

(19)日本国特許庁(JP)

**(12)特許公報(B2)**

(11)特許番号  
**特許第7084878号**  
**(P7084878)**

(45)発行日 令和4年6月15日(2022.6.15)

(24)登録日 令和4年6月7日(2022.6.7)

(51)国際特許分類

C 1 2 N	15/13 (2006.01)	F I	C 1 2 N	15/13	Z N A
C 0 7 K	16/36 (2006.01)		C 0 7 K	16/36	
C 1 2 N	15/63 (2006.01)		C 1 2 N	15/63	Z
C 1 2 N	1/15 (2006.01)		C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19 (2006.01)		C 1 2 N	1/19	

請求項の数 30 (全64頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2018-560082(P2018-560082)
(86)(22)出願日	平成29年5月16日(2017.5.16)
(65)公表番号	特表2019-527033(P2019-527033)
A)	
(43)公表日	令和1年9月26日(2019.9.26)
(86)国際出願番号	PCT/US2017/032808
(87)国際公開番号	WO2017/200981
(87)国際公開日	平成29年11月23日(2017.11.23)
審査請求日	令和2年4月28日(2020.4.28)
(31)優先権主張番号	62/337,118
(32)優先日	平成28年5月16日(2016.5.16)
(33)優先権主張国・地域又は機関	
米国(US)	
(31)優先権主張番号	62/340,834
(32)優先日	平成28年5月24日(2016.5.24)
	最終頁に続く

(73)特許権者	000002934 武田薬品工業株式会社 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1 号
(74)代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(74)代理人	100181674 弁理士 飯田 貴敏
(74)代理人	100181641 弁理士 石川 大輔
(74)代理人	230113332 弁護士 山本 健策
(72)発明者	フェルケル, ディルク オーストリア国 アー-1220 ウィー ン, シュタドルブライテナー アンガーバー 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗第IX因子Padua抗体

**(57)【特許請求の範囲】****【請求項1】**

配列番号1のアミノ酸配列を含む第IX因子Paduaに結合し、野生型(WT)第IX因子に結合しない、抗体またはその抗原結合性断片であって、前記抗体またはその抗原結合性断片は、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含み、前記重鎖可変領域は、アミノ酸配列SSYAI S(配列番号6)を含むCDR1、アミノ酸配列GIVPAFGTANYAQKFQG(配列番号7)を含むCDR2、および、アミノ酸配列SWGVI SFA Y(配列番号8)を含むCDR3を含み、前記軽鎖可変領域は、アミノ酸配列RASQDISSYLN(配列番号9)を含むCDR1、アミノ酸配列AASN LQS(配列番号10)を含むCDR2、および、アミノ酸配列MQYDSL PFTF(配列番号11)を含むCDR3を含む、抗体またはその抗原結合性断片。

**【請求項2】**

配列番号1のエピトープと結合し、前記エピトープは、アミノ酸配列D R A T C L L S T K F T(配列番号3)内の線状エピトープである、請求項1に記載の抗体または抗原結合性断片。

**【請求項3】**

配列番号1のエピトープに結合し、前記エピトープは、アミノ酸配列L V D R A T C L L S T K F T I Y N N M F C A G F H(配列番号5)のフォールディングされた構造のコンフォメーションアルエピトープである、請求項1に記載の抗体または抗原結合性断片。

**【請求項4】**

前記フォールディングされた構造が、ジスルフィド架橋を含む、請求項 3 に記載の抗体または抗原結合性断片。

**【請求項 5】**

アミノ酸配列（配列番号 2）を含む W T 第 I X 因子に結合しない、請求項 1～4 のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合性断片。

**【請求項 6】**

D R A T C L R S T K F T（配列番号 14）または L V D R A T C L R S T K F T I Y N N M F C A G F H（配列番号 15）のアミノ酸配列に結合しない、請求項 1～5 のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合性断片。

**【請求項 7】**

100 nM またはそれ未満の K<sub>D</sub> で前記第 I X 因子 P a d u a に結合する、請求項 1～6 のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合性断片。

**【請求項 8】**

25 nM～75 nM の範囲の K<sub>D</sub> で前記第 I X 因子 P a d u a に結合する、請求項 7 に記載の抗体または抗原結合性断片。

**【請求項 9】**

50 nM～60 nM の範囲の K<sub>D</sub> で前記第 I X 因子 P a d u a に結合する、請求項 7 に記載の抗体または抗原結合性断片。

**【請求項 10】**

ヒト血漿を含むサンプル中の前記第 I X 因子 P a d u a に結合し、W T 第 I X 因子に結合しない、請求項 1～9 のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合性断片。

20

**【請求項 11】**

前記サンプルは、少なくとも 5 % のヒト血漿を含み、前記サンプルは、少なくとも 5 μg / mL の W T 第 I X 因子を含む、請求項 10 に記載の抗体または抗原結合性断片。

**【請求項 12】**

前記サンプルは、少なくとも 10 % のヒト血漿を含み、前記サンプルは、少なくとも 5 μg / mL の W T 第 I X 因子を含む、請求項 10 に記載の抗体または抗原結合性断片。

**【請求項 13】**

前記サンプルは、少なくとも 20 % のヒト血漿を含み、前記サンプルは、少なくとも 5 μg / mL の W T 第 I X 因子を含む、請求項 10 に記載の抗体または抗原結合性断片。

30

**【請求項 14】**

第 I I 因子ポリペプチド、第 X 因子ポリペプチドまたは第 I I 因子ポリペプチドおよび第 X 因子ポリペプチドの両方に結合しない、請求項 1～13 のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合性断片。

**【請求項 15】**

( i ) F a b または F a b 2' 抗体断片である、( i i ) 単一特異性である、( i i i ) 完全にヒトのものである、( i v ) 二価である、( v ) 二量体化された F a b 断片を含む、( v i ) 二量体化された F a b ミニ抗体を含む、( v i i ) リンカーを介した二量体化された F a b 断片である、請求項 1～14 のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合性断片。

40

**【請求項 16】**

( i ) 配列番号 24 もしくは配列番号 25 のアミノ酸配列、( i i ) 配列番号 24 および 25 のアミノ酸配列、( i i i ) 配列番号 26 もしくは配列番号 27 のアミノ酸配列、あるいは( i v ) 配列番号 26 および 27 のアミノ酸配列を含む、請求項 1～15 のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合性断片。

**【請求項 17】**

配列番号 1 のアミノ酸配列を含む第 I X 因子 P a d u a に結合し、野生型 ( W T ) 第 I X 因子に結合しない抗体の重鎖可変領域と軽鎖可変領域とを含むアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、

前記重鎖可変領域は、アミノ酸配列 S S Y A I S（配列番号 6）を含む C D R 1、アミノ

50

酸配列 G I V P A F G T A N Y A Q K F Q G (配列番号 7) を含む C D R 2、およびアミノ酸配列 S W G V I S F A Y (配列番号 8) を含む C D R 3 を含み、前記軽鎖可変領域は、アミノ酸配列 R A S Q D I S S Y L N (配列番号 9) を含む C D R 1、アミノ酸配列 A A S N L Q S (配列番号 10) を含む C D R 2、およびアミノ酸配列 M Q Y D S L P F T F (配列番号 11) を含む C D R 3 を含み、かつ前記ポリペプチドが、配列番号 1 のアミノ酸配列を含む第IX因子 P a d u a に結合し、野生型 (WT) 第IX因子に結合しない、ポリペプチド。

**【請求項 18】**

異種成分にコンジュゲートした、請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合性断片、あるいは請求項 17 に記載のポリペプチドを含むコンジュゲート。 10

**【請求項 19】**

前記異種成分が、ポリマー、炭水化物、脂質、核酸、オリゴヌクレオチド、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質および検出剤からなる群より選択される、請求項 18 に記載のコンジュゲート。

**【請求項 20】**

前記抗体または抗原結合性断片もしくはポリペプチドが、(i) アガロース、セルロース、デキストラン、ポリアクリルアミド、ラテックスまたは制御多孔質ガラスにコンジュゲートされている、(ii) フルオロフォア、発色団、放射性同位体、酵素標識、またはビオチンにコンジュゲートされている、または(i) および(ii) の両方にコンジュゲートされている、請求項 18 または 19 に記載のコンジュゲート。 20

**【請求項 21】**

請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合性断片、請求項 17 に記載のポリペプチド、請求項 18 ~ 20 のいずれか一項に記載のコンジュゲート、あるいはそれらの断片をコードするヌクレオチド配列を含む核酸。

**【請求項 22】**

請求項 21 に記載の核酸を含むベクター。

**【請求項 23】**

請求項 21 に記載の核酸または請求項 22 に記載のベクターを含む宿主細胞。

**【請求項 24】**

(i) 請求項 1 から 16 のいずれか一項に記載の抗体もしくは抗原結合性断片、請求項 1 7 に記載のポリペプチド、請求項 18 から 20 のいずれか一項に記載のコンジュゲート、請求項 21 に記載の核酸、請求項 22 に記載のベクター、および / または請求項 23 に記載の宿主細胞を含む、キット。 30

**【請求項 25】**

ヒト血漿、もしくはその希釈された画分、および / またはヒト組織もしくはその細胞を含む、ヒトから得られた生体サンプルと混合された、請求項 1 から 16 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片を含む組成物。

**【請求項 26】**

ヒト血漿タンパク質を含む、ヒトから得られた生体サンプルと混合された、請求項 1 から 16 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片を含む組成物であって、前記ヒト血漿タンパク質の少なくとも 1 つは、第IX因子、またはそのバリエント、第I I 因子、および第X因子からなる群より選択される、組成物。 40

**【請求項 27】**

サンプル中の第IX因子 P a d u a を検出するための、請求項 1 から 16 のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合性断片、請求項 17 に記載のポリペプチド、請求項 18 から 20 のいずれか一項に記載のコンジュゲート、請求項 21 に記載の核酸、請求項 22 に記載のベクター、請求項 23 に記載の宿主細胞、および / または請求項 24 に記載のキットの使用。

**【請求項 28】**

被験体から得られたサンプル中の第IX因子 P a d u a を検出する方法であって、(i)

10

20

30

40

50

前記サンプルを、請求項 1 から 16 のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合性断片、請求項 17 に記載のポリペプチド、または請求項 18 から 20 のいずれか一項に記載のコンジュゲートと接触させて、前記第 IX 因子 Padua と、前記抗体、抗原結合性断片、ポリペプチドまたはコンジュゲートとを含む複合体を形成するステップ、および (i) 前記サンプル中の前記複合体を検出するステップを含む、方法。

**【請求項 29】**

前記抗体または抗原結合性断片もしくはポリペプチドが、検出剤および / または固体支持体にコンジュゲートされているか、あるいは前記コンジュゲートが、検出剤を含む、請求項 28 に記載の方法。

**【請求項 30】**

前記サンプルを、検出剤を含む二次抗体と接触させるステップを含み、前記二次抗体は、前記抗体もしくは抗原結合性断片もしくはポリペプチドまたはコンジュゲートに結合する、請求項 28 に記載の方法。

**【発明の詳細な説明】**

**【技術分野】**

**【0001】**

関連出願への相互参照

この特許出願は、米国特許法 § 119 (e) にしたがって、2016年5月16日に出願された米国仮特許出願第 62/337,118 号および 2016 年 5 月 24 日に出願された同第 62/340,834 号（これらの両方は、その全体が参考として本明細書に援用される）に対する優先権を主張する。

**【0002】**

電子的に提出された資料の参照による組み込み

明細書と同時に提出され、2016年5月16日に作成された「50573(SeqList string.txt」と名付けられた 28,804 バイトの ACII (テキスト) ファイルと識別されたコンピューター読み取り可能なヌクレオチド / アミノ酸配列表は、その全体が参照により組み入れられる。

**【背景技術】**

**【0003】**

遺伝子治療は、血友病のための将来的な処置選択肢として大いに有望である。ある臨床試験では、重度の血友病 B を有する被験体は、成熟ペプチド配列の 338 位（またはプレプロタンパク質配列の 384 位）における Arg から Leu の単一のアミノ酸置換を有する FIX の機能亢進性のバリエントである第 IX 因子 (FIX) Padua をコードするアデノ関連ウイルス (AAV) ベクターで処置される。導入遺伝子産物 (FIX Padua) の特異的な検出は、因子置き換えの成功を評価するのに有用であると予想される。しかしながら、一部の患者は第 IX 因子の交差反応物質 (CRM) を有することから、処置された患者における FIX Padua の特異的な検出は課題を残している。一部の CRM 陽性 (CRM+) 患者は、例えば野生型 (WT) 第 IX 因子を発現するが、この因子は現在利用可能な FIX Padua 結合剤と交差反応することから、FIX Padua がこのような CRM+ 患者によって発現されるかどうかを決定することが難しくなっている。

**【発明の概要】**

**【課題を解決するための手段】**

**【0004】**

本明細書は、野生型 FIX への交差反応性を伴うことなく FIX Padua (FIX p) を特異的に認識する結合性構築物を提供する。例示的な実施形態において、結合性構築物は、配列番号 1 のアミノ酸配列を含む FIX Padua に結合し、アミノ酸配列、配列番号 2 を含む WT 第 IX 因子に結合しない、抗体またはその抗原結合性断片である。例示的な実施形態において、結合性構築物は、配列番号 6 ~ 11 の各々を含むアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、任意選択で、(i) 配列番号 6 ~ 11 の各々の間に、1つもしくは複数のアミノ酸が存在し、ならびに / または (ii) ポリペプチドは、任意選択

10

20

30

40

50

で、D Y K D D D D K (配列番号12)を含むF L A Gタグおよび／もしくはH H H H H H (配列番号13)を含むヘキサH i sタグをさらに含み、任意選択で、F L A Gタグおよび／またはヘキサH i sタグは、ポリペプチドのC末端に配置されている、ポリペプチドである。例示的な実施形態において、結合性構築物は、(i)免疫グロブリン重鎖の定常領域、(ii)免疫グロブリン軽鎖の定常領域、または(iii)免疫グロブリン重鎖の定常領域および免疫グロブリン軽鎖の定常領域の両方にコンジュゲートした本明細書に記載される抗原結合性断片を含むコンジュゲートである。例示的な実施形態において、結合性構築物は、異種成分に連結またはコンジュゲートした本明細書に記載される抗体または抗原結合性断片を含むコンジュゲートである。例示的な態様において、コンジュゲートは、ポリマー、炭水化物、脂質、核酸、オリゴヌクレオチド、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、または検出剤にコンジュゲートした本明細書に記載される抗体または抗原結合性断片を含む。

#### 【0005】

加えて、本明細書に記載される抗体、抗原結合性断片、ポリペプチド、コンジュゲート、またはそれらの断片をコードするヌクレオチド配列を含む核酸が提供される。核酸を含むベクターおよび核酸またはベクターを含む宿主細胞が、さらに提供される。

#### 【0006】

本明細書は、関連するキットも、提供する。例示的な実施形態において、キットは、本明細書に記載される抗体、抗原結合性断片、ポリペプチド、コンジュゲート、核酸、ベクター、宿主細胞、またはそれらの組み合わせ、および任意選択で使用のための指示を含む。例示的な態様において、キットはまた、固体支持体も含み、任意選択で、抗体、抗原結合性断片、ポリペプチド、またはコンジュゲートは、固体支持体上にプレコーティングされている。例示的な態様において、キットはまた、キット中に提供される抗体、抗原結合性断片、ポリペプチド、またはコンジュゲートに結合する二次抗体も含む。

#### 【0007】

本発明はさらに、生体サンプル、例えばヒトから得られた生体サンプルと混合された、本明細書に記載される抗体もしくは抗原結合性断片もしくはポリペプチドまたはコンジュゲートを含む組成物を提供する。例示的な態様において、生体サンプルは、ヒト血漿、またはその希釈された画分、および／またはヒト組織もしくはその細胞を含む。例示的な態様において、生体サンプルは、ヒト血漿タンパク質を含み、ヒト血漿タンパク質の少なくとも1つは、第IX因子、第XI因子、および第X因子、ならびにそれらのバリエントからなる群より選択される。任意選択で、組成物は、検出剤を含む。

#### 【0008】

本明細書で提供されるこのような結合性構築物は、例えば、サンプル、例えば野生型F IXを含む、例えば臨床または前臨床サンプル中のF IX P a d u aの、一義的または特異的な検出を可能にする検出方法において有用である。したがって、本明細書は、被験体から得られたサンプル中の配列番号1のアミノ酸配列を含む第IX因子P a d u aを検出する方法を提供する。例示的な実施形態において、本方法は、(i)サンプルを、結合性構築物(例えば、本明細書に記載される抗体、抗原結合性断片、ポリペプチドまたはコンジュゲート)と接触させて、F IX pと結合性構築物とを含む複合体、例えば免疫複合体を形成すること、および(ii)サンプル中の複合体を検出することを含む。本発明の実施形態において、例えば以下の項目が提供される。

##### (項目1)

配列番号1のアミノ酸配列を含む第IX因子P a d u aに結合し、アミノ酸配列(配列番号2)を含む野生型(WT)第IX因子に結合しない、抗体またはその抗原結合性断片。

##### (項目2)

配列番号1のエピトープと結合し、前記エピトープは、アミノ酸配列D R A T C L L S T K F T(配列番号3)内の線状エピトープである、項目1に記載の抗体または抗原結合性断片。

##### (項目3)

10

20

30

40

50

配列番号 1 のエピトープに結合し、前記エピトープは、アミノ酸配列 L V D R A T C L L S T K F T I Y N N M F C A G F H (配列番号 5) のフォールディングされた構造のコンフォメーションエピトープであり、任意選択で前記フォールディングされた構造は、ジスルフィド架橋を含む、項目 1 に記載の抗体または抗原結合性断片。

(項目 4 )

D R A T C L R S T K F T (配列番号 14) または L V D R A T C L R S T K F T I Y N N M F C A G F H (配列番号 15) のアミノ酸配列に結合しない、前述の項目のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合性断片。

(項目 5 )

約 100 nM またはそれ未満の K<sub>D</sub> で前記第 IX 因子 P ad u a に結合する、前述の項目のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合性断片。

10

(項目 6 )

約 25 ~ 約 75 nM の範囲の K<sub>D</sub> で前記第 IX 因子 P ad u a に結合し、任意選択で、約 50 nM ~ 約 60 nM の範囲の K<sub>D</sub> で前記第 IX 因子 P ad u a に結合する、項目 5 に記載の抗体または抗原結合性断片。

(項目 7 )

ヒト血漿を含むサンプル中の前記第 IX 因子 P ad u a に結合し、WT 第 IX 因子に結合せず、任意選択で、前記サンプルは、少なくとももしくは約 5 %、少なくとももしくは約 10 %、または少なくとももしくは約 20 % のヒト血漿を含み、前記サンプルは、少なくともまたは約 5 μg / mL の WT 第 IX 因子を含む、前述の項目のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合性断片。

20

(項目 8 )

第 XI 因子ポリペプチドまたは第 X 因子ポリペプチドに結合せず、任意選択で、第 XI 因子にも第 X 因子にも結合しない、前述の項目のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合性断片。

(項目 9 )

F ab または F ab 2' 抗体断片である、前述の項目のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合性断片。

(項目 10 )

単一特異性である、前述の項目のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合性断片。

30

(項目 11 )

完全にヒトのものである、前述の項目のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合性断片。

(項目 12 )

二価である、前述項目のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合性断片。

(項目 13 )

二量体化された F ab 断片または二量体化された F ab ミニ抗体を含む、前述の項目のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合性断片。

(項目 14 )

リンカーを介した二量体化された F ab 断片である、前述の項目のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合性断片。

40

(項目 15 )

(i) S S Y A I S (配列番号 6) ; G I V P A F G T A N Y A Q K F Q G (配列番号 7) ; S W G V I S F A Y (配列番号 8) ; R A S Q D I S S Y L N (配列番号 9) ; A A S N L Q S (配列番号 10) ; および M Q Y D S L P F T F (配列番号 11) のアミノ酸配列、あるいは (i i) 配列番号 24 もしくは配列番号 25 または配列番号 24 および 25 のアミノ酸配列あるいは (i i i) 配列番号 26 もしくは配列番号 27 または配列番号 26 および 27 のアミノ酸配列を含む、前述の項目のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合性断片。

(項目 16 )

50

配列番号 6 ~ 11 の各々を含むアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、任意選択で、(i) 配列番号 6 ~ 11 の各々の間に、1つもしくは複数のアミノ酸が存在し、ならびに / または (ii) 前記ポリペプチドは、任意選択で、DYKDDDDK (配列番号 12) を含む FLAG タグおよび / もしくは HHHHHHH (配列番号 13) を含むヘキサ His タグをさらに含み、任意選択で、前記 FLAG タグおよび / または前記ヘキサ His タグは、前記ポリペプチドの C 末端に配置されている、ポリペプチド。

(項目 17)

任意選択で、ポリマー、炭水化物、脂質、核酸、オリゴスクレオチド、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質および検出剤からなる群より選択される異種成分にコンジュゲートした、前述の項目のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合性断片もしくはポリペプチドを含むコンジュゲート。

10

(項目 18)

前記抗体または抗原結合性断片もしくはポリペプチドが、アガロース、セルロース、デキストラン、ポリアクリルアミド、ラテックスまたは制御多孔質ガラスにコンジュゲートされている、項目 17 に記載のコンジュゲート。

(項目 19)

前記抗体または抗原結合性断片もしくはポリペプチドが、フルオロフォア、発色団、放射性同位体、酵素標識、またはビオチンにコンジュゲートされている、項目 17 または 18 に記載のコンジュゲート。

20

(項目 20)

項目 14 に記載のポリペプチドのホモ二量体を含み、任意選択で、前記二量体の前記ポリペプチドは、ヘリックス - ターン - ヘリックス構造を介して連結されている、項目 17 から 19 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

(項目 21)

前述の項目のいずれか一項に記載の抗体、抗原結合性断片、ポリペプチド、コンジュゲート、またはそれらの断片をコードするスクレオチド配列を含む核酸。

(項目 22)

項目 21 に記載の核酸を含むベクター。

(項目 23)

項目 21 に記載の核酸または項目 22 に記載のベクターを含む宿主細胞。

30

(項目 24)

(i) 項目 1 から 15 のいずれか一項に記載の抗体もしくは抗原結合性断片、項目 16 に記載のポリペプチド、項目 17 から 20 のいずれか一項に記載のコンジュゲート、項目 21 に記載の核酸、項目 22 に記載のベクター、および / または項目 23 に記載の宿主細胞、および任意選択で使用のための指示、ならびに任意選択で (ii) (i) の抗体、抗原結合性断片、ポリペプチド、もしくはコンジュゲートに結合する二次抗体を含む、キット。

(項目 25)

固体支持体をさらに含む、項目 24 に記載のキット。

(項目 26)

前記抗体、抗原結合性断片、ポリペプチドまたはコンジュゲートが、前記固体支持体上にプレコーティングされている、項目 25 に記載のキット。

40

(項目 27)

前記固体支持体が、ポリマービーズ、マイクロタイタープレート、膜、またはフィルターである、項目 25 または 26 に記載のキット。

(項目 28)

約 100 ng またはそれより多く、約 150 ng またはそれより多く、約 200 ng またはそれより多く、約 500 ng またはそれより多くの前記抗原結合性断片を含む溶液でプレコーティングされた固体支持体を含む、項目 26 または 27 に記載のキット。

(項目 29)

50

ヒト血漿、もしくはその希釈された画分、および／またはヒト組織もしくはその細胞を含む、ヒトから得られた生体サンプルと混合された、項目1から15のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片を含む組成物であって、任意選択で、検出剤を含む組成物。

(項目30)

ヒト血漿タンパク質を含む、ヒトから得られた生体サンプルと混合された、項目1から15のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片を含む組成物であって、前記ヒト血漿タンパク質の少なくとも1つは、第IX因子、またはそのバリエント、第XI因子、および第X因子からなる群より選択され、任意選択で、前記組成物は検出剤を含む、組成物。

10

(項目31)

サンプル中の第IX因子Paduaを検出するための、項目1から15のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合性断片、項目16に記載のポリペプチド、項目17から20のいずれか一項に記載のコンジュゲート、項目21に記載の核酸、項目22に記載のベクター、項目23に記載の宿主細胞、および／または項目24から27のいずれか一項に記載のキットの使用。

(項目32)

被験体から得られたサンプル中の第IX因子Paduaを検出する方法であって、(i)前記サンプルを、項目1から15のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合性断片、項目16に記載のポリペプチド、または項目17から20のいずれか一項に記載のコンジュゲートと接触させて、前記第IX因子Paduaと、前記抗体、抗原結合性断片、ポリペプチドまたはコンジュゲートとを含む複合体を形成するステップ、および(ii)前記サンプル中の前記複合体を検出するステップを含む、方法。

20

(項目33)

前記抗体または抗原結合性断片もしくはポリペプチドが、検出剤および／または固体支持体にコンジュゲートされているか、あるいは前記コンジュゲートが、検出剤を含む、項目32に記載の方法。

(項目34)

前記サンプルを、検出剤を含む二次抗体と接触させるステップを含み、前記二次抗体は、前記抗体もしくは抗原結合性断片もしくはポリペプチドまたはコンジュゲートに結合する、項目32に記載の方法。

30

(項目35)

前記複合体を検出するステップが、前記検出剤のシグナルを検出することを含む、項目33または34に記載の方法。

(項目36)

前記シグナルが、酵素活性、結合活性および／または色素形成活性である、項目35に記載の方法。

(項目37)

前記サンプルが、血液サンプル、血清サンプル、または血漿サンプルである、項目32から36のいずれか一項に記載の方法。

40

(項目38)

前記被験体が、第IX因子Paduaをコードするヌクレオチド配列を含むベクターで処置されている、項目32から37のいずれか一項に記載の方法。

(項目39)

本明細書に記載の結合性構築物。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】図1は、WT第IX因子およびFIX Paduaのアミノ酸配列の略図を表す。

【0010】

【図2】図2は、5 μg / mlのBC1(Z軸に最も近い(すなわち左側の)青色のバー

50

)、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  の B C 1 (青色のバーの右の赤色のバー)、 $0.2 \mu\text{g}/\text{ml}$  の B C 1 (赤色のバーに隣接する緑色のバー)または $0.04 \mu\text{g}/\text{ml}$  の B C 1 でコーティングされた N i 2 + プレートに対する、 F I X P a d u a の (左のパネル) または W T 第 I X 因子 (右のパネル) の結合シグナルのグラフを表す。

【0011】

【図3】図3は、 F I X P a d u a の示された濃度に対する、 M a x i S o r p プレート上にコーティングされた B C 1 (三角形)、 B C 2 (ひし形)、または B C 3 (四角形) の結合シグナルのグラフを表す。

【0012】

【図4】図4は、 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$  の W T 第 I X 因子を含有しベンズアミジンを含まない 5 % ヒト血漿溶液中の F I X P a d u a の示された濃度に対する B C 1 の結合シグナルのグラフを表す。

10

【0013】

【図5】図5は、2 % の B S A / P B S (ひし形)、 $50 \text{mM}$  のベンズアミジンを含有する 5 % 血漿溶液 (四角形)、 $50 \text{mM}$  のベンズアミジンを含有する 10 % 血漿溶液 (三角形)、または $50 \text{mM}$  のベンズアミジンを含有する 20 % 血漿溶液 (x) 中の、 F I X P a d u a の示された濃度に対する B C 1 の結合シグナルのグラフを表す。

【0014】

【図6】図6は、 W T 第 I X 因子および $50 \text{mM}$  のベンズアミジンを含む 20 % (v/v) 血漿溶液中の、 F I X P a d u a の示された濃度に対する B C 1 (四角形)、 B C 2 (三角形)、 B C 4 (ひし形)、または陰性対照 (x) の結合シグナルのグラフを表す。

20

【0015】

【図7】図7は、凝固因子： F I X P a d u a (ひし形)；第 I I 因子 (四角形)；および第 X 因子 (三角形) の示された濃度に対する、 B C 1 (左のパネル) および B C 4 (右のパネル) の結合シグナルの 2 つのグラフを表す。

【0016】

【図8】図8は、 W T 第 I X 因子 (ひし形) または F I X P a d u a (四角形) の示された濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) に対する、 B C 5 (左のパネル) および B C 6 (右のパネル) の結合シグナルの 2 つのグラフを表す。

30

【0017】

【図9】図9は、実施例2に記載される E L I S A の構成要素の略図を表す。

【0018】

【図10】図10は、実施例1に記載される E L I S A の構成要素の略図を表す。

【0019】

【図11】図11は、 F I X P a d u a を含有するサンプル (丸) または参照ヒト血漿サンプル (ひし形) を使用した F I X P a d u a の E L I S A の濃度 - 応答曲線のグラフを表す。

【0020】

【図12】図12は、 F I X P a d u a の示された量の 6 つの標準 (標準 D 1 ~ D 6 ) を使用した F I X P a d u a の E L I S A の較正曲線のグラフを表す。

40

【0021】

【図13】図13は、緩衝液または正常な血漿もしくは F I X 欠乏血漿中の F I X P a d u a を使用した F I X P a d u a の E L I S A の希釈 - 応答曲線のグラフを表す。

【0022】

【図14】図14は、クエン酸塩加サル血漿サンプルを使用した F I X P a d u a の E L I S A の希釈 - 応答曲線のグラフを表す。

【0023】

【図15】図15は、 F I X P a d u a を発現する A A V 2 / 8 ウイルスベクターで処置した後の、 F I X 交差反応物質を有する被験体 (C R M + ) のサンプルの凝固活性およびタンパク質測定のグラフを表す。

50

## 【0024】

【図16】図16は、F IX Paduaを発現するAAV2/8ウイルスベクターで処置した後の、F IX交差反応物質を有する第2の被験体(CRM+)のサンプルの凝固活性およびタンパク質測定のグラフを表す。

## 【0025】

【図17】図17は、F IX Paduaを発現するAAV2/8ウイルスベクターで処置した後の、F IX交差反応物質を有しない被験体(CRM+)のサンプルの凝固活性およびタンパク質測定のグラフを表す。

## 【0026】

【図18】図18は、F IX濃度の関数としてのシグナルのグラフを表し、シグナルは、  
F IX Padua特異的な色素形成活性アッセイによって生成される。 10

## 【0027】

【図19】図19は、F IX Padua特異的なFabの生成に関する戦略の略図、ならびに使用されたパニングおよびブロッキングペプチドの配列を表す(F IX Padua中のL338は、赤色と囲みで示され、F IX wt中のR338は、緑色と囲みで示される)。

## 【0028】

【図20】図20は、精製されたミニ抗体(二価Fab)の概略的な構造を表す。

## 【0029】

【図21】図21Aは、ブタF IXaのX線構造を表し、Arg338がブタF IXaの重鎖の表面上に配置されていることを実証し、図21Bは、ヒトF IX Paduaのスキームを表し、Leu338を実証する。 20

## 【0030】

【図22】図22は、精製されたFabはF IX Paduaに特異的に結合し、F IX wt抗原に特異的に結合しないことを実証するグラフを表す。図22は、wtおよびPadua抗原に対する精製された二価FabからのELISAのグラフを表す。異なるパニング戦略から得られた二価Fabを、wtおよびPaduaペプチドならびにタンパク質に対する特異性に関して試験した。結果は、バックグラウンドに対する倍率増加(fold increase)として表され(図22A)、図22Bは、ELISAセットアップのスキームを示す。カラムの順番は、凡例に記載のものと同じである(すなわち、Ab42のカラムは、左側である)。詳細について、実施例5における方法の説明を参照されたい。 30

## 【0031】

【図23】図23は、精製された二価Fabが20%のヒト血漿マトリクス中のF IX wtに対して交差反応性を示さないことを実証するグラフを表す。図23は、20%血漿の存在下での精製された二価FabのELISAのグラフを表す。(図23A)精製された二価Fabをコーティングし、5 μg/mLのF IX wtを含有し、示されたPadua F IX濃度を有する20%のヒト血漿と共にインキュベートした。HRP標識ポリクローナルヤギ抗F IX抗体(100ng/ml)を用いて検出を実行した。(図23B)ELISAセットアップのスキーム。線は、凡例と同じ順番である。 40

## 【0032】

【図24】図24は、選択された候補Ab42の表面プラズモン共鳴(SPR)分析を実証するグラフを表す。(図24A)Hisタグを有するミニ抗体Ab42は、NTA-BIAcoreセンサーチップにおいて、KD = 59nM(ka: 4.3 × 10<sup>4</sup> 1/Ms; kd: 0.002531 1/秒)でF IX Paduaと結合するが(図24B)、F IX wtとは結合しない。点線は、生データを表し、一方で実線は、フィッティングしたデータを示す。線は、凡例と同じ順番である。

## 【0033】

【図25】図25は、イムノアッセイの図解を表す。

## 【0034】

10

20

30

40

50

【図26】図26は、精製されたF IX pサンプルに関して得られた濃度 - 応答曲線によって表されるアッセイの選択性を実証するグラフを表し、5 μg / mLの正常なF IX濃度を有する新鮮凍結参照血漿調製物は、アッセイの選択性を実証する。ヒト血漿は、本質的に応答を示さなかった。

【0035】

【図27】図27は、0.85 ~ 27.1 ngのF IX p / mLの範囲の6ポイントの較正曲線のグラフを表し、十分な線形性を有していた。それらの正確度は、相関係数r、低い方の相対合計誤差(relative total error)(RTE)、およびバックフィッティング(back-fitting)アプローチの結果によって実証された。

【0036】

【図28】図28は、正常なおよびF IX欠乏血漿における並行して行った研究を実証する一組のグラフを表す。F IX pをスパイクした血漿の希釈 - 応答曲線の傾きは、緩衝液希釈系列で得られた傾きと<5%異なっていたことから、血漿のマトリクスはアッセイの性能に影響を与えたことが示される。

【0037】

【図29】図29は、ELISAの感受性に対するCa<sup>2+</sup>の影響を実証するグラフを表す。Ca<sup>2+</sup>によって生じた明らかな感受性の増加が示され、これは、ポリクローナル検出抗体およびF IXのCa依存性EGFドメインによって引き起こされた可能性が極めて高い。

【0038】

【図30】図30は、フェーズ1/2試験でAAV2/8ウイルスベクターで処置された第1の患者由来のクエン酸塩加血漿サンプルの分析を実証する一組のグラフを表す。第1の患者から得られた血漿サンプルはF IX交差反応物質陽性(CRM+)であった。

【0039】

【図31】図31は、フェーズ1/2試験でAAV2/8ウイルスベクターで処置された第2の患者由来のクエン酸塩加血漿サンプルの分析を実証する一組のグラフを表す。第2の患者から得られた血漿サンプルはF IX交差反応物質陽性(CRM+)であった。

【0040】

【図32】図32は、フェーズ1/2試験でAAV2/8ウイルスベクターで処置された第3の患者由来のクエン酸塩加血漿サンプルの分析を実証する一組のグラフを表す。第3の患者から得られた血漿サンプルはF IX交差反応物質陽性(CRM+)でなかった。

【発明を実施するための形態】

【0041】

本明細書は、野生型F IXに対して最小の交差反応性で、またはそれに対する交差反応性がなくF IX Paduaを特異的に認識する結合性構築物を提供する。例示的な態様において、結合性構築物は、F IX Paduaに結合し、野生型(WT)第IX因子に結合しない。例示的な態様において、結合性構築物は、WT第IX因子の存在下で、F IX Paduaに結合する(WT第IX因子に結合しない)。例示的な態様において、結合性構築物は、類似したまたは同じ条件下で、F IX Paduaに結合し、1つのWT第IX因子、ならびに第II因子および第X因子の一方もしくは両方、またはそれらの他のあらゆる変異したもしくは改変された形態(F IX Paduaを除く)に結合しない。例示的な態様において、結合性構築物は、F IX Paduaに結合し、第II因子にも第X因子にも結合しない。例示的な態様において、結合性構築物は、F IX Paduaに結合し、WT第IX因子、第II因子および第X因子のどれにも結合しない。例示的な態様において、結合性構築物は、WT第IX因子、第II因子および第X因子の存在下で、F IX Paduaに結合する(WT第IX因子、第II因子および第X因子に結合しない)。例示的な実施形態において、結合性構築物は、ヒト血漿中に存在するレベルのWT第IX因子、第II因子、および第X因子を含む溶液中に存在する場合でも、F IX Paduaのエピトープ(配列番号1)に結合する。

【0042】

10

20

30

40

50

## エピトープ

「エピトープ」は、本明細書で使用される場合、結合性構築物で結合する F I X P a d u a の領域またはその中の領域を意味する。一部の実施形態において、エピトープは、線状エピトープである。「線状エピトープ」は、本明細書で使用される場合、結合性構築物で結合する F I X P a d u a の領域またはその中の領域であって、その領域が、F I X P a d u a のアミノ酸配列の連続するアミノ酸で構成される、領域を指す。第 I X 因子 P a d u a の一次構造において、線状エピトープのアミノ酸は、互いに隣接している。したがって、線状エピトープは、抗原、すなわち F I X P a d u a のアミノ酸配列の断片または一部である。

### 【 0 0 4 3 】

他の例示的な実施形態において、エピトープは、コンフォーメーションアルエピトープまたは構造エピトープである。「コンフォーメーションアルエピトープ」または「構造エピトープ」は、第 I X 因子 P a d u a がその適切にフォールディングされた状態にある場合、互いに近接して配置されたアミノ酸で構成されるエピトープを意味する。線状エピトープとは異なり、コンフォーメーションアルエピトープまたは構造エピトープのアミノ酸は、F I X P a d u a の一次構造（すなわち、アミノ酸配列）において必ずしも互いに隣接していないてもよい。コンフォーメーションアルエピトープまたは構造エピトープは、必ずしも抗原（F I X p）のアミノ酸配列の連続するアミノ酸で構成されていなくてもよい。

### 【 0 0 4 4 】

例示的な実施形態において、結合性構築物は、配列番号 1 のアミノ酸配列を含む F I X P a d u a のエピトープに結合し、このエピトープは、配列番号 1 のアミノ酸配列内の線状エピトープである。例示的な態様において、線状エピトープは、D R A T C L L S T K F T（配列番号 3）のアミノ酸配列内である。例示的な態様において、線状エピトープは、配列番号 3 の少なくとも L - L を含む。例示的な実施形態において、結合性構築物は、W T 第 I X 因子、第 I I 因子、および / または第 X 因子の存在下でも、F I X P a d u a の線状エピトープに結合する。例示的な実施形態において、結合性構築物は、5 μ g / mL の W T 第 I X 因子の存在下でも、F I X P a d u a のエピトープに結合する。例示的な実施形態において、結合性構築物は、5 μ g / mL の W T 第 I X 因子の存在下および 20 % のヒト血漿マトリクス中でも、F I X P a d u a のエピトープに結合する。

### 【 0 0 4 5 】

例示的な態様において、結合性構築物は、W T F I X のエピトープに結合しない。例示的な態様において、結合性構築物は、配列番号 2 内、または D R A T C L R S T K F T（配列番号 14）内、もしくは L V D R A T C L R S T K F T I Y N N M F C A G F H（配列番号 15）内のエピトープに結合しない。例示的な態様において、結合性構築物は、F I X P a d u a に結合性構築物が結合する場合と類似したまたは同じ条件下で、W T F I X のエピトープに結合しない。例示的な態様において、結合性構築物は、W T F I X の正常な血漿レベルを含む溶液中にある場合、W T F I X のエピトープに結合しない。例示的な態様において、結合性構築物は、5 μ g / mL の W T F I X を含む溶液（例えば、緩衝液）（例えば、約 5 μ g / mL の W T F I X を含むヒト血漿マトリクス）中にある場合、W T F I X のエピトープに結合しない。

### 【 0 0 4 6 】

例示的な実施形態において、結合性構築物は、F I X P a d u a のエピトープ（配列番号 1）に結合し、このエピトープは、アミノ酸配列 L V D R A T C L L S T K F T I Y N N M F C A G F H（配列番号 5）のフォールディングされた構造のコンフォーメーションアルエピトープである。例示的な実施形態において、結合性構築物は、F I X P a d u a のエピトープ（配列番号 1）に結合し、このエピトープは、アミノ酸配列 L V D R A T C L L S T K F T I Y N N M F C A G F H（配列番号 5）のフォールディングされた構造のコンフォーメーションアルエピトープであり、フォールディングされた構造は、ジスルフィド架橋を含む。例示的な実施形態において、結合性構築物は、W T 第 I X 因子、第 I I 因子、および / または第 X 因子の存在下でも、F I X P a d u a のコンフォーメーションアルエピ

10

20

30

40

50

トープに結合する。例示的な実施形態において、結合性構築物は、 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$  の WT 第 IX 因子の存在下でも、FIX Padua のエピトープに結合する。

#### 【0047】

##### 親和性およびアビディティ

本明細書で提供される結合性構築物は、非共有結合および可逆的な方式で、FIX Padua に結合する。例示的な実施形態において、結合性構築物の FIX Padua への結合強度は、結合性構築物の結合部位とエピトープとの相互作用の強度の尺度であるその親和性に関して記載される場合がある。例示的な態様において、本明細書で提供される結合性構築物は、FIX Padua に対して高い親和性を有し、したがって、低い親和性の結合性構築物より短い期間でより多くの量の FIX Padua と結合すると予想される。例示的な態様において、結合性構築物は、少なくとも  $10^5 \text{ mol}^{-1}$ 、少なくとも  $10^6 \text{ mol}^{-1}$ 、少なくとも  $10^7 \text{ mol}^{-1}$ 、少なくとも  $10^8 \text{ mol}^{-1}$ 、少なくとも  $10^9 \text{ mol}^{-1}$ 、または少なくとも  $10^{10} \text{ mol}^{-1}$  の平衡会合定数、KA を有する。例示的な態様では、本明細書において提供される結合性構築物は、ヒト血漿中で FIX Padua に対して高い親和性を呈する。例示的な態様では、結合性構築物は、ヒト血漿を含むサンプル中で、第 IX 因子 Padua に結合し、WT 第 IX 因子に結合しない。例示的な態様では、結合性構築物は、少なくともまたは約 5% のヒト血漿（例えば、5% のヒト血漿マトリックス）を含むサンプル中で、第 IX 因子 Padua に結合し、WT 第 IX 因子に結合しない。例示的な態様では、結合性構築物は、少なくともまたは約 10% のヒト血漿（例えば、10% のヒト血漿マトリックス）を含むサンプル中で、第 IX 因子 Padua に結合し、WT 第 IX 因子に結合しない。例示的な態様では、結合性構築物は、少なくともまたは約 5% ~ 約 40%、約 10% ~ 約 30%、または約 15% ~ 約 20% のヒト血漿を含むサンプル中で、第 IX 因子 Padua に結合し、WT 第 IX 因子に結合しない。例示的な態様では、結合性構築物は、ある量のヒト血漿（例えば、少なくともまたは約 5% のヒト血漿、少なくともまたは約 10% のヒト血漿、少なくともまたは約 20% のヒト血漿）、および少なくともまたは約  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  の WT 第 IX 因子、または少なくともまたは約  $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$  の WT 第 IX 因子、または少なくともまたは約  $5 \mu\text{g}/\text{mL}$  の WT 第 IX 因子、または少なくともまたは約  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  の WT 第 IX 因子を含むサンプル中で、第 IX 因子 Padua に結合し、WT 第 IX 因子に結合しない。例示的な態様では、結合性構築物は、これらに限定されないが第 II 因子、第 V 因子、第 VII 因子、第 VIII 因子、第 X 因子、第 XI 因子、第 XII 因子、および第 XIII 因子を含む他の凝血因子を含むサンプル中で、第 IX 因子 Padua に結合し、WT 第 IX 因子に結合しない。例示的な態様では、結合性構築物は、第 IX 因子 Padua に結合し、WT 第 IX 因子に結合せず、第 II 因子または第 X 因子にさらに結合しない。例示的な態様では、結合性構築物は、第 IX 因子 Padua に結合し、WT 第 IX 因子に結合せず、第 II 因子にも第 X 因子にもさらに結合しない。

#### 【0048】

例示的な実施形態において、結合性構築物の FIX Padua への結合強度は、その感受性に関して記載される場合がある。KD は、平衡解離定数であり、これは、結合性構築物と FIX Padua との間の  $k_{off}/k_{on}$  の比である。KD および KA は、反比例している。KD 値は、結合性構築物の濃度（特定の実験に必要な結合性構築物の量）に関し、したがって KD 値がより低ければ（濃度がより低ければ）、結合性構築物の親和性はより高い。例示的な態様において、結合性構築物の FIX Padua への結合強度は、KD に関して記載される場合がある。例示的な態様では、本明細書において提供される結合性構築物の FIX p 対する KD は、約  $1.0 \times 10^{-6}$  またはそれ未満、約  $1.0 \times 10^{-7}$  またはそれ未満、約  $1.0 \times 10^{-8}$  またはそれ未満、約  $1.0 \times 10^{-9}$  また

10

20

30

40

50

はそれ未満、約 $1.0 \times 10^{-10}$ またはそれ未満である。例示的な態様では、本明細書において提供される結合性構築物のKDは、マイクロモル濃度、ナノモル濃度、ピコモル濃度、またはフェムトモル濃度である。例示的な態様では、本明細書において提供される結合性構築物のKDは、約 $10^{-4} \sim 10^{-6}$ または $10^{-7} \sim 10^{-9}$ または $10^{-10} \sim 10^{-12}$ または $10^{-13} \sim 10^{-15}$ の範囲内である。例示的な態様では、本明細書において提供される結合性構築物のKDは、約 $100\text{ nM}$ またはそれ未満である。ある特定の態様では、本明細書において提供される結合性構築物のKDは、約 $20\text{ nM}$ ～約 $100\text{ nM}$ 、約 $25\text{ nM}$ ～約 $95\text{ nM}$ 、約 $30\text{ nM}$ ～約 $90\text{ nM}$ 、約 $35\text{ nM}$ ～約 $85\text{ nM}$ 、約 $40\text{ nM}$ ～約 $80\text{ nM}$ 、約 $45\text{ nM}$ ～約 $75\text{ nM}$ 、約 $50\text{ nM}$ ～約 $70\text{ nM}$ 、または約 $55\text{ nM}$ ～約 $65\text{ nM}$ である。例示的な態様では、結合性構築物のKDは、約 $25\text{ nM}$ ～約 $75\text{ nM}$ の範囲内である。例示的な態様では、結合性構築物のKDは、約 $50\text{ nM}$ ～約 $60\text{ nM}$ の範囲内である。例示的な態様では、結合性構築物のKDは、約 $56\text{ nM}$ である。

#### 【0049】

アビディティは、抗体-抗原複合体の全体的な強度の尺度を与える。アビディティは、3つの主要なパラメーター：結合性構築物のエピトープに対する親和性、結合性構築物とFIX Paduaの両方の原子価、および相互作用するパートの構造上の配置に依存する。結合性構築物の原子価（抗原結合部位の数）がより多いほど、結合できる抗原（FIX Padua）の量はより多くなる。例示的な態様において、結合性構築物は、FIX pに対して強いアビディティを有する。例示的な態様において、結合性構築物は、多価である。例示的な態様において、結合性構築物は、二価である。

#### 【0050】

##### 構造

本明細書に記載される結合性構築物は、多数の構造の1つを有するように操作されていてもよい。例示的な態様において、本明細書で提供される結合性構築物は、抗体またはその抗原結合性断片の構造を有する。例示的な態様において、本明細書で提供される結合性構築物は、抗体に基づく構造または抗体に由来する構造を有する。例示的な態様において、本明細書で提供される結合性構築物は、合成抗体模倣体、操作されたタンパク質、またはアプタマーの構造、例えば、本明細書に記載される構造およびMcEnaneyら、「Chemically Synthesized Molecules with the Targeting and Effector Functions of Antibodies」J. Am. Chem. Soc.、136巻(52号)：18034～18043頁(2014年)；BinzおよびPlueckthun、「Engineered proteins as specific binding reagents」Curr Opin Biotechnol. 16巻(4号)：459～69頁(2005年)；およびRoqueら、「Antibodies and genetically engineered related molecules: production and purification」Biotechnol Prog. 20巻(3号)：639～54頁(2004年)に記載の構造を有する。

#### 【0051】

##### 抗体および抗原結合性断片

例示的な実施形態において、結合性構築物は、抗体である。抗体は、どのようなタイプの抗体であってもよく、すなわち、当該分野において公知の免疫グロブリンであってもよい。例示的な実施形態において、抗体は、クラスまたはアイソタイプIgA、IgD、IgE、IgG、またはIgMの抗体である。例示的な実施形態において、本明細書に記載される抗体は、1つまたは複数のアルファ、デルタ、イプシロン、ガンマ、および/またはミュー重鎖を含む。例示的な実施形態において、本明細書に記載される抗体は、1つまたは複数のカッパまたは軽鎖を含む。例示的な態様において、抗体は、IgG抗体であり、任意選択で、4つのヒトサブクラス：IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4の1つである。

**【 0 0 5 2 】**

一部の実施形態において、抗体はまた、モノクローナル抗体である。他の実施形態において、抗体は、ポリクローナル抗体である。

**【 0 0 5 3 】**

一部の実施形態において、抗体は、天然に存在する抗体、例えば、哺乳動物、例えばマウス、ウサギ、ヤギ、ウマ、ニワトリ、ハムスター、ヒトなどから単離および／または精製された抗体に構造的に類似しているかまたはそれ由来である。これに関して、抗体は、哺乳動物抗体、例えば、マウス抗体、ウサギ抗体、ヤギ抗体、ウマ抗体、ニワトリ抗体、ハムスター抗体、ヒト抗体などとみなされる場合もある。例示的な態様において、抗体は、哺乳動物抗体のみの配列を含む。このような抗体を产生する方法は当該分野において公知であり、その一部は、本明細書の「Method of Antibody Production」というタイトルのセクションにおいてさらに説明される。例示的な態様において、結合性構築物は、完全ヒト抗体であるか、または非ヒト抗体の配列を含まない。

10

**【 0 0 5 4 】**

一部の実施形態において、抗体は、遺伝学的に操作された抗体であり、天然に存在しない。例示的な実施形態において、抗体は、単鎖抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、CDRグラフト化抗体、ヒューマニア化(humanized)抗体、二重特異性抗体、三重特異性抗体などである。遺伝子工学技術はまた、非ヒト供給源から完全ヒト抗体を作製する能力も提供する。

20

**【 0 0 5 5 】**

一部の態様において、遺伝学的に操作された抗体は、FIX Paduaに特異的な単鎖抗体(SCA)である。SCAを作製する方法は当該分野において公知である。例えば、Davisら、Nature Biotechnology 9巻：165～169頁(1991年)を参照されたい。

**【 0 0 5 6 】**

一部の態様において、抗体は、キメラ抗体である。用語「キメラ抗体」は、本明細書において、1つの種からの定常ドメインと第2の種からの可変ドメインとを含有する抗体、またはより一般的には、少なくとも2つの種からのアミノ酸配列のストレッチを含有する抗体を指すものとして使用される。特定の態様において、キメラ抗体は、FIX Paduaに結合する。

30

**【 0 0 5 7 】**

一部の態様において、抗体は、ヒト化抗体である。用語「ヒト化」は、抗体に関して使用される場合、元の供給源の抗体より本物のヒト抗体に類似した構造および免疫学的な機能を有するように操作された非ヒト供給源からの少なくともCDR領域を有する抗体を指す。例えば、ヒト化は、非ヒト抗体、例えばマウス抗体からのCDRをヒト抗体にグラフト化することを含んでいてもよい。ヒト化はまた、非ヒト配列をよりヒト配列に類似させるための選択されたアミノ酸置換を含んでいてもよい。

**【 0 0 5 8 】**

本明細書における用語「キメラまたはヒト化」の使用は、相互排他的であることを意味せず、それよりもむしろ、さらにヒト化されたキメラ抗体、ヒト化抗体、およびキメラ抗体を包含することを意味する。文脈上別段の指示がない限り、キメラ抗体(の特性、使用、試験など)に関する記述はヒト化抗体にも適用され、ヒト化抗体に関する記述はキメラ抗体にも関係する。同様に、文脈上指示がない限り、このような記述はまた、抗体およびこのようないくつかの抗体の抗原結合性断片にも適用可能であることが理解されるものとする。

40

**【 0 0 5 9 】**

一部の態様において、抗体は、humanized(商標)抗体である。ヒューマニア化テクノロジーは、非ヒト抗体を操作されたヒト抗体に変換するための、KaloBios Pharmaceuticals, Inc. (South San Francisco, California) の所有権のある方法である。Humanized(商標)抗体は、高親和性を有し、ヒト生殖細胞系抗体配列に高度な類似性を有する。例えば、T

50

omasevicら、Growth factors 32巻：223～235頁（2014年）を参照されたい。

#### 【0060】

一部の態様において、抗体は、FIX Paduaに特異的なCDRグラフト化抗体である。CDRグラフト化抗体を作製する方法は、当該分野において公知である。例えば、参考によりその全体が組み入れられるLo、Benny、Antibody Engineering：Methods and Protocols、248巻（2004年）を参照されたい。

#### 【0061】

例示的な実施形態において、抗体は、二重特異性、三重特異性、または多重特異性になるように操作され、抗体は、2つまたはそれより多くの別個の抗原結合領域を含む。一部の態様において、抗体は、FIX Paduaに特異的な二重特異性または三重特異性抗体である。二重特異性または三重特異性抗体を作製する方法は、当該分野において公知である。例えば、MarvinおよびZhu、Acta Pharmacologica Sinica 26巻：649～658頁（2005年）および米国特許第6,551,592号を参照されたい。例示的な態様において、結合性構築物は、第1のFIX Paduaのエピトープおよび第2のFIX Paduaのエピトープに特異的な二重特異性の抗原結合性構築物である。例示的な実施形態において、抗体は、クアドローマ、ヘテロ二量体二重特異性抗体、二重特異性抗体の融合体、二重特異性抗体断片、二重特異性T細胞エンゲージャー（bispecific T-cell engager）（BiTE）、または多重特異性抗体である。例示的な実施形態において、抗体は、二価、三価、または多価になるように操作されている。例えば、Cuestaら、「Multivalent antibodies: when design surpasses evolution」Trends in Biotechnology 28巻、355～362頁（2010年）；Holligerら、「Engineered antibody fragments and the rise of single domains」Nat. Biotechnol. 23巻、1126～1136頁（2005年）；Chanら、「Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation」Nat Rev Immunol 10巻、301～316頁（2010年）；Byrneら、「A tale of two specificities: bispecific antibodies for therapeutic and diagnostic applications」Trends Biotechnol. 31巻、621～632頁（2013年）を参照されたい。一部の実施形態において、抗体は、単量体の形態であり、一方で他の実施形態において、抗体は、1つまたは複数の抗体（例えば、それらのそれぞれは第1の抗体の同じエピトープを認識する）にコンジュゲートされている。したがって、一部の態様において、抗体は、二量体、ポリマー、オリゴマー、または多量体の形態である。

#### 【0062】

例示的な態様において、結合性構築物は、抗体の抗原結合性断片であるか、または抗体の抗原結合性断片を含む。抗原結合性断片（また本明細書では「抗原結合部分」とも称される）は、本明細書に記載される抗体のいずれかの抗原結合性断片であってもよい。抗原結合性断片は、少なくとも1つの抗原結合部位を有する抗体のあらゆる部分であってもよく、これらに限定されないが、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、单一特異性もしくは二重特異性Fab<sub>2</sub>、三重特異性Fab<sub>3</sub>、一価IgG、scFv、dsFv、scFv-Fc、二重特異性のダイアボディ、三重特異性のトリアボディ、ミニボディ、またはIgNARの断片（例えば、V-NAR）、またはhc IgGの断片（例えば、VhH）、またはビス-scFv、Fab発現ライブラリーによって発現される断片などである。例示的な態様において、抗原結合性断片は、ドメイン抗体、VhHドメイン、V-NARドメイン、VHドメイン、VLドメインなどである。しかしながら、本開示の抗体断片は、これらの例示的なタイプの抗体断片に限定されない。例示的な態様において、結合性構築物は、Fab断

10

20

30

40

50

片を含む。例示的な態様において、結合性構築物は、2つのF<sub>a</sub>b断片を含む。例示的な態様において、結合性構築物は、リンカーを介して接続された2つのF<sub>a</sub>b断片を含む。例示的な態様において、結合性構築物は、2つのF<sub>a</sub>b断片を含むミニボディを含むかまたはそのようなミニボディである。例示的な態様において、結合性構築物は、リンカーを介して繋がれた2つのF<sub>a</sub>b断片を含むミニボディを含むかまたはそのようなミニボディである。ミニボディは、当該分野において公知である。例えば、Huら、Cancer Res 56巻：3055～3061頁（1996年）を参照されたい。例示的な態様において、結合性構築物は、任意選択でアルカリホスファターゼドメインを含む、リンカーを介して繋がれた2つのF<sub>a</sub>b断片を含むミニボディを含むか、またはそのようなミニボディである。

10

#### 【0063】

ドメイン抗体は、抗体の機能的な結合単位を含み、抗体の重鎖（V<sub>H</sub>）または軽鎖（V<sub>L</sub>）のいずれかの可変領域に対応していてもよい。ドメイン抗体は、およそ13kDaの分子量、または完全抗体のおよそ10分の1の分子量を有していてもよい。ドメイン抗体は、本明細書に記載されるものなどの完全抗体に由来するものでもよい。

#### 【0064】

結合性構築物は、一部の実施形態において、単量体またはポリマー、二重特異性または三重特異性、二価または三価である。例示的な態様において、本明細書で提供される結合性構築物は、単一特異性である。例示的な態様において、本明細書で提供される結合性構築物は、二重特異性である。例示的な態様において、本明細書で提供される結合性構築物は、完全にヒトのものである。例示的な態様において、結合性構築物は、2つのF<sub>a</sub>b断片を含み、二価である。例示的な態様において、結合性構築物は、構造が同一な2つのF<sub>a</sub>b断片のホモ二量体である。したがって、例示的な態様において、結合性構築物は、二価であるが、FIX Paduaに対して单一特異性である。例示的な態様において、ホモ二量体は、ヘリックス-ターン-ヘリックスモチーフを介して二量体化されている。例示的な態様において、結合性構築物は、構造が同一な2つのF<sub>a</sub>bミニ抗体のホモ二量体である。したがって、例示的な態様において、結合性構築物は、二価であるが、FIX Paduaに対して单一特異性である。例示的な態様において、2つのF<sub>a</sub>bミニ抗体のホモ二量体は、アルカリホスファターゼドメインを介して二量体化されている。

20

#### 【0065】

抗体分子の抗原結合性またはイディオタイプを含有する抗体断片は、当該分野において公知の技術によって生成することができる。例えば、このような断片としては、これらに限定されないが、抗体分子のペプシン消化によって生成することができるF(a<sub>b'</sub>)<sub>2</sub>断片；F(a<sub>b'</sub>)<sub>2</sub>断片のジスルフィド架橋を還元することによって生成することができるF<sub>a</sub><sub>b'</sub>断片；および抗体分子をパパインおよび還元剤で処理することによって生成することができる2つのF<sub>a</sub><sub>b'</sub>断片が挙げられる。

30

#### 【0066】

単鎖可変領域断片（sFv）抗体断片は、合成ペプチドを介して抗体軽鎖のVドメインに連結された抗体重鎖の可変（V）ドメインを含む短縮されたF<sub>a</sub>b断片からなり、これは、慣例的な組換えDNAテクノロジー技術を使用して生成することができる（例えば、上記のJanewayらを参照）。同様に、ジスルフィド安定化可変領域断片（dsFv）は、組換えDNAテクノロジーによって調製することができる（例えば、Reitterら、Protein Engineering、7巻、697～704頁（1994年）を参照）。

40

#### 【0067】

組換え抗体断片、例えばscFvはまた、異なる標的抗原に高い結合アビティティおよび特異性を有する安定な多量体のオリゴマーに組み立てられるように操作されていてもよい。このようなダイアボディ（二量体）、トリアボディ（三量体）またはテトラボディ（四量体）は当該分野において周知である。例えば、Korttら、Biomol Eng. 2001 18巻：95～108頁、（2001年）およびTodorovskaya、J

50

Immuno1 Methods. 248巻：47～66頁、(2001年)を参照されたい。

#### 【0068】

二重特異性抗体 (b s c A b) は、組換え方法を使用してグリシン - セリンリンカーを介して繋がれた 2 つの单鎖 Fv 断片を含む分子である。例示的な実施形態において、目的の 2 つの抗体の V 軽鎖 (VL) および V 重鎖 (VH) ドメインは、標準的な PCR 方法を使用して単離される。次いで、2 ステップの融合 PCR で、各ハイブリドーマから得られた VL および VH の cDNA を繋ぎ合わせて单鎖断片を形成する。二重特異性の融合タンパク質は、類似の方式で調製される。二重特異性の单鎖抗体および二重特異性の融合タンパク質は、本発明の開示の範囲内に含まれる抗体物質である。例示的な二重特異性抗体は、米国特許出願公開第 2005-0282233 号 A1 および国際特許出願公開 WO 2005/087812 号で教示されており、これら両方の出願はそれらの全体が参考により本明細書に組み入れられる。10

#### 【0069】

例示的な実施形態において、結合性構築物は、同じ標的抗原分子上の 2 つの異なるオーバーラップしていないエピトープに結合する能力を有する、二重パラトープの (bi paratopic) 抗体またはその二重パラトープの抗原結合性断片である。同じ細胞表面標的に同時に結合することによって、二重パラトープの抗体およびその二重パラトープの抗原結合性断片は、結合アビティの強化をもたらし、標的を発現する細胞にのみ優先的な（強い）結合を生じさせて、それにより、抗体選択性の微調整を可能にする。二重パラトープの抗体またはその二重パラトープの抗原結合性断片は、同じ標的分子上の 2 つの異なるエピトープに同時に結合することによって、親抗体（または抗原結合性断片）を単独で、または組み合わせて使用しても達成し得ない新しい官能性を獲得することも可能になるかもしれないことが実証されている。例示的な態様において、本明細書で提供される結合性構築物は、FIX Padua に対して二重パラトープのものである。20

#### 【0070】

例示的な実施形態において、抗原結合性断片は、二重特異性、三重特異性、または多重特異性になるように操作されている。例示的な態様において、抗原結合性断片は、2 つまたはそれより多くの別個の抗原結合性領域を含む。一部の態様において、抗原結合性断片は、FIX Padua および少なくとも 1 つの他の抗原に特異的な二重特異性または三重特異性抗体である。例示的な態様において、結合性構築物は、第 1 の FIX Padua のエピトープおよび第 2 の FIX Padua のエピトープに特異的な二重特異性の抗原結合性断片である。例示的な実施形態において、抗原結合性断片は、二価、三価、または多価になるように操作されている。例示的な実施形態において、結合性構築物は、FIX Padua に対して单一特異性を有する二価の Fab 断片である。一部の実施形態において、抗原結合性断片は、单量体の形態であり、一方で他の実施形態において、抗原結合性断片は、1 つまたは複数の抗原結合性断片（例えば、それらのそれぞれは、第 1 の抗原結合性断片の同じエピトープを認識する）にコンジュゲートされている。したがって、一部の態様において、抗原結合性断片は、二量体化、重合、オリゴマー化、または多量体化されている。例示的な態様において、結合性構築物は、二量体化された Fab 断片である。30

例示的な態様において、結合性構築物は、完全にヒトの二量体化された Fab 断片である。例示的な態様において、結合性構築物は、ヘリックス - ターン - ヘリックスモチーフを介して二量体化されている。例示的な実施形態において、抗原結合性断片は、二価、三価、または多価になるように操作されている。例示的な実施形態において、結合性構築物は、FIX Padua に対して单一特異性の二量体化された二価 Fab 断片であり、ここで結合性構築物は、ヘリックス - ターン - ヘリックスモチーフを介して二量体化されている。40

#### 【0071】

例示的な態様において、結合性構築物、例えば、抗体またはその抗原結合性断片は、SSYAI S (配列番号 6) ; GIVPAFGTANYAQKFQG (配列番号 7) ; SWG

10

20

30

40

50

V I S F A Y (配列番号 8) ; R A S Q D I S S Y L N (配列番号 9) ; A A S N L Q S (配列番号 10) ; および M Q Y D S L P F T F (配列番号 11) のアミノ酸配列を含む。例示的な態様において、配列番号 6 ~ 11 の各々の間に、1つまたは複数のアミノ酸が存在する。例示的な態様において、結合性構築物、例えば、抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号 24 もしくは配列番号 25 または配列番号 24 および 25 の両方の配列を含む。例示的な態様において、結合性構築物、例えば、抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号 26 もしくは配列番号 27 または配列番号 26 および 27 の両方の配列を含む。例示的な態様において、結合性構築物、例えば、抗体またはその抗原結合性断片のアミノ酸配列は、例えば、リンカー、発現タグ(例えば、Hisタグ、FLAGタグ、mycタグ、蛍光タンパク質(例えば、緑色蛍光タンパク質、青色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、黄色蛍光タンパク質、シアントンパク質、強化緑色蛍光タンパク質など)の追加の配列を含む。例示的な態様において、結合性構築物、例えば、抗体またはその抗原結合性断片は、Hisタグおよび / または FLAGタグの配列を含む。例示的な態様において、FLAGタグは、配列番号 12 の配列を含む。例示的な態様において、Hisタグは、配列番号 13 の配列を含む。例示的な態様において、結合性構築物、例えば、抗体またはその抗原結合性断片は、リンカーを含む。例示的な態様において、結合性構築物、例えば、抗体またはその抗原結合性断片は、合成二重ヘリックスループヘリックスモチーフ、例えば Haylockら、Int J. Oncol. 48巻(2号) : 461 ~ 470 頁(2016年) または Wangら、Anal. Chem. 78巻: 997 ~ 1004 頁(2006年) に記載されるものを含む。例示的な態様において、結合性構築物、例えば、抗体またはその抗原結合性断片は、定常抗体ドメインを含む。このような抗体ドメインは、Huら、Cancer Res 56巻: 3055 ~ 3061 頁(1996年) および McGregorら、Mol Immuno 31巻: 219 ~ 226 頁(1994年) に記載されている。例示的な態様において、結合性構築物、例えば、抗体またはその抗原結合性断片は、細菌のアルカリホスファターゼドメイン、例えば上記の Wangら(2006年) に記載されるものを含む。例示的な態様において、結合性構築物、例えば、抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号 28 もしくは配列番号 27 または配列番号 28 および 27 の両方の配列を含む。

### 【0072】

#### アプタマー

一部の実施形態において、結合性構築物は、抗体の類似体である。一部の態様において、結合性構築物は、アプタマーである。近年のコンビナトリアル科学の分野における進歩により、所与の標的に高い親和性および特異性を有する短いポリマー配列(例えば、オリゴ核酸またはペプチド分子)が同定されてきた。例えば、SELEXテクノロジーは、哺乳動物抗体に匹敵する結合特性を有するDNAおよびRNAアプタマーを同定するのに使用されており、免疫学の分野は、無数の化合物に結合する抗体または抗体断片を生成し単離しており、ファージディスプレイは、非常に好都合な結合特性を有する新しいペプチド配列を発見するのに利用されている。これらの分子進化技術の成功に基づいて、任意の標的分子にも結合する分子を作り出すことは確かである。相補的な塩基対合を含まない短い領域から作り出されたヘアピンループを利用することが多いアプタマーや、ループ化された超可変領域のコンビナトリアルアレンジメント、および直鎖状ペプチドファージディスプレイの結果と比較して改善された結果を示した環状ペプチドを利用する新しいファージディスプレイライブラリーを利用する天然由来の抗体の場合と同様に、ループ構造は、所望の結合属性を提供することに関連することが多い。アプタマーについてより詳細には、概して、Gold, L.、Singer, B.、He, Y. Y.、Brody, E.、「Aptamers As Therapeutic And Diagnostic Agents」、J. Biotechnol. 74巻: 5 ~ 13 頁(2000年) を参照されたい。アプタマーを生成するための関連技術は、参照によりその全体が組み入れられる米国特許第 6,699,843 号に見出すことができる。

### 【0073】

10

20

30

40

50

### 抗体または抗原結合性断片の產生方法

抗体の好適な作製方法は、当該分野において公知である。例えば、標準的なハイブリドーマ方法は、例えば、HarlowおよびLane(編)、Antibodies: A Laboratory Manual、CSH Press(1988年)、およびCA. Janewayら(編)、Immunobiology、第5版、Garland Publishing、New York、NY(2001年))に記載されている。

#### 【0074】

簡単に述べれば、ポリクローナル抗体は、本開示のポリペプチドを含む免疫原で動物を免疫化し、その免疫化された動物から抗血清を収集することによって調製される。抗血清产生には広範な動物種を使用することができる。一部の態様において、抗抗血清の产生に使用される動物は、非ヒト動物、例えばウサギ、マウス、ラット、ハムスター、ヤギ、ヒツジ、ブタまたはウマなどである。ウサギは血液量が比較的多いことから、ウサギがポリクローナル抗体の產生のために好ましい選択である。選択されるFIX Paduaエピトープとの免疫反応性を有するポリクローナル抗血清を生成するための例示的な方法において、ウサギ免疫化のために、フロイント完全アジュバント中で、50 µgのFIX Padua抗原を乳化する。例えば21日の間隔で、ブーストのために、フロイント不完全アジュバント中で、50 µgのエピトープを乳化する。抗体を生成させた後、単に動物を放血させ全血から血清サンプルを調製することによって、ポリクローナル抗血清を得ることができる。

10

#### 【0075】

本開示の方法で使用するためのモノクローナル抗体は、培養物中の連続細胞株によって抗体分子の產生をもたらすあらゆる技術を使用して調製することができる。このような技術としては、これらに限定されないが、KoehlerおよびMilsteinによって元々説明されたハイブリドーマ技術(Nature 256巻:495~497頁、1975年)、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kosborら、Immunol Today 4巻:72頁、1983年; Coteら、Proc Natl Acad Sci 80巻:2026~2030頁、1983年)およびEBV-ハイブリドーマ技術(Coleら、Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy、Alan R Liss Inc、New York N.Y.、77~96頁、(1985年)が挙げられる。

20

#### 【0076】

簡単に述べれば、例示的な実施形態において、モノクローナル抗体を生成するために、マウスに組換えFIX Paduaを定期的に注射し、それに対する抗体を生じさせる(例えば、10~20 µgをフロイント完全アジュバント中で乳化する)。マウスに、PBS中のFIX Paduaの最終的な融合前ブーストを与え、4日後にマウスを殺し、その脾臓を取り出す。脾臓を10 mlの無血清RPMI 1640中に入れ、2 mMのL-グルタミン、1 mMのピルビン酸ナトリウム、100 ユニット/mlのベニシリン、および100 µg/mlのストレプトマイシン(RPMI)が補充された無血清RPMI 1640(Gibco、Canada)中に浸した2枚のガラス顕微鏡スライドの艶消しの端部の間で脾臓を磨り潰すことによって、単一細胞の懸濁物を形成する。細胞懸濁物を、滅菌された70メッシュのNitexセルストレーナー(Becton Dickinson、Parsippany、N.J.)に通過させて濾過し、200 gで5分間遠心分離し、ペレットを20 mlの無血清RPMI中に再懸濁することによって2回洗浄する。3匹のナイーブBalb/cマウスから採取した脾細胞を、類似の方式で調製し、対照として使用する。融合の前に、11%ウシ胎仔血清(FBS)を含むRPMI中で対数期で3日間維持したNS-1骨髄腫細胞(Hyclone Laboratories, Inc.、Logan、Utah)を200 gで5分遠心分離し、ペレットを2回洗浄する。

30

#### 【0077】

脾臓細胞(1×10<sup>8</sup>個)を2.0×10<sup>7</sup>個のNS-1細胞と合わせ、遠心分離し、上清を吸引する。細胞ペレットを軽く叩くことによってチューブから取り外し、1 mlの3

40

50

7 の P E G 1 5 0 0 ( 5 0 % 、 7 5 m M の H e p e s 中、 pH 8 . 0 ) ( B o e h r i n g e r M a n n h e i m ) を攪拌しながら 1 分にわたり添加し、続いて 7 m l の無血清 R P M I を 7 分にわたり添加する。追加の 8 m l の R P M I を添加し、細胞を 2 0 0 g で 1 0 分遠心分離する。上清を捨てた後、ペレットを、 1 5 % F B S 、 1 0 0 μ M ナトリウムヒポキサンチン、 0 . 4 μ M アミノブテリン、 1 6 μ M チミジン ( H A T ) ( G i b c o ) 、 2 5 ユニット / m l の I L - 6 ( B o e h r i n g e r M a n n h e i m ) および脾細胞  $1 . 5 \times 1 0 ^ 6$  個 / m l を含有する 2 0 0 m l の R P M I に再懸濁し、 1 0 個の C o r n i n g の平底 9 6 ウエル組織培養プレート ( C o r n i n g 、 C o r n i n g N . Y . ) にプレーティングする。

## 【 0 0 7 8 】

融合後の 2 、 4 、および 6 日目に、融合プレートのウェルから 1 0 0 μ l の培地を取り出し、新しい培地で交換する。8日目、 E L I S A によって融合体をスクリーニングし、以下のように F I X P a d u a に結合するマウス I g G の存在に関して試験する。 I m m u l o n 4 プレート ( D y n a t e c h 、 C a m b r i d g e 、 M a s s . ) を、 2 5 m M トリス、 pH 7 . 5 で希釈した 1 0 0 n g / ウェルの E G F R で、 3 7 で 2 時間コーティングする。コーティング溶液を吸引し、 2 0 0 μ l / ウェルのプロッキング溶液 ( C M F - P B S で希釈した 0 . 5 % 魚皮ゼラチン ( S i g m a ) ) を添加し、 3 7 で 3 0 分インキュベートする。プレートを 0 . 0 5 % T w e e n 2 0 を含む P B S ( P B S T ) で 3 回洗浄し、 5 0 μ l の培養上清を添加する。 3 7 で 3 0 分間インキュベートし、上述したように洗浄した後、 P B S T 中 1 : 3 5 0 0 で希釈した 5 0 μ l の西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲートヤギ抗マウス I g G ( f c ) ( J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h 、 W e s t G r o v e 、 P a . ) を添加する。上述したようにプレートをインキュベートし、 P B S T で 4 回洗浄し、 pH 4 . 5 の 1 0 0 m M クエン酸塩中の、 1 m g / m l の o - フェニレンジアミン ( S i g m a ) および 0 . 1 μ l / m l の 3 0 % H 2 O 2 からなる 1 0 0 μ l の基質を添加する。 5 0 μ l の 1 5 % H 2 S O 4 を添加することによって 5 分後に呈色反応を止める。プレートリーダー ( D y n a t e c h ) で A 4 9 0 を読み取る。

## 【 0 0 7 9 】

選択された融合ウェルを、 9 6 ウエルプレートへの希釈によって 2 回クローニングし、 5 日後に 1 ウエル当たりのコロニーの数を可視的にスコア付けする。ハイブリドーマによって産生されたモノクローナル抗体を、 I s o s t r i p システム ( B o e h r i n g e r M a n n h e i m 、 I n d i a n a p o l i s 、 I n d . ) を使用してアイソタイプに分類する。

## 【 0 0 8 0 】

ハイブリドーマ技術を採用する場合、骨髄腫細胞株を使用することができる。このようなハイブリドーマを産生する融合手順での使用に適した細胞株は、好ましくは抗体非産生性であり、高い融合効率を有し、所望の融合細胞 (ハイブリドーマ) の増殖だけを支持するある特定の選択培地でそれらが増殖できないように酵素が欠失している。例えば、免疫化された動物がマウスである場合、 P 3 - X 6 3 / A g 8 、 P 3 - X 6 3 - A g 8 . 6 5 3 、 N S 1 / 1 . A g 4 1 、 S p 2 1 0 - A g 1 4 、 F O 、 N S O / U 、 M P C - 1 1 、 M P C 1 1 - X 4 5 - G T G 1 . 7 および S 1 9 4 / 1 5 X X 0 B u 1 を使用してもよく；ラットの場合、 R 2 1 0 . R C Y 3 、 Y 3 - A g 1 . 2 . 3 、 I R 9 8 3 F および 4 B 2 1 0 を使用してもよく；細胞融合に関して、 U - 2 6 6 、 G M 1 5 0 0 - G R G 2 、 L I C R - L O N - H M y 2 および U C 7 2 9 - 6 が全て有用である。

## 【 0 0 8 1 】

宿主の種に応じて、様々なアジュバントを使用して、免疫応答を増加させることができる。このようなアジュバントとしては、これらに限定されないが、フロイント、ミネラルゲル、例えば水酸化アルミニウム、ならびに表面活性物質、例えばリゾレシチン、ブルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳濁液、キーホールリンペットヘモシニアント、およびジニトロフェノールが挙げられる。 B C G (カルメット - ゲラン杆菌) および

10

20

30

40

50

*Corynebacterium parvum*は、有用なヒトアジュvantの可能性がある。

【0082】

代替として、他の方法、例えばEBV-ハイブリドーマ方法(HaskardおよびArchær、J. Immunol. Methods、74巻(2号)、361~67頁(1984年)、およびRoderら、Methods Enzymol.、121巻、140~67頁(1986年))、およびバクテリオファージベクター発現系(例えば、Huseら、Science、246巻、1275~81頁(1989年)を参照)が当該分野において公知である。さらに、非ヒト動物で抗体を産生する方法は、例えば、米国特許5,545,806、5,569,825、および5,714,352、ならびに米国特許出願公開第2002/0197266号A1に記載されている。10

【0083】

抗体はまた、Orlandiら(Proc Natl Acad Sci 86巻:3833~3837頁;1989年)、およびWinter GおよびMilstein C(Nature 349巻:293~299頁、1991年)で開示されたように、in vivoにおいてリンパ球集団中での産生を誘導することによって、または組換え免疫グロブリンライブラリーまたは高度に特異的な結合試薬のパネルをスクリーニングすることによっても産生することができる。抗体または抗原結合性断片の全配列が公知の場合、組換えタンパク質を産生する方法を採用することができる。例えば、「Protein production and purification」Nat Methods 5巻(2号):135~146頁(2008年)を参照されたい。20

【0084】

またファージディスプレイも、本発明の開示の抗体を生成するのに使用することができる。これに関して、抗体の抗原結合性可変(V)ドメインをコードするファージライブラリーは、標準的な分子生物学および組換えDNA技術を使用して生成することができる(例えば、Sambrookら(編)、Molecular Cloning, A Laboratory Manual、第3版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、New York(2001年)を参照)。所望の特異性を有する可変領域をコードするファージは、所望の抗原への特異的な結合に関して選択され、選択された可変ドメインを含む完全なまたは部分的な抗体が再構成される。再構成された抗体をコードする核酸配列は、細胞によってモノクローナル抗体の特徴を有する抗体が分泌されるように、好適な細胞株、例えばハイブリドーマ産生に使用される骨髄腫細胞に導入される(例えば、上記のJanewayら、上記のHuseら、および米国特許6,265,150を参照)。関連の方法は、米国特許第5,403,484;米国特許第5,571,698;米国特許第5,837,500;米国特許第5,702,892にも記載されている。技術は、米国特許第5,780,279;米国特許第5,821,047;米国特許第5,824,520;米国特許第5,855,885;米国特許第5,858,657;米国特許第5,871,907;米国特許第5,969,108;米国特許第6,057,098;および米国特許第6,225,447に記載されている。30

【0085】

抗体は、特定の重鎖および軽鎖免疫グロブリン遺伝子に関してトランスジェニックであるトランスジェニックマウスによって産生することができる。このような方法は当該分野において公知であり、例えば米国特許第5,545,806号および同5,569,825号、ならびに上記のJanewayらに記載されている。40

【0086】

ヒト化抗体を生成するための方法は当該分野において周知であり、例えば、上記のJanewayら、米国特許第5,225,539号、同第5,585,089号および同第5,693,761号、欧州特許第0239400号B1、および英国特許第2188638号で詳細に記載されている。ヒト化抗体はまた、米国特許第5,639,641号およびPedersenら、J. Biol. 235巻、959~973頁(199950

4年)に記載された抗体リサーフェイシングテクノロジー(antibody resurfacing technology)を使用しても生成することができる。好ましいキメラまたはヒト化抗体は、ヒト定常領域を有し、抗体の可変領域、または少なくともCDRは、非ヒト種由来である。非ヒト抗体をヒト化するための方法は当該分野において周知である。(米国特許第5,585,089号、および同第5,693,762号を参照)。一般的に、ヒト化抗体は、非ヒト供給源からそのフレームワーク領域に導入された1つまたは複数のアミノ酸残基を有する。ヒト化は、例えば、Jonesら(Nature 321巻:522~525頁、1986年)、Riechmannら(Nature、332巻:323~327頁、1988年)およびVerhoevenら(Science 239巻:1534~1536頁、1988年)に記載された方法を使用して、げつ歯類相補性決定領域(CDR)の少なくとも一部をヒト抗体の対応する領域の代わりに使用することによって実行することができる。操作された抗体を調製するための非常に多くの技術が、例えば、OwensおよびYoung, J. Immunol. Meth.、168巻:149~165頁(1994年)に記載されている。次いでさらなる変化を抗体のフレームワークに導入して、親和性または免疫原性をモジュレートすることができる。

#### 【0087】

「キメラ抗体」の產生のために開発された技術である、適切な抗原特異性および生物活性を有する分子を得るためにマウス抗体遺伝子のヒト抗体遺伝子へのスプライシングを使用することができる(Morrisonら、Proc Natl Acad Sci 81巻:6851~6855頁(1984年); Neubergerら、Nature 312巻:604~608頁(1984年); Takedaら、Nature 314巻:452~454頁(1985年))。代替として、単鎖抗体の產生に関する記載された技術(米国特許第4,946,778号)を、EGFRまたはHSP90特異的な単鎖抗体を產生するように適合させることができる。

#### 【0088】

同様に、CDRを含む組成物は、当該分野において公知のCDRを単離するための技術を使用して生成される。相補性決定領域は、6つのポリペプチドループ(重鎖または軽鎖可変領域の各々につき、3つのループ)を特徴とする。CDRにおけるアミノ酸位置は、参考により本明細書に組み入れられる、Kabatら、「Sequences of Proteins of Immunological Interest」、U.S. Department of Health and Human Services、(1983年)によって定義される。例えば、ヒト抗体の超可変領域は、概して、重鎖および軽鎖可変領域の残基28~35、49~59、および残基92~103で見出されるものと定義される(JanewayおよびTravers、Immunobiology、第2版、Garland Publishing、New York、(1996年))。またマウスCDRも、概ねこれらのアミノ酸残基に見出されている。当該分野において、CDR領域は、上述されたこれらのおよその残基の数個のアミノ酸内に見出され得ることが理解されている。免疫グロブリン可変領域も、CDRを取り囲む4つの「フレームワーク」領域(FR1~4)からなる。異なる軽鎖または重鎖のフレームワーク領域の配列は、種内で高度に保存されており、ヒト配列とマウス配列との間でも保存されている。

#### 【0089】

モノクローナル抗体の重鎖可変領域または軽鎖可変領域の1つ、2つ、および/または3つのCDRを含む組成物が生成される。スクレオチドおよびポリペプチド配列をクローニングおよび発現するための技術は、当該分野で十分に確立されている(例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor、New York(1989年)を参照)。增幅させたCDR配列を、適切な発現ベクターにライゲートさせる。1つ、2つ、3つ、4つ、5つおよび/または6つのクローニングしたCDRを含むベクターは、任意選択で、CDRに連結された追加のポリペプチドをコードする領域を含有する。

10

20

30

40

50

## 【0090】

マウス抗体のフレームワーク領域（F R）は、1200種を超えるヒトV H配列および1000種を超えるV L配列を含むヒト抗体可変配列の大きいデータベースから選択される互換性のあるヒトフレームワーク領域を置換することによってヒト化される。比較に使用される抗体配列のデータベースは、Andrew C. R. MartinのKabat Manウェブページ(<http://www.rubic.rdg.ac.uk/abs/>)からダウンロードされる。CDRを同定するためのKabatの方法は、あらゆるヒト抗体からおよそのCDRおよびフレームワーク領域を描き、類似性に関してマウス抗体の配列と比較してCDRおよびF Rを決定するための手段を提供する。高い全体的なフレームワークのマッチング、類似のCDR長さ、および正規の残基およびV H / V L接触残基の最小のミスマッチに基づき、最もマッチしたヒトV HおよびV L配列が選択される。マウス配列に最も類似したヒトフレームワーク領域が、マウスCDR間に挿入される。代替として、マウスフレームワーク領域は、ヒト抗体のフレームワーク領域により厳密に似ているネイティブのフレームワーク領域の全てまたは一部のアミノ酸置換を行うことによって改変されていてもよい。

10

## 【0091】

加えて、本発明の開示で使用するための抗体を生成するための他の有用な技術は、合理的設計タイプのアプローチを使用する技術であり得る。合理的設計の目的は、それらが相互作用する生物学的に活性なポリペプチドの構造的な類似体または化合物（アゴニスト、アンタゴニスト、阻害剤、ペプチドミメティク(peptidomimetic)、結合パートナーなど）を産生することである。1つのアプローチでは、抗体またはそのエピトープ結合断片の3次元構造を生成することになる。これは、X線結晶学、コンピューターモデリングによって、または両方のアプローチの組み合わせによって達成することができる。代替アプローチである「アラニンスキャン」は、分子中の残基をアラニンでランダムに置き換え、それにより生じる機能に対する効果を決定することを含む。

20

## 【0092】

化学的に構築された二重特異性抗体は、例えばヘテロ二官能性試薬であるスクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)-プロピオネット(S P D P、Pierce Chemicals、Rockford、Ill.)などの化学物質を用いて異種FabまたはF(ab')<sub>2</sub>断片を化学的に架橋することによって調製することができる。FabおよびF(ab')<sub>2</sub>断片は、無傷の抗体をパパインまたはペプシンでそれぞれ消化することによって、無傷の抗体から得ることができる(Karpovskylar、J. Exp. Med. 160巻：1686～701頁(1984年)；Titussら、J. Immunol. 138巻：4018～22頁(1987年))。

30

## 【0093】

どのように抗体が産生されたかにかかわらずFIX Paduaのエピトープに結合する能力について抗体を試験する方法は、当該分野において公知であり、あらゆる抗体-抗原結合アッセイ、例えば、ラジオイムノアッセイ(R I A)、ELISA、ウェスタンプロット、免疫沈降、表面プラズモン共鳴、および競合阻害アッセイなどが挙げられる(例えば、Janewayら、下記、および米国特許出願公開第2002/0197266号を参照)。

40

## 【0094】

## ポリペプチド

配列番号6～11の各々を含むアミノ酸配列を含むポリペプチドが、本明細書においてさらに提供される。ポリペプチドは、FIX pに結合し、WT FIXに結合せず、例えば、ポリペプチドは、WT FIXの存在下でも、任意選択で、他の凝固因子、例えば第I因子および第X因子の存在下でも、FIX pにのみ結合する。例示的な態様において、ポリペプチドは、少なくとも5%、少なくとも10%または少なくとも20%のヒト血漿を含むサンプル中のFIX pに結合する。例示的な態様において、配列番号6～11の各々の間に、1つまたは複数のアミノ酸が存在する。例示的な態様において、ポリペプチド

50

は、配列番号 2 4 もしくは配列番号 2 5 または配列番号 2 4 および 2 5 の両方の配列を含む。例示的な態様において、ポリペプチドは、配列番号 2 6 もしくは配列番号 2 7 または配列番号 2 6 および 2 7 の両方の配列を含む。例示的な態様において、ポリペプチドのアミノ酸配列は、例えば、リンカー、発現タグ（例えば、H i s タグ、F L A G タグ、m y c タグ、蛍光タンパク質（例えば、緑色蛍光タンパク質、青色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、黄色蛍光タンパク質、シアン蛍光タンパク質、強化緑色蛍光タンパク質など）の追加の配列を含む。例示的な態様において、ポリペプチドは、H i s タグおよび / または F L A G タグの配列を含む。例示的な態様において、F L A G タグは、配列番号 1 2 の配列を含む。例示的な態様において、H i s タグは、配列番号 1 3 の配列を含む。例示的な態様において、ポリペプチドは、リンカーを含む。例示的な態様において、ポリペプチドは、合成二重ヘリックスループヘリックスモチーフの配列、例えば H a y l o c k ら、I n t J . O n c o l . 4 8 卷（2 号）：4 6 1 ~ 4 7 0 頁（2 0 1 6 年）または W a n g ら、A n a l . C h e m . 7 8 卷：9 9 7 ~ 1 0 0 4 頁（2 0 0 6 年）に記載されるものを含む。例示的な態様において、ポリペプチドは、定常抗体ドメインの配列を含む。このような抗体ドメインは、H u ら、C a n c e r R e s 5 6 卷：3 0 5 5 ~ 3 0 6 1 頁（1 9 9 6 年）および M c G r e g o r ら、M o l I m m u n o 3 1 卷：2 1 9 ~ 2 2 6 頁（1 9 9 4 年）に記載されている。例示的な態様において、ポリペプチドは、細菌のアルカリホスファターゼドメイン、例えば上記の W a n g ら（2 0 0 6 年）に記載されるものを含む。例示的な態様において、ポリペプチドは、配列番号 2 8 もしくは配列番号 2 7 または配列番号 2 8 および 2 7 の両方の配列を含む。

10

20

#### 【 0 0 9 5 】

##### コンジュゲート

本明細書に記載される結合性構築物は、例えば、グリコシリ化、アミド化、カルボキシリ化、もしくはリン酸化によって、または酸付加塩、アミド、エステル、特に C 末端エステル、および N - アシル誘導体を作り出すことによって改変することができる。また結合性構築物は、他の成分と共有結合または非共有結合複合体、すなわちコンジュゲートを形成することによって誘導体が作り出されるように改変することもできる。共有結合した複合体は、結合性構築物を含むアミノ酸の側鎖上の官能基に、または N もしくは C 末端で化学成分を連結することによって調製することができる。

30

#### 【 0 0 9 6 】

一部の実施形態において、本開示の結合性構築物は、第 2 の成分（例えば、異種成分）に付着される、連結される、繋がれる、またはコンジュゲートされ、得られた生成物は、コンジュゲートである。したがって、本明細書は、異種成分に（共有結合で、または非共有結合によって）連結された本明細書に記載される結合性構築物を含むコンジュゲートを提供する。本明細書で使用される場合、用語「異種成分」は、本発明の結合性構築物と異なるあらゆる分子（化学的もしくは生化学、天然に存在する、または非コード化）を指す。例示的な異種成分としては、これらに限定されないが、ポリマー、炭水化物、脂質、核酸、オリゴヌクレオチド、D N A もしくは R N A 、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、治療剤（例えば、細胞傷害剤、サイトカイン）、診断剤または検出剤が挙げられる。

40

#### 【 0 0 9 7 】

一部の実施形態において、結合性構築物は、様々な異種成分で化学修飾される。一部の実施形態において、化学修飾は、本明細書で論じられるような追加の所望の特徴を付与する。化学修飾は、一部の態様において、様々な異なる形態、例えば異種ペプチド、多糖類、脂質、放射性同位体、非標準的なアミノ酸残基および核酸、金属キレート、ならびに様々な細胞傷害剤などの形態をとる。

#### 【 0 0 9 8 】

一部の実施形態において、結合性構築物は、様々な特性、例えば、溶解度および / または安定性および / または半減期の増加、タンパク質分解による切断に対する耐性、クリアランスのモジュレーション、特定の細胞または組織タイプへの標的化を付与するために、異

50

種ペプチドに融合される。一部の実施形態において、結合性構築物は、IgGまたは他の免疫グロブリンのFcドメインに連結される。一部の実施形態において、結合性構築物は、アルカリホスファターゼ(AP)に融合されている。FcまたはAP融合構築物を作製するための方法は、国際特許公開WO02/060950号に見出される。結合性構築物を、特異的な特性(例えば、半減期、バイオアベイラビリティ)を有するタンパク質ドメインと融合させることによって、これらの特性を本発明の結合性構築物に付与することが可能である。

#### 【0099】

結合性構築物は、検出剤(例えば、検出可能な標識またはレポーター基)、これらに限定されないが、放射性標識、蛍光標識、酵素(例えば、熱量測定または蛍光測定的な反応を触媒する酵素)、基質、固体マトリクス、または担体(例えば、ビオチンまたはアビジン)などにコンジュゲートさせることができる。例示的な態様において、蛍光標識は、ローダミン色素、フルオレセイン色素および/またはシアニン色素を含む。例示的な実施形態において、蛍光標識は、一組の色素、例えば、ローダミン色素、TAMRA、およびフルオレセイン色素、FAMを含む。別の実施形態において、蛍光標識は、オレゴングリーン488、フルオレセイン-EX(Fluorescein-EX)、フルオレセインイソチオシアネット、ローダミンレッド-X、リサミンローダミンB、カルセイン、フルオレセイン、ローダミン、1つまたは複数のBODIPY色素、テキサスレッド、オレゴングリーン514、および1つまたは複数のAlexa Fluorからなる群より2つもしくはそれより多くの色素を選択することによって形成された一組の蛍光色素を含む。代表的なBODIPY色素としては、BODIPY FL、BODIPY R6G、BODIPY TMR、BODIPY 581/591、BODIPY TR、BODIPY 630/650およびBODIPY 650/665が挙げられる。代表的なAlexa Fluorとしては、Alexa Fluor 350、405、430、488、500、514、532、546、555、568、594、610、633、635、647、660、680、700、750および790が挙げられる。例示的な態様において、蛍光標識は、オレゴングリーン488、フルオレセイン-EX、FITC、ローダミンレッド-X、リサミンローダミンB、カルセイン、フルオレセイン、ローダミン、BODIPYS、およびテキサスレッド、例えばMolecular Probes Handbook、第11版(2010年)に開示されているものの1つまたは複数を含む。例示的な態様において、検出可能な標識は、放射性同位体、発色団、フルオロフォア、蛍光色素、酵素(例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ)、リンカー分子または他の成分もしくは化合物から選択され、これらは、検出可能なシグナル(例えば、放射能、蛍光、色)を放出するか、または標識がその基質に曝露された後に検出可能なシグナルを放出するかのいずれかである。様々な検出可能な標識/基質対(例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ/ジアミノベンジン、ビオチン/ストレプトアビシン、ルシフェラーゼ/ルシフェリン)、抗体を標識化するための方法、および標識化された二次抗体を使用して抗原を検出するための方法は、当該分野において周知である。例えば、HarlowおよびLane編(U sing Antibodies: A Laboratory Manual(1999年)Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.)を参照されたい。

#### 【0100】

一部の実施形態において、結合性構築物は、リンカーの非存在下で、異種成分に直接繋がれている。代替の態様において、結合性構築物は、1つまたは複数のリンカーを介して、異種成分に間接的に接続されている。直接的に繋ぎ合わされているかまたはリンカーを介して間接的に繋ぎ合わされているかにかかわらず、結合性構築物は、共有結合(例えば、ペプチド、エステル、アミド、またはスルフヒドリル結合)もしくは非共有結合(例えば、疎水性相互作用、水素結合、ファンデルワールス結合、静電またはイオン性相互作用を介して)、またはそれらの組み合わせを介して接続されていてもよい。本発明の結合性構築物および異種成分は、当該分野において公知のあらゆる手段を介して接続されていても

10

20

30

40

50

よく、これらに限定されないが、本発明のいずれかのリンカーを介して接続されていてもよい。

#### 【0101】

本明細書に記載される結合性構築物の特定の残基は、異種成分が付着する可能性がある例示的な部位を表す。例えば、Cys、His、LysおよびN末端残基、Arg、Tyr、Asp、Glu、Ser、Thr、Proは、異種成分が付着する可能性がある部位を表す。一部の態様において、残基（またはその部分）は、異種成分を付着させる前に、1つもしくは複数の薬剤および/または化学物質で活性化される。

#### 【0102】

二官能性の薬剤での誘導体化は、水不溶性の支持マトリクスに結合性構築物を架橋するのに有用である。このような誘導体化はまた、結合性構築物中で隣接する結合エレメントを接続し、または結合エレメントを異種ペプチド、例えばFc断片に接続することができるリンカーを提供する場合もある。一般的に使用される架橋剤としては、例えば、1,1-ビス(ジアゾアセチル)-2-フェニルエタン、グルタルアルデヒド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、例えば4-アジドサリチル酸とのエステル、ホモ二官能性イミドエステル、例えばジスクシンイミジルエステル、例えば3,3'-ジチオビス(スクシンイミジルプロピオネート)、および二官能性マレイミド、例えばビス-N-マレイミド-1,8-オクタンなどが挙げられる。例えばメチル-3-[ (p-アジドフェニル)ジチオ]プロピオイミデートなどの誘導体化剤は、光の存在下で架橋を形成する可能な光活性化可能な中間体を生じる。代替として、タンパク質固定のために、反応性水不溶性マトリクス、例えば臭化シアンで活性化される炭水化物、ならびに参照により本明細書に組み入れられる米国特許第3,969,287号；同第3,691,016号；同第4,195,128号；同第4,247,642号；同第4,229,537号；および同第4,330,440号に記載される反応性基質が採用される。

10

20

30

#### 【0103】

一般的に、化学的な誘導体化は、タンパク質を異種成分、例えば活性化されたポリマー分子と反応させるのに使用されるあらゆる好適な条件下で実行することができる。ポリペプチドの化学的な誘導体を調製するための方法は、一般的に、(a)結合性構築物を、結合性構築物が1つまたは複数のポリマー分子に付着するようになる条件下で、異種成分、例えば活性化されたポリマー分子（例えばポリマー分子の反応性エステルまたはアルデヒド誘導体）と反応させるステップ、および(b)反応生成物を得るステップを含むであろう。最適な反応条件は、公知のパラメーターおよび所望の結果に基づき決定されるであろう。例えば、ポリマー分子：タンパク質の比率が大きいほど、付着したポリマー分子の量がより多くなる。一部の実施形態において、化合物は、アミノ末端に単一のポリマー分子成分を有していてもよい。（例えば、米国特許第5,234,784号を参照）。

#### 【0104】

本明細書で開示された誘導体化された結合性構築物は、誘導体化されていない分子と比較して、追加の活性、強化もしくは低減された生物活性、または他の特徴、例えば増加もしくは減少した半減期を有していてもよい。

40

#### 【0105】

##### コンジュゲート：Fc融合体

ヒトIgGのFc領域などの置換基の場合、融合体は、本発明の結合性構築物に直接融合させる、または介在配列を介して融合させてもよい。例えば、ヒトIgGヒンジ、CH2およびCH3領域を、結合性構築物のN末端またはC末端のいずれかで融合させて、Fc領域を付着させることができる。得られたFc融合構築物は、プロテインAアフィニティカラム(Pierce, Rockford, Ill.)による精製を可能にする。Fc領域に融合したペプチドおよびタンパク質は、in vivoにおいて、融合していない対応物より実質的に大きい半減期を呈し得る。Fc領域への融合は、融合ポリペプチドの二量体化/多量体化を可能にする。Fc領域は、天然に存在するFc領域であってもよく、または優れた特徴、例えば、治療または診断のクオリティー、循環時間、凝集の低減の

50

ために改変されてもよい。上述したように、一部の実施形態において、結合性構築物は、免疫グロブリンまたはその部分（例えば、可変領域、CDR、またはFc領域）にコンジュゲートしており、例えば融合している。免疫グロブリン(Ig)の公知のタイプとしては、IgG、IgA、IgE、IgDまたはIgMが挙げられる。Fc領域は、Ig重鎖のC末端領域であり、これは、再利用（これは、延長した半減期をもたらす）、抗体依存性の細胞媒介性細胞傷害（ADCC）、および補体依存性細胞傷害（CDC）などの活動を行うFc受容体への結合に関与する。

#### 【0106】

例えば、一部の定義によれば、ヒトIgG重鎖のFc領域は、Cys226から重鎖のC末端に伸長する。「ヒンジ領域」は、一般的に、ヒトIgG1のGlu216からPro230に伸長する（他のIgGアイソタイプのヒンジ領域は、システイン結合に関与するシステインを整列することによってIgG1配列と整列することができる）。IgGのFc領域は、2つの定常ドメイン、CH2およびCH3を含む。ヒトIgGのFc領域のCH2ドメインは通常、アミノ酸231からアミノ酸341に伸長する。ヒトIgGのFc領域のCH3ドメインは通常、アミノ酸342から447に伸長する。免疫グロブリンまたは免疫グロブリン断片もしくは領域のアミノ酸の番号付けに対してなされた言及は全て、Kabatら、1991年、Sequences of Proteins of Immunological Interest、U.S. Department of Public Health、Bethesda、Mdに基づく。関連する実施形態において、Fc領域は、CH1以外の免疫グロブリン重鎖、例えばIgGおよびIgAのCH2およびCH3領域、またはIgEのCH3およびCH4領域に由来する、1つまたは複数のネイティブのまたは改変された定常領域を含んでいてもよい。

10

20

30

#### 【0107】

好適な異種成分は、FcRn結合部位を含む免疫グロブリン配列の部分を含む。FcRnは、サルベージ受容体であり、免疫グロブリンを再利用し、それを血液の循環に戻すことに関与する。FcRn受容体に結合するIgGのFc部分の領域は、X線結晶学に基づき説明されている（Burmeisterら、1994年、Nature 372巻：379頁）。Fcの主要なFcRnとの接触領域は、CH2およびCH3ドメインの接合部に近い。Fc-FcRnの接触は、全て単一のIg重鎖内である。主要な接触部位としては、CH2ドメインのアミノ酸残基248、250～257、272、285、288、290～291、308～311、および314、ならびにCH3ドメインのアミノ酸残基385～387、428、および433～436が挙げられる。

#### 【0108】

アミノ酸改変は、免疫グロブリンのFc領域になされてもよい。このようなバリエントFc領域は、Fc領域のCH3ドメイン（残基342～447）中に少なくとも1つのアミノ酸改変、および/またはFc領域のCH2ドメイン（残基231～341）中に少なくとも1つのアミノ酸改変を含む。FcRnに対する親和性の増加を付与すると考えられる変異としては、T256A、T307A、E380A、およびN434Aが挙げられる（Shieldら、2001年、J. Biol. Chem. 276巻：6591頁）。他の変異は、FcRnへの親和性を有意に低減させずに、Fc領域のFc RI、Fc RIIIA、Fc RIIIB、および/またはFc RIIIAへの結合を低減させることができる。例えば、Fc領域の297位におけるAlaまたは別のアミノ酸でのAsnの置換は、高度に保存されたN-グリコシル化部位を除去し、免疫原性の低減とそれに伴うFc領域の半減期の延長、加えてFc Rへの結合の低減をもたらす可能性がある（Routledgeら、1995年、Transplantation 60巻：847頁；Friendら、1999年、Transplantation 68巻：1632頁；Shieldら、1995年、J. Biol. Chem. 276巻：6591頁）。Fc Rへの結合を低減させるIgG1の233～236位におけるアミノ酸改変がなされている（WardおよびGhetie 1995年、Therapeutic Immunology 2巻：77頁およびArmourら、1999年、Eur. J. I

40

50

mmunol. 29巻：2613頁）。一部の例示的なアミノ酸置換は、それぞれその全体が参照により本明細書に組み入れられる米国特許7,355,008および7,381,408に記載されている。

#### 【0109】

異種成分：ポリマー、炭水化物、および脂質

例示的な実施形態において、異種成分は、ポリマーである。ポリマーは、分岐状であっても、または非分岐状であってもよい。ポリマーは、どのような分子量を有していてもよい。一部の実施形態において、ポリマーは、約2kDa～約100kDaの間の平均分子量を有する（用語「約」は、水溶性ポリマーの調製物において、一部の分子が、述べられた分子量より高いか多少低い重さを有することを示す）。ポリマーの平均分子量は、一部の態様において、約5kDa～約50kDaの間、約12kDa～約40kDaの間、または約20kDa～約35kDaの間である。

10

#### 【0110】

一部の実施形態において、ポリマーは、重合度を制御できるように、単一の反応性基、例えばアシル化の場合は活性エステル、またはアルキル化の場合はアルデヒドを有するよう改変される。一部の実施形態において、ポリマーは、それが付着するタンパク質が水性環境、例えば生理学的な環境で沈殿しないように、水溶性である。一部の実施形態において、例えば組成物が治療的用途で使用される場合、ポリマーは、薬学的に許容されるものである。加えて、一部の態様において、ポリマーは、ポリマーの混合物、例えばコポリマー、ブロックコポリマーである。

20

#### 【0111】

一部の実施形態において、ポリマーは、ポリアミド、ポリカーボネート、ポリアルキレンおよびその誘導体、例えば、ポリアルキレングリコール、ポリアルキレンオキシド、ポリアルキレンテレフタレート(terephthalate)など、アクリル酸およびメタクリル酸エステルのポリマー、例えば、ポリ(メタクリル酸メチル)、ポリ(メタクリル酸エチル)、ポリ(メタクリル酸ブチル)、ポリ(メタクリル酸イソブチル)、ポリ(メタクリル酸ヘキシル)、ポリ(メタクリル酸イソデシル)、ポリ(メタクリル酸ラウリル)、ポリ(メタクリル酸フェニル)、ポリ(アクリル酸メチル)、ポリ(アクリル酸イソプロピル)、ポリ(アクリル酸イソブチル)、およびポリ(アクリル酸オクタデシル)など、ポリビニルポリマー、例えば、ポリビニルアルコール、ポリビニルエーテル、ポリビニルエステル、ハロゲン化ポリビニル、ポリ(酢酸ビニル)、およびポリビニルピロリドンなど、ポリグリコリド、ポリシロキサン、ポリウレタンおよびそれらのコポリマー、セルロース、例えば、アルキルセルロース、ヒドロキシアルキセルロース、セルロースエーテル、セルロースエステル、ニトロセルロース、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシブチルメチルセルロース、酢酸セルロース、プロピオン酸セルロース、酢酸酪酸セルロース、酢酸フタル酸セルロース、カルボキシルエチルセルロース、三酢酸セルロース、およびセルロース硫酸ナトリウム塩など、ポリプロピレン、ポリエチレン、例えば、ポリ(エチレングリコール)、ポリ(エチレンオキシド)、およびポリ(フタル酸エチレン)など、ならびにポリスチレンからなる群より選択される。

30

#### 【0112】

一部の態様において、ポリマーは、生分解性ポリマー、例えば合成生分解性ポリマー（例えば、乳酸とグリコール酸とのポリマー、ポリ無水物、ポリ(オルト)エステル、ポリウレタン、ポリ(酪酸(butic acid))、ポリ(吉草酸)、およびポリ(ラクチド-co-カプロラクトン)）、ならびに天然生分解性ポリマー（例えば、アルギメントおよび他の多糖類、例えばデキストランおよびセルロースなど、コラーゲン、それらの化学誘導体（化学基、例えばアルキル、アルキレンの置換、付加、ヒドロキシル化、酸化、および当業者によって慣例的になされる他の改変）、アルブミンおよび他の親水性タンパク質（例えば、ゼイン、ならびに他のプロラミンおよび疎水性タンパク質））、加えてそれらのあらゆるコポリマーまたは混合物である。一般的に、これらの材料は、in vi

40

50

v o における酵素加水分解または水分への曝露のいずれかによる、表面またはバルクの浸食によって分解する。

#### 【 0 1 1 3 】

一部の態様において、ポリマーは、生体接着性ポリマー、例えば、その教示が本明細書に組み入れられる H . S . S a w h n e y 、 C . P . P a t h a k および J . A . H u b b e l l による M a c r o m o l e c u l e s 、 1 9 9 3 年、 2 6 卷、 5 8 1 ~ 5 8 7 頁で記載された生体内分解性ヒドロゲル、ポリヒアルロン酸、カゼイン、ゼラチン、グルチン ( g l u t i n ) 、ポリ無水物、ポリアクリル酸、アルギネート、キトサン、ポリ ( メタクリル酸メチル ) 、ポリ ( メタクリル酸エチル ) 、ポリ ( メタクリル酸ブチル ) 、ポリ ( メタクリル酸イソブチル ) 、ポリ ( メタクリル酸ヘキシル ) 、ポリ ( メタクリル酸イソデシル ) 、ポリ ( メタクリル酸ラウリル ) 、ポリ ( メタクリル酸フェニル ) 、ポリ ( アクリル酸メチル ) 、ポリ ( アクリル酸イソプロピル ) 、ポリ ( アクリル酸イソブチル ) 、およびポリ ( アクリル酸オクタデシル ) などである。 10

#### 【 0 1 1 4 】

一部の実施形態において、ポリマーは、水溶性ポリマーまたは親水性ポリマーである。好適な水溶性ポリマーは、当該分野において公知であり、例えば、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルセルロース ( H P C ; K l u c e l ) 、ヒドロキシプロピルメチルセルロース ( H P M C ; M e t h o c e l ) 、ニトロセルロース、ヒドロキシプロピルエチルセルロース、ヒドロキシプロピルブチルセルロース、ヒドロキシプロピルベンチルセルロース、メチルセルロース、エチルセルロース ( E t h o c e l ) 、ヒドロキシエチルセルロース、様々なアルキルセルロースおよびヒドロキシアルキルセルロース、様々なセルロースエーテル、酢酸セルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、カルボキシメチルセルロースカルシウム、酢酸ビニル / クロトン酸コポリマー、ポリメタクリル酸ヒドロキシアルキル、メタクリル酸ヒドロキシメチル、メタクリル酸コポリマー、ポリメタクリル酸、ポリメタクリル酸メチル、無水マレイン酸 / メチルビニルエーテルコポリマー、ポリビニルアルコール、ポリアクリル酸のナトリウムおよびカルシウム塩 ( s o d i u m a n d c a l c i u m p o l y a c r y l i c a c i d ) 、ポリアクリル酸、酸性カルボキシポリマー、カルボキシポリメチレン、カルボキシビニルポリマー、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンコポリマー、ポリメチルビニルエーテル - c o - 無水マレイン酸、カルボキシメチルアミド、メタクリル酸カリウムジビニルベンゼンコポリマー、ポリオキシエチレングリコール、ポリエチレンオキシド、ならびにそれらの誘導体、塩、および組み合わせが挙げられる。一部の態様において、水溶性ポリマーまたはそれらの混合物としては、これらに限定されないが、 N - 結合型または O - 結合型炭水化物、糖、ホスフェート、炭水化物；糖；ホスフェート；ポリエチレングリコール ( P E G ) ( 例えれば、タンパク質を誘導体化するのに使用されている P E G の形態、例えばモノ ( C 1 ~ C 1 0 ) アルコキシ - またはアリールオキシ - ポリエチレングリコールなど ) ；モノメトキシポリエチレングリコール；デキストラン ( 例えれば、低分子量デキストラン、例えれば約 6 k D のもの ) 、セルロース；セルロース；他の炭水化物ベースのポリマー、ポリ - ( N - ビニルピロリドン ) ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド / エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール ( 例えれば、グリセロール ) 、およびポリビニルアルコールが挙げられる。また、本発明は、共有結合で付着した多量体を調製するのに使用できる二官能性の架橋分子も包含する。 20 30 40

#### 【 0 1 1 5 】

本明細書での使用のため特に好ましい水溶性ポリマーは、ポリエチレングリコール ( P E G ) である。ポリエチレングリコールは、本明細書で使用される場合、他のタンパク質を誘導体化するのに使用できる P E G の形態のいずれかを包含することを意味し、例えればモノ ( C 1 ~ C 1 0 ) アルコキシ - またはアリールオキシ - ポリエチレングリコールなどである。 P E G は、広範な分子量で入手可能な直鎖状または分岐状の中性ポリエーテルであり、水とほとんどの有機溶媒に可溶性である。 P E G は、水中に存在する場合、主とし 50

てその高い動的な鎖の移動性と親水性の性質によって、他のタンパク質またはポリマーの表面に付着したときに水のシェルまたは水和層(hydration sphere)を作り出すことから、他のポリマーまたはペプチドを排除するのに有効である。PEGは、非毒性、非免疫原性であり、食品医薬品局によって内部での消費に承認されている。

#### 【0116】

ペグ化化合物を調製するための方法は、(a) 化合物が1つまたは複数のPEG基に付着するようになる条件下で、化合物をポリエチレングリコール(例えばPEGの反応性エステルまたはアルデヒド誘導体)と反応させるステップ、および(b) 反応生成物を得るステップを含んでいてもよい。一般的に、アシル化反応のための最適な反応条件は、公知のパラメーターおよび所望の結果に基づいて決定されるであろう。例えば、PEG:化合物の比が大きいほど、ポリペグ化生成物のパーセンテージがより大きくなる。一部の実施形態において、結合性構築物は、N末端に単一のPEG成分を有する。参照により本明細書に組み入れられる米国特許第8,234,784号を参照されたい。10

#### 【0117】

一部の実施形態において、異種成分は、炭水化物である。一部の実施形態において、炭水化物は、単糖(例えば、グルコース、ガラクトース、フルクトース)、二糖(例えば、スクロース、ラクトース、マルトース)、オリゴ糖(例えば、ラフィノース、スタキオース)、多糖(デンプン、アミラーゼ、アミロペクチン、セルロース、キチン、カラース、ラミナリン、キシラン、マンナン、フコイダン、ガラクトマンナン)である。

#### 【0118】

一部の実施形態において、異種成分は、脂質である。一部の実施形態において、脂質は、脂肪酸、エイコサノイド、プロスタグランジン、ロイコトリエン、トロンボキサン、N-アシルエタノールアミン)、グリセロ脂質(例えば、一、二、三置換グリセロール)、グリセロリン脂質(例えば、ホスファチジルコリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン)、スフィンゴ脂質(例えば、スフィンゴシン、セラミド)、ステロール脂質(例えば、ステロイド、コレステロール)、ブレノール脂質、サッカロリピド(saccharolipid)、またはポリケチド、油、ワックス、コレステロール、ステロール、脂溶性ビタミン、モノグリセリド、ジグリセリド、トリグリセリド、リン脂質である。20

#### 【0119】

異種成分：治療剤

一部の実施形態において、異種成分は、治療剤である。治療剤は、当該分野において公知のもののいずれでもよい。本明細書において企図される治療剤の例としては、これらに限定されないが、天然の酵素、天然供給源由来のタンパク質、組換えタンパク質、天然のペプチド、合成ペプチド、環状ペプチド、抗体、受容体アゴニスト、細胞傷害剤、免疫グロブリン(immunoglobulin)、ベータ-アドレナリン遮断剤、カルシウムチャネル遮断薬、冠血管拡張薬、強心配糖体、抗不整脈薬、心臓交感神経様作用薬(cardiac sympathetic metanic)、アンギオテンシン変換酵素(ACE)阻害剤、利尿薬、変力物質、コレステロールおよびトリグリセリド降下剤、胆汁酸金属イオン封鎖剤、フィブラーート、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル(methylglutaryl) (HMG)-CoAレダクター阻害剤、ナイアシン誘導体、抗アドレナリン作動薬、アルファ-アドレナリン遮断剤、中枢作用性抗アドレナリン作動薬、血管拡張薬、カリウム保持剤、チアジドおよび関連薬剤、アンギオテンシンII受容体アンタゴニスト、末梢血管拡張薬、抗アンドロゲン剤、エストロゲン、抗生物質、レチノイド、インスリンおよび類似体、アルファ-グルコシダーゼ阻害剤、ビグアニド、メグリチニド、スルホニル尿素、チアゾリジンジオン(thiazolidinedione)、アンドロゲン、プロゲストゲン、骨代謝調節薬、下垂体前葉ホルモン、視床下部ホルモン、下垂体後葉ホルモン、ゴナドトロピン、ゴナドトロピン放出ホルモンアンタゴニスト、排卵刺激剤、選択的エストロゲン受容体モジュレーター、抗甲状腺剤、甲状腺ホルモン、膨張性物質(bulk forming agent)、緩下剤、蠕動抑制薬(antiperistaltic)304050

l t i c ) 、 フローラ調節剤、 腸内吸着剤、 腸内抗感染薬、 食欲増進薬 ( a n t i a n o r e x i c ) 、 抗悪液質薬 ( a n t i c a c h e x i c ) 、 抗過食薬 ( a n t i b u l i m i c ) 、 食欲抑制薬、 抗肥満剤、 制酸薬、 上部消化管剤、 抗コリン剤、 アミノサリチル酸誘導体、 生体応答調整物質、 コルチコステロイド、 鎮痙薬、 5 - H T 4 部分アゴニスト、 抗ヒスタミン剤、 カンナビノイド、 ドーパミンアンタゴニスト、 セロトニンアンタゴニスト、 細胞保護剤、 ヒスタミン H 2 - 受容体アンタゴニスト、 粘膜保護剤、 プロトンポンプ阻害剤、 H . p y l o r i 除菌療法、 赤血球産生刺激因子、 造血剤、 貧血剤、 ヘパリン、 抗線維素溶解剤、 止血薬、 血液凝固因子、 アデノシンニリン酸阻害剤、 糖タンパク質受容体阻害剤、 フィブリノーゲン - 血小板結合阻害剤、 トロンボキサン - A 2 阻害剤、 プラスミノゲン活性化因子、 抗血栓剤、 グルココルチコイド、 ミネラルコルチコイド、 コルチコステロイド、 選択的免疫抑制剤、 抗真菌剤、 予防療法に関与する薬物、 A I D S 関連感染、 サイトメガロウイルス、 非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤、 ヌクレオシド類似体逆転写酵素 ( t r a n s c r i p t s e ) 阻害剤、 プロテアーゼ阻害剤、 貧血、 カポジ肉腫、 アミノグリコシド、 カルバペネム、 セファロスポリン、 グリコペプチド ( g l y c o p o p t i d e ) 、 リンコサミド、 マクロライド ( m a c r o l i d e s ) 、 オキサゾリジノン、 ペニシリン、 ストレプトグラミン、 スルホンアミド、 トリメトプリムおよび誘導体、 テトラサイクリン、 駆虫薬、 抗アメーバ薬 ( a m e b i c i e s ) 、 ビグアニド、 キナルカロイド、 葉酸アンタゴニスト、 キノリン誘導体、 P n e u m o c y s t i s c a r i n i i 療法、 ヒドラジド、 イミダゾール、 トリアゾール、 ニトロイミダゾール ( n i t r o i m i d z a o l e ) 、 環状アミン、 ノイラミニダーゼ阻害剤、 ヌクレオシド、 ホスフェート結合因子、 コリンエステラーゼ阻害剤、 補助療法、 バルビツール酸塩および誘導体、 ベンゾジアゼピン、 ガンマアミノ酪酸誘導体、 ヒダントイン誘導体、 イミノスチルベン誘導体、 スクシンイミド誘導体、 抗痙攣薬、 麦角アルカロイド、 抗片頭痛薬 ( a n t i m i g r a n e ) 調製物、 生体応答調整物質、 カルバミン酸エステル ( c a r b a m i c a c i d e a t e r ) 、 三環式誘導体、 脱分極剤、 非脱分極剤、 神経筋麻痺剤 ( n e u r o m u s c u l a r p a r a l y t i c a g e n t ) 、 C N S 刺激剤、 ドーパミン作動性試薬、 モノアミンオキシダーゼ阻害剤、 C O M T 阻害剤、 スルホン酸アルキル、 エチレンイミン、 イミダゾテトラジン、 ナイトロジェンマスターード類似体、 ニトロソウレア、 白金含有化合物、 代謝拮抗物質、 プリン類似体、 ピリミジン類似体、 尿素誘導体、 アントラサイクリン ( a n t r a c y c l i n e ) 、 アクチノマイシン D 、 カンプトテシン誘導体、 エピポドフィロトキシン、 タキサン、 ビンカアルカロイドおよび類似体、 抗アンドロゲン剤、 抗エストロゲン薬、 非ステロイド性アロマターゼ阻害剤、 プロテインキナーゼ阻害剤抗新生物薬、 アザスピロデカンジオン誘導体、 抗不安薬、 刺激剤、 モノアミン ( m o n o a m i n d ) 再取り込み阻害剤、 選択的セロトニン再取り込み阻害剤、 抗うつ薬、 ベンゾイソオキサゾール誘導体、 ブチロフェノン誘導体、 ジベンゾジアゼピン誘導体、 ジベンゾチアゼピン誘導体、 ジフェニルブチルピペリジン誘導体、 フェノチアジン、 チエノベンゾジアゼピン誘導体、 チオキサンテン誘導体、 アレルゲン抽出物、 非ステロイド系薬剤、 ロイコトリエン受容体アンタゴニスト、 キサンチン、 エンドセリン受容体アンタゴニスト、 プロスタグラジン、 肺サーファクタント、 粘液溶解剤、 抗有糸分裂剤、 尿酸排泄薬 ( u r i c o s u r i c ) 、 キサンチンオキシダーゼ阻害剤、 ホスホジエステラーゼ阻害剤、 メテナミン ( m e t h e a m i n e ) 塩、 ニトロフラン誘導体、 キノロン、 平滑筋弛緩薬、 副交感神経作動薬、 ハロゲン化炭化水素、 アミノ安息香酸のエステル、 アミド ( 例えればリドカイン、 塩酸アルチカイン、 塩酸ブピバカイン ) 、 解熱剤、 催眠薬 ( h y n o t i c ) および鎮静剤、 シクロピロロン、 ピラゾロピリミジン、 非ステロイド性抗炎症薬、 オピオイド、 パラ - アミノフェノール誘導体、 アルコールデヒドロゲナーゼ阻害剤、 ヘパリンアンタゴニスト、 吸着剤、 催吐薬、 オピオイドアンタゴニスト、 コリンエステラーゼ再活性化因子、 ニコチン補充療法、 ビタミン A 類似体およびアンタゴニスト、 ビタミン B 類似体およびアンタゴニスト、 ビタミン C 類似体およびアンタゴニスト、 ビタミン D 類似体およびアンタゴニスト、 ビタミン E 類似体およびアンタゴニスト、 ビタミン K 類似体およびアンタゴニストが挙げられる。

10

20

30

40

50

## 【0120】

## コンジュゲート：検出剤

例示的な実施形態において、結合性構築物は、検出剤にコンジュゲートされている。例示的な実施形態において、検出剤は、酵素活性、放射能、色素形成活性、および／または結合活性に基づき検出可能な（測定可能な）シグナルを放出することが可能である。例示的な実施形態において、シグナルは、放射性、色素形成、比色、蛍光定量的、化学発光、強化された化学発光、直接的な蛍光、時間分解蛍光、直接的な化学発光、リン光性、酵素によるものか、またはマイクロもしくはナノ粒子、ストレプトアビジン／アビジン・ビオチンおよびプロテインAの結合に基づく。例示的な実施形態において、検出剤は、酵素、放射性同位体、DNAレポーター、色素形成もしくは蛍光発生レポーター、または電気化学発光タグを含む。例示的な態様において、酵素は、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）、アルカリホスファターゼ（AP）、グルコースオキシダーゼ、またはベータ-ガラクトシダーゼである。例示的な態様において、酵素は、ある特定の試薬に曝露されると、化学発光または光の発生を引き起こす。例示的な態様において、放射性同位体は、I<sup>125</sup>である。例示的な態様において、DNAレポーターは、DNAプローブである。例示的な態様において、蛍光発生レポーターは、フィコエリトリン（PE）、例えば、B-PE、R-PE、またはアロフィコシアニン（APC）である。

10

## 【0121】

## コンジュゲート：二量体および多量体

一部の実施形態において、結合性構築物は、1つより多くの本発明の結合性構築物が一緒に連結されている二量体または多量体として提供される。一部の態様において、二量体は、一緒に連結された同じタイプの（例えば、同じ構造の）2つの結合性構築物を含むホモ二量体である。代替の態様において、二量体は、互いに構造的に異なる2つの本発明の結合性構築物を含むヘテロ二量体である。一部の態様において、多量体は、各結合性構築物が同じタイプ（例えば、同じ構造）を有する、本発明の1つより多くの結合性構築物を含むホモ多量体である。代替の態様において、多量体は、1つより多くの本発明の結合性構築物を含むヘテロ多量体であり、ここでヘテロ多量体の少なくとも2つの結合性構築物が、その他のものと構造的に異なっている。例示的な態様において、結合性構築物は、2つのFab断片の二量体、例えばホモ二量体を含み、各Fab断片は、FIXpに結合し、WT-FIXに結合せず、例えば、WT-FIXの存在下でも、またはヒト血漿を含むサンプル中でも、FIXpに結合する。例示的な態様において、2つのFab断片を含むホモ二量体は、二価であるが、FIXpに対して单一特異性である。例示的な態様において、ホモ二量体の各Fab断片は、配列番号6～11のアミノ酸配列を含む。例示的な態様において、配列番号6～11のそれぞれの間に、1つまたは複数のアミノ酸が存在する。例示的な態様において、ホモ二量体の各Fab断片は、配列番号24もしくは配列番号25または配列番号24および25の両方の配列を含む。例示的な態様において、ホモ二量体の各Fab断片は、配列番号26もしくは配列番号27または配列番号26および27の両方の配列を含む。

20

## 【0122】

結合性構築物の2つまたはそれより多くは、当業者公知の標準的な連結剤（linking agent）および手順を使用して一緒に連結させることができる。ある特定の実施形態において、2つの（またはそれより多くの）結合性構築物を接続するリンカーは、当該分野において公知のリンカーである。一部の実施形態において、リンカーは、ジスルフイド結合である。例えば、二量体の各単量体は、それぞれジスルフイド結合の形成に参加するスルフヒドリルおよび硫黄原子を含んでいてもよい。一部の実施形態において、リンカーは、ヘリックス-ターン-ヘリックスモチーフである。例示的な態様において、二量体の各単量体は、ヘリックス-ターン-ヘリックスモチーフを介して接続されている。例示的な態様において、二量体の各単量体は、アルカリホスファターゼドメインを介して接続されている。

30

## 【0123】

40

50

例示的な態様において、2つのFab断片を含むホモ二量体は、2つのFab断片を接続するリンカーを含む。例示的な態様において、ホモ二量体は、合成二重ヘリックスループヘリックスモチーフを含み、例えばHaylockら、Int J. Oncol. 48巻(2号):461~470頁(2016年)またはWangら、Anal. Chem. 78巻:997~1004頁(2006年)に記載されるものを含む。例示的な態様において、ホモ二量体は、定常抗体ドメインを含む。このような抗体ドメインは、Huら、Cancer Res 56巻:3055~3061頁(1996年)およびMcGregorら、Mol Immunol 31巻:219~226頁(1994年)に記載されている。例示的な態様において、ホモ二量体は、細菌のアルカリホスファターゼドメイン、例えば上記のWangら(2006年)に記載されるものを含む。例示的な態様において、ホモ二量体は、配列番号28もしくは配列番号27または配列番号28および27の両方の配列を含む。

#### 【0124】

##### 核酸

さらに本明細書において、本明細書に記載される結合性構築物(例えば、抗体、抗原結合性断片、ポリペプチド、またはコンジュゲート)のいずれかをコードするヌクレオチド配列を含む核酸が提供される。「核酸」は、本明細書で使用される場合、「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、および「核酸分子」を含み、一般的にはDNAまたはRNAのポリマーを意味し、これらは、一本鎖または二本鎖の合成のものかまたは天然供給源から得られた(例えば、単離および/または精製された)ものであってもよく、これらは、天然、非天然または変更されたヌクレオチドを含有していてもよく、改変されていないオリゴヌクレオチドのヌクレオチド間に見出されるホスホジエステルの代わりに、天然、非天然または変更されたヌクレオチド間の連結、例えばホスホルアミデート(phosphoramidate)連結またはホスホロチオエート連結を含有していてもよい。核酸は、いかなる挿入、欠失、逆位、および/または置換も含まないことが一般的に好ましい。しかしながら、一部の場合において、本明細書で論じられるように、核酸が、1つまたは複数の挿入、欠失、逆位、および/または置換を含むことが好適な場合がある。

#### 【0125】

好ましくは、本発明の核酸は、組換え体である。用語「組換え体」は、本明細書で使用される場合、(i)天然または合成の核酸セグメントを生きた細胞中で複製可能な核酸分子に繋ぎ合わせることによって、生きた細胞の外側で構築される分子、または(ii)上記の(i)に記載されたものの複製から生じる分子を指す。本明細書での目的に応じて、複製は、in vitroでの複製またはin vivoでの複製であり得る。

#### 【0126】

核酸は、当該分野において公知の手順を使用した化学合成および/または酵素によるライゲーション反応に基づき構築することができる。例えば、上記のSambrookら、および上記Ausubelらを参照されたい。例えば、核酸は、天然に存在するヌクレオチドを使用して、または分子の生物学的安定性を増加させる、またはハイブリダイゼーションで形成された二重鎖(例えば、ホスホロチオエート誘導体およびアクリジン置換ヌクレオチド)の物理的安定性を増加させるように設計された様々に改変されたヌクレオチドを使用して化学的に合成することができる。核酸を生成するのに使用できる改変されたヌクレオチドの例としては、これらに限定されないが、5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン(thiouridine)、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、ベータ-D-ガラクトシルケオシン、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N-置換アデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル(methylammomethyluracil)、5-メトキシアミノメチルウラシル(methylammoniummethyloxacil)、5-

10

20

30

40

50

- 2 - チオウラシル、ベータ - D - マンノシルケオシン (mannosylqueosine)、5' - メトキシカルボキシメチルウラシル、5 - メトキシウラシル、2 - メチルチオ - N 6 - イソペンテニルアデニン、ウラシル - 5 - オキシ酢酸 (v)、ワイプトキソシン、シュードウラシル (pseudoouratil)、ケオシン (queosine)、2 - チオシトシン、5 - メチル - 2 - チオウラシル、2 - チオウラシル、4 - チオウラシル、5 - メチルウラシル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸メチルエステル、3 - (3 - アミノ - 3 - N - 2 - カルボキシプロピル) ウラシル、および 2 , 6 - ジアミノプリンが挙げられる。代替として、本発明の核酸の 1 つまたは複数は、例えば Macromolecular Resources (Fort Collins, CO) および Synthegen (Houston, TX) などの会社から購入することもできる。

10

#### 【0127】

一部の態様において、核酸は、抗体、抗原結合性断片、ポリペプチド、またはコンジュゲートの一部のみをコードする。例えば、コンジュゲートがアミノ酸を含まず、したがって核酸によってコードされていないポリマーを含む場合、核酸は、核酸によってコードされ得るコンジュゲートの一部のみをコードする。例示的な実施形態において、核酸は、配列番号 6 ~ 11 の各々を含むアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。例示的な態様において、核酸は、配列番号 6 ~ 11 の各々を含むアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードし、配列番号 6 ~ 11 の各々の間に、1 つまたは複数のアミノ酸が存在する。例示的な態様において、核酸は、発現タグ、例えば、D Y K D D D D K (配列番号 12) を含む F L A G タグ、および / または H H H H H H (配列番号 13) を含むヘキサ His タグをさらに含むポリペプチドをコードする。

20

#### 【0128】

核酸は、例えば、本発明の結合性構築物の組換え產生方法において有用である。

#### 【0129】

##### 組換え発現ベクター

本発明の核酸は、組換え発現ベクター、または「ベクター」に組み込むことができる。これに関して、本発明は、本発明の核酸のいずれかを含む組換え発現ベクターまたは「ベクター」を提供する。本明細書での目的のために、用語「組換え発現ベクター」または「ベクター」は、構築物が m R N A 、タンパク質、ポリペプチド、またはペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでおり、細胞内で m R N A 、タンパク質、ポリペプチド、またはペプチドを発現させるのに十分な条件下でベクターを細胞と接触させる場合、宿主細胞による m R N A 、タンパク質、ポリペプチド、またはペプチドの発現を許容する、遺伝子改变されたオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド構築物を意味する。本発明のベクターは、全体としては天然に存在しない。しかしながら、ベクターの一部が天然に存在する可能性がある。本発明の組換え発現ベクターは、あらゆるタイプのヌクレオチド、これらに限定されないが、D N A および R N A などを含んでいてもよく、これらは、一本鎖または二本鎖の合成のものかまたは部分的に天然供給源から得られたものであってもよく、天然、非天然または変更されたヌクレオチドを含有していてもよい。組換え発現ベクターは、天然に存在するもしくは天然に存在しないヌクレオチド間連結、または両方のタイプの連結を含んでいてもよい。好ましくは、変更されたヌクレオチドまたは天然に存在しないヌクレオチド間連結は、ベクターの転写または複製を妨げない。

30

#### 【0130】

本発明の組換え発現ベクターは、あらゆる好適な組換え発現ベクターであってもよく、あらゆる好適な宿主を形質転換またはトランスフェクトするのに使用することができる。好適なベクターとしては、増殖および拡大増殖 (expansion) もしくは発現またはその両方のために設計されたもの、例えばプラスミドおよびウイルスなどが挙げられる。ベクターは、p U C シリーズ (Fermentas Life Sciences) 、 p B l u e s c r i p t シリーズ (Stratagene, La Jolla, CA) 、 p E T シリーズ (Novagen, Madison, WI) 、 p G E X シリーズ (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) 、および p E X シリーズ (C

40

50

l o n t e c h、P a l o A l t o、C A ) からなる群より選択することができる。また、バクテリオファージベクター、例えば G T I O、G T 1 1、Z a p I I ( S t r a t a g e n e ) 、 E M B L 4 、 および N M I 1 4 9 も使用することができる。植物発現ベクターの例としては、p B I O 1 、 p B I 1 0 1 . 2 、 p B I 1 0 1 . 3 、 p B I 1 2 1 および p B I N 1 9 ( C l o n t e c h ) が挙げられる。動物発現ベクターの例としては、p E U K - C 1 、 p M A M および p M A M n e o ( C l o n t e c h ) が挙げられる。好ましくは、組換え発現ベクターは、ウイルスベクター、例えばレトロウイルスベクターである。

#### 【 0 1 3 1 】

本発明の組換え発現ベクターは、例えば上記の S a m b r o o k ら、および上記の A u s u b e l らに記載される標準的な組換え D N A 技術を使用して調製することができる。環状または直鎖状の発現ベクターの構築物は、原核または真核宿主細胞で機能的な複製系を含有するように調製することができる。複製系は、例えば、C o I E 1 、 2  $\mu$  プラスミド、S V 4 0 、ウシパピローマウイルスなどの由来であってもよい。

10

#### 【 0 1 3 2 】

望ましくは、組換え発現ベクターは、調節配列、例えば転写および翻訳開始および終止コドンなどを含み、このような配列は、ベクターが導入されることになる宿主のタイプ（例えば、細菌、真菌、植物、または動物）に特異的であり、必要に応じてベクターがD N AベースかまたはR N Aベースであるかどうかが考慮される。

20

#### 【 0 1 3 3 】

組換え発現ベクターは、ポリペプチド（それらの機能的な部分および機能的なバリエントを含む）をコードするヌクレオチド配列、またはポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に相補的な、もしくはハイブリダイズするヌクレオチド配列に作動可能に連結したネイティブまたは標準的なプロモーターを含んでいてもよい。プロモーターの選択、例えば、強いか、弱いか、誘導性であるか、組織特異的であるか、および発生特異的であるかは、当業者の通常の技量の範囲内である。同様に、ヌクレオチド配列をプロモーターと組み合わせることも当業者の技術の範囲内である。プロモーターは、非ウイルスプロモーターまたはウイルスプロモーター、例えば、サイトメガロウイルス ( C M V ) プロモーター、S V 4 0 プロモーター、R S V プロモーター、およびマウス幹細胞ウイルスの末端反復に見出されるプロモーターであり得る。

30

#### 【 0 1 3 4 】

本発明の組換え発現ベクターは、一過性発現、安定な発現のいずれか、またはその両方のために設計することができる。また組換え発現ベクターは、構成的発現または誘導性発現のために作製することもできる。さらに、組換え発現ベクターは、自殺遺伝子を含むように作製することができる。

#### 【 0 1 3 5 】

##### 宿主細胞

本発明はさらに、本明細書に記載される核酸または組換え発現ベクターのいずれかを含む宿主細胞を提供する。用語「宿主細胞」は、本明細書で使用される場合、本発明の組換え発現ベクターを含有および発現するあらゆるタイプの細胞を指す。宿主細胞は、真核細胞、例えば、植物、動物、真菌、もしくは藻類であってもよいし、または原核細胞、例えば、細菌もしくは原生動物であってもよい。宿主細胞は、培養細胞であってもよいし、または初代細胞、すなわち生物、例えばヒトから直接的に単離されたものでもよい。宿主細胞は、接着細胞であってもよいし、または懸濁細胞、すなわち懸濁物中で増殖する細胞であってもよい。好適な宿主細胞は、当該分野において公知であり、例えば、D H 5 E . c o l i 細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞、サル V E R O 細胞、C O S 細胞、H E K 2 9 3 細胞などが挙げられる。組換え発現ベクターを増幅または複製する目的の場合、宿主細胞は、好ましくは原核細胞であり、例えば D H 5 細胞である。組換えポリペプチドを産生する目的の場合、宿主細胞は、好ましくは哺乳動物細胞であり、例えば C H O 細胞である。

40

50

## 【0136】

## キット

本明細書は、本発明の開示の結合性構築物のいずれか1つまたは複数を含むキットを提供する。例示的な実施形態において、キットは、本明細書に記載される、抗体もしくは抗原結合性断片もしくはポリペプチドもしくはコンジュゲートもしくは核酸もしくはベクターもしくは宿主細胞、または前述のもののいずれかの組み合わせを含む。例示的な態様において、結合性構築物は、キット中に予め決定された量または濃度で提供される。例えば、キットは、サンプル中の FIX Paduaを検出するための予め決定された量の結合性構築物を含む検出キットであり得る。例示的な実施形態において、キット中、本発明の開示の結合性構築物の1つまたは複数は、水溶液中に提供される。例示的な態様において、水溶液は、ドライアイス上で最終使用者に提供される。一部の態様において、水溶液は、キットの他の構成要素から別々にして最終使用者に提供される。例示的な実施形態において、本発明の開示の結合性構築物は、キット中、凍結乾燥または他のフリーズドライした形態で提供される。例示的な態様において、本発明の開示の結合性構築物は、キット中、凍結したまたは低温保存した形態で提供される。例示的な態様において、キット中に提供される抗体もしくは抗原結合性断片もしくはポリペプチドまたはコンジュゲートの濃度は、約1～10 µg / mLまたは約1～5 µg / mLである。例示的な態様において、キット中に提供される抗体もしくは抗原結合性断片もしくはポリペプチドまたはコンジュゲートの濃度は、約1.5 µg / mLから約2.0 µg / mLである。

## 【0137】

例示的な態様において、キットは、固体支持体を含み、例示的な態様において、抗体もしくは抗原結合性断片もしくはポリペプチドまたはコンジュゲートは、固体支持体上にプレコーティングされている。例示的な態様において、キットは、チューブ、ディッシュ、フラスコ、バッグ、プレート（例えば、マイクロタイタープレート）、膜、フィルター、ビーズ、ファイバー、プローブなどからなる群より選択される固体支持体を含む。例示的な態様において、固体支持体は、ポリマーで作製されている。例示的な態様において、固体支持体は、アガロース、セルロース、デキストラン、ポリアクリルアミド、ラテックス、または制御多孔質ガラス（controlled pore glass）で作製されている。例示的な態様において、固体支持体は、二フッ化ポリビニル（PVDF）、ニトロセルロース、ナイロン66、protanニトロセルロース、または紙で作製されている。例示的な態様において、膜は、Immobilion（登録商標）、Protran（登録商標）、QuicK Draw（登録商標）、Westran（登録商標）、Whatman（登録商標）またはHybond（登録商標）膜（Sigma-Aldrich, St. Louis, MO）の1つである。例示的な態様において、固体支持体は、ポリマービーズ、マイクロタイタープレート、膜またはフィルターである。例示的な態様において、キットは、約100 ngもしくはそれより多く、約150 ngもしくはそれより多く、約200 ngもしくはそれより多く、約500 ngもしくはそれより多くの抗体もしくは抗原結合性断片もしくはポリペプチドまたはコンジュゲートを含む溶液でプレコーティングされた固体支持体を含む。ある特定の態様において、キットは、約50 ng～約550 ng、約100 ng～約500 ng、約125 ng～約400 ng、約150 ng～約350 ng、約175 ng～約300 ng、もしくは約200 ng～約250 ngの抗体もしくは抗原結合性断片もしくはポリペプチドまたはコンジュゲートを含む溶液でプレコーティングされた固体支持体を含む。ある特定の態様において、キットは、約100 ng～約150 ng、約150 ng～約200 ng、約200 ng～約500 ngの抗体もしくは抗原結合性断片もしくはポリペプチドまたはコンジュゲートを含む溶液でプレコーティングされた固体支持体を含む。例示的な態様において、キットは、事前にアリコートにされた量の抗体もしくは抗原結合性断片もしくはポリペプチドまたはコンジュゲートを含む固体支持体を含む。例示的な態様において、キットは、マイクロタイタープレートを含み、マイクロタイタープレートの各ウェルは、約1～10 µg / mLまたは約1～5 µg / mLの抗体もしく

10

20

30

40

50

は抗原結合性断片もしくはポリペプチドまたはコンジュゲートを含む溶液を約100μL～約500μL含む溶液を含む。例示的な態様において、キットは、マイクロタイタープレートを含み、マイクロタイタープレートの各ウェルは、約2.5μg/mLの抗体もしくは抗原結合性断片もしくはポリペプチドまたはコンジュゲートを含む溶液を約100μL～約500μLを含む溶液を含む。

#### 【0138】

例示的な態様において、キットは、本明細書に記載される検出方法で使用される追加の試薬、基質、溶媒、緩衝液、希釈剤などを含む。例示的な態様において、追加の構成要素のいずれか1つまたは複数は、キット中に、予め決定された量で、例えば検出アッセイに必要な好適な量で提供される。例示的な態様において、キットは、FIX Paduaに結合する抗体、抗原結合性断片、ポリペプチドまたはコンジュゲートに結合する二次抗体を含む。例示的な態様において、二次抗体は、検出剤を含む。例示的な実施形態において、検出剤は、酵素、放射性同位体、DNAレポーター、色素形成もしくは蛍光発生レポーター、または電気化学発光タグを含む。検出剤は、本明細書に記載される検出剤のいずれかであってもよい。例示的な態様において、二次抗体またはFIX Paduaに結合する抗体、抗原結合性断片、ポリペプチドまたはコンジュゲートは、検出剤に付着している。

10

#### 【0139】

##### 組成物

本明細書は、本発明の開示の結合性構築物のいずれか1つまたは複数を含む組成物を提供する。例示的な態様において、組成物は、検出剤と混合された本明細書に記載される結合性構築物を含む。例示的な態様において、検出剤は、本明細書に記載されるあらゆる検出剤である。「コンジュゲート：検出剤」というタイトルのセクションを参照されたい。

20

#### 【0140】

例示的な態様において、組成物は、被験体から得られた生体サンプルと混合された、本明細書に記載される結合性構築物を含む。例示的な態様において、生体サンプルは、本明細書に記載されるあらゆる生体サンプルである。「サンプル」というタイトルのセクションを参照されたい。例示的な態様において、組成物は、ヒト血漿、またはその希釈された画分を含む生体サンプルと混合された、本明細書に記載される抗体もしくは抗原結合性断片もしくはポリペプチドまたはコンジュゲートを含む。例示的な態様において、組成物は、ヒト組織またはその細胞を含む生体サンプルと混合された、本明細書に記載される抗体もしくは抗原結合性断片もしくはポリペプチドまたはコンジュゲートを含む。例示的な態様において、生体サンプルは、肝臓組織を含む。例示的な態様において、組成物は、検出剤をさらに含む。

30

#### 【0141】

サンプル、例えば、ヒト血漿タンパク質を含む生体サンプルと混合された、本発明の開示の結合性構築物のいずれか1つまたは複数を含む組成物が、本明細書においてさらに提供される。例示的な態様において、組成物は、第IX因子、第XI因子、および第X因子、ならびにそれらのバリアントからなる群より選択されるヒト血漿タンパク質の少なくとも1つと混合された、本明細書に記載される抗体もしくは抗原結合性断片もしくはポリペプチドまたはコンジュゲートを含む。例示的な態様において、組成物は、検出剤をさらに含む。

40

#### 【0142】

##### 検出方法

本明細書で提供される結合性構築物は、例えば、サンプル、例えばFIX PaduaおよびWT FIXを含む臨床サンプル中のFIX Paduaの、一義的または特異的な検出を可能にする検出方法において有用である。結合性構築物は、当該分野において公知のあらゆる抗体ベースのアッセイもしくは技術またはあらゆるイムノアッセイ、例えば、これらに限定されないが、ラジオイムノアッセイ(RIA)、磁気イムノアッセイ(MIA)、免疫細胞化学的(ICC)アッセイ、免疫組織化学(IHC)アッセイ、免疫蛍光アッセイ、ELISA、EIA、ELISPOT、酵素増幅イムノアッセイ、ラジオバイン

50

ティングアッセイ (radio binding assay)、ウェスタンプロットティング、免疫沈降、ドットプロット、フローサイトメトリー、リアルタイム免疫定量PCR、タンパク質マイクロアレイなどにおいて使用することができる。例えば、The Immunoassay Handbook (第4版); Theory and Applications of Ligand Binding, ELISA and Related Techniques、Wild編, Elsevier Ltd. (Oxford、UK) 2013年、GreenおよびSambrook、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第4版、Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor、NY) 2012年、およびImmunoassay、DiamondisおよびChristopoulos、Academic Press 1996年を参照されたい。  
10

#### 【0143】

したがって、本明細書は、サンプル中の第IX因子Paduaを検出するための、本明細書に記載される結合性構築物（例えば、抗体もしくは抗原結合性断片、ポリペプチド、またはコンジュゲート）、核酸、ベクター、宿主細胞、および／またはキットの使用を提供する。例示的な態様において、サンプルは、FIX Paduaをコードする核酸を含む発現ベクターが投与された被験体から得られた生体サンプルである。例えば、様々な実施形態において、被験体は、出血障害に罹っており、第IX因子補充療法を受けており、この療法は、任意選択で、異種第IX因子Paduaをコードするヌクレオチド配列を含む核酸の発現によって達成される。  
20

#### 【0144】

本明細書は、被験体から得られたサンプル中の第IX因子Paduaを検出する方法も提供する。例示的な実施形態において、本方法は、(i)サンプルを、本明細書に記載される結合性構築物（例えば、抗体もしくは抗原結合性断片もしくはポリペプチドまたはコンジュゲート）と接触させて、FIX Paduaと、結合性構築物（例えば、抗体、抗原結合性断片、ポリペプチド、またはコンジュゲート）とを含む複合体（例えば、免疫複合体）を形成すること、および(ii)複合体を検出することを含む。

#### 【0145】

例示的な実施形態において、FIX Paduaは、配列番号1のアミノ酸配列を含む。  
30

#### 【0146】

例示的な実施形態において、複合体を検出することは、検出剤のシグナルを検出することを含む。例示的な実施形態において、シグナルは、酵素活性、放射能、色素形成活性、および／または結合活性に基づく。例示的な実施形態において、シグナルは、放射性、色素形成、比色、蛍光定量的、化学発光、強化された化学発光、直接的な蛍光、時間分解蛍光、直接的な化学発光、リン光性、酵素によるものか、またはマイクロまたはナノ粒子、ストレプトアビジン／アビジン-ビオチンおよびプロテインAの結合に基づく。例示的な実施形態において、検出剤は、酵素、放射性同位体、DNAレポーター、色素形成または蛍光発生レポーター、電気化学発光タグを含む。例示的な実施形態において、複合体を検出することは、表面プラズモン共鳴を行い、複合体を検出すること、または電極で抵抗の変化(FIX Paduaが抗体、抗原結合性断片、ポリペプチド、またはコンジュゲートに結合する場合の)を測定することを含む。Gonzalez-Diazら、「Plasmonic Au/Co/Au nanosandwiches with Enhanced Magneto-Optical Activity」Small 4巻(2号):202~5頁(2008年)およびTsekenis(2008年)、「Label-less immunosensor assay for myelin basic protein based upon an ac impedance protocol」Analytical Chemistry 80巻(6号):2058~62頁(2008年)を参照されたい。例示的な態様において、酵素は、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)、アルカリホスファターゼ(AP)、グルコースオキシダーゼ、またはベータ-ガラクトシダーゼである。例示的な態様において、酵素は、それらを化学発光させるま  
40

たは光を発生させる試薬に曝露される。例示的な態様において、放射性同位体は、I 1 2 5である。例示的な態様において、DNAレポーターは、DNAプローブである。例えば、Rajkovic、「Immunoquantitative real-time PCR for detection and quantification of *Staphylococcus aureus* enterotoxin B in foods.」Applied and Environmental Microbiology 72巻(10号)：6593～9頁(2006年)；およびGofflot「Immuno-quantitative polymerase chain reaction for detection and quantitation of prion protein.」Journal of Immunoassay and Immunochemistry 25巻(3号)：241～58頁(2004年)を参照されたい。例示的な態様において、蛍光発生レポーターは、フィコエリトリン(PE)例えば、B-PE、R-PE、またはアロフィコシアニン(APC)である。

#### 【0147】

例示的な実施形態において、抗体または抗原結合性断片もしくはポリペプチドは、検出剤にコンジュゲートされている。例示的な実施形態において、コンジュゲートは、検出剤を含む。例示的な実施形態において、抗体または抗原結合性断片もしくはポリペプチドは、検出剤にコンジュゲートしていないか、またはコンジュゲートは、検出剤を含まない。このような例示的な実施形態において、本方法は、サンプルを、検出剤を含む二次抗体と接触させることを含み、ここで二次抗体は、抗体もしくは抗原結合性断片もしくはポリペプチドまたはコンジュゲートに結合する。二次抗体は、あらゆるアイソタイプまたはクラスのあらゆる抗体であってもよく、ただし、二次抗体は、抗FIX Padua抗体、それらの抗原結合性断片、ポリペプチドまたはコンジュゲートに結合することを条件とする。

#### 【0148】

例示的な実施形態において、抗体または抗原結合性断片もしくはポリペプチドは、固体支持体にコンジュゲートされている。例示的な実施形態において、コンジュゲートは、固体支持体を含む。例えば、固体支持体は、チューブ、ディッシュ、フラスコ、バッグ、プレート(例えば、マイクロタイタープレート)、膜、フィルター、ビーズ、ファイバー、プローブなどからなる群より選択される。例示的な態様において、固体支持体は、ポリマーで作製されている。例示的な態様において、固体支持体は、アガロース、セルロース、デキストラン、ポリアクリルアミド、ラテックス、または制御多孔質ガラスで作製されている。例示的な態様において、固体支持体は、アガロースで作製されている。例示的な態様において、固体支持体は、ニフッ化ポリビニル(PVDF)、ニトロセルロース、ナイロン66、protranニトロセルロース、または紙で作製されている。例示的な態様において、膜は、Immobilon(登録商標)、Protran(登録商標)、Quic k Draw(登録商標)、Westran(登録商標)、Whatman(登録商標)またはHybond(登録商標)膜(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)の1つである。例示的な態様において、固体支持体は、ポリマービーズ、磁気または常磁性ビーズ、マイクロタイタープレート、膜またはフィルターである。

#### 【0149】

##### 被験体

例示的な実施形態において、本明細書で言及される被験体は、哺乳動物、これらに限定されないが、げっ歯目の哺乳動物、例えばマウスおよびハムスター、ならびにウサギ目の哺乳動物、例えばウサギ、食肉目に属する哺乳動物、例えばネコ(Feline)(ネコ)およびイヌ(Canine)(イヌ)、偶蹄目に属する哺乳動物、例えばウシ(Bovine)(ウシ)およびブタ(Swine)(ブタ)、またはウマ目(Perissodactyla)の哺乳動物、例えばウマ(Equine)(ウマ)などである。一部の態様において、哺乳動物は、靈長目、マーモセット科(Ceboid)、またはサル(Simoid)(サル)の目に属するか、または類人猿目(ヒトおよび大型類人猿)に属する。例示的な態様において、哺乳動物は、ヒトである。例示的な態様において、ヒト被験体は

10

20

30

30

40

50

、成人、例えば18歳またはそれより上の成人、または若年層である。例示的な態様において、被験体は、配列番号1のアミノ酸配列を含むF IX Paduaをコードするスクレオチド配列を含む発現ベクターが投与されている。例示的な態様において、被験体は、出血障害を有する。例示的な態様において、被験体は、被験体の血液が適切に凝固しない出血障害を有する。例示的な態様において、被験体は、第IX因子、例えば、WT第IX因子の発現の欠如またはその低い発現レベルを有する。例示的な態様において、被験体は、第IX因子をコードする遺伝子中に変異を有する。例示的な態様において、被験体は、血友病、例えば、血友病B（またクリスマス病としても公知）に罹っている。例示的な態様において、被験体は、正常より高い凝固活性を呈する。例示的な態様において、被験体は、天然に存在するF IX Paduaを有し、例えば、F IX Paduaの発現を引き起こす遺伝子変異を有する。

10

#### 【0150】

##### サンプル

例示的な実施形態において、本明細書で言及されるサンプルは、1種または複数の体液、例えばヒト体液を含む生体サンプルである。例示的な態様において、サンプルは、体液、これらに限定されないが、被験体から得られた、血液、血漿、血清、リンパ液、母乳、唾液、粘液（mucous）、精液、膣分泌物、細胞抽出物、炎症液（inflammatory fluid）、脳脊髄液、便、硝子体液、または尿などを含む。例示的な態様において、サンプルは、血液、血漿、または血清を含む。例示的な態様において、サンプルは、血液、血漿、または血清から調製される。例示的な態様において、サンプルは、血液、血漿、または血清の画分である。例示的な態様において、サンプルは、血液サンプル、血漿サンプル、または血清サンプルである。例示的な態様において、サンプルは、血液またはその画分（例えば、血漿、血清）を含む。例示的な態様において、サンプルは、血漿を含むかまたは血漿である。

20

#### 【0151】

例示的な態様において、サンプルは、ヒト組織サンプルである。例示的な態様において、ヒト組織サンプルは、筋肉組織、上皮組織、結合組織、または神経組織を含む。例示的な態様において、ヒト組織サンプルは、骨組織を含む。例示的な態様において、ヒト組織サンプルは、心臓組織、脾臓組織、リンパ節組織、脳組織、脊髄組織、神経組織、耳、鼻もしくは目の組織、乳房組織、皮下組織、乳腺組織、骨髄組織、リンパ組織、上咽頭組織、喉頭組織、気管組織、気管支（bronchus）組織、肺組織、皮膚組織、唾液腺組織、舌もしくは口からの組織、中咽頭組織、咽喉頭（laryngopharynx）組織、食道組織、胃組織、小腸組織、虫垂組織、結腸組織、直腸組織、肛門組織、肝臓組織、胆道組織、胰臓組織、胆囊組織、腎臓組織、尿管組織、膀胱組織、尿道組織、子宮組織、腔組織、外陰組織、卵巢組織、胎盤組織、陰囊組織、陰茎組織、前立腺組織、睾丸組織、精囊組織、下垂体組織、松果体組織、甲状腺組織、副甲状腺組織、副腎組織、またはランゲルハンス島組織を含む。例示的な態様において、ヒト組織サンプルは、肝臓組織または脾臓組織または腎臓組織を含む。例示的な態様において、ヒト組織サンプルは、肝臓組織を含む。

30

#### 【0152】

以下の実施例は本発明を単に例証するために記載されたものであり、その範囲を限定するためでは決してない。

40

##### 【実施例】

#### 【0153】

##### （実施例1）

この実施例は、本発明の抗体またはその抗原結合性断片を作製する方法を実証するものである。

#### 【0154】

ファージディスプレイ方法を使用して、候補の特異的F IX Padua結合性構築物を選択した。338位に单一のアミノ酸置換を含む直鎖状ペプチド、338位に单一のアミ

50

ノ酸置換を含む構造ペプチド、または全長組換え F I X Padua を使用してファージライブラリーをスクリーニングし、候補を捕捉した。3回のパニングを、野生型 F I X 配列と競合させて、および競合させずに行って、数種の候補結合性構築物を同定した。B I A C O R E および E L I S A 実験を実行して、得られた候補の特異性および親和性を決定した。

#### 【 0 1 5 5 】

配列 D R A T C L L S T K F T を含む直鎖状ペプチドを有する 1 つの候補 ( B C 1 と称する)を得て、配列 L V D R A T C L L S T K F T I Y N N M F C A G F H を含む構造ペプチドを有する 2 つの候補 ( B C 2 および B C 3 と称する)を得た。F I X Padua と交互になった直鎖状ペプチドまたは構造ペプチドを含むペプチドを有するさらに別の候補 ( B C 4 )を得た。10

#### 【 0 1 5 6 】

スクリーニングアッセイにより、候補が F I X Padua に結合することが実証された。B C 2 および B C 3 の場合、野生型 F I X に対する結合シグナル ( バックグラウンドに対する倍率 ) は 1.1 未満であったが、F I X Padua に対する結合シグナル ( バックグラウンドに対する倍率 ) は 7.1 より高かった。B C 1 の場合、野生型 F I X に対する結合シグナル ( バックグラウンドに対する倍率 ) は 1 であったが、F I X Padua に対する結合シグナルはほぼ 2.0 であった。第 2 のセットのスクリーニングアッセイにおいて、野生型 F I X に対する結合シグナルは、B C 1 、 B C 2 、および B C 3 の各々について 1 またはそれ未満であったが、F I X Padua に対する B C 1 、 B C 2 、および B C 3 に関する結合シグナルはそれぞれ 7.0 、 3.0 、および 1.0 であった。B C 4 について、F I X Padua に対する結合シグナルは 3.6 より高かったが、野生型 F I X に対するシグナルは約 1 であったことが実証された。20

#### 【 0 1 5 7 】

B C 1 の F I X Padua への結合を、B C 1 のコーティング濃度に加えて F I X Padua の濃度を変化させた N i 2 + プレート上の E L I S A によって試験した。試験された B C 1 および F I X Padua の濃度は、0.04 μg / ml 、 0.2 μg / ml 、 1 μg / ml 、および 5 μg / ml であった。F I X Padua に対する B C 1 の結合シグナルを w t F I X 対照と比較した。試験された各濃度において、F I X Padua の B C 1 への結合は W T F I X の B C 1 への結合より大きかった ( 図 2 ) 。30

#### 【 0 1 5 8 】

野生型 F I X の存在下における B C 1 、 B C 2 、および B C 3 の F I X Padua への結合を、E L I S A によって試験した ( 図 10 で示した通り ) 。 MaxiSorp プレートを 5 μg / mL の B C 1 、 B C 2 、または B C 3 でコーティングし、コーティングされたプレートに、様々な濃度の F I X Padua および 5 μg / mL の野生型 F I X を含有する溶液を添加した。試験した F I X Padua 濃度は、0 μg / mL 、 0.156 μg / mL 、 0.313 μg / mL 、 0.625 μg / mL 、 1.25 μg / mL 、 2.5 μg / mL 、 5 μg / mL 、および 10 μg / mL であった。図 3 で示されるように、B C 1 は、W T 第 I X 因子の存在下でも F I X Padua に強い親和性を示す。B C 1 は、5 μg / mL の W T 第 I X 因子の存在下で最大の感受性を示した。40

#### 【 0 1 5 9 】

5 % のヒト血漿および 5 μg / mL の W T 第 I X 因子の存在下における B C 1 の様々な濃度の F I X Padua への結合を、E L I S A によって試験した ( 図 10 で示した通り ) 。図 4 で示されるように、F I X Padua への B C 1 の結合は、F I X Padua の濃度が増加するにつれて、W T 第 I X 因子および他の血漿タンパク質の存在下でも増加する。F I X Padua は、2.5 ng / ml ~ 1000 ng / ml まで様々なであった。

#### 【 0 1 6 0 】

50 mM のベンズアミジンを含有する様々な % 血漿溶液中の B C 1 の F I X Padua への結合を、E L I S A によって試験した ( 図 10 で示した通り ) 。溶液は、5 % 、 10 % 、または 20 % ( v / v ) 血漿であった。図 5 で示されるように、B C 1 は、20 %

10

20

30

40

50

血漿溶液中  $3.13 \text{ ng/mL}$  ~  $200 \text{ ng/mL}$  の範囲で FIX Padua を検出することができた。

#### 【0161】

$5 \mu\text{g/mL}$  の WT 第IX因子を含有する 20% のヒト血漿の存在下における BC1、BC2、および BC4 の FIX Padua への結合を ELISA によって試験した。このアッセイに使用された FIX Padua の濃度は、0、 $3.13$ 、 $6.25$ 、 $12.5$ 、 $25$ 、 $50$ 、 $100$  および  $200 \text{ ng/mL}$  であった。図 6 で示されるように、BC1 は最大の感受性を呈したが、BC2 は、最も低い感受性を呈し、 $5 \mu\text{g/mL}$  の WT 第IX因子を含有する 20% のヒト血漿サンプル中で FIX Padua に結合できなかった。BC4 の FIX Padua への結合能力は、BC1 の結合能力より低いことが実証された（図 6）。BC2 のように、BC3 も、20% のヒト血漿を含有するサンプル中で FIX Padua 特異的な検出抗体として機能しなかった（データ示さず）。

10

#### 【0162】

BC1 および BC4 の他の凝固因子への結合を、ELISA によって試験した。具体的には、BC1 または BC4 の第II因子および第X因子への結合を試験した。図 7 で示されるように、BC1 の結合は、FIX Padua に高度に特異的であったが、これは第II因子または第X因子に対する交差反応性がないことを示し、それに対して BC4 は、対照的に、第II因子に対するわずかな交差反応性が実証された。

#### 【0163】

BC1 の結合は FIX Padua に特異的であった。対照的に、2つの他の結合性構築物（BC5 および BC6）を構造ペプチドを使用したファージディスプレイ（phase display）によって作製した。図 8 で示されるように、WT FIX への有意な結合が実証されたことから、BC5 および BC6 の結合は FIX Padua に特異的ではなかった。

20

#### 【0164】

BC1 の KD 値を Biacore 表面プラズモン共鳴により決定した。BC1 の KD は  $56 \text{ nM}$  であった。BC1 は、他の候補に比べて FIX Padua への最大の親和性を示した。この値は、市販の抗体の KD (M) 値より優れているとまでは言わないまでもそれに類似している。例えば、市販のシートの抗ヒト野生型 FIX 抗体の KD (M) 値は、 $3.11 \times 10^{-9}$  である。

30

#### 【0165】

BC1 の重鎖および軽鎖の CDR の配列を PCR によって決定し、続いて配列を翻訳し、配列は以下である：

#### 【表1】

重鎖 CDR1	SSYAIIS	配列番号 6
重鎖 CDR2	GIVPAFGTANYAQKFQG	配列番号 7
重鎖 CDR3	SWGVISFAY	配列番号 8
軽鎖 CDR1	RASQDISSYLN	配列番号 9
軽鎖 CDR2	AASNLLQS	配列番号 10
軽鎖 CDR3	MQYDSLPTF	配列番号 11

40

#### 【0166】

直鎖状ペプチドを用いて得られた BC1 は、独特で特異的な FIX Padua 結合をもたらし、この活性が確認された。BC1 は約  $3 \text{ ng/mL}$  血漿の検出限界を呈し、高度に

50

上昇した ( $> 5 \mu\text{g} / \text{mL}$ ) 濃度でも野生型 F IX に対する交差反応性がないことを示した。

#### 【0167】

これらのデータは、高度に特異的な抗 F IX Padua 抗体が生成されたことを裏付けるものである。この抗体は、ヒト血漿サンプル中の F IX Padua に結合し、WT 第 IX 因子、第 XI 因子および第 X 因子のどれにも結合しない。これらのデータは、この抗体が、例えば野生型 F IX と F IX Padua 抗原レベルとの間を選択的に区別する臨床アッセイの開発に使用することができるることを裏付けるものである。

#### 【0168】

##### (実施例 2)

この実施例は、本発明の抗体またはその抗原結合性断片を使用する方法を実証する。

10

#### 【0169】

新たに開発した第 IX 因子 Padua (F IX p) に特異的に結合する抗体 (BC1) の F ab 断片を、標準的な条件を使用して 96 ウェルマイクロプレート上に  $2 \mu\text{g} / \text{mL}$  でコーティングした。検出系として、市販のビオチン化ポリクローナルヒツジ抗ヒト F IX IgG およびストレプトアビシンペルオキシダーゼを使用した。図 9 に、アッセイ構成要素の略図を示す。

#### 【0170】

アッセイの較正を、 $27.1 \sim 0.85 \text{ ng} / \text{mL}$  の F IX p の濃度範囲を網羅する F IX p 調製物を用いて 6 ポイントの較正曲線を作成することによって達成した。患者のサンプルを、 $5 \text{ mg} / \text{mL}$  ウシ血清アルブミン、 $10 \text{ mM}$  のベンズアミジン、 $10 \text{ mM}$  の CaCl<sub>2</sub> および $0.05\% \text{ Tween } 20$  を含有する HEPES / NaCl 緩衝液で希釈した。

20

#### 【0171】

正常ヒト血漿または精製されたヒト F IX は、F IX p 特異的な ELISA においてシグナルを示さなかった。正確な較正曲線を得た。 $1/10$  に希釈した正常ヒト血漿にスパイクした F IX p は、緩衝液中のアッセイ標準で得られたものに類似する希釈応答曲線 (dilution response curve) で許容できる回復を示した。重要なことに、F IX p をコードする発現ベクターで処置された 6 人の患者のサンプルの分析は、時間をわたって高度に類似した F IX p タンパク質および F IX 活性曲線を実証し、交差反応物質陽性 (CRM+) 患者のサンプルは、CRM- 患者と比較して F IX p タンパク質のシグナルが増加しなかったことを示したことから、アッセイの特異性が示された。

30

#### 【0172】

F IX p 特異的な ELISA は、F IX p タンパク質の測定による処置転帰 (treatment outcome) の追加のモニタリングを可能にする。

#### 【0173】

##### (実施例 3)

この実施例は、F IX Padua に選択的な ELISA およびヒト血漿サンプルを試験するための ELISA の使用を実証する。

#### 【0174】

BC1 の調製物 ( $0.94 \text{ mg} / \text{mL}$ ) を、 $0.1 \text{ M}$  の NaHCO<sub>3</sub> - Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、pH 9.5 で  $1/500$  に希釈し、 $100 \mu\text{L}$  / ウエルで、 $0 \sim +10$  で一晩インキュベートすることによって Maxisorp F96 プレートのウェルに結合させた。サンプルおよび試薬の希釈、ならびにプレートのプロッキングに使用した希釈緩衝液 (DB) は、 $5 \text{ mg} / \text{mL}$  ビオチン非含有ウシ血清アルブミン (BSA)、 $10 \text{ mM}$  の Ca<sup>2+</sup>、 $0.05\% \text{ Tween } 20$  (Bio-Rad, EIA グレード) および $10 \text{ mM}$  のベンズアミジンを含有する、 $0.1 \text{ M}$  の Hepes、 $0.1 \text{ M}$  の NaCl、pH 7.2 であった。コーティング後、プレートを、 $0.05\% \text{ Tween } 20$  を含有するリン酸緩衝食塩水で洗浄し、ウェルを、 $200 \mu\text{L}$  の DB / ウエルと室温で 60 分間 (RT、18 から 26) インキュベートすることによって、プロッキングするステップを、

40

50

洗浄することによって終結させた。次いで標準 / サンプルの希釈物をローディングし、連続的な 1 + 1 の希釈系列をプレート上で直接調製した。希釈物 (100 μL / ウェル) をプレートと共に室温で 60 分間インキュベートした。次いでプレートを再度洗浄し、F9-1030A (Coachrom) から調製されたビオチン化ポリクローナルヒツジ抗ヒト F IX 検出抗体を添加した (100 μL / ウェル; 作業用希釈 1 / 500)。室温で 60 分間インキュベートした後、プレートを再度洗浄し、ストレプトアビジンペルオキシダーゼ (Dako Cytomation) を添加し (100 μL / ウェル; 希釈 1 / 4,000)、室温で 30 分間インキュベートした。最後の徹底的な洗浄手順の後、結合したペルオキシダーゼ活性を、すぐ使用できるペルオキシダーゼ基質である SureBlue で測定し、3N 硫酸で反応を止めた。次いでプレートを、ELISA リーダーを用いて、620 nm で得られた結果を減算して 450 nm で測定した。

#### 【0175】

図 11 は、5 μg / mL の WT F IX 濃度で精製されたヒト F IX Padua 調製物および新鮮凍結対照血漿調製物 (CRYO Check; Precision Biologics) に関して得られた濃度 - 応答曲線を示す。

#### 【0176】

29 ~ 0.91 ng / mL の範囲を網羅する組換えヒト F IX Padua 濃度に関して得られた用量応答曲線は、正確度、精度および線形性に関して容認された要件を満たしており、したがってサンプルの外挿に適切であるとみなされた。特に、10g - 10g 回帰曲線の相関係数は 0.9985 であり、平均の正確度は 101.4 % であり、精度は 7.0 % であった。正確度および精度を、較正曲線の 6 つの濃度に関して測定されたシグナルをバックフィッティングすることによって計算した。さらにデータから、F IX Padua に関して、このアプローチの絶対特異性が示された。5 μg / mL の正常血漿濃度で F IX wt を含有し、1 / 10 の最小限の希釈を使用して測定されたヒト参照血漿は、いかなるシグナルも惹起しなかった。

#### 【0177】

ELISA を上述したようにして行った。較正曲線を、別の組換えヒト F IX Padua 調製物を使用して、542.42 μg / mL のタンパク質濃度で得た。タンパク質 1 mg 当たり 2310 IU の比凝固活性は、この調製物を、過剰に活性な F IX Padua バリアントとして明らかに分類した。連続的な希釈系列は 1 / 20, 000 ~ 1 / 640, 000 の範囲であり、27.1 ~ 0.85 ng / mL の F IX 濃度範囲を定義した。図 12 は、ブランクで補正した平均シグナルの対数と、6 つのアッセイ標準の F IX 濃度との間の線形回帰曲線として得られた平均較正曲線を示す。挿入図は、バックフィッティングしたアッセイキャリブレータ D1 ~ D6 とそれらそれぞれの名目上の濃度との一致を示す。F IX Padua の較正曲線は、27.1 ~ 0.85 ng / mL の濃度範囲で優れた線形性を示した。較正曲線は、平均相関係数  $r = 0.9992$  (範囲: 0.9986 ~ 0.9996) によって示され、較正曲線の個々のポイントにつき計算されたバックフィッティングした濃度によって裏付けられ、範囲全体にわたり期待されたものより 9 % 未満異なっていた (範囲: 91.1 % ~ 108.6 %)。これらのバックフィッティングデータは容易に、リガンド結合アッセイの好適な較正曲線を同定するための、生物学的な分析方法の検証に関する EMA ガイドラインによって定義された要件を満たした。較正曲線の相対合計誤差 (RTE) は低かった。具体的には、RTE は、較正曲線標準のブランクで補正した平均の光学密度 (OD) をバックフィッティングすることによって計算された。得られた濃度を、それらの希釈度をかけることによって正規化した。この時点で、アッセイ標準の名目上の濃度とバックフィッティングアプローチによって決定された平均濃度との間の絶対差の合計、およびこの平均濃度の二重の標準偏差として RTE を計算した。さらに、傾きの低い RSD は、これらの曲線が、臨床の場で使用しようとするアッセイに必要な再現性で得ることができたことを実証した。

#### 【0178】

ELISA を上述したようにして行った。正常新鮮凍結ヒト血漿および F IX 欠乏血漿に

10

20

30

40

50

FIX Paduaをスパイクした。スパイクした2つの血漿調製物の希釈系列を1/10の希釈から開始した。図13は、緩衝液で得られたものと比較した2つの血漿サンプルの希釈-応答曲線を示す。FIX Paduaをスパイクした血漿サンプルに関して得られた希釈-応答曲線の傾きは、緩衝液希釈系列に関して得られたものとは5%未満異なっていた。これは、血漿マトリクスがアッセイの性能に影響を与えたことを示す。

#### 【0179】

また従来のポリクローナル抗ヒトFIX抗体は、ヒトFIXとサルFIXとの間の高い配列相同意のために、カニクイザルFIXにも結合する（内部データ）。それゆえに、FIX PaduaのELISAの選択性をクエン酸塩加サル血漿のマトリクスに関してチェックした。具体的には、雌および雄のクエン酸塩加サル血漿サンプルにFIX Paduaをスパイクし、1/10の最小限の希釈で希釈系列を開始して測定した。図14は、緩衝液で得られたものと比較した2つの血漿サンプルの希釈-応答曲線を示す。

10

#### 【0180】

FIX Paduaをスパイクした血漿サンプルに関して得られた希釈-応答曲線の傾きは、緩衝液希釈系列に関して得られたものとは4%未満異なっていた。これは、クエン酸塩加サル血漿マトリクスがアッセイの性能に影響を与えたことを示す。さらに、スパイクしたFIX Paduaの濃度の回復は、雌および雄血漿サンプルそれぞれで91.3%および103.1%であった。

#### 【0181】

FIX Paduaを発現するAAV2/8ウイルスベクターで処置した後のフェーズ1/2臨床試験におけるFIX交差反応物質を含む被験体（CRM+）からのクエン酸塩加血漿サンプル中のFIX Paduaの測定を実行した。被験体からの血漿サンプルを使用して、FIX PaduaのELISAを上述したようにして行った。被験体から得られた血漿サンプルを使用したFIX凝固活性およびFIX抗原測定を、標準的な方法を使用することによって実行した。図15は、フェーズ1/2臨床試験からの被験体から得られた血漿サンプルに行われたFIX活性およびFIXタンパク質測定の結果を示し、それによれば1U/mLに近いFIX抗原の濃度が常に実証されたが、FIX活性は定量下限未満であった。このデータは、被験体が、CRM+、すなわち従来のFIX ELISAでは測定可能な凝固不活性FIXタンパク質を示すと認定するものであった。FIX PaduaのELISAのng/mLで得られた結果を、活性の変換の場合はアッセイ標準の比活性（2310IU/mg）、および抗原の変換の場合は5μg/mLの正常ヒトFIX濃度を使用して活性および抗原単位に変換した。

20

#### 【0182】

FIX PaduaのELISAデータは、FIX活性データに類似するものであったことから、測定されたFIX活性はFIX Paduaの発現に依存していたことが証明された。対照的に、FIX Padua特異的なELISAで測定されたFIX抗原濃度は、標準的なELISAで得られたものより明らかに低かったことから、FIX PaduaのELISAはCRM+材料とFIX Paduaとの間の識別を可能にしたことが実証された。

#### 【0183】

FIX Paduaを発現するAAV2/8ウイルスベクターで処置した後のフェーズ1/2臨床試験におけるFIX交差反応物質を含む第2の被験体（CRM+）からのクエン酸塩加血漿サンプル中のFIX Paduaの測定を実行した。第2の被験体からの血漿サンプルを使用して、FIX PaduaのELISAを上述したようにして行った。第2の被験体から得られた血漿サンプルを使用したFIX凝固活性およびFIX抗原測定を、標準的な方法を使用することによって実行した。図16は、第2の被験体から得られた血漿サンプルに行われたFIX活性およびFIXタンパク質測定の結果を示し、それによれば0.8U/mLに近いFIX抗原の濃度が常に実証されたが、FIX活性は定量下限未満であった。このデータは、被験体が、CRM+、すなわち従来のFIX ELISAでは測定可能な凝固不活性FIXタンパク質を示すと認定するものであった。FIX Padua

30

40

50

*adu a* の E L I S A の ng / mL で得られた結果を、活性の変換の場合はアッセイ標準の比活性 ( 2310 IU / mg ) 、および抗原の変換の場合は 5 μg / mL の正常ヒト F IX 濃度を使用して活性および抗原単位に変換した。

#### 【 0184 】

F IX Padua の E L I S A データは、F IX 活性データに類似するものであったことから、測定された F IX 活性は F IX Padua の発現に依存していたことが証明された。対照的に、F IX Padua 特異的な E L I S A で測定された F IX 抗原濃度は、標準的な E L I S A で得られたものより明らかに低かったことから、F IX Padua の E L I S A は CRM+ 材料と F IX Padua との間の識別を可能にしたことが実証された。

10

#### 【 0185 】

F IX Padua を発現する AAV2 / 8 ウイルスベクターで処置した後のフェーズ 1 / 2 臨床試験における F IX CRM+ のない被験体からのクエン酸塩加血漿サンプル中の F IX Padua の測定を実行した。F IX CRM+ のない被験体からの血漿サンプルを使用して、F IX Padua の E L I S A を上述したようにして行った。F IX CRM+ のない被験体からの血漿サンプルを使用した F IX 凝固活性および F IX 抗原測定を、標準的な方法を使用することによって実行した。図 17 は、CRM+ のないことを常に実証した被験体から得られた血漿サンプルに行われた F IX 活性および F IX タンパク質測定の結果を示す。F IX Padua の E L I S A の ng / mL で得られた結果を、活性の変換の場合はアッセイ標準の比活性 ( 2310 IU / mg ) 、および抗原の変換の場合は 5 μg / mL の正常ヒト F IX 濃度を使用して活性および抗原単位に変換した。F IX Padua の E L I S A データは、F IX 活性および F IX タンパク質データに類似するものであったことから、測定された F IX 活性は F IX Padua の発現に依存していたことが証明された。

20

#### 【 0186 】

##### ( 実施例 4 )

BC1 を使用して F IX 色素形成活性アッセイも開発した。F IX Padua を、プレートに結合した BC1 に結合させることによってサンプルマトリクスから選択的に精製した。徹底的に洗浄することによってヒト F IX 野生型を含む未結合のサンプル構成要素を除去し、その後、マイクロプレートのウェル上で色素形成第 IX 因子試験 221806 ( Hyphen Biomed ) を行った。サンプルを上述した希釈緩衝液で希釈した。図 18 は、F IX Padua および正常参照血漿調製物に関して得られた用量応答 - 曲線を示す。

30

#### 【 0187 】

F IX Padua は、直線状の濃度 - 応答曲線を示したが、約 1 U / mL の F IX 濃度を有する正常参照血漿濃度は、いかなる測定可能なシグナルも示さなかった。これらのデータは、F IX Padua 比活性アッセイを説明するアプローチの実行可能性を実証し、同時にその特異性を確認した。

#### 【 0188 】

##### ( 実施例 5 )

以下は、F IX 野生型と F IX Padua バリアントとを識別する抗体の単離を説明する。

40

#### 【 0189 】

F IX Padua は、単一のアミノ酸交換 ( F IX R338L ) を有する野生型 F IX の天然に存在する機能亢進性バリアントである。血友病 B 遺伝子治療に関する F IX Padua の有用性が前臨床モデルですでに示されており、現在のところ臨床フェーズ 1 / 2 プログラムで調査中である。治療成功の評価は、主として F IX Padua 導入遺伝子発現の決定に頼っているが、これは、野生型 F IX と F IX Padua とを識別する抗体の欠如によって妨げられる。野生型 F IX への交差反応性を伴わずに F IX Padua を特異的に認識する抗体は、臨床サンプル中の F IX Padua を一義的に検出す

50

るアッセイの開発を可能にする。ファージディスプレイ方法を使用して、特異的 F I X Padua 結合剤を選択した。ファージライブラリーを、338位に単一のアミノ酸置換を含む直鎖状および構造ペプチド、ならびに全長組換え F I X Padua を用いてスクリーニングした。3回のパニングを、野生型 F I X 配列と競合させて、および競合させずに行って、数種の結合剤を同定した。B I A C O R E (表面プラズモン共鳴) および E L I S A 実験を実行して、得られた抗体の特異性および親和性を決定した。まず異なるファージディスプレイパニング経路から様々な抗体を同定した。直鎖状ペプチド経路から生成した抗体は、独特で特異的な F I X Padua 結合を示した。選択された抗体は、約 3 ng / mL 血漿の検出限界を有し、高度に上昇した ( $> 50 \mu\text{g} / \text{mL}$ ) 濃度でも野生型 F I X に対する交差反応性がないことを示した。高度に特異的な抗 F I X Padua 抗体は、野生型 F I X と F I X Padua 抗原レベルとの間を選択的に区別する臨床アッセイの開発に使用することができる。

#### 【 0190 】

導入：

#### 【 0191 】

F I X Padua は、単一のアミノ酸交換 (F I X R 338 L) を有する F I X 野生型 (wt) の天然に存在する機能亢進性バリエントである。この機能獲得型変異は、正常な F I X と比較して、比凝固活性の 8 ~ 10 倍の増加をもたらす。in vitro で、組換え F I X - R 338 L は、組換え F I X 野生型の凝固活性より 5 ~ 10 倍高い比凝固活性を有していた [1]。血友病 B 遺伝子治療に関する F I X Padua の有用性が前臨床モデルすでに示されており、現在のところ臨床フェーズ 1 / 2 試験で調査中である。治療成功の評価は、主として F I X Padua 導入遺伝子発現の決定に頼っているが、これは、F I X wt と F I X Padua とを識別する抗体の欠如によって妨げられる。

#### 【 0192 】

この研究の目的は、F I X 野生型への交差反応性を伴わずに F I X Padua と特異的に結合する抗体を生成して、臨床サンプル中での F I X wt の存在下における F I X Padua の検出を可能にすることであった。

#### 【 0193 】

以下は、この研究で行われた方法を説明する。

#### 【 0194 】

抗 Padua F I X 特異的抗体の生成：抗体（二価 Fab）を、HuCAL PLATI NUM (登録商標) ライブラリーおよび Cys Display (登録商標) テクノロジーに基づくファージディスプレイテクノロジーによって生成した。4つの異なるアプローチを適用して、F I X Padua に特異的な抗体を単離した（図 19）。2つは、固体または液体（ビーズ）相アッセイのいずれかにおいて 338 位に単一のアミノ酸置換を含むペプチドを用いて実行された。第 3 および第 4 の戦略は、全長活性 F I X Padua タンパク質を含んでいた。適した陰性対照 (wt ペプチドまたは F I X wt) を含む各戦略につき 3 回のパニングを実行した。固有の陽性クローニングの Fab を產生し、F I X Padua 抗原への特異的結合に関して試験した。E L I S A の場合、抗原 [5 μg / mL] をコーティングし、Fab 断片 [2 μg / mL] と共にインキュベートし、続いて抗 Fab A P コンジュゲートで検出した。

#### 【 0195 】

血漿 E L I S A : Fab を Maxisorp E L I S A プレート [5 μg / mL] 上にコーティングし、P B S 緩衝液中に希釈した 20 % のヒト血漿に加えて 50 mM のベンズアミジンと共にインキュベートした。血漿に 5 μg / mL の r F I X wt および増加する濃度の r F I X Padua (HEK 293 で所内生産) をスパイクした。H R P で標識化したポリクローナルヤギ抗 F I X 抗体 (100 ng / mL) を使用して検出を行った。

#### 【 0196 】

B i a C o r e : 全ての実験を、25 で、B i a c o r e (商標) 200 機器およびニッケルでコーティングされたバイオセンサーチップ (NTA - チップ、G E Health

10

20

30

40

50

h care) を使用して実行した。機器をまず、H B S - E P ランニング緩衝液で 3 回プライミングし、フローセル 1 ( F C 1 ) を、未改変であり F a b リガンドが欠如した参照フローセルとして使用した。約 5 0 0 R U の F I X Padua 特異的 A b 4 2 の固定には、フローセル 2 ( F C 2 ) を使用した。リガンド濃度は、1 0 0 ~ 6 . 2 5 n M の範囲であった。

#### 【 0 1 9 7 】

この研究の結果は、後述される。

#### 【 0 1 9 8 】

プラ w t F I X の構造分析から、単一の Padua 改変 ( R 3 3 8 L ) はタンパク質の表面に位置しており [ 2 ] ( 図 2 1 ) 、したがって、高度に特異的な抗体の生成に好適なエピトープであることが明らかになった。精製された二価 F a b を、 E L I S A によって、2 0 % のヒト血漿中での抗原の特異性 ( 図 2 2 ) および F I X w t に対する交差反応性に関して試験した ( 図 2 3 ) 。 5 μ g / m L の、スパイクした F I X w t を含有する 2 0 % 血漿マトリクス中、4 つの中離された二価 F a b のうち 2 つのみ ( A b 4 2 および A b 7 6 ) が、 F I X Padua に特異的に結合した。 A b 4 2 のみが、ヒト F I I およびヒト F X に対していかなる交差反応性も示さなかった ( データ示さず ) 。

10

#### 【 0 1 9 9 】

これらのデータに基づき、ファージディスプレイテクノロジーを使用して高度に特異的な抗 F I X Padua ミニ抗体 A b 4 2 が生成されたことが結論付けられた。選択された候補は、 F I X 野生型または他の一般的な血液因子タンパク質、例えば F I I または F X に対する交差反応性を示さない。 F I X Padua への有効な結合は、ヒト血漿マトリクス ( 2 0 % ) 中および F I X w t の一般的な濃度の存在下で示された。ミニ抗体 A b 4 2 は、臨床フェーズ 1 / 2 試験中に処置された患者からの血漿中における F I X Padua 分析に現在使用されている ( 以下を参照 ) 。

20

#### 【 0 2 0 0 】

上述した研究において、以下の参考文献：( 1 ) Simionisら、 X - Linked Thrombophilia with a Mutant Factor IX ( Factor IX Padua ) N Engl J Med 2009 年 ; 3 6 1 卷 : 1 6 7 1 ~ 5 頁；および ( 2 ) Brandstetter ら、 X - ray structure of dottting factor IXa : active site and module structure related to Xase activity and hemophilia B . Proc Nail Acad Sci U S A . 1 9 9 5 年 1 月 10 日 ; 9 2 卷 ( 2 1 号 ) : 9 7 9 6 ~ 8 0 0 頁が引用される。

30

#### 【 0 2 0 1 】

以下は、血友病 B 遺伝子治療のモニタリングのための F I X Padua 特異的イムノアッセイの開発および適用を説明する。

#### 【 0 2 0 2 】

遺伝子治療は、血友病の将来的な処置選択肢として大きな見込みがある。ある臨床フェーズ 1 / 2 試験では、 A A V 2 / 8 ウイルスベクターを使用して、重度の血友病 B を有する被験体において、単一のアミノ酸交換 ( R 3 3 8 L ) を有する F I X の機能亢進性バリアントである F I X Padua ( F I X p ) を発現させる。導入遺伝子産物の特異的な検出は、治療の成功の評価にとって重要であるが、 F I X 交差反応物質を有する患者 ( C R M + ) では問題がある。 F I X p 特異的な E L I S A の開発、および F I X Padua を発現する A A V 2 / 8 ウイルスベクターで処置した後の血友病 B 患者の血漿中で発現される F I X p を測定するためのこのアッセイの適用。新たに開発した F I X p 特異的な結合抗体の F a b 断片を、標準的な条件を使用して 9 6 ウェルマイクロプレートに 2 μ g / m L でコーティングした。検出系として、ビオチン化ポリクローナルヒツジ抗ヒト F I X Ig G およびストレプトアビシンペルオキシダーゼを使用した。アッセイの較正を、 2 7 . 1 ~ 0 . 8 5 n g / m L の F I X p 濃度範囲を網羅する F I X p 調製物を用いて 6 ポイントの較正曲線を生成することによって達成した。患者のサンプルを、 5 m g / m L ウシ

40

50

血清アルブミン、10 mMのベンズアミジン、10 mMのCaCl<sub>2</sub>および0.05%Tween 20を含有するHEPES/NaCl緩衝液で希釈した。正常ヒト血漿または精製されたヒトFIXは、FIXp特異的なELISAにおいてシグナルを示さなかった。正確な較正曲線を得た。1/10希釈した正常ヒト血漿にスパイクしたFIXpは、緩衝液中のアッセイ標準で得られたものに類似する希釈応答曲線で許容できる回復を示した。重要なことに、FIXpをコードするAAVで処置された6人の患者のサンプルの分析は、時間をわたって高度に類似したFIXpタンパク質およびFIX活性曲線を実証し、CRM+患者のサンプルは、CRM-患者と比較してFIXpタンパク質のシグナルの増加を示さなかつたことから、アッセイの特異性が示された。FIXp特異的なELISAは、FIXpタンパク質の測定による処置転帰の追加のモニタリングを可能にする。これは、このアプローチの実行可能性を実証する最初のデータを表す。

#### 【0203】

導入：

#### 【0204】

遺伝子治療は、血友病の将来的な処置選択肢として大きな見込みがある[1]。ある臨床フェーズ1/2試験では、AAV2/8ウイルスベクターを使用して、重度の血友病Bを有する被験体において、単一のアミノ酸交換(R338L)を有するFIXの機能亢進性バリエントであるFIX Padua(FIXp)[2]を発現させる。導入遺伝子産物の特異的な検出は、治療の成功の評価にとって重要であるが、FIX交差反応物質を有する患者(CRM+)では問題がある。

#### 【0205】

図25は、この研究に記載される方法(アッセイ)の原理を描写する。抗FIX Padua Fabをマイクロプレートウェルにコーティングして、サンプルからFIX Paduaを選択的に捕捉する。洗浄ステップの後、未結合のサンプル化合物を除去し、所内のビオチン化ポリクローナルヒツジ抗FIX IgGおよびストレプトアビジンペルオキシダーゼを使用して結合したFIX Paduaを検出する。結合したHRP活性は、すぐ使用できるHRP基質であるSureBlueを使用して測定される。

#### 【0206】

以下は、この研究で行われた方法を説明する。

#### 【0207】

ELISA手順：Fab調製物Ab42(0.94 mg/mL)を、0.1MのNaHCO<sub>3</sub>-Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、pH 9.5で1/500に希釈し、100 μL/ウェルで0~+10で一晩インキュベートすることによってMaxisorp F96プレートのウェルに結合させた。サンプルおよび試薬の希釈およびプレートのプロッキングに使用された希釈緩衝液(DB)は、0.1MのHEPES、0.1MのNaCl、pH 7.2、5 mg/mLビオチン非含有ウシ血清アルブミン(BSA)、10 mMのCa<sup>2+</sup>、0.05%Tween 20(Bio-Rad、EIAグレード)、および10 mMのベンズアミジンを含有していた。コーティング後、プレートを、0.05%Tween 20を含有するリン酸緩衝食塩水で洗浄した。次いで、ウェルを、200 μLのDB/ウェルと室温(RT)で60分間インキュベートすることによってプロッキングした。プロッキングするステップを、洗浄することによって終結させた。次いで、標準/サンプルの希釈物をローディングし、連続的な1+1の希釈系列をプレート上で直接調製した。希釈物(100 μL/ウェル)を室温で60分間インキュベートした。プレートを再度洗浄し、F9-1030A(A-Coa)から調製されたビオチン化ポリクローナルヒツジ抗ヒトFIX検出抗体を添加した(100 μL/ウェル；希釈11500)。室温で60分間インキュベートした後、プレートを再度洗浄し、ストレプトアビジンペルオキシダーゼ(DakoCytomation)を添加し(100 μL/ウェル；希釈1/4,000)、室温で30分間インキュベートした。最終的な洗浄手順の後、結合したペルオキシダーゼ活性を、すぐ使用できるペルオキシダーゼ基質であるSureBlue(KPL)を用いて測定し、3N硫酸で反応を止めた。次いでプレートを、620 nmで得られた結果を減算して45

10

20

30

40

50

0 nmで測定した。精製された組換えF IX Padua ( F IX p )調製物を用いて較正曲線を構築し、542.4 μg / mLのタンパク質濃度を実証した。タンパク質1 mg当たり2,310 IUの比凝固活性は、この調製物を、過剰に活性なF IX Paduaバリエントとして明らかに分類した。連続的な希釈系列は、1/20,000から1/640,000の範囲であり、27.1~0.85 ng / mLのF IX濃度範囲を定義した。

#### 【0208】

この研究の結果は、下記および図面で説明される。F IX凝固活性およびF IX抗原測定を、確立された標準的な方法を適用して実行し、クエン酸塩加血漿サンプルも、ELISAを用いたF IX Paduaタンパク質の特異的な測定に供した。ng / mLで得られたF IX PaduaのELISAの結果を活性および抗原単位に変換した。具体的には、F IX p ELISAのためのアッセイ標準として適用された、F IX 2,310 IU / mgの組換え精製されたF IX Padua調製物の比活性を使用して、活性単位を計算し、一方で抗原血漿単位への変換は、5 μg / mLの正常F IX血漿濃度に基づいた。図26~29はそれぞれ、正常およびF IX欠乏血漿におけるアッセイの選択性、較正曲線、並行して行った研究、およびELISAの感受性に対するカルシウムの影響を実証する

#### 【0209】

血漿サンプルを、AAV 2 / 8ウイルスベクターで処置された患者から得た。図30~32は、3人の患者から得られたサンプル中のF IX Paduaの活性および発現を実証する。被験体05-001から得られた血漿サンプルは、一貫して1U / mLに近いF IX抗原濃度を示したが、F IX活性は定量下限未満であった。このデータは、F IX交差反応物質の存在(CRM+)、すなわち凝固不活性F IXタンパク質が、従来のF IX ELISAで測定可能であることを明らかにした。F IX p ELISAデータは、F IX活性データに類似するものであったことから、測定されたF IX活性はF IX Paduaの発現に依存することが実証された。対照的に、F IX Padua特異的なELISAで測定されたF IX抗原濃度は、標準的なELISAで得られたものより明らかに低かったことから、F IX PaduaのELISAはCRM+材料とF IX Paduaとの間の識別を可能にしたことが実証された。被験体10-005からのサンプルで、より低いCRM+レベルにもかかわらず類似のデータが見出されたが、被験体03-004からのサンプルはCRM+を含有せず、結果として2つのELISAシステムでも類似する時間対濃度曲線が得られた。

#### 【0210】

これらのデータから、F IX pの捕捉のために高度に特異的なFab断片の使用に基づくF IX Padua特異的なELISAは、F IX pの測定による処置転帰の追加のモニタリングを可能にすることが結論付けられた。これらは、このアプローチの実行可能性を実証する最初のデータである。

#### 【0211】

上述した研究において、以下の参考文献：[1] Simionio Pら(2009年)：NEJM 361巻、1671~1675頁。X-Linked thrombophilia with a Mutant Factor IX (Factor IX Padua)；[2] Cruedel JMら(2015年)。Blood 125巻：1553~1561頁が引用される。F IX - PaduaのAAV肝臓発現は、血友病Bのイヌおよびマウスにおいて血栓形成性を増加させることなくF IX阻害剤を妨害し根絶する。本明細書の実施形態は、以下のようにも記載することができる：

1. 配列番号1のアミノ酸配列を含む第IX因子Paduaに結合し、アミノ酸配列(配列番号2)を含む野生型(WT)第IX因子に結合しない、抗体またはその抗原結合性断片。

2. 配列番号1のエピトープと結合し、エピトープは、アミノ酸配列DRATCLLSTKFT(配列番号3)内の線状エピトープである、実施形態1に記載の抗体または抗原結合性断片。

3. 配列番号1のエピトープに結合し、エピトープは、アミノ酸配列LVDRATCL

10

20

30

40

50

L S T K F T I Y N N M F C A G F H (配列番号5)のフォールディングされた構造のコンフォメーションナルエピトープである、実施形態1に記載の抗体または抗原結合性断片。

4. フォールディングされた構造が、ジスルフィド架橋を含む、実施形態1または3に記載の抗体または抗原結合性断片。

5. D R A T C L R S T K F T (配列番号14)またはL V D R A T C L R S T K F T I Y N N M F C A G F H (配列番号15)のアミノ酸配列に結合しない、前述の実施形態のいずれか1つに記載の抗体または抗原結合性断片。

6. 約100nMまたはそれ未満のK<sub>D</sub>で第IX因子P aduaに結合する、前述の実施形態のいずれか1つに記載の抗体または抗原結合性断片。

7. 約25～約75nMの範囲のK<sub>D</sub>で第IX因子P aduaに結合する、前述の実施形態のいずれか1つに記載の抗体または抗原結合性断片。 10

8. 約50nM～約60nMの範囲のK<sub>D</sub>で第IX因子P aduaに結合する、前述の実施形態のいずれか1つに記載の抗体または抗原結合性断片。

9. 約20nM～約100nM、約25nM～約95nM、約30nM～約90nM、約35nM～約85nM、約40nM～約80nM、約45nM～約75nM、約50nM～約70nM、または約55nM～約65nMの範囲のK<sub>D</sub>で第IX因子P aduaに結合する、前述の実施形態のいずれか1つに記載の抗体または抗原結合性断片。

10. ヒト血漿を含むサンプル中の第IX因子P aduaに結合し、WT第IX因子に結合せず、任意選択で、サンプルは、少なくとももしくは約5%、少なくとももしくは約10%、または少なくとももしくは約20%のヒト血漿を含み、サンプルは、少なくともまたは約5μg/mLのWT第IX因子を含む、前述の実施形態のいずれか1つに記載の抗体または抗原結合性断片。 20

11. 第II因子ポリペプチドまたは第X因子ポリペプチドに結合しない、前述の実施形態のいずれか1つに記載の抗体または抗原結合性断片。

12. 抗体または抗原結合性断片が、第II因子にも第X因子にも結合しない、前述の実施形態のいずれか1つに記載の抗体または抗原結合性断片。

13. F abまたはF ab2'抗体断片である、前述の実施形態のいずれか1つに記載の抗体または抗原結合性断片。

14. 単一特異性である、前述の実施形態のいずれか1つに記載の抗体または抗原結合性断片。 30

15. 完全にヒトのものである、前述の実施形態のいずれか1つに記載の抗体または抗原結合性断片。

16. 二価である、前述の実施形態のいずれか1つに記載の抗体または抗原結合性断片。

17. 二価であるが、FIX P aduaに対して単一特異性である、前述の実施形態のいずれか1つに記載の抗体または抗原結合性断片。

18. 二量体化されたF ab断片または二量体化されたF abミニ抗体を含む、前述の実施形態のいずれか1つに記載の抗体または抗原結合性断片。

19. リンカーを介して二量体化されたF ab断片である、前述の実施形態のいずれか1つに記載の抗体または抗原結合性断片。

20. (i) S S Y A I S (配列番号6)；G I V P A F G T A N Y A Q K F Q G (配列番号7)；S W G V I S F A Y (配列番号8)；R A S Q D I S S Y L N (配列番号9)；A A S N L Q S (配列番号10)；およびM Q Y D S L P F T F (配列番号11)のアミノ酸配列、あるいは(i i)配列番号24もしくは配列番号25または配列番号24および25のアミノ酸配列あるいは(i i i)配列番号26もしくは配列番号27または配列番号26および27のアミノ酸配列を含む、前述の実施形態のいずれか1つに記載の抗体または抗原結合性断片。 40

21. 配列番号6～11の各々を含むアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、任意選択で、(i)配列番号6～11の各々の間に、1つもしくは複数のアミノ酸が存在し、ならびに/または(i i)ポリペプチドは、任意選択で、D Y K D D D D K (配列番号12)を含むFLAGタグおよび/もしくはH H H H H (配列番号13)を含むヘキサH

10

20

30

40

50

i s タグをさらに含む、ポリペプチド。

22 . F L A G タグおよび / またはヘキサH i s タグは、ポリペプチドの C 末端に配置されている、実施形態 21 に記載のポリペプチド。

23 . 異種成分にコンジュゲートした、前述の実施形態のいずれか 1 つに記載の抗体または抗原結合性断片もしくはポリペプチドを含むコンジュゲート。

24 . 異種成分が、ポリマー、炭水化物、脂質、核酸、オリゴヌクレオチド、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質および検出剤からなる群より選択される、実施形態 23 に記載のコンジュゲート。

25 . 抗体または抗原結合性断片もしくはポリペプチドが、アガロース、セルロース、デキストラン、ポリアクリルアミド、ラテックスまたは制御多孔質ガラスにコンジュゲートされている、実施形態 23 または 24 に記載のコンジュゲート。 10

26 . 抗体または抗原結合性断片もしくはポリペプチドが、フルオロフォア、発色団、放射性同位体、酵素標識、またはビオチンにコンジュゲートされている、実施形態 23 から 25 のいずれか 1 つに記載のコンジュゲート。

27 . 実施形態 19 に記載のポリペプチドのホモ二量体を含む、実施形態 23 から 26 のいずれか 1 つに記載のコンジュゲート。

28 . 二量体のポリペプチドは、ヘリックス - ターン - ヘリックス構造を介して連結されている、実施形態 27 のいずれか 1 つに記載のコンジュゲート。

29 . 前述の実施形態のいずれか 1 つに記載の抗体、抗原結合性断片、ポリペプチド、コンジュゲート、またはそれらの断片をコードするヌクレオチド配列を含む核酸。 20

30 . 実施形態 29 に記載の核酸を含むベクター。

31 . 実施形態 29 に記載の核酸または実施形態 30 に記載のベクターを含む宿主細胞。

32 . 実施形態 1 から 20 のいずれか 1 つに記載の抗体もしくは抗原結合性断片、実施形態 21 または 22 に記載のポリペプチド、実施形態 23 から 28 のいずれか 1 つに記載のコンジュゲート、実施形態 29 に記載の核酸、実施形態 30 に記載のベクター、および / または実施形態 31 に記載の宿主細胞を含む、キット。

33 . 抗体、抗原結合性断片、ポリペプチド、もしくはコンジュゲートに結合する二次抗体をさらに含む、実施形態 32 に記載のキット。

34 . 固体支持体をさらに含む、実施形態 32 または 33 に記載のキット。

35 . 抗体、抗原結合性断片、ポリペプチドまたはコンジュゲートが、固体支持体上にプレコーティングされている、実施形態 32 から 34 のいずれか 1 つに記載のキット。 30

36 . 固体支持体が、ポリマービーズ、マイクロタイタープレート、膜、またはフィルターである、実施形態 34 または 35 に記載のキット。

37 . 約 1 0 0 n g またはそれより多く、約 1 5 0 n g またはそれより多く、約 2 0 0 n g またはそれより多く、約 5 0 0 n g またはそれより多くの抗原結合性断片を含む溶液でプレコーティングされた固体支持体を含む、実施形態 35 または 36 に記載のキット。

38 . 使用のための指示をさらに含む、実施形態 32 から 37 のいずれか 1 つに記載のキット。

39 . ヒト血漿、もしくはその希釈された画分、および / またはヒト組織もしくはその細胞を含む、ヒトから得られた生体サンプルと混合された、実施形態 1 から 20 のいずれか 1 つに記載の抗体またはその抗原結合性断片を含む組成物であって、任意選択で、検出剤を含む組成物。 40

40 . ヒト血漿タンパク質を含む、ヒトから得られた生体サンプルと混合された、実施形態 1 から 20 のいずれか 1 つに記載の抗体またはその抗原結合性断片を含む組成物であって、ヒト血漿タンパク質の少なくとも 1 つは、第 I X 因子、第 I X 因子のバリアント、第 I I 因子、第 I I 因子のバリアント、第 X 因子および第 X 因子のバリアントからなる群より選択される、組成物。

41 . 検出剤を含む、実施形態 40 に記載の組成物。

42 . サンプル中の第 I X 因子 P a d u a を検出するための、実施形態 1 から 20 のいずれか 1 つに記載の抗体または抗原結合性断片、実施形態 21 または 22 に記載のポリペ

10

20

30

40

50

プチド、実施形態 23 から 28 のいずれか 1 つに記載のコンジュゲート、実施形態 29 に記載の核酸、実施形態 30 に記載のベクター、実施形態 31 に記載の宿主細胞、および / または実施形態 32 から 38 のいずれか 1 つに記載のキットの使用。

43. 被験体から得られたサンプル中の第 IX 因子 P ad u a を検出する方法であって、(i) サンプルを、実施形態 1 から 20 のいずれか 1 つに記載の抗体または抗原結合性断片、実施形態 21 または 22 に記載のポリペプチド、または実施形態 23 から 28 のいずれか 1 つに記載のコンジュゲートと接触させて、第 IX 因子 P ad u a と、抗体、抗原結合性断片、ポリペプチドまたはコンジュゲートとを含む複合体を形成するステップ、および (ii) サンプル中の複合体を検出するステップを含む、方法。

44. 抗体または抗原結合性断片もしくはポリペプチドが、検出剤および / または固体支持体にコンジュゲートされているか、あるいはコンジュゲートが、検出剤を含む、実施形態 43 に記載の方法。 10

45. サンプルを、検出剤を含む二次抗体と接触させるステップを含み、二次抗体は、抗体もしくは抗原結合性断片もしくはポリペプチドまたはコンジュゲートに結合する、実施形態 43 または 44 に記載の方法。

46. 複合体を検出するステップが、検出剤のシグナルを検出することを含む、実施形態 43 から 35 のいずれか 1 つに記載の方法。

47. シグナルが、酵素活性、結合活性および / または色素形成活性である、実施形態 46 に記載の方法。

48. サンプルが、血液サンプル、血清サンプル、または血漿サンプルである、実施形態 43 から 47 のいずれか 1 つに記載の方法。 20

49. 被験体が、第 IX 因子 P ad u a をコードするヌクレオチド配列を含むベクターで処置されている、実施形態 43 から 48 のいずれか 1 つに記載の方法。

50. 本明細書に記載の結合性構築物。

#### 【0212】

本明細書において引用された、刊行物、特許出願、および特許を含む全ての参考文献は、各参考文献が個別具体的に参照により組み入れられることが示されたのと同程度に、さらに本明細書にその全体が記載されたのと同程度に参照により本明細書に組み入れられる。

#### 【0213】

用語「1つの (a)」および「1つの (an)」および「その (the)」ならびに類似の指示対象の使用は、本開示を記載する場合（特に以下の特許請求の範囲の文脈で）、本明細書において別段の指定がない限り、またはそれ以外の方式で文脈上明らかに矛盾しない限り、単数形と複数形の両方を包含すると解釈されるものとする。用語「含む (including)」、「有する」、「含む (including)」、および「含有する」は、別段の言及がない限り、包括的な用語（すなわち、「これらに限定されないが、～を含む」を意味すること）として解釈されるものとする。 30

#### 【0214】

本明細書における値の範囲の詳述は、範囲に含まれるそれぞれ別個の値および各上下限値を個々に述べる簡略的な方法として役立つことが単に意図され、本明細書において別段の指定がない限り、各別個の値および上下限値は、それが本明細書で個々に列挙されたのと同等に明細書に組み入れられる。 40

#### 【0215】

本明細書に記載される全ての方法は、本明細書において別段の指定がない限り、またはそれ以外の方式で文脈上明らかに矛盾しない限り、あらゆる好適な順番で実行することができる。本明細書で提供されるありとあらゆる実施例、または例示的な言語（例えば、「例えば、など (such as)」）の使用は、開示をより明確にし、別段の主張がない限り、本開示の範囲に限定を設けないことが単に意図される。明細書中の言語は、いずれの特許請求されていない要素も本開示の実施に必須であることを示すものと解釈されるべきではない。

#### 【0216】

10

20

30

40

50

本開示の好ましい実施形態は、本開示を行うことに関する本発明者らが認識する最良の形態を含めて本明細書に記載される。そのような好ましい実施形態のバリエーションは、前述の記載を読めば当業者にとって明白になり得る。本発明者らは、当業者が必要に応じてこのようなバリエーションを採用することを予測しており、本発明者らは、本明細書に具体的に記載されたものとは別的方式で本開示が実施されることを意図している。したがって、本開示は、適用法で認められるようにここに添付された特許請求の範囲で列挙された主題の全ての改変および均等物を含む。さらに、上述された要素のあらゆる可能なバリエーションでのあらゆる組み合わせが、本明細書において別段の指定がない限り、またはそれ以外の方式で文脈上明らかに矛盾しない限り、本開示によって包含される。

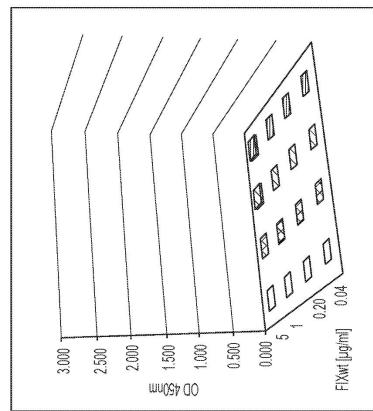
【 囮 面 】

【 図 1 】

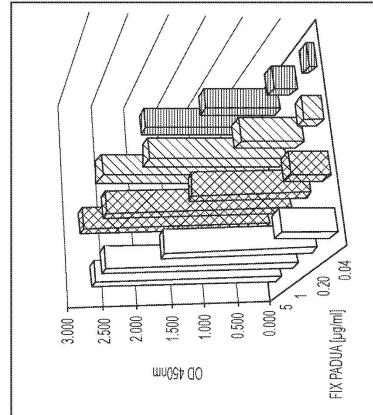
**FIX WT: シグナルペプチド** プロペプチド  
軽鎖  
**活性ペプチド** 活性化ペプチド  
重鎖  
活性化ペプチドの構造は、シグナルペプチドとプロペプチドの二部構成で、シグナルペプチドは、細胞膜を通過するための機能を有するアミノ酸配列であり、プロペプチドは、活性化ペプチドとなるための機能を有するアミノ酸配列である。活性化ペプチドは、シグナルペプチドとプロペプチドの接合部で切断され、シグナルペプチドが除去される。この過程で、活性化ペプチドが形成される。

**PR0104 変異体** 384位のアミノ酸アルギニン(R)からロイシン(L)への置換は、機能能が准活性(FIX活性約5~10倍)をもたらす。384位は、シジナルペプチドおよびプロペプチドを除去した成熟ペプチド配列の

**FIGURE 1**



【 义 2 】



10

20

30

40

50

【図 3】

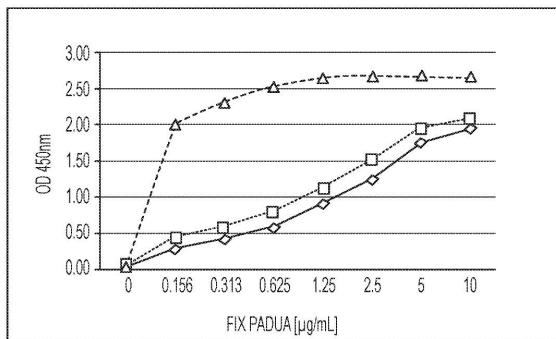


FIGURE 3

【図 4】

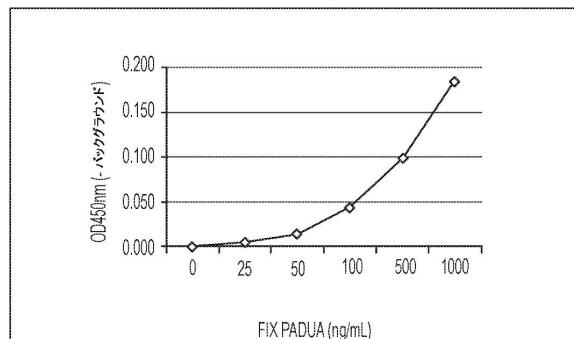


FIGURE 4

10

【図 5】

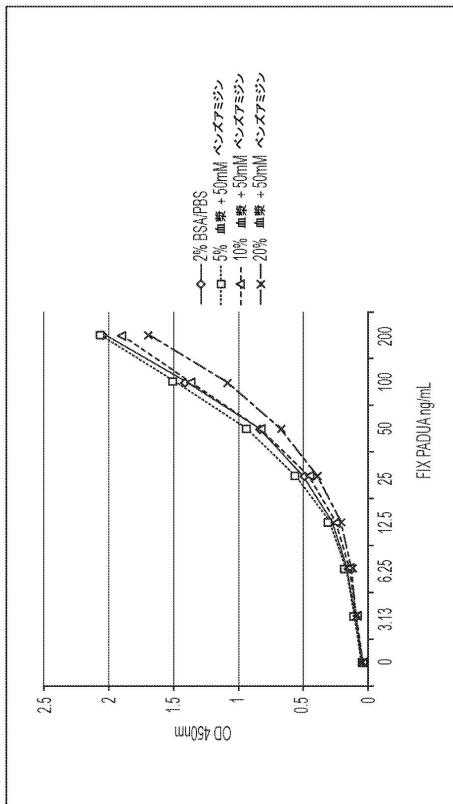


FIGURE 5

【図 6】

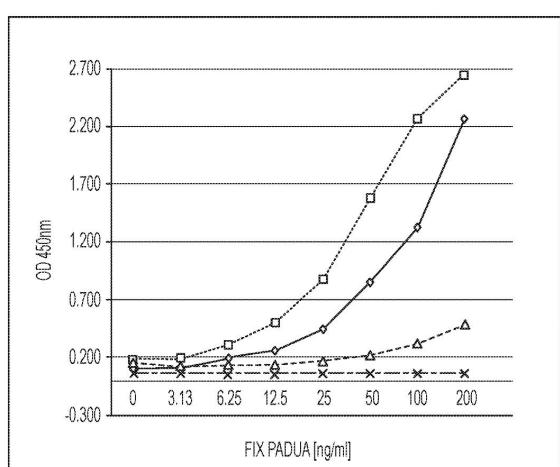


FIGURE 6

20

30

40

50

【図 7】

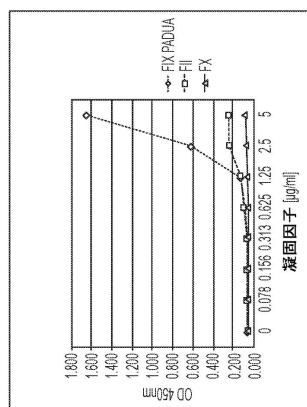


FIGURE 7

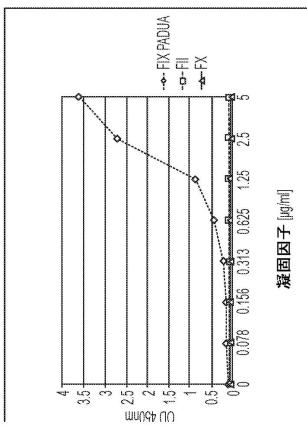


FIGURE 7

【図 8】

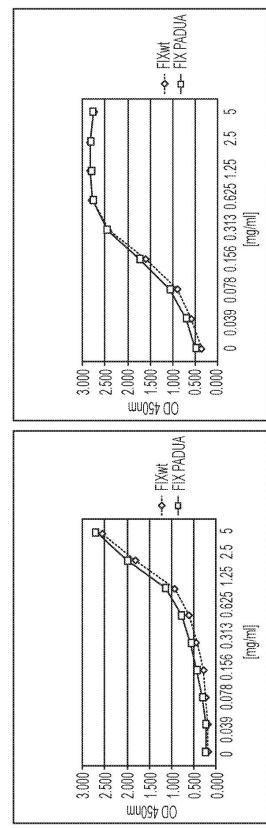


FIGURE 8

10

20

【図 9】

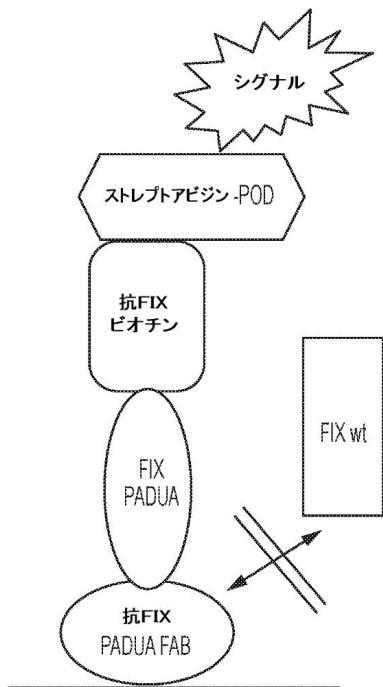
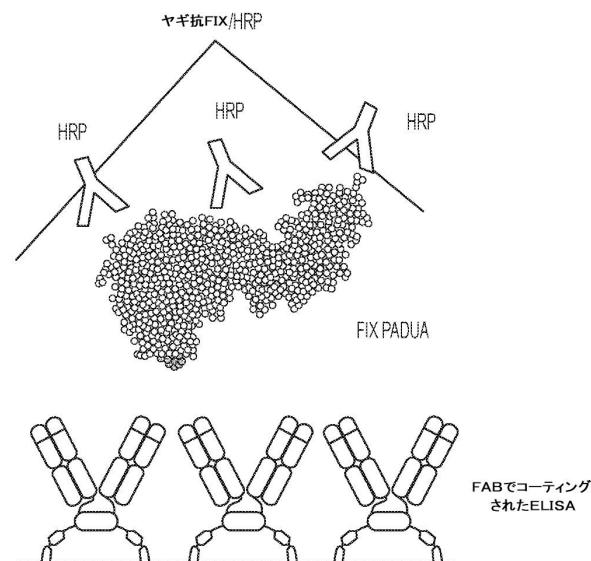


FIGURE 9

【図 10】



30

40

FIGURE 10

50

【図 1 1】

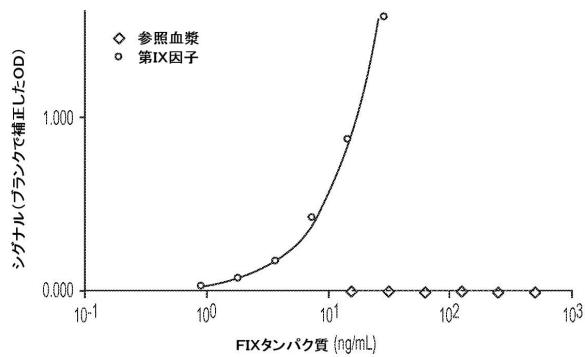


FIGURE 11

【図 1 2】

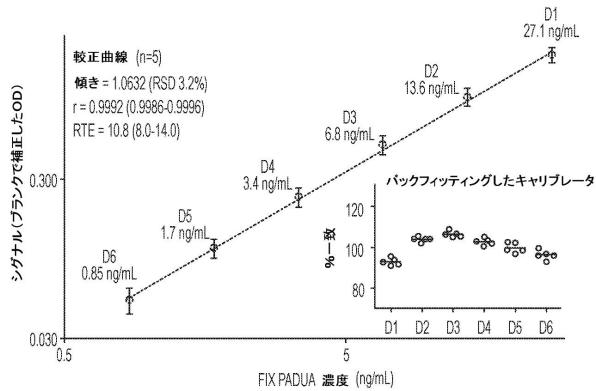


FIGURE 12

10

【図 1 3】

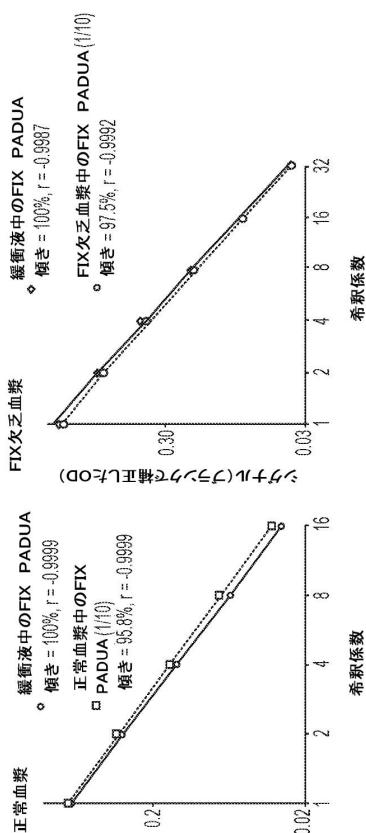


FIGURE 13

20

【図 1 4】

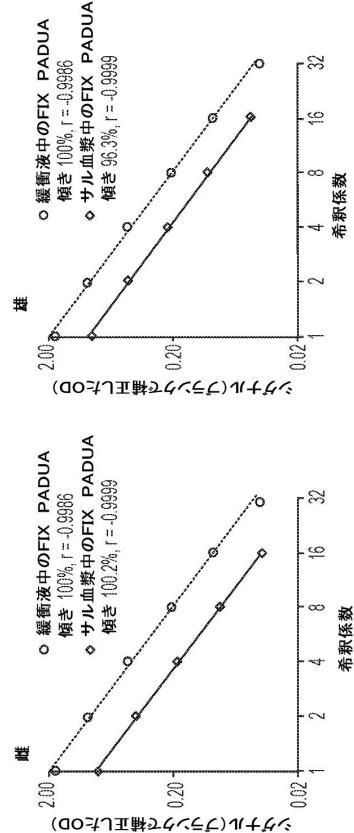


FIGURE 14

30

40

50

【図 15】

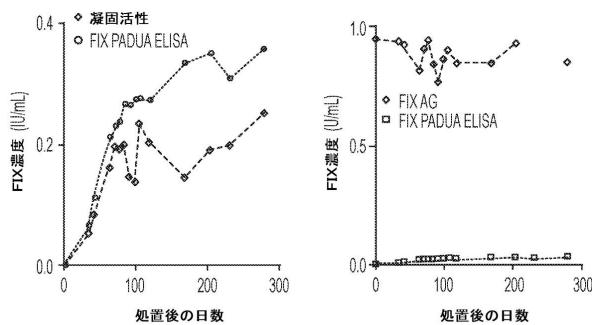


FIGURE 15

【図 16】

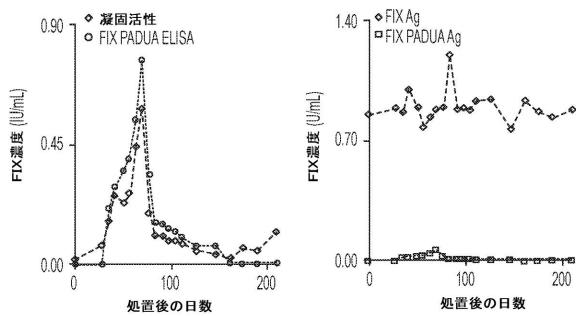


FIGURE 16

10

【図 17】

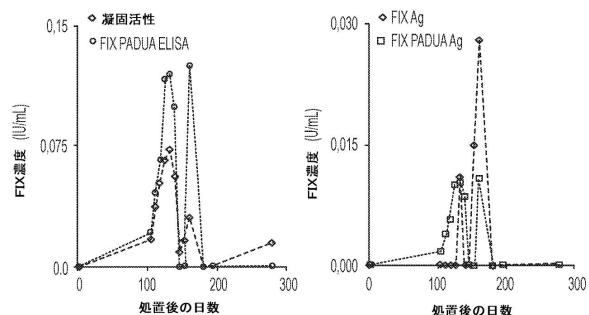


FIGURE 17

【図 18】

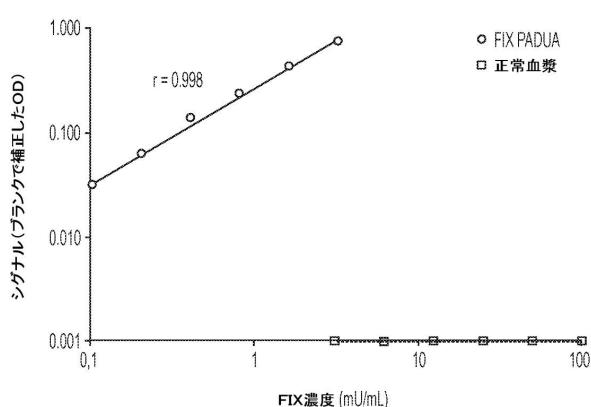


FIGURE 18

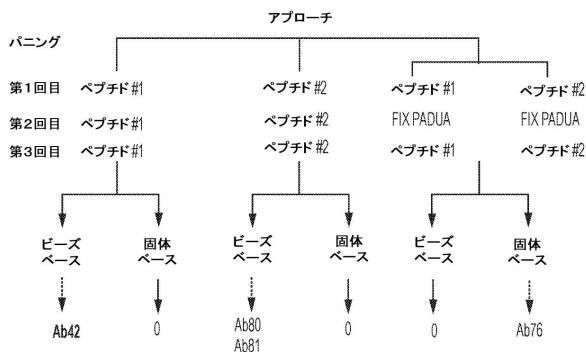
20

30

40

50

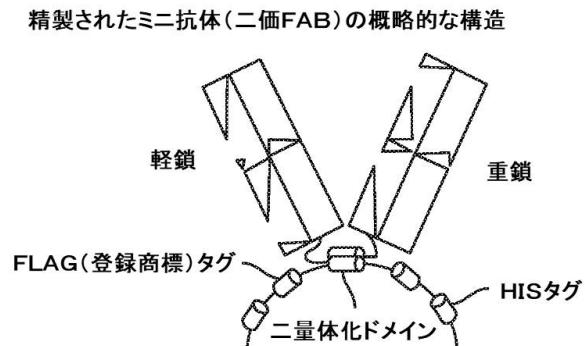
【図 19】



パニング(PADUA)ペプチド:  
 #1:ビオチン-TDS-リンカー-DRATCILSTKFT  
 #2:ビオチン-TDS-リンカー-LVDRATCLLSTKFTIYNNMFCAGTH  
 ブロッキング(wt)ペプチド:  
 #1:ビオチン-TDS-リンカー-DRATCILSTKFT  
 #2:ビオチン-TDS-リンカー-LVDRATCLRSTKFTIYNNMFCAGTH

FIGURE 19

【図 20】



10

FIGURE 20

【図 21】

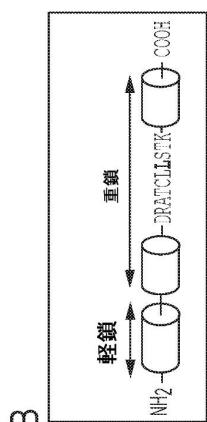
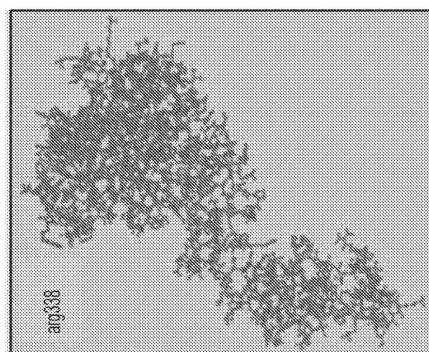
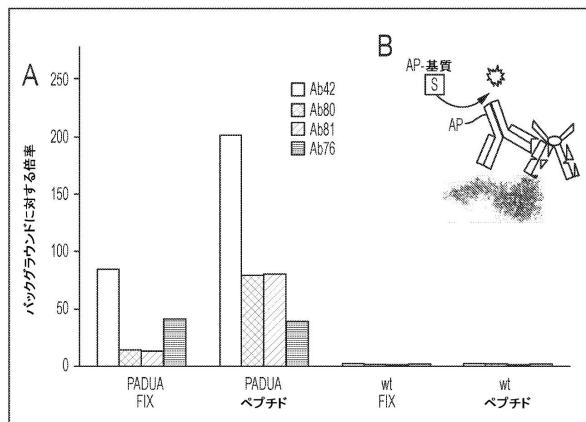


FIGURE 21



【図 22】



20

30

FIGURE 22

40

50

【図 2 3】

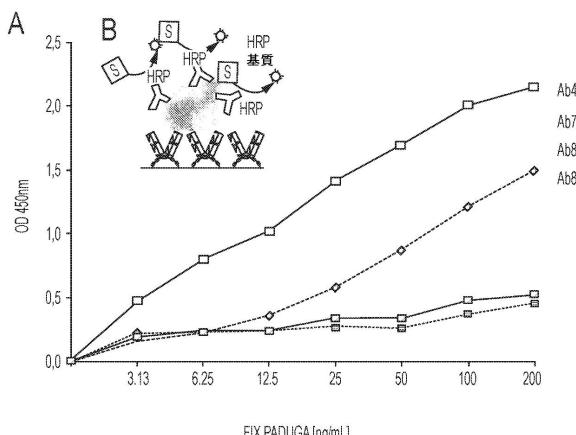


FIGURE 23

【図 2 4】

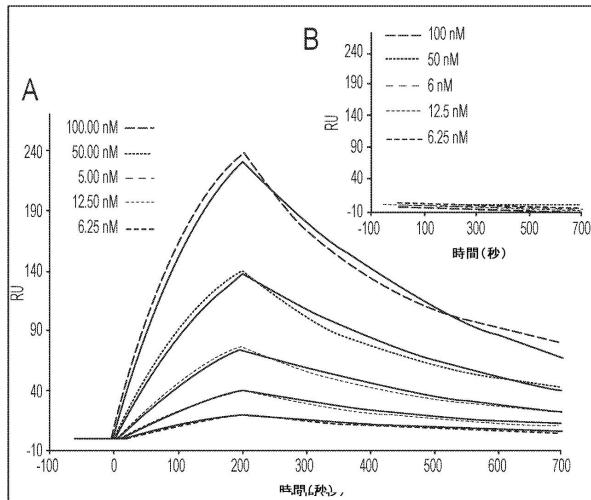


FIGURE 24

【図 2 5】

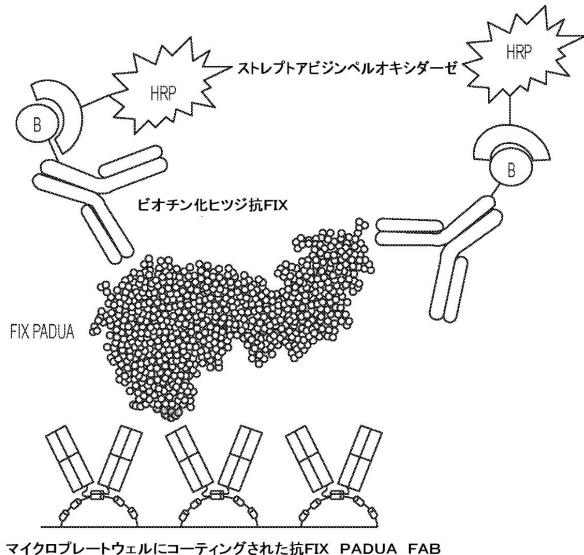


FIGURE 25

【図 2 6】

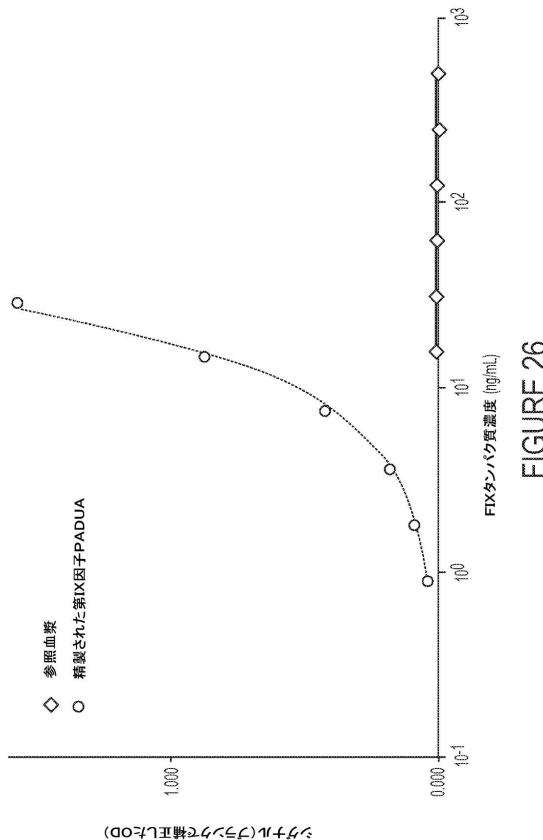


FIGURE 26

10

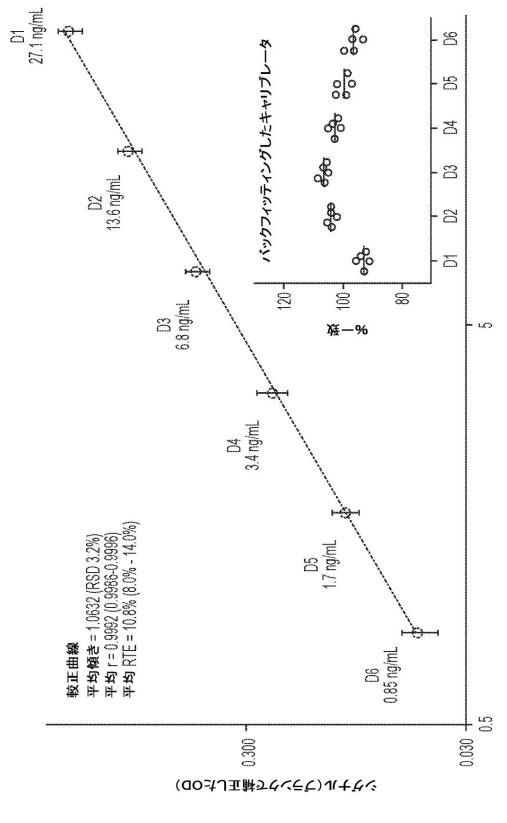
20

30

40

50

【図27】



【図28】

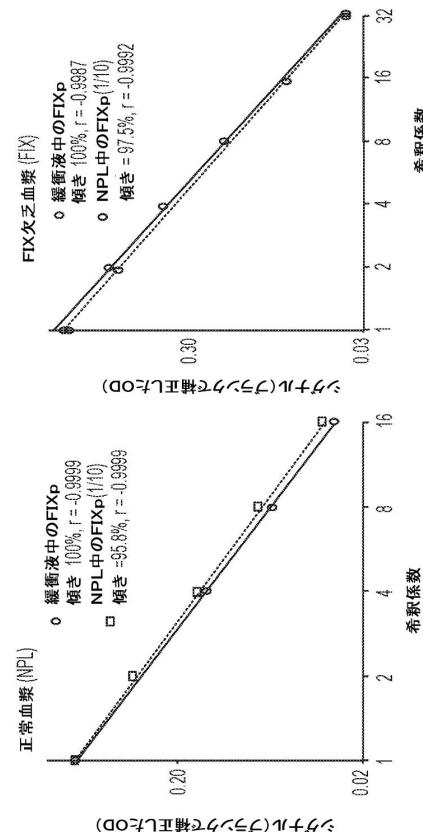
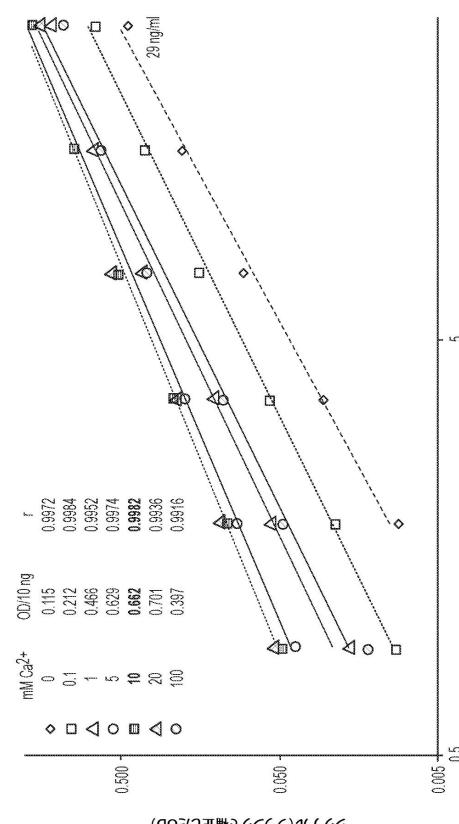


FIGURE 27

FIGURE 28

【図29】



【図30】

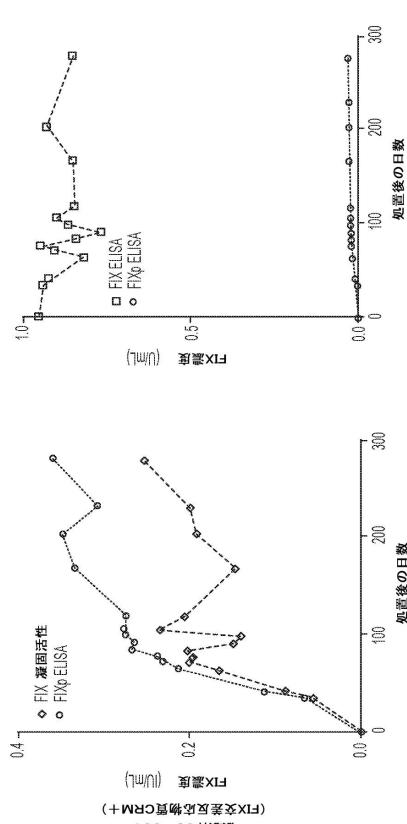


FIGURE 29

FIGURE 30

【図 3 1】

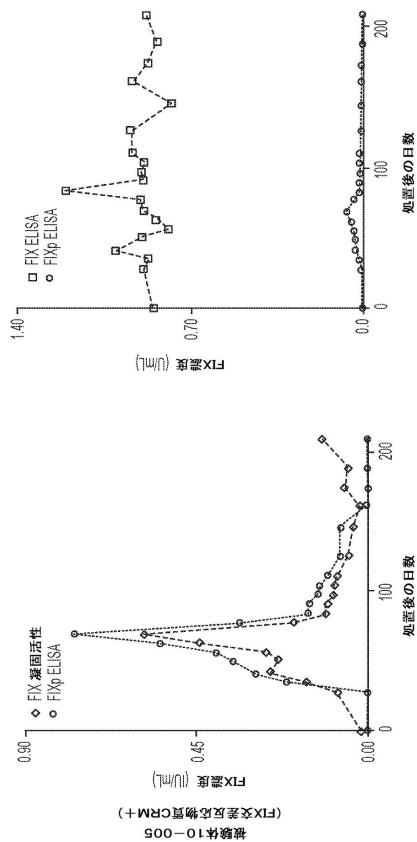


FIGURE 31

【図 3 2】

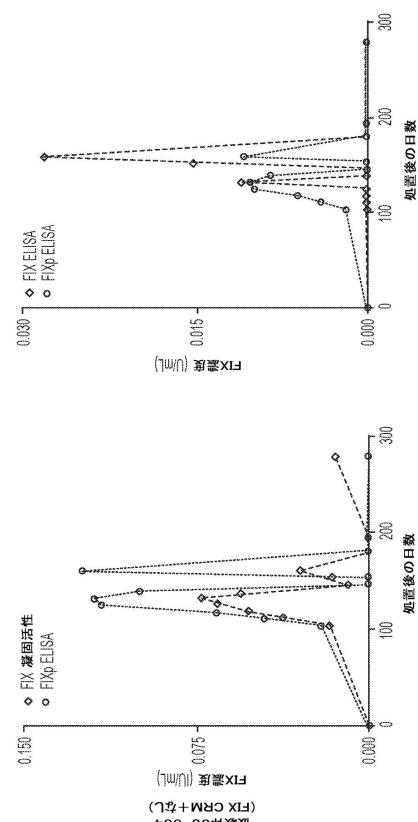


FIGURE 32

## 【配列表】

0007084878000001.app

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

	F I
C 1 2 N	1/21 (2006.01)
C 1 2 N	5/10 (2006.01)
G 0 1 N	33/573 (2006.01)
C 0 7 K	16/46 (2006.01)
C 0 7 K	19/00 (2006.01)
C 0 7 K	14/745 (2006.01)
C 0 7 K	17/00 (2006.01)
C 0 7 K	7/06 (2006.01)
C 0 7 K	7/08 (2006.01)
	C 1 2 N      1/21
	C 1 2 N      5/10
	G 0 1 N      33/573      A
	C 0 7 K      16/46
	C 0 7 K      19/00
	C 0 7 K      14/745
	C 0 7 K      17/00
	C 0 7 K      7/06
	C 0 7 K      7/08

## (33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

1 7

## (72)発明者 パフリンガー, ロベルト

オーストリア国 アー - 1 2 2 0 ウィーン, テラーガッセ 4 2 / 4 / 2 6

## (72)発明者 ロッテンシュタイナー, ハンスペーター

オーストリア国 アー - 1 0 2 0 ウィーン, ハイドガッセ 1 0 / 1 7

## (72)発明者 ヴェーバー, アルフレート

オーストリア国 アー - 1 2 1 0 ウィーン, スカラウプシュトラーセ 2 4 / 4 2 / 8

## (72)発明者 エンゲルマイアー, アンドレア

オーストリア国 アー - 1 1 5 0 ウィーン, ベネディクト シエリンガーガッセ 1 7 / 2 5

審査官 野村 英雄

## (56)参考文献

CRUDELE, J.M., et al. , "AAV liver expression of FIX-Padua prevents and eradicates FIX inhibitor without increasing thrombogenicity in hemophilia B dogs and mice." , BLOOD , 2015年03月05日 , Vol.125, No.10 , pp.1553-1561 , doi: 10.1182/blood-2014-07-588194

NAIR, N., et al. , "Computationally designed liver-specific transcriptional modules and hyper active factor IX improve hepatic gene therapy." , BLOOD , 2014年05月15日 , Vol.123, No, 20 , pp.3195-3199 , doi: 10.1182/blood-2013-10-534032

KOENDERMAN, J., et al. , "Factor IX-R338L (Factor IX Padua) screening in a Dutch population of sibpairs with early onset venous thromboembolism." , THROMBOSIS RESEARCH , 2011年 , Vol.128, No.6 , p.603 , doi: 10.1016/j.thromres.2011.07.009

## (58)調査した分野 (Int.Cl. , D B名)

C 1 2 N    1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 0 7 K    1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

P u b M e d