu60、Gly61、Asn62、Gln63、Arg65、Phe66、Glu67、Glu71及びMet75を含むことが判明した。距離、電荷-電荷相互作用、水素結合、極性及び疎水的相互作用並びに低い溶媒接触性から評価した結果、残基:Arg41、Arg65及びGlu67(配列番号2)が、エピトープの特に重要な残基であると思われる。

【 0 1 4 2 】

従ってmAb 2F22のTFPIエピトープ(Fab 0296に代表される)は、短いN末端 ヘリックスを含むKPI-1ドメインに先行する残基、KPI-1ドメインの 鎖1の前のループ中にある残基及び 鎖1の先頭の残基を含む。 鎖2の末端にある残基及び 鎖2とKPI-1のC末端 ヘリックスの間とのループ中にある残基並びにKPI-1のC末端 ヘリックス内の残基も含まれる。

【 0 1 4 3 】

それ故、その結果は、Fab 0296、従ってmAb 2F22が、TFPI KPI-1及び先行するN末端領域の部分に特異的に結合することを示す。

【 0 1 4 4 】

TFPI KPI-1に対するFab 0296パラトープは、重鎖(H)の残基Val12、Phe27、Tyr32、Trp52、Arg53、Gly54、Gly55、Ser56、Ile57、Asp58、Tyr59、Ala61、Met64、Lys97、Ser99、His100、Asn102、Tyr103、Val104、Gly105及びTyr106(配列番号16、表9)並びに軽鎖(L)の残基Pro31、Ala32、Tyr49、Ser50、Asn53、Tyr55、Thr56、Tyr91、Thr92、Ser93及びTyr94(配列番号17、表9)を含む。

【 0 1 4 5 】

10

20

30

【表 7 A】

表 9 : TFPI フラグメント/Fab 0296複合体結晶構造のデータ

結晶学的複合体に対するTFPI KPI-1、K鎖(配列番号2)とFab 0296の重鎖(H鎖)(配列番号16)及びFab 0296の軽鎖(L鎖)(配列番号17)との相互作用。カットオフ距離4.0 Åを使用した。接触を、CCP4セット[Collaborative Computational Project, N., *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, (1994)、第50巻、760~763頁]のCONTACTコンピューターソフトウェアプログラムによって同定した。最後の列において、「**」は、CONTACTによって算出されたこの接触(距離<3.3 Å)が水素結合である可能性が高いことを指し示し、「*」は、その可能性が低いことを指し示す(距離>3.3 Å)。ブランクは、プログラムが水素結合の可能性がないと見なしたことを指し示す。水素結合は、ドナーとアクセプターの間に特異的であり、一般に強く、容易に特定可能である。

ヒトTFPI			Fab 0296			距離[Å]	可能性があるH-結合
残基の種類	残基番号及び鎖	原子名	残基の種類	残基番号及び鎖	原子名		
Leu	16K	CB	Tyr	32H	OH	3.77	
Leu	16K	CD1	Phe	27H	CB	3.99	
			Tyr	32H	CZ	3.78	
			Tyr	32H	CE2	3.86	
			Tyr	32H	OH	3.40	
			Lys	97H	CE	3.77	
Leu	16K	CD2	Val	2H	CG2	3.74	
Pro	17K	CG	Thr	56L	OG1	3.68	
Leu	19K	CA	Tyr	49L	OH	3.80	
Leu	19K	CB	His	100H	ND1	3.95	
			His	100H	CE1	3.46	
			His	100H	NE2	3.73	
			Tyr	49L	OH	3.79	
Leu	19K	CD1	Ser	99H	O	3.47	
			His	100H	CD2	3.85	
			His	100H	NE2	3.69	
			Tyr	55L	CE1	3.86	
Leu	19K	C	Tyr	49L	OH	3.85	
Lys	20K	N	Tyr	49L	CZ	3.89	
			Tyr	49L	OH	3.01	***
Lys	20K	CA	Tyr	49L	OH	3.93	
Lys	20K	CB	Tyr	49L	OH	3.70	
Lys	20K	CG	Tyr	49L	OH	3.51	
Lys	20K	CD	Tyr	49L	OH	3.80	
			Asn	53L	CG	3.73	
			Asn	53L	OD1	3.29	
Lys	20K	CE	Asn	53L	OD1	3.93	
Lys	20K	C	His	100H	CE1	3.92	
Lys	20K	O	His	100H	ND1	3.41	*
			His	100H	CE1	2.88	
			Tyr	49L	CE2	3.58	

【表 7 B】

Leu	21K	CA	Tyr	106H	OH	3.73	
Leu	21K	CB	Tyr	106H	OH	3.99	
Leu	21K	CD2	Tyr	103H	CE2	3.72	
			Tyr	103H	CD2	3.52	
			His	100H	ND1	3.89	
			Tyr	106H	OH	3.87	
Leu	21K	C	Tyr	106H	OH	3.71	
Met	22K	N	Tyr	106H	CZ	3.81	
			Tyr	106H	OH	2.81	***
			Tyr	106H	CE2	3.87	
Met	22K	CA	Tyr	106H	OH	3.68	
Met	22K	CB	Tyr	106H	OH	3.60	
Met	22K	CG	Ser	50L	OG	3.75	
Met	22K	SD	Pro	31L	CG	3.78	
Met	22K	CE	Pro	31L	CG	3.80	
Met	22K	O	Tyr	106H	OH	3.86	*
Phe	25K	CZ	Gly	105H	O	3.58	
			Ala	32L	CB	3.89	
Phe	25K	CE2	Val	104H	O	3.96	
			Gly	105H	CA	3.87	
			Gly	105H	C	3.87	
			Gly	105H	O	3.41	
			Tyr	106H	CE1	3.90	
			Tyr	106H	CZ	3.61	
			Tyr	106H	OH	3.79	
			Tyr	106H	CE2	3.86	
Phe	25K	CD2	Val	104H	O	3.81	
			Tyr	106H	CZ	3.81	
			Tyr	106H	OH	3.59	
Cys	35K	SG	Ala	61H	CB	3.72	
Ala	37K	CB	Met	64H	CE	3.75	
Met	39K	SD	Ile	57H	O	3.21	
Met	39K	CE	Ser	56H	CA	3.87	
			Ser	56H	CB	3.66	
			Ile	57H	N	3.44	
			Ile	57H	O	3.31	
Arg	41K	NE	Ser	56H	CB	3.74	
Arg	41K	CZ	Ser	56H	CB	3.85	
			Asp	58H	OD1	3.00	
Arg	41K	NH1	Asp	58H	CG	3.53	
			Asp	58H	OD1	2.67	***
			Asp	58H	OD2	3.65	*

【0 1 4 7】

10

20

30

40

【表 7 C】

Arg	41K	NH2	Ser	56H	CB	3.50	
			Ile	57H	N	3.79	*
			Ile	57H	C	3.58	
			Ile	57H	O	3.12	***
			Asp	58H	CG	3.78	
			Asp	58H	OD1	2.58	***
Tyr	56K	CE2	Asp	58H	OD1	3.40	
Gly	57K	O	Met	64H	CE	3.82	
Gly	58K	O	Asp	58H	C	3.65	
			Tyr	59H	N	2.83	***
			Tyr	59H	CB	3.96	
			Tyr	59H	CD1	3.80	
			Asp	58H	CA	3.56	
			Tyr	59H	CA	3.82	
			Tyr	59H	O	3.69	*
Cys	59K	CA	Tyr	59H	O	3.61	
Cys	59K	CA	Tyr	59H	O	3.59	
Cys	59K	CB	Tyr	59H	O	3.52	
Cys	59K	CB	Tyr	59H	O	3.30	
Cys	59K	SG	Met	64H	SD	3.34	
			Ala	61H	CA	3.60	
			Tyr	59H	O	3.92	
			Ala	61H	N	3.94	
			Ala	61H	CB	3.75	
Cys	59K	SG	Ala	61H	CB	3.85	
Glu	60K	N	Ser	93L	O	3.90	*
Glu	60K	CA	Ser	93L	O	3.25	
			Ser	93L	CB	4.00	
			Ser	93L	C	3.99	
Glu	60K	OE2	Tyr	94L	CE1	3.99	
Glu	60K	C	Ser	93L	O	3.30	
Glu	60K	O	Ser	93L	O	3.25	***
Gly	61K	O	Ser	93L	CA	3.27	
			Ser	93L	CB	3.51	
Asn	62K	CA	Thr	92L	O	3.84	
Gln	63K	CA	Val	104H	CG1	3.96	
Gln	63K	CG	Tyr	91L	O	3.58	
			Gly	105H	CA	3.77	
Gln	63K	CD	Tyr	91L	O	3.77	
			Thr	92L	CA	3.83	
Gln	63K	OE1	Thr	92L	O	3.95	*
			Thr	92L	CA	3.87	

【0 1 4 8】

10

20

30

40

【表 7 D】

Gln	63K	NE2	Tyr	91L	O	3.65	*
			Thr	92L	CA	3.98	
			Thr	92L	CG2	3.73	
			Ala	32L	CB	3.74	
Arg	65K	NE	Asp	58H	OD1	3.91	*
			Asp	58H	OD2	3.76	*
Arg	65K	CZ	Asp	58H	OD2	3.81	
Arg	65K	NH2	Asp	58H	CG	3.65	
			Asp	58H	OD2	2.92	***
			Val	104H	CG1	3.71	
			Val	104H	CG2	3.60	
Arg	65K	O	Val	104H	CG2	3.64	
Phe	66K	CD1	Tyr	103H	CE1	3.80	
			Tyr	103H	CD1	3.77	
Phe	66K	CE1	Tyr	103H	CE1	3.74	
			Tyr	103H	CD1	3.63	
Glu	67K	CB	Asn	102H	ND2	3.46	
Glu	67K	CG	Ser	56H	OG	3.33	
Glu	67K	CD	Gly	54H	N	3.40	
			Gly	54H	CA	3.69	
			Ser	56H	OG	3.32	
			Trp	52H	CB	3.78	
			Asn	102H	ND2	3.94	
			Ser	56H	CB	3.89	
Glu	67K	OE1	Gly	54H	N	2.79	***
			Gly	54H	CA	3.49	
			Trp	52H	CB	3.57	
			Trp	52H	C	3.94	
			Arg	53H	N	3.47	*
			Arg	53H	CG	3.98	
			Arg	53H	CD	3.87	
			Arg	53H	C	3.84	
			Asn	102H	CG	3.86	
			Asn	102H	OD1	3.93	*
			Asn	102H	ND2	2.97	***
Glu	67K	OE2	Gly	54H	C	3.27	
			Gly	54H	O	3.77	*
			Gly	55H	N	3.51	*
			Ser	56H	N	3.02	***
			Gly	54H	N	3.28	***
			Gly	54H	CA	3.27	
			Ser	56H	CA	3.64	
			Ser	56H	OG	2.52	***
			Trp	52H	CB	3.91	
			Ser	56H	CB	3.10	

10

20

30

40

【0 1 4 9】

【表7E】

Glu	71K	CD	Asn	102H	ND2	3.46	
			Arg	53H	NH1	3.50	
Glu	71K	OE1	Asn	102H	CB	3.82	
			Asn	102H	CG	3.79	
			Asn	102H	ND2	2.81	***
Glu	71K	OE2	Arg	53H	NH2	3.78	*
			Arg	53H	CD	3.65	
			Arg	53H	NE	3.58	*
			Asn	102H	ND2	3.43	*
			Arg	53H	CZ	3.01	
			Arg	53H	NH1	2.28	***
Glu	71K	O	Tyr	103H	CE1	3.91	
			Tyr	103H	OH	3.57	*
Met	75K	N	Tyr	103H	OH	3.80	*
Met	75K	CB	Tyr	103H	CE1	3.82	
			Tyr	103H	CZ	4.00	
			Tyr	103H	OH	3.73	

10

20

【0150】

(実施例7)

表面プラズモン共鳴によって測定される、FXaに対するTFPIの親和性及びFVIIa/可溶性TFに対するTFPIの親和性に対するTFPI(1~79)特異的TFPI抗体の効果

TFPIとFXa又はTFPIとFVIIa/可溶性TF(FVIIa/sTF)との間の相互作用を阻害するTFPI抗体の能力を、Biacore T200機器によるSPRアッセイを使用して評価した。TFPI KPI-1抗体に結合しているTFPIに対するFXa又はFVIIa/sTFの親和性を、TFPI KPI-3 mAb 4F110(WO2012/001087)に結合しているTFPIに対するFXa又はFVIIa/sTFの親和性と比較した。対照として、TFPI KPI-2 mAb 4F36(WO2010/072691)に結合しているTFPIに対するFXa又はFVIIa/sTFの親和性を、アッセイに含めた。

30

【0151】

ウサギポリクローン抗マウス免疫グロブリン(Mouse Antibody Capture Kit、GE Healthcare社)を、実施例3に記載の通りseries S CM4センサーチップ(GE Healthcare)のフローセル1~4に固定した。いずれの実験においても、関連する抗TFPI N末端抗体(2F22、2F3、2F45、2F48、1F91、2F35、10R-T141A(Fitzgerald社)、MBS532510(MyBioSource社)、ADG 4903(American Diagnostica GmbH社)、2H8(Mastら、Arterioscler Thromb Vasc Biol. (2002) 22:2099~2104頁))、抗TFPI KPI-2抗体(4F36、WO2010/072691)又は抗TFPI KPI-3抗体(WO2012/001087に開示されている4F110)mAbを、フローセル2、3又は4に流速10 μL/分で180秒間注入し、その後続けて20nMヒトTFPI(配列番号1)を全てのフローセル(1~4)に流速10 μL/分で180秒間注入した。異なる濃度(25nM、12.5nM、6.25nM及び0nM)のFXa(Haematologic Technologies社)を、ランニングバッファー(10mM HEPES、pH7.4、150mM NaCl、10 mM CaCl₂、0.05% Surfactant P20、1mg/mL BSA)にサンプルを希釈することによって試験した。各サンプルを、30 μL/分の流速で120秒間の接触時間、その後180秒間の解離時間を使用してアッセイした。センサー表面を、10mMグリシンpH1.7を用いて流速30 μL/分で30秒間をそれぞれ2サイクルで再生した。FVIIaの各サンプルを、620nM sTFを含有するランニングバッファーに、320nM、160nM、80nM又は0nMの最終濃度で調製した。可溶性組織因子1-219(sTF)を、公開されている手順に従って調製した(Freskgardら、1996年)。これまでに説明されているように、組換えFVIIaの発現及び精製を実施した(Thimら、1988年；Persson及びNielsen、1996年)。第1のサンプル注入の開始前に、FVIIa/sTF複合体を室温で10~15分間インキュベートした。各サンプルを、30 μL/分の流速で120秒間の接触時間、そ

40

50

の後180秒間の解離時間を使用してアッセイした。センサー表面を、10mMグリシンpH1.7を用いて流速30 μ L/分で30秒間をそれぞれ2サイクルで再生した。Biacore T200 Evaluationソフトウェア(バージョン2.0)を使用して、データを分析した。結合定数(k_a 、 k_d 、 K_D)の決定を、TFPIとFXa又はTFPIとFVIIa/sTFとの1:1相互作用と仮定して得た。

【 0 1 5 2 】

TFPI(1～79)に特異的な一部の抗TFPI抗体(mAb 2F22、2F3及び2F45)は、FXaに対するTFPIの親和性を抗TFPI KPI-3 mAb 4F110に結合しているTFPIに対するFXaの親和性と比較して30倍以上低下させたが、試験した他の全ての抗体は、TFPIに対するFXaの親和性に対して全く又は僅かな(10倍未満)効果しかなかった(表10)。親和性の低下は、主により速い解離速度(k_d)によるものであった。

10

【 0 1 5 3 】

TFPI(1～79)に特異的な全ての抗TFPI抗体は、FVIIa/sTFに対するTFPIの結合を遮断した(表11)。

【 0 1 5 4 】

【表8】

表10：指示した抗体に結合したヒトTFPI α に対するFXaの親和性を、SPR分析によって測定した。結合定数(k_a 、 k_d 、 K_D)の決定を、ヒトTFPI α とFXaとの1:1相互作用と仮定して得た。

サンプル	化合物	TFPIエピトープ	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
FXa	4F110	KPI-3	5.67E+05	1.67E-04	2.95E-10
FXa	4F36	KPI-2	1.85E+06	5.52E-02	結合なし
FXa	2F22	1-79	1.95E+05	1.31E-02	6.74E-08
FXa	2F3	1-79	1.79E+05	2.33E-02	1.30E-07
FXa	2F45	1-79	2.76E+06	3.21E-02	1.16E-08
FXa	2F48	1-79	6.99E+05	1.67E-03	2.39E-09
FXa	1F91	1-79	6.62E+05	1.20E-03	1.81E-09
FXa	2F35	1-79	6.17E+05	1.34E-03	2.16E-09
FXa	10R-T141A	1-79	8.10E+05	1.18E-03	1.46E-09
FXa	MBS532510	1-79	1.09E+06	1.19E-03	1.09E-09
FXa	ADG4903	1-79	9.34E+05	1.06E-03	1.14E-09
FXa	2H8	1-79	7.77E+05	9.53E-04	1.23E-09

10

20

表11：指示した抗体に結合したヒトTFPI α に対するFVIIa/sTFの親和性を、SPR分析によって測定した。結合定数(k_a 、 k_d 、 K_D)の決定を、ヒトTFPI α とFVIIa/sTF複合体との1:1相互作用と仮定して得た。n.b.:検出可能な結合なし

サンプル	化合物	TFPIエピトープ	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
FVIIa/sTF (640 nM)	4F110	KPI-3	2.31E+04	4.61E-03	1.99E-07
FVIIa/sTF (640 nM)	4F36	KPI-2	1.09E+04	2.79E-03	2.56E-07
FVIIa/sTF (640 nM)	2F22	1-79	n.b.	n.b.	n.b.
FVIIa/sTF (640 nM)	2F3	1-79	n.b.	n.b.	n.b.
FVIIa/sTF (640 nM)	2F45	1-79	n.b.	n.b.	n.b.
FVIIa/sTF (640 nM)	2F48	1-79	n.b.	n.b.	n.b.
FVIIa/sTF (640 nM)	1F91	1-79	n.b.	n.b.	n.b.
FVIIa/sTF (640 nM)	2F35	1-79	n.b.	n.b.	n.b.
FVIIa/sTF (640 nM)	10R-T141A	1-79	n.b.	n.b.	n.b.
FVIIa/sTF (640 nM)	MBS532510	1-79	n.b.	n.b.	n.b.
FVIIa/sTF (640 nM)	ADG4903	1-79	n.b.	n.b.	n.b.
FVIIa/sTF (640 nM)	2H8	1-79	n.b.	n.b.	n.b.

30

40

【0155】

(実施例8)

FXaアミド分解活性のTFPI 阻害に対するTFPI(1~79)に特異的な抗TFPI抗体の効果

発色性基質S-2765(Chromogenix社)に対するFXa(Enzyme Research Laboratories Ltd.社)アミド分解活性のTFPI 阻害への抗体の効果を、50mM HEPES、pH7.4、100mM NaCl、5mM CaCl₂、0.1mg/mL BSAを含有する緩衝液中でアッセイした。抗TFPI mAb(32nM)を、8nM TFP I (配列番号1)と室温で30分間インキュベートした。S-2765(0.5mM)を添加し、5分間インキュベートした。反応を、0.1nMの最終濃度になるようにFXaを添加することにより開始した。40分間インキュベーションした後に、生成物の形成を、Spectramax 340マイクロプレ

50

一ト分光光度計により405nmで測定した。TFPI の非存在下の活性を100%に設定し、TFPI 存在下であるが抗体が非存在下の活性を0%に設定した。結果を、表12に示す。予想通り、TFPI とKPI-2 mAb2021(WO2010/072691に開示されている)とのプレインキュベーションは、FXaに対するTFPI 活性を完全に中和した。TFPI KPI-1抗体の効果は、2つの群、即ちFXaのTFPI 阻害を部分的に中和した(>20%)1群(2F3、2F22、2F45)及びFXaのTFPI 阻害にあまり影響を及ぼさなかった(<20%)別の群に分けることができる。

【0156】

【表9】

表12：FXaのTFPI α 阻害に対する抗体の効果

TFPI α と40分間インキュベーションした後に測定した残りのFXa活性。TFPI α の非存在下の活性を100%に設定し、TFPI α 存在下であるが抗体が非存在下の活性を0%に設定した。

化合物	FXa活性(%)
2021	103.8±6.6
1F56	5.5±1.1
1F91	5.8±2.1
2F3	48.9±1.3
2F22	50.4±1.4
2F35	13.4±8.0
2F45	28.2±1.8
2F48	8.2±1.9
2H8	3.4
ADG4903	4.9
10R-T141A	6.8
MBS532510	6.8

【0157】

(実施例9)

sTF/FVIIaアミド分解活性及びFXaアミド分解活性によって測定されるTFPI(1～79)に特異的な抗TFPI抗体によるTFPI 阻害の反転

FVIIa/sTF活性のTFPI 阻害に対する抗体の効果を、20mM HEPES、pH7.5、150mM NaCl、5mM CaCl₂、0.1% BSA中で試験した。反応混合物は、5nM FVIIa、10nM可溶性TF(sTF)及び0.5mM発色性基質S-2288(H-D-Ile-Pro-Arg-pNa、Chromogenix社)を含有した。可溶性組織因子1-219(sTF)を、公開されている手順に従って調製した(Freskgardら、1996年)。これまでに説明されているように、組換えFVIIaの発現及び精製を実施した(Thimら、1988年；Persson及びNielsen、1996年)。活性をOD_{405nm}の変化によって室温で測定し、TFPIの非存在下の活性を100%に設定した。FVIIa/sTF活性は、150nM TFPI (配列番号1)の添加により阻害され、阻害は、表13に示すようにTFPI(1～79)に対する様々な抗体200nMによって逆転された。TFPI(1～79)に対する一部の抗体(1F91、2F3、2F22、2F45)は、これらの条件下でFVIIa/sTFのTFPI 阻害を逆転させた。1つのTFPI(1～79)抗体(2F35)及びKPI-2抗体(2021、WO2010/072691に開示されている)は、あまり効果がなかった。

【0158】

次に、FXa活性のTFPI 阻害の反転に対するKPI-1抗体の効果を試験した。反応混合物は、20mM HEPES pH7.5、150mM NaCl、5mM CaCl₂、0.1% BSA中に1nM FXa及び0.5mM発色性基質S-2765(Z-D-Arg-Gly-Arg-pNa、Chromogenix社)を含有した。FXaを、4nM TFPI (配列番号1)と15分間インキュベートし、続いて0.5mM S-2765を添加した。次いで活性をOD_{405nm}の変化によって室温で測定した。阻害の反転は、20nM TFPI(1～79)(1F91、2F3、2F22、2F35、2F45)又はKPI-2(2021、WO2010/072691に開示されている)抗体の添加によって15分後

10

20

30

40

50

に誘導された。得られた進行曲線に従って、抗体添加の100分後に傾きを測定した。TFPI の非存在下の活性を100%に設定した。結果を、表13に示す。KPI-2はFXaに結合するので、TFPI(1~79)に特異的な複数の抗TFPI抗体(2F3、2F22、2F45)が、FXa活性部位と相互作用するKPI-2上のエピトープに結合するmAb 2021よりFXa活性のTFPI 阻害をより効率的に逆転させたことは意外だった。結果は、KPI-2上的一次接触エリア以外のTFPI(1~79)上のエリアが、FXaへのTFPI の結合に不可欠であることを示唆している。

【0159】

【表10】

表13 : FVIIa/sTF及びFXaアミド分解活性のTFPI α 阻害の反転

化合物	FVIIa/sTF活性(%)	FXa活性(%) (100分間インキュベーション した後)
FVIIa/sTF又はFXa(A)	100±0.7	100±1.7
(A)+TFPI(B)	59.0±0.2	0.5±0.06
(B)+1F91	82.2±0.4	5.1±0.06
(B)+2F3	88.6±0.5	58.1±1.0
(B)+2F22	88.3±0.5	60.8±1.5
(B)+2F35	61.4±0.2	4.2±0.1
(B)+2F45	87.5±0.4	38.3±1.9
(B)+2021	66.5±0.3	18.6±0.4

10

20

30

【0160】

(実施例10)

FXa生成に対するTFPI(1~79)に特異的な抗体の効果

FXa生成のTFPI 阻害に対する抗TFPI抗体の効果を、50mM HEPES、pH7.4、100mM NaCl、10mM CaCl₂、1mg/mL BSA、0.1% PEG8000(w/v)を含有する緩衝液中でアッセイした。抗体(64nM)を、4nM TFPI と室温で10分間インキュベートした後、プレインキュベート(5分間)したFVIIa(0.5nM)と30pM Dade Innovin(Dade Behring社)との混合物を添加した。これまでに説明されているように、組換えFVIIaの発現及び精製を実施した(Thimら、1988年；Persson及びNielsen、1996年)。160nM FX (Enzyme Research Laboratories Ltd社)の添加後に、反応物を、全容積100mLで30分間インキュベートした。反応を、停止緩衝液(50mM HEPES、pH7.4、100mM NaCl、80mM EDTA)50mLの添加によってクエンチし、生成したFXaの量を、2mM発色性基質S-2765(Chromogenix社)50mLの添加により決定した。S-2765の切断を、Spectramax 340マイクロプレート分光光度計を使用して405nmでモニタリングした。TFPI の非存在下の活性を100%に設定し、TFPI 存在下であるが抗体が非存在下の活性を0%に設定した。結果は、抗TFPI(1~79)抗体2F22及び2F3が、FXa生成のTFPI 阻害を最も効果的に中和することを示唆している(表14)。予想通り、TFPI KPI-2抗体(mAb 2021、W02010/072691に開示されている)は、TFPI阻害を完全に中和した。

【0161】

40

【表 1 1】

表 1 4 : FXa活性

抗体有り及び無しでFVIIa、Innovin、FX及びTFPIを30分間インキュベーションした後に生成したFXa活性。TFPI α の非存在下の活性を100%に設定し、TFPI α 存在下であるが抗体が非存在下の活性を0%に設定した。

化合物	FXa活性(%)
2F22	40.5
2F3	36.6
2F45	21.0
2F48	2.9
1F56	18.4
1F91	13.9
2F35	18.3
mAb 2021	103.1

10

【0 1 6 2】

(実施例11)

FVIII中和全血におけるトロンボエラストグラフィー(TEG)に対するTFPI(1~79)特異的TFPI抗体の効果

20

クエン酸安定化した全血を、(最終濃度):100 μ g/mLヒツジ抗ヒトFVIII抗体(Haematologic Technologies Inc.社、PAHFVIII-S)及び0.3pM TF[Innovin(登録商標)、1:20,000]で補充した。この予混合物320 μ Lを、0.2M CaCl₂ 20 μ Lを含有するトロンボエラストグラフカップへ移したとき、100nM TFPI抗体の非存在下又は存在下で凝固が開始された。TEG出力波形を、最大120分間連続的に追跡した(5000シリーズTEG分析装置、Haemoscope Corporation社、ナイルズ、イリノイ州、米国)。以下のTEG変数を記録した:R時間(凝固時間、即ち凝固の開始から2mmの振幅が得られるまでの時間)、MTG(トロンビン生成の最大速度)、角度(R値とTEG出力波形の変曲点の間の角度として測定される凝血塊の発達)及びMA(凝血塊の最大機械強度を反映するTEG出力波形の最大振幅)。結果は、全てでないが一部のTFPI抗体が、凝固時間(R値)を短縮し、参照TFPI KPI-2抗体(mAb 2021、W02010/072691に開示されている)のと同程度にトロンビン生成の最大速度(MTG)、角度及び最大振幅(MA)を高めたことを示す(表 1 5)。

30

【0 1 6 3】

【表12】

表15:TEG結果

FVIII中和血液で得たトロンボエラストグラフィー曲線から得られるR時間(凝固時間)、MTG(トロンビン生成の最大速度)、角度及びMA(最大振幅)

FVIII中和血液	R時間 (分)	MTG (mm*100/秒)	角度 (°)	MA (mm)
化合物(100nM)				
2021	6.7	15.8	55.1	61.8
1F91	8.1	11.4	47.0	61.2
2F3	7.4	15.1	54.9	65.6
2F22	6.8	14.2	56.0	57.0
2F35	12.6	7.7	35.7	69.6
2F45	7.5	13.5	50.9	63.5
-	17.1	6.9	29.6	67.2
正常血液	R時間 (分)	MTG (mm*100/秒)	角度 (°)	MA (mm)
	6.1	19.3	60.3	65.6

10

20

【0164】

本明細書において本発明の特定の特徴を例示し説明したが、当業者であれば多くの修飾、置換、変更及び同等物を思いつくと予想される。従って、添付の請求の範囲は、そのような修飾及び変更の全てを本発明の真の本質に含まれるものとして網羅することを目的とすることが理解されるものとする。

【図1】

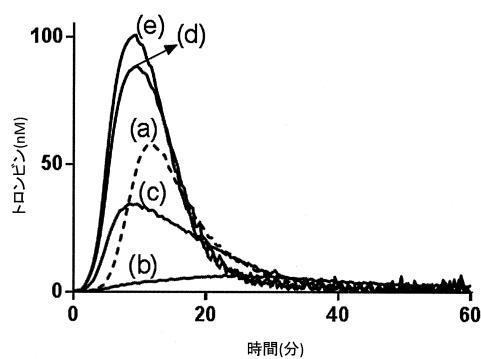


図1

【図2】

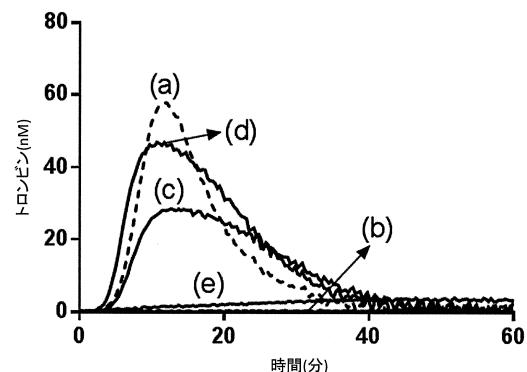


図2

【配列表】

0006584397000001.app

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 14159679.1

(32)優先日 平成26年3月14日(2014.3.14)

(33)優先権主張国・地域又は機関

　　欧洲特許庁(EP)

(72)発明者 ベーリット・オールセン・クローグ

　　デンマーク・DK-2880・バウスヴェア・ノヴォ・アレー・(番地なし)・ノヴォ・ノルディ
　　スク・アー／エス

(72)発明者 ヘレ・ヘイブルッホ・ペーターセン

　　デンマーク・DK-2880・バウスヴェア・ノヴォ・アレー・(番地なし)・ノヴォ・ノルディ
　　スク・アー／エス

(72)発明者 セシリア・アウグストソン

　　デンマーク・DK-2880・バウスヴェア・ノヴォ・アレー・(番地なし)・ノヴォ・ノルディ
　　スク・アー／エス

審査官 宮岡 真衣

(56)参考文献 欧州特許出願公開第00539975(EP, A1)

　　国際公開第2012/135671(WO, A1)

　　特表2012-513193(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 16/00 - 16/46

A61K 39/395

A61P 7/00 - 7/12

C12N 15/13