

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4398648号
(P4398648)

(45) 発行日 平成22年1月13日(2010.1.13)

(24) 登録日 平成21年10月30日(2009.10.30)

(51) Int.Cl.

F 1

C O 7 K 16/40 (2006.01)

C O 7 K 16/40

C 1 2 P 21/08 (2006.01)

C 1 2 P 21/08

C 1 2 N 15/02 (2006.01)

C 1 2 N 15/00

C

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/00

B

C 1 2 N 9/64 (2006.01)

C 1 2 N 9/64

Z

請求項の数 14 (全 7 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-30238 (P2003-30238)
 (22) 出願日 平成15年2月7日(2003.2.7)
 (65) 公開番号 特開2003-286300 (P2003-286300A)
 (43) 公開日 平成15年10月10日(2003.10.10)
 審査請求日 平成18年1月26日(2006.1.26)
 (31) 優先権主張番号 10205520.3
 (32) 優先日 平成14年2月8日(2002.2.8)
 (33) 優先権主張国 ドイツ(DE)

微生物の受託番号 DSM ACC2533

前置審査

(73) 特許権者 597070264
 ツェー・エス・エル・ベアリング・ゲー・
 エム・ペー・ハー
 ドイツ連邦共和国D-35041 マルブ
 ルク・エミル・フォン・ベアリング・シュ
 トラーセ 76
 (74) 代理人 100127926
 弁理士 結田 純次
 (74) 代理人 100105290
 弁理士 三輪 昭次
 (74) 代理人 100140132
 弁理士 竹林 則幸
 (72) 発明者 ユアゲン・レーミシュ
 オーストリア国2331フェーゼンドルフ
 ・ラクセンブルガーシュトラーセ152
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血液凝固第V因子活性化プロテアーゼに対する抑制性モノクローナル抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ハイブリドーマ細胞株DSM ACC 2533によって産生されるモノクローナル抗体。

【請求項2】

受託番号DSM ACC 2533で寄託されたハイブリドーマ細胞株。

【請求項3】

請求項1に記載のモノクローナル抗体の結合特異性を有する単鎖抗体。

【請求項4】

担体タンパク質と結合している請求項3に記載の単鎖抗体。

【請求項5】

請求項1に記載のモノクローナル抗体の結合特異性を有するヒト化抗体。

【請求項6】

請求項1に記載のモノクローナル抗体と共に、血液凝固第VII因子活性化プロテアーゼおよびそのプロ酵素を含有する調製物。

【請求項7】

血液凝固第VII因子活性化プロテアーゼおよびそのプロ酵素を抑制する請求項1に記載のモノクローナル抗体を含む血液凝固第VII因子調製物。

【請求項8】

請求項1に記載のモノクローナル抗体と共に、血液凝固第V因子、血液凝固第VIII因子

またはフィブリノゲンを含有する調製物。

【請求項 9】

請求項 1 に記載のモノクローナル抗体を含有する、血液の凝固能を低下させる医薬調製物。

【請求項 10】

血液凝固第VII因子活性化プロテアーゼの活性を測定する方法であって、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体を被検サンプルに添加して血液凝固第VII因子活性化プロテアーゼのアミド分解活性を抑制し、ついで、該被検サンプル中に残留するアミド分解活性を測定する、前記測定方法。

【請求項 11】

請求項 1 に記載のモノクローナル抗体を免疫吸着物質として用いる、血液凝固第VII因子活性化プロテアーゼまたはそのプロ酵素の調製方法。

【請求項 12】

血液凝固第VII因子活性化プロテアーゼが得られる出発物質に、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体が添加される、血液凝固第VII因子活性化プロテアーゼまたはそのプロ酵素の調製方法。

【請求項 13】

血栓症のリスクの低下、および血液凝固第VII因子活性化プロテアーゼまたはそのプロ酵素の含有量が増加した血液の凝固能の低下を目的とする請求項 1 に記載のモノクローナル抗体を含有する医薬。

【請求項 14】

フィブリン含有血栓によって生じる疾患の治療を目的とする請求項 1 に記載のモノクローナル抗体を含有する医薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、第VII因子活性化プロテアーゼまたはそのプロ酵素を特異的に抑制するが、他のプロテアーゼのタンパク質分解特性を損なわないモノクローナル抗体に関する。

【0002】

【従来技術】

プロテアーゼは、生物で活性酵素をそれらの前駆体（プロ酵素）から遊離させる場合に決定的な機能を有することが判明している。しかしながら、プロテアーゼは、さらに活性化された酵素を再び分解する特性もまた有し、したがって前記酵素はほんの短時間後に再び不活性になる。安定化された医薬調製物を製造するために、したがって特定のプロテアーゼの活性を抑制することがしばしば必要である。

【0003】

したがってプロテアーゼによってもたらされる分解に対して安定化させることは、血液凝固因子を含む医薬調製物の場合でも、そのような調製物の有効性を特に比較的長期の保存期間の後でさえも担保するために重要な作業である。

【0004】

血液凝固系は、血漿に存在する凝固因子で構成される 2 つの異なるカスケード様の活性化経路を含む。発動メカニズムに応じて、内因性または外因性ルートのどちらかが優先的に凝固開始に機能する。

【0005】

組織の損傷では、トロンボプラスチン（組織因子、TF）が外因性凝固ルートのイニシエーターとして表面に露出される。第VII凝固因子（FVII）は、循環中の活性化FVII（FVIIa）と同様に、膜結合トロンボプラスチンと結合する。カルシウムイオンおよび脂質の存在下で、このTF-FVIIa複合体はFXを固定させ、前記を限定的タンパク質分解によりその活性化型（FXa）に変換する。プロトロンビンからトロンビンへ活性化させることにより、FXaは順にフィブリンを形成させ、したがって最終的には創傷の閉鎖をもたらす。

【0006】

FVIIaは、健常者の血漿中に非常に低濃度で見出される。しかも、血中で循環するFVIIaの理由および起源についてはほとんど分かっていない。微量の発現トロンボプラスチンまたは細胞崩壊時に放出されるトロンボプラスチンが血中で役割を果たすことができるであろう。

【0007】

ドイツ公開公報第19903693号は、FVII活性化プロテアーゼ（FSA P (Factor Seven-Activating Protease)とも称される）について開示している。前記の特性のために、FSA Pは血液凝固を促進し、出血誘発性合併症の医薬として用いることができる。

【0008】

FSA Pはプロ酵素（単鎖FSA P、scFSA P）として血漿中に存在する。前記プロ酵素は調製中に活性化されるので、公知のクロマトグラフィーによる方法を用いて、主に2つの鎖をもつ活性化形のプロテアーゼ（二鎖FSA P、tcFSA P）のみを得ることができる。この活性化は他のプロテアーゼ、例えばウロキナーゼによって生じるが、また自己触媒によっても生じることがある。活性化FSA Pは、それ自身をタンパク質分解により不活化することができる。したがって、特にscFSA Pの調製は困難であるが、完全なtcFSA Pの調製もまた簡単ではない。FSA Pを調製する最適な方法は、ドイツ公開公報第13937218号および13937219号に記載されている。この場合の方法で重要な工程は、マトリックス結合モノクローナル抗体との免疫吸着および溶出液を安定化させるための特別な条件である。しかしながら、免疫吸着でも、たとえ少量であってもtcFSA Pの生成を回避するために可能なかぎり迅速に作業するように注意が必要である。前記は、多価プロテアーゼ抑制物質（例えばアプロチニン、C1-エステラーゼ抑制物質または-2アンチプラスミン）の代わりに、FSA Pの活性化もしくは自己活性化のみを防止または減少させる特異的モノクローナル抗体を調製中に使用することによってもっとも良好に達成される。

【0009】

【発明が解決しようとする課題および課題を解決するための手段】

本発明は、したがって血液凝固第VII因子活性化プロテアーゼまたはそのプロ酵素を抑制するモノクローナル抗体に関する。ハイブリドーマ細胞株DSM ACC 2533によって産生されるモノクローナル抗体は、特に前記目的に適している。前記のようなモノクローナル抗体が血液凝固第VII因子活性化プロテアーゼまたはそのプロ酵素に添加されると、後者はそれによって抑制される。上記のモノクローナル抗体を含む第VII因子調製物は、第VII因子活性化プロテアーゼおよびそのプロ酵素に抑制により安定化される。

【0010】

本発明の抗体はまた、調製用および分析用用途にも用いることができる。実際、ドイツ公開公報第19903693号は、FSA Pが、血液凝固第VIII/VIIIa因子およびV/Va因子をプロテアーゼ濃度およびインキュベーション時間に依存する態様でインキュベーション中に不活化する特性をもつことを開示している。FSA Pの作用が本発明の抗体の添加によって抑制されるならば、本発明の抗体は前記血液凝固因子をタンパク質分解から保護することになる。さらにまた、本発明の抗体を添加することによってフィブリノゲン溶液を安定化させることができる。

【0011】

本発明の抑制性抗体は、それをプロテアーゼ含有溶液に添加したとき、タンパク質分解作用がFSA Pに起因するのか別のプロテアーゼに起因するのかをFSA Pの選択的抑制により検出することができるという事実によって、診断的使用の可能性の道を開いた。特にこの方法は、活性化FSA Pによって、またはFSA P活性化ウロキナーゼのアミド分解活性を測定することによって、FSA P活性をベースにする全てのアッセイ系（例えば色素形成基質の切断）に応用することができる。

【0012】

さらに本発明の抑制性抗体はまた、特定の疾患の場合に予防的または治療的に有用である。したがって、例えばFSA Pの血中含有量の増加は血液の前凝固特性を高め、したがっ

10

20

30

40

50

て血栓症のリスクが増す。抑制性抗体の投与は血液の凝固能力を低下させ、したがって血栓症のリスクを低下させることができる。

【 0 0 1 3 】

ドイツ公開公報第19903693号は、血液凝固第VII因子活性化プロテアーゼを含有する医薬調製物の具体的なフィブリン溶解作用を記載している。前記プロテアーゼはしたがって、フィブリン含有血栓によって生じる疾患の治療にも使用することができる。このことから、F S A Pの濃度が高いと続いて出血傾向が生じるかまたは増加する可能性があるが、これは抑制性モノクローナル抗体によって防止または減少させることができるといえる。これによってまた、創傷治癒に対する副作用または癌の発生を抑制することができる。

【 0 0 1 4 】

F S A Pに対する抑制性モノクローナル抗体の上記のような多様な応用は、s c F S A P活性化を防止し、したがってその後のt c F S A Pの生成を妨げる前記抗体によって達成される。これまでに知られているF S A Pの特性の多くはt c F S A Pによって仲介されるので、s c F S A Pの抑制はF S A P作用を阻止するために十分である。

【 0 0 1 5 】

本発明にしたがってハイブリドーマ細胞D S M A C C 2 5 3 3から得られるモノクローナル抗体は、したがって非常に効率的にt c F S A P活性を抑制するが、またs c F S A Pの自己活性化もまた抑制する。もちろん、前記モノクローナル抗体は、ヒトで予防薬または治療薬として用いる前にヒト化されねばならない。これらの方法は周知であり、ここで詳細に記載しようとするものではない。

【 0 0 1 6 】

さらにまた、ドイツ特許出願第10052319.6号では、血液凝固第VII因子活性化プロテアーゼ(F S A P)の他に、検査した全血液提供者の5から10%でF S A P変異体が存在していることが既に記載されている。前記変異体は、s c u P A活性化に関して活性をもたず、さらにそのアミノ酸配列はアミノ酸393位にG l u / G l n交換およびG l y / G l u交換を示す。この一ヌクレオチド多形現象(= S N P)は、プロプラスミノゲン活性化因子の活性化の低下と密接に関係し、したがってフィブリン溶解能の低下および血栓症のリスク増加と関連する。前記リスクを減少させるために、欧州特許出願第01115691.6号は野生型F S A Pの投与を提唱している。

【 0 0 1 7 】

今や本発明は、抑制性モノクローナル抗体を投与することによってF S A Pおよび変異体もまた抑制し、それによって潜在的血栓症または塞栓症を減少させる可能性を提供する。他方、FVII活性化特性は低下しているがそのフィブリン溶解能力は増加しているF S A P変異体は、本発明の抑制性モノクローナル抗体を投与することによって出血傾向の潜在的増加の治療に利用することができる。

【 0 0 1 8 】

ハイブリドーマ細胞株D S M A C C 2 5 3 3は以下のように特定および調製された：3匹のマウスをF S A Pで免疫した。1匹のマウスの脾臓細胞をネズミのミエローマ細胞株S P 2 / 0 - A g 1 4と、融合試薬としてポリエチレングリコール4000を用いて融合させた。細胞を24穴(ウェル)の培養プレートに分注した。使用した培養液は、ダルベッコ改変イーグル培養液(Dulbecco modified Eagle's Medium)で10%ウシ胎児血清および選別用H A Tを含んでいた。約2週間後に、増殖している細胞クローンを48ウェルの培養プレートに移し、コードを付与した。1728個の増殖細胞クローンの上清をE L I S AによってマウスI g Gの存在についてアッセイした。マウスI g G陽性上清は、固定F S A Pを用いて特異性についてテストした。アッセイしたクローンのうち108個がF S A Pについて特異的であると同定された。更なる実験によって、ハイブリドーマ細胞株D S M A C C 2 5 3 3由来のモノクローナル抗体の抑制特性を精査した。前記抗体はI g G 1型である。

【 0 0 1 9 】

ハイブリドーマ細胞株D S M A C C 2 5 3 3由来のモノクローナル抗体は、t c F S

10

20

30

40

50

A Pのタンパク分解活性を抑制する。したがって、前記抗体は第VII因子またはプロウロキナーゼを活性化するF S A Pの能力を抑制するだけでなく、F S A Pの自己活性化を妨げる。

以下の実施例で本発明をさらに詳述する。

【0020】

【実施例】

実施例1：DSM ACC 2533由来のモノクローナル抗体のscFSA P（自己）活性化に対する作用

クエン酸血漿の再カルシウム添加によって凝固が活性化され、最終的にフィブリン凝塊が生成される。前記的环境下では、scFSA Pは、とにかくも長時間後にのみ活性化される。“活性化因子との接触”または硫酸デキストランの添加による反応性表面の刺激によって、scFSA Pはまた血漿環境下で活性化される。これは、SDS-PAGEおよびウェスタンブロット分析により非常に明瞭に示すことができる。この目的のために、硫酸デキストランを添加した再カルシウム添加サンプルを種々の時間インキュベートし、続いて可能な最良の方法でSDS-PAGEを実施できるように、当業者に周知の“真性グロブリン”沈殿に付した。前記のようにして、サンプルのタンパク質濃度を低下させバンドパターンがスメア化するのを防止する。このようにして得たサンプルに還元剤を添加し、それによってscFSA P活性化から生じる重鎖および軽鎖tcFSA Pをはるかに容易に特定する。SDS-PAGEによって得られたバンドパターンをニトロセルロースに移動（プロットイング）させた後、ドイツ特許出願第10036641.4号に記載された標識モノクローナル抗体DSM ACC 2453およびDSM ACC 2454を用いて2つのtcFSA Pバンドを検出する。

【0021】

この実験の結果として、プロット上のscFSA Pの消失および2つのtcFSA P鎖の増加が観察される。tcFSA Pの軽鎖はFSA Pの活性部位を含み、血漿をインキュベートしている間に対応するインヒビタータンパク質（例えばC1-エステラーゼ抑制物質または-2アンチプラスミン）と反応し、より困難であるが最終的には（擬似二価）複合体として検出用モノクローナル抗体によって認識されるので、時には重鎖のみが可視化されることもある。

【0022】

DSM ACC 2533から得られたモノクローナル抗体を上記の血漿サンプルに添加し、上記のようにscFSA P活性化を観察するならば、コントロール（前記モノクローナル抗体を添加されていないか、または非抑制性モノクローナル抗体が添加されている）とは対照的に、高分子量バンド（一鎖形）の消失、およびそれに対応する、tcFSA P重鎖（および軽鎖）の出現は観察されない。したがって、ハイブリドーマ細胞株DSM ACC 2533に由来するモノクローナル抗体はscFSA Pに結合し、それによってscFSA Pの活性化を妨げている。

【0023】

前記作用を定量することによって、前記抗体は、scFSA P活性化の抑制について極めて強力なモノクローナル抗体であることが示された。FSA Pと等しいモル量でも顕著に活性化を低下させ、このことは、本抑制性モノクローナル抗体を非常に有用な診断薬および調製用賦形剤にする。比較的低濃度での高い有効性は、ヒトでの投与における本モノクローナル抗体の使用を魅力的なものにする。

【0024】

実施例2：ハイブリドーマ細胞株DSM ACC 2533由来の抑制性モノクローナル抗体による活性tcFSA Pの抑制

ドイツ特許出願第19903693号で記載されているように、FSA Pの活性は種々のアッセイ系でテストすることができる。プラスミノゲン-活性化因子プロ酵素またはFVIIの対応する凝固促進による活性化の他に、例えば、FV、FVIII、FIXまたはフィブリンノーゲンの不活化速度をモニターすることも可能である。これらのアッセイ系で、その抑制特性につい

10

20

30

40

50

て本発明の抑制性モノクローナル抗体をテストした。

【 0 0 2 5 】

その結果、ハイブリドーマ細胞株 D S M A C C 2 5 3 3 由来の抑制性モノクローナル抗体は、上記の血液凝固因子に対する t c F S A P の活性を強力な態様で抑制する。このことはまた、t c F S A P へのその活性化、したがってアミド分解活性を有する形態への変換が妨げられる s c F S A P についても上記実施例 1 で示したように事実である。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)		A 6 1 K 39/395	P
A 6 1 P 7/02 (2006.01)		A 6 1 P 7/02	
G 0 1 N 33/573 (2006.01)		G 0 1 N 33/573	A
G 0 1 N 33/577 (2006.01)		G 0 1 N 33/577	B
C 1 2 R 1/91 (2006.01)		C 1 2 P 21/08	
		C 1 2 R 1:91	

- (72)発明者 ヴィーガンツ・ラング
ドイツ連邦共和国 3 5 0 9 1 ケルベ . アカーツィエンヴェーク 2
- (72)発明者 アネッテ・フォイスナー
ドイツ連邦共和国 3 5 0 4 3 マルブルク . ランゲヴィーゼンヴェーク 1 0
- (72)発明者 グードルーン・ムート - ナウマン
ドイツ連邦共和国 3 5 0 8 3 ヴェター . タールブリック 2
- (72)発明者 ハンス - アルノルト・シュテーア
ドイツ連邦共和国 3 5 0 8 3 ヴェター . シュールシュトラッセ 6 6
- (72)発明者 クリスティアン・カネマイアー
ドイツ連邦共和国 3 5 3 9 0 ギーセン . ノイシュタット 1 9
- (72)発明者 クラウス・ブライスナー
ドイツ連邦共和国 3 5 3 9 4 ギーセン . タネンヴェーク 1 0
- (72)発明者 中澤 文恵
東京都文京区小石川 4 - 1 7 - 1 9 2 0 2 号

審査官 飯室 里美

- (56)参考文献 Blood Coagulation and Fibrinolysis , 2 0 0 1 年 , Vol.12 , p.375-383
Pharm Acta Helv , 1 9 9 3 年 , Vol.68, No.1 , p.3-20
J ViroL. , 1 9 9 1 年 , Vol.65, No.7 , p.3667-3675

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C07K 16/40
A61K 39/395
A61P 7/02
C12N 5/10
C12N 9/64
C12N 15/02
C12P 21/08
G01N 33/573
G01N 33/577
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)