

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6586016号  
(P6586016)

(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 16/38   | (2006.01) | C07K | 16/38  |
| A61K 39/395  | (2006.01) | A61K | 39/395 |
| A61P 7/04    | (2006.01) | A61P | 7/04   |
| C12N 15/13   | (2006.01) | C12N | 15/13  |
| C12P 21/08   | (2006.01) | C12P | 21/08  |

請求項の数 19 (全 74 頁)

|                    |                               |
|--------------------|-------------------------------|
| (21) 出願番号          | 特願2015-562176 (P2015-562176)  |
| (86) (22) 出願日      | 平成26年3月14日 (2014.3.14)        |
| (65) 公表番号          | 特表2016-512214 (P2016-512214A) |
| (43) 公表日           | 平成28年4月25日 (2016.4.25)        |
| (86) 國際出願番号        | PCT/EP2014/055055             |
| (87) 國際公開番号        | W02014/140240                 |
| (87) 國際公開日         | 平成26年9月18日 (2014.9.18)        |
| 審査請求日              | 平成29年3月13日 (2017.3.13)        |
| (31) 優先権主張番号       | 13159515.9                    |
| (32) 優先日           | 平成25年3月15日 (2013.3.15)        |
| (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       | 61/789, 274                   |
| (32) 優先日           | 平成25年3月15日 (2013.3.15)        |
| (33) 優先権主張国・地域又は機関 | 米国 (US)                       |

|           |   |
|-----------|---|
| (73) 特許権者 | 509091848<br>ノヴォ・ノルディスク・アー/エス<br>デンマーク、ハウスヴェア・ディーケー-<br>2880、ノヴォ・アレー            |
| (74) 代理人  | 100108453<br>弁理士 村山 靖彦  |
| (74) 代理人  | 100110364<br>弁理士 実広 信哉  |
| (74) 代理人  | 100133400<br>弁理士 阿部 達彦  |
| (72) 発明者  | ビーリト・オールセン・クローウ<br>デンマーク・DK-2880・ハウスヴェ<br>ア・ノヴォ・アレー・(番地なし)・ノヴ<br>オ・ノルディスク・アー/エス |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】組織因子系凝固インヒビター上の2つのエピトープに特異的に結合することが可能な抗体

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

組織因子系凝固インヒビター(TFPI)の第1のエピトープ及びTFPIの第2のエピトープに特異的に結合することが可能であり、第1のエピトープは配列番号1の1～181位の中に位置するアミノ酸残基を含み、第2のエピトープは配列番号1の182～276位の中に位置するアミノ酸残基を含む、組織因子系凝固インヒビター(TFPI)に特異的に結合することが可能な二重特異的抗体。

## 【請求項2】

第1のエピトープが組織因子系凝固インヒビター(TFPI)のKPI-1ドメインの中のアミノ酸残基を含む、請求項1に記載の二重特異的抗体。

10

## 【請求項3】

第1のエピトープが組織因子系凝固インヒビター(TFPI)のKPI-2ドメインの中のアミノ酸残基を含む、請求項1に記載の二重特異的抗体。

## 【請求項4】

第2のエピトープが組織因子系凝固インヒビター(TFPI)のKPI-3ドメインの中のアミノ酸残基を含む、請求項1～3のいずれか一項に記載の二重特異的抗体。

## 【請求項5】

組織因子系凝固インヒビター(TFPI)に特異的に結合することが可能であり、配列番号1のLeu 16、Pro 17、Leu 19、Lys 20、Leu 21、Met 22、Phe 25、Cys 35、Ala 37、Met 39、Arg 41、Tyr 56、Gly 57、Gly 58、Cys 59、Glu 60、Gly 61、Asn 62、Gln 63、Arg 65

20

、Phe 66、Glu 67、Glu 71及びMet 75からなる群から選択される1つ又は複数のアミノ酸残基を含むKPI-1エピトープに結合することが可能である、請求項1、2又は4に記載の二重特異的抗体。

【請求項6】

配列番号1のアミノ酸残基Arg 41、Arg 65及び/又はGlu 67を含むKPI-1エピトープに結合することが可能である、請求項5に記載の二重特異的抗体。

【請求項7】

組織因子系凝固インヒビター(TFPI)に特異的に結合することが可能であり、配列番号1のGlu 100、Glu 101、Asp 102、Pro 103、Arg 107、Tyr 109、Thr 111、Tyr 113、Phe 114、Asn 116、Gln 118、Gln 121、Cys 122、Glu 123、Arg 124、Phe 125、Lys 126及びLeu 140からなる群から選択される1つ又は複数のアミノ酸残基を含むKPI-2エピトープに結合することが可能である、請求項1、3又は4に記載の二重特異的抗体。  
10

【請求項8】

組織因子系凝固インヒビター(TFPI)に特異的に結合することが可能であり、配列番号1のアミノ酸残基Arg 107を含むKPI-2エピトープに特異的に結合することが可能である、請求項7に記載の二重特異的抗体。

【請求項9】

組織因子系凝固インヒビター(TFPI)に特異的に結合することが可能であり、配列番号1のTyr 207、Asn 208、Ser 209、Val 210、Ile 211、Gly 212、Lys 213、Arg 215、Lys 232、Gln 233、Leu 236及びLys 240からなる群から選択される1つ又は複数のアミノ酸残基を含むKPI-3エピトープに結合することが可能である、請求項1~8のいずれか一項に記載の二重特異的抗体。  
20

【請求項10】

配列番号1のアミノ酸残基Ile 211、Lys 213及び/又はArg 215を含むKPI-3エピトープに結合することが可能である、請求項9に記載の二重特異的抗体。

【請求項11】

Fab-Fabコンジュゲート又は完全長抗体フォーマット形である、請求項1~10のいずれか一項に記載の二重特異的抗体。

【請求項12】

ヒト化されている、請求項1~11のいずれか一項に記載の二重特異的抗体。

30

【請求項13】

請求項1~12のいずれか一項に記載の二重特異的抗体を含む医薬組成物。

【請求項14】

第1の单一特異的抗体及び第2の单一特異的抗体を含む医薬組成物であって、第1の单一特異的抗体は、配列番号1の組織因子系凝固インヒビター(TFPI)アミノ酸残基1~181の中のエピトープに特異的に結合することが可能であり；

第2の单一特異的抗体は、配列番号1のTFPIアミノ酸残基182~276の中のエピトープに特異的に結合することが可能である、医薬組成物。

【請求項15】

第1の单一特異的TFPI抗体が、KPI-2の中のエピトープに特異的に結合することができ、  
第2の单一特異的TFPI抗体が、KPI-3の中のエピトープに特異的に結合することができ、KPI-2エピトープに結合する抗体の重鎖が、

40

配列番号3のアミノ酸残基31~35に対応するCDR1配列、

配列番号3、配列番号5及び配列番号7から成る群から選択される配列のアミノ酸残基50~66に対応するCDR2配列、

配列番号3のアミノ酸残基99~110に対応するCDR3配列、  
を含み、

KPI-2エピトープに結合する抗体の軽鎖が、

配列番号4のアミノ酸残基24~39に対応するCDR1配列、

配列番号4のアミノ酸残基55~61に対応するCDR2配列、

50

配列番号4のアミノ酸残基94～102に対応するCDR3配列、  
を含み、

KPI-3エピトープに結合する抗体の重鎖が、

配列番号9のアミノ酸残基31～35に対応するCDR1配列、

配列番号9のアミノ酸残基50～66に対応するCDR2配列、

配列番号9のアミノ酸残基99～107に対応するCDR3配列、

を含み、

KPI-3エピトープに結合する抗体の軽鎖が、

配列番号10のアミノ酸残基24～34に対応するCDR1配列、

配列番号10のアミノ酸残基50～56に対応するCDR2配列、

配列番号10のアミノ酸残基89～97に対応するCDR3配列、

を含む、請求項14に記載の医薬組成物。

**【請求項16】**

第1の单一特異的TFPI抗体が、KPI-1の中のエピトープに特異的に結合することができ、

第2の单一特異的TFPI抗体が、KPI-3の中のエピトープに特異的に結合することができ、KPI

1-1エピトープに結合する抗体の重鎖が、

配列番号22のアミノ酸残基31～36に対応するCDR1配列、

配列番号22のアミノ酸残基51～66に対応するCDR2配列、

配列番号22のアミノ酸残基99～104に対応するCDR3配列、

を含み、

KPI-1エピトープに結合する抗体の軽鎖が、

配列番号23のアミノ酸残基24～33に対応するCDR1配列、

配列番号23のアミノ酸残基49～55に対応するCDR2配列、

配列番号23のアミノ酸残基88～96に対応するCDR3配列、

を含み、

KPI-3エピトープに結合する抗体の重鎖が、

配列番号9のアミノ酸残基31～35に対応するCDR1配列、

配列番号9のアミノ酸残基50～66に対応するCDR2配列、

配列番号9のアミノ酸残基99～107に対応するCDR3配列、

を含み、

KPI-3エピトープに結合する抗体の軽鎖が、

配列番号10のアミノ酸残基24～34に対応するCDR1配列、

配列番号10のアミノ酸残基50～56に対応するCDR2配列、

配列番号10のアミノ酸残基89～97に対応するCDR3配列、

を含む、請求項14に記載の医薬組成物。

**【請求項17】**

KPI-1の中のエピトープに特異的に結合することができる第1の单一特異的TFPI抗体、及び、KPI-3の中のエピトープに特異的に結合することができる第2の单一特異的TFPI抗体を含み、

KPI-1エピトープに結合する抗体の重鎖が、

配列番号24のアミノ酸残基31～35に対応するCDR1配列、

配列番号24のアミノ酸残基50～65に対応するCDR2配列、

配列番号24のアミノ酸残基98～110に対応するCDR3配列、

を含み、

KPI-1エピトープに結合する抗体の軽鎖が、

配列番号25のアミノ酸残基24～34に対応するCDR1配列、

配列番号25のアミノ酸残基50～56に対応するCDR2配列、

配列番号25のアミノ酸残基89～96に対応するCDR3配列、

を含み、

KPI-3エピトープに結合する抗体の重鎖が、

10

20

30

40

50

配列番号9のアミノ酸残基31～35に対応するCDR1配列、  
 配列番号9のアミノ酸残基50～66に対応するCDR2配列、  
 配列番号9のアミノ酸残基99～107に対応するCDR3配列、  
 を含み、

KPI-3エピトープに結合する抗体の軽鎖が、  
 配列番号10のアミノ酸残基24～34に対応するCDR1配列、  
 配列番号10のアミノ酸残基50～56に対応するCDR2配列、  
 配列番号10のアミノ酸残基89～97に対応するCDR3配列、  
 を含む、医薬組成物。

## 【請求項18】

10

KPI-1の中のエピトープに特異的に結合することができる第1の单一特異的TFPI抗体、及び、KPI-3の中のエピトープに特異的に結合することができる第2の单一特異的TFPI抗体を含み、

KPI-1エピトープに結合する抗体の重鎖が、  
 配列番号26のアミノ酸残基31～35に対応するCDR1配列、  
 配列番号26のアミノ酸残基50～65に対応するCDR2配列、  
 配列番号26のアミノ酸残基98～110に対応するCDR3配列、  
 を含み、

KPI-1エピトープに結合する抗体の軽鎖が、  
 配列番号27のアミノ酸残基24～34に対応するCDR1配列、  
 配列番号27のアミノ酸残基50～56に対応するCDR2配列、  
 配列番号27のアミノ酸残基89～96に対応するCDR3配列、  
 を含み、

20

KPI-3エピトープに結合する抗体の重鎖が、  
 配列番号9のアミノ酸残基31～35に対応するCDR1配列、  
 配列番号9のアミノ酸残基50～66に対応するCDR2配列、  
 配列番号9のアミノ酸残基99～107に対応するCDR3配列、  
 を含み、

KPI-3エピトープに結合する抗体の軽鎖が、  
 配列番号10のアミノ酸残基24～34に対応するCDR1配列、  
 配列番号10のアミノ酸残基50～56に対応するCDR2配列、  
 配列番号10のアミノ酸残基89～97に対応するCDR3配列、  
 を含む、医薬組成物。

## 【請求項19】

30

KPI-1の中のエピトープに特異的に結合することができる第1の单一特異的TFPI抗体、及び、KPI-3の中のエピトープに特異的に結合する第2の单一特異的TFPI抗体を含み、

KPI-1エピトープに結合する抗体の重鎖が、  
 配列番号30のアミノ酸残基31～35に対応するCDR1配列、  
 配列番号30のアミノ酸残基50～65に対応するCDR2配列、  
 配列番号30のアミノ酸残基98～110に対応するCDR3配列、  
 を含み、

40

KPI-1エピトープに結合する抗体の軽鎖が、  
 配列番号31のアミノ酸残基24～34に対応するCDR1配列、  
 配列番号31のアミノ酸残基50～56に対応するCDR2配列、  
 配列番号31のアミノ酸残基89～96に対応するCDR3配列、  
 を含み、

KPI-3エピトープに結合する抗体の重鎖が、  
 配列番号9のアミノ酸残基31～35に対応するCDR1配列、  
 配列番号9のアミノ酸残基50～66に対応するCDR2配列、  
 配列番号9のアミノ酸残基99～107に対応するCDR3配列、

50

を含み、

KPI-3エピトープに結合する抗体の軽鎖が、

配列番号10のアミノ酸残基24～34に対応するCDR1配列、

配列番号10のアミノ酸残基50～56に対応するCDR2配列、

配列番号10のアミノ酸残基89～97に対応するCDR3配列、

を含む、医薬組成物。

**【発明の詳細な説明】**

**【技術分野】**

**【0001】**

本発明は、組織因子系凝固インヒビターアルファ(TFPI )及びTFPIベータ(TFPI )の両方に存在するN末端領域(残基1～181)中のエピトープと、完全長TFPI だけに存在する、C末端部分(残基182～276)中の別のエピトープとに結合することが可能である、抗体及びその組成物に関する。本発明は、そのような抗体の医薬的及び治療的な使用にも関する。 10

**【背景技術】**

**【0002】**

出血個体において、凝固は、脈管外TFが血液中のFVIIaに曝露するときに組織因子/VIIa因子(TF/FVIIa)複合体によって開始される。TF/FVIIa複合体形成は、活性化V因子(FVa)と一緒に限定量のトロンビンを生成するFXaへのX因子(FX)の活性化につながる。少量のトロンビンは血小板を活性化し、それは次に活性化VIII因子(FVIIIa)及びIX因子(IXa)で構成されるテナーゼ複合体の構築及び結合を支援する血小板リン脂質の表面曝露をもたらす。 20 テナーゼ複合体はFX活性化の非常に効率的な触媒であり、この第2の工程で生成されるFXaは最終トロンビンバーストを担うFVa/FXaプロトロンビナーゼ複合体で活性プロテアーゼの役目をする。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、それは重合して、漏出性血管を密封して止血するフィブリンネットワークを形成する。急速で大量のトロンビンバーストは、固形で安定したフィブリンクロットの形成の必要条件である。

**【0003】**

FVIII又はFIX欠乏によって引き起こされる不十分なFXa増殖及びトロンビン生成は、それぞれ血友病A及びBの患者の出血体质の根底にある理由である。血友病患者では、FVIII又はFIX欠乏がテナーゼ複合体による不全なFXa生成につながるので、FXa生成は主にTF/FVIIa複合体によって推進される。しかし、組織因子系凝固インヒビター(TFPI)が自己調節ループ中のXa因子及びTF/FVIIa複合体を阻害するので、TF/FVIIaによって媒介されるFXからFXaへの活性化は一時的である。フィードバック阻害は、TF/FVIIa/FXa/TFPI複合体の形成につながる。TFPI阻害を中和することは、凝固の開始の間のTF/FVIIaによって媒介されるFXの活性化を長くし、それによって、それは、例えばFVIII又はFIX欠乏によるテナーゼ活性障害によって引き起こされる不十分なFXa生成を有する血友病患者で止血を促進する。

**【0004】**

TFPIは、TF-FVIIa及びFXaの両方の阻害を通してFXの活性化及び活性を調節する、遅く、タイトに結合する競合的阻害剤である。TFPIによるFXaの阻害は二相反応で起こり、それは、ゆるいTFPI-FXa複合体を最初にもたらし、それは、タイトな結合のTFPI-FXa複合体にゆっくりと再編成され、そこにおいて、TFPIの第2のクーニッツ型阻害剤ドメイン(KPI-2)がFXaの活性部位に結合してブロックする。凝固の開始の後、TF/FVIIaによって媒介されるFXa生成は、TFPIによってタイトに下方制御される。TF/FVIIaは、FXaがTF/FVIIa複合体に結合するか、膜の上のその近接部に結合するときに、律速段階としてFXaのTFPIによる阻害を含む工程でTFPIによって阻害される(Baughら、1998、JBC、273:4378～4386頁)。TFPIの第1のクーニッツ型阻害剤ドメイン(KPI-1)は、タイトなTFPI-FXa複合体の形成に寄与し、それはTF結合FVIIaの活性部位に直接に結合してブロックする。第3のクーニッツ型阻害剤ドメインKPI-3及び塩基性のC末端テールからなるTFPIのC末端部分は、いかなる直接阻害活性も有しないが、それはTFPI-FXa複合体の形成を増強し、それはプロテインS、 40

50

及び脈管表面へのTFPI の局在化に関するヘパリン様分子に結合する。

【0005】

TFPI は、生理的に意味のあるTFPI 濃度でプロトロンビナーゼ複合体によるFXa媒介トロンビン生成を阻害する。このフィードバック阻害は、クロット形成の開始段階の一時性の障害として主に働く。プロトロンビナーゼ複合体でのFXaのTFPI による阻害は、TFPI の塩基性領域と、血小板FVaの上に、及びFXaによって最初に活性化されるときにFVaの上に曝露させられるFVの酸性領域との間の高親和性相互作用を通して媒介される。プロトロンビナーゼ複合体によって生成されるトロンビンによってFVaが更に切断されるときの酸性領域の除去の結果、TFPI のFVa依存性阻害活性は失われる。TFPI はC末端塩基性領域がないので、プロトロンビナーゼ活性の阻害剤でない(Woodら2013、PNAS、110:17838 ~ 843頁)。

10

【0006】

TFPIに結合することが可能である抗体は、当技術分野で公知である。例えば、WO2010/072691、WO2012/001087及びWO2012/135671は、モノクローナル抗体(mAb)を開示し、その各々はTFPIの1つの特異的エピトープへの結合が可能である。以下の制限は、例えばKPIドメインの上の、単一の可変領域によって規定される抗体のパラトープ領域に一般的に制限される単一のTFPIエピトープを標的にするそのような抗体に適用することができる。第1に、TF/FVIIa/FXa複合体の最終阻害は、TFPI及びTF/FVIIa/FXa複合体の上に点在する相補領域の間でのいくつかの相互作用に依存する。これは、TFPIのKPI-1及びKPI-2のそれぞれFVIIa及びFXaの活性部位への直接結合だけでなく、TFPIのN末端及びC末端領域の領域を含むTF/FVIIa/FXaエキソサイトとの相互作用にも適用される。例えば単一のKPIに結合するモノクローナル抗体は、特にTFPIの生理的に高い濃度でTFPIの全ての阻害機能を完全にブロックすることができないことがある。第2にモノクローナル抗体又はその断片でTFPIを標的にすることは、TFPI-mAb複合体の腎クリアランスの低減の結果として、又はTFPI-mAb複合体形成のために低減される他のクリアランス機構の結果として、TFPIを循環中に蓄積せざることがある。いくつかのモノクローナル抗体の投与は、TFPIのKPI-3及びC末端テールに結合するヘパリン又はアプタマーの投与後に観察されたものと同じように、内皮からのTFPIの放出及び急増する血漿TFPIレベルを引き起こすことができる(WongらHaemophilia、2012、18:LB-WE 03.1 p831、Hoppensteadtら、Thromb. Res.、77:175 ~ 185頁)。第3に、TFPIの特異的プールを標的にすることが望ましいことがある。損傷部位での凝固の調節のために、完全長循環TFPI が特に重要であると考えられる。全てのTFPIプールのうち、完全長TFPI だけが露出したC末端領域(残基182 ~ 276)を有するという事実は、完全長TFPI

20

プールを選択的に標的にすることを可能にする。単に完全長TFPI プールを標的にし、例えばTFPI やリポタンパク質関連TFPIを標的にしないことによって、標的によって媒介される薬物配置を低減し、*in vivo*薬物半減期の延長及び必要用量の低減をもたらすことができる。しかし、TFPI のC末端領域を特異的に標的にする公知の抗体は、特にTFPIの高い濃度でTFPI 活性を完全に中和することができない。本発明者らは、本明細書に開示される抗体-及びその組合せ-は、そのような限界に対処することができると想定している。

30

【先行技術文献】

40

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】WO2010/072691

【特許文献2】WO2012/001087

【特許文献3】WO2012/135671

【特許文献4】WO2005040219

【特許文献5】米国特許出願公開第20050238646号

【特許文献6】米国特許出願公開第20020161201号

【特許文献7】EP404,097

【特許文献8】WO93/11161

50

- 【特許文献 9】米国特許第5,629,384号
- 【特許文献 10】WO2006134148
- 【特許文献 11】WO90/13540
- 【特許文献 12】米国特許第5,932,462号
- 【特許文献 13】米国特許第5,643,575号
- 【特許文献 14】WO2003/031464
- 【特許文献 15】WO2004/099231
- 【特許文献 16】WO0331464
- 【特許文献 17】米国特許第5,677,425号
- 【非特許文献】 10
- 【0008】
- 【非特許文献 1】Baughら、1998、JBC、273:4378 ~ 4386頁
- 【非特許文献 2】Woodら2013、PNAS、110:17838 ~ 843頁
- 【非特許文献 3】WongらHaemophilia、2012、18:LB-WE 03.1 p831
- 【非特許文献 4】Hoppensteadtら、Thromb. Res.、77:175 ~ 185頁
- 【非特許文献 5】Birdら、Science (1988) 242:42S ~ 426頁
- 【非特許文献 6】Hustonら、PNAS (1988) 85:5879 ~ 5883頁
- 【非特許文献 7】IIIら、Protein Eng (1997) 10:949 ~ 57頁
- 【非特許文献 8】Holliger及びHudson、Nat Biotechnol (2005) 23:1126 ~ 1136頁 20
- 【非特許文献 9】Cai及びGaren、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1996) 93: 6280 ~ 6285頁
- 【非特許文献 10】Desmyterら、J. Biol. Chem. (2002) 277: 23645 ~ 23650頁
- 【非特許文献 11】Bondら、J. Mol. Biol. (2003) 332: 643 ~ 655頁
- 【非特許文献 12】Pluckthun、1994、The Pharmacology of Monoclonal Antibodies、Vol. 113、Rosenburg and Moore編、Springer-Verlag、New York、269 ~ 315頁
- 【非特許文献 13】Hollingerら、1993、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90:6444 ~ 6448頁
- 【非特許文献 14】Zapataら、1995、Protein Eng.、8(10):1057 ~ 1062頁
- 【非特許文献 15】Chelius D.ら；MAb. 2010年5月 ~ 6月；2(3): 309 ~ 319頁
- 【非特許文献 16】Klein Cら、MAb. 2012年11月 ~ 12月；4(6): 653 ~ 663頁
- 【非特許文献 17】Labrijnら、PNAS、110、5145 ~ 5150頁(2013)
- 【非特許文献 18】Kontermann、MAbs. 2012年3月 ~ 4月4(2): 182 ~ 197頁 30
- 【非特許文献 19】「Polymer Synthesis and Characterization」、J. A. Nairn、University of Utah、2003
- 【非特許文献 20】Advanced Drug Delivery Reviews、2002、54、459 ~ 476頁
- 【非特許文献 21】Nature Reviews Drug Discovery、2003、2、214 ~ 221頁、DOI:10.1038/nrd1033
- 【非特許文献 22】Adv Polym Sci、2006、192、95 ~ 134頁、DOI 10.1007/12\_022、Springer-Verlag、Berlin Heidelberg、2005
- 【非特許文献 23】R. F. Taylor、(1991)、「Protein immobilisation. Fundamental and applications」、Marcel Dekker、N.Y.
- 【非特許文献 24】S. S. Wong、(1992)、「Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking」、CRC Press、Boca Raton 40
- 【非特許文献 25】G. T. Hermansonら、(1993)、「Immobilized Affinity Ligand Techniques」、Academic Press、N.Y.
- 【非特許文献 26】Bioconjugate Techniques、Second Edition、Greg T. Hermanson、2008、Amsterdam, Elsevier
- 【非特許文献 27】Glycobiology (2011) 21:1331 ~ 1340頁
- 【非特許文献 28】Kielyら、J. Biol. Chem. 1976、251:5490頁
- 【非特許文献 29】Glabeら、J. Biol. Chem.、1980、255:9236頁
- 【非特許文献 30】Juleniusら、Glycobiology、2005、15:153頁
- 【非特許文献 31】Antibody Engineering, Methods in Molecular Biology、248卷、Ben 50

ny K. Lo編

- 【非特許文献 3 2】Angalら、Mol Immunol. 1993;30:105～8頁
- 【非特許文献 3 3】Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest、5版、U.S. Department of Health and Human Services、NIH Publication No. 91-3242
- 【非特許文献 3 4】Chothia及びLesk、J. Mol. Biol 1987; 196: 901～917頁
- 【非特許文献 3 5】Devereuxら(1984) Nucleic Acids Research 12:387～395頁
- 【非特許文献 3 6】Altschul S.F. (1993) J Mol Evol 36:290～300頁
- 【非特許文献 3 7】Altschul, S.F.ら(1990) J Mol Biol 215:403～10頁
- 【非特許文献 3 8】National Centre for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 10
- 【非特許文献 3 9】Henikoff及びHenikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915～10919頁
- 【非特許文献 4 0】Karlin及びAltschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873～5787頁
- 【非特許文献 4 1】Remington: The Science and Practice of Pharmacy、19版、1995
- 【非特許文献 4 2】DurocherらNucleic Acid Research、2002
- 【非特許文献 4 3】Edelman G.M.ら、Proc. Natl. Acad. USA 63、78～85頁(1969)
- 【非特許文献 4 4】Kabsch, W.、J.Appl.Crystallogr.、(1993)、26巻、795～800頁
- 【非特許文献 4 5】Yin, J.ら、Proc Natl Acad Sci USA、2003年2月4日、(100)、100巻8 20  
56～861頁
- 【非特許文献 4 6】Berman, H. M.ら、Nucleic Acids Res.、(2000)、28巻、235～242頁
- 【非特許文献 4 7】Vagin, A.ら、J.Appl.Crystallogr.、(1997)、30巻、1022～1025頁
- 【非特許文献 4 8】Collaborative Computational Project, N.、Acta crystallographic a, Section D, Biological crystallography、(1994)、50巻、760～763頁
- 【非特許文献 4 9】Langer, G.ら、Nat Protoc.、(2008)、3巻、1171～1179頁
- 【非特許文献 5 0】Murshudov, G. N.ら、Acta Crystallographica SectionD Biological Crystallography、(2011)、67巻、355～367頁
- 【非特許文献 5 1】Emsley, P.ら、Acta Crystallogr. Sect. D-Biol. Crystallogr.、(2 30  
004)、60巻、2126～2132頁
- 【非特許文献 5 2】Lee, B.ら、J Mol Biol.、(1971)、55巻、379～400頁
- 【非特許文献 5 3】Saff, E. B.ら、Math Intell.、(1997)、19巻、5～11頁
- 【非特許文献 5 4】Labrijnら、PNAS、110:5145～5150頁(2013)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0 0 0 9】

本発明は、組織因子系凝固インヒビターアルファ(TFPI<sub>1</sub>)及びTFPIベータ(TFPI<sub>2</sub>)の両方に存在するN末端領域(残基1～181)中のエピトープと、完全長TFPI<sub>1</sub>だけに存在する、C末端部分(残基182～276)中の別のエピトープとに結合することが可能である、抗体及びその組成物に関する。本発明は、そのような抗体の医薬的及び治療的な使用にも関する。 40

【課題を解決するための手段】

【0 0 1 0】

本発明は、TFPI<sub>1</sub>上の2つのエピトープに特異的に結合することが可能な二重特異的抗体に關し、その第1はTFPI<sub>1</sub>(1～181)(配列番号1)の中に位置し、その第2はTFPI<sub>1</sub>(182～276)(配列番号1に対する番号付け)の中に位置する。前記エピトープの第1は、TFPI<sub>1</sub>のKPI-1ドメインの上にあってもよい。或いは、前記エピトープの第1は、TFPI<sub>1</sub>のKPI-2ドメインの上にあってもよい。前記エピトープの第2は、TFPI<sub>1</sub>のKPI-3ドメインの上にあってもよい。二重特異的抗体は完全長抗体であってもよく、又は2つの抗体断片のコンジュゲート若しくは融合タンパク質、例えばFab-Fabコンジュゲート若しくは融合タンパク質であってもよい。

【0 0 1 1】

本発明は、2つの単一特異的抗体の組合せにも関し、第1の単一特異的抗体はTFPI(1～181)に特異的に結合することが可能であり、第2の単一特異的抗体はTFPI(182～276)に特異的に結合することが可能である。第1の抗体は、TFPIのKPI-1ドメイン又はTFPIのKPI-2ドメインに特異的に結合することができ、第2の抗体は、TFPIのKPI-3ドメインに特異的に結合することができる。

【0012】

本発明は、完全長TFPI を選択的に標的にする二重特異的抗体に更に関する。

【0013】

本発明は、本発明による二重特異的抗体又は単一特異的抗体の組合せを含む医薬製剤にも関し、そのいずれも医薬として使用できる。

10

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】TFPIレベルが上昇した血友病A様状態のヒト血漿においてTFPIのKPI-2及びKPI-3の複合抗体標的化によってトロンビン生成が強く増強されたことを示す図である。10 μM ホスファチジルコリン/ホスファチジルセリン小胞により、正常なヒト血漿(NHP)のプールでトロンビン生成(TGTアッセイ)を測定した。カルシウム再添加及び1pMのリピド化組織因子(Innovin(登録商標))の添加によって凝固の開始を誘導した。曲線(a)は、更なる添加なしのNHPで得られた結果を示す。曲線(b)は、100 μg/mlのヒツジ抗ヒトFVIII抗体(市販品)の添加によって血友病A様状態が得られるときの結果を示す。曲線(c)は、血友病A様血漿への20nM完全長TFPI の添加がトロンビン生成を完全に抑制したことを示す。曲線(d)は、FVIIIの中和と組み合わせた20nM完全長TFPI の結果としてのトロンビン生成の抑制が、KPI-2に特異的に結合する200nMのmAb 2021の添加によって部分的に後退させられただけだったことを示す。曲線(e)は、KPI-3に特異的に結合する200nMのmAb 4F110が、例えば検出可能なトロンビン生成の後退を可能にするTFPI阻害を後退させたのと同じこれらの条件は完全に阻止したことを示す。曲線(f)は、対照的に、KPI-3に結合する100nMのmAb 4F110とKPI-2に結合する100nMのmAb 2021との組合せは、TFPI阻害を効果的に後退させ、FVIII抗体なしのNHPで得られたレベルにトロンビン生成をほぼ回復させた(曲線(a))ことを示す。

20

【図2】mAb及びFab-Fabコンジュゲートによる、細胞表面でのTF/FVIIaによって媒介されるFXa生成のTFPI による阻害の中和を示す図である。EA.hy926 wt細胞を、mAb又はFab-Fabコンジュゲートの漸増濃度とインキュベートした。上清中のFXa活性は、様々な濃度(0～60nM)のmAb 2021(A)、mAb 4F110:(B)、Fab-Fabコンジュゲート9002(C)又はFab-Fabコンジュゲート9004(D)と一緒に、50pMのFVIIa及び50nMのFXとの37 でのインキュベーションの後に測定した。四角は、60nMのmAb又はFab-Fabコンジュゲートと一緒に0.5mg/mlのヤギ抗ヒトTFポリクローナル抗体の影響を示す。結果は、平均±SD(n=3)で示す。

30

【図3】非対称二重特異的抗体フォーマットを用いて、TFPIレベルが上昇した血友病A様状態下のヒト血漿においてTFPIのKPI-2及びKPI-3の複合抗体標的化によってトロンビン生成が強く増強されたことを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0015】

*in vivo*で、組織因子系凝固インヒビター(TFPI)はいくつかのコンパートメントで見出される。TFPIの主要な部分は脈管内皮に関連し、副次的部分は血液中を循環する。TFPIの2つのスプライス変異体、TFPIアルファ(TFPI<sub>α</sub>)及びTFPIベータ(TFPI<sub>β</sub>)が、ヒトについて記載されている。TFPI<sub>α</sub>はおそらく内皮細胞表面で発現される支配形であるが、TFPI<sub>β</sub>の細胞内貯蔵はある特定の刺激により循環中に放出させることができる。TFPI<sub>β</sub>は、リボタンパク質と関連しているか血小板中の完全長又はトランケーションされたタンパク質として血液中を循環する。

40

【0016】

成熟ヒトTFPI は、276アミノ酸タンパク質(配列番号1)であり、酸性N末端領域、リンカーレジオが散在する3つのタンデム配置クーニッツ型阻害剤ドメイン(KPI-1、KPI-2及びKP

50

I-3)、及び塩基性のC末端テールで構成される。KPI-1、KPI-2及びKPI-3ドメインは、配列番号1の残基26～76、残基97～147及び残基189～239とそれぞれ規定される。成熟TFPI は、グリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)アンカーを通して内皮細胞表面に共有結合する193アミノ酸タンパク質である。TFPI の最初の181アミノ酸はTFPI と同一である(配列番号1の残基1～181に対応する)が、C末端配列の最終12アミノ酸はTFPI と無関係であり、残基193に付着するGPIアンカーを有する。

#### 【 0 0 1 7 】

本発明は、TFPI の上の2つの異なる及び/又は特異なエピトープに結合する2つの单一特異的抗体の組合せに関する。本発明は、そのような2つの单一特異的抗体に由来する二重特異的抗体にも関する。二重特異的抗体の1つの抗原認識部位(又は「アーム」)が由来する单一特異的抗体の1つは、TFPI(1～181)と本明細書で規定されるTFPIのKPI-1/KPI-2領域中のエピトープを対象とし、それはヒトTFPI(1～181)(配列番号2)であってもよい。二重特異的抗体の第2の抗原認識部位(又は「アーム」)が由来する第2の单一特異的抗体は、TFPI(182～276)と本明細書で規定される、TFPI だけに存在する「KPI-3領域」を対象とする。

#### 【 0 0 1 8 】

「KPI-1/KPI-2領域」は、本明細書においてTFPIのアミノ酸残基1～181(すなわちTFPI(1～181)を指し、それはヒトTFPI(1～181)(配列番号2)であってもよく、したがってTFPIのKPI-1及びKPI-2ドメインを包含する。「KPI-3領域」は、本明細書においてTFPIのアミノ酸残基182～276(すなわちTFPI(182～276)を指し、したがってTFPIのKPI-3ドメイン及びC末端テールを包含する。したがって、二重特異的抗体又は抗体断片の1つの单一特異的抗体又は1つのアームは、TFPIのN末端近くの酸性領域、KPI-1、KPI-2、KPI-1とKPI-2の間のリンカー領域、KPI-2とKPI-3の間のリンカー領域の最初の部分を含むTFPIのKPI-1/KPI-2領域(すなわちTFPIの1～181)の中に位置するエピトープに特異的に結合することが可能である。二重特異的抗体の第2の单一特異的抗体又は第2のアームは、完全長TFPI だけに存在してTFPI に存在しないアミノ酸残基182～276の中に位置するエピトープに特異的に結合することが可能である。残基182～276は、KPI-2とKPI-3の間のリンカー領域の第2の部分、KPI-3ドメイン及び塩基性C末端テールに相当する。

#### 【 0 0 1 9 】

本発明の2つの单一特異的抗体の組合せ又は本発明の二重特異的抗体は、その凝血促進効果をそれが由来する個々の抗体の予想される相加効果と比較するとき、優れたプロファイルを有することができる。例えば、組み合わせた2つの单一特異的抗体又は二重特異的抗体は、例えば正常な生理的レベルに対してTFPI の濃度が高いときでさえ、TFPI の全ての阻害機能をロックすることができる場合がある。二重特異的抗体又はFab-Fabコンジュゲートを得るための、本発明の2つの別々のエピトープに向けられる2つの抗原結合部分の連結は、結合効果のために、2つの別々の抗原結合部分を合わせた効果によって得られるものより強力なTFPI 活性の中和をもたらすことができる。単独で試験するときに、本発明の組合せ又は本発明の二重特異的抗体が由来する单一特異的抗体の両方が、検出可能な凝血促進活性を有することは必要条件でなく、それは特に意外な知見である。KPI-1/KPI-2領域に向けられる抗体又は二重特異的抗体の1つのアームから生じる効果は、TFPIの全てのプールの活性をモジュレートすることができるが、2つの单一特異的抗体の組合せ又は二重特異的抗体の優れた効果は、完全長TFPI の活性を優先的にモジュレートする。

#### 【 0 0 2 0 】

本発明の二重特異的抗体は、TFPIの1つの特異的プール、すなわちTFPI の活性を選択的にモジュレートすることができる場合がある。KPI-1/KPI-2領域に結合することができる二重特異的抗体の单一のアームは、单一特異的抗体のように、それ自体、TFPIの阻害活性を有意に阻止することができないことがある。しかし、それは、二重特異的抗体の第2のアームがTFPI のKPI-3領域に結合するとき、TFPI 阻害の特異的妨害により有意に寄与することができる。それにより、そのような二重特異的抗体は、完全長TFPI の阻害

10

20

30

40

50

を中和することが可能である場合がある。前記二重特異的抗体のTFPIへの結合は、KPI-1/KPI-2領域を標的にするアームに排他的に依存する。KPI-1/KPI-2領域への結合を弱めることは、TFPIへの結合を優先的に減少させるが、二重特異的抗体の第2のアームによるKPI-3領域の標的化のために、TFPI阻害の中和はなお本質的に元のままである。TFPI又はリポタンパク質関連TFPIの標的化の低減又は不在のために、前記二重特異的抗体の1つのアームのKPI-1/KPI-2領域への親和性のそのような弱化は、長期 *in vivo* 薬物半減期及び/又はより低い抗体必要用量につながる標的媒介薬物配置の低減をもたらすことができる。

【0021】

二重特異的抗体のKPI-3領域標的化成分の親和性は、TFPIの効率的な係合を保証するのに単独で十分であってもよい。結合効果のために、TFPI活性の中和により血漿中で効率的な効果をなお保持しながら、内皮細胞上のTFPIへの結合を実質的に減らすことが可能である場合がある。連結された2つのパラトープの結合効果がなお存在する点まで二重特異的抗体のKPI-1/KPI-2標的化成分の結合を弱めることによって、これを得ることができる。ある特定のエピトープを標的にする抗体を選択することによって、及び、当業者に公知である方法によって、二重特異的抗体のKPI-1/KPI-2及びKPI-3結合成分の絶対的及び相対的な親和性を調整することによってそのような抗体を構築することができる。更に、そのような二重特異的抗体の選択性及び他の特性は、二重特異的フォーマットを変化させることによってモジュレートすることができる。

【0022】

本明細書で用いる用語「TFPI」は、任意の適する生物体に由来することができる組織因子系凝固インヒビター(TFPI)の天然形を包含する。例えば、本明細書に記載する用途のためのTFPIは、哺乳動物のTFPI、例えばヒト、マウス、ラット、靈長類、ウシ、ヒツジ、ウサギ又はブタのTFPIであってもよい。好ましくは、TFPIはヒトTFPIである。TFPIは、適する細胞の中で翻訳後プロセシングを受けたTFPIタンパク質等のTFPIの成熟形であってもよい。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分子の変異形、アイソフォーム及び他の同族体も包含する。TFPI活性とは、その阻害活性を指す。変異形TFPI分子は、FXaの触媒活性を中和する能力又はTF-FVIIa/FXaの複合体を阻害する能力等の、天然のTFPIと同じ種類の活性を有することを一般に特徴とする。

【0023】

本明細書で用語「抗体」は、抗原又はその一部に特異的に結合することが可能である、免疫グロブリン配列に由来するタンパク質を指す。用語抗体には、任意のクラス(又はアイソタイプ)、すなわちIgA、IgD、IgE、IgG、IgM及び/又はIgYの完全長抗体が含まれるが、これらに限定されない。本用語は、完全長抗体の1つ又は複数の抗原結合断片を含むこともできる。抗原又はその一部に特異的に結合する抗体は、その抗原又はその一部に排他的に結合することができるか、限定された数の相同的抗原又はその一部に結合することができる。

【0024】

天然の完全長抗体は、少なくとも4つのポリペプチド鎖、すなわちジスルフィド結合によって接続される2つの重(H)鎖及び2つの軽(L)鎖を通常含む。一部の場合には、ラクダ科の動物で見出される重鎖だけの抗体(V<sub>H</sub>断片)、及び軟骨魚類で見出されるIgNARの場合のように、自然抗体は4つ未満の鎖を含む。特定の医薬用の免疫グロブリンの1つのクラスは、IgGである。ヒトでは、それらの重鎖定常領域の配列に基づいて、IgGクラスを4つのサブクラスIgG1、IgG2、IgG3及びIgG4に再分割することができる。それらの配列組成の差に基づいて、軽鎖は2つのタイプ、カッパ鎖及びラムダ鎖に分割することができる。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る2つの重鎖、及び各々ジスルフィド結合によって重鎖に結合する2つの軽鎖で構成される。IgG重鎖は、重鎖可変領域(VH)及び最高3つの重鎖定常領域(CH)、すなわち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

10

20

30

40

50

ク領域(FR)と呼ばれるより保存されている領域が間に散在する、相補性決定領域(CDR)又は超可変領域(HvR)と呼ばれる超可変性の領域に更に細分化することができる。VH及びVL領域は、一般的には、アミノ末端からカルボキシ末端まで以下の順序で配列される3つのCDR及び4つのFRで構成される:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重鎖及び軽鎖の超可変領域を有する可変ドメインは抗原と相互作用することが可能なドメインを形成し、抗体の定常領域は、限定されるものではないが、免疫系の様々な細胞(エフェクター細胞)、Fc受容体及び古典的補体系のC1複合体の第1の成分(C1q)を含めた、宿主組織又は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。

## 【0025】

本発明の抗体は、単離することができる。用語「単離された抗体」は、それが生成された環境中の他(別)の成分から分離及び/若しくは回収された抗体、並びに/又はそれが生成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を指す。 10

## 【0026】

本明細書で用いる用語「单一特異的抗体」は、单一の抗原認識部位(すなわち一価)を有するか、又はそれぞれ1つの共通する標的抗原に特異的である2つの同一の抗原認識部位(すなわち二価)を有する抗体を指す。

## 【0027】

本発明の单一特異的抗体は、单一の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特異な重鎖及び軽鎖可変ドメイン配列のセットをそれらが表すという点で、モノクローナル抗体であってもよい。当業者に公知である様々な方法を用いて、本発明の抗体を生成、精製することができる。例えば、抗体はハイブリドーマ細胞から生成することができる。抗体は、B細胞の増殖によって生成することができる。抗体又はその断片は、哺乳動物又は微生物発現系で、又はin vitro翻訳によって組換えにより発現させることができる。抗体又はその断片は、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又はリボソーム若しくはmRNAディスプレイによって、細胞表面結合分子として組換えにより発現させることもできる。一旦生成されると、抗体は、TFPI(1~181)、完全長TFPI 及びTFPI 、例えばヒトTFPI(1~181)、完全長ヒトTFPI 及びヒトTFPI に結合するそれらの能力についてスクリーニングすることができる。 20

## 【0028】

抗体の抗原結合機能は完全長抗体の断片によって実行することができるが分かっているので、抗体の様々な抗原結合性断片は、本発明による单一特異的抗体であってもよい。抗体の「抗原結合性断片」という用語は、本明細書に記載される抗原、例えばTFPI 、例えばヒトTFPI (配列番号1)、例えばヒトTFPI(1~181)(配列番号2)、例えばヒトTFPI(1 82~276、配列番号1による番号付け)、例えばTFPI 、例えばヒトTFPI 又は別の標的分子に特異的に結合するか認識する能力を保持する抗体の1つ又は複数の断片を指す。抗原結合性断片の例には、Fab、Fab'、Fab<sub>2</sub>、Fab'<sub>2</sub>、FabS、Fv(一般的に抗体の单一のアームのVL及びVHドメイン)、単鎖Fv(scFv;例えばBirdら、Science (1988) 242:42S~426頁;及びHustonら、PNAS (1988) 85:5879~5883頁を参照)、dsFv、fd(一般的にVH及びCH1ドメイン)及びdAb(一般的にVHドメイン)断片;VH、VL、VhH及びV-NARドメイン;单一のVH及び单一の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、テトラボディ及びカツバボディ(例えば、IIIら、Protein Eng (1997) 10:949~57頁);ラクダのIgG;IgNAR;並びに1つ又は複数の単離されたCDR又は機能的パラトープが含まれ、単離されたCDR又は抗原結合性残基若しくはポリペプチドは、機能的抗体断片を形成するように一緒に結合又は連結することができる。各種の抗体断片が、例えばHolliger及びHudson、Nat Biotechnol (2005) 23:1126~1136頁;WO2005040219、並びに米国特許出願公開第20050238646号及び第20020161201号に記載又はレビューされている。これらの抗体断片は、当業者に公知である従来の技術を使用して得られ、断片は無傷の抗体と同様に有用性についてスクリーニングすることができる。 30

## 【0029】

「Fab」、「Fab'」及び「Fab'<sub>2</sub>」断片を含む抗体の「Fab断片」は、抗体の重鎖を接続

するヒンジシスティン残基のN末端又はC末端側のヒンジ領域での重鎖の切断によって、前記抗体から導くことができる。「Fab」断片は、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の定常ドメイン(CH1)を含む。「Fab'<sub>2</sub>」断片は、それらのヒンジシスティンによって一般に共有結合される「Fab'」断片の対を含む。Fab'は、Fab'<sub>2</sub>の重鎖を接続するヒンジジスルフィド結合の切断によって、Fab'<sub>2</sub>断片から正式に導かれる。抗体断片のジスルフィド結合以外の他の化学結合も、当技術分野で公知である。Fab断片は、おそらくより低い親和性でその抗原に結合する親抗体の能力を保持する。Fab'<sub>2</sub>断片は二価の結合が可能であるが、Fab及びFab'断片は一価の結合が可能である。一般に、Fab断片は、Fc受容体との相互作用が起こる定常CH2及びCH3ドメイン、すなわちFc部分を欠く。したがって、Fab断片は、エフェクター機能が一般に欠けている。Fab断片は、例えばFabを得るためにパバインを使用するか、Fab'<sub>2</sub>を得るためにペプシンを使用する抗体の酵素的切断により、当技術分野で公知の方法によって生成することができる。Fab、Fab'、Fab'<sub>2</sub>を含むFab断片は、当業者に周知である技術を使用して、組換えて生成することができる。

#### 【0030】

「Fv」断片は、完全な抗原認識及び結合部位を有する抗体断片であり、一般に、共有結合性であってもよい結合状態、例えば一本鎖可変ドメイン断片(scFv)状である1つの重鎖及び1つの軽鎖可変ドメインの二量体を含む。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二量体の表面で抗原結合部位を規定するのは、この構成においてである。総合すると、6つの超可変領域又はそのサブセットは、抗体に抗原結合特異性を付与する。しかし、抗原に特異的な3つの超可変領域だけを含む単一の可変ドメインでさえ、通常結合部位全体より低い親和性であるが、抗原を認識して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 (1996) 93: 6280~6285頁)。例えば、重鎖可変ドメイン(VHH)だけを有する天然のラクダ科の動物の抗体は、抗原に結合することができる(Desmyterら、J. Biol. Chem. (2002) 277: 23645~23650頁; Bondら、J. Mol. Biol. (2003) 332: 643~655頁)。

#### 【0031】

「単鎖Fv」又は「scFv」抗体断片は抗体のVH及びVLドメインを含み、これらのドメインはそこで単一のポリペプチド鎖で存在する。一般に、Fvポリペプチドは、scFv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ポリペプチドリンクーをVHとVLドメインの間に更に含む。scFvのレビューについては、Pluckthun、1994、The Pharmacology of Monoclonal Antibodies、Vol. 113、Rosenburg and Moore編、Springer-Verlag、New York、269~315頁を参照。

#### 【0032】

用語「ダイアボディ」は、2つの抗原結合部位を有する小さい抗体断片を指し、断片は、同じポリペプチド鎖(VH及びVL)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。同じ鎖の上で2つの可変ドメインの間での対形成を可能にするには短すぎるリンクーを用いて、可変ドメインは別の鎖の相補ドメインと対にさせられ、2つの抗原結合部位が形成される。ダイアボディは、例えばEP404,097; WO93/11161; 及びHollingerら、1993、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90:6444~6448頁でより完全に記載される。

#### 【0033】

「線状抗体」という語句は、Zapataら、1995、Protein Eng.、8(10):1057~1062頁に記載されるような抗体を指す。簡潔には、これらの抗体は、相補的な軽鎖ポリペプチドと一緒に抗原結合性領域の対を形成するタンデム型のFdセグメント(VH-CH1-VH-CH1)の対を有する。線状抗体は、二重特異的又は単一特異的であってもよい。

#### 【0034】

本明細書で用いる用語「モノボディ」は、重鎖可変ドメインを有し、軽鎖可変ドメインを有さない抗原結合性分子を指す。モノボディは、軽鎖の不在下で抗原に結合することができ、一般的に3つの超可変領域、例えばCDRH1、CDRH2及びCDRH3と命名されるCDRを有する。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る2つの重鎖抗原結合性分

10

20

30

40

50

子を有する。重鎖可変ドメインは、1つ又は複数の超可変領域、好ましくはCDRH3又はHVL-H3領域を含む。

【0035】

抗体断片は、従来の組換え又はタンパク質工学技術を用いて得ることができ、断片は、無傷の抗体と同様に、TFPI(1~181)、完全長TFPI 及びTFPIへの結合に関して、又は別の機能に関してスクリーニングすることができる。

【0036】

本発明の抗体断片は、トランケーションによって、例えばポリペプチドのN及び/又はC末端からの1つ又は複数のアミノ酸の除去によって作製することができる。断片は、1つ又は複数の内部欠失によって生成することもできる。

10

【0037】

本明細書において用語「二重特異的抗体」は、2つの異なる抗原又は同じ抗原の上の2つの異なるエピトープにそれが係合することを可能にする、2つの異なる及び/又は特異な抗原認識部位又は「アーム」を有する抗体を指す。用語「多重特異的抗体」は、2つ以上の異なる抗原又は同じ抗原の上の2つ以上の異なるエピトープに係合する能力を有する抗体を指す。したがって、多重特異的抗体は、二重特異的抗体を含む。

【0038】

自然抗体を模倣する完全長IgGフォーマットの二重特異的抗体は、2つの個々のハイブリドーマの融合により、二重特異的ヘテロ二量体化抗体の部分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によって生成することができる(Chelius D.ら; MAbs. 2010年5月~6月; 2(3): 309~319頁)。二重特異的ヘテロ二量体化抗体は、組換え技術を用いて代わりに生成することができる。ヘテロ二量体化は、ヘテロ二量体化を促進するようにFc領域の二量体化インターフェイスを操作することによって達成することもできる。この1つの例はいわゆるノブ・イン・ホール突然変異であり、そこでは、立体配置的にかさばった側鎖(ノブ)が反対側のFcの上の立体配置的に小さい側鎖(ホール)にマッチさせた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相補性を生成する。操作されたヘテロ二量体化Fcインターフェイスのための他の方法は、静電相補性、非IgGヘテロ二量体化ドメインへの融合であるか、ヘテロ二量体化を制御するためにヒトIgG4の天然のFabアーム交換現象を利用することである。ヘテロ二量体化二重特異的抗体の例は、文献で、例えば(Klein Cら; MAbs. 2012年11月~12月; 4(6): 653~663頁)によく記載されている。ヘテロ二量体抗体の軽鎖に特に注目しなければならない。LC及びHCの正しい対形成は、共通の軽鎖を用いて達成することができる。ヘテロ二量体化を促進するためにはLC/HCインターフェイスの操作を再び使用することができるか、又はCrossMabsにおけるように軽鎖交差操作を使用する。二重特異体を生成するために、弱い還元条件下での適当な突然変異を有する2つの個々のIgGからの抗体のin vitro再構成を使用することもできる(例えばLabrijnら; PNAS. 110、5145~5150頁(2013))。更に、天然のFabアーム交換方法は、正しい軽鎖対形成を保証することが報告されている。

20

【0039】

多重特異的抗体をベースとした分子は、文献に記載のように、多重特異的及び多価抗体誘導体を形成するために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換えで発現させることもできる。融合抗体の例は、DVD-Ig、IgG-scFv、ダイアボディ、DART等である(Kontermann、MAbs. 2012年3月~4月4(2): 182~197頁)。特異的検出若しくは精製タグ、半減期延長部分又は他の成分を融合タンパク質に組み込むことができる。追加の非IgG様式を融合タンパク質に組み込むことができる。FCヘテロ二量体化に基づく二重特異的完全長抗体は、LC対形成方法論にかかわりなく、一般に非対称IgGと呼ばれる。

30

【0040】

多重特異的抗体をベースとした分子は、文献に記載されるように、個々の完全長IgGの化学的コンジュゲーション若しくは連結により、又はIgGの断片の連結により多重特異的及び多価抗体誘導体を形成することによって生成することもできる。融合抗体の例は、化学連結されたFab'2、IgG二量体等である(Kontermann、MAbs. 2012年3月~4月、4(2):182

40

50

~197頁)。特異的検出若しくは精製タグ、半減期延長分子又は他の成分をコンジュゲートタンパク質に組み込むことができる。追加の非IgGポリペプチドを融合タンパク質に組み込むこともできる。そのような二重特異的抗体の例は、実施例で提供される。

【0041】

多重特異的分子は、上記のものを含む組換え及び化学的方法を組み合わせることによって生成することもできる。

【0042】

本発明の二重特異的抗体は、ここに参照により組み込まれるWO2010/072691で最初に記載されたモノクローナル抗体であるmAb 2021抗体の抗原結合性断片を含むことができる。

【0043】

本発明の二重特異的抗体は、mAb 2F22抗体の抗原結合性断片を含むことができる。

【0044】

本発明の二重特異的抗体は、mAb 2F3抗体、mAb 2F45抗体、mAb 1F91抗体又は2F35抗体の抗原結合性断片を含むことができる。

【0045】

本発明の二重特異的抗体は、ここに参照により組み込まれるWO2012/001087で最初に記載されたモノクローナル抗体であるmAb 4F110抗体、mAb 22F66抗体又はmAb 22F71抗体の抗原結合性断片;或いは、本明細書に開示されるmAb 22F74抗体の抗原結合性断片を更に含むことができる。例えば、本発明の二重特異的抗体は、前述の抗体の1つのFab断片を含むことができる。本発明の二重特異的抗体は、前述の抗体の1つに基づく変異形Fab断片、例えば本明細書に開示されるFab 0094又はFab 0095又はFab 0313(mAb 2021からの誘導体)を含むこともできる。

【0046】

二重特異的又は二官能基の本発明の抗体は、以下のTFPIの異なるエピトープに結合する2つの抗体又はその断片の化学的コンジュゲーションによって得ることができる:

mAb1(又は断片)-mAb2(又は断片)

mAb1(又は断片)-リンカー-mAb2(又は断片)

【0047】

連結は、単一の共有結合(直接連結)であってもよいか、一般に以下のように記載されるビラジカルを含むことができる:

【0048】

【化1】



【0049】

上式で、Xは、限定されるものではないが、炭素、酸素、硫黄、リン及び窒素の群から選択される少なくとも1つの原子である。\*は、このビラジカルの接続位置を示す。用語「ビラジカル」は、互いに独立して行動する2つのフリーラジカル中心を有する、偶数電子化合物を指す。

【0050】

一実施形態では、リンカーは、40個以下の原子で構成される鎖である。

【0051】

一実施形態では、リンカーで使用する化学部分は、以下の構造を有するビラジカルを含む

【0052】

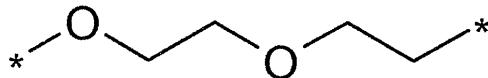
10

20

30

40

## 【化2】



## 【0053】

一実施形態では、リンカー部分は、対称構造を有するビラジカルを含む(ホモ二官能基化リンカー)。

## 【0054】

リンカーは、上の説明に類似する構造のポリマーであってもよい。

10

## 【0055】

一実施形態では、リンカーで使用する化学部分は、ポリマー、共有結合性化学結合によつて接続される2つ以上の反復構造単位で構成される高分子を含む。そのようなポリマーは親水性であつてもよい。

## 【0056】

用語親水性又は「水溶性」は、なんらかの検出可能な程度の水溶解性を有する部分を指す。水溶性を検出及び/又は定量化する方法は、当技術分野で周知である。

## 【0057】

本発明による例示的な水溶性ポリマーには、ペプチド、サッカライド、(ポリ)エーテル、(ポリ)アミン、(ポリ)カルボン酸等が含まれる。ペプチドは混合配列を有することができるか、例えば(ポリ)リジン等、単一のアミノ酸で構成されてもよい。例示的な多糖は、(ポリ)シアリン酸である。例示的な(ポリ)エーテルは、(ポリ)エチレングリコールである。(ポリ)エチレンイミンは例示的なポリアミンであり、(ポリ)アクリル酸は代表的な(ポリ)カルボン酸である。

20

## 【0058】

他の多くのポリマーも、本発明に適する。水溶性であるポリマー骨格が、本発明で特に有用である。適するポリマーの例には、それらに限定されないが、他のポリ(アルキレングリコール)、例えばポリ(プロピレングリコール)('PPG')、エチレングリコールとプロピレングリコール等のコポリマー、ポリ(オキシエチル化ポリオール)、ポリ(ビニルピロリドン)、ポリ(ヒドロキシプロピルメタクリルアミド)、ポリ([アルファ]-ヒドロキシ酸)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリホスファゼン、ポリオキサゾリン、ポリ(N-アクリロイルモルホリン)、例えば参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許第5,629,384号に記載のもの、並びにそのコポリマー、ターポリマー及び混合物が含まれる。

30

## 【0059】

ポリマーリンカーは、好ましくは直鎖状である。

## 【0060】

各個々のポリマー鎖の分子量は異なつてもよいが、ポリマーの平均分子量は一般的に約1,000Da(1kDa)から約40,000Da(40kDa)、例えば約1,000Daから約12,000Da、例えば約2,000Daから約11,000Da、例えば約2,000Daから約3,000Da; 約3,000Daから約4,000Da; 約4,000から約5,000Da; 約5,000から約6,000Da; 約6,000から約7,000Da; 約7,000から約8,000Da; 約8,000から約9,000Da; 約9,000から約10,000Da; 又は約10,000から約11,000Daの範囲内である。これらのサイズは、正確な測定値でなく推定値を表すことを理解すべきである。好ましい実施形態により、本発明による分子は、親水性ポリマーの不均一な集団とコンジュゲートされる。

40

## 【0061】

特定の実施形態では、リンカーで使用する化学部分は、ポリエチレングリコール(PEG)を含む。

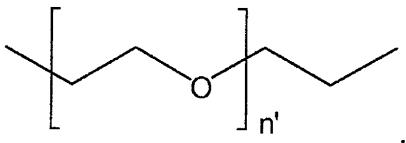
## 【0062】

本明細書において用語「PEG」は、以下の構造を含むビラジカルを指し、

## 【0063】

50

## 【化3】



## 【0064】

上式で、 $n'$ は1より大きな整数である。

## 【0065】

PEGはエチレンオキシドの重合によって調製され、広範囲の分子量で市販されている。  
本発明による使用のためのPEGは、好ましくは直鎖状である。

## 【0066】

更に、「PEG」は、カップリング剤、カップリング又は活性化部分(例えば、カルボン酸/活性エステル、ケト、アルコキシアミン、チオール、トリフレート、トレシラート、アジリジン、オキシラン、アルキン、アジド又はマレイミド部分)の有り無しの、ポリエチレンギリコール化合物又はその誘導体を指すことができる。本明細書で指摘する他のリンカーも、カップリング剤、カップリング又は活性化部分(例えば、カルボン酸/活性エステル、ケト、アルコキシアミン、チオール、トリフレート、トレシラート、アジリジン、オキシラン、アルキン、アジド又はマレイミド部分)が有っても無くてもよい。

## 【0067】

1つの特定の実施形態では、本発明による使用のためのPEGは単分散である。  
別の特定の実施形態では、本発明による使用のためのPEGは多分散である。

## 【0068】

多分散PEGは、様々な分子量を有するPEG分子で構成される。サイズ分布は、その重量平均分子量( $M_w$ )及びその数平均分子量( $M_n$ )で統計学的に特徴付けることができ、その比は多分散指数( $M_w/M_n$ )と呼ばれる(例えば「Polymer Synthesis and Characterization」、J. A. Nairn、University of Utah、2003、を参照する)。 $M_w$ 及び $M_n$ は、質量分析によって測定することができる。

## 【0069】

多分散指数は1以上の数であってよく、それはゲル透過クロマトグラフデータから推定することができる。多分散指数が1であるとき、その生成物は単分散であり、したがって単一の分子量を有する化合物で構成される。多分散指数が1を超えるとき、そのポリマーは多分散であり、多分散指数は異なる分子量を有するポリマーの分布がどれくらい広いかについて教える。多分散指数は、一般的にPEGの分子量と一緒に増加する。特定の実施形態では、本発明による使用のためのPEGの多分散指数は、i) 1.06未満、ii) 1.05未満、ii) 1.04未満、iv) 1.03未満又はv) 1.02~1.03である。

## 【0070】

重合工程のために使用する開始剤に従い、異なる形のPEGが利用できる。

## 【0071】

PEG置換基のコンジュゲーションのための多数の方法が、Advanced Drug Delivery Reviews、2002、54、459~476頁、Nature Reviews Drug Discovery、2003、2、214~221頁、DOI:10.1038/nrd1033、Adv Polym Sci、2006、192、95~134頁、DOI 10.1007/12\_022、Springer-Verlag、Berlin Heidelberg、2005、及びその中の参考文献に記載されている。或いは、親水性ポリマー置換基のコンジュゲーションは、酵素的方法の使用によって起こすことができた。例えば、そのような方法はWO2006134148に記載のトランスグルタミナーゼの使用である。

## 【0072】

ポリペプチドへのポリマー分子の共有結合を実行するために、ポリマー分子の末端基は活性型で、すなわち反応性官能基と一緒に提供される。適する活性化ポリマー分子は、例えばSigma-Aldrich Corporation社、St. Louis、MO、USA、Rapp Polymere GmbH社、Tubin

10

20

30

40

50

gen、Germany、又はPolyMASC Pharmaceuticals plc社、UKから市販されている。或いは、ポリマー分子は、例えばWO90/13540に開示されるように、当技術分野で公知である従来の方法によって活性化することができる。活性化PEGポリマーの具体例は、米国特許第5,932,462号及び第5,643,575号に開示される。更に、以下の刊行物は、有益なポリマー分子及び/又はペグ化化学を開示する：WO2003/031464、WO2004/099231。

【0073】

活性化ポリマー分子とのモノクローナル抗体又はその断片のコンジュゲーションは、任意の従来の方法、例えば以下の参考文献(それらはポリマー分子の活性化のために適する方法も記載する)に記載される方法の使用によって実行することができる：R. F. Taylor (1991)、「Protein immobilisation. Fundamental and applications」、Marcel Dekker、N.Y.；S. S. Wong (1992)、「Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking」、CRC Press、Boca Raton；G. T. Hermansonら (1993)、「Immobilized Affinity Lig and Techniques」、Academic Press、N.Y.、Bioconjugate Techniques、Second Edition、Greg T. Hermanson、2008、Amsterdam, Elsevier。当業者は、使用する活性化方法及び/又はコンジュゲーション化学は、ポリペプチドの付着基(その例は上で更に与えられる)、並びにポリマーの官能基(例えばアミン、ヒドロキシル、カルボキシル、アルデヒド、スルフヒドリル、スクシンイミジル、マレイミド、ビニルスルホン又はハロアセテート)に依存することを承知する。ペグ化は、ポリペプチド上の利用できる付着基(すなわちポリペプチド表面に露出している付着基)へのコンジュゲーションに向けることができるか、1つ又は複数の特異的な付着基、例えばN末端アミノ基又はチオールに向けることができる。更に、コンジュゲーションは1段階で、又は段階的に達成することができる。

【0074】

別の実施形態では、リンカーとして使用する化学部分は、ヒドロキシエチルデンプンである。本明細書で用いる用語「ヒドロキシエチルデンプン」(HES/HAES)は、非イオン性デンプン誘導体を指す。異なる型のヒドロキシエチルデンプンは、一般的に130～200kDa前後のそれらの平均分子量によって一般的に記載される。

【0075】

別の実施形態では、リンカーで使用する化学部分は、ポリシアル酸を含む。

【0076】

別の実施形態では、リンカーで使用する化学部分は、例えばGlycobiology (2011) 21: 1331～1340頁に記載されるヘパロサンポリマーを含む。

【0077】

別の実施形態では、リンカーの化学部分は、タンパク質の少なくとも1つをグリカン、すなわちタンパク質に結合する多糖又はオリゴ糖に結合するために使用される。

【0078】

別の実施形態では、リンカーの化学部分は、タンパク質の少なくとも1つをN連結グリカンに結合するために使用される。

【0079】

別の実施形態では、リンカーの化学部分は、タンパク質の少なくとも1つをO連結グリカンに結合するために使用される。

【0080】

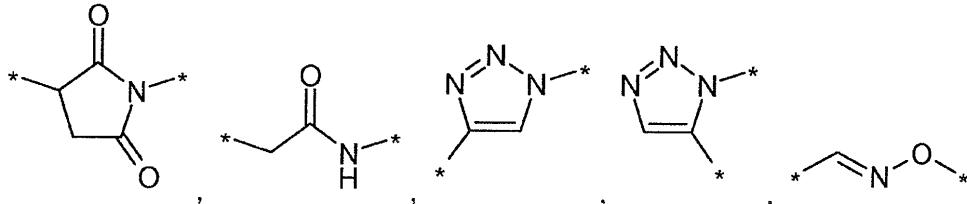
N-グリカン及びO-グリカンの両方は、それらのタンパク質を生成する細胞によってmAb等のタンパク質に結合される。発生期のタンパク質がリボソームから小胞体に転位するに従い、細胞性N-グリコシル化機構はアミノ酸鎖のN-グリコシル化シグナル(N-X-S/Tモチーフ)を認識し、グリコシル化する(Kielyら、J. Biol. Chem. 1976、251:5490頁；Glabeら、J. Biol. Chem.、1980、255:9236頁)。同様に、O-グリカンはアミノ酸鎖の特定のO-グリコシル化部位に結合されるが、O-グリコシル化を誘発するモチーフはN-グリコシル化シグナルより非常に不均一であり、アミノ酸配列のO-グリコシル化部位を予測する我々の能力はなお不十分である(Juleniusら、Glycobiology、2005、15:153頁)。様々なポリマー側鎖基とポリペプチドをコンジュゲートする方法は、例えばWO0331464に記載される。

## 【0081】

別の実施形態では、リンカーで使用する化学部分は、前記リンカーを以下のビラジカルから選択される構造を有するタンパク質の少なくとも1つに結合するために使用する化学部分を含む：

## 【0082】

## 【化4】



10

## 【0083】

本発明の単一特異的及び二重特異的抗体は、ヒト抗体又はヒト化抗体であってもよい。本明細書で用いる用語「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導か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、フレームワーク領域及び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導かれる可変領域を有することができる。)更に、抗体が定常領域を有する場合は、定常領域又はその一部もヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列から導かれる。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よってコードされないアミノ酸残基を含むことができる(例えば、in vitroでのランダム若しくは部位特異的突然変異誘発、又はin vivoでの体細胞突然変異によって導入される突然変異)。

20

## 【0084】

そのようなヒト抗体は、ヒトモノクローナル抗体であってもよい。そのようなヒトモノクローナル抗体は、不死化細胞と融合されているヒト免疫グロブリン重鎖及び軽鎖遺伝子セグメントレパートリーを含むゲノムを有する、ヒト以外のトランスジェニック動物、例えばトランスジェニックマウスから得られるB細胞を含むハイブリドーマによって生成することができる。

30

## 【0085】

ヒト抗体は、天然及び合成配列多様性で更に多様化されたヒト生殖細胞系配列の選択の上に築き上げられた配列ライブラリーから単離することができる。

## 【0086】

ヒト抗体は、ヒトリンパ球のin vitro免疫化と、続くEBウイルスによるリンパ球の形質転換によって調製することができる。

## 【0087】

用語「ヒト抗体誘導体」は、ヒト抗体の任意の改変形、例えば抗体と別の薬剤又は抗体のコンジュゲートを指す。

## 【0088】

本明細書で用いる用語「ヒト化抗体」は、ヒト以外の免疫グロブリンから導かれる配列(CDR領域又はその部分)を有する、ヒト/ヒト以外のキメラ抗体を指す。したがって、ヒト化抗体は、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、配列組成及び機能性を有する、マウス、ラット、ウサギ又はヒト以外の靈長類等のヒト以外の種からの抗体(ドナー抗体)の超可変領域からの残基と置き換えられる、ヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。一部の場合には、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク(FR)残基が、対応するヒト以外の残基で置き換えられる。そのような改変の例は、一般的にドナー抗体から導かれるアミノ酸残基である、1つ又は複数のいわゆる復帰突然変異の導入である。抗体のヒト化は、当分野の技術者に公知である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, 248

40

50

巻、Benny K. Lo編、を参照)。軽鎖及び重鎖両方の可変ドメインに適する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の相同性によって同定することができる。或いは、例えば構造、生物物理及び生化学特性についての知識に基づいて、固定レシピエントフレームワークを使用することができる。レシピエントフレームワークは、成熟した抗体配列から導かれた生殖細胞系であってもよい。ドナー抗体からのCDR領域は、CDRグラフティングによって移動させることができる。CDRグラフティングヒト化抗体は、ドナー抗体からのアミノ酸残基の再導入(復帰突然変異)がヒト化抗体の特性に有益な影響を及ぼす決定的なフレームワーク位置の同定によって、例えば親和性、機能性及び生物物理特性について更に最適化することができる。ドナー抗体由来の復帰突然変異に加えて、ヒト化抗体は、CDR又はフレームワーク領域への生殖細胞系残基の導入、免疫原性エピトープの削除、部位特異的突然変異誘発、親和性成熟等によって操作することができる。

#### 【 0 0 8 9 】

更に、ヒト化抗体は、レシピエント抗体又はドナー抗体で見出されない残基を含むことができる。これらの改変は、抗体性能を更に洗練するために加えられる。一般に、ヒト化抗体は、CDR領域の全て又は実質的に全てがヒト以外の免疫グロブリンのそれらに対応し、FR残基の全て又は実質的に全てがヒト免疫グロブリン配列のそれらである、少なくとも1つ、一般的に2つの可変ドメインを含む。ヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域(Fc)、一般的にヒト免疫グロブリンのそれの少なくとも一部を任意選択で含むこともできる。

#### 【 0 0 9 0 】

用語「ヒト化抗体誘導体」は、ヒト化抗体の任意の改変形、例えば抗体と別の化学薬剤又は抗体又は抗体断片又はポリペプチドのコンジュゲートを指す。

#### 【 0 0 9 1 】

本明細書で用いる用語「キメラ抗体」は、その軽鎖及び重鎖遺伝子が、異なる種を起源とする免疫グロブリンの可変及び定常領域遺伝子から、一般的に遺伝子操作によって構築された抗体を指す。例えば、マウスモノクローナル抗体からの遺伝子の可変セグメントをヒト定常領域に連結することができる。

#### 【 0 0 9 2 】

抗体の断片結晶性領域(「Fc領域」/「Fcドメイン」)は抗体のC末端領域であり、それは定常CH2及びCH3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、並びに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、その機能的特性の1つ又は複数、中でも例えば血清中半減期、補体結合、Fc受容体結合、タンパク質安定性及び/又は抗原依存性細胞性細胞毒性、又はその欠損を一般的に変化させるために、抗体はFc領域に改変を含むように操作することができる。更に、前と同じように抗体の1つ又は複数の機能的特性を変化させるために、本発明の抗体は、化学改変(例えば、1つ又は複数の化学部分を抗体に結合することができる)するか、又は改変してそのグリコシル化を変化させることができる。IgG1抗体は、特定のFc受容体(L234A、L235E及びG237A)への親和性の低下、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以下の突然変異の1つ又は複数、おそらく全てを含む改変Fcドメインを持つことができる(EU指標による残基番号付け)。

。

#### 【 0 0 9 3 】

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であってもよい。所望により、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、当初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することができる。クラススイッチ技術は、1つのIgGサブクラスを別のものに、例えばIgG1からIgG2かIgG4に; IgG2からIgG1かIgG4に; 又はIgG4からIgG1かIgG2に変換するために使用することもできる。異なるIgGサブクラスからの領域の組合せによって定常領域キメラ分子を生成するために、抗体の操作を実施することもできる。

#### 【 0 0 9 4 】

一実施形態では、CH1のヒンジ領域は、ヒンジ領域のシステイン残基の数が変化するよ

10

20

30

40

50

うに、例えば増加又は減少するように改変される。このアプローチは、例えばBodmerらによる米国特許第5,677,425号で更に記載される。

【0095】

抗体を安定させるために、例えば二価抗体が2つの一価VH-VL断片に分離する危険を低減するために、定常領域を改変することができる。例えば、IgG4定常領域では、ヒンジ部の重鎖間ジスルフィド架橋を安定させるために、残基S228(EU番号付け指数による、KabatによりS241)をプロリン(P)残基に突然変異させることができる(例えば、Angalら、Mol. Immunol. 1993;30:105～8頁を参照)。

【0096】

TFPI上の2つの特異なエピトープに結合する二重特異的抗体又は2つの单一特異的抗体は、当分野の技術者に公知である方法によって生成することができる。二重特異的フォーマットは、例えば2つの抗体断片、例えば2つのFab又はscFv断片の、直接的な、又は適切な機能のために必要な柔軟性を提供するリンカーを通しての化学的コンジュゲーションによって調製することができる。Fab断片を結合するための1つの具体的な方法は、Fab断片に適切に置いたシステイン残基でチオール官能性を使用することである。

【0097】

抗体又はその断片は、それらの相補性決定領域(CDR)で規定することができる。本明細書で使用するとき、用語「相補性決定領域」又は「超可変領域」は、抗原結合に関与するアミノ酸残基が置かれる抗体領域を指す。超可変性の領域又はCDRは、抗体可変ドメインのアミノ酸配列の最大変動性を有する領域として同定することができる。Kabatデータベース等のデータベースをCDR同定のために使用することができ、例えば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の31～35(H1)、50～65(H2)及び95～102(H3)を含むと規定される;(Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest、5版、U.S. Department of Health and Human Services、NIH Publication No. 91-3242)。或いは、CDRは、「超可変ループ」からの残基(軽鎖可変ドメインの残基 26～33(L1)、50～52(L2)及び91～96(L3)並びに重鎖可変ドメインの26～32(H1)、53～55(H2)及び96～101(H3);Chothia及びLesk、J. Mol. Biol. 1987;196:901～917頁)と規定することができる。一般的に、この領域のアミノ酸残基の番号付けは、上記、Kabatらに記載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」等の語句は、重鎖可変ドメイン又は軽鎖可変ドメインのためのこの番号付け体系を指す。Kabat番号付け体系を用いて、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)又はCDRの短縮又はそれへの挿入に対応するより少ないか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等)を含むことができる。所与の抗体のためのKabatによる残基の番号付けは、「標準」のKabatによって番号付けられた配列との抗体配列の相同領域での整列によって決定することができる。

【0098】

用語「フレームワーク領域」又は「FR」残基は、本明細書に規定される通り、CDRの中にはないVH又はVLアミノ酸残基を指す。

【0099】

本発明の抗体は、Kabat番号付けを使用して規定されるか、本明細書に開示される逐次的アミノ酸番号付けにより規定されるように、本明細書に開示される特異抗体の1つ又は複数からのCDR領域、例えば配列番号3～61からのCDR領域を含むことができる。

【0100】

したがって、TFPI(1～181)に結合することが可能である本発明の单一特異的抗体は、TFPI(1～181)に結合する本発明の二重特異的抗体の一部を有することができ、前記CDR領域を含むこともできる。

【0101】

10

20

30

40

50

TFPI(1～181)に結合することが可能である本発明の单一特異的抗体は、以下を含む重鎖を有することができる：

・それらのアミノ酸残基の1つが異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい、配列番号3のアミノ酸31～35に対応するCDR1配列；及び/又は

・それらのアミノ酸の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、配列番号3又は配列番号5又は配列番号7のアミノ酸50～66に対応するCDR2配列；及び/又は

・それらのアミノ酸残基の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、配列番号3のアミノ酸99～110に対応するCDR3配列。

【0102】

10

TFPI(1～181)に結合することが可能である本発明の单一特異的抗体は、以下を含む軽鎖を有することができる：

・配列番号4のアミノ酸24～39に対応するCDR1配列；及び/又は

・配列番号4のアミノ酸55～61に対応するCDR2配列；及び/又は

・配列番号4のアミノ酸94～102に対応するCDR3配列。

【0103】

TFPI(182～276)に結合することが可能である本発明の单一特異的抗体は、以下を含む重鎖を有することができる：

・それらのアミノ酸残基の1つが異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい、配列番号9のアミノ酸31～35に対応するCDR1配列；及び/又は

20

・それらのアミノ酸の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、配列番号9のアミノ酸50～66に対応するCDR2配列；及び/又は

・それらのアミノ酸残基の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、配列番号9のアミノ酸99～107に対応するCDR3配列。

【0104】

TFPI(182～276)に結合することが可能である本発明の单一特異的抗体は、以下を含む軽鎖を有することができる：

・それらのアミノ酸残基の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、配列番号10のアミノ酸24～34に対応するCDR1配列；及び/又は

・それらのアミノ酸残基の1つが異なるアミノ酸によって置換されてもよい、配列番号10のアミノ酸50～56に対応するCDR2配列；及び/又は

30

・それらのアミノ酸残基の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、配列番号10のアミノ酸89～97に対応するCDR3配列。

【0105】

TFPI(182～276)に結合することが可能である本発明の单一特異的抗体は、以下を含む重鎖を有することができる：

・それらのアミノ酸残基の1つが異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい、配列番号11のアミノ酸31～35に対応するCDR1配列；及び/又は

・それらのアミノ酸の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、配列番号11のアミノ酸50～66に対応するCDR2配列；及び/又は

40

・それらのアミノ酸残基の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、配列番号11のアミノ酸99～106に対応するCDR3配列。

【0106】

TFPI(182～276)に結合することが可能である本発明の单一特異的抗体は、以下を含む軽鎖を有することができる：

・それらのアミノ酸残基の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、配列番号12のアミノ酸24～33に対応するCDR1配列；及び/又は

・それらのアミノ酸残基の1つが異なるアミノ酸によって置換されてもよい、配列番号12のアミノ酸49～55に対応するCDR2配列；及び/又は

・それらのアミノ酸残基の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

50

列番号12のアミノ酸88～96に対応するCDR3配列。

【0107】

TFPI(182～276)に結合する本発明の二重特異的抗体の部分は、前記CDR領域を含むこと 10  
もできる。

【0108】

TFPI(182～276)に結合することが可能である本発明の单一特異的抗体は、以下を含む重鎖を有することができる：

・それらのアミノ酸残基の1つが異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい、配列番号13のアミノ酸31～35に対応するCDR1配列；及び/又は

・それらのアミノ酸の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、配列番号13のアミノ酸50～66に対応するCDR2配列；及び/又は

・それらのアミノ酸残基の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、配列番号13のアミノ酸99～111に対応するCDR3配列。

【0109】

TFPI(182～276)に結合することが可能である本発明の单一特異的抗体は、以下を含む軽鎖を有することができる：

・それらのアミノ酸残基の1つ、2つ又は3つが異なるアミノ酸によって置換されてもよい、配列番号14のアミノ酸24～38に対応するCDR1配列；及び/又は

・それらのアミノ酸残基の1つが異なるアミノ酸によって置換されてもよい、配列番号14のアミノ酸54～60に対応するCDR2配列；及び/又は

・それらのアミノ酸残基の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、配列番号14のアミノ酸93～101に対応するCDR3配列。

【0110】

TFPI(182～276)に結合することが可能である本発明の单一特異的抗体は、以下を含む重鎖を有することができる：

・それらのアミノ酸残基の1つが異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい、配列番号15のアミノ酸31～35に対応するCDR1配列；及び/又は

・それらのアミノ酸の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、配列番号15のアミノ酸50～66に対応するCDR2配列；及び/又は

・それらのアミノ酸残基の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、配列番号15のアミノ酸99～106に対応するCDR3配列。

【0111】

TFPI(182～276)に結合することが可能である本発明の单一特異的抗体は、以下を含む軽重鎖を有することができる：

・それらのアミノ酸残基の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、配列番号16のアミノ酸24～34に対応するCDR1配列；及び/又は

・それらのアミノ酸残基の1つが異なるアミノ酸によって置換されてもよい、配列番号16のアミノ酸50～56に対応するCDR2配列；及び/又は

・それらのアミノ酸残基の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、配列番号16のアミノ酸89～97に対応するCDR3配列。

【0112】

TFPI(182～276)に結合する本発明の二重特異的抗体の部分は、前記CDR領域を含むこと 40  
ができる。

【0113】

TFPI(1～181)に結合することが可能である本発明による单一特異的抗体は、以下を含む重鎖を有することができる：

・それらのアミノ酸残基の1つが異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい、配列番号22のアミノ酸31～36に対応するCDR1配列；及び/又は

・それらのアミノ酸の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、配列番号22のアミノ酸51～66に対応するCDR2配列；及び/又は

10

20

30

40

50

・それらのアミノ酸残基の1つが異なるアミノ酸によって置換されてもよい、配列番号2のアミノ酸99～104に対応するCDR3配列。

【0114】

TFPI(1～181)に結合することが可能である本発明による单一特異的抗体は、以下を含む軽鎖を有することができる：

・それらのアミノ酸残基の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、配列番号23のアミノ酸24～33に対応するCDR1配列；及び/又は

・それらのアミノ酸残基の1つが異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい、配列番号23のアミノ酸49～55に対応するCDR2配列；及び/又は

・それらのアミノ酸残基の1つが異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい、配列番号23のアミノ酸88～96に対応するCDR3配列。 10

【0115】

TFPI(1～181)に結合することが可能である本発明による单一特異的抗体は、以下を含む重鎖を有することができる：

・それらのアミノ酸残基の1つが異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい、配列番号24のアミノ酸31～35に対応するCDR1配列；及び/又は

・それらのアミノ酸の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、配列番号24のアミノ酸50～65に対応するCDR2配列；及び/又は

・それらのアミノ酸残基の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、配列番号24のアミノ酸98～110に対応するCDR3配列。 20

【0116】

TFPI(1～181)に結合することが可能である本発明による单一特異的抗体は、以下を含む軽鎖を有することができる：

・それらのアミノ酸残基の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、配列番号25のアミノ酸24～34に対応するCDR1配列；及び/又は

・それらのアミノ酸残基の1つが異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい、配列番号25のアミノ酸50～56に対応するCDR2配列；及び/又は

・それらのアミノ酸残基の1つが異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい、配列番号25のアミノ酸89～96に対応するCDR3配列。 30

【0117】

TFPI(1～181)に結合することが可能である本発明による单一特異的抗体は、以下を含む重鎖を有することができる：

・それらのアミノ酸残基の1つが異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい、配列番号28のアミノ酸31～35に対応するCDR1配列；及び/又は

・それらのアミノ酸の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、配列番号28のアミノ酸50～66に対応するCDR2配列；及び/又は

・それらのアミノ酸残基の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、配列番号28のアミノ酸99～105に対応するCDR3配列。 40

【0118】

TFPI(1～181)に結合することが可能である本発明による单一特異的抗体は、以下を含む軽鎖を有することができる：

・それらのアミノ酸残基の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、配列番号29のアミノ酸24～39に対応するCDR1配列；及び/又は

・それらのアミノ酸残基の1つが異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい、配列番号29のアミノ酸55～61に対応するCDR2配列；及び/又は

・それらのアミノ酸残基の1つが異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい、配列番号29のアミノ酸94～102に対応するCDR3配列。 50

【0119】

TFPI(1～181)に結合することが可能である本発明による单一特異的抗体は、以下を含む重鎖を有することができる：

・それらのアミノ酸残基の1つが異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい、配列番号30のアミノ酸31～35に対応するCDR1配列；及び/又は

・それらのアミノ酸の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、配列番号30のアミノ酸50～65に対応するCDR2配列；及び/又は

・それらのアミノ酸残基の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、配列番号30のアミノ酸98～110に対応するCDR3配列。

【0120】

TFPI(1～181)に結合することが可能である本発明による单一特異的抗体は、以下を含む軽鎖を有することができる：

・それらのアミノ酸残基の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、配列番号31のアミノ酸24～34に対応するCDR1配列；及び/又は

・それらのアミノ酸残基の1つが異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい、配列番号31のアミノ酸50～56に対応するCDR2配列；及び/又は

・それらのアミノ酸残基の1つが異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい、配列番号31のアミノ酸89～96に対応するCDR3配列。

【0121】

TFPI(182～276)に結合することが可能である本発明の单一特異的抗体は、以下を含む重鎖を有することができる：

・それらのアミノ酸残基の1つが異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい、配列番号42のアミノ酸31～35に対応するCDR1配列；及び/又は

・それらのアミノ酸の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、配列番号42のアミノ酸50～66に対応するCDR2配列；及び/又は

・それらのアミノ酸残基の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、配列番号42のアミノ酸99～105に対応するCDR3配列。

【0122】

TFPI(182～276)に結合することが可能である本発明の单一特異的抗体は、以下を含む軽鎖を有することができる：

・それらのアミノ酸残基の1つ、2つ又は3つが異なるアミノ酸によって置換されてもよい、配列番号43のアミノ酸24～38に対応するCDR1配列；及び/又は

・それらのアミノ酸残基の1つが異なるアミノ酸によって置換されてもよい、配列番号43のアミノ酸54～60に対応するCDR2配列；及び/又は

・それらのアミノ酸残基の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、配列番号43のアミノ酸93～101に対応するCDR3配列。

【0123】

TFPI(182～276)に結合することが可能である本発明の单一特異的抗体は、以下を含む重鎖を有することができる：

・それらのアミノ酸残基の1つが異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい、配列番号44のアミノ酸31～35に対応するCDR1配列；及び/又は

・それらのアミノ酸の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、配列番号44のアミノ酸50～66に対応するCDR2配列；及び/又は

・それらのアミノ酸残基の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、配列番号44のアミノ酸99～109に対応するCDR3配列。

【0124】

TFPI(182～276)に結合することが可能である本発明の单一特異的抗体は、以下を含む軽鎖を有することができる：

・それらのアミノ酸残基の1つ、2つ又は3つが異なるアミノ酸によって置換されてもよい、配列番号45のアミノ酸24～34に対応するCDR1配列；及び/又は

・それらのアミノ酸残基の1つが異なるアミノ酸によって置換されてもよい、配列番号45のアミノ酸50～56に対応するCDR2配列；及び/又は

・それらのアミノ酸残基の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

10

20

30

40

50

列番号45のアミノ酸89～97に対応するCDR3配列。

【0125】

TFPI(182～276)に結合することが可能である本発明の单一特異的抗体は、以下を含む重鎖を有することができる：

・それらのアミノ酸残基の1つが異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい、配列番号46のアミノ酸31～36に対応するCDR1配列；及び/又は

・それらのアミノ酸の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、配列番号46のアミノ酸51～66に対応するCDR2配列；及び/又は

・それらのアミノ酸残基の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、配列番号46のアミノ酸99～106に対応するCDR3配列。 10

【0126】

TFPI(182～276)に結合することが可能である本発明の单一特異的抗体は、以下を含む軽鎖を有することができる：

・それらのアミノ酸残基の1つ、2つ又は3つが異なるアミノ酸によって置換されてもよい、配列番号47のアミノ酸24～38に対応するCDR1配列；及び/又は

・それらのアミノ酸残基の1つが異なるアミノ酸によって置換されてもよい、配列番号47のアミノ酸54～60に対応するCDR2配列；及び/又は

・それらのアミノ酸残基の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、配列番号47のアミノ酸93～101に対応するCDR3配列。 20

【0127】

TFPI(182～276)に結合することが可能である本発明の单一特異的抗体は、以下を含む重鎖を有することができる：

・それらのアミノ酸残基の1つが異なるアミノ酸残基によって置換されてもよい、配列番号60のアミノ酸31～35に対応するCDR1配列；及び/又は

・それらのアミノ酸の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、配列番号60のアミノ酸50～66に対応するCDR2配列；及び/又は

・それらのアミノ酸残基の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、配列番号60のアミノ酸99～107に対応するCDR3配列。 20

【0128】

TFPI(182～276)に結合することが可能である本発明の单一特異的抗体は、以下を含む軽鎖を有することができる：

・それらのアミノ酸残基の1つ、2つ又は3つが異なるアミノ酸によって置換されてもよい、配列番号61のアミノ酸24～34に対応するCDR1配列；及び/又は

・それらのアミノ酸残基の1つが異なるアミノ酸によって置換されてもよい、配列番号61のアミノ酸50～56に対応するCDR2配列；及び/又は

・それらのアミノ酸残基の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、配列番号61のアミノ酸89～97に対応するCDR3配列。 30

【0129】

前記单一特異的抗体を組み合わせて、KPI-1/KPI-3二重特異的抗体を形成することができる。 40

【0130】

一実施形態では、KPI-1ドメイン特異的抗体又はその断片をC末端領域(配列番号1による182～276)特異的抗体又はその断片と組み合わせて、二重特異的抗体をとりわけ完全長フォーマット又はFab-Fabコンジュゲートの形で形成する。

【0131】

1つのそのような実施形態では、mAb 1F91(配列番号22及び23)又はその断片を、mAb 22F 74(配列番号15及び16)又はその断片と組み合わせる。

【0132】

1つのそのような実施形態では、mAb 1F91(配列番号22及び23)又はその断片を、mAb 22F 132(配列番号42及び43)又はその断片と組み合わせる。 50

## 【0133】

1つのそのような実施形態では、mAb 1F91(配列番号22及び23)又はその断片を、mAb 22F79(配列番号44及び45)又はその断片と組み合わせる。

## 【0134】

1つのそのような実施形態では、mAb 1F91(配列番号22及び23)又はその断片を、mAb 41F41(配列番号46及び47)又はその断片と組み合わせる。

## 【0135】

1つのそのような実施形態では、mAb 1F91(配列番号22及び23)又はその断片を、mAb 41F30(配列番号60及び61)又はその断片と組み合わせる。

## 【0136】

1つのそのような実施形態では、mAb 2F3(配列番号24及び25)又はその断片を、mAb 22F74(配列番号15及び16)又はその断片と組み合わせる。

## 【0137】

1つのそのような実施形態では、mAb 2F3(配列番号24及び25)又はその断片を、mAb 22F132(配列番号42及び43)又はその断片と組み合わせる。

## 【0138】

1つのそのような実施形態では、mAb 2F3(配列番号24及び25)又はその断片を、mAb 22F79(配列番号44及び45)又はその断片と組み合わせる。

## 【0139】

1つのそのような実施形態では、mAb 2F3(配列番号24及び25)又はその断片を、mAb 41F41(配列番号46及び47)又はその断片と組み合わせる。

## 【0140】

1つのそのような実施形態では、mAb 2F3(配列番号24及び25)又はその断片を、mAb 41F30(配列番号60及び61)又はその断片と組み合わせる。

## 【0141】

1つのそのような実施形態では、mAb 2F22(配列番号26及び27)又はその断片を、mAb 22F74(配列番号15及び16)又はその断片と組み合わせる。

## 【0142】

1つのそのような実施形態では、mAb 2F22(配列番号26及び27)又はその断片を、mAb 22F132(配列番号42及び43)又はその断片と組み合わせる。

## 【0143】

1つのそのような実施形態では、mAb 2F22(配列番号26及び27)又はその断片を、mAb 22F79(配列番号44及び45)又はその断片と組み合わせる。

## 【0144】

1つのそのような実施形態では、mAb 2F22(配列番号26及び27)又はその断片を、mAb 41F41(配列番号46及び47)又はその断片と組み合わせる。

## 【0145】

1つのそのような実施形態では、mAb 2F22(配列番号26及び27)又はその断片を、mAb 41F30(配列番号60及び61)又はその断片と組み合わせる。

## 【0146】

1つのそのような実施形態では、mAb 2F35(配列番号28及び29)又はその断片を、mAb 22F74(配列番号15及び16)又はその断片と組み合わせる。

## 【0147】

1つのそのような実施形態では、mAb 2F35(配列番号28及び29)又はその断片を、mAb 22F132(配列番号42及び43)又はその断片と組み合わせる。

## 【0148】

1つのそのような実施形態では、mAb 2F35(配列番号28及び29)又はその断片を、mAb 22F79(配列番号44及び45)又はその断片と組み合わせる。

## 【0149】

1つのそのような実施形態では、mAb 2F35(配列番号28及び29)又はその断片を、mAb 41F

10

20

30

40

50

41(配列番号46及び47)又はその断片と組み合わせる。

【0150】

1つのそのような実施形態では、mAb 2F35(配列番号28及び29)又はその断片を、mAb 41F 30(配列番号60及び61)又はその断片と組み合わせる。

【0151】

1つのそのような実施形態では、mAb 2F45(配列番号30及び31)又はその断片を、mAb 22F 74(配列番号15及び16)又はその断片と組み合わせる。

【0152】

1つのそのような実施形態では、mAb 2F45(配列番号30及び31)又はその断片を、mAb 22F 132(配列番号42及び43)又はその断片と組み合わせる。

10

【0153】

1つのそのような実施形態では、mAb 2F45(配列番号30及び31)又はその断片を、mAb 22F 79(配列番号44及び45)又はその断片と組み合わせる。

【0154】

1つのそのような実施形態では、mAb 2F45(配列番号30及び31)又はその断片を、mAb 41F 41(配列番号46及び47)又はその断片と組み合わせる。

【0155】

1つのそのような実施形態では、mAb 2F45(配列番号30及び31)又はその断片を、mAb 41F 30(配列番号60及び61)又はその断片と組み合わせる。

【0156】

20

変異形抗体は、上述の特定の配列及び断片の1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、最高10個又はそれ以上のアミノ酸置換及び/又は欠失及び/又は挿入を含むことができる。「欠失」変異形は、個々のアミノ酸の欠失、アミノ酸の小集団、例えば1、2、3、4若しくは5アミノ酸の欠失、又はより大きなアミノ酸領域の欠失、例えば特定のアミノ酸ドメイン若しくは他の特徴の欠失を含むことができる。「挿入」変異形は、個々のアミノ酸の挿入、アミノ酸の小集団、例えば1、2、3、4若しくは5アミノ酸の挿入、又はより大きなアミノ酸領域の挿入、例えば特定のアミノ酸ドメイン若しくは他の特徴の挿入を含むことができる。「置換」変異形は、同数のアミノ酸による1つ又は複数のアミノ酸の交換、及び保存的アミノ酸置換の形成を好ましくは含む。例えば、類似の特性を有する代替アミノ酸、例えば別の塩基性アミノ酸、別の酸性アミノ酸、別の中性アミノ酸、別の荷電アミノ酸、別の親水性アミノ酸、別の疎水性アミノ酸、別の極性アミノ酸、別の芳香族アミノ酸又は別の脂肪族アミノ酸で、アミノ酸を置換することができる。適する置換基を選択するために使用することができる20個の主なアミノ酸のいくつかの特性は、以下の通りである：

30

【0157】

【表1】

|     |                  |     |              |
|-----|------------------|-----|--------------|
| Ala | 脂肪族、疎水性、中性       | Met | 疎水性、中性       |
| Cys | 極性、疎水性、中性        | Asn | 極性、親水性、中性    |
| Asp | 極性、親水性、荷電(-)     | Pro | 疎水性、中性       |
| Glu | 極性、親水性、荷電(-)     | Gln | 極性、親水性、中性    |
| Phe | 芳香族、疎水性、中性       | Arg | 極性、親水性、荷電(+) |
| Gly | 芳香族、中性           | Ser | 極性、親水性、中性    |
| His | 芳香族、極性、親水性、荷電(+) | Thr | 極性、親水性、中性    |
| Ile | 脂肪族、疎水性、中性       | Val | 脂肪族、疎水性、中性   |
| Lys | 極性、親水性、荷電(+)     | Trp | 芳香族、疎水性、中性   |
| Leu | 脂肪族、疎水性、中性       | Tyr | 芳香族、極性、疎水性   |

40

【0158】

好ましい「誘導体」又は「変異形」には、天然のアミノ酸の代わりに、配列に出現するアミノ酸がその構造類似体であるものが含まれる。配列で使用するアミノ酸は、抗体の機

50

能に著しい悪影響を与えない限り、誘導体化又は改変、例えば標識してもよい。

【0159】

置換は、限定されるものではないが、保存的置換であってもよい。

【0160】

上記の誘導体及び変異形は、抗体の合成の間か生成後の改変によって、又は抗体が組換え形であるときは、部位特異的突然変異誘発、ランダム突然変異誘発又は核酸の酵素切断及び/若しくはライゲーションの公知技術を使用することによって調製することができる。

【0161】

本発明は、本発明の抗体をコードするポリヌクレオチドにも関する。したがって、本発明のポリヌクレオチドは、本明細書に記載される任意の抗体をコードすることができる。本明細書において用語「核酸分子」及び「ポリヌクレオチド」は互換的に使用され、デオキシリボヌクレオチドであれ、リボヌクレオチドであれ、又はその類似体であれ、任意の長さのヌクレオチドの重合体形を指す。ポリヌクレオチドの非限定例には、遺伝子、遺伝子断片、メッセンジャーRNA(mRNA)、cDNA、組換えポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離DNA、任意の配列の単離RNA、核酸プローブ及びプライマーが含まれる。本発明のポリヌクレオチドは、単離又は精製された形で提供することができる。

【0162】

選択されたポリペプチドを「コードする」核酸配列は、適当な調節配列の制御下に置いたときにin vivoでポリペプチドに転写(DNAの場合)及び翻訳(mRNAの場合)される核酸分子である。コード配列の境界は、5'(アミノ)末端の開始コドン及び3'(カルボキシ)末端の翻訳終止コドンによって決定される。本発明のために、そのような核酸配列には、限定されるものではないが、ウイルス、原核生物又は真核生物のmRNAからのcDNA、ウイルス又は原核生物のDNA又はRNAからのゲノム配列、更に合成DNA配列さえ含まれてもよい。転写終止配列は、コード配列の3'側に位置することができる。

【0163】

一実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、上記のVH又はVLアミノ酸配列をコードする配列を含む。例えば、本発明のポリヌクレオチドは、上記の配列番号11の配列又はその変異形若しくは断片を含むポリペプチドをコードすることができる。代わりに、適するポリヌクレオチド配列は、これらの特定のポリヌクレオチド配列の1つの変異形であってもよい。例えば、変異形は上記の核酸配列のいずれかの置換、欠失又は付加変異形であってもよい。変異形ポリヌクレオチドは、配列表で与えられる配列の、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、最高10個、最高20個、最高30個、最高40個、最高50個、最高75個又はそれ以上の核酸置換及び/又は欠失を含むことができる。

【0164】

適する変異形は、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと少なくとも70%相同意的であってもよく、好ましくは少なくとも80又は90%、より好ましくは少なくとも95%、97%又は99%それと相同意的であってもよい。相同意性の測定方法は当技術分野で周知であり、本場面では、相同意性は核酸同一性に基づいて計算されることが当業者に理解される。そのような相同意性は、少なくとも15、好ましくは少なくとも30、例えば少なくとも40、60、100、200又はそれ以上の数の連続ヌクレオチドの領域にわたって存在することができる。そのような相同意性は、未改変ポリヌクレオチド配列の全長にわたって存在することができる。

【0165】

ポリヌクレオチドの相同意性又は同一性の測定方法は、当技術分野で公知である。例えば、UWGCGパッケージは、相同意性を計算する(例えばそのデフォルト設定で使用する)ために使用することができる、BESTFITプログラムを提供する(Devereuxら(1984) Nucleic Acids Research 12:387 ~ 395頁)。

【0166】

相同意性を計算するか配列を一列に並べるために、例えばAltschul S.F. (1993) J Mol E

10

20

30

40

50

vol 36:290～300頁;Altschul, S.F.ら(1990) J Mol Biol 215:403～10頁に記載されている、PILEUP及びBLASTアルゴリズムを使用することもできる(一般的にそれらのデフォルト設定で)。

【0167】

BLAST分析を実行するソフトウェアは、National Centre for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)を通して公開されている。このアルゴリズムは、データベース配列中の同じ長さのワードと整列させるとときに、いくつかの正値の閾値スコアTにマッチするかそれを満たす長さWの短いワードをクエリー配列で同定することによって、ハイスクア配列対(HSP)を最初に同定することを含む。Tは、近傍ワードスコア(neighborhood word score)閾値と呼ばれる(Altschulら上記)。これらの初期近傍ワードヒットは、それらを含むHSPを見出すための検索を開始するためのシードとしての機能を果たす。ワードヒットは、累積アラインメントスコアを増加させることができる限り、各配列に沿って両方向に延長させられる。各方向でのワードヒットの延長は、次の場合に停止される: 1つ又は複数の負のスコアの残基アラインメントの蓄積のために、累積アラインメントスコアがゼロ以下になる; 又は、いずれかの配列の末端に到達する。BLASTアルゴリズムのパラメータW、T及びXは、アラインメントの感受性及び速度を決定する。BLASTプログラムは、デフォルトとして11のワード長(W)、50のBLOSUM62スコアリングマトリックス(Henikoff及びHenikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915～10919頁を参照)アラインメント(B)、10の予想(E)、M=5、N=4及び両方の鎖の比較を使用する。

【0168】

BLASTアルゴリズムは、2つの配列間の類似性の統計分析を実施する; 例えば、Karlin及びAltschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873～5878頁を参照。

【0169】

本明細書において用語「抗原」(Ag)は、Agを認識する抗体(Ab)を生成するために免疫適格脊椎動物の免疫化のために使用される実体を指す。本発明との関連で、適する抗原には、ヒトTFPI(1～181)及び完全長ヒトTFPI が含まれる。本明細書で、Agはより広く規定され、一般にAbによって特異的に認識される標的分子を含むものとされ、したがって免疫化過程又はAbを生成するために使用される他の過程、例えばファージディスプレイで使用される分子の断片又は模倣体を含む。

【0170】

本明細書で用いる用語「エピトープ」は、抗体(Ab)等の「抗原結合性ポリペプチド」とその対応する抗原(Ag)の間の分子相互作用との関連で規定される。一般に、「エピトープ」はAbが特異的に結合するAg上のエリア又は領域、すなわちAbと物理的に接触するエリア又は領域を指す。物理的接触は、Ab及びAg分子中の原子の様々な基準(例えば、2～6、例えば3、例えば4、例えば5 の距離カットオフ; 又は溶媒アクセス性)を使って規定することができる。タンパク質エピトープは、Abへの結合に直接に関与するAg中のアミノ酸残基(エピトープの免疫優勢成分とも呼ばれる)、並びに結合に直接に関与しない他のアミノ酸残基、例えばAbによって効果的にブロックされるAgのアミノ酸残基、すなわちAbの「溶媒排除表面」及び/又は「フットプリント」の中のアミノ酸残基を含むことができる。

【0171】

本明細書において用語「エピトープ」は、特に明記しない限り、本発明による单一若しくは二重特異的TFPI抗体、又は別のTFPI特異的薬剤に特異的に結合するTFPIの任意の特定領域中の、両方の型の結合性領域を含む。TFPIは、いくつかの異なるエピトープを含むことができ、これらには、限定されるものではないが、(1)直鎖状ペプチドエピトープ(2)成熟したTFPIコンホーメーションで互いの近くに位置する1つ又は複数の非連続アミノ酸からなるコンホーメーション依存エピトープ; 及び(3)全体又は一部がTFPIに共有結合している分子構造、例えば炭水化物基からなる翻訳後エピトープが含まれてもよい。

【0172】

所与の抗体(Ab)/抗原(Ag)対のためのエピトープは、様々な実験的及びコンピュータエ

10

20

30

40

50

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記載し、特徴付けることができる。実験的手段には、突然変異誘発、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方法；当技術分野で公知である方法が含まれる。各方法は特異な原理に頼っているので、エピトープの記載はそれを決定した方法に深く関係する。したがって、用いたエピトープマッピング方法に従い、所与のAb/Ag対のためのエピトープは異なって記載されることがある。

【0173】

その最も詳細なレベルで、AgとAbの間の相互作用のためのエピトープは、Ag-Ab相互作用に存在する原子接触を規定する空間座標、並びに結合熱力学へのそれらの相対寄与に関する情報によって記載することができる。より詳細でないレベルで、エピトープは、AgとAbの間の原子接触を規定する空間座標によって特徴付けることができる。更により詳細でないレベルで、エピトープは、Ab:Ag複合体の原子の間の距離又はその溶媒アクセス性等の特定の基準によって規定される、それが含むアミノ酸残基によって特徴付けることができる。更により詳細でないレベルで、エピトープは、機能を通して、例えば他のAbとの競合結合によって特徴付けることができる。エピトープは、別のアミノ酸による置換がAbとAgの間の相互作用の特徴を変化させるアミノ酸残基を含むとして、より一般的に規定することもできる。

【0174】

Ab、例えばFab断片とそのAgの間の複合体の空間座標によって規定される、X線によって導かれた結晶構造との関連で、本明細書において特記されない限り、又は文脈に反しない限り、用語エピトープは、Abの重原子から4 の距離の範囲内に重原子(すなわち水素以外の原子)を有するTFPI残基であると、特に規定される。

【0175】

用いるエピトープマッピング方法に従い、エピトープの記載及び定義は異なるレベルの詳細さで得られる事実から、同じAgの上の異なるAbのためのエピトープの比較を、異なるレベルの詳細さで同様に実行することができる事が導かれる。

【0176】

例えばX線構造から判定される、アミノ酸レベルで記載されるエピトープは、それらが同じセットのアミノ酸残基を有するならば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るならば、エピトープは重複すると言われる。アミノ酸残基がエピトープによって共有されないならば、エピトープは別々(特異)であると言われる。

【0177】

用語「パラトープ」の定義は、観点を反転させることによって、「エピトープ」の上記の定義から導かれる。したがって、用語「パラトープ」は、Agが特異的に結合する、すなわちそれがAgと物理的接触をする、Ab上のエリア又は領域を指す。

【0178】

Ab、例えばFab断片とそのAgの間の複合体の空間座標によって規定される、X線によって導かれた結晶構造との関連で、本明細書において特記されない限り、又は文脈に反しない限り、用語パラトープは、TFPIの重原子から4 の距離の範囲内に重原子(すなわち水素以外の原子)を有することを特徴とするAg残基であると、特に規定される。

【0179】

所与の抗体(Ab) / 抗原(Ag)対のためのエピトープ及びパラトープは、日常の方法によって同定することができる。例えば、エピトープの一般的な位置は、異なる断片又は変異形TFPIポリペプチドに結合する抗体の能力を評価することによって判定することができる。抗体と接触するTFPI中の特異的アミノ酸(エピトープ)及びTFPIと接触する抗体の特異的アミノ酸(パラトープ)も、日常の方法を使って判定することができる。例えば、抗体及び標的分子を合わせることができ、Ab:Ag複合体を結晶化することができる。抗体とその標的の間の相互作用の特定部位を同定するために、複合体の結晶構造を決定して使用することができる。

10

20

30

40

50

## 【0180】

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それらの能力に関して特徴付けることができ、「競合結合」/「ビニング」にかけることができる。本文脈で、用語「ビニング」は、同じ抗原に結合する抗体を分類する方法を指す。抗体の「ビニング」は、表面プラズモン共鳴(SPR)、ELISA又はフローサイトメトリー等の標準技術に基づくアッセイでの、それらの共通抗原への2つの抗体の競合結合に基づくことができる。

## 【0181】

抗体の「ピン」は、参照抗体を用いて規定される。第二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は、第二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、参照及び第二抗体は抗原の同じ部分に競合的に結合し、「競合抗体」と造語されている。第二抗体が参照抗体と同時に抗原に結合することが可能である場合は、第二抗体は別個の「ピン」に属すると言われる。この場合、参照及び第二抗体は抗原の同じ部分に競合的に結合せず、「非競合抗体」と造語されている。10

## 【0182】

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。競合抗体、すなわち同じ「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を有することができ、又は別々のエピトープさえ有することができる。後者は、抗原上のそのエピトープに結合している参照抗体が、第二抗体が抗原上のそのエピトープと接触するために必要とされる空間を占める場合である(「立体障害」)。非競合抗体は、別々のエピトープを一般に有する。20

## 【0183】

TFPI(1~181)及びTFPI(182~276)に対する単一特異的抗体又は二重特異的抗体の2つの抗原認識部位の相対的及び絶対的親和性の調整は、例えば、TFPI阻害の完全な妨害をなお提供しつつ、TFPIへの選択的結合を提供する観点から有利である。

## 【0184】

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断片と抗原の間の非共有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(内在性の活性)を記載するために使用される。

## 【0185】

一価の相互作用を通しての2つの分子、例えば抗体又はその断片と抗原の間の結合親和性は、平衡解離定数( $K_D$ )を判定することによって数量化することができる。次に、 $K_D$ は、例えばSPR方法による複合体形成及び解離の動態の測定によって判定することができる。一価の複合体の結合及び解離に対応する速度定数は、結合速度定数 $k_a$ (又は $k_{on}$ )及び解離速度定数 $k_d$ (又は $k_{off}$ )とそれぞれ呼ばれる。 $K_D$ は、式 $K_D = k_d/k_a$ を通して $k_a$ 及び $k_d$ と関連する。30

## 【0186】

上記の定義に従い、異なる分子相互作用に関連する結合親和性、例えば所与の抗原のための異なる抗体の結合親和性の比較は、個々の抗体/抗原複合体の $K_D$ 値の比較によって比較することができる。

## 【0187】

本発明による抗体は、TFPIへの結合に関して別の分子、例えば天然のリガンド又は受容体又は別の抗体と競合することができ、それによってこれらの相互作用に関連する機能に影響を及ぼすことができる。天然のリガンド/受容体と競合する抗体の能力は、TFPI阻害のための見かけの $K_I$ に及ぼす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。次に、見かけの $K_I$ 値から $K_D$ 値を推測することができる。一般的に、標的(TFPI)に対する抗体のための対象の $K_D$ 値は、他のTFPIリガンドの $K_D$ より2倍、好ましくは5倍、より好ましくは10倍低い。より好ましくは、 $K_D$ は50倍、例えば100倍、又は200倍;更に好ましくは500倍、例えば1,000倍又は10,000倍低い。40

## 【0188】

この解離定数の値は、周知の方法によって直接に判定することができる。標的に対する50

抗体等のリガンドの結合能力を評価する標準アッセイは当技術分野で公知であり、例えば、ELISA、ウエスタンプロット、RIA、等温滴定熱量測定及びフローサイトメトリー分析がある。抗体の結合動態及び結合親和性も、SPR等の当技術分野で公知の標準アッセイによって評価することができる。

【0189】

標的への抗体の結合を、別の抗体等のその標的の別のリガンドによる標的の結合と比較する競合結合アッセイを実行することができる。

【0190】

本発明の単一特異的抗体又は二重特異的抗体の任意のアームは、その標的に対して $1 \times 10^{-7}$ M以下、 $1 \times 10^{-8}$ M以下、又は $1 \times 10^{-9}$ M以下、又は $1 \times 10^{-10}$ M以下、 $1 \times 10^{-11}$ M以下、又は $1 \times 10^{-12}$ M以下の $K_D$ 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であってもよい。

10

【0191】

一態様では、本発明は、そのような競合抗体が二重特異的である限り、本発明の抗体と競合する抗体を含む。

【0192】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載される二重特異的抗体等の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、薬学的に許容される担体と一緒に製剤化される、本発明の1つ又は複数の二重特異的TFPI抗体を含む医薬組成物を提供する。

20

【0193】

したがって、本発明の1つの目的は、0.25mg/ml～250mg/mlの濃度で存在するそのような二重特異的TFPI抗体を含む医薬製剤を提供することであり、そこで、前記製剤はpHが2.0～10.0である。製剤は、緩衝系、保存剤、張性剤、キレート化剤、安定剤又は界面活性剤、並びにその様々な組合せの1つ又は複数を更に含むことができる。医薬組成物での保存剤、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、19版、1995を参照されたい。

【0194】

一実施形態では、医薬製剤は水性製剤である。そのような製剤は一般的に溶液又は懸濁液であるが、コロイド、分散液、乳剤及び多相材料を含むこともできる。用語「水性製剤」は、少なくとも50w/w%の水を含む製剤と規定される。同様に、用語「水溶液」は、少なくとも50w/w%の水を含む溶液と規定され、用語「水性懸濁液」は、少なくとも50w/w%の水を含む懸濁液と規定される。

30

【0195】

別の実施形態では、医薬製剤は凍結乾燥製剤であり、医師又は患者は使用前にそれに溶媒及び/又は希釈剤を加える。

【0196】

更なる態様では、医薬製剤はそのような抗体の水溶液及び緩衝液を含み、そこにおいて、抗体は1mg/ml以上の濃度で存在し、前記製剤はpHが約2.0～約10.0である。

40

【0197】

本発明による2つの単一特異的抗体を含む二重特異的抗体又は医薬製剤は、凝固障害の対象を処置するために使用することができる。

【0198】

本明細書で用いる用語「対象」には、任意のヒト患者又はヒト以外の脊椎動物が含まれる。

【0199】

本明細書で用いる用語「凝固障害」は、正常な凝固カスケードの任意の凝固促進性成分の任意の定性的若しくは定量的欠陥又はフィブリン溶解現象の任意の上方制御が引き起こすことができる、出血傾向の増加を指す。そのような凝固障害は先天性及び/又は後天性

50

及び/又は医原性であってもよく、当分野の技術者によって同定される。

【0200】

先天性低凝固障害の非限定例は、血友病A、血友病B、第VII因子欠損、第X因子欠損、第XI因子欠損、フォンウィルブランド病及び血小板減少症、例えばグランツマン血小板無力症及びベルナール-スリエ症候群である。前記血友病A又はBは、重度、中等度又は軽度であってもよい。血友病の臨床重症度は、血液中のFIX/FVIIIの機能単位の濃度によって判定され、軽度、中等度又は重度に分類される。重度の血友病は、正常なレベルの1%未満に対応する<0.01U/mlの凝固因子レベルによって規定され、中等度及び軽度の患者はそれぞれ1~5%及び>5%のレベルを有する。「阻害剤」(すなわち、第VIII因子に対する同種異系抗体)による血友病A及び「阻害剤」(すなわち、第IX因子に対する同種異系抗体)による血友病Bは、部分的に先天性で部分的に後天性である凝固障害の非限定例である。

10

【0201】

後天性の凝固障害の非限定例は、ビタミンK欠乏によって引き起こされるセリンプロテアーゼ欠乏であり、そのようなビタミンK欠乏はワルファリン等のビタミンKアンタゴニストの投与が引き起こすことができる。後天性の凝固障害は、甚大な外傷の後に起こることもできる。「血液性の悪循環」としても知られるこの場合には、それは、血液希釈(希釈性の血小板減少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)を特徴とする。輸液療法及びフィブリン溶解現象の増加は、この状況を悪化させることができる。前記出血は、身体の任意の部分からのものであってよい。

20

【0202】

医原性凝固障害の非限定例は、血栓塞栓性疾患を処置するために処方することができる、ヘパリン、アスピリン、ワルファリン及び他の血小板凝集阻害剤等の抗凝固薬品の過剰投与である。医原性凝固障害の第2の非限定例は、過剰及び/又は不適当な輸液療法によって誘導されるもの、例えば輸血が誘導することができるものである。

【0203】

本発明の一実施形態では、出血は血友病A又はBと関連する。別の実施形態では、出血は後天性の阻害剤による血友病A又はBと関連する。別の実施形態では、出血は血小板減少症と関連する。別の実施形態では、出血はフォンウィルブランド病と関連する。別の実施形態では、出血は重度の組織傷害と関連する。別の実施形態では、出血は重度の外傷と関連する。別の実施形態では、出血は手術と関連する。別の実施形態では、出血は出血性胃炎及び/又は腸炎と関連する。別の実施形態では、例えば胎盤剥離では、出血は大量子宮出血である。別の実施形態では、出血は、頭蓋内、耳内又は眼内等の、機械的止血の可能性が限定されている器官で起こる。別の実施形態では、出血は抗凝固療法と関連する。

30

【0204】

本明細書で用いる用語「処置」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学療法を指す。前記対象は、前記特定の処置の使用が前記ヒト又は他の脊椎動物の健康に有益なことを示す、仮診断又は確定診断を下した医師又は獣医によって検診を受けたことが予想される。対象の健康の現状により、前記処置のタイミング及び目的は個体の間で異なってもよい。したがって、前記処置は予防的、待期的、症候的及び/又は治療的であってもよい。本発明に関して、予防的、待期的、症候的及び/又は治療的処置は、本発明の別々の態様を表すことができる。

40

【0205】

本発明の抗体は、非経口的に、例えば静脈内に、例えば筋肉内に、例えば皮下に投与することができる。或いは、本発明の抗体は、非経口以外の経路を通して、例えば経口的又は局所的に投与することができる。本発明の抗体は、予防的に投与されてもよい。本発明の抗体は、治療的に投与されてもよい(必要に応じて)。

【0206】

一実施形態では、本発明の二重特異的抗体は、in vitroでTFPI レベルを測定するために使用される。

【0207】

50

以下のものは、本発明の非限定的態様である：

1. 組織因子系凝固インヒビター(TFPI)に特異的に結合することが可能な多重特異的抗体。  
。
2. 組織因子系凝固インヒビター(TFPI)の第1のエピトープ及びTFPIの第2のエピトープに特異的に結合することが可能な多重特異的抗体であって、第1のエピトープは配列番号1の1～181位の中に位置するアミノ酸残基を含み、第2のエピトープは配列番号1の182～276のTFPI位の中に位置するアミノ酸残基を含む。  
。
3. 第1のエピトープが組織因子系凝固インヒビター(TFPI)のKPI-1ドメインの中のアミノ酸残基を含む、態様1又は2に記載の多重特異的抗体。  
。
4. 第1のエピトープが組織因子系凝固インヒビター(TFPI)のKPI-2ドメインの中のアミノ酸残基を含む、態様1又は2に記載の多重特異的抗体。  
10
5. 第2のエピトープが組織因子系凝固インヒビター(TFPI)のKPI-3ドメインの中のアミノ酸残基を含む、態様1～4のいずれか1つに記載の多重特異的抗体。  
。
6. 二重特異的抗体である、態様1～5のいずれか1つに記載の多重特異的抗体。  
。
7. 組織因子系凝固インヒビター(TFPI)に特異的に結合することが可能であり、配列番号1のLeu 16、Pro 17、Leu 19、Lys 20、Leu 21、Met 22、Phe 25、Cys 35、Ala 37、Met 39、Arg 41、Tyr 56、Gly 57、Gly 58、Cys 59、Glu 60、Gly 61、Asn 62、Gln 63、Arg 65、Phe 66、Glu 67、Glu 71及びMet 75からなる群から選択される1つ又は複数のアミノ酸残基を含むKPI-1エピトープに結合することが可能である、態様6に記載の二重特異的抗体。  
20
8. 配列番号1のアミノ酸残基Arg 41、Arg 65及び/又はGlu 67を含むKPI-1エピトープに結合することが可能である、態様7に記載の二重特異的抗体。  
。
9. 組織因子系凝固インヒビター(TFPI)に特異的に結合することが可能であり、配列番号1のGlu 100、Glu 101、Asp 102、Pro 103、Arg 107、Tyr 109、Thr 111、Tyr 113、Phe 114、Asn 116、Gln 118、Gln 121、Cys 122、Glu 123、Arg 124、Phe 125、Lys 126及びLeu 140からなる群から選択される1つ又は複数のアミノ酸残基を含むKPI-2エピトープに結合することが可能である、態様6に記載の二重特異的抗体。  
。
10. 組織因子系凝固インヒビター(TFPI)に特異的に結合することが可能であり、配列番号1のアミノ酸残基Arg 107を含むKPI-2エピトープに特異的に結合することが可能である、態様9に記載の二重特異的抗体。  
30
11. 組織因子系凝固インヒビター(TFPI)に特異的に結合することが可能であり、配列番号1のTyr 207、Asn 208、Ser 209、Val 210、Ile 211、Gly 212、Lys 213、Arg 215、Lys 232、Gln 233、Leu 236及びLys 240からなる群から選択される1つ又は複数のアミノ酸残基を含むKPI-3エピトープに結合することが可能である、態様6～10のいずれか1つに記載の二重特異的抗体。  
。
12. 配列番号1のアミノ酸残基Ile 211、Lys 213及び/又はArg 215を含むKPI-3エピトープに結合することが可能である、態様11に記載の二重特異的抗体。  
。
13. 組織因子系凝固インヒビター(TFPI)に特異的に結合することが可能であり、配列番号1のLeu 16、Pro 17、Leu 19、Lys 20、Leu 21、Met 22、Phe 25、Cys 35、Ala 37、Met 39、Arg 41、Tyr 56、Gly 57、Gly 58、Cys 59、Glu 60、Gly 61、Asn 62、Gln 63、Arg 65、Phe 66、Glu 67、Glu 71及びMet 75からなる群から選択される1つ又は複数のアミノ酸残基を含むKPI-1エピトープ;並びに配列番号1のTyr 207、Asn 208、Ser 209、Val 210、Ile 211、Gly 212、Lys 213、Arg 215、Lys 232、Gln 233、Leu 236及びLys 240からなる群から選択される1つ又は複数のアミノ酸残基を含むKPI-3エピトープに結合することが可能である、態様6～8のいずれか1つに記載の二重特異的抗体。  
40
14. 組織因子系凝固インヒビター(TFPI)に特異的に結合することが可能であり、配列番号1のGlu 100、Glu 101、Asp 102、Pro 103、Arg 107、Tyr 109、Thr 111、Tyr 113、Phe 114、Asn 116、Gln 118、Gln 121、Cys 122、Glu 123、Arg 124、Phe 125、Lys 126及びLeu 140からなる群から選択される1つ又は複数のアミノ酸残基を含むKPI-2エピトープ;並びに配列番号1のTyr 207、Asn 208、Ser 209、Val 210、Ile 211、Gly 212、Lys 213、Arg 50

215、Lys 232、Gln 233、Leu 236及びLys 240からなる群から選択される1つ又は複数のアミノ酸残基を含むKPI-3エピトープに結合することが可能である、態様9～12のいずれか1つに記載の二重特異的抗体。

15. 配列番号3のアミノ酸残基99～110に対応するCDR3配列を含む重鎖；  
及び、

配列番号4のアミノ酸残基94～102に対応するCDR3配列を含む軽鎖；  
を含み、個々のCDR配列のアミノ酸残基の1つ又は2つは、異なるアミノ酸によって保存的に置換されてもよい、態様6に記載の二重特異的抗体。

16. 重鎖が、

配列番号3のアミノ酸残基31～35に対応するCDR1配列；並びに 10

配列番号3又は配列番号5及び配列番号7からなる群から選択される配列のアミノ酸残基50～66に対応するCDR2配列；

を更に含み、軽鎖が：

配列番号4のアミノ酸残基24～39に対応するCDR1配列；並びに

配列番号4のアミノ酸残基55～61に対応するCDR2配列；  
を更に含み、個々のCDR配列のアミノ酸残基の1つ又は2つは、異なるアミノ酸によって保存的に置換されてもよい、態様15に記載の二重特異的抗体。

17. 配列番号9のアミノ酸残基99～107に対応するCDR3配列を含む重鎖；  
及び、

配列番号10のアミノ酸残基89～97に対応するCDR3配列を含む軽鎖； 20  
を含み、個々のCDR配列のアミノ酸残基の1つ又は2つは、異なるアミノ酸によって保存的に置換されてもよい、態様6に記載の抗体。

18. 重鎖が、

配列番号9のアミノ酸残基31～35に対応するCDR1配列；並びに

配列番号9のアミノ酸残基50～66に対応するCDR2配列；

を更に含み、軽鎖が、

配列番号10のアミノ酸残基24～34に対応するCDR1配列；

配列番号10のアミノ酸残基50～56に対応するCDR2配列；

を更に含み、個々のCDR配列のアミノ酸残基の1つ又は2つは、異なるアミノ酸によって保存的に置換されてもよい、態様17に記載の二重特異的抗体。 30

19. 配列番号11のアミノ酸残基99～106に対応するCDR3配列を含む重鎖；  
及び、

配列番号12のアミノ酸残基88～96に対応するCDR3配列を含む軽鎖；  
を含み、個々のCDR配列のアミノ酸残基の1つ又は2つは、異なるアミノ酸によって保存的に置換されてもよい、態様6に記載の二重特異的抗体。

20. 重鎖が、

配列番号11のアミノ酸残基31～35に対応するCDR1配列；並びに

配列番号11のアミノ酸残基50～66に対応するCDR2配列；

を更に含み、軽鎖が、

配列番号12のアミノ酸残基24～33に対応するCDR1配列；並びに 40

配列番号12のアミノ酸残基49～55に対応するCDR2配列；

を更に含み、個々のCDR配列のアミノ酸残基の1つ又は2つは、異なるアミノ酸によって保存的に置換されてもよい、態様19に記載の二重特異的抗体。

21. 配列番号13のアミノ酸残基99～111に対応するCDR3配列を含む重鎖；  
及び、

配列番号14のアミノ酸残基93～101に対応するCDR3配列を含む軽鎖；  
を含み、個々のCDR配列のアミノ酸残基の1つ又は2つは、異なるアミノ酸によって保存的に置換されてもよい、態様6に記載の二重特異的抗体。

22. 重鎖が、

配列番号13のアミノ酸残基31～35に対応するCDR1配列；並びに 50

配列番号13のアミノ酸残基50～66に対応するCDR2配列；

を更に含み、軽鎖が、

配列番号14のアミノ酸残基24～38に対応するCDR1配列；並びに

配列番号14のアミノ酸残基54～60に対応するCDR2配列；

を更に含み、個々のCDR配列のアミノ酸残基の1つ又は2つは、異なるアミノ酸によって保存的に置換されてもよい、態様21に記載の二重特異的抗体。

23. 配列番号15のアミノ酸残基99～106に対応するCDR3配列を含む重鎖；

及び、

配列番号16のアミノ酸残基89～97に対応するCDR3配列を含む軽鎖；

を含み、個々のCDR配列のアミノ酸残基の1つ又は2つは、異なるアミノ酸によって保存的に置換されてもよい、態様6に記載の二重特異的抗体。 10

24. 重鎖が、

配列番号15のアミノ酸残基31～35に対応するCDR1配列；並びに

配列番号15のアミノ酸残基50～66に対応するCDR2配列；

を更に含み、軽鎖が

配列番号16のアミノ酸残基24～34に対応するCDR1配列；並びに

配列番号16のアミノ酸残基50～56に対応するCDR2配列；

を更に含み、個々のCDR配列のアミノ酸残基の1つ又は2つは、異なるアミノ酸によって保存的に置換されてもよい、態様23に記載の二重特異的抗体。

25. 配列番号26のアミノ酸残基98～110に対応するCDR3配列を含む重鎖； 20

及び、

配列番号27のアミノ酸残基89～96に対応するCDR3配列を含む軽鎖；

を含み、個々のCDR配列のアミノ酸残基の1つ又は2つは、異なるアミノ酸によって保存的に置換されてもよい、態様6に記載の二重特異的抗体。

26. 重鎖が、

配列番号26のアミノ酸残基31～35に対応するCDR1配列；並びに

配列番号26のアミノ酸残基50～65に対応するCDR2配列；

を更に含み、軽鎖が、

配列番号27のアミノ酸残基24～34に対応するCDR1配列；並びに

配列番号27のアミノ酸残基50～56に対応するCDR2配列； 30

を更に含み、個々のCDR配列のアミノ酸残基の1つ又は2つは、異なるアミノ酸によって保存的に置換されてもよい、態様25に記載の二重特異的抗体。

27. 完全長抗体フォーマットの形である、態様6に記載の二重特異的抗体。

28. Fab-Fabコンジュゲート又は融合タンパク質である、態様6～31のいずれか1つに記載の二重特異的抗体。

29. 第1のFab及び第2のFabを含み、第1のFabは第1の重鎖(HC)及び第1の軽鎖(LC)を含み、第1の重鎖は、

配列番号3のアミノ酸残基31～35に対応するCDR1配列；

配列番号3又は配列番号5及び配列番号7からなる群から選択される配列のアミノ酸残基5 40  
0～66に対応するCDR2配列；並びに

配列番号3のアミノ酸残基99～110に対応するCDR3配列；

を含み、第1の軽鎖(LC)は、

配列番号4のアミノ酸残基24～39に対応するCDR1配列；

配列番号4のアミノ酸残基55～61に対応するCDR2配列；並びに

配列番号4のアミノ酸残基94～102に対応するCDR3配列；

を含み、第2のFabは第2の重鎖及び第2の軽鎖を含み、第2の重鎖(HC)は、

配列番号9のアミノ酸残基31～35に対応するCDR1配列；

配列番号9のアミノ酸残基50～66に対応するCDR2配列；並びに

配列番号9のアミノ酸残基99～107に対応するCDR3配列；

を含み、第2の軽鎖(LC)は、 50

配列番号10のアミノ酸残基24～34に対応するCDR1配列；

配列番号10のアミノ酸残基50～56に対応するCDR2配列；並びに

配列番号10のアミノ酸残基89～97に対応するCDR3配列；

を含み、個々のCDR配列のアミノ酸残基の1つ又は2つは、異なるアミノ酸によって保存的に置換されてもよい、態様28に記載のFab-Fabコンジュゲート。

30. 第1のFab及び第2のFabを含み、第1のFab断片は第1の重鎖(HC)及び第1の軽鎖(LC)を含み、第1の重鎖は、

配列番号26のアミノ酸残基31～35に対応するCDR1配列；

配列番号26のアミノ酸残基50～65に対応するCDR2配列；及び

配列番号26のアミノ酸残基98～110に対応するCDR3配列；

を含み、第1の軽鎖(LC)は、

配列番号27のアミノ酸残基24～34に対応するCDR1配列；

配列番号27のアミノ酸残基50～56に対応するCDR2配列；及び

配列番号27のアミノ酸残基89～96に対応するCDR3配列；

を含み、第2のFab断片は第2の重鎖及び第2の軽鎖を含み、第2の重鎖(HC)は、

配列番号9のアミノ酸残基31～35に対応するCDR1配列；

配列番号9のアミノ酸残基50～66に対応するCDR2配列；及び

配列番号9のアミノ酸残基99～107に対応するCDR3配列；

を含み、第2の軽鎖(LC)は、

配列番号10のアミノ酸残基24～34に対応するCDR1配列；

配列番号10のアミノ酸残基50～56に対応するCDR2配列；及び

配列番号10のアミノ酸残基89～97に対応するCDR3配列；

を含み、個々のCDR配列のアミノ酸残基の1つ又は2つは、異なるアミノ酸によって保存的に置換されてもよい、態様29に記載のFab-Fabコンジュゲート。

31. ヒト化される、態様1～30のいずれか1つに記載の多重特異的又は二重特異的抗体。

32. 第1の単一特異的抗体及び第2の単一特異的抗体を含む医薬組成物であって、第1の単一特異的抗体は、配列番号1の組織因子系凝固インヒビター(TFPI)アミノ酸残基1～181の中のエピトープに特異的に結合することが可能であり；

第2の単一特異的抗体は、配列番号1のTFPIアミノ酸残基182～276の中のエピトープに特異的に結合することが可能である、医薬組成物。

33. 第1の抗体のエピトープが組織因子系凝固インヒビター(TFPI)のKPI-1ドメイン又はTFPIのKPI-2ドメインの中のアミノ酸残基を含み、第2の抗体のエピトープがTFPIのKPI-3ドメインの中のアミノ酸残基を含む、態様32に記載の医薬組成物。

34. 第1の単一特異的抗体が、

配列番号26のアミノ酸残基98～110に対応するCDR3配列を含む重鎖(HC)；  
及び、

配列番号27のアミノ酸残基89～96に対応するCDR3配列を含む軽鎖(LC)；

を含み、個々のCDR配列のアミノ酸残基の1つ又は2つは、異なるアミノ酸によって保存的に置換されてもよい、態様33に記載の医薬組成物。

35. 第2の単一特異的抗体が、

配列番号9のアミノ酸残基99～107に対応するCDR3配列を含む重鎖(HC)；  
及び、

配列番号10のアミノ酸残基89～97に対応するCDR3配列を含む軽鎖(LC)；

を含み、個々のCDR配列のアミノ酸残基の1つ又は2つは、異なるアミノ酸によって保存的に置換されてもよい、態様33に記載の医薬組成物。

36. 第2の単一特異的抗体が、

配列番号9のアミノ酸残基31～35に対応するCDR1配列；及び

配列番号9のアミノ酸残基50～66に対応するCDR2配列；

を更に含む重鎖(HC)を含み、第2の単一特異的抗体が、

配列番号10のアミノ酸残基24～34に対応するCDR1配列；及び

10

20

30

40

50

配列番号10のアミノ酸残基50～56に対応するCDR2配列；  
を更に含む軽鎖(LC)を含み、個々のCDR配列のアミノ酸残基の1つ又は2つは、異なるアミノ酸によって保存的に置換されてもよい、態様35に記載の医薬組成物。

37. 前の態様のいずれか1つに記載の单一特異的抗体の組合せを含む多重特異的若しくは二重特異的抗体又は医薬組成物と競合する单一特異的抗体を含む多重特異的若しくは二重特異的抗体又は医薬組成物。

38. 態様1～31のいずれか1つに記載の多重特異的又は二重特異的抗体を含む医薬組成物。

39. 医薬として用いるための、態様1～31又は37のいずれか1つに記載の多重特異的若しくは二重特異的抗体、又は態様32～37のいずれか1つに記載の单一特異的抗体の組合せを含む医薬組成物。

10

40. 凝固障害の処置で用いるための、態様1～19又は37のいずれか1つに記載の多重特異的若しくは二重特異的抗体、又は態様32又は37のいずれか1つに記載の单一特異的抗体の組合せを含む医薬組成物。

41. 態様1～31のいずれか1つに記載の二重特異的抗体又はその断片を発現する真核生物細胞。

42. *in vitro*でTFPI レベルを測定するための、態様6～31のいずれか1つに記載の二重特異的抗体の使用。

43. 循環TFPI を選択的に標的にする、態様1～37のいずれか1つに記載の二重特異的抗体。

#### 【実施例】

20

#### 【0208】

##### (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断片、例えば配列番号1の残基1～161に対応するもので免疫化した。マウスは皮下注射した：最初の注射のために、20 μgのヒトTFPIを完全フロイントアジュバントと混合した。以降の免疫化のために、不完全フロイントアジュバントを同じ濃度の抗原と使用した。最終免疫化の10日後に、ヒトTFPI特異的抗体のために、ELISAを使用してマウスからの眼血をスクリーニングした。静脈内注射によって陽性血清力値のマウスを10 μgのヒト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、単一細胞懸濁液に分散させた。PEG方法又は電気融合によって、脾細胞及び骨髄腫細胞の融合を実行した。生じたハイブリドーマ細胞を限界希釈によってクローニングし、マイクロタイタープレートに入れた。完全長TFPI 又はTFPI断片に結合することが可能な抗体の発現について、個々のハイブリドーマからの上清を先ずELISAでスクリーニングした。

30

#### 【0209】

標準のプロテインA親和性クロマトグラフィーによって抗体を上清から精製し、ヒトTFPIへの結合及び親和性並びに血漿でのTFPI中和活性を判定するために使用した(希釈プロトロンビン時間)。対象の抗体を生成するハイブリドーマを限界希釈によってサブクローニングし、サブクローニングしたハイブリドーマからの材料のために元の抗体プロファイルを検証した。サブクローニングしたハイブリドーマからの細胞は、RNAの単離並びに以降の抗体クローニング及び配列同定のために使用した。

40

#### 【0210】

##### (実施例2)

マウスの抗TFPI KPI-3/C末端特異的mAb、TFPI4F110、TFPI22F66及びTFPI22F71のクローニング及び配列決定

TFPI抗体のマウス重鎖及び軽鎖配列: WO2012/001087に記載の通りに、TFPI4F110、TFPI22F66及びTFPI22F71をクローニングし、配列決定をした。

#### 【0211】

Qiagen社からのRNeasy-Miniキットを用いて全RNAをハイブリドーマ細胞から抽出し、cDNA合成のための錆型として使用した。Clontech社からのSMART(商標)RACE cDNA増幅キット

50

を用いて、5'-RACE反応でcDNAを合成した。Phusion Hot Startポリメラーゼ(Finnzymes社)及びフォワードプライマーとしてSMART(商標)RACEキットに含まれる汎用プライマーミックス(UPM)を用いて、HC及びLC配列の以降の標的增幅をPCRによって実施した。HC(VHドメイン)增幅のために、以下の配列のリバースプライマーを使用した：

5'-CTTGCCATTGAGCCAGTCCTGGTCATGATGG-3' (配列番号17)

【0212】

TFPI22F66及びTFPI22F71 LC(VLドメイン)增幅のために、以下の配列のリバースプライマーを使用した：

5'-GTTGTTCAAGAACGACACGACTG-3' (配列番号18)

【0213】

TFPI4F110 LC增幅のために、以下の配列のリバースプライマーを使用した：

5'-GCTCTAGACTAACACTCATTCCCTGTTGAAGCTCTTG-3' (配列番号19)

【0214】

ゲル電気泳動によってPCR生成物を分離し、GE Healthcare Bio-Sciences社からのGFX PCR DNA & Gel Band Purificationキットを用いて抽出し、Zero Blunt TOPO PCR Cloningキット及び化学的にコンピテントなTOP10大腸菌(E. coli)(Invitrogen社)を用いて配列決定のためにクローニングした。Applied Biosystems社からのAmpliTaq Gold Master Mix及びM13uni/M13revプライマーを用いて、選択したコロニーの上でコロニーPCRを実施した。コロニーPCRのクリーンアップは、ExoSAP-IT酵素ミックス(USB社)を使用して実施した。配列決定は、M13uni(-21)/M13rev(-29)配列決定プライマーを用いて、Eurofins MWG Operon, Germanyで実施した。VectorNTIプログラムを用いて配列を分析し、注釈を付けた。全てのキット及び試薬は、製造業者の指示に従って使用した。

【0215】

ハイブリドーマTFPI4F110、TFPI22F66及びTFPI22F71の各々について、単一の特異なマウスカッパ型LC及び単一の特異なマウスHC、サブクラスIgG1を同定した。アミノ酸配列は、配列表で提供する。リーダーペプチド配列は、含まれない。

【0216】

(実施例3)

マウス抗TFPI KPI-3/C末端特異的mAb 22F74、41F41、41F30、22F132、22F79のクローニング及び配列決定並びにマウス抗TFPI KPI-1 mAb 2F3、2F22、2F45、1F91及び2F35のクローニング及び配列決定。

抗TFPI抗体のマウス重鎖及び軽鎖配列は、以下の通りにクローニングし、配列決定をした。

【0217】

Qiagen社からのRNeasy-Miniキットを用いて全RNAをハイブリドーマ細胞から抽出し、cDNA合成のための鑄型として使用した。Clontech社からのSMART(商標)又はSMARTer(商標) RACE cDNA増幅キットを用いて、5'-RACE反応でcDNAを合成した。Phusion Hot Startポリメラーゼ(Finnzymes社)及びフォワードプライマーとしてSMART(商標)/SMARTer(商標) RACEキットに含まれる汎用プライマーミックス(UPM)を用いて、HC及びLC配列の以降の標的增幅をPCRによって実施した。HC(VHドメイン)增幅のために、以下の配列のリバースプライマーを使用した：

5'-CCCTTGACCAGGCATCCCAG-3' (配列番号20)

【0218】

LC増幅のために、以下の配列のリバースプライマーを使用した：

5'-GCTCTAGACTAACACTCATTCCCTGTTGAAGCTCTTG-3' (配列番号21)

【0219】

ゲル電気泳動によってPCR生成物を分離し、GE Healthcare Bio-Sciences社からのGFX PCR DNA & Gel Band Purificationキットを用いて抽出し、Zero Blunt TOPO PCR Cloningキット及び化学的にコンピテントなTOP10大腸菌(Invitrogen社)を用いて配列決定のためにクローニングした。Applied Biosystems社からのAmpliTaq Gold Master Mix及びM13uni

10

20

30

40

50

/M13revプライマーを用いて、選択したコロニーの上でコロニーPCRを実施した。コロニーPCRのクリーンアップは、ExoSAP-IT酵素ミックス(USB社)を使用して実施した。配列決定は、M13uni(-21)/M13rev(-29)配列決定プライマーを用いて、Eurofins MWG Operon、Germanyで実施した。VectorNTIプログラムを用いて配列を分析し、注釈を付けた。全てのキット及び試薬は、製造業者の指示に従って使用した。

【0220】

単一の特異なマウスカッパ型LC及び単一の特異なマウスIgG HC、サブクラスを、各ハイブリドーマについて同定した。アミノ酸配列は、配列表で提供する。リーダーペプチド配列は、含まれない。

【0221】

(実施例4)

mAb 2021及びmAb 2021変異体のクローニング及び操作

この実施例は、抗TFPI抗体mAb2021及びその変異体のクローニング及び操作を記載する。

【0222】

Qiagen社からのRNeasy-Miniキットを用いて全RNAをM-hTFPI 4F36A1B2ハイブリドーマ細胞から抽出し、cDNA合成のための錫型として使用した。Clontech社からのSMART(商標) RA CE cDNA増幅キットを用いて、5'-RACE反応でcDNAを合成した。Phusion Hot Startポリメラーゼ(Finnzymes社)及びフォワードプライマーとしてSMART(商標) RACEキットに含まれる汎用プライマーミックス(UPM)を用いて、HC及びLC配列の以降の標的増幅をPCRによって実施した。HC(VHドメイン)増幅のために、以下の配列のリバースプライマーを使用した：

5'-CCCTTGACCAGGCATCCCAG-3' (配列番号20)

【0223】

LC増幅のために、以下の配列のリバースプライマーを使用した：

5'-GCTCTAGACTAACACTCATTCTGTTGAAGCTCTTG-3' (配列番号21)

【0224】

ゲル電気泳動によってPCR生成物を分離し、GE Healthcare Bio-Sciences社からのGFX PCR DNA & Gel Band Purificationキットを用いて抽出し、Zero Blunt TOPO PCR Cloningキット及び化学的にコンピテントなTOP10大腸菌(Invitrogen社)を用いて配列決定のためにクローニングした。Applied Biosystems社からのAmpliTaq Gold Master Mix及びM13uni/M13revプライマーを用いて、選択したコロニーの上でコロニーPCRを実施した。コロニーPCRのクリーンアップは、ExoSAP-IT酵素ミックス(USB社)を使用して実施した。配列決定は、M13uni(-21)/M13rev(-29)又はT3/T7配列決定プライマーを用いて、Eurofins MWG Operon、Germanyで実施した。VectorNTIプログラムを用いて配列を分析し、注釈を付けた。全てのキット及び試薬は、製造業者の指示に従って使用した。

【0225】

単一の特異なマウスカッパ型LC及び単一の特異なマウスHC、サブクラスIgG1を同定した。

【0226】

移植された抗HzTFPI4F36A1B2のための発現ベクターの生成

Yves Durocher(DurocherらNucleic Acid Research、2002)によって開発されたHEK293-6E EBNAをベースとした発現系での抗TFPI抗体/抗体断片の一時的発現のために、一連のCMVプロモータをベースとした発現ベクター(pTTベクター)を生成した。CMVプロモータに加えて、pTTをベースとしたベクターは、pMB1起点、EBV起点及びAmp耐性遺伝子を有する。

【0227】

クローンマウス抗TFPI4F36A1B2のVH及びVL配列に基づいて、抗TFPI4F36のヒト化バージョンをヒト生殖細胞系配列へのCDR移植によって設計した。移植されるHzTFPI4F36のVH及びVL領域のためのDNA配列を、上記の抗体のヒト化設計に従って合成した(GENEART社)。基本的な最小限CDR移植により、追加の復帰突然変異なしで配列を得た。構築物は、LC及びHCそれぞれの生殖細胞系リーダーペプチド配列、並びにATG開始コドンの直ぐ上流にKozak

10

20

30

40

50

配列(5'-GCCGCCACC-3')を含んだ。

【0228】

ヒトカッパ/IgG4(S241P)アイソタイプとしての移植されるTFPI4F36抗体の一時的発現のために、pTTをベースとした発現ベクターを生成した。単量体の抗体断片、すなわち1つのLC及び1つのHCで構成される「半抗体」の形成を排除するために、241位のプロリン突然変異(Kabatによる番号付け、EU番号付け系(Edelman G.M.ら、Proc. Natl. Acad. USA 63、78～85頁(1969)による残基228に対応する)をIgG4ヒンジ領域に導入した。

【0229】

VH断片をGENEARTクローニングベクターから切除し、ヒトIgG4(S241P) CHドメインの配列を有する線状化したpTTをベースとした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転換した。最終構築物の配列は、DNA配列決定によって検証した。VL断片をGENEARTクローニングベクターから切除し、ヒトカッパCLドメインの配列を有する線状化したpTTをベースとした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転換した。最終構築物の配列は、DNA配列決定によって検証した。

【0230】

mAb 2021を単離するための部位特異的突然変異誘発

移植されるHzTFPI4F36の軽鎖(LC)及び重鎖(HC)で、一連のヒトからマウスへの逆突然変異(復帰突然変異と呼ぶ)を生成した。

【0231】

移植される構築物を最適化するために、移植されるHzTFPI4F36 LC/HC構築物の特定の残基にヒトからマウスへの逆突然変異(以後、復帰突然変異と呼ぶ)を導入するために、部位特異的突然変異誘発を実施した。突然変異は、2つの異なる方法によって導入した：

- 1.点突然変異及び組合せ突然変異を導入するために、Stratagene社からのQuikChange(登録商標) Site-Directed又はMulti Site-Directed Mutagenesisキットを使用した。キットは、製造業者のプロトコルに従って用いた。
- 2.点突然変異を導入するために、及び組合せ突然変異を生成するために、標準的な2ステップ重複PCR方法も使用した。

【0232】

移植されるHzTFPI4F36のためのLC及びHC発現プラスミドを、突然変異誘発のための鋳型として使用した。全ての最終構築物の配列は、DNA配列決定によって検証した。

【0233】

mAb 2021 HCのための最終配列は、フレームワーク配列を元のマウスFR2と同一にする4つの復帰突然変異を有するFR2領域及び3つのCDR2突然変異体、すなわち元の移植された配列と比較して合計7つのHC復帰突然変異(A40T、G42E、G44R、S49A、Y59F、A60P、K64Q)を有する(Kabatによる番号付け)。LC配列は、移植されるHzTFPI4F36 LC配列である。CDR及びフレームワークは、Kabatに従って規定された。

【0234】

最終mAb 2021のHC及びLCのためのアミノ酸配列は、それぞれ配列番号50及び配列番号51で掲載する。

【0235】

発現収率を向上させるために、HC及びLCのための元のシグナルペプチド配列(ヒト生殖細胞系配列)を、ヒトCD33シグナルペプチド(SP)と交換した。Kozakエレメント(GCCGCCACC)、開始コドン及びCD33シグナル配列(センスプライマー)及び終止コドン及びEcoRI制限部位(アンチセンスプライマー)を含有するプライマーによるHC又はLC断片の標準のPCR増幅によって、シグナルペプチド配列を交換した。増幅した断片を線状化したpTTをベースとしたベクターにクローニングし、選択のために大腸菌に転換した。最終構築物の配列は、DNA配列決定によって検証した。

【0236】

mAb 2021のより低い親和性の変異体の生成

mAb 2021を得るための抗TFPI4F36A1B2のヒト化の過程で、いくつかのより低い親和性の

10

20

30

40

50

変異体が同定された。変異体は、上記の通り部位特異的突然変異誘発によって生成された。mAb 2007及びmAb 2014は、そのようなより低い親和性の変異体の2つであった。mAb 2007は、移植されたHzTFPI4F36の配列と比較してVHドメインに単一のA60P復帰突然変異を有する(Kabatによる番号付け)。移植されるHzTFPI4F36のための配列と比較して、mAb 2014はVLドメインに4つの復帰突然変異(Y36L、K39R、Q42E、Q45K)を有するFR2領域を有し、フレームワーク配列を元のマウスFR2に同一にする(Kabatによる番号付け)。mAb 2014の重鎖は、移植されるHzTFPI4F36に対応する。2つの変異体は、mAb 2021と比較して、それぞれ少なくとも1桁又は2桁低いTFPI結合親和性を有する。最初の移植されたHzTFPI4F36変異体(mAb 2000)は、mAb 2021と比較しておよそ3桁低いTFPI結合性親和性を示した。

【0237】

10

mAb 2021及びmAb 2021変異体のFab断片の発現のための発現ベクターは、実施例6に記載されている通りに生成した。mAb 2021のHC配列、配列番号50の227位に対応するシステインの後のヒンジ領域で、IgG4をベースとしたHCをトランケーションした。トランケーションは、化学的コンジュゲーションに利用可能なC末端システインを残す。上記のmAb 2021のLCベクター及びトランケーションしたmAb 2007のHCベクターを用いて、mAb 2007のFab断片をFab 0094として発現させた。上記のmAb 2014のLCベクター及びトランケーションしたmAb 2014のHCベクターを用いて、mAb 2014のFab断片をFab 0095として発現させた。移植したHzTFPI4F36のmAb 2021のLCベクター及びトランケーションしたHCを用いて、mAb 2000のFab断片をFab 0313として発現させた。

【0238】

20

(実施例5)

マウス/ヒトキメラTFPI4F110、TFPI22F66、TFPI22F71、TFPI2F22 mAbのための発現ベクターの生成

Yves Durocher(DurocherらNucleic Acid Research、2002)によって開発されたHEK293-6E EBNAをベースとした発現系、又はInvitrogen社からのEXPI293F系でのマウス/ヒトキメラ抗TFPI抗体/抗体断片の一時的発現のために、一連のCMVプロモータをベースとした発現ベクター(pTTベクター)を生成した。CMVプロモータに加えて、pTTをベースとしたベクターは、pMB1起点、EBV起点及びAmp耐性遺伝子を有する。実施例7に記載の通り、LC及びHC発現ベクターの同時トランスフェクションによって、Fab断片を含む抗TFPI抗体変異体をHEK293-6E又はEXPI293F細胞で一時的に発現させた。キメラ抗TFPI mAb及びFab断片の一時的発現のために、pTTをベースとしたLC発現ベクターを生成した。最初に、N及びC末端配列に特異的なプライマーを用いて、元のTOPO配列決定クローンからTFPI4F110、TFPI22F66、TFPI22F71又はTFPI2F22のVLドメインに対応する領域を2ステップ反応でPCR增幅させた。2ステップ重複PCRによって、元のマウスシグナルペプチドをヒトCD33シグナルペプチドに交換した。一次センスプライマーはCD33シグナルペプチド配列のC末端部分を有し、二次センスプライマーはクローニング目的のためのHindIII制限部位、ATG開始コドンの直ぐ上游のKozak配列(5'-GCCGCCACC-3')、及びCD33シグナルペプチド配列のN末端部分を有した。アンチセンスプライマーは、VL/CL移行配列にインフレームBsiWI制限部位を有した。

30

【0239】

ヒトカッパCLドメインの配列を有する線状化したpTTをベースとしたベクターに増幅した断片をクローニングし、その後選択のために大腸菌に転換した。最終構築物の配列は、DNA配列決定によって検証した。

40

【0240】

キメラ抗TFPI mAbの一時的発現のために、pTTをベースとしたHC発現ベクターを生成した。最初に、N及びC末端配列に特異的なプライマーを用いて、元のTOPO配列決定クローンからTFPI4F110、TFPI22F66、TFPI22F71又はTFPI2F22のVHドメインに対応する領域を2ステップ反応でPCR增幅させた。2ステップ重複PCRによって、元のマウスシグナルペプチドをヒトCD33シグナルペプチドに交換した。一次センスプライマーはCD33シグナルペプチド配列のC末端部分を有し、二次センスプライマーはクローニング目的のためのHindIII制限部位、ATG開始コドンの直ぐ上游のKozak配列(5'-GCCGCCACC-3')、及びCD33シグナルペプチド配列のN末端部分を有した。

50

ド配列のN末端部分を有した。アンチセンスプライマーは、VH/CH移行部にインフレームNheI制限部位を有した。

【0241】

生成したVHドメインPCR断片を制限消化し、操作したヒトIgG4(S241P) CHドメインの配列を有する線状化したpTTをベースとした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転換した。単量体の抗体断片、すなわち1つのLC及び1つのHCで構成される「半抗体」の形成を排除するために、IgG4ヒンジ領域の241位のプロリン突然変異(Kabatによる番号付け、EU番号付け系(Edelman G.M.ら、Proc. Natl. Acad. USA 63、78～85頁(1969))による残基228に対応する)を導入した。最終構築物の配列は、DNA配列決定によって検証した。

10

【0242】

TFPI4F110のLC及びHCベクターを用いて、TFPI4F110のキメラバージョンをmAb 4F110として組換えて発現させた。

【0243】

TFPI22F66のLC及びHCベクターを用いて、TFPI22F66のキメラバージョンをmAb 22F66として組換えて発現させた。

【0244】

TFPI22F71のLC及びHCベクターを用いて、TFPI22F71のキメラバージョンをmAb 22F71として組換えて発現させた。

【0245】

TFPI2F22のLC及びHCベクターを用いて、TFPI2F22のキメラバージョンをmAb 2F22として組換えて発現させた。

20

【0246】

(実施例6)

二重特異的分子のためのFab成分

Fab-Fab化学的コンジュゲートのために適するFab断片を生成するために、トランケーションされたmAb 4F110 HCの発現のための発現ベクターを生成した。ヒトIgG4定常領域の227位のシステインの後のヒンジ領域に対応するものにおいて、mAb 4F110のIgG4をベースとしたHCをトランケーションした(配列番号50による番号付け)。トランケーションは、化学的コンジュゲーションに利用可能なC末端システインを残す。Stratagene社からのQuikChange (登録商標) Site-Directed突然変異誘発キットを用いて、部位特異的突然変異誘発によってシステイン残基の後に終止コドンを導入することによって、トランケーションされた配列を生成した。最終構築物の配列は、DNA配列決定によって検証した。上記のmAb 4F110 LCベクター及びトランケーションされたHCベクター(配列番号9及び配列番号10)を用いて、mAb 4F110のFab断片をFab 0089として発現させた。

30

【0247】

Fab-Fab化学的コンジュゲートのために、トランケーションされたmAb 2021 HCの発現のための発現ベクターも生成した。mAb 2021のクローニング、ヒト化及び発現はWO2010/072691に記載され、それはここに参照により組み込まれる。mAb 2021 HCのヒトIgG4定常領域、配列番号50の227位のシステインの後のヒンジ領域において、mAb 2021のIgG4をベースとしたHCをトランケーションした。トランケーションは、化学的コンジュゲーションに利用可能なC末端システインを残す。Stratagene社からのQuikChange (登録商標) Site-Directed突然変異誘発キットを用いて、部位特異的突然変異誘発によってシステイン残基の後に終止コドンを導入することによって、トランケーションされた配列を生成した。全ての最終構築物の配列は、DNA配列決定によって検証した。上記のmAb 2021 LCベクター及びトランケーションされたHCベクター(配列番号3及び配列番号4)を用いて、mAb 2021のFab断片をFab 0088として発現させた。

40

【0248】

mAb 2021のより低い親和性の変異体の発現のための重鎖発現ベクターも生成した。mAb 2021変異体はmAb 2021のヒト化に由来し、WO2010/072691に記載される。mAb 2021 HCのヒ

50

ト IgG4 定常領域、配列番号50の227位に対応するシステインの後のヒンジ領域において、IgG4をベースとしたHCをトランケーションした。トランケーションは、化学的コンジュゲーションに利用可能なC末端システインを残す。発現ベクターを組み立てるために、標準の制限酵素をベースとしたクローニングを用いて、実施例4に記載されるmAb 2000、mAb2007及びmAb2014のHCのVHドメインに対応する領域を、トランケーションされたヒト IgG4 CHドメインの配列を有する線状化したpTTをベースとしたツールボックスベクターにクローニングした。上記の通り227位のシステインの後のヒンジ領域で、IgG4をベースとしたHCをトランケーションした。最終構築物の配列は、DNA配列決定によって検証した。mAb2007、mAb 20014及びmAb 2000のより低い親和性のFab断片は、それぞれFab 0094(配列番号5及び配列番号6)、Fab 0095(配列番号7及び配列番号8)及びFab 0313(配列番号58及び配列番号59)として発現させた。

## 【0249】

Fab 0094、0095、0313のためのトランケーションされたHC発現ベクターの生成のための上記の方法は、Fab 2F22(配列番号40及び配列番号41)等の本発明の他のFab断片の生成でも使用した。

## 【0250】

## (実施例7)

## mAb及びFabの発現及び精製

LC及びHC発現ベクターの同時トランスフェクションによって、Fab断片を含む抗TFPI抗体変異体をHEK293-6E細胞又はEXP1293F細胞の懸濁培養で一時に発現させた。以下の手順は、懸濁適合HEK293-6E細胞又はEXP1293F細胞のために使用される一般的なトランスフェクションプロトコルを記載する。

## 【0251】

## HEK293-6Eプロトコル

25 μg/mlジエネテシン(Gibco)、0.1v/v%の界面活性剤Pluronic F-68(Gibco)及び1v/v%のペニシリン-ストレプトマイシン(Gibco)を追加したFreeStyle(商標) 293発現培地(Gibco)において、HEK293-6E細胞を懸濁状態で成長させた。37℃、8% CO<sub>2</sub>及び125rpmで細胞を振盪インキュベーター中のエルレンマイヤー振盪フラスコで培養し、細胞数0.1~1.5×10<sup>6</sup>/mlの細胞密度に維持した。

## 【0252】

## HEK293-6Eトランスフェクション

- トランスフェクションのために使用する培養の細胞密度は、細胞数0.9~2.0×10<sup>6</sup>/mlであった。

- 1mlの細胞培養につき0.5 μg LCベクターDNA+0.5 μg HCベクターDNAの混合物を使用した。

- DNAをOpti-MEM培地(Gibco)に30 μl培地/μg DNAで希釈し、混合し、5分の間室温(23~25℃)でインキュベートした。

- 293Fectin (商標)(Invitrogen)を1 μgのDNAにつき1 μlの濃度でトランスフェクション試薬として使用した。

- 293Fectin (商標)をOpti-MEM培地(Gibco)に30×で希釈し、混合し、5分の間室温(23~25℃)でインキュベートした。

- DNA及び293Fectin溶液を混合し、25分間室温(23~25℃)に放置してインキュベートさせた。

- 次に、DNA-293Fectin混合物を細胞培養へ直接加えた。

- トランスフェクション細胞培養を、37℃、8% CO<sub>2</sub>及び125rpmの振盪インキュベーターに移した。

- トランスフェクションの3~6日後、細胞培養上清を遠心分離によって収集し、続いて0.22 μmのPESフィルター(Corning社)で濾過した。

- ForteBio Octetシステム及びプロテインAバイオセンサー又は定量的プロテインA HPLCを用いて、清澄化細胞培養上清での直接のBiolayer干渉法によって抗体産生の定量分

10

20

30

40

50

析を実施した。

【0253】

EXPI293Fプロトコル

Expi293 (商標)発現培地(Life Technologies社)において、EXPI293F細胞を懸濁状態で増殖させた。36.5 、8% CO<sub>2</sub>及び85～125rpmで細胞をオービタル振盪インキュベーター中のエルレンマイヤー振盪フラスコで培養し、細胞数0.4～4×10<sup>6</sup>/mlの細胞密度に維持した。

【0254】

EXPI293Fトランスフェクション

1) DNA及びトランスフェクション試薬の別々の希釈溶液を最初に調製する。

10

a) 1mlの細胞培養につき合計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)に50μl培地/μg DNAで希釈し、混合し、5分の間室温(23～25 )で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につき2.7μlの濃度で使用する。Expifectamin (商標)溶液をOpti-MEM培地(Gibco社)に18.5×で希釈し、混合し、5分の間室温(23～25 )でインキュベートする。

2) DNA及びExpifectamin (商標)293希釈溶液を混合し、10分間室温(23～25 )に放置してインキュベートさせる。

3) DNA-Expifectamin (商標)293混合液を、EXPI293F細胞培養に直接加える。

a) トランスフェクションの時に、EXPI293F培養の細胞密度は、細胞数2.8～3.2×10<sup>6</sup>/mlであるべきである。

20

4) トランスフェクション細胞培養を、36.5 、8% CO<sub>2</sub>及び85～125rpmのオービタル振盪インキュベーターに移す。

5) トランスフェクションの18時間後、5μlの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のExpifectamin (商標) 293トランスフェクションエンハンサー2/ml培養を加え、36.5 、8% CO<sub>2</sub>及び85～125rpmのオービタル振盪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、細胞培養上清を遠心分離によって収集し、続いて0.22μmのPESフィルターユニット(Corning社)で濾過した。

【0255】

30

一般精製プロトコル

GE Healthcare社からのMabSelectSuRe樹脂を製造業者の指示に従って用いて、mAb変異体を標準の親和性クロマトグラフィーによって精製した。精製された抗体は、pH7.2のPBS緩衝液に緩衝液交換した。

【0256】

GE Healthcare社によって開発されたKappaSelect樹脂を用いて、Fab断片を標準の親和性クロマトグラフィーによって精製した。精製されたFab断片は、pH7.2のPBS緩衝液に緩衝液交換した。

【0257】

品質評価及び濃度判定は、SEC-HPLCによって実施した。

40

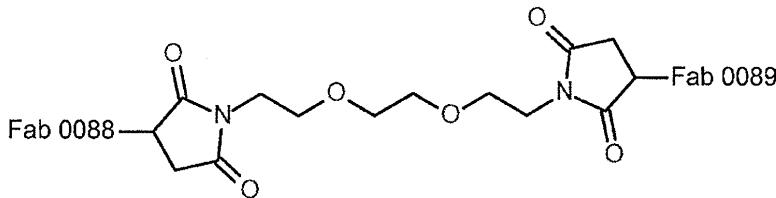
【0258】

(実施例8)

1,8-N,N'-ビス(マレイミド)-3,6-ジオキサオクタンによるFab 0088及びFab 0089のコンジュゲーション(ref. 9000)

【0259】

## 【化5】



## 【0260】

PBS緩衝液中のFab 0088(mAb 2021のFab断片)(5mg、3.92mg/ml、0.104mmol)を、トリス(3-スルホナートフェニル)ホスフィン水和物ナトリウム塩(3.2ml、10mg/ml、工業用(Alfa Aesar社#39538、CAS:63995-70-0)の溶液と混合した。反応液は、周囲温度で1時間30分の間放置した。Amicon超遠心濾過装置(5kDa MWCO、Millipore社)を用いて、混合液を50mM酢酸緩衝液(水酸化ナトリウムでpH5に調整した希酢酸；緩衝液A)に緩衝液交換した。あらかじめ調整したHiTrap SP HPカラム(GE Healthcare社)の上にタンパク質を固定化し、緩衝液Bが300mM塩化ナトリウムを含有する緩衝液Aであった勾配で溶出した。

## 【0261】

溶出したタンパク質(3ml、0.6mg)を1,8-N,N'-ビス(マレイミド)-3,6-ジオキサオクタン(Thermo Scientific社/Pierce社、製品番号22336;2ml緩衝液に6.2mg)の溶液と混合した。生じた混合液を周囲温度で2.5時間インキュベートした。Amicon超遠心濾過装置(5kDa MWCO、Millipore社)を用いて、混合液を50mM酢酸緩衝液(水酸化ナトリウムでpH5に調整した希酢酸；緩衝液A)に緩衝液交換した。あらかじめ調整したHiTrap SP HPカラム(GE Healthcare社)の上にタンパク質を固定化し、緩衝液Bが300mM塩化ナトリウムを含有する緩衝液Aであった勾配で溶出した。

## 【0262】

PBS緩衝液中のFab 0089 (mAb 4F110のFab断片)(5mg、3.58mg/ml、0.105mmol)を、トリス(3-スルホナートフェニル)ホスフィン水和物ナトリウム塩(3.2ml、10mg/ml、工業用(Alfa Aesar社#39538、CAS:63995-70-0)の溶液と混合した。

## 【0263】

反応液は、周囲温度で2時間15分の間放置した。Amicon超遠心濾過装置(5kDa MWCO、Millipore社)を用いて、混合液を50mM酢酸緩衝液(水酸化ナトリウムでpH5に調整した希酢酸；緩衝液A)に緩衝液交換した。あらかじめ調整したHiTrap SP HPカラム(GE Healthcare社)の上にタンパク質を固定化し、緩衝液Bが300mM塩化ナトリウムを含有する緩衝液Aであった勾配で溶出した。

## 【0264】

2つの溶液(Fab 0088、還元してリンカーに結合、4ml;Fab 0089、還元、4ml)を混合した。生じた混合液を周囲温度に一晩放置した。溶液を濃縮し、Akta FPLC機器を用いてSuperdex200 10/300 GLカラム(GE Healthcare社)に詰め、緩衝液(9.7mMヒスチジン、2.3mM CaCl<sub>2</sub>、308mM NaCl、8.8mMスクロース、0.01% Tween 80、pH7.0)で溶出した。単離した分画は、SDS-PAGE分析、分析的サイズ排除クロマトグラフィー及びエドマン配列決定によって分析した。

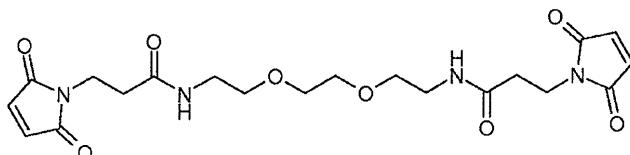
## 【0265】

(実施例9)

1,16-N,N'-ビス(マレイミド)-4,13-ジアザ-7,10-ジオキサ-3,14-ジオキソヘキサデカンの調製

## 【0266】

## 【化6】



## 【0267】

N-マレオイル- -アラニン(1.26g、7.4mmol)を、DCM(20ml)に溶解した。N,N'-ジイソブロピルカルボジイミド(1.15ml、7.4mmol)を加えた。混合液を30分間攪拌した。攪拌している溶液にDCM中の1,8-ジアミノ-3,6-ジオキサオクタンの溶液を60分間にわたって滴下添加した。混合液を1時間攪拌した。溶液は、減圧濃縮乾固させた。酢酸が多少存在する水/MeCN(2:1)に、未精製固体を懸濁させた。RP HPLC(水に0~50%のMeCN、0.1% TFA、C<sub>18</sub>カラム)を用いて混合液を精製した。生成物は、LCMS(ESI):451([M+H]<sup>+</sup>)及びNMRで特徴付けた。

10

## 【0268】

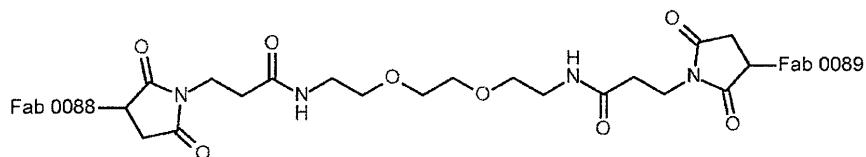
(実施例10)

1,16-N,N'-ビス(マレイミド)-4,13-ジアザ-7,10-ジオキサ-3,14-ジオキソヘキサデカンによるFab 0088及びFab 0089のコンジュゲーション(ref. 9002)

## 【0269】

20

## 【化7】



## 【0270】

Fab 0089(5mg、3.58mg/ml、1.42ml、104nmol)を25mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH7に緩衝液交換した。最終容量は、2000マイクロリットル(50マイクロモル、2.5mg/ml)であった。リン酸緩衝液中の溶液からのビス(p-スルホナートフェニル)フェニルホスフィン二水和物二カリウム塩を、200マイクロモルの最終濃度に加え(ビス(p-スルホナートフェニル)フェニルホスフィンニカリウムニ水和物塩、CAS:151888-20-9、Sigma-Aldrich社;2.24mg、4.19マイクロモル)、1mlの25mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH7、に溶解して、4.19mMの濃度にした(希釈係数:20.9)。95マイクロリットルをタンパク質溶液に加えた。(2000マイクロリットルの全容量)。

30

## 【0271】

1,16-N,N'-ビス(マレイミド)-4,13-ジアザ-7,10-ジオキサ-3,14-ジオキソヘキサデカン(5mg、11マイクロモル)を溶液に加えた。混合液を周囲温度で45分間インキュベートした。

40

## 【0272】

試料を、5mM酢酸緩衝液、pH5、で希釈した。試料をHiTrap SP HPカラム(1ml)に詰めた。カラムを、5mM酢酸及び25mM酢酸緩衝液で洗浄した。1M NaClを含有する25mM酢酸緩衝液で化合物を溶出した。

## 【0273】

Fab 0088(5mg、3.92mg/ml、1.27ml、104nmol)を25mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH7に緩衝液交換した。最終容量は、2000マイクロリットル(50マイクロモル、2.5mg/ml)であった。リン酸緩衝液中の溶液からのビス(p-スルホナートフェニル)フェニルホスフィンニ水和物ニカリウム塩を、200マイクロモルの最終濃度に加え(ビス(p-スルホナートフェニル)フェニルホスフィンニカリウムニ水和物塩、CAS:151888-20-9、Sigma-Aldrich社;2.24mg、4.19マイクロモル)、1mlの25mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH7、に溶解して、4.19mMの濃度にした(希釈係数:20.9)。95マイクロリットルをタンパク質溶液に加えた。(2000マイクロリットルの全容量)。

50

.19マイクロモル)、1mlの25mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH7、に溶解して、4.19mMの濃度にした(希釈係数:20.9)。95マイクロリットルをタンパク質溶液に加えた(2000マイクロリットルの全容量)。

【0274】

2つのタンパク質溶液を混合し、25mM酢酸緩衝液、pH5、に緩衝液交換し、半分の容量まで濃縮した。混合液を周囲温度で3時間インキュベートした。10mMのL-ヒスチジン、150mM NaCl、pH7、であらかじめ調整したSuperdex200 10/300 GLカラムに、溶液を詰めた。前記緩衝液を用いて化合物を溶出した。選択した分画をプールし、SDS-PAGE分析、LCMS (m/z:96144、[M-NH3+H]<sup>+</sup>)、逆相HPLC及びエドマン配列判定を用いて分析した。このコンジュゲートは、9002と呼んだ。

10

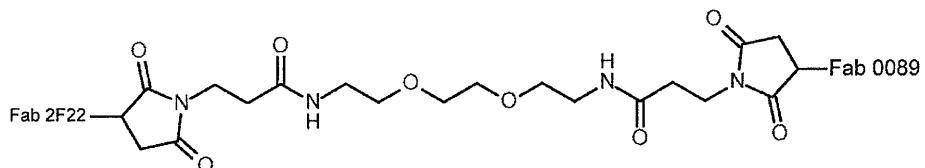
【0275】

(実施例11)

1,16-N,N'-ビス(マレイミド)-4,13-ジアザ-7,10-ジオキサ-3,14-ジオキソヘキサデカンによるFab 2F22及びFab 0089のコンジュゲーション(ref. 9028)

【0276】

【化8】



20

【0277】

上の実施例と完全に類似して、Amicon超遠心分離装置(Millipore社、10kDa MWCO)を使用してFab 2F22(3.9mg)及びFab 0089(8.0mg)をリン酸緩衝食塩水に緩衝液交換した。両方のタンパク質の濃度は、50マイクロモルに調整した。

【0278】

リン酸緩衝液中の溶液からのビス(p-スルホナートフェニル)フェニルホスフィン二水和物二カリウム塩を、200マイクロモルの最終濃度に加えた。生じた混合液は、室温で一晩インキュベートした。Fab 2F22は、15mM酢酸ナトリウム緩衝液、1Mの塩化ナトリウム、pH 5.0、に緩衝液交換した。

30

【0279】

Fab 0089は、15mM酢酸ナトリウム緩衝液、pH4.5、に緩衝液交換した。1,16-N,N'-ビス(マレイミド)-4,13-ジアザ-7,10-ジオキサ-3,14-ジオキソヘキサデカン(スパチュラの先)を溶液に加えた。生じた混合液を室温に30分間保った。混合液をあらかじめ調整したHiTrap SP HPカラム(GE Healthcare社、1ml)に詰めた。固定化されたタンパク質は、15mM酢酸ナトリウム緩衝液、pH4.5、25CVで洗浄した。15mM酢酸ナトリウム緩衝液、1M NaCl、pH5.0、でタンパク質をカラムから溶出し、Fab 2F22と混合した。生じた混合液は、Amicon超遠心分離スピンフィルター(MWCO 10kDa)で濃縮した。最終容量:400マイクロリットル。混合液は、20時間インキュベートした。5mM HEPES、150mM NaCl、pH7.3であらかじめ調整したゲル透過カラム(HiLoad16/600 Superdex 200カラム、GE Healthcare)に、試料を注入した。水に5mM HEPES、150mM NaCl、pH7.3の1ml/分の流量を使用して、試料をカラムから溶出した。所望のコンジュゲートを含有する分画は、SDS-PAGE分析法を用いて同定した。Amicon超遠心分離装置(MWCO 10kDa)を使用して、プールした分画を1000マイクロリットルの容量に濃縮した。LCMS(m/z:95629、[M+H]<sup>+</sup>)。このコンジュゲートは、9028と呼んだ。

40

【0280】

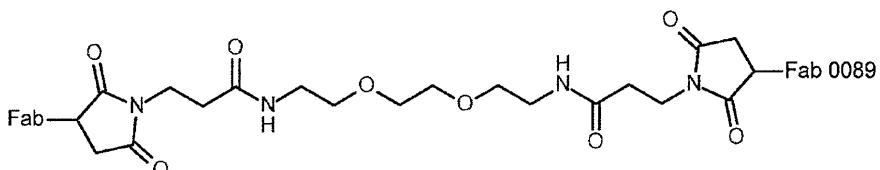
(実施例12)

1,16-N,N'-ビス(マレイミド)-4,13-ジアザ-7,10-ジオキサ-3,14-ジオキソヘキサデカンによるFab 0094及びFab 0089のコンジュゲーション(ref. 9004)

【0281】

50

## 【化9】



## 【0282】

上の実施例と同じように、Fab 0094及びFab 0089のコンジュゲートを形成した。  
LCMS( $m/z$ :95994、 $[M+H]^+$ )。このコンジュゲートは、9004と呼んだ。

10

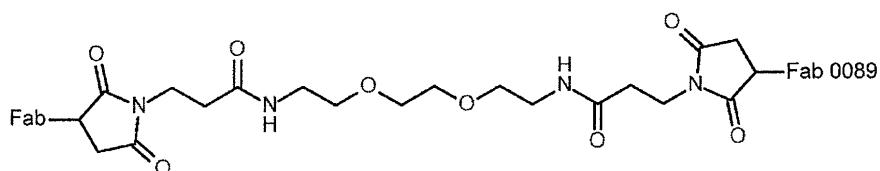
## 【0283】

(実施例13)

1,16-N,N'-ビス(マレイミド)-4,13-ジアザ-7,10-ジオキサ-3,14-ジオキソヘキサデカンによるFab 0095及びFab 0089のコンジュゲーション(ref. 9005)

## 【0284】

## 【化10】



20

## 【0285】

上の実施例と同じように、Fab 0095及びFab 0089のコンジュゲートを形成した。  
LCMS( $m/z$ :95928、 $[M-NH_3+H]^+$ )。このコンジュゲートは、9005と呼んだ。

## 【0286】

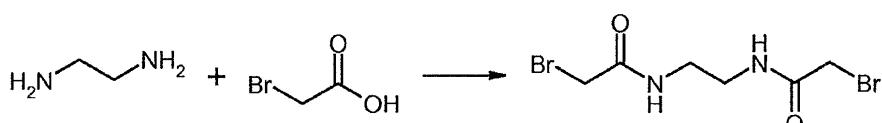
(実施例14)

ビス(プロモアセチル)エチレンジアミンの調製

## 【0287】

## 【化11】

30



## 【0288】

プロモ酢酸(2.1g、15mmol)を、DCM(40ml)に溶解した。溶液は、PS樹脂の上の固定化カルボジイミド(N-シクロヘキシルカルボジイミド-N'-メチルポリスチレン;Novabiochem社、製品番号:8.55029.0025;2.3mmol/g;10g)の懸濁液に15分間にわたって滴下添加した。攪拌している溶液に、DCM(20ml)中のジアミンの溶液(450mg、7.5mmol)を20分間にわたって滴下添加した。混合液を1時間攪拌した。溶液を濾過し、減圧濃縮乾固させた。LCMS( $m/z$ :302.9、 $[M+H]^+$ )。

40

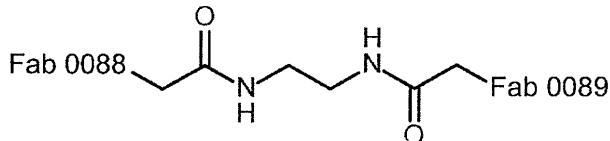
## 【0289】

(実施例15)

ビス(プロモアセチル)エチレンジアミンを用いるFab 0088及びFab 0089のコンジュゲーション(ref. 9029)

## 【0290】

## 【化12】



## 【0291】

Amicon超遠心分離装置(Millipore社、10kDa MWCO)を使用して、Fab 0088及びFab 0089をリン酸緩衝食塩水に緩衝液交換した。両方のタンパク質の濃度は、50マイクロモルに調整した。リン酸緩衝液中の溶液からのビス(p-スルホナートフェニル)フェニルホスフィン二水和物二カリウム塩を、200マイクロモルの最終濃度に加えた。生じた混合液は、室温で一晩インキュベートした。 10

## 【0292】

タンパク質は、20mMトリエタノールアミン、1M NaCl、200マイクロモルのビス(p-スルホナートフェニル)フェニルホスフィン二水和物二カリウム塩、pH8.5に緩衝液交換した。Fab 0089 (60mg、10mg/ml)を、ビス(プロモアセチル)エチレンジアミン(37mg)と混合した。混合液を周囲温度で30分間インキュベートした。LCMS( $m/z: 47858$  [M-NH<sub>3</sub>+H]<sup>+</sup>)。試料を、15mM酢酸緩衝液、pH4.5で希釈した(約10倍)。試料を、あらかじめ調整したHiTrap SP HPカラム(5ml)に詰めた。カラムは、15mM酢酸緩衝液で洗浄した。化合物は、20mMトリエタノールアミン及び1M NaClの水性緩衝液、pH8.5で溶出した。2つのタンパク質溶液を混合し、Amicon超遠心分離装置(Millipore社、10kDa MWCO)を用いて20mMトリエタノールアミン、1M NaCl、pH8.5、200マイクロモルのビス(p-スルホナートフェニル)フェニルホスフィン二水和物二カリウム塩、pH 8.5に濃縮/緩衝液交換した。混合液を周囲温度で24時間インキュベートした。15mM HEPES、150mM NaCl、pH7.3であらかじめ調整したSuperdex200 26/60 GLカラム(HiLoad26/60 Superdex 200カラム、GE Healthcare社)に、溶液を詰めた。水に15mM HEPES、150mM NaCl、pH7.3の2.5ml/分の流量を使用して、試料をカラムから溶出した。所望のコンジュゲートを含有する分画は、SDS-PAGE分析法を用いて同定した。Amicon超遠心分離装置(MWCO 10kDa)を使用して、プールした分画を1000マイクロリットルの容量に濃縮した。LCMS( $m/z: 95834$ 、[M-NH<sub>3</sub>+H]<sup>+</sup>)。 20

## 【0293】

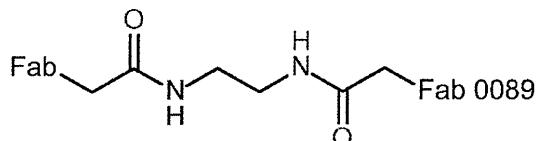
30

(実施例16)

ビス(プロモアセチル)エチレンジアミンを用いるFab 0094及びFab 0089のコンジュゲーション(ref. 9030)

## 【0294】

## 【化13】



40

## 【0295】

Amicon超遠心分離装置(Millipore社、10kDa MWCO)を使用して、Fab 0094及びFab 0089をリン酸緩衝食塩水に緩衝液交換した。両方のタンパク質の濃度は、50マイクロモルに調整した。リン酸緩衝液中の溶液からのビス(p-スルホナートフェニル)フェニルホスフィン二水和物二カリウム塩を、200マイクロモルの最終濃度に加えた。生じた混合液は、室温で一晩インキュベートした。タンパク質は、20mMトリエタノールアミン、1M NaCl、200マイクロモルのビス(p-スルホナートフェニル)フェニルホスフィン二水和物二カリウム塩、pH8.5に緩衝液交換した。

## 【0296】

Fab 0089 (60mg、10mg/ml)を、ビス(プロモアセチル)エチレンジアミン(37mg)と混合し

50

た。混合液を周囲温度で30分間インキュベートした。LCMS( $m/z:47858$   $[M-NH_3+H]^+$ )。

【0297】

試料は、15mM酢酸緩衝液、pH4.5で希釈した(約10倍)。試料を、あらかじめ調整したHiTrap SP HPカラム(5mL)に詰めた。カラムは、15mM酢酸緩衝液で洗浄した。化合物は、20mMトリエタノールアミン及び1M NaClの水性緩衝液、pH8.5で溶出した。

【0298】

2つのタンパク質溶液を混合し、Amicon超遠心分離装置(Millipore社、10kDa MWCO)を用いて20mMトリエタノールアミン、1M NaCl、pH8.5、200マイクロモルのビス(p-スルホナートフェニル)フェニルホスフィン二水和物二カリウム塩、及び200マイクロモルのヨウ化ナトリウム、pH8.5に濃縮/緩衝液交換した。混合液を周囲温度で24時間インキュベートした。15mM HEPES、150mM NaCl、pH7.3であらかじめ調整したSuperdex200 26/60 GLカラム(HiLoad26/60 Superdex 200カラム、GE Healthcare)に、溶液を詰めた。水に15mM HEPES、150mM NaCl、pH7.3の2.5mL/分の流量を使用して、試料をカラムから溶出した。所望のコンジュゲートを含有する分画は、SDS-PAGE分析法を用いて同定した。Amicon超遠心分離装置(MWCO 10kDa)を使用して、プールした分画を1000マイクロリットルの容量に濃縮した。LCMS( $m/z:95664$ 、 $[M-NH_3+H]^+$ )。この化合物は、9030と呼んだ。

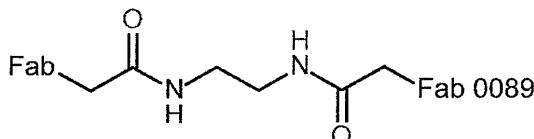
【0299】

(実施例17)

ビス(プロモアセチル)エチレンジアミンを用いるFab 0313及びFab 0089のコンジュゲーション(ref. 9031)

【0300】

【化14】



【0301】

Amicon超遠心分離装置(Millipore社、10kDa MWCO)を使用して、Fab 0094及びFab 0089をリン酸緩衝食塩水に緩衝液交換した。両方のタンパク質の濃度は、50マイクロモルに調整した。リン酸緩衝液中の溶液からのビス(p-スルホナートフェニル)フェニルホスフィン二水和物二カリウム塩を、200マイクロモルの最終濃度に加えた。生じた混合液は、室温で一晩インキュベートした。

【0302】

タンパク質は、20mMトリエタノールアミン、1M NaCl、200マイクロモルのビス(p-スルホナートフェニル)フェニルホスフィン二水和物二カリウム塩、pH8.5に緩衝液交換した。

【0303】

Fab 0089 (60mg、10mg/mL)を、ビス(プロモアセチル)エチレンジアミン(37mg)と混合した。混合液を周囲温度で30分間インキュベートした。LCMS( $m/z:47858$   $[M-NH_3+H]^+$ )。

【0304】

試料を、15mM酢酸緩衝液、pH4.5で希釈した(約10倍)。試料を、あらかじめ調整したHiTrap SP HPカラム(5mL)に詰めた。カラムを、15mM酢酸緩衝液で洗浄した。化合物は、20mMトリエタノールアミン及び1M NaClの水性緩衝液、pH8.5で溶出した。

【0305】

2つのタンパク質溶液を混合し、Amicon超遠心分離装置(Millipore社、10kDa MWCO)を用いて20mMトリエタノールアミン、1M NaCl、pH8.5、200マイクロモルのビス(p-スルホナートフェニル)フェニルホスフィン二水和物二カリウム塩、及び200マイクロモルのヨウ化ナトリウム、pH8.5に濃縮/緩衝液交換した。混合液を周囲温度で24時間インキュベートした。15mM HEPES、150mM NaCl、pH7.3であらかじめ調整したSuperdex200 26/60 GLカラム(HiLoad26/60 Superdex 200カラム、GE Healthcare)に、溶液を詰めた。水に15mM HEPES、150mM NaCl、pH7.3の2.5mL/分の流量を使用して、試料をカラムから溶出した。所望のコンジュゲートを含有する分画は、SDS-PAGE分析法を用いて同定した。Amicon超遠心分離装置(MWCO 10kDa)を使用して、プールした分画を1000マイクロリットルの容量に濃縮した。LCMS( $m/z:95664$ 、 $[M-NH_3+H]^+$ )。この化合物は、9030と呼んだ。

10

20

30

40

50

mM NaCl、pH7.3の2.5ml/分の流量を使用して、試料をカラムから溶出した。所望のコンジュゲートを含有する分画は、SDS-PAGE分析法を用いて同定した。Amicon超遠心分離装置(M WCO 10kDa)を使用して、プールした分画を1000マイクロリットルの容量に濃縮した。LCMS (m/z:95638、[M-NH<sub>3</sub>+H]<sup>+</sup>)。

【0306】

(実施例18)

トロンビン生成アッセイ

10 μMのPS/PC:ホスファチジルセリン/ホスファチジルコリン25/75%を追加した正常なヒト血漿(NHP、HemosIL較正血漿)で、トロンビン生成に及ぼす抗体の効果を研究した。カルシウム再添加及びInnovin(登録商標)(1.0pm)の添加によって、凝固を開始させた。100 μg/mlのヒツジ抗ヒトFVIII抗体(市販品)の添加によって、血友病A様血漿が得られた。

【0307】

Bachem (Bubendorf社、Switzerland)からの蛍光原基質Z-Gly-Gly-Arg-AMC.HCl(I-1140)の変換の後に、トロンビン活性を連続的に評価した。励起及び放射波長をそれぞれ368及び460nmに設定して、蛍光をマイクロタイタープレートFluorskan Ascent蛍光光度計(Thermo Labsystems社、Helsinki、Finland)で測定した。形成されたトロンビンの量の計算、並びに内部フィルター効果及び蛍光原基質の消費のための得られた相対蛍光単位の補正を可能にするために、キャリブレータを用いた。更に、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差し引いた。Synapse BV (Maastricht、Netherlands)によって提供される較正自動化トロンボグラム(CAT)コンピュータソフトウェアによって、これらの補正は自動的に実行された。i)遅延時間、ii)曲線下全面積、内因性トロンビン能(ETP)、iii)トロンビンピーク高さ(Peak)、iv)ピークまでの時間(ttPeak)、及びv)トロンビン生成最大速度(Rate)の計算を可能にするトロンビン生成曲線を与えた、データの最初の導関数をとった。

【0308】

(実施例19)

結合相互作用分析

結合相互作用分析は、Biacore T200機器での表面プラズモン共鳴によって得られた。Biacore T-200コントロールソフトウェア(GE Healthcare社)で利用可能なアミン結合プロトコル及びアミン結合キット(GE Healthcare社)で提供される試薬を用いて、Human Fab Binder (Human Fab Captureキット、GE Healthcare社)を、10000応答単位(RU)でフローセル1~4のシリーズS CM4センサーチップ(GE Healthcare社)に固定化した。関連するFab断片又はFab-Fabコンジュゲートは、固定された濃度でフローセル2、3又は4で捕捉された。TFPIをランニングバッファ(10mM Hepes、pH7.4、300mM NaCl、5mM CaCl<sub>2</sub>、0.05%界面活性剤P20、1mg/mlのBSA)で希釈することによって、TFPIの異なる濃度を試験した。300秒の接触時間及び続く50 μl/分の流量での600秒の解離時間を用いて、各試料を分析した。緩衝液ブランクも分析した。センサー表面は、各々50 μl/分の流量で30秒間の2つのサイクルで、10mMグリシンpH2.1で再生した。

【0309】

データを分析するためにBiacore T200評価ソフトウェアを使用した。TFPI及び対象のFab変異体又はFab-Fabコンジュゲートの1:1の相互作用を仮定して、結合定数(k<sub>on</sub>、k<sub>off</sub>、K<sub>d</sub>)の判定が得られた。

【0310】

(実施例20)

ヒト血友病A血漿での組織因子によって誘導されるトロンビン生成に及ぼす抗TFPI抗体の効果

ヒト血友病A血漿での組織因子によって誘導されるトロンビン生成に及ぼす抗TFPI抗体の相乗効果は、TFPIのKPI-1/KPI-2領域のエピトープを標的にする抗体とのKPI-3領域のエピトープを標的にする抗体の組合せ又は融合によって得ることができる。

【0311】

10

20

30

40

50

トロンビン生成に及ぼす抗体の効果は、実施例18によるトロンビン生成アッセイで研究した。

【0312】

図1(曲線a)は、NHPによるトロンビン生成曲線を示す。血友病A様状態をシミュレーションするためのNHPへの100 μg/mlのヒツジ抗ヒトFVIII抗体の添加(曲線b)は、トロンビン生成を強く低減した。NHPは約1.6nMのTFPIを含有し、そのうちわずか約0.2nMが完全長TFPIとして存在する。FVIII中和血漿へのmAb 2021を含むいくつかの抗TFPI抗体の添加(WO2010/072691でも開示される)は、正常に近いトロンビン生成曲線を効率的に再確立する。しかし、前臨床及び臨床試験は、抗体又はアブタマーによるTFPIのin vivo標的化がTFPI血漿レベルの有意な上昇を引き起こすことを示している。したがって、高いTFPI濃度の条件下でのTFPI標的化の効果を研究することに興味があった。図1は、FVIII中和血漿への20nM完全長TFPIの添加が測定可能なトロンビン生成を完全に阻止したこと(曲線c)、及びKPI-2に対する高親和性抗体(mAb 2021)の200nMの添加がTFPI阻害を効率的に抑止することができず、これらの条件下で頑強なトロンビン生成を確立することができなかったこと(曲線d)を示す。KPI-3に対する高親和性抗体(mAb 4F110)の200nMの添加は、20nMのTFPIの存在下で有意なトロンビン生成を確立することができない(曲線e)。しかし、驚くべきことに、100nMのmAb 2021及び100nMのmAb 4F110の組合せは、各抗体単独によつてもたらされるトロンビン生成の合計より明らかに大きく、NHPによつてもたらされるトロンビン生成と同じオーダーである(曲線a)頑強なトロンビン生成を確立すること(曲線f)によって相乗効果を示す。

【0313】

図1のデータは、KPI-2に対する抗体と組み合わせたTFPIのKPI-3に対する抗体の組合せが、高いTFPI濃度においてTFPI阻害を覆すことにおいて相乗的に作用したことを示す。図1の曲線から導かれるトロンビンピーク高さ(Peak)のパラメータを、Table 1(表2)に掲載する。

【0314】

【表2】

Table 1. 20nM完全長TFPI $\alpha$ を有するFVIII中和NHP(HAP)でのトロンビン生成に及ぼす抗TFPI KPI-2及び抗TFPI KPI-3単一特異的抗体の組合せの効果

|                        | mAb-1<br>100nM | mAb-2<br>100nM | mAb 1 及び mAb 2<br>の組合せ | Peak (nM) |
|------------------------|----------------|----------------|------------------------|-----------|
| NHP <sup>1)</sup>      | -              | -              | -                      | 36.0      |
| HAP <sup>2)</sup>      | -              | -              | -                      | 8.0       |
| HAP+TFPI <sup>3)</sup> | -              | -              | -                      | 0         |
| HAP+TFPI <sup>3)</sup> | 2021           | 2021           | 2 × KPI-2              | 18.9      |
| HAP+TFPI <sup>3)</sup> | 2021           | 4F110          | KPI-2+KPI-3            | 62.4      |
| HAP+TFPI <sup>3)</sup> | 4F110          | 4F110          | 2 × KPI-3              | 0         |

<sup>1)</sup> NHP:更なる添加のない正常なヒト血漿、<sup>2)</sup> HAP: FVIII中和血漿、<sup>3)</sup> HAP+TFPI: 20nM TFPI $\alpha$ を有するFVIII中和血漿

【0315】

mAb 2021と組み合わせたときの、トロンビン生成に及ぼす可能な相乗効果について、TFPIのC末端領域に対するいくつかの抗体をその後評価した。FVIII中和血漿への20nMのヒトTFPIの添加によって得られた高いTFPI濃度の条件下で、C末端抗体のいずれも、単独でTFPIによる阻害を阻止して、測定可能なトロンビン生成を促進することができなかった(データ示さず)。しかし、Table 2(表3)のデータは、高いTFPI濃度の血友病A様条件下で、いくつかの抗TFPI KPI-3/C末端抗体(\*の印)がmAb 2021と相乗的に作用して、血漿で顕著なトロンビンピークを生成することを示す。トロンビン生成曲線から導かれるトロンビンピーク高さを、Table 2(表3)に掲載する。

10

20

30

40

50

【0316】

【表3】

Table 2. 20nM完全長TFPI $\alpha$ を有するFVIII中和NHP(HAP)でのトロンビン生成に及ぼす抗TFPI KPI-2及び抗TFPI KPI-3单一特異的TFPI抗体の組合せの効果

|                        | mAb-1<br>100nM | mAb-2<br>100nM | Ab 標的の組合せ   | Peak (nM) |
|------------------------|----------------|----------------|-------------|-----------|
| NHP <sup>1)</sup>      | -              | -              | -           | 87.1      |
| HAP <sup>2)</sup>      | -              | -              | -           | 10.8      |
| HAP+TFPI <sup>3)</sup> | -              | -              | -           | 0         |
| HAP+TFPI <sup>3)</sup> | 2021           | 2021           | 2×KPI-2     | 17.2      |
| HAP+TFPI <sup>3)</sup> | 2021           | 4F110*         | KPI-2+KPI-3 | 50.4      |
| HAP+TFPI <sup>3)</sup> | 2021           | 22F66          | KPI-2+KPI-3 | 14.7      |
| HAP+TFPI <sup>3)</sup> | 2021           | 22F71*         | KPI-2+KPI-3 | 26.4      |
| HAP+TFPI <sup>3)</sup> | 2021           | 22F74*         | KPI-2+KPI-3 | 50.1      |
| HAP+TFPI <sup>3)</sup> | 2021           | 22F79*         | KPI-2+KPI-3 | 55.6      |
| HAP+TFPI <sup>3)</sup> | 2021           | 22F132*        | KPI-2+KPI-3 | 64.8      |
| HAP+TFPI <sup>3)</sup> | 2021           | 35F2*          | KPI-2+KPI-3 | 21.8      |
| HAP+TFPI <sup>3)</sup> | 2021           | 37F7*          | KPI-2+KPI-3 | 30.6      |
| HAP+TFPI <sup>3)</sup> | 2021           | 41F15          | KPI-2+KPI-3 | 16.4      |
| HAP+TFPI <sup>3)</sup> | 2021           | 41F30*         | KPI-2+KPI-3 | 27.5      |
| HAP+TFPI <sup>3)</sup> | 2021           | 41F41*         | KPI-2+KPI-3 | 68.3      |
| HAP+TFPI <sup>3)</sup> | 2021           | 41F61*         | KPI-2+KPI-3 | 38.9      |
| HAP+TFPI <sup>3)</sup> | 2021           | 41F62          | KPI-2+KPI-3 | 16.6      |
| HAP+TFPI <sup>3)</sup> | 2021           | 41F66*         | KPI-2+KPI-3 | 28.7      |
| HAP+TFPI <sup>3)</sup> | 2021           | 41F74          | KPI-2+KPI-3 | 17.2      |

<sup>1)</sup> NHP:更なる添加のない正常なヒト血漿、<sup>2)</sup> HAP:FVIII中和血漿、<sup>3)</sup> HAP+TFPI:20nM TFPI $\alpha$ を有するFVIII中和血漿、\*) mAb 2021と組み合わせたときの相乗効果

【0317】

30

KPI-3ドメイン特異的mAb 4F110と組み合わせたときの、トロンビン生成に及ぼす可能な相乗効果について、TFPIのKPI-1ドメインに対するいくつかの抗体を評価した。Table 3(表4)及びTable 4(表5)は、20nMのヒトTFPI $\alpha$ を加えたFVIII中和血漿(HAP)での、単独で、及びmAb 4F110と組み合わせて用いたときの、遅延時間、ピークまでの時間及びピークに及ぼすKPI-1ドメイン特異的mAb 4903 (American Diagnostica、カタログ番号ADG4903)、1F91、2F3、2F22、2F35及び2F45の効果に関するデータを示す。

【0318】

40

KPI-1特異的抗体の一部だけが、単独でTFPIによる阻害を阻止して、測定可能なトロンビン生成を促進することができた。しかし、Table 4(表5)のデータは、高いTFPI濃度の血友病A様条件下で、いくつかのKPI-1ドメイン特異的抗体(\*の印)がmAb 4F110と相乗的に作用して、血漿で顕著なトロンビンピークを生成することを示す。トロンビンピーク高さは、トロンビン生成曲線から導かれた。

【0319】

## 【表4】

Table 3. 20nM完全長TFPI $\alpha$ を有するFVIII中和NHP(HAP)でのトロンビン生成に及ぼす抗TFPI KPI-1及び抗TFPI KPI-3単一特異的TFPI抗体の組合せの効果

|                   | mAb-1<br>100nM | mAb-2<br>100nM | Abの組合せ      | Peak (nM) |
|-------------------|----------------|----------------|-------------|-----------|
| NHP <sup>1)</sup> | -              | -              | -           | 36.0      |
| HAP <sup>2)</sup> | -              | -              | -           | 8.0       |
| HAP+TFPI          | -              | -              | -           | 0         |
| HAP+TFPI          | 4903           | 4903           | 2×KPI-1     | 0         |
| HAP+TFPI          | 4903           | 4F110          | KPI-1+KPI-3 | 26.9      |

<sup>1)</sup> NHP:更なる添加のない正常なヒト血漿、<sup>2)</sup> HAP:FVIII中和血漿

## 【0320】

## 【表5】

Table 4. 20nM完全長TFPI $\alpha$ を有するFVIII中和NHP(HAP)でのトロンビン生成に及ぼす抗TFPI KPI-1及び抗TFPI KPI-3単一特異的抗体の組合せの効果

|                        | mAb-1<br>100nM | mAb-2<br>100nM | Ab 標的の組合せ   | 遅延時間(分) | ttPeak (分) | Peak (nM) |
|------------------------|----------------|----------------|-------------|---------|------------|-----------|
| NHP <sup>1)</sup>      | -              | -              | -           | 6.7     | 11.6       | 71.0      |
| HAP+TFPI <sup>2)</sup> | -              | -              | -           | 0       | 0          | 0         |
| HAP+TFPI <sup>2)</sup> | 4F110          | 4F110          | 2×KPI-3     | 0       | 0          | 0         |
| HAP+TFPI <sup>2)</sup> | 1F91           | 1F91           | 2×KPI-1     | 0       | 0          | 0         |
| HAP+TFPI <sup>2)</sup> | 1F91*          | 4F110          | KPI-1+KPI-3 | 3.1     | 7.4        | 18.9      |
| HAP+TFPI <sup>2)</sup> | 2F3            | 2F3            | 2×KPI-1     | 5.8     | 14.6       | 20.9      |
| HAP+TFPI <sup>2)</sup> | 2F3*           | 4F110          | KPI-1+KPI-3 | 3.3     | 8.9        | 63.3      |
| HAP+TFPI <sup>2)</sup> | 2F22           | 2F22           | 2×KPI-1     | 5.1     | 13.6       | 23.7      |
| HAP+TFPI <sup>2)</sup> | 2F22*          | 4F110          | KPI-1+KPI-3 | 3.3     | 9.1        | 61.7      |
| HAP+TFPI <sup>2)</sup> | 2F35           | 2F35           | 2×KPI-1     | 0       | 0          | 0         |
| HAP+TFPI <sup>2)</sup> | 2F35           | 4F110          | KPI-1+KPI-3 | 0       | 0          | 0         |
| HAP+TFPI <sup>2)</sup> | 2F45           | 2F45           | 2×KPI-1     | 9       | 23.6       | 7.2       |
| HAP+TFPI <sup>2)</sup> | 2F45*          | 4F110          | KPI-1+KPI-3 | 3.2     | 10.7       | 28.5      |

<sup>1)</sup> NHP:更なる添加のない正常なヒト血漿、<sup>2)</sup> HAP: FVIII中和血漿、\*) mAb 4F110と組み合わせたときのトロンビン生成に及ぼす相乗効果

## 【0321】

(実施例21)

ヒト血友病A血漿での組織因子によって誘導されるトロンビン生成に及ぼす抗TFPI性Fab断片コンジュゲートの相乗効果

ヒトTFPIへの結合親和性を判定するために、実施例6、7、10、12、13及び17によって調製されたFab断片及びFab-Fabコンジュゲートを、実施例19による結合相互作用分析アッセイで分析した。

## 【0322】

Table 5 (表6)は、5つのFab断片:

Fab 0088 (KPI-2)配列番号3+4、

Fab 0094 (KPI-2)配列番号5+6

Fab 0095 (KPI-2)配列番号7+8

Fab 0313 (KPI-2)配列番号58+59

Fab 0089 (KPI-3)配列番号9+10

10

20

30

40

50

及び4つのKPI-2/KPI-3ドメイン特異的Fab-Fabコンジュゲート(個々のFabの配列番号は上記と同じである):

Fab 0088-Fab 0089 (9002とも呼ばれる;KPI-2/KPI-3)

Fab 0094-Fab 0089 (9004とも呼ばれる;KPI-2/KPI-3)

Fab 0095-Fab 0089 (9005とも呼ばれる;KPI-2/KPI-3)

Fab 0313-Fab 0089 (9031とも呼ばれる;KPI-2/KPI-3)

の平衡解離定数( $K_D$ )を示す。

【0323】

【表6】

10

Table 5. 抗TFPI KPI-2及び抗TFPI KPI-3 Fab断片並びにFab-FabコンジュゲートのヒトTFPI $\alpha$ (TFPI $\alpha$ )への結合

| リガンド                     | 標的            | $K_a$ (1/Ms) | $K_d$ (1/s) | 親和性 $K_D$ (M) |
|--------------------------|---------------|--------------|-------------|---------------|
| Fab 0088                 | TFPI $\alpha$ | 1.7E+06      | 1.0E-04     | 6.0E-11       |
| Fab 0089                 | TFPI $\alpha$ | 5.0E+06      | 5.7E-04     | 1.1E-10       |
| Fab 0094                 | TFPI $\alpha$ | 1.5E+05      | 6.6E-04     | 4.4E-09       |
| Fab 0095                 | TFPI $\alpha$ | 3.9E+06      | 3.0E-03     | 7.8E-10       |
| Fab 0313                 | TFPI $\alpha$ | 4.9E+04      | 2.1E-03     | 4.2E-08       |
| Fab 0088-Fab 0089 (9002) | TFPI $\alpha$ | 7.1E+06      | 3.8E-05     | 5.3E-12       |
| Fab 0094-Fab 0089 (9004) | TFPI $\alpha$ | 6.2E+06      | 2.2E-04     | 3.6E-11       |
| Fab 0095-Fab 0089 (9005) | TFPI $\alpha$ | 6.1E+06      | 2.3E-04     | 3.8E-11       |
| Fab 0313-Fab 0089 (9031) | TFPI $\alpha$ | 4.0E+07      | 6.7E-03     | 1.7E-10       |

20

【0324】

トロンビン生成(実施例18によって測定したときの)に及ぼす可能な効果について、TFPIのKPI-2ドメインに対するFab断片を評価した。Table 6(表7)は、内因性TFPIレベルを有するFVIII中和NHP(HAP)でのトロンビンピークに及ぼすKPI-2ドメイン特異的Fab断片0088、0094及び0095並びにmAb 2021の効果に関するデータを示す。Fab断片0088、0094及び0095は、mAb 2021の変異体である。Table 7(表8)は、2nMの完全長TFPI $\alpha$ をFVIII中和NHP(HAP)に加えた類似の実験からの結果を示す。トロンビンピーク高さは、トロンビン生成曲線から導かれた。

30

【0325】

【表7】

Table 6. 内因性TFPI $\alpha$ レベルを有するFVIII中和NHP(HAP)での、トロンビン生成に及ぼす抗TFPI KPI-2特異的Fab断片又はmAb 2021の効果

|                | mAb 2021     | Fab 0088 | Fab 0094 | Fab 0095 |
|----------------|--------------|----------|----------|----------|
| Fab/mAb 濃度(nM) | トロンビンピーク(nM) |          |          |          |
| 0.00           | 22.4         | 22.4     | 22.3     | 25.1     |
| 6.25           | 112.8        | 96.8     | 35.9     | 74.2     |
| 12.5           | 113.6        | 98.1     | 45.0     | 81.3     |
| 25.0           | 116.5        | 101.5    | 60.2     | 84.9     |
| 50.0           | 118.2        | 100.9    | 73.9     | 85.4     |
| 100            | 118.0        | 87.7     | 74.1     | 84.7     |

40

【0326】

## 【表8】

Table 7. 2nMの完全長TFPI  $\alpha$  を有するFVIII中和NHP (HAP)での、トロンビン生成に及ぼす抗TFPI KPI-2特異的Fab断片又はmAb 2021の効果

| mAb 2021              | Fab 0088 | Fab 0094            | Fab 0095 |  |
|-----------------------|----------|---------------------|----------|--|
| <b>Fab/mAb 濃度(nM)</b> |          | <b>トロンビンピーク(nM)</b> |          |  |
| <b>0.00</b>           | 4.08     | 4.05                | 4.1      |  |
| <b>6.25</b>           | 48.9     | 38.4                | 5.9      |  |
| <b>12.5</b>           | 61.7     | 64.2                | 10.6     |  |
| <b>25.0</b>           | 68.4     | 69.8                | 14.3     |  |
| <b>50.0</b>           | 73.4     | 67.7                | 18.9     |  |
| <b>100</b>            | 58.6     | 48.1                | 20.3     |  |
|                       |          |                     | 24.6     |  |

## 【0327】

実施例18によって測定したときのトロンビン生成に及ぼす可能な効果を判定するために、KPI-2及びKPI-3ドメインを標的にするFab-Fabコンジュゲートを実施例6、7、10 (9002)及び12 (9004)によって調製し、対応する非コンジュゲート型Fab断片と比較した。Table 8A (表9)及びTable 8B (表10)は、20nMの完全長TFPI  $\alpha$  を有するFVIII中和NHP (HAP)での、トロンビン生成に及ぼす、KPI-2+KPI-3ドメイン特異的Fab 0088-Fab 0089 (9002と呼ぶ)及びFab 0094-Fab 0089 (9004と呼ぶ)コンジュゲート並びに非コンジュゲート型のFab断片の効果に関するデータを示す。

## 【0328】

明らかに、抗体又はFab断片と組み合わせることによって得られる相乗効果に加えて、Fab-Fabコンジュゲートは、同じ濃度の組合せ、すなわち非コンジュゲート型Fab断片と比較したときに、トロンビン生成に結合効果を示すということである。トロンビンピーク高さは、トロンビン生成曲線から導かれた。

## 【0329】

## 【表9】

Table 8A. 20nMのTFPI  $\alpha$  を有するFVIII中和NHP (HAP)でのトロンビン生成に及ぼす抗TFPI KPI-2及び抗TFPI KPI-3特異的Fab断片又はFab-Fabコンジュゲートの効果

|                               | Fab 0088-Fab 0089 (9002) | Fab 0088+Fab 0089 | Fab 0094-Fab 0089 (9004) | Fab 0094+Fab 0089 |
|-------------------------------|--------------------------|-------------------|--------------------------|-------------------|
| <b>トロンビンピーク(nM)</b>           |                          |                   |                          |                   |
| NHP                           | 47.2                     | 47.2              | 47.2                     | 47.2              |
| HA 血漿                         | 10.3                     | 10.3              | 10.3                     | 10.3              |
| HA 血漿+20nM TFPI               | 0                        | 0                 | 0                        | 0                 |
| +20nM Fab-Fab 又は Fab+Fab*     | 22.3                     | 0                 | 2.0                      | 0                 |
| +50nM Fab-Fab 又は Fab+Fab**    | 39.7                     | 18.1              | 14.8                     | 1.3               |
| +100nM Fab-Fab 又は Fab+Fab***  | 46.8                     | 36.3              | 19.3                     | 5.1               |
| +200nM Fab-Fab 又は Fab+Fab**** | 48.2                     | 47.4              | 24.9                     | 14.1              |

Fab-Fabコンジュゲートの濃度に同等の全濃度を達成するために、非コンジュゲート型Fab断片の各々の $2 \times 20^*$ 、 $2 \times 50^{**}$ 、 $2 \times 100^{***}$ 又は $2 \times 200^{****}$ nMを使用した

## 【0330】

## 【表10】

Table 8B. 20nMのTFPI  $\alpha$  を有するFVIII中和NHP (HAP)でのトロンビン生成(ピークまでの時間)に及ぼす抗TFPI KPI-2及び抗TFPI KPI-3特異的Fab断片又はFab-Fabコンジュゲートの効果

|                               | Fab 0088-Fab 0089 (Fab-Fab 9002) | Fab 0088+Fab 0089 | Fab 0094-Fab 0089 (Fab-Fab 9004) | Fab 0094+Fab 0089 |
|-------------------------------|----------------------------------|-------------------|----------------------------------|-------------------|
| ピークまでの時間(分)                   |                                  |                   |                                  |                   |
| NHP                           | 9.7                              | 9.7               | 9.7                              | 9.7               |
| HA 血漿                         | 12.7                             | 12.7              | 12.7                             | 12.7              |
| HA 血漿+20nM TFPI               | -                                | -                 | -                                | -                 |
| +20nM Fab-Fab 又は Fab+Fab*     | 20.4                             | -                 | 約 40                             | -                 |
| +50nM Fab-Fab 又は Fab+Fab**    | 18.1                             | 23.7              | 25                               | 約 60              |
| +100nM Fab-Fab 又は Fab+Fab***  | 17.5                             | 20.7              | 17.5                             | 約 45              |
| +200nM Fab-Fab 又は Fab+Fab**** | 16.4                             | 18.7              | 16.0                             | 23.1              |

Fab-Fabコンジュゲートの濃度に同等の全濃度を達成するために、非コンジュゲート型Fab断片の各々の2×20\*、2×50\*\*、2×100\*\*\*又は2×200\*\*\*\*nMを使用した

10

20

## 【0331】

明らかに、Fab-FabコンジュゲートはTFPIへの結合に結合効果を示して、2つの抗体又は2つの非コンジュゲート型Fab断片を組み合わせることによって得られる効果よりも高いトロンビン生成の相乗的増加をもたらすということである。

## 【0332】

ヒトTFPIへの結合親和性を判定するために、KPI-1及びKPI-3ドメインを標的にするFab断片及びFab-Fabコンジュゲートを実施例6、7及び11 (9028)によって調製し、実施例19による結合相互作用分析アッセイで分析した。Table 9 (表11)は、1つのFab断片:

30

Fab 2F22 (KPI-1)(配列番号40及び41)

及び1つのKPI-1/KPI-3ドメイン特異的Fab-Fabコンジュゲート(個々のFabの配列番号は上記と同じである):

Fab 2F22-Fab 0089 (9028とも呼ばれる; KPI-1/KPI-3)

の平衡解離定数( $K_D$ )を示す。

## 【0333】

## 【表11】

Table 9. ヒトTFPI  $\alpha$  (TFPI  $\alpha$ )への抗TFPI KPI-1 Fab断片2F22並びに抗TFPI KPI-1及び抗TFPI KPI-3 Fab-Fabコンジュゲートの結合。

40

| リガンド                     | 標的            | $k_a$ (1/Ms) | $k_d$ (1/s) | 親和性 $K_D$ (M) |
|--------------------------|---------------|--------------|-------------|---------------|
| Fab 2F22                 | TFPI $\alpha$ | 1.2E+05      | 2.1E-04     | 1.7E-09       |
| Fab 2F22-Fab 0089 (9028) | TFPI $\alpha$ | 2.7E+06      | 2.0E-04     | 7.5E-11       |

## 【0334】

実施例18によって測定したトロンビン生成に及ぼす可能な効果を判定するために、KPI-1及びKPI-3ドメインを標的にするFab-Fabコンジュゲートを対応する非コンジュゲート型Fab断片と比較した。Table 10 (表12)は、20nMの完全長TFPI  $\alpha$  を有するFVIII中和NHP (HAP)でのトロンビン生成に及ぼす、KPI-1/KPI-3ドメイン特異的Fab 2F22-Fab 0089コンジュゲート並びに非コンジュゲート型のFab断片の効果に関するデータを示す。

50

【0 3 3 5】

【表12】

| FVIII 中和 NHP<br>(HAP) |                  | Peak (nM)   |             |                             |  | 遅延時間(分)     |             |                             |  | ttPeak (分)  |             |                             |  |
|-----------------------|------------------|-------------|-------------|-----------------------------|--|-------------|-------------|-----------------------------|--|-------------|-------------|-----------------------------|--|
| TFPI<br>濃度<br>(nM)    | 薬物<br>濃度<br>(nM) | Fab<br>2F22 | Fab<br>0089 | Fab<br>2F22+<br>Fab<br>0089 | Fab<br>2F22-<br>Fab<br>0089<br>コンジュゲ<br>ート | Fab<br>2F22 | Fab<br>0089 | Fab<br>2F22+<br>Fab<br>0089 | Fab<br>2F22-<br>Fab<br>0089<br>コンジュゲ<br>ート | Fab<br>2F22 | Fab<br>0089 | Fab<br>2F22+<br>Fab<br>0089 | Fab<br>2F22-<br>Fab<br>0089<br>コンジュゲ<br>ート |
| 20                    | 200              | 26.6        | 0.97        | 68.5                        | 87.0                                       | 7.7         | 16.8        | 4.0                         | 4.0  | 14.7        | 76.7        | 11.7                        | 10.8                                       |
| 20                    | 100              | 26.7        | 0.8         | 61.7                        | 76.4                                       | 8.0         | 20.3        | 4.0                         | 4.2  | 16.3        | 71.8        | 12.5                        | 11.0                                       |
| 20                    | 50               | 21.2        | 0.0         | 54.5                        | 54.1                                       | 8.17        | n.a.        | 4.2                         | 4.3  | 19.8        | n.a.        | 13.0                        | 12.0                                       |
| 20                    | 25               | 11.9        | 0.0         | 31.1                        | 21.4                                       | 12.0        | n.a.        | 4.7                         | 5.2  | 29.0        | n.a.        | 15.8                        | 16.2                                       |
| 20                    | 0                | 0.0         | 0.0         | 0.0                         | 0.0  | n.a.        | n.a.        | n.a.                        | n.a.                                       | n.a.        | n.a.        | n.a.                        | n.a.                                       |
| NHP                   |                  | Peak (nM)   |             |                             |  | 遅延時間(分)     |             |                             |  | ttPeak (分)  |             |                             |  |
|                       |                  | 61.1        |             |                             |  | 8.3         |             |                             |  | 13.8        |             |                             |  |

Table 10  
20nMの完全長TFPI $\alpha$ を有するFVIII中和NHP (HAP)でのトロンビン生成に及ぼす抗TFPI KPI-1及び抗TFPI KPI-3特異的Fab断片並びにFab-Fabコンジュゲート化合物の効果。「Peak」:トロンビンピーク高さ;「ttPeak」:ピークまでの時間。n.a.:入手不能。

【0 3 3 6】

(実施例22)

抗TFPI mAb 2F22のFab断片との複合体の可溶性TFPI KPI-1の結晶構造

抗TFPI2F22モノクローナル抗体のFab断片(配列番号:配列52及び53)との複合体の、TFPI 50

KPI-1の前のN末端部分を含む可溶性ヒトTFPIクーニッツ型プロテアーゼ阻害剤ドメイン1(KPI-1)(TFPI 1~79、配列番号1による番号付け)の3D構造を、X線結晶学を使用して高分解能で判定した。結果は、抗体がTFPIのKPI-1及び先行するN末端の一部に結合することが可能なことを実証する。生じたヒトTFPIエピトープ残基は以下を含む:Leu 16、Pro 17、Leu 19、Lys 20、Leu 21、Met 22、Phe 25、Cys 35、Ala 37、Met 39、Arg 41、Tyr 56、Gly 57、Gly 58、Cys 59、Glu 60、Gly 61、Asn 62、Gln 63、Arg 65、Phe 66、Glu 67、Glu 71及びMet 75 (配列番号1)。

### 【0337】

#### 材料及び方法

結晶学に適するFab断片を得るために、トランケーションされたmAb 2F22 HCの発現のためのpTTをベースとした発現ベクターを生成した。制限酵素消化によってVH断片をmAb 2F2 HC発現ベクターから切除し、トランケーションされたヒトIgG4定常領域の配列を含有する線状化したpTTをベースとしたツールボックスベクターにクローニングした。IgG4をベースとしたHCは、伸長したFab 2F22 HC (化学的結合のためのFab、配列番号40)の配列の222位に対応するリジンの後のヒンジ領域でトランケーションした。クローニング反応物は、その後選択のために大腸菌に転換した。最終構築物の配列は、DNA配列決定によって検証した。mAb 2F22断片のFab断片は、EXPI293F細胞でFab 0296 (配列番号52及び53)として発現させ、実施例7に記載の通りKappaSelect樹脂を用いて標準の親和性クロマトグラフィーによって精製した。

### 【0338】

両方ともリン酸緩衝食塩水(PBS)緩衝液(2リットルの水に4錠、GIBCOカタログ番号18912-014 Invitrogen社)中の、ヒトTFPIのN末端部分、更にN末端付着GSSGSSGタグ(配列番号62)を含む可溶性ヒトTFPI KPI-1、及びFab 0296 (配列番号53に対応する軽鎖及び配列番号52に対応する重鎖断片からなる)を、TFPI種のわずかなモル過剰量(1.1:1)と混合した。次に10,000分子量のカットオフでAmicon Ultra-4遠心濾過機を使用して、複合体を約10.0mg/mlに濃縮した。TTP Lab Tech社からの96ウェルTTP IQプレートno:4150-05800及び1ウェルにつき100μlの沈殿溶液を用いて、シッティングドロップ技術によって結晶を成長させた。沈殿溶液は20w/v%のPEG 3350、200mMの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した。全液滴サイズは200nlであり、結晶は数日後に出現した。結晶を含有する液滴に、75%沈殿溶液及び25%グリセロールを含有する1μlの低温溶液ミックスを移すことによって、結晶を低温冷凍のために用意した。約2分の間、浸漬した。次に結晶を引き上げ、液体N<sub>2</sub>で瞬間冷凍し、データ収集の間、低温N<sub>2</sub>ガス流によって100Kの温度に保った。MAX-lab、Lund、SwedenのビームラインBL911-3で、1.65 Åまで結晶データを収集した。データの空間群判定、積算及びスケーリングは、XDSソフトウェアパッケージ[Kabsch、W.、J.Appl.Crystallogr.、(1993)、26巻、795~800頁]によって行った。空間群はC2であると判定し、シンクロトロンデータの格子パラメータはそれぞれ89.010、66.660、106.110

であると判定し、111.18°の角度であった。1.65 Å分解能へのR-symは8.4%で、完全性は99.5%であった。特異な反射の強度/シグマ(強度)の平均は、約1.8 Å分解能で2.0に等しかった。

### 【0339】

Protein Data Bank (PDB)[Berman、H. M.ら、Nucleic Acids Res.、(2000)、28巻、235~242頁]の受託コード1NGZ[Yin、J.ら、Proc Natl Acad Sci USA、2003年2月4日、(100)、100巻856~861頁]のFab分子の座標を用いた構造決定のために、分子代替物(MR)を使用した。Fab分子を2つのドメイン、可変及び定常ドメインに分割し、各々をMR計算での探索モデルとして使用した。定常及び可変Fabドメインの位置を見出すために、CCP4パッケージCCP4[Collaborative Computational Project、N.、Acta crystallographica、Section D、Biological crystallography、(1994)、50巻、760~763頁]のMolrepソフトウェア[Vagin、A.ら、J.Appl.Crystallogr.、(1997)、30巻、1022~1025頁]を使用した。KPI-1ドメインはMR段階では見出されなかったが、差電子密度地図はこの段階でのKPI-1ドメイン分子のおよその位置を示した。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

10

20

30

40

50

度向上と、続くARP-wARPソフトウェア[Langer、G.ら、*Nat Protoc*、(2008)、3巻、1171～1179頁][Murshudov、G. N.ら、*Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*、(2011)、67巻、355～367頁]を用いた自動化モデル構築及び位相向上は、Fab 0296分子及びKPI-1ドメイン構造、及びKPI-1ドメインに先行するN末端の一部のほとんど完全な構造を与えた。TFPI(配列番号1)については、残基15～77が、KPI-1(残基26～79)に加えてKPI-1のN末端の一部の残基も含むX線モデルに含まれる。Fab 0296断片については、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-Biol. Crystallogr.*、(2004)、60巻、2126～2132頁]を使用する電子密度地図のコンピュータグラフィクス検査、モデルの補正及び構築と、続く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)、67巻、355～367頁]を用いる結晶学的精密化の手順が入力された。更なる有意な改善をモデルに加えることができなくなるまで、手順を反復した。1.65 分解能までの全てのデータの最終R-及びR-freeは、それぞれ0.192及び0.220であった。

#### 【0340】

##### 結果

CCP4プログラムセット[Collaborative Computational Project、N.、*Acta crystallographica. Section D、Biological crystallography*、(1994)、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)、55巻、379～400頁][Saff、E. B.ら、*Math Intell.*、(1997)、19巻、5～11頁]による、ペアワイズ相互作用で排除された平均面積の計算は、結晶構造 $1195^{-2}$ の可溶性ヒトTFPI断片/抗TFPI Fab 0296分子複合体を与えた。

#### 【0341】

結晶構造で観察されたTFPIのN末端部分を含むTFPI KPI-1(配列番号62)と、抗TFPI Fab 0296(配列番号52及び53)の間の直接接触は、抗TFPI Fab 0296とTFPI断片分子の間の4.0 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)、50巻、760～763頁]のContactsソフトウェアを実行することによって同定した。可溶性TFPI断片/抗TFPI Fab 0296複合体結晶構造からの結果を、Table 11(表13)に示す。TFPI N末端、抗TFPI2F22のためのエピトープを含む生じたTFPI KPI-1は、TFPI(配列番号1)の以下の残基の1つ又は複数を含むことが見出された: Leu 16、Pro 17、Leu 19、Lys 20、Leu 21、Met 22、Phe 25、Cys 35、Ala 37、Met 39、Arg 41、Tyr 56、Gly 57、Gly 58、Cys 59、Glu 60、Gly 61、Asn 62、Gln 63、Arg 65、Phe 66、Glu 67、Glu 71及びMet 75。距離、電荷間相互作用、水素結合、極性及び疎水性相互作用、並びに低い溶媒アクセス性から評価すると、以下の残基がエピトープの特に重要な残基であるようである:Arg 41、Arg 65及びGlu 67。

#### 【0342】

したがって、抗TFPI2F22 TFPIエピトープは、短いN末端 ヘリックス、KPI-1の鎖1の前のループの残基、及び鎖1の初めの残基を含む、KPI-1に先行する残基を含む。それは、鎖2の末端の残基、及びKPI-1の鎖2とC末端 ヘリックスの間のループの残基、及びKPI-1のC末端 ヘリックスの中の残基も含む。

#### 【0343】

TFPI KPI-1のための抗TFPI2F22パラトープは、重(H)鎖(配列番号52、Table 11(表13))の残基Val 2、Phe 27、Tyr 32、Trp 52、Arg 53、Gly 54、Gly 55、Ser 56、Ile 57、Asp 58、Tyr 59、Ala 61、Met 64、Lys 97、Ser 99、His 100、Asn 102、Tyr 103、Val 104、Gly 105及びTyr 106、並びに軽(L)鎖(配列番号53、Table 11(表13))の残基Pro 31、Ala 32、Tyr 49、Ser 50、Asn 53、Tyr 55、Thr 56、Tyr 91、Thr 92、Ser 93及びTyr 94を含む。

#### 【0344】

## 【表 1 3 A】

Table 11. 相互作用

第 1 の結晶学的独立複合体のための抗 TFPI Fab 0296(配列番号 52)の重鎖(鎖 H)及び抗 TFPI Fab 0296(配列番号 53)の軽鎖(鎖 L)との TFPI KPI-1、鎖 K、(配列番号 1)の相互作用。4.0 Å の距離カットオフを使用した。接触は、CCP4 セット [Collaborative Computational Project, N., Acta crystallographica, Section D, Biological crystallography, (1994), 50 巻, 760~763 頁] の CONTACT コンピュータソフトウェアプログラムによって同定した。最後の欄で、「\*\*\*」は CONTACT によって計算したときのこの接触(距離 <3.3 Å)での水素結合の強力な可能性を示し、「\*」は弱い可能性(距離 >3.3 Å)を示す。ブランクは、プログラムが水素結合の可能性がないとみなしたこと示す。水素結合はドナーとアクセプターの間で特異的であり、一般的に強力で、容易に識別可能である。

これらの結果は、抗TFPI Fab 0296がTFPI KPI-1及び先行するN末端の一部に特異的に結合することを示す。

| hTFPI |         |     | Fab 0296 |         |     | 距離(Å) | H 結合の可能性 |
|-------|---------|-----|----------|---------|-----|-------|----------|
| 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  |          |

## 【0 3 4 5】

10

20

30

40

【表 1 3 B】

|     |     |     |     |      |     |      |     |
|-----|-----|-----|-----|------|-----|------|-----|
| 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 |     |
| 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 |     |

10

20

30

40

【0 3 4 6】

【表 1 3 C】

|     |     |     |     |      |     |      |     |
|-----|-----|-----|-----|------|-----|------|-----|
| Arg | 41K | NH1 | Asp | 58H  | CG  | 3.53 |     |
|     |     |     | Asp | 58H  | OD1 | 2.67 | *** |
|     |     |     | Asp | 58H  | OD2 | 3.65 | *   |
| 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 |     |

【0 3 4 7】

10

20

30

40

【表 1 3 D】

|     |     |     |     |      |     |      |     |
|-----|-----|-----|-----|------|-----|------|-----|
| Gln | 63K | OE1 | Thr | 92L  | O   | 3.95 | *   |
|     |     |     | Thr | 92L  | CA  | 3.87 |     |
| 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 | *** |

10

20

30

40

【0 3 4 8】

【表13E】

|     |     |     |     |      |     |      |     |
|-----|-----|-----|-----|------|-----|------|-----|
| 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 |     |
| 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

30

## 【0349】

これらの結果は、抗TFPI Fab 0296がTFPI KPI-1及び先行するN末端の一部に特異的に結合することを示す。

## 【0350】

(実施例23)

## 細胞表面関連TFPIへの抗体の結合

*in vitro*で内皮細胞表面に関連したTFPIに結合する抗TFPI抗体、Fab断片又はFab-Fabコンジュゲートの能力を、フローサイトメトリーを使用して研究した。アッセイ緩衝液(2%のFCSを追加したPBS)の中で、ヒト臍静脈細胞系EA.hy926細胞(ATCC)を、抗TFPI mAb 2021、Fab 0088、Fab 0094、Fab 0095又はFab 0313、又はFab 0088-Fab 0089コンジュゲート9002又はFab 0094-Fab 0089コンジュゲート9004の異なる濃度と氷上で30分間インキュベートした。細胞をPBSで洗浄し、その後アッセイ緩衝液の中で、APCコンジュゲート型二次抗体(Allophycocyanin-AffiniPure F(ab')2断片口バ抗ヒトIgG (H+L)、Jackson Immuno Research、カタログ709-136-149)と氷上で30分間インキュベートした。細胞をPBSで洗浄し、BD LSRFortessaフローサイトメーターで分析した。異なる抗体濃度で中央蛍光強度を用いて結合プロファイルをプロットし、最大半減結合値(EC50)を計算した。

## 【0351】

Table 12 (表14)に掲載されるデータは、Table 5 (表6)に掲載されるSPR分析によって判定したときに、KPI-2 TFPI Fab 0088、Fab 0094及びFab 0313 (全てのFab断片はmAb 2021に由来する)が、EA.hy926細胞表面関連TFPI及びTFPI に類似の親和性で結合すること

40

50

を明らかに示す。TFPIへの高親和性結合(Table 5 (表6))と対照的に、EA.hy926細胞表面関連TFPIへの抗TFPI KPI-3 mAb 4F110の測定可能な結合を検出することができなかった。データは、EA.hy926細胞表面関連TFPIへのFab 0094-Fab 0089コンジュゲート9004の親和性が、TFPIへのその親和性(Table 5 (表6))と比較して有意に低減されることも示し、C末端領域を含むTFPI種への優先的結合を示している。

【0352】

【表14】

Table 12. 抗TFPI抗体及び断片EA.hy926細胞表面関連TFPIの結合のEC50値(n.b:測定可能な結合がない)

10

| 抗体(mAb/Fab/Fab-Fab コンジュゲート)     | EC50<br>(nM) |
|---------------------------------|--------------|
| mAb 2021                        | 0.11         |
| Fab 0088                        | 0.31         |
| Fab 0094                        | 3.80         |
| Fab 0313                        | 25.90        |
| mAb 4F110                       | n.b.         |
| Fab 0088-Fab 0089 コンジュゲート(9002) | 0.33         |
| Fab 0094-Fab 0089 コンジュゲート(9004) | 6.90         |

20

【0353】

(実施例24)  
mAb及びFab-Fabコンジュゲートによる、TF/FVIIaによって媒介されるFXa生成のTFPIによる阻害の中和

10% FCS及び1%ペニシリン/ストレプトマイシンを補充したDMEM (Gibco社)の中で、ヒト臍静脈細胞系EA.hy926細胞(ATCC)を96ウェルプレートで100%集密度まで増殖させた。20ng/ml TNF 及び20ng/ml IL-1 で細胞を3時間刺激し、細胞表面TF依存性FX活性化の中和試験のために使用した。細胞を25mM HEPES、137mM NaCl、3.5mM KCl、pH7.4で2回洗浄した後、FX活性化を25mM HEPES、137mM NaCl、3.5mM KCl、5mM CaCl<sub>2</sub>、1mg/ml BSA pH7.4で測定した。37 の15分間のインキュベーションの後、0~60nM mAb又はFab-Fabコンジュゲートの添加によってTFPIの中和を120分間誘導した。これに続いて、50pM rFVIIa (Novo Nordisk A/S)と15分間インキュベートした。次に、37 で40分間の50nM FXの添加によって、FXaの生成を開始した。40 μlの上清を10 μl (75mM) EDTAと混合することによって反応を停止し、0.6mM発色基質S-2765 (Chromogenix社)で最後にFXa活性を測定した。TF/FVIIa活性は、0.5mg/mlの中和性ヤギ抗ヒトTFポリクローナル抗体を添加した対照実験で検証した。

30

【0354】

データは、GraphPad Prismソフトウェア(バージョン5)で分析した。結果を、図2に示す。上清中のFXa活性は、様々な濃度(0~60nM)のmAb 2021:(A);mAb 4F110(B);Fab 0088-Fab 0089コンジュゲート9002(C);又はFab 0094-Fab 0089コンジュゲート9004(D)と一緒に、50pMのFVIIa及び50nMのFXとの37 でのインキュベーションの後に測定した。四角は、60nMのmAb又はFab-Fabコンジュゲートと一緒に0.5mg/mlのヤギ抗ヒトTFポリクローナル抗体の効果を示す。結果は、平均±SD、n=3、で示す。

40

【0355】

データは、mAb 4F110ではなくmAb 2021が、EA.hy926細胞の表面でTF/FVIIa媒介FX活性化のTFPI阻害を中和することが可能であったことを示す。TFPIの中和は、Fab 0088-Fab 0089コンジュゲート9002でも観察された。対照的に、Fab 0094-Fab 0089 9004は、EA.hy 926細胞でのTF/FVIIaのTFPI 阻害に及ぼす有意な中和効果がなかった。したがって、KPI-2及びKPI-3に対するFab-Fabコンジュゲートの機能的効果のために、KPI-2結合抗体の親和性のモジュレーションが決定的であることが示される。

50

## 【0356】

(実施例25)

## 非対称の二重特異的抗体の生成

非対称のIgGフォーマットに基づいて、すなわちFCヘテロ二量体化を通して、二重特異的TFPI KPI-2/KPI-3結合抗体を生成した。FCヘテロ二量体化を達成するために、mAb 2021及びmAb 4F110のhIgG1変異体のFC領域に1セットの適合する突然変異を組み入れた。

## 【0357】

制限酵素消化によってVH断片をmAb 2021及びmAb 4F110 HC発現ベクターから切除し、ヒトIgG1定常領域の配列を含有する線状化したpTTをベースとしたツールボックスベクターにクローニングした。クローニング反応物は、その後選択のために大腸菌に転換した。最終構築物の配列は、DNA配列決定によって検証した。

10

## 【0358】

制御されたFabアーム交換によるFCヘテロ二量体化を支援するために、単一のフェニルアラニンからロイシンへの突然変異を、配列番号63の409位に対応するmAb 2021のIgG1 HCのCH3ドメインに導入した。突然変異は、Stratagene社からのQuikChange (登録商標)部位特異的突然変異誘発キットを用いて、部位特異的突然変異誘発によって導入した。全ての最終構築物の配列は、DNA配列決定によって検証した。mAb 2021の操作したIgG1バージョンは、実施例7に記載の通り、EXP1293F細胞でmAb 0309 (配列番号63及び64)として発現させた。GE Healthcare社からのMabSelectSuRe樹脂を製造業者の指示に従って用いて、標準の親和性クロマトグラフィーによって精製を実施した。精製された抗体は、pH7.2のPBS緩衝液に緩衝液交換した。

20

## 【0359】

配列番号65の410位に対応するmAb 4F110のIgG1 HCのCH3ドメインに、リジンからアルギニンへの対応する突然変異を導入した。突然変異は、Stratagene社からのQuikChange (登録商標)部位特異的突然変異誘発キットを用いて、部位特異的突然変異誘発によって導入した。全ての最終構築物の配列は、DNA配列決定によって検証した。mAb 2021の操作したIgG1バージョンは、実施例7に記載の通り、EXP1293F細胞でmAb 0312 (配列番号65及び66)として発現させた。GE Healthcare社からのMabSelectSuRe樹脂を製造業者の指示に従って用いて、標準の親和性クロマトグラフィーによって精製を実施した。精製された抗体は、pH7.2のPBS緩衝液に緩衝液交換した。

30

## 【0360】

二重特異的KPI-2/KPI-3結合抗体は、mAb2021 (KPI-2結合)の操作したIgG1変異体mAb309とmAb4F110 (KPI-3結合)の操作したIgG1変異体mAb312の間の制御されたFabアーム交換によって調製した。二重特異的抗体は、公表された方法(Labrijnら、PNAS、110:5145 ~ 5150頁(2013))に基本的に従って調製した。

## 【0361】

簡単には、mAb 0309 (mAb2021 IgG1のPheからLeuへの変異体配列番号63)を、PBS緩衝液中で1:1のモル比(1抗体につき1mg/ml)でmAb 0312 (mAb 4F110 IgG1のLysからArgへの変異体配列番号65)と混合した。25mMの2-メルカプトエチルアミン(MEA)の存在下で37 °Cで90分間の1:1混合液のインキュベーションによって抗体を選択的に還元して、半抗体を形成し、Fabアーム交換を可能にした。最後に、還元剤の除去(MEAを含まないPBS緩衝液へのダイアフィルトレーション)及び+5 °Cで少なくとも16時間の保存の後に、自発的な再組み立て及び再酸化が得られた。CH3ドメイン突然変異によって促進されたヘテロ二量体化が、90%を超える効率で観察された。mAb 0309及び0312から導かれた最終二重特異的抗体は、mAb 0325と命名した(配列番号67 ~ 70)。

40

## 【0362】

突然変異の逆のセット、すなわちmAb 2021 IgG1の上のLysからArg、及びmAb 4F110 IgG1の上のPheからLeuも生成して試験し、類似の結果を得た。

## 【0363】

ヒト血友病A血漿での組織因子誘導トロンビン生成に及ぼす相乗効果は、TFPIのKPI-2及

50

びKPI-3領域のエピトープを標的にする抗体のFCヘテロ二量体化を通して組み立てられる、非対称の二重特異的抗体を用いて得ることができる。

【0364】

トロンビン生成に及ぼす抗体の効果は、実施例18によるトロンビン生成アッセイで研究した。

【0365】

図3(曲線a)は、NHPによるトロンビン生成曲線を示す。血友病A様状態をシミュレーションするためのNHPへの100 μg/mlのヒツジ抗ヒトFVIII抗体の添加(曲線b)は、トロンビン生成を強く低減した。NHPは約1.6nMのTFPIを含有し、そのうちわずか約0.2nMが完全長TFPI

として存在する。FVIII中和血漿への、mAb 2021のFC操作バージョンmAb 0309を含むいくつかの抗TFPI抗体の添加(mAb 2021はWO2010/072691でも開示される)は、正常に近いトロンビン生成曲線を効率的に再確立する(データ示さず)。しかし、前臨床及び臨床試験は、抗体又はアブタマーによるTFPIのin vivo標的化がTFPI血漿レベルの有意な上昇を引き起こすことを示している。したがって、高いTFPI濃度の条件下でのTFPI標的化の効果を研究することに興味があった。図3は、FVIII中和血漿への20nM完全長TFPIの添加が測定可能なトロンビン生成を完全に阻止したこと(曲線c)、及びKPI-2に対する高親和性抗体(mAb 0309)の200nMの添加がTFPI阻害を効率的に抑止することができず、これらの条件下で頑強なトロンビン生成を確立することができなかつたこと(曲線d)を示す。KPI-3に対する高親和性抗体(mAb 0312、mAb 4F110のFC操作バージョン)の200nMの添加は、20nMのTFPIの存在下で有意なトロンビン生成を確立することができない(曲線e)。対照的に、mAb 0309及び0312の非対称的二重特異的抗体組合せ、mAb 0325は、各抗体単独によつてもたらされるトロンビン生成の合計より明らかに大きく、NHPでもたらされるトロンビン生成と同じオーダーである(曲線a)頑強なトロンビン生成を確立すること(曲線f)によって相乗効果を示す。

【0366】

本明細書において本発明のある特定の特徴について例示し説明してきたが、当業者であれば、今や多くの改変、置換、変更及び同等物に想到し得る。したがって、添付の特許請求の範囲は、本発明の真の精神の範囲内に入るような全ての改変及び変更を保護するものと理解すべきである。

【0367】

[配列表フリーテキスト]

配列番号1は、ヒトTFPIアルファのアミノ酸配列を表す。

配列番号2は、TFPI(1～181)のアミノ酸配列を表す。

配列番号3は、Fab 0088の重鎖(HC)のアミノ酸配列を表す。

配列番号4は、Fab 0088の軽鎖(LC)のアミノ酸配列を表す。

配列番号5は、Fab 0094の重鎖(HC)のアミノ酸配列を表す。

配列番号6は、Fab 0094の軽鎖(LC)のアミノ酸配列を表す。

配列番号7は、Fab 0095の重鎖(HC)のアミノ酸配列を表す。

配列番号8は、Fab 0095の軽鎖(LC)のアミノ酸配列を表す。

配列番号9は、Fab 0089の重鎖(HC)のアミノ酸配列を表す。

配列番号10は、Fab 0089の軽鎖(LC)のアミノ酸配列を表す。

配列番号11は、mAb 22F66の重鎖可変ドメイン(VH)のアミノ酸配列を表す。

配列番号12は、mAb 22F66の軽鎖可変ドメイン(VL)のアミノ酸配列を表す。

配列番号13は、mAb 22F71の重鎖可変ドメイン(VH)のアミノ酸配列を表す。

配列番号14は、mAb 22F71の軽鎖可変ドメイン(VL)のアミノ酸配列を表す。

配列番号15は、mAb 22F74の重鎖可変ドメイン(VH)のアミノ酸配列を表す。

配列番号16は、mAb 22F74の軽鎖可変ドメイン(VL)のアミノ酸配列を表す。

配列番号17～21は、プライマーのスクレオチド配列を表す。

配列番号22は、mAb 1F91の重鎖可変ドメイン(VH)のアミノ酸配列を表す。

配列番号23は、mAb 1F91の軽鎖可変ドメイン(VL)のアミノ酸配列を表す。

10

20

30

40

50

配列番号24は、mAb 2F3の重鎖可変ドメイン(VH)のアミノ酸配列を表す。

配列番号25は、mAb 2F3の軽鎖可変ドメイン(VL)のアミノ酸配列を表す。

配列番号26は、mAb 2F22の重鎖可変ドメイン(VH)のアミノ酸配列を表す。

配列番号27は、mAb 2F22の軽鎖可変ドメイン(VL)のアミノ酸配列を表す。

配列番号28は、mAb 2F35の重鎖可変ドメイン(VH)のアミノ酸配列を表す。

配列番号29は、mAb 2F35の軽鎖可変ドメイン(VL)のアミノ酸配列を表す。

配列番号30は、mAb 2F45の重鎖可変ドメイン(VH)のアミノ酸配列を表す。

配列番号31は、mAb 2F45の軽鎖可変ドメイン(VL)のアミノ酸配列を表す。

配列番号32は、mAb 2021の重鎖可変ドメイン(VH)のアミノ酸配列を表す。

配列番号33は、mAb 2021の軽鎖可変ドメイン(VL)のアミノ酸配列を表す。

配列番号34は、mAb 0094の重鎖可変ドメイン(VH)のアミノ酸配列を表す。

配列番号35は、mAb 0094の軽鎖可変ドメイン(VL)のアミノ酸配列を表す。

配列番号36は、mAb 0095の重鎖可変ドメイン(VH)のアミノ酸配列を表す。

配列番号37は、mAb 0095の軽鎖可変ドメイン(VL)のアミノ酸配列を表す。

配列番号38は、mAb 4F110の重鎖可変ドメイン(VH)のアミノ酸配列を表す。

配列番号39は、mAb 4F110の軽鎖可変ドメイン(VL)のアミノ酸配列を表す。

配列番号40は、Fab 2F22の重鎖(HC)のアミノ酸配列を表す。

配列番号41は、Fab 2F22の軽鎖(LC)のアミノ酸配列を表す。

配列番号42は、mAb 22F132の重鎖可変ドメイン(VH)のアミノ酸配列を表す。

配列番号43は、mAb 22F132の軽鎖可変ドメイン(VL)のアミノ酸配列を表す。

配列番号44は、mAb 22F79の重鎖可変ドメイン(VH)のアミノ酸配列を表す。

配列番号45は、mAb 2F79の軽鎖可変ドメイン(VL)のアミノ酸配列を表す。

配列番号46は、mAb 41F41の重鎖可変ドメイン(VH)のアミノ酸配列を表す。

配列番号47は、mAb 41F41の軽鎖可変ドメイン(VL)のアミノ酸配列を表す。

配列番号48は、mAb 4F110の重鎖(HC)のアミノ酸配列を表す。

配列番号49は、mAb 4F110の軽鎖(LC)のアミノ酸配列を表す。

配列番号50は、mAb 2021の重鎖(HC)のアミノ酸配列を表す。

配列番号51は、mAb 2021の軽鎖(LC)のアミノ酸配列を表す。

配列番号52は、Fab 0296の重鎖(HC)のアミノ酸配列を表す。

配列番号53は、Fab 0296の軽鎖(LC)のアミノ酸配列を表す。

配列番号54は、mAb 0094の重鎖(HC)のアミノ酸配列を表す。

配列番号55は、mAb 0094の軽鎖(LC)のアミノ酸配列を表す。

配列番号56は、mAb 0095の重鎖(HC)のアミノ酸配列を表す。

配列番号57は、mAb 0095の軽鎖(LC)のアミノ酸配列を表す。

配列番号58は、Fab 0313の重鎖(HC)のアミノ酸配列を表す。

配列番号59は、Fab 0313の軽鎖(LC)のアミノ酸配列を表す。

配列番号60は、mAb 41F30の重鎖可変ドメイン(VH)のアミノ酸配列を表す。

配列番号61は、mAb 41F30の軽鎖可変ドメイン(VL)のアミノ酸配列を表す。

配列番号62は、標識をつけたTFPI KPI-1/N末端のアミノ酸配列を表す。

配列番号63は、mAb 0309の重鎖(HC)のアミノ酸配列を表す。

配列番号64は、mAb 0309の軽鎖(LC)のアミノ酸配列を表す。

配列番号65は、mAb 0312の重鎖(HC)のアミノ酸配列を表す。

配列番号66は、mAb 0312の軽鎖(LC)のアミノ酸配列を表す。

配列番号67は、mAb 0325の重鎖1(HC1)のアミノ酸配列を表す。

配列番号68は、mAb 0325の軽鎖1(LC1)のアミノ酸配列を表す。

配列番号69は、mAb 0325の重鎖2(HC2)のアミノ酸配列を表す。

配列番号70は、mAb 0325の軽鎖2(LC2)のアミノ酸配列を表す。

10

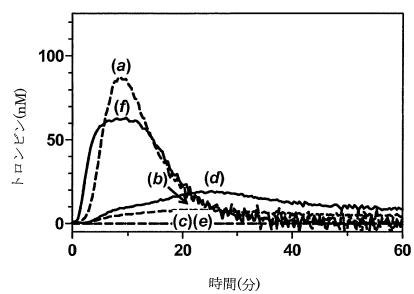
20

30

40

【図1】

Fig. 1



【図2】

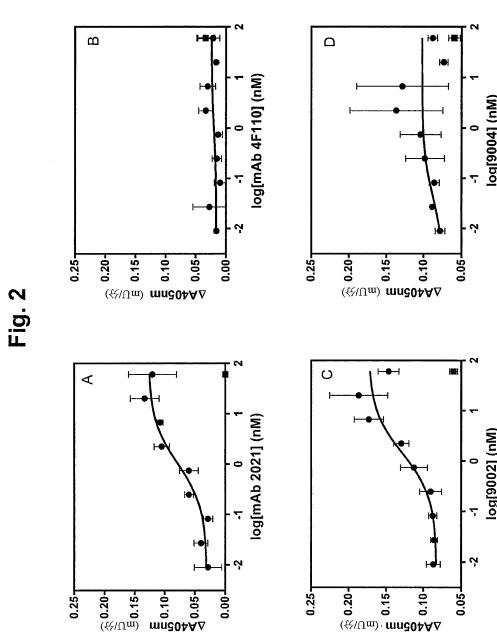
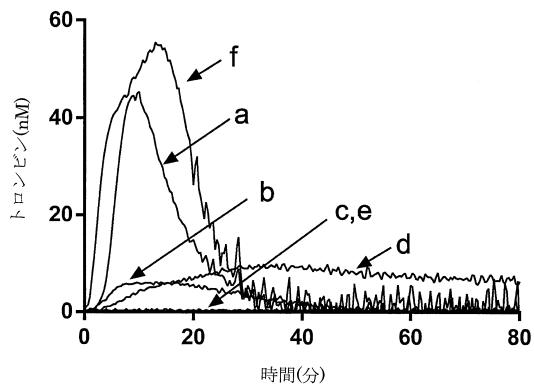


Fig. 2

【図3】

Fig. 3



【配列表】

0006586016000001.app

---

フロントページの続き

(72)発明者 ミケール・コフォード・ハンセン  
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 イーダ・ヒルデン  
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 ヘレ・ハイブロク・ペーテルゼン  
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 ラース・クリスチャン・ペーテルゼン  
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 イエンス・ブラインホルト  
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 戸来 幸男

(56)参考文献 国際公開第2012/135671(WO,A2)  
国際公開第2012/001087(WO,A1)  
国際公開第2010/072691(WO,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 16/00-16/46  
Caplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/  
WPIDS(STN)  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)  
PubMed