

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-158564

(P2017-158564A)

(43) 公開日 平成29年9月14日(2017.9.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B O 6 5
C O 7 K 16/36 (2006.01)	C O 7 K 16/36	4 C O 8 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 H O 4 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	

審査請求 有 請求項の数 19 O L 外国語出願 (全 58 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-80020 (P2017-80020)	(71) 出願人	509087759
(22) 出願日	平成29年4月13日 (2017.4.13)		ヤンセン バイオテック, インコーポレー
(62) 分割の表示	特願2013-558088 (P2013-558088)		テッド
原出願日	平成24年3月12日 (2012.3.12)		アメリカ合衆国ペンシルベニア州1904
(31) 優先権主張番号	61/452,674		4 ホーシヤム・リッジビュードライブ80
(32) 優先日	平成23年3月15日 (2011.3.15)	(74) 代理人	100092783
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 小林 浩
		(74) 代理人	100093676
			弁理士 小林 純子
		(74) 代理人	100120134
			弁理士 大森 規雄
		(74) 代理人	100153693
			弁理士 岩田 耕一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト組織因子抗体及びその使用

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】組織因子(凝固因子F3)シグナル伝達を阻害することができるが、組織因子に対する第V I I因子結合又は第F X因子結合を妨げず、かつ凝固時間を長引かせない抗体であり、患者の止血を防げずに、腫瘍細胞に対する発癌、転移、血管生成及び抗アポトーシス機能を阻害できるTF結合抗体のヒト化形態の提供。

【解決手段】3つの重鎖CDR配列であるH-CDR1、H-CDR2及びH-CDR3、かつ、3つの軽鎖CDR配列であるL-CDR1、L-CDR2及びL-CDR3のそれぞれが特定のアミノ酸配列である単離された抗組織因子抗体。組織因子結合に関して、F V I I a複合体と競合せず、TF-V I I a複合体の凝固促活性、アミド分解活性を実質的に阻外せず、MDA-MB-231細胞からのサイトカインIL-8放出によって測定される、TF-V I I aによって媒介されるシグナル伝達を阻害する、抗組織因子である、抗体。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト組織因子への結合に関してマウス抗体 10H10 と競合する単離された抗体であって、前記抗体結合ドメインが、ヒトフレームワーク (FR) 領域に適合され、かつ FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 の構造を有し、前記 FR アミノ酸配列が、IMGT データベースで認証されているヒト生殖系列遺伝子配列によってコードされたアミノ酸配列から変更されず、CDR 配列が、配列番号 6 ~ 11 及び 27 で表されるマウス 10H10 CDR と 50 % 以上の配列同一性を有する、単離された抗体。

【請求項 2】

前記抗体が、組織因子結合に関して FVIIa と競合せず、かつ、MDA-MB-231 細胞からのサイトカイン IL-8 放出によって測定すると、TF-VIIa 複合体の凝固促進活性、アミド分解活性を実質的に阻害しないが、TF-VIIa によって媒介されるシグナル伝達を阻害する、請求項 1 に記載の単離された抗体。

10

【請求項 3】

前記 CDR 配列の 1 つ又は 2 つ以上が、配列番号 6 ~ 11 及び 27 の配列から選択される、請求項 2 に記載の抗体。

【請求項 4】

前記 3 つの軽鎖 CDR 配列である L-CDR1、L-CDR2、及び L-CDR3 がそれぞれ、配列番号 9 ~ 11 によって表わされる、請求項 3 に記載の抗体。

【請求項 5】

前記 3 つの重鎖 CDR 配列である H-CDR1、H-CDR2、及び H-CDR3 がそれぞれ、配列番号 6 ~ 8 によって、又はそれぞれ配列番号 6、27、及び 8 によって表わされる、請求項 3 に記載の抗体。

20

【請求項 6】

L-CDR1、L-CDR2、及び L-CDR3 がそれぞれ、配列番号 9 ~ 11 によって表わされ、前記 3 つの重鎖 CDR 配列である H-CDR1、H-CDR2、及び H-CDR3 がそれぞれ、配列番号 6 ~ 8 によって、又はそれぞれ配列番号 6、27 及び 8 によって表わされる、請求項 3 に記載の抗体。

【請求項 7】

前記ヒト HC 可変領域フレームワークが、前記 IMGT データベースによって表わされるIGHV ファミリーの 1、3、又は 5 メンバー由来である、請求項 1 に記載の抗体。

30

【請求項 8】

配列番号 12 ~ 21 から選択される HC 可変領域を含む、請求項 7 に記載の抗体。

【請求項 9】

前記ヒト LC 可変領域フレームワークが、ヒト IGKV ファミリー 2 又は 4 メンバー由来である、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 10】

配列番号 22 ~ 26 から選択される LC 可変領域を含む、請求項 9 に記載の抗体。

【請求項 11】

前記ヒト HC 可変領域フレームワークが、IGHV5 及び IGKV2 から選択されるヒト生殖系列遺伝子ファミリー由来である、請求項 1 に記載の抗体。

40

【請求項 12】

配列番号 12 ~ 21 から選択される HC 可変領域と、配列番号 22 ~ 26 から選択されるヒト LC 可変領域と、を含む、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 13】

配列番号 8 の H-CDR3 と、配列番号 6、62 ~ 83 から選択される配列を有する H-CDR1 と、配列番号 7、27、及び 84 ~ 107 から選択される配列を有する H-CDR2 と、任意に IG V J 4 (配列番号 60) 又はその変異体から選択される HC FR4 領域と、を有する HC 可変領域を含む、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 14】

50

配列番号 9、108～116 から選択される配列を有する L - C D R 1 と、配列番号 10 及び 117～120 から選択される配列を有する L - C D R 2 と、配列番号 11 及び 121～128 から選択される配列を有する L - C D R 3 と、任意に I G K J 2 (配列番号 61) 又はその変異体から選択される L C F R 4 領域と、を有する L C 可変領域を含む、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 15】

配列番号 8 の H - C D R 3 と、配列番号 6、62～83 から選択される配列を有する H - C D R 1 と、配列番号 7、27、及び 84～107 から選択される配列を有する H - C D R 2 と、任意に I G V J 4 (配列番号 60) 又はその変異体から選択される H C F R 4 領域と、を有する H C 可変領域、並びに、配列番号 9、108～116 から選択される配列を有する L - C D R 1 と、配列番号 10 及び 117～120 から選択される配列を有する L - C D R 2 と、配列番号 11 及び 121～128 から選択される配列を有する L - C D R 3 と、任意に I G K J 2 (配列番号 61) 又はその変異体から選択される L C F R 4 領域と、を有する L C 可変ドメインを含む、請求項 1 に記載の抗体。

10

【請求項 16】

前記 H C ヒトフレームワーク配列が、I G H V 5 __ a 由来であり、前記 H C 可変領域が、配列番号 19、129～155 から選択される配列を有する、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 17】

前記 L C ヒト F R 配列が、I G K V 2 D 4 0 __ O 1 由来であり、前記 L C 可変領域が、配列番号 23、157～164 から選択される配列を有する、請求項 1 に記載の抗体。

20

【請求項 18】

前記 H C ヒトフレームワーク配列が、I G H V 5 __ a 由来であり、前記 H C 可変領域が、配列番号 19、129～155 から選択される配列を有し、前記 L C ヒト F R 配列が、I G K V 2 D 4 0 __ O 1 由来であり、前記 L C 可変ドメインが、配列番号 23、157～164 から選択される配列を有する、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 19】

I G H V 5 __ a フレームワーク由来の、C D R でない位置と定義される結合ドメインを有し、H - C D R 3 が、配列 S G Y Y G N S G F A Y (配列番号 8) を有し、H - C D R - 1 及び / 又は H - C D R - 2 位置の配列が、下記式：

H - C D R 1 G Y T F X₁ X₂ X₃ W I E (I) (配列番号 83)

30

(式中、X₁ は、A、D、G、I、L、N、P、R、S、T、V、及び Y から選択され、X₂ は、A、P、S、及び T から選択され、X₃ は、F、H、及び Y から選択され、又は配列は G F T F I T Y W I A (配列番号 81) であってもよい)；及び

H - C D R 2 D I X₁ P G X₂ G X₃ T X₄ (I I) (配列番号 107)

(式中、X₁ は I 及び L から選択され、X₂ は S 及び T から選択され、X₃ は、A、F、H、及び w から選択され、X₄ は、D、H、I、L、及び N から選択され、又は、H - C D R 2 は D I L P A S S S T N (配列番号 105) である) によって与えられる、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 20】

結合ドメインを有し、前記 C D R でない位置が、I G K V 2 D 4 0 __ O 1 フレームワーク由来であり、L - C D R - 1 及び / 又は L C D R - 2、並びに L - C D R 3 の配列が、下記式：

40

L - C D R 1 K S S Q S L L X₁ X₂ X₃ X₄ Q X₅ N Y L T (I I I)
(配列番号 116)

(式中、X₁ は、F、P、S、T、W、及び Y から選択され、X₂ は、F、S、T、R、及び V から選択され、X₃ は、A、G、P、S、W、Y、及び V から選択され、X₄ は、G、N、及び T から選択され、X₅ は、K、R、及び S から選択される)；

L - C D R 2 X₁ A S T R X₂ S (I V) (配列番号 120)

(式中、X₁ は、H 及び W から選択され、X₂ は、D、E、及び S から選択される)；

L - C D R 3 Q N D X₁ X₂ X₃ P X₄ T (V) (配列番号 128)

50

(式中、X 1 は、D、F、及び L から選択され、X 2 は、S、T、及び Y から選択され、X 3 は、W 及び Y から選択され、X 4 は、L 及び M から選択される) によって与えられる配列を有する、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 2 1】

疾患を患う被験者を治療する方法であって、TF 発現、及び該 TF 発現により生じる局所生物活性が、治療を必要としている被験者に、請求項 1、3、19、又は 20 に記載の抗体を投与することを含む、治療すべき前記疾患に直接又は間接的に関連している、方法。

【請求項 2 2】

前記疾患が癌である、請求項 2 1 に記載の方法。

10

【請求項 2 3】

前記癌が、原発固形腫瘍、転移癌、細胞腫、腺癌、メラノーマ、液性腫瘍、リンパ腫、白血病、骨髄腫、軟部組織癌、悪性腫瘍、骨肉腫、胸腺腫、リンパ肉腫、線維肉腫、平滑筋肉腫、脂肪腫、神経膠芽腫、星状細胞腫 (astrosarcoma)、前立腺、乳腺、卵巣、胃、脾臓、喉頭、食道、精巣、肝臓、耳下腺、胆道、結腸、直腸、頸、子宮、子宮内膜、甲状腺、肺、腎臓、又は膀胱の癌から選択される、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記疾患が、良性腫瘍、血管腫、聴神経腫瘍、神経線維腫、トラコーマ、及び化膿性肉芽腫；動脈硬化斑；眼球血管新生疾患、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、黄斑変性症、角膜移植片拒絶反応、血管新生緑内障、水晶体後線維増殖、ルベオース、網膜芽細胞腫、ブドウ膜炎及び眼の翼状片 (異常な血管成長)；リウマチ性関節炎；乾癬；創傷治癒遅延；子宮内膜症；脈管形成；肉芽形成；肥厚性瘢痕 (ケロイド)；癒着不能骨折；強皮症；トラコーマ；血管接着；心筋血管新生；冠側副；脳側副；動静脈奇形；虚血肢血管新生；オースラー・ウェーバー症候群；ブランク血管新生；毛細血管拡張症；血友病関節症；血管線維腫；線維筋性形成異常；創傷肉芽形成；クローン病；及びアテローム性動脈硬化症から選択される、請求項 2 1 に記載の方法。

20

【請求項 2 5】

薬学的に許容可能な調製物中に請求項 1、3、19、又は 20 に記載の抗体を含む、被験者を治療するのに有用な医薬組成物。

【請求項 2 6】

安定な形態の請求項 1、3、19、又は 20 に記載の抗体と、使用説明書と、を含む、キット。

30

【請求項 2 7】

請求項 1、3、19、又は 20 に記載の抗体の前記抗体結合ドメインの 1 つ以上をコードする、単離された核酸。

【請求項 2 8】

請求項 2 7 に記載の少なくとも 1 つのポリヌクレオチドを含む、ベクター。

【請求項 2 9】

請求項 2 8 に記載のベクターを含む、宿主細胞。

40

【請求項 3 0】

I g G 1 又は I g G 4 アイソタイプを有する、請求項 1、3、19、又は 20 に記載の単離された抗体又は断片。

【請求項 3 1】

F c 領域がヒト I g G 1 アイソタイプを含み、K a b a t 位置 239 及び 332 (これらは配列番号 167 の 242 及び 335 である) が、該 F c 領域の変異により、野生型残基 S 及び D から、D 及び E に改変されている、請求項 3 0 に記載の単離された抗体又は断片。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

50

(関連出願の相互参照)

本出願は、2011年3月15日に提出された米国特許出願第61/452,674号に対する優先権を請求し、この内容は参照することによりその全体として本明細書に組み込まれる。

【0002】

(発明の分野)

本発明は、組織因子介在血液凝固を阻害することなく、腫瘍細胞などの血管外組織上に存在する抗原であるヒト組織因子に結合する、ヒトに適合した抗体にする。本発明はまた、ヒト組織因子の存在及び受容体機能に関連した、癌などの疾患を治療するための抗体の使用方法に関する。

10

【背景技術】

【0003】

凝固因子III(F3)、組織トロンボプラスチン、又はCD142としても知られる組織因子(TF)は、2つのフィブロネクチンIII型ドメインを含む219アミノ酸の細胞外領域と、リン酸化され得る1つのセリン残基を有する短い細胞内ドメインとを有する膜貫通糖タンパク質である。TFは、FVII/FVIIaの細胞受容体である。

【0004】

TFは、細胞受容体の形で、正常脳、肺、及び胎盤では高レベル、並びに脾臓、胸腺、骨格筋、及び肝臓では低レベルの組織特異的分布を呈する。TFはまた、細胞由来微小粒子中に、及び選択的スプライシング可溶型として見出される。正常組織における発現に加え、TFは、最も主要な腫瘍型において、及び多くの腫瘍由来の細胞株において過剰発現されることが報告されている(Ruf W J Thromb Haemost . 5 : 1584 ~ 1587 , 2007 ; Millsomら、Arterioscler Thromb Vasc Biol . 29 : 2005 ~ 2014 , 2009)。

20

【0005】

損傷に応答した血清タンパク質の凝固は、損傷に対する重要な生理応答である。血液が、コラーゲン(内因性経路)及び組織因子(外因性経路)を含むタンパク質に暴露されると、血小板及び血漿タンパクであるフィブリノゲン(凝固因子)への変化を起こす。血管損傷の後、第VII因子(FVII)は循環を離れ、組織因子保有細胞(間質線維芽細胞及び白血球)上に発現される組織因子(TF)と接触し、活性化されたTF-FVIIa複合体を形成する。TF-FVIIaは、第IX因子(FIX)及び第X因子(FX)を活性化する。FVIIは、TFによってアロステリックに活性化され、かつトロンビン、FXIa、プラスミン、FXII及びFXaによって活性化され得る。TF-FVIIaは、FXaと共に三元複合体を形成する。

30

【0006】

非血管細胞によって発現される組織因子(TF)は、血液凝固を活性化することによって止血に重要な役割を担う。TFは、止血と異なるプロセスに更に関与し、その上にTFが発現される細胞表面の機能に直接関連する。血管及び非血管細胞上の凝固プロテアーゼのTF依存性アセンブリは、Gタンパク質共役受容体であるプロテアーゼ活性化受容体(PAR)を活性化する。したがって、TF:FVIIa複合体は、PAR、主にPAR2を介して細胞シグナルを誘発し(Camererら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97 : 5255 ~ 5260 , 2000 ; Riewald & Ruf , Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 : 7742 ~ 7747 , 2001 ; Rufら、J Thromb Haemost 1 : 1495 ~ 4503 , 2003 ; Chenら、Thromb Haemost 86 : 334 ~ 45 , 2001)、腫瘍形成、血管新生、腫瘍進行、及び転移に寄与することができる。

40

【0007】

三元複合体TF/FVIIa/FXaは、TF:FVIIa複合体がFXに作用することによって直接的に、又は、FXをFXaに変換することができるTF:FVIIaによるFIXとFIXaの変換後に間接的に形成される。TF/FVIIa/FXa複合体の形成

50

は、シグナル伝達を引き起こすか、又はPAR 1～4などの他の受容体を活性化することができる。TF/FVIIa/FXa複合体の形成は、インターロイキン-8(IL-8)の誘導をもたらす、腫瘍細胞移動を刺激することができる(Hjortorら、血液103:3029～3037, 2004)。PAR 1及びPAR 2は共に、腫瘍転移に関与するが(Shiら、Mol Cancer Res. 2:395～402, 2004)、活性化された二元及び三元複合体(TF-VIIa及びTF-VIIa-FXa)は、同様に細胞シグナル伝達をもたらすPAR 2の活性化因子である(Rao & Pendurthi, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 25:47～56, 2005)。したがって、組織因子の発癌性の役割を、腫瘍の移動、溢血、及び転移メカニズムに関与することもまた長い間疑われてきた凝血の役割から分離させることができるかどうかを決めることは興味深かった。

10

【0008】

リガンド結合部位の機能的側面及び免疫学的側面を研究するために、組織因子に対する、Morrissey(1988, Thromb Res 52(3):247～261; US5223427)及びMagdolen(1996 Biol Chem 379:157～165)に記載されているもののようなモノクローナル抗体が用いられてきた。TF-VIIa複合体を形成する又は維持するTFの能力を妨げることによって、又はFXを活性化する複合体の能力を阻害することによって、血栓事象を阻害するために、組織因子に結合することが可能なモノクローナル抗体を用いることができる。組織因子に結合し、かつ凝固を阻害しない抗体もまた知られている。第VIIa因子開始TFシグナル伝達を阻害するが、凝固を阻害しない、抗体10H10などの抗体もまた記載されており(Ahamedら、2006 Proc Natl Acad Sci USA 103(38):13932～13937)、かかる抗体は、かかる活性を有する剤の、固形腫瘍の治療における役割及び実用性を研究する機会を提供してきた(Versteegeら、2008 Blood 111(1):190～199)。Rufらは、国際公開特許第2007056352A3号において、患者のうっ血を妨げずに、組織因子シグナル伝達を阻害するための方法及び組成物を開示している。

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

癌の進行は多角的プロセスであるので、患者の止血を妨げないと同時に、腫瘍細胞に対する発癌、転移、血管生成、及び抗アポトーシス機能を阻害することができるTF結合抗体である治療候補物質が望ましい。

30

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明は、マウス抗体10H10の結合エピトープを保持する、ヒトの治療法として使用される、ヒト適合坑ヒト組織因子特異抗体を提供し、その抗体は、FVIIa結合に関して組織因子と競合せず、したがって、TF-VIIa複合体の凝固促進活性、アミド分解活性を実質的に阻害しないが、TF-VIIaによって媒介されるシグナル伝達、及びサイトカインIL-8放出などの下流の発癌作用を阻害する。

40

【0011】

ヒトに適合した本発明の抗体は、ヒトIgG可変ドメインフレームワークと、10H10マウス抗体CDR配列の配列を参照することによって決定され、かつ配列番号6～11及び27で表されるCDR変異体残基との組み合わせで構築される。ヒトフレームワークFR1及びFR2及びFR3と、CDR及びCDR変異体と、FR4との組み合わせが提供され、これらの組み合わせは、抗体結合ドメインの、マウス抗体10H10の免疫特異性とのアセンブリを可能にする。本発明の一実施形態では、配列番号6～11で表される、又は配列番号6、8～11、及び27で表されるグループとしての6つのCDR配列は、ヒトIgG可変ドメインのCDRでない位置と定義され、ヒトTFに対する10H10の結合親和性が保持されるように選択される、ヒト生殖細胞系FRと組み合わせられる。一

50

態様では、ヒトHC可変領域FRは、IGHVデータベースによって表わされるIGHV遺伝子ファミリーの1、3、又は5メンバー由来である。一態様では、ヒトLC可変領域FRは、ヒトIGKV遺伝子ファミリーの2又は4メンバー由来である。一実施形態では、抗体Fv(LC可変領域と対をなすHC可変領域)は、配列番号12~21から選択されるHC可変領域と、配列番号22~26から選択されるLC可変ドメインとを含む。

【0012】

特定の実施形態では、抗体Fv(LC可変領域と対をなすHC可変領域)を形成するヒトFRは、IGHV5と、IGKV2 FRとを含む。本発明の抗体は、配列番号8のH-CDR3、配列番号6、及び62~83から選択される配列を有するH-CDR1、配列番号7、27、及び84~107から選択される配列を有するH-CDR2、並びに、任意にIGVJ4(配列番号60)又はその変異体から選択されるHC FR4領域を有するHC可変ドメインを含む。本発明の抗体は、配列番号9、108~116から選択される配列を有するL-CDR1、配列番号10及び117~120から選択される配列を有するL-CDR2、配列番号11及び121~128から選択される配列を有するL-CDR3、並びに、任意にIGKJ2(配列番号61)又はその変異体から選択されるLC FR4領域を有するLC可変ドメインを有する抗体を更に含む。特定の実施形態では、ヒトフレームワーク配列は、IGHV5__aに由来し、形成された可変ドメインは、配列番号19、129~155から選択される配列を含む。別の実施形態では、ヒトフレームワーク配列は、IGKV2D40__O1由来であり、形成された可変ドメインは、配列番号23、156~163から選択される配列を含む。

【0013】

本発明の抗体は、IGHV5__aフレームワーク由来の、CDRでない位置と定義される結合ドメインを有し、H-CDR3が、配列SGYYGNSGFAY(配列番号8)を有し、H-CDR-1位置の配列が、下記式：

H-CDR1 GYTFX₁X₂X₃WIE (I) (配列番号83)

(式中、X₁は、A、D、G、I、L、N、P、R、S、T、V、及びYから選択され、X₂は、A、P、S、及びTから選択され、X₃は、F、H、及びYから選択され、又は配列はGFTFITYWIA(配列番号81)であってもよい)；及びH-CDR2位置の配列が次式によって与えられ：

H-CDR2 DIX₁PGX₂GX₃TX₄ (II) (配列番号107)

(式中、X₁はI及びLから選択され、X₂はS及びTから選択され、X₃は、A、F、H、及びwから選択され、X₄は、D、H、I、L、及びNから選択され；ただし、H-CDR2がDILPASSSTN(配列番号105)であるH189は除く)によって与えられる、抗体としての一形態で表されることができる。

【0014】

本発明の抗体は、IGKV2D40__O1フレームワーク由来の、CDRでない位置と定義される結合ドメインを有し、L-CDR-1及び/又はLCDR-2、並びにL-CDR3の配列が、下記式：

L-CDR1 KSSQSLLX₁X₂X₃X₄Q X₅NYLT (III) (配列番号116)

(式中、X₁は、F、P、S、T、W、及びYから選択され、X₂は、F、S、T、R、及びVから選択され、X₃は、A、G、P、S、W、Y、及びVから選択され、X₄は、G、N、及びTから選択され、X₅は、K、R、及びSから選択される)；

L-CDR2 X₁ASTRX₂S (IV) (配列番号120)

(式中、X₁はH及びWから選択され、X₂は、D、E、及びSから選択される)；

L-CDR3 QNDX₁X₂X₃PX₄T (V) (配列番号128)

(式中、X₁は、D、F、及びLから選択され、X₂は、S、T、及びYから選択され、X₃は、W及びYから選択され、X₄は、L及びMから選択される)によって与えられる配列を有する、抗体として表わされる。

【 0 0 1 5 】

こうして、抗体重鎖及び軽鎖 C D R 残基は、実質的に 1 0 H 1 0 のマウス C D R から改変される。例えば、上述の説明によると、抗体重鎖は、1 0 H 1 0 のマウス C D R と、7 0 % (C D R 1 で 3 / 1 0 の残基が変更された場合) 及び 6 0 % (C D R 2 で 4 / 1 0 の残基が変更された場合) だけ類似し得る (C D R 3 は変更されない場合)。軽鎖 C D R 残基は、1 0 H 1 0 のマウス C D R と、7 1 % (5 / 1 7 が変更された場合)、(7 1 %) (2 / 7 が変更された場合)、又は 5 5 % (4 / 9 が変更された場合) だけ類似する。

【 0 0 1 6 】

本発明は、ヒト組織因子に対する結合で競合し、したがって、マウス 1 0 H 1 0 抗体と実質的に同じヒト T F - E C D 上のエピトープと結合する、ヒトに適合した抗体を更に提供 10
する。本発明は、T F 発現、及びその T F 発現により生じる局所生物活性が、治療すべき疾患に直接又は間接的に関連している疾患を患う被験者を治療するために、かかる抗体を使用する方法を更に提供する。

【 0 0 1 7 】

本発明は、抗体、並びに抗体の薬学的に許容可能な調製物を調製する方法、調製物を含む容器、及び、本発明の抗体が被験者を治療するために使用する方法に利用される、その容器を含むキット、を更に提供する。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 8 】

【 図 1 】 1 0 H 1 0 F a b の共結晶の X 線回折分析によって、又はヒト適合変異体 (M 20
1 5 9 3 F a b) 及びヒト T F - E C D 残基 5 ~ 2 0 8 を用いて明らかにされたエピトープを示し、M 1 5 9 3 H - C D R 1 (T 3 1 P) 及び H C D R - 2 (S 5 7 F) において改変された 2 つの接触残基が示されている。

【 図 2 】 ヒト (配列番号 1、1 ~ 2 1 9)、カニクイザル (配列番号 2、1 ~ 2 2 0)、及びマウス T F - E C D (配列番号 3、1 ~ 2 2 1) のアミノ酸残基のアライメントであり、マウス抗体 T F 8 - 5 G 9 (H u a n g ら、1 9 9 8 J M o l B i o l 2 7 5 : 8 7 3 ~ 9 4) 及び 1 0 H 1 0 が接触する残基位置を示しており、これら残基は、凝固因子 F V I I / V I I a 及び F X が接触することで知られている。

【 図 3 】 5 G 9 及び 1 0 H 1 0 のパラトープ、並びに凝固因子 F V I I 及び F X が接触して示されている領域を有する、ヒト T F - E C D の三次元映像を示し、残基 L 1 0 4 及び 30
T 1 9 7 のみに 1 0 H 1 0 及び F X の両方が接触している。

【 図 4 】 マウス抗体 1 0 H 1 0 の重鎖 (上方のアライメント) 及び軽鎖 (下方のアライメント) 可変ドメインのアミノ酸配列 (それぞれ配列番号 4 及び 5)、抗体 M 5 9 のヒトフレームワーク適合配列 (それぞれ配列番号 1 9 及び 2 3)、並びに 2 つの選択された親和性成熟可変ドメイン配列 H 1 1 6 (配列番号 1 3 3) 及び H 1 7 1 (配列番号 1 3 9) のアライメントを示す。

【 図 5 】 アイソタイプ対照 B 3 7 と比較した、M D B - M B - 2 3 1 乳癌細胞による 0 . 2 4 µ g / m L での、F V I I a 誘発 I L - 8 放出に対する 2 7 個の親和性成熟 m A b による相対的阻害百分率を示す。

【 図 6 】 免疫無防備状態のマウスに M D A - M B 2 3 1 腫瘍細胞を埋め込んだ後の、数日にわたる腫瘍容積のプロットを示し、M 1 5 9 3 を投与された群は、定着腫瘍の成長を低減させた。 40

【 図 7 】 免疫無防備状態のマウスに A 4 3 1 ヒト扁平上皮癌細胞を埋め込んだ後の、数日にわたる腫瘍容積のプロットを示し、M 1 5 9 3 を投与された群は、定着腫瘍の成長を低減させた。

【 図 8 】 マウス可変ドメインヒト I g G 1 (M 1)、位置 2 3 4 及び 2 3 5 がアラニン置換されているマウス可変ドメインヒト I g G 4、未修飾 C H O で産生された野生型 I g G 1 としての M 1 5 9 3、低フコース含有量でグリカンを生成するように選択された C H O 株で産生された M 1 5 9 3 - L F、並びに S 2 3 9 D 及び I 3 3 2 E に K a b a t 位置置換を有する M 1 5 9 3 - D E に関する、ヒト P B M C による標的細胞溶解 (M D A - M B 50

2 3 1 細胞) のパーセンテージと、M A b 濃度とを対比したプロットを示す。

【 0 0 1 9 】

配列リストの説明 (1)

配列リストの説明

配列番号:	説明	特徴又は起源
1	ヒト組織因子の成熟鎖	ECD=1-219
2	カニクイザルの組織因子ECD	ECDのみ1-220
3	ハツカネズミの組織因子(P20352)	ECD=1-221
4	10H10重鎖(HC)可変領域	
5	10H10軽鎖(LC)可変領域	
6	10H10のH-CDR1	
7	10H10のH-CDR2	
8	10H10のH-CDR3	
9	10H10のL-CDR1	
10	10H10のL-CDR2	
11	10H10のL-CDR3	
12	H15	IGHV5-a
13	H16	IGHV1-46
14	H17	IGHV1-3
15	H18	IGHV3-74
16	H19	IGHV1-69
17	H20	IGHV1-18
18	H21	IGHV1-f
19	H22	s1_IGHV5-a
20	H23	s1_IGHV1-69
21	H24	s1_IGHV1-f
22	L2	IGKV4-1_B3
23	L3	IGKV2D40_O1
24	L4	IGKV2D-28_A3
25	L5	IGKV2D-29_A2
26	L7	IGKV2-24_A23
27	H22、H23、及びH24のH-CDR2	マウス、Kabat-7
28	H15及びH22のFR1	IGHV5-a
29	H16、H17、及びH20のFR1	IGHV1-46、IGHV1-3、IGHV1-18
30	H18のFR1	IGHV3-74
31	H19及びH23のFR1	IGHV1-69
32	H21及びH24のFR1	

10

20

30

40

【 0 0 2 0 】

配列リストの説明 (2)

(上記表の続き)

配列番号:	説明	特徴又は起源
33	H15及びH22のFR2	IGHV5-a
34	H16、H19、H20、及びH23_s1_IGHV1-69のFR2	IGHV1-46、IGHV1-69のFR2 IGHV1-18、及びs1_IGHV1-69
35	H17のFR2	IGHV1-3
36	H18のFR2	IGHV3-74
37	H21及びH24のFR2	IGHV1-f
38	H15のFR3	IGHV5-a
39	H16のFR3	IGHV1-46
40	H17のFR3	IGHV1-3
41	H18のFR3	IGHV3-74
42	H19のFR3	IGHV1-69
43	H20のFR3	IGHV1-18
44	H21のFR3	IGHV1-f
45	H22のFR3	s1_IGHV5-a
46	H23のFR3	s1_IGHV1-69_
47	H24のFR3	s1_IGHV1-f
48	L2のFR1	IGKV4-1_B3
49	L3のFR1	IGKV2D40_O1
50	L4のFR1	IGKV2D-28_A3
51	L5のFR1	IGKV2D-29_A2
52	L7のFR1	IGKV2-24_A23
53	L2のFR2	IGKV4-1_B3
54	L3 & L4のFR2	IGKV2D-28_A3
55	L5のFR2	IGKV2D-29_A2
56	L7のFR2	IGKV2-24_A23
57	L2のFR3	IGKV4-1_B3
58	L3、L4、及びL5のFR3	IGKV2D40_O1、IGKV2D-28_A3、 IGKV2D-29_A2
59	L7のFR3	IGKV2-24_A23
60	FR4 HC	IGHJ4
61	FR4 LC	IGKJ2
62	M1602のH106のH-CDR1	
63	M1587のH116のH-CDR1	
64	M1590のH117のH-CDR1	
65	M1591のH122のH-CDR1	
66	M1612のH133のH-CDR1	
67	M1597のH134のH-CDR1	

10

20

30

40

【 0 0 2 1 】

配列リストの説明 (3)

(上記表の続き)

配列番号:	説明	特徴又は起源
68	M1613のH136、及びM1596のH185のH-CDR1	
69	M1613のH136のH-CDR1	
70	M1585のH139のH-CDR1	
71	M1594のH158のH-CDR1	
72	M1595のH160のH-CDR1	M1595
73	M1586のH164のH-CDR1	
74	M1592のH165のH-CDR1	
75	M1605のH168のH-CDR1	
76	M1593のH171のH-CDR1	
77	M1584のH173のH-CDR1	
78	M1588のH179のH-CDR1	
79	M1606のH181のH-CDR1	
80	M1589のH187のH-CDR1	
81	M1607のH189のH-CDR1	
82	H177、H130、H105、及びH128のH-CDR1	
83	H-CDR1変異体	
84	M1602のH106のH-CDR2	
85	M1610のH115のH-CDR2	
86	M1587のH116のH-CDR2	
87	M1590のH117のH-CDR2	
88	M1611のH128のH-CDR2	
89	M1599のH130のH-CDR2	
90	M1597のH134のH-CDR2	
91	M1613のH136のH-CDR2	
92	M1598のH137のH-CDR2	
93	M1604のH138のH-CDR2	
94	M1595のH160のH-CDR2	
95	M1586のH164のH-CDR2	
96	M1592のH165のH-CDR2	
97	M1605のH168のH-CDR2	
98	M1593のH171のH-CDR2	
99	M1584のH173のH-CDR2	
100	M1583のH177のH-CDR2	
101	M1588のH179のH-CDR2	
102	M1606のH181のH-CDR2	
103	M1596のH185のH-CDR2	
104	M1589のH187のH-CDR2	
105	M1607のH189のH-CDR2	
106	M1608のH207のH-CDR2	
107	H-CDR2変異体	

10

20

30

40

【 0 0 2 2 】

配列リストの説明 (4)

(上記表の続き)

配列番号:	説明	特徴又は起源
108	M1646 & M1638両方のL138のL-CDR1	
109	M1651 & M1643両方のL162のL-CDR1	
110	M1652 & M1644両方のL225のL-CDR1	
111	M1653 & M1645両方のL283のL-CDR1	
112	M1647 & M1639両方のL320のL-CDR1	
113	M1648 & M1640両方のL327のL-CDR1	
114	M1649 & M1641両方のL335のL-CDR1	
115	M1650 & M1642両方のL369のL-CDR1	
116	L-CDR1変異体	
117	M1646 & M1638両方のL138のL-CDR2	
118	M1647 & M1639両方のL320のL-CDR2	
119	M1649 & M1641両方のL335のL-CDR2	
120	L-CDR2変異体	
121	M1651 & M1643両方のL162のL-CDR3	
122	M1652 & M1644両方のL225のL-CDR3	
123	M1653 & M1645両方のL283のL-CDR3	
124	M1647 & M1639両方のL320のL-CDR3	
125	M1648 & M1640両方のL327のL-CDR3	
126	M1649 & M1641両方のL335のL-CDR3	
127	M1650 & M1642両方のL369のL-CDR3	
128	L-CDR3の変異体	
129	H177	
130	H173	
131	H139	
132	H164	
133	H116	
134	H179	
135	H187	
136	H117	
137	H122	
138	H165	
139	H171	
140	H158	

10

20

30

40

【 0 0 2 3 】

配列リストの説明 (5)

(上記表の続き)

配列番号:	説明	特徴又は起源
141	H160	
142	H185	
143	H134	
144	H137	
145	H130	
146	H105	
147	H106	
148	H138	
149	H168	
150	H181	
151	H189	
152	H207	
153	H115	
154	H128	
155	H133	
156	H136	
157	L138	
158	L320	
159	L327	
160	L335	
161	L369	
162	L162	
163	L225	
164	L283	
165	M1593完全長軽鎖	
166	M1593完全長重鎖	
167	M1593-DE完全長重鎖	

10

20

30

40

【発明を実施するための形態】

【0024】

略語

TF = 組織因子、huTF = ヒト組織因子、muTF = マウス組織因子、cynoTF = カニクイザル組織因子、TF - FVIIa = 組織因子 - 第VIIa因子複合体、TF / FVIIa = 組織因子 - 第VIIa因子複合体、HC = 重鎖、LC = 軽鎖、v - 領域 = 可変領域、VH = 重鎖可変領域、VL = 軽鎖可変領域、CCD = 電荷結合素子、CDR = 相補的決定領域、CHES = 2 - (N - シクロヘキシルアミノ) - エタンスルホン酸、EDTA = エチレンジアミン四酢酸、ECD = 細胞外ドメイン、HEPES = N - (2 - ヒド

50

ロキシエチル) - ピペラジン - N' - 2 - エタンスルホン酸、H E K = ヒト胎児腎臓細胞、M E S = 2 - (N - モルホリノ) エタンスルホン酸、P A R = プロテアーゼ活性化受容体、P B M C = 末梢血単核細胞、P B S = リン酸緩衝生理食塩水、P D B = プロテインデータバンク、P E G = ポリエチレングリコール、S D S P A G E = ドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミドゲル電気泳動、S E C = サイズ排除クロマトグラフィ、M A b = モノクローナル抗体、F R = 抗体のフレームワーク、H F A = ヒトフレームワーク適合。

【 0 0 2 5 】

定義 & 用語の説明

本明細書で使用されるとき、「抗体」は、抗体全体、及びその任意の抗原結合断片又は短鎖を含む。したがって、抗体は、本発明の抗体の中に組み込むことのできる、重鎖若しくは軽鎖の少なくとも1つの相補的決定領域 (C D R) 若しくはそのリガンド結合部、重鎖若しくは軽鎖可変領域、重鎖若しくは軽鎖定常領域、フレームワーク (F R) 領域若しくはその任意の部分、又は結合タンパク質の少なくとも一部分などが挙げられるが、これらに限定されない、免疫グロブリン分子の少なくとも一部分を含む任意のタンパク質又はペプチド含有分子を含む。用語「抗体」は、抗体、その消化断片、特定部分及び変異体を更に含むことを意図し、これには抗体模倣薬が挙げられ、あるいは抗体の構造及び/若しくは機能を模倣する抗体の部分又はその特定断片若しくは一部を含み、単鎖並びに単ドメイン抗体及びその断片が挙げられる。機能的断片は、予め選択された標的に対する抗原結合断片を含む。抗体の「抗原結合部分」という用語に包含される結合断片の例は、(i) F a b 断片、V L、V H、C L 及び C H、ドメインからなる一価断片；(i i) F (a b ') 2 断片、ヒンジ領域にてジスルフィド架橋により結合された2つのF a b 断片を含む二価断片；(i i i) V H 及び C H、ドメインからなるF d 断片；(i v) 抗体の単腕 (single arm) のV L 及びV H ドメインからなるF v 断片、(v) V H ドメインからなるd A b 断片 (W a r d ら、(1 9 8 9) N a t u r e 3 4 1 : 5 4 4 ~ 5 4 6) ；並びに(v i) 単離された相補的決定領域 (C D R) を含む。更に、F v 断片の2つのドメイン、V L 及びV H は別個の遺伝子によりコードされているが、これらの領域は組換え方法を用いて合成リンカーにより連結することができ、合成リンカーは、V L 及びV H 領域を対にして、一価分子を形成する単一タンパク質鎖 (単鎖F v (s c F v)) として知られる、例えば、B i r d ら、(1 9 8 8) S c i e n c e 2 4 2 : 4 2 3 ~ 4 2 6、及びH u s t o n ら、(1 9 8 8) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 5 : 5 8 7 9 ~ 5 8 8 3 を参照のこと) として作製することを可能にする。そのような単鎖抗体も、抗体の「抗原結合部分」という用語に包含されることを意図する。これらの抗体断片は、当業者に既知の従来技術を使用して得られ、これらの断片はインタクト抗体と同一の方法で、有用性に関してスクリーニングされる。逆に、s c F v コンストラクトのライブラリを使用して抗原結合能力に関してスクリーニングした後、従来技術を使用して、ヒト生殖系列遺伝子配列をコードする他のDNAにスプライスしてもよい。そのようなライブラリの1つの例は、「H u C A L : ヒトコンピナトリアル抗体ライブラリ」(K n a p p i k , A . ら、J M o l B i o l (2 0 0 0) 2 9 6 (1) : 5 7 ~ 8 6) である。

【 0 0 2 6 】

用語「C D R」は、抗原結合に関与する、又はその原因である、抗体の相補的決定領域又は高頻度可変領域アミノ酸残基を指す。抗体のヒトI g G サブタイプの高頻度可変領域、即ちC D R は、K a b a t ら (1 9 9 1 S e q u e n c e s o f P r o t e i n s o f I m m u n o l o g i c a l I n t e r e s t , 5 t h E d . P u b l i c H e a l t h S e r v i c e , N a t i o n a l I n s t i t u t e s o f H e a l t h , B e t h e s d a , M d .) に記載されているように、軽鎖可変ドメイン内の残基24 ~ 34 (L - C D R 1)、50 ~ 56 (L - C D R 2)、及び89 ~ 97 (L - C D R 3) と、重鎖可変ドメイン内の31 ~ 35 (H - C D R 1)、50 ~ 65 (H - C D R 2)、及び95 ~ 102 (H - C D R 3) とからのアミノ酸残基、並びに/又は

高頻度可変ループ（即ち、(Chothia and Lesk, 1987 J. Mol. Biol. 196: 901~917)に記載されているように、軽鎖可変ドメイン内の残基26~32(L1)、50~52(L2)、及び91~96(L3)、並びに重鎖可変ドメイン内の26~32(H1)、52~56(H2)、及び95~101(H3)）からのアミノ酸残基を含む。Chothia及びLeskは、構造的に保存されている高頻度可変ループを「カノニカル構造」と呼ぶ。フレームワーク又はFR1~4残基は、高頻度可変領域以外の、それを一括する可変ドメイン残基である。Chothia及びLeskの付番システムは、小文字表記、例えば30a、30b、30c等で表される特定の残基の拡張を示すことにより、ループ内の残基の数の相違を考慮する。最近では、共通の付番システムであるinternational ImmunoGenetics in formation system（登録商標）(IMGT) (LaFrancら、2005. Nucl Acids Res. 33: D593~D597)が開発され、広く採用されている。

【0027】

本明細書において、CDRは、アミノ酸配列と、連番による軽鎖又は重鎖内の位置との両方の観点において意味される。免疫グロブリン可変ドメインの構造内のCDRの「位置」が、種間で保存され、ループと呼ばれる構造に存在するとき、構造上の特徴により可変ドメイン配列を整合する付番システムを使用することにより、CDR及びフレームワーク残基は、容易に同定される。この情報は、1種の免疫グロブリンから、典型的にヒト抗体からのアクセプターフレームワークの中へのCDR残基のグラフト化及び置換に使用される。

【0028】

本明細書で使用されるとき、用語「Fc」、「Fc含有タンパク質」、又は「Fc含有分子」は、少なくとも1つの免疫グロブリンCH2及びCH3ドメインを有する、単量体、二量体、又はヘテロ二量体タンパク質を意味する。CH2及びCH3ドメインは、タンパク質/分子（例えば、抗体）の二量体領域の少なくとも一部を形成することができる。

「エピトープ」という用語は、抗体に対する特異的結合が可能なタンパク質決定因子を意味する。エピトープは通常、アミノ酸又は糖側鎖などの化学的に活性な分子表面基で構成されており、通常、特定の3次元構造特性並びに特定の電荷特性を有する。構造的及び非構造的エピトープは、後者ではなく前者に対する結合が、変性溶媒の存在下で損失するという点で区別される。

【0029】

本明細書で使用されるとき、 K_D は、解離定数、詳細には既定の抗原についての抗体の解離定数 K_D を意味し、特異的標的に対する抗体の親和性の尺度である。高親和性抗体は、既定の抗原について、有する K_D が 10^{-8} M以下、より好ましくは 10^{-9} M以下、更に好ましくは 10^{-10} M以下である。 K_D の逆数は、 K_A 、会合定数である。本明細書で使用されるとき、用語「 k_{dis} 」又は「 k_2 」又は「 k_d 」は、特定の抗体-抗原相互作用の解離速度を指すよう意図されている。「 K_D 」は、解離速度(k_2)（「オフ速度(k_{off})」とも呼ばれる）の結合速度(k_1)（又は「オン速度(k_{on})」）に対する比である。よって K_D は、 k_2/k_1 又は k_{off}/k_{on} に等しく、モル濃度(M)として表現される。ここで、 K_D が小さくなるほど、結合は強くなる。よって、 K_D が 10^{-6} M（又は1マイクロM）とは、 10^{-9} M（又は1nM）と比べ、弱い結合を表わす。

【0030】

本明細書で使用されるとき、用語「モノクローナル抗体」又は「モノクローナル抗体組成物」は、単一分子組成物の抗体分子の調製を意味する。モノクローナル抗体組成物は、特定エピトープの単一の結合特異性及び親和性を示す。この用語はまた、「組み換え抗体」及び「組み換えモノクローナル抗体」も含み、(a)動物、又は抗体分泌動物細胞と融合パートナーとの融合により調製されたハイブリドーマから単離された抗体、(b)抗体を発現するよう形質転換された宿主細胞、例えばトランスフェクターマから単離された抗

体、(c) 組み換えの、ヒト又は他の種のコンビナトリアル抗体ライブラリから単離された抗体、並びに(d) 免疫グロブリン遺伝子配列を他のDNA配列にスプライスすることを含む任意の他の手段により調製、発現、作製又は単離された抗体、などの全ての抗体は、組み換え手段により調製、発現、作製又は単離される。本明細書で使用されるとき、「単離された抗体」は、異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に有さない抗体を指すことが意図される。しかしながら、ヒトTFのエピトープ、アイソフォーム、又は変異体に特異的に結合する、単離された抗体は、他の関連した抗原、例えば、他の種(例えば、TF種ホモログ)由来の抗原に対して、交差反応性を有する場合がある。更に、単離抗体は、他の細胞物質及び/又は化学物質を実質的に含まない場合もある。本発明の一実施形態では、異なる特異性を有する「単離された」モノクローナル抗体の組み合わせを、明確に規定された組成物中で混ぜ合わせる。

10

【0031】

本明細書で使用されるとき、「特異的な結合」、「免疫特異的な結合」及び「免疫特異的に結合する」は、所定の抗原に結合する抗体を指す。通常、抗体の結合における解離定数(K_D)は 10^{-7} M以下であり、抗体が所定の抗原と結合する際の K_D は、所定の抗原以外の非特異的抗原(例えば、BSA、カゼイン、又は他の任意の特定のポリペプチド)と結合する際の K_D と比較して、少なくとも $1/2$ 以下である。「抗原を認識する抗体」及び「抗原に特異的な抗体」という表現は、本明細書において、「抗原に特異的に結合する抗体」という用語と同義的に使用される。本明細書で使用されるとき、「高度に特異的な」結合は、特定の標的エピトープに対する抗体の相対的な K_D が、他のリガンドに対する抗体の結合に関する K_D の少なくとも 10 倍小さいことを意味する。

20

【0032】

本明細書で使用されるとき、「アイソタイプ」は、重鎖定常領域遺伝子によりコードされる抗体クラス(例えば、IgM又はIgG)を指す。いくつかの抗体クラスは更にサブクラスを包含し、そのサブクラスも重鎖定常領域によりコードされ、更に定常領域ドメイン(例えばIgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4)内の特定の残基においてオリゴ糖により装飾され、抗体に生物学的機能が更に付与されている。例えば、ヒト抗体アイソタイプにおいて、IgG1、IgG3、及びわずかながらIgG2は、マウスIgG2a抗体と同様、エフェクター機能を呈する。

30

【0033】

「エフェクター」機能又は「エフェクターポジティブ(effector positive)」は、抗体が抗原特異的結合領域から区別されるドメインを含み、そのドメインは、受容体、又は補体などの他の血液成分と相互作用して、例えばマクロファージの動員、及び抗体の抗原結合ドメインに結合された細胞の破壊をもたらす事象を引き起こすことができる。抗体は、エフェクター分子の結合により仲介される数種のエフェクター機能を有する。例えば、抗体に対する補体のC1成分の結合は、補体系を活性化させる。補体の活性化は、オプソニン作用と、細胞の病原体の溶解に重要である。補体の活性化は、炎症性応答を刺激し、また自己免疫過敏症にも関与し得る。更に、抗体は、Fc領域を介して細胞に結合し、抗体Fc領域上のFc受容体部位が、細胞上のFc受容体(FcR)と結合する。IgG(γ 受容体)、IgE(η 受容体)、IgA(α 受容体)及びIgM(μ 受容体)を含む、抗体の異なるクラスに特異的な多数のFc受容体が存在する。細胞表面上のFc受容体に対する抗体の結合は、多数の重要で多様な生物学的応答を誘発し、生物学的応答には、抗体被覆粒子の貪食及び破壊、免疫複合体の排除、キラー細胞による抗体被覆標的細胞の溶解(抗体依存性細胞介在性細胞傷害、又はADCCと称される)、炎症性メディエーターの放出、胎盤通過、並びに免疫グロブリン産生の制御が含まれる。

40

【0034】

用語「組織因子タンパク質」、「組織因子」、及び「TF」は、以下に記載されるように、天然ヒト組織因子又は組み換え組織因子に対応するアミノ酸配列を有するポリペプチドを指すために用いられる。天然TFは、人類並びに他の動物種、例えば、ウサギ、ラット、ブタ、非ヒト霊長類、ウマ、マウス、及び羊の組織因子を包含する(例えば、Har

50

t z e l l ら、(1 9 8 9) M o l . C e l l . B i o l . , 9 : 2 5 6 7 ~ 2 5 7 3 ;
A n d r e w s ら、(1 9 9 1) G e n e , 9 8 : 2 6 5 ~ 2 6 9 ; 及び T a k a y e n
i k ら、(1 9 9 1) B i o c h e m . B i o p h y s . R e s . C o m m . , 1 8 1 :
1 1 4 5 ~ 1 1 5 0 を参照のこと)。ヒト組織因子のアミノ酸配列は、UniProt 受
入番号 P 1 3 7 2 6 (配列番号 1)、カニクイザル (配列番号 2)、及び UniProt
受入番号 P 2 0 3 5 2 で示されるマウス (配列番号 3) で示される。他の哺乳類組織因子
タンパク質のアミノ酸配列は、一般に知られているか、又は従来技術を通じて取得できる

【 0 0 3 5 】

本発明の抗体は、TF シグナル伝達によりもたらされる細胞、組織、又は器官上に発現
したヒト TF の機能を阻害することが望ましい場合、また、TF : F V I I a 複合体の形
成によりもたらされる TF の凝血原機能を実質的に変化させないことが望ましい場合に、
被験者に投与する又はヒト組織と接触させるのに有用である。そうした用途は、腫瘍、特
に、胸部、前立腺、肺、脾臓、及び卵巣の原発又は二次性固形腫瘍の治療に見出すことが
できる。

【 0 0 3 6 】

本発明はまた、培養液中、生体内原位置、及び生体内などで形成されるのが望ましい環
境において、組換え手段、又は抗体の発現情報の伝達を介して構築及び製造するのが有用
であることが当該技術分野において周知である配列と組み合わせることができる、本発
明の抗体配列をコードする核酸を包含する。本発明の抗体を産生する目的でかかる核酸を
操作する手段は、当業者に周知である。

【 0 0 3 7 】

本発明は、更に、本発明の抗体を単離された形態で投与及び貯蔵するための調製物、例
えば、薬学的に許容可能な又は安定した調製物を提供する。

【 0 0 3 8 】

1 . 抗体の組成物

特性

本発明は、1 0 H 1 0 (E d g i n g t o n ら、米国特許第 5 , 2 2 3 , 4 2 7 号) と
して知られるヒト TF に結合する、凝固を阻害しないマウス抗体は、特定の細胞における
TF のシグナル伝達を抑制することができるという予想外の発見に基づいている (A h m
e d ら、2 0 0 6、先に引用、P C T 国際公開特許第 2 0 0 7 / 0 5 6 3 5 2 A 2 号) 。
したがって、本発明の抗体は、マウス抗体 1 0 H 1 0 の結合エピトープを保持するもので
あり、このマウス抗体 1 0 H 1 0 は、F V I I a 結合に関して組織因子と競合せず、TF
- V I I a 複合体の凝固を促進するアミド分解活性を実質的に阻害し、並びに、TF - V
I I a によって媒介されるシグナル伝達、及びサイトカイン IL - 8 の放出などの下流の
発癌作用を阻害する。本発明の抗体は、I M G T データベースに記載されているヒト生殖
細胞系列 I g G 遺伝子に適合し、ヒト血漿中のカルシウムの存在下で凝固を開始させる T
F の能力を妨げずに、ヒト TF に結合し続ける。

【 0 0 3 9 】

マウス抗体 1 0 H 1 0 の結合エピトープを保持する抗体は、一般に、抗体の TF に結合
する能力、及びヒト TF への結合に関して 1 0 H 1 0 と競合する能力の評価によって評価
され得、一方でそれと同時に、ヒト血漿の存在下で TF を含む試料中に存在する場合、抗
体の不在下でのヒト血漿の同様の試料と比べて、TF が開始する血漿凝固に必要な時間を
実質的に長引かせない。別の意味では、抗体のエピトープは、抗体によって結合された T
F の欠失突然変異誘発、置換変異誘発、制限タンパク質分解後のペプチド断片の同定、並
びに TF の一次構造及び抗体結合ドメインの原子構造の近くをマッピングし、それによっ
て抗体とヒト TF との間の三次元結合を定義するための、共結晶化及び X 線回折法を含む
が、これらに限定されない当該技術分野において既知の技術によって、物理的にマッピン
グされ得る (図 1) 。

【 0 0 4 0 】

したがって、エピトープは、F V I I a 結合部位と重ならないとして定義することができる(図2及び図3)。より詳細には、本発明の抗体によって結合されるエピトープは、ヒト血漿中のカルシウムの存在下で凝固を開始させるTFの能力を妨げずに、F V I I によって接触されないTFのNDメインの1つ以上の残基(配列番号1で示される成熟鎖の残基1~104)、例えば残基65~70と接触し、基質結合にとって重要なCメインのK165及びK166と接触しなくてもよい(Kirchoferら、2000 Thromb Haemostat 84:1072~81)。

【0041】

一実施形態では、抗体の結合速度(k_a ($1/M \cdot s$))は 1×10^{-5} より大きい。別の実施形態では、TFに関する抗体の解離速度(k_d ($1/s$))は 1.0×10^{-5} 未満であり、得られる K_D は、 1×10^{-9} M未満(1 nM未満)である。特定の実施形態では、抗体は、 K_D が 0.5×10^{-9} M未満であるヒト生殖系列遺伝子適応抗体である。一実施形態では、抗体は、表11に示される重鎖及び軽鎖ペアのドメイン、例えば、M1639、M1645、M1647、M1652、M1641、M1644、M1587、M1604、M1593、M1606、M1584、M1611、M1596、M1601、M1588、M1594、M1607、M1612、M1595、M1599、M1589、M1592、M1583、及びM1610から選択される結合ドメインを有する。

【0042】

抗体組成物は、配列番号6~166で示されるアミノ酸配列の1つ以上から選択される結合ドメインのアミノ酸残基の配列を含むとして更に特徴付けることができる。

【0043】

変化したFc機能を有する抗体変異体

組換え方法によって生産された治療用モノクローナル抗体の使用が広がるにつれて、こうした複合体組成物の特徴及び特性が探求されてきた。免疫特異性及び抗原標的化の特徴は、一般に、CDRとしても知られる高頻度可変領域のループ末端などの可変ドメイン及びサブドメインに存在するが、複合体は、IgGのFc部分などの定常ドメインによって形成される構造体によって提供される他の受容体及び血清成分と相互作用する。

【0044】

抗体及び他のFc含有タンパク質は、いくつかのよく知られた生体外アッセイによって機能性を比較することができる。具体的には、Fcγ受容体のFcγRI、FcγRII、及びFcγRIIIファミリーのメンバーに対する親和性が対象となる。これらの測定値は、受容体の組み換え可溶型又は受容体の細胞結合型を使用して形成することができる。更に、FcRnに対する親和性、IgGの延長された循環半減期に应答可能な受容体は、組み換え可溶型FcRnを使用して、例えば、BIACoreによって測定することができる。ADCCアッセイ及びCDCアッセイ等の細胞ベースの機能性アッセイは、特定の変異型構造の可能な機能性の結果に関する見識を提供する。一実施形態において、ADCCアッセイは、主要なエフェクター細胞であるNK細胞を有するように構成され、それによって、FcγRIIIA受容体上で機能的効果を反映させる。過酸化物質又は炎症媒介物放出等の細胞応答を測定できるように、食作用アッセイを使用して、異なる変異型の免疫エフェクター機能を比較することもできる。インビボモデルも同様に、例えば、抗CD3抗体の変異型を使用して、マウスにおけるT細胞活性を測定する場合に使用することができ、活性は、Fcγ受容体等の特定リガンドを係合するFcドメインに依存する。

【0045】

2. 組織因子シグナル阻害抗体の産生

本出願に記載される抗体の特徴及び生物活性を有する抗体は、任意の哺乳類、例えば、非限定的にヒト、マウス、ウサギ、ラット、げっ歯類、霊長類、ヤギ、若しくはそれらの任意の組み合わせを含むか、又はそれらに由来することができ、単離されたヒト、霊長類、げっ歯類、哺乳類、キメラ、ヒト又は霊長類適応抗体、免疫グロブリン、開裂生成物、及び他の特定部分、並びにそれらの変異型を含む。モノクローナル抗体は、ハイブリドー

マ技術 (Kohler and Milstein, 1975, Nature, 256: 495 ~ 497)、及びB細胞と融合する不死化融合パートナーを用いる関連方法など、当該技術分野において周知の任意の方法によって調製され得る。本発明で用いる抗体はまた、例えば、Babcock, J.ら、1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(15): 7843 ~ 7848、国際公開特許第92/02551号、同第2004/051268号、及びPCT国際特許出願第2004/10637号に記載される方法による特異抗体の生成に関して選択される1個のリンパ球から生成する免疫グロブリン可変領域cDNAsのクローニング及び発現に基づいた単一リンパ球抗体法を用いて産生することもできる。

【0046】

標的結合ドメイン又はサブドメイン、定常ドメイン、並びに本明細書に記載されるFcドメインなどの機能的非標的結合ドメインを含む抗体は、当該技術分野において周知のいくつかの方法によって誘導され得る。一態様では、天然抗体ドメインの配列は、例えば、V-base (the MRC Centre for Protein Engineeringから供給される)、the National Center for Biologics Information (NCBI Ig blast)、又はthe International Immunogenetics Information System (登録商標)より供給されるthe ImmunoGenetics (IMGT) databaseなどの、刊行された又はオンラインの文書又はデータベースから好都合に得られる。

【0047】

ヒト抗体

本発明は更に、ヒトTFに結合するヒト免疫グロブリン (又は抗体) を提供する。これらの抗体はまた、遺伝子操作を受けた又は適応されたとして特徴付けされ得る。免疫グロブリンは、実質的にヒト生殖系列免疫グロブリンからの可変領域 (複数可) を有し、抗原認識に関与することが知られる残基において、指向された変形、例えば、KabattのCDR又は構造的に画定されるような高頻度可変ループを含む。存在する場合、定常領域 (1つ以上) も、実質的にヒト免疫グロブリンからである。ヒト抗体は、少なくとも約 10^{-6} M (1マイクロM)、約 10^{-7} M (100 nM)、 10^{-9} M (1 nM) 以下のTFに対する K_D を示す。親和性の変化に影響を及ぼす、例えば、TFに対するヒト抗体の親和性を改善する、又はその K_D を減少させるために、CDR残基又は他の残基のいずれかの置換が行われ得る。

【0048】

TFに結合するヒト抗体の産生源は、好ましくは、本明細書では、配列番号129 ~ 163から選択される配列、配列番号28 ~ 61から選択されるFR、及び、ヒトTFに結合することができ、かつ繊維状ファージ粒子上にディスプレイされるヒト由来Fabのレパートリーを用いて、カニクイザルTFと交差反応することができるとして特定される、配列番号6 ~ 11、27、62 ~ 128の1つ以上から選択されるCDRを含む可変領域として提供される配列である。

【0049】

いずれかのヒト可変ドメインFRへのいずれかの非ヒトCDRの置換は、CDRの由来となった親可変FRに対する適合から提供されるのと同じ空間的定位置を可能とし得ない。最終MAbに対合される重鎖及び軽鎖の可変フレームワーク領域は、同一又は異なるヒト抗体配列に由来し得る。ヒト抗体配列は、天然ヒト抗体の配列であってもよく、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来してもよく、又は数種のヒト抗体及び/若しくは生殖系列配列のコンセンサス配列であってもよい。

【0050】

好適なヒト抗体配列は、マウス可変領域のアミノ酸配列と、既知のヒト抗体の配列とのコンピュータ比較により同定される。比較は重鎖と軽鎖とで別々に行われるが、原理はそれぞれに関して類似している。

【0051】

経験的方法に関しては、所望の活性、結合親和性又は特異性をスクリーニングし得る変異体配列のライブラリを形成することが特に簡便であることが見出されている。そのような変異体のライブラリを形成するための1つのフォーマットは、ファージディスプレイベクターである。あるいは、変異体は、可変ドメイン内の標的残基をコードする核酸配列を多様化させる他の方法を用いて生成することができる。

【0052】

更なる置換が必要であるか否かを決定する別の方法と、置換されるアミノ酸残基の選択とは、コンピュータモデリングを用いて達成することができる。免疫グロブリン分子の3次元画像を生成するコンピュータハードウェア及びソフトウェアは、広く入手可能である。一般に、分子モデルは、免疫グロブリン鎖又はそのドメインに関する解明された構造から出発して生成される。モデリングされる鎖のアミノ酸配列の、解明された3次元構造の鎖又はドメインとの類似性が比較され、最大の配列類似性を示す鎖又はドメインが分子モデル構成の出発点として選択される。解明された出発構造は、モデリングされている免疫グロブリン鎖又はドメイン内の実際のアミノ酸と、出発構造内のアミノ酸との間の差異を許容するように変更される。次いで、変更された構造は、複合体免疫グロブリンに組み立てられる。最終的に、モデルは、エネルギーを最小化し、また全部の原子が互いから適切な距離内に存在し、結合の長さや角度が化学的に許容し得る限界内にあることを検証することにより精密化される。

【0053】

コードの縮重により、多様な核酸配列が各免疫グロブリンアミノ酸配列をコードするであろう。所望の核酸配列は、新規の固相DNA合成、又は所望のポリヌクレオチドの早期に調製された変異体のPCR突然変異誘発により生成され得る。本願に記載される抗体をコードする全ての核酸は、本発明に明白に含まれる。

【0054】

本明細書に記載されるように生成されたヒト抗体の可変セグメントは、典型的には、ヒト免疫グロブリン定常領域の少なくとも一部に結合される。抗体は、軽鎖及び重鎖定常領域の両方を含む。重鎖定常領域は、通常、CH1、ヒンジ、CH2、CH3、更にCH4ドメインを含むことがある。

【0055】

ヒト抗体は、IgM、IgG、IgD、IgA、及びIgEを含む抗体の任意のクラス、並びにIgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4を含む任意のサブクラス（アイソタイプ）からの任意のタイプの定常ドメインを含んでもよい。ヒト化抗体が細胞傷害活性を示すことが所望される場合、定常ドメインは通常、補体結合性定常ドメインであり、クラスは一般にIgG₁である。かかる細胞傷害活性が望ましくないとき、定常ドメインは、IgG₂クラスであってもよい。ヒト化抗体は、2つ以上のクラス又はアイソタイプからの配列を含んでもよい。

【0056】

場合により定常領域に結合されたヒト化軽鎖及び重鎖可変領域をコードする核酸は、発現ベクター内に挿入される。軽鎖及び重鎖は、同じ又は異なる発現ベクターにクローニングされ得る。免疫グロブリン鎖をコードするDNAセグメントは、免疫グロブリンポリペプチドの発現を確実にする発現ベクター（1つ以上）内の制御配列に操作可能に結合される。そのような制御配列は、シグナル配列、プロモーター、エンハンサー、及び転写終結配列を含む（全ての目的に関して引用によりその全体が本明細書に組み込まれる、Queenら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029 (1989)；国際公開特許第90/07861号；Cora、J. Immunol. 148, 1149 (1992)を参照のこと）。

【0057】

抗体若しくはFc又はその成分及びドメインは、そのようなドメイン又は成分のライブラリ、例えば、ファージライブラリから選択することにより得られてもよい。ファージラ

イブラリは、ランダムオリゴヌクレオチドのライブラリ又は目的とする配列を含むポリヌクレオチドのライブラリを挿入することによって、例えば、免疫化動物又はヒトのB細胞から作製することができる (Hoogenboomら、2000, Immunol. Today 21(8)371~8)。抗体ファージライブラリは、1つのファージに重(H)及び軽(L)鎖可変領域対を含み、単鎖Fv断片又はFab断片の発現を可能にする (Hoogenboomら、2000 supra)。ファージミドリライブラリの多様性は、ライブラリのモノクローナル抗体の免疫特異性を増大及び/又は変化させ、追加の望ましいヒトモノクローナル抗体を産生しその後同定するように、操作され得る。例えば、遺伝子をコードする重鎖(H)及び軽鎖(L)の免疫グロブリン分子は、組み立てられた免疫グロブリン分子における新規のHL対を作成するように、無作為に混合(入れ替え)され得る。更に、遺伝子をコードするH鎖及びL鎖の一方又は双方は、免疫グロブリンポリペプチドの可変領域の相補性決定領域(CDR)において変異誘発され、かつその後に望ましい親和性及び中和能力について篩分けされ得る。抗体ライブラリはまた、1つ以上のヒトFR配列を選択し、かつヒト抗体レパートリー由来か又は設計された変異を通じて得られるCDRカセットの収集物を導入することによって合成的に作製され得る (Kretzschmar and von Ruden 2000, Current Opinion in Biotechnology, 13:598~602)。多様性の位置はCDRに限定されず、可変領域のFRセグメントも含み得、又は抗体可変領域以外、例えばペプチド等を含み得る。

10

20

30

40

50

【0058】

抗体可変領域以外を含み得る標的結合成分又は非標的結合成分の他のライブラリは、リボソームディスプレイ、酵母ディスプレイ、及び細菌ディスプレイである。リボソームディスプレイは、タンパク質のRNAとの付着を保ちつつ、mRNAをそれらの同属タンパク質へと翻訳する方法である。核酸コーディング配列は、RT-PCRによって回復される (Mattheakis, L.C.ら、1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 9022)。酵母ディスプレイは、膜結合 α -アグルチニン酵母接着受容体、aga1及びaga2(接合型系の一部)の融合タンパク質の構築に基づく (Broderら、1997, Nature Biotechnology, 15:553~7)。細菌ディスプレイは、細胞膜又は細胞壁に関係している、標的と排出された細菌タンパク質との融合に基づく (Chen and Georgiou 2002 Bio

【0059】

本発明はまた、本発明の組成物をコードする核酸を、単離したポリヌクレオチドとして、又は、組成物若しくはその定方向突然変異の原核、真核、若しくは繊維状ファージ発現、分泌及び/若しくは表示に適合性のベクターを含む発現ベクターの一部として提供する。

【0060】

3. 本発明の抗体の産生方法

本発明の抗体分子が、本明細書に記載される構造及び機能特性に従って特定されたら、抗体鎖の所望の部分又は抗体鎖全体をコードする核酸配列は、クローン化、コピー、又は化学的に合成されることができ、かつ常法によって抗体を発現させるために単離及び使用されることができる。本発明の抗体は、免疫グロブリン分子の精製のための当該技術分野において周知の任意の方法によって、例えば、クロマトグラフィ(例えば、イオン交換、アフィニティー、及びサイズ排除カラムクロマトグラフィ)、遠心分離、溶解度差によって、又はタンパク質の精製のための任意の他の標準的な技術によって、精製され得る。更に、本発明の抗体及びその断片は、精製を容易にするために、本明細書に記載される、さもなければ当該技術分野において既知の異種ポリペプチド配列と融合することができる。

【0061】

宿主細胞選択又は宿主細胞工学

本明細書で説明されるように、組換えFc含有タンパク質又はモノクローナル抗体の発

現のために選択される宿主細胞は、免疫グロブリンC H 2ドメイン内でタンパク質を修飾するオリゴ糖部分の組成物における変化を含むが、これに限定されず、最終的な組成物にとって重要な寄与因子である。したがって、本発明の1つの態様は、所望の治療用タンパク質を発現する産生細胞の使用及び/又は開発のために、適切な宿主細胞の選択を含む。

【0062】

更に、宿主細胞は、哺乳類起源であってもよく、又はCOS-1、COS-7、HEK293、BHK21、CHO、BSC-1、Hep G2、653、SP2/0、293、HeLa、骨髓腫、リンパ腫、酵母、昆虫若しくは植物細胞、又はそれらの任意の誘導体、不死化細胞、若しくは形質転換細胞から選択されてもよい。

【0063】

あるいは、別の方法としては、宿主細胞は、ポリペプチドのグリコシル化が不可能である種又は有機体、例えば、原核細胞又は有機体、及び天然又は工学的的大腸菌 spp、クレブシエラ spp、又はシュドモナス spp から選択されてもよい。

【0064】

4. 抗TF抗体の使用法

上述された方法のうちのいずれかによって生成される組成物（抗体、抗体変異体、又は断片）は、ヒトの疾患、又は細胞、組織、器官、体液、若しくは、一般に宿主における特定の病理を、診断、治療、検出、又は調節するために使用され得る。本明細書において教示されるように、抗体が元のターゲッティング性を保持した状態で、標的結合後のエフェクター機能のより特異的に適した範囲をもたらすための、抗体のFc部分、Fc融合タンパク質、又はFc断片の修飾は、特定応用及び治療指標のための抗体の変異体を産生する。

【0065】

本明細書によって提供される組成物を用いて治療可能であり得る疾患又は症状としては、原発固形腫瘍及び転移癌などの癌、細胞腫、腺癌、メラノーマ、リンパ腫、白血病及び骨髓腫などの液性腫瘍、並びに癌の進行につれて形成される浸潤性腫瘤、軟部組織癌；悪性腫瘍、骨肉腫、胸腺腫、リンパ肉腫、線維肉腫、平滑筋肉腫、脂肪腫、神経膠芽腫、星状細胞腫（astro sarcoma）、前立腺、乳腺、卵巣、胃、脾臓、喉頭、食道、精巣、肝臓、耳下腺、胆道、結腸、直腸、頸、子宮、子宮内膜、甲状腺、肺、腎臓、又は膀胱の癌が挙げられるが、これらに限定されない。

【0066】

本発明の抗体が、炎症性サイトカインIL-8などのサイトカインの下流放出に關与するTFの能力を阻害することによって、組織内の発癌促進環境を低減する限りにおいて、本発明の抗体は、予防的に、又は腫瘍の増殖及び血管新生を抑制することを目的とする他の治療と共に用いられ得る。ほとんどの加齢による癌は、再生可能な組織の上皮細胞に由来する。上皮組織の重要な要素は、細胞外基質、及び線維芽細胞、マクロファージ、及び内皮細胞などのいくつかの細胞型から成る上皮下部の層である間質である。癌性腫瘍において、間質は、腫瘍の成長及び進行にとって重要であり、TFは、間質細胞並びに癌性上皮細胞上に発現され得る。したがって、間質内のTF：V I I aシグナル伝達によりもたらされる下流因子の存在は、腫瘍性組織の形成を駆動する発癌突然変異と相乗作用する癌促進組織環境を作り出す可能性がある。

【0067】

同様に、TFが脂肪組織で発現されると、肥満症、メタボリックシンドローム、及び糖尿病などの状態の組織の機能を変更することができる。本発明の抗体は、TF：V I I aシグナル伝達を阻害することによって、こうした疾患を治療するのに有用であり得る。例えばIL-8及びIL-6などのTF：F V I I aシグナル伝達の下流で生成される因子のいくつかは、強力な炎症メディエーターである。本発明の抗体の付加的用途は、したがって、リウマチ性関節炎、炎症性腸疾患、及び喘息などであるが、これらに限定されない炎症性疾患の治療が挙げられる。

【0068】

本発明の抗体は、TF:VIIaシグナル伝達を阻害し、かつ血管新生を促進する下流効果を低減するので、本発明の抗体は、癌に加えて、血管新生を伴う他の疾病、疾患、及び/又は病状を治療するのに有用であり得る。こうした疾病、疾患、及び/又は病状としては、良性腫瘍、例えば血管腫、聴神経腫瘍、神経線維腫、トラコーマ、及び化膿性肉芽腫など；動脈硬化斑；眼球血管新生疾患、例えば、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、黄斑変性症、角膜移植片拒絶反応、血管新生緑内障、水晶体後線維増殖、ルベオース、網膜芽細胞腫、ブドウ膜炎及び眼の翼状片（異常な血管成長）など；リウマチ性関節炎；乾癬；創傷治癒遅延；子宮内膜症；脈管形成；肉芽形成；肥厚性瘢痕（ケロイド）；癒着不能骨折；強皮症；トラコーマ；血管接着；心筋血管新生；冠側副；脳側副；動静脈奇形；虚血肢血管新生；オースラー・ウェーバー症候群；ブランク血管新生；毛細血管拡張症；血友病関節症；血管線維腫；線維筋性形成異常；創傷肉芽形成；クローン病；及びアテローム性動脈硬化症が挙げられるが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

【0069】

本発明の抗体がTF:VIIaシグナル伝達を阻害する限りにおいて、その抗体を用いて、新生物などであるが、これに限定されない、過剰増殖性の疾病、疾患、及び/又は病状を治療及び/又は診断することができる。抗体は、直接的又は間接的相互作用を介して、疾患の拡散を阻害することができる。本発明の抗体によって治療することができる、及び/又は診断することができる過剰増殖性の疾病、疾患、及び/又は病状の例としては、高ガンマグロブリン血症、リンパ増殖性疾患、キャスルマン病などの疾病、及び/又は病状、パラプロテイン血症、紫斑、サルコイドーシス、セザリー症候群、Waldenströmマクログロブリン血症、ゴシェ病、組織球増加症、並びに器官、組織、又は体液区画における任意のその他の過剰増殖性疾患などの過剰増殖性の疾病、疾患、及び/又は病状が挙げられるが、これらに限定されない。

【0070】

本発明の抗体が治療上使用され得る更なる手段としては、例えば、補体(CDC)によって又はエフェクター細胞(ADCC)によって介在されるような抗体の直接的細胞毒性、又は、例えば免疫複合体としての抗体の間接的細胞毒性が挙げられるが、これらに限定されない。

【0071】

本発明は一般論として記述されてきているが、本発明の実施形態は、特許請求の範囲を限定するように解釈されるべきではない以下の実施例で更に開示される。実験的記述では、特定の試薬及び手順を用いて、タンパク質、又は抗体、又は特定の断片を産生した。抗体を特性化するために定常的に用いた解析法を以下に記載する。

【0072】

材料及び方法

タンパク質及び抗体スタンダード

ヒトTFの組み換え細胞外ドメイン(ECD)を、ELISA及びBiacoreを基礎とする直接的な結合アッセイ用に2つの形態で構築し、TF(配列番号1)の成熟鎖のアミノ酸1~219を、C末端His6-tagペプチドを有する哺乳類系で発現させ、共結晶構造解析に関しては、配列番号1のアミノ酸5~213を、C末端His6-tagペプチドを有する細菌系で発現させた。タンパク質のアミン残基を標的にするNHSESTER化学分析を用いて、ヒトTF₁₋₂₁₉をビオチン化した。凝固アッセイでは、Innovin(登録商標)(Dade Behring Inc. カタログ番号B4212)(診断用途用の、リン脂質、カルシウム、緩衝液、及び安定剤と混合された凍結乾燥された組み換えヒト組織因子)を用いた。

【0073】

カニクイザル(cyno)TF-ECD(配列番号2)を、BioChain Institute(Hayward, CA)から入手したカニクイザルの精巣組織から単離したcDNAから、ポリメラーゼ連鎖反応を用いてクローン化した。

【0074】

いくつかの抗体を参照抗体として用いた：i) 元のハイブリドーマTF9・10H10-3・2・2からクローン化した10H10（米国特許第7223427号）；ii) ヒトIgG1/Kappa定常領域に配列番号4及び配列番号5を含む10H10マウス-ヒトキメラ、M1と指定；iii) M59、10H10の6つのCDRを含み、かつ親和性成熟のための親抗体としての役割を果たす、ヒトIgG1及びヒトKappa定常領域に配列番号19及び配列番号23を含むヒトFR適応抗体；iv) マウスの抗ヒト組織因子抗体TF8-5G9（米国特許第7223427号）；v) 抗体5G9からヒトIgG1/Kappaとしてヒト化した、CNTO 860として知られる抗体（米国特許第7605235号）、並びにvi) B37と呼ばれる無関係な抗原（RSV）に結合するアイソタイプ対照（ヒトIgG1/kappa）抗体。

10

【0075】

抗体の発現及び精製

常法を用いて、開示される抗体を発現及び生成した。一次スクリーニングでは、これら分子をコードするDNAを、96ウェルプレートの中のHEK 293E細胞の中で一時的に発現させ、トランスフェクションの後96時間後に、上清を活性（結合）に関して試験した。パイロットスケールでの発現及び精製の該当点を特定して選択した。パイロットスケールでの発現は、750mLの量のHEK 293F細胞又はCHO-S中で一時的に行われた。採取した上清をタンパク質Aクロマトグラフィーで精製し、精製タンパク質を、それらの親和性及び機能活性について評価した。更に、精製タンパク質を、SDS-PAGE、SE-HPLC、及び相互作用クロマトグラフィー（CIC）による生物物理学的特徴付けに供した。理論的等電点（pI）を、各変異体についても計算した。パイロットスケールでの特徴付けから、最終的な有力候補の組をWAVE生物反応器にトランスフェクトし、タンパク質Aクロマトグラフィー（chromatography）で精製した。

20

【0076】

Fab産生及びモノクローナルFabのELISA

ファージパニングラウンドからのグリセロールストックをミニプレップし、pIX遺伝子をNheI/SpeI消化により除去した。再連結の後、DNAをTG-1細胞に転換し、LB/寒天平板培地で一晚増殖させた。次の日、コロニーを採取し、一晚増殖させ、この培養物を、(i) V領域のコロニーPCR及びシーケンシング、並びに(ii) Fab産生の誘発で用いた。Fabを産生するため、一晚培養物を新しい培地で10~100倍に希釈し、37℃で5~6時間にわたって増殖させた。Fab産生は、IPTGを含有する新鮮培地を加えることによって誘発され、培養物を30℃にて一晚増殖させた。次の日、培養物を回転沈降させ、可溶性のFabタンパク質を含有する上清を、FabのELISAで用いた。

30

【0077】

FabのELISAでは、Fabは、多クローン性抗Fd（CH1）抗体によってプレートの上に捕捉された。適切な洗浄及び阻害の後、ビオチン化hTFを0.2nM濃度で添加した。この濃度は、全プレートに対照として存在する親Fabを100%結合と定義した場合の親の結合百分率として定義された、Fab変異体のランク付けを可能にする。ビオチン化hTFは、HRP共役ストレプトアビジン及びプレートリーダーの化学発光読取値によって検出された。

40

【0078】

TF-EC2結合MabベースのELISA

化学発光による検出を用いた溶液相直接TF結合ELISAを用いて、ヒトフフレームワーク適応ライブラリから最も良く結合するもののランク付けを行った。96ウェルblack maxisorpプレートを、炭酸塩-重炭酸塩緩衝液で希釈した100uLの4ug/mLヤギ抗ヒトIgG FCで、pH 9.4、4℃にて一晚コーティングした後、洗浄緩衝液（0.05%のTween-20溶液を有するPBS）で3回洗浄し、300uLの1% BSA/10mM PBS溶液で1時間にわたって阻害し、その後、先と同様に洗浄した。試料又は標準物質をアッセイ緩衝液（PBS+0.5% Tween中

50

1 % BSA) で 50 ng / mL に希釈し、100 μ L を室温にて 1 時間にわたり振盪させながらアッセイプレートに添加した。これらプレートを 3 回洗浄し、1 ウェル当たり 100 μ L の、His タグのついたヒト又はカニクイザル TF - ECD を、アッセイ緩衝液で希釈して 100 ng / mL で添加し、室温にて 2 時間インキュベートした。洗浄後、アッセイ緩衝液で 1 : 2000 に希釈した Qiagen ペルオキシダーゼ共役 pentahis を 1 ウェル当たり 100 μ L で添加し、室温で 1 時間にわたり振盪させながらインキュベートした。BM Chemilum Substrate (BM Chemilum, POD, Roche) を緩衝液中 1 : 100 の希釈で新たに調製し、最終洗浄後に 100 μ L をプレートに添加した。10 分後に、Perkin Elmer Envision Reader, BM Chemilum program でプレートを読み取る。

10

【0079】

FACS による抗組織因子 mAb の MDA - MB - 231 全細胞結合

このアッセイは、乳癌細胞に発現した内在性ヒト TF に対する抗体の直接結合を検出するために用いられる。FACS 緩衝液 (PBS 中 1 % FBS) 中の試験 mAb の 4 点滴定を 2 組調製する。滴定を 1 : 4 希釈にて 1,000 ng / mL で開始する。親分子である M1 を陽性対照として用い、抗 RSV mAb である B37 を陰性 / アイソタイプ対照として用いる。無染色細胞及び二次抗体である、FACS 緩衝液 1 : 200 中の Cy - 5 共役ヤギ抗ヒト IgG Fc 抗体を対照として用い、使用直前に調製した。

【0080】

標準的な組織培養技術を用いて、培養瓶の中の接着 MDA - MB - 231 細胞を PBS (w / o Ca + 2 / Mg + 2) で 1 回すすぐ。Versene で細胞を持ち上げ、細胞を計数し、1 ウェル当たり 200,000 個の細胞をポリスチレン製 V 底プレートに播種する。FACS 解析プロトコル：組織因子結合。Allegra X - 15 R 遠心機の中の細胞を 450 $\times$ g にて 3 分間 4 でペレット化し、FACS 緩衝液 (PBS 中 2 % FBS) 中に再懸濁し、1 ウェル当たり 200,000 個の細胞を 200 μ L の中に蒔く。細胞を 450 $\times$ g にて 3 分間 4 でペレット化する。上清を捨て、100 μ L / ウェルの試験又は対照 mAb を指定されたウェルに添加し、氷上又は 4 で 1 時間 (+ / - 10 分) にわたってインキュベートする。細胞を 450 $\times$ g にて 3 分間 4 でペレット化する。上清を捨て、細胞を FACS 緩衝液で 1 回洗浄する。200 μ L / ウェルの FACS 緩衝液中に細胞を再懸濁し、細胞を 450 $\times$ g にて 3 分間 4 でペレット化する。上清を捨て、100 μ L / ウェルの二次抗体を指定されたウェルに添加し (倍散)、氷上で 1 時間 (+ / - 10 分) にわたってインキュベートする。細胞を 450 $\times$ g にて 3 分間 4 でペレット化する。上清を捨て、200 μ L / ウェルの FACS 緩衝液中に細胞を再懸濁する前に (倍散)、FACS 緩衝液中で細胞を 2 回洗浄する。細胞を 450 $\times$ g にて 3 分間 4 でペレット化する。上清を捨て、100 μ L / ウェルの CytoFix 緩衝液中に細胞を再懸濁する。反応をフローサイトメトリー (BD FACS Array) で解析する。無染色対照のウェル中の主要な細胞集団をゲーティングし、このゲートを全データセットに適用することによって、FACS データ解析に FlowJo ソフトウェアを用いる。データは、適用したゲートに関する赤チャンネルの幾何平均蛍光強度 (MFI) の表としてエクスポートされる。

20

30

40

【0081】

Thermafluor アッセイ

Thermofluor 技術は、加熱されたときの分子アンフォールディングの反応速度測定である。分子が加熱されると、分子が展開するときに、色素 (ANS) は分子に結合することができる。色素は分子に結合すると蛍光を発し、この蛍光が経時的に測定される。このアッセイでは、抗体の展開は 37 ~ 95 で測定され、0.5 毎に検出される。アッセイ対照として用いられる既知の Tms を有する 2 つの mAb (Emmp 4 A5、及び Emmp 5 F6) と同様に、マウス及びキメラ形態 (10H10、M1、5G9、及び CNT0860) の両方の親分子の Tms も測定した。

【0082】

50

ヒトフフレームワーク適応ライブラリ変異体の耐熱性を予測するために、このアッセイを用いた。精製抗体をPBSで0.5 mg/mLに希釈し、2 uLの試料を各ウェルに添加し、1ウェル当たり合計で1 u gの試料とする。各試料を2重で加える。ストックANSは、DMSO中500 mMである。ストックANSをDMSOで1:12に(40 mMまで)希釈し、20 uLの40 mM ANS溶液、2.8 uLの10% Tween、及び1.98 mLのPBSを混合して色素/Tween溶液を形成し、2 uLの色素/Tween溶液及び2 uLの油を加える。プレートを遠心する(450 rpmで2分)。Thermo fluor設定:シャッターは手動に設定、勾配温度0.5 / 秒、連続勾配、温度勾配:50~95。高温で15秒保持を選択、露出時間10秒/1反復、ゲイン標準値=2、「単一SC画像/プレート」を選択。

10

【0083】

相互作用クロマトグラフィ(CID)

種々の抗体と他のヒト抗体との相互作用を判定するために、ヒトIgG(Sigma Aldrich)結合カラムを用いてクロマトグラフィ実験を行った。簡潔に言うと、50 mgのヒトIgGを、メーカーの説明書に従って、1 mLのNHS-セファロースカラム(GE Healthcare)に結合させた。結合されなかったIgGを、0.1 M Tris、pH 8、0.5 M NaClで洗浄することによって取り除き、非反応NHS群を同じ緩衝液によりブロックした。結合効率は、Pierce's Coomassie Plusアッセイキット(Thermo Pierce)を使用して、非反応結合緩衝液及び洗浄液中に残っているタンパク質濃度を測定し、固定化の前のタンパク質の量から減算することによって決定された。タンパク質を樹脂に添加しなかったこと以外は、同じプロトコルを用いて対照カラムも調製した。

20

【0084】

最初に対照カラムを、PBS、pH 7で平衡化した後のDionex Ultimate 3000 HPLCに、0.1 mL/分の流量で通した。非特異的結合部位がブロックされるのを確実にするために、最初に20 Lのタンパク質ストック溶液を注入し、続いて20 Lの10%アセトン注入して、カラムの完全性をチェックした。

【0085】

分析されるべき試料を、PBS、pH 7で0.1 mg/mLに希釈した。各試料の20マイクロリットルを各カラムに注入し、0.1 mL/分で30分にわたって通した。保持時間を記録し、各変異体の保持係数(k')を計算した。

30

k' の計算は、タンパク質誘導体化カラム(IgG結合カラム)での保持時間(t_R)と、タンパク質が結合していないカラムでの保持時間(t_0)の差である。計算は、カラムを標準化するために、両方のカラムでのアセトンの保持時間も考慮に入れる。 k' の許容値は0.3未満である。

【0086】

溶解性

種々の抗体の室温での溶解性を判定するため、遠心濾過装置を使用して濃度実験を行った。簡潔に言うと、PBS中の抗体調製物を、室温にてVivaspin-15(15 mL)遠心濾過装置(30,000 MWCO, Sartorius, Goettingen, Germany)に加えた。フィルタを、Beckman Allegra X15-R遠心機の中でスインギングパケットローターを使用して、3000×gで20分間隔で回転させた。体積が約2 mLまで減少したら、上清をVivaspin-4(4 mL)濾過装置(30,000 MWCO)に移し、20分間隔で4,000×gで遠心分離した。体積が500 Lまで減少したら、サンプルをVivaspin-500濾過装置に移し、15分間Eppendorf 5424遠心機で15,000×gにて遠心分離した。タンパク質濃度が100 mg/mL以上に達するまでこれを繰り返した。タンパク質濃度は、適切な希釈を用い、BioTek Synergy HT(商標)分光光度計上での280 nm及び310 nmにおける吸光度により決定された。この時点で、遠心分離を停止させ、試料を一晩室温で保持して、平衡に達した。次の朝、試料の沈殿の兆候をチェックし

40

50

た。濃度が100mg/mL超であった場合、プロセスを中止した。

【0087】

第V I I A 因子誘発 I L - 8 阻害アッセイ

このアッセイを用いて、TF結合抗体が、TFを発現するヒト細胞からのF V I I a 誘発 I L - 8 放出をなくすかどうかを試験した。D M E M 及び10% F B S (G i b c o : カタログ番号11995及びカタログ番号16140)中で成長するように適合されたヒト乳がん細胞(M D A - M B - 231)(A T C C : H T B - 26)を、96ウェルの細胞培養プレート(N u n c : カタログ番号167008)に、1ウェル当たり20000個の細胞(100,000個の細胞/mL)の密度で、標準的細胞培養技術を用いて蒔いた。2µg/mLで開始し、F B S を有さないD M E M で1:2又は1:4のいずれかで連続希釈される抗体処理の前に、細胞を2日にわたって回収した。抗体は、F B S を有さないD M E M 中最終濃度50nMのヒトF V I I a (I n n o v a t i v e R e s e a r c h : カタログ番号I H F V I I a、ロット:2824)で処理する1時間前に加えられた。細胞をインキュベータに24時間入れた。処理の後、上清を収集し、I L - 8 の量を、メーカーのプロトコル(R & D S y s t e m s : カタログ番号D8000C)にしたがってE L I S A によって検出した。簡単に言えば、各処理試料の光学密度(O D)を450nm及び540nmにて読み取った。アッセイプレートの光学的不完全性を補正するために、540nmにおける読み取り値を用いたが、一方で、メーカーのプロトコルに従って作製したI L - 8 標準曲線を用いて処理試料中のI L - 8 含有量を計算するために、450nmにおける補正された読み取り値(O D 450 マイナス O D 540)を用いた。抗体及びF V I I a 処理を受けていない細胞を有するウェルを用いて、内因性I L - 8 レベルを決定する一方で、F V I I a のみを受けた細胞を有するウェルを用いて、「非阻害」I L - 8 レベルを決定し、それによって、最小及び最大I L - 8 レベルをそれぞれ定義した。M A b 滴定処理試料を、上で定義された最大及び最小I L - 8 レベルに対して正規化し、阻害百分率で表した。正規化データは、棒グラフで表されるか、又は各M A b のE C ₅₀ 値を抽出するようにフィットする4パラメータのロジスティック曲線に当て嵌められるかのいずれかであった。

10

20

30

40

【0088】

凝固アッセイ

このアッセイは、カルシウム及び添加された組み換えヒトTF調製物(I n n o v i n , D a d e B e h r i n g I n c)の存在下でヒト血漿を使用して、抗ヒトTF抗体が生体外での凝固を阻害するかどうかを判定するために用いた。抗ヒトTF抗体をH B S S (G i b c o、カタログ番号14175)で2mg/mL抗体まで希釈する。クエン酸ナトリウムを有するプールされたヒト血漿(G e o r g e K i n g B i o m e d i c a l , N o v i , M I)を、1000rpmにて5分にわたり回転沈降させ、透明な血漿を新しい管に移す。透明な96ウェルアッセイプレート(N U N C、カタログ番号439454)の各ウェルの中で、25µLの希釈した抗体を100µLのヒト血漿に加える。22mMのC a C L 2 を有するH B S S で1:500に希釈した125µLのI n n o v i n (D a d e B e h r i n g I n c .、カタログ番号B4212)を、抗体を有する又は有する血漿を収容しているウェルに添加することによって、反応を開始させる。凝固反応は、S p e c t r a M a x M 2 e 読み取り機(M o l e c u l a r D e v i c e s , S u n n y v a l e , C A)を使用して、反応開始直後及び30分にわたり37にて、O D 405で速度論的に監視する。各抗体のT1/2 M a x は、最大光学密度の50%に達するまでにかかる時間(秒)として、S o f t m a x P r o ソフトウェアを用いて決定される。試料の時間(秒)は各プレートの参照に対して正規化されたが、統計的には、抗体を有さない試料、10H10、及び全て10H10由来でヒトに適合した変異体の平均時間である150秒及び200秒と記載している試料の間に差はなかった。

(実施例)

【0089】

実施例1:10H10のシーケンシング

50

The Scripps Research Institute in La Jolla, CA (米国特許第5223427号、Morriseyら、1988 Thromb Res. 52(3):247~261)で産生された10H10として知られるマウス抗体を、ハイブリドーマTF9.10H10-3.2.2によって産生する。10H10ハイブリドーマクローンからの抗体の配列は、以前に報告されていない。

この配列は、2つの抗体鎖、VH及びVLを、5' GeneRacer (商標) (Invitrogen)、プライマー、並びにマウスIgG1定常領域及びマウスKappa定常領域内の配列にそれぞれ相補的な3' コンセンサスプライマーを用いて増殖せる、5' RACE法 (Focus 25(2):25~27, 2003; Maruyama 1994 Gene 138, 171~174)を用いて特定された。配列解析により適したVL生成物を生成するために、5' GeneRacer Nestedプライマー及び3' コンセンサスプライマーを用いるNested PCR増幅を用いた。

10

【0090】

各鎖の可変領域を特定するために、少なくとも16個のクローンが選択された。挿入の未知の領域の配列決定のためにプライマーを用いた。配列解析のため、生配列データをABI DNA SequencerからVector NTI (Invitrogen Informax)にダウンロードした。1つの機能的VH及び1つの機能的VLを特定した。VH及びVL遺伝子は共に、それらの自然シグナル配列、FR、CDR、及びJセグメントを見つけるために更に解析された。

20

【0091】

VHのCDR-1に対応する領域を除き、10H10、FR及びCDRは順次的に番号が付けられ、Kabatsの定義 (Kabatra, 5th edit. Public Health Service, NIH, Washington, DC, 1991)に従って分割された。この領域では、Kabatsの定義とChothiaの定義との組み合わせが用いられた (Raghunathan, G., US2009/0118127 A1; Chothia and Lesk, J Mol Biol 196(4):901~17, 1987)。

【0092】

【表 1】

表 1. 10H10 可変領域の配列及びその配列構造

タンパク質名	ポリペプチド配列	サブドメイン
10H10重鎖可変領域 (配列番号4)	QVHLQQSGAELMKPGASVKISKAS GYTFITYWIE WVKQRPGHGLEWIG DILPGSGSTNYNENFKG KATFTADSSSNAYMQLSSLTSEDSAV YYCAR SGYYGNSGFAY WGQGTLLVTVSA	FR1=1~25 CDR1=26~35(配列番号6) FR2=36~49 CDR2=50~66(配列番号7) FR3=67~98 CDR3=99~109(配列番号8) FR4(JH3)=110~120
10H10軽鎖可変領域 (配列番号5)	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSC KSSQSLLSSGNQKNYLT WYQQIPGQPPLLIY WASTRES GVPDRFTGSGSGTDFLTINSVQAEDLA VYYC QNDYTYPLT FGAGTKLELK	FR1=1~23 CDR1=24~40(配列番号9) FR2=41~55 CDR2=56~62(配列番号10) FR3=63~94 CDR3=95~103(配列番号11) FR4(K5)=104~113

10

20

【0093】

クローン化したV領域は、ヒトIgG1/K α 定常領域を用いて操作され、HEK293又はCHO細胞株の組み換え発現のために哺乳類発現ベクターにクローニングされ、M1と指定されるマウス-ヒトキメラ抗体を産生し、これを参照抗体としてアッセイ開発で用いた。結晶構造解析で用いる10H10Fabを産生するために、HC V領域もまた、ヒトIgG1 CH1ドメインのみ、及びC末端ヘキサヒスチジンを用いて操作された。

30

【0094】

実施例2：非凝固性組織因子抗体のエピトープマッピング

ヒトTF ECDと、対応するFab断片との間の複合体の結晶構造決定により、10H10のエピトープマッピングを行った。Hisタグ付きヒトTF ECD(配列番号1の残基5~213)を大腸菌内で発現させ、HisTrap HPカラム(GE Healthcare)及びQ HPカラム(GE Healthcare)をそれぞれ用いて、親和性及びイオン交換クロマトグラフィによって精製した。10H10 FabのHisタグ付きキメラバージョン(マウスV領域、ヒト定常ドメイン)をHEK細胞内で発現させ、親和性(TALONカラム、GE Healthcare)及びサイズ排除(HiLoad Superdex 200カラム、GE Healthcare)クロマトグラフィを用いて精製した。

40

【0095】

FabとヒトTF ECDを1:1.2のモル比で混合することにより、複合体を調製した(過剰なTF)。混合物を20分間室温でインキュベートし、20mMのHEPES、pH 7.5、及び0.1M NaClで平衡化したSuperdex 200カラム

50

(GE Healthcare) にロードした。主ピークに対応するフラクションをプールし、10 mg/mL となるまで濃縮し、結晶化で使用した。複合体は、蒸気拡散法により 20 で結晶化された。10H10:TF 複合体は、0.1 M の CHES、pH 9.5 中 18% の PEG 8000 を含有する溶液から結晶化された。X 線データ収集のために、複合体の 1 つの結晶を、20% グリセロールを補充した母液に数秒間浸漬し、38 (100 K) の窒素流中で急速冷凍した。Saturn 944 CCD 検出器を装備した Rigaku MicroMax TM - 007 HF 微小焦点 X 線発生装置、及び X-stream (商標) 2000 循環冷却システム (Rigaku) を用いて、X 線回折強度を測定した。構造は、高分子結晶学の CCP4 プログラムスーツ (CCP4 suite of programs) を用いて、分子置換によって決定された (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994, Acta Cryst. D 50, 760~763)。

10

【0096】

TF ECD は、免疫グロブリンフォールドを有する 2 つの位相的に同一のドメインから成る。N 末端ドメインは (ECD、配列番号 1 の) 残基 1~103 に及び、C 末端ドメインは残基 104~210 に及ぶ。10H10 エピトープは、ECD の残基 K149~D150 を中心とし、10H10 の重鎖及び軽鎖の可変ドメインの間の深いポケットに至ることが見出された。10H10 と TF との間の接点は広範囲であり、6 つの CDR ループ全てが関与する (図 1)。

20

【0097】

注目すべき発見は、10H10 の TF エピトープが FV II 及び FX 結合部位と重なり合わないことである (図 2 及び図 3)。また、10H10 及び 5G9 (凝固を阻害する能力を有する別のマウスヒト TF 結合抗体であり、このエピトープは従前公表されている、Huang ら、1998 J Mol Biol 275: 873~94) のエピトープは、部分的に重なり合っており、これら 2 つの抗体とヒト TF との間の競合的結合を説明している (図 2 及び図 3)。

【0098】

ヒト TF ECD: 10H10 接点

10H10 は、ECD の N 末端ドメインと C 末端ドメインとの間の接点で TF に結合する。TF の凸面は、抗体の凹状 CDR 表面に合致する。複合体形成の際に覆われる総面積は、相互作用分子のそれぞれの上で 1,100 Å² を超える。6 つの CDR の全てが、TF との直接接触に関与する (接触は 4 Å 原子間距離と定義される)。合計で、24 個のエピトープ残基及び 25 個のパラトープ残基が存在する。CDR L1、H1、及び H3 は、接触の大部分を形成する。10H10:TF 複合体のエピトープ及びパラトープを形成する残基は、図 1 に概略的に示されている。

30

【0099】

10H10 エピトープは、TF ECD の N ドメインからの 2 つのセグメントと、C ドメインからの 3 つのセグメントとを含む。N ドメインからの 2 つのセグメントは抗体と相互作用する、つまり、残基 65~70 は H-CDR1 及び H-CDR3 と相互作用し、残基 104 は H-CDR1 と相互作用する。C ドメインの 3 つのセグメントは抗体と相互作用する、つまり、残基 195 及び 197 は、H-CDR1 及び H-CDR2 と相互作用し、残基 171~174 は、L-CDR1 及び L-CDR3 と相互作用し、残基 129~150 は、L-CDR1、L-CDR3、H-CDR1 及び H-CDR3 と相互作用し、TF 残基 K149~D150 は、エピトープの中心にあり、VL ドメインと VH ドメインとの間に形成される深いポケットに達し、それらの主なパートナーはそれぞれ、10H10 の LC 可変領域 (配列番号 5) の D97、及び HC 可変領域 (配列番号 4) の W33 である。

40

【0100】

B. 抗体特異性

ヒト、カニクイザル (配列番号 2)、及びマウス TF ECD (配列番号 3) のアミノ

50

酸配列が、図2に整列配置されている。ヒトの配列とカニクイザルTF ECDの配列の類似性は高く、これら2つが10H10接触残基において異なるのは、配列番号1の位置197の1つ残基だけであり、この位置はカニクイザル配列ではR (Arg)である。ヒト配列のT197は、単一H-CDR2残基によって接触されるので、10H10由来の抗体の現在の組で見られる高レベルの交差反応性の説明がつく。

【0101】

ヒト及びマウスTF配列を並べることにより、有意なアミノ酸の相違がエピトープ残基において生じるので、10H10の種特異性を決定するエピトープ残基は明白であった、つまり、配列番号1と配列番号3とを対比すると、10H10がヒトTFと接触する24個の残基のうち、ヒト配列とマウス配列とは、NDメインにおいて位置68、69、70、及び104で異なり、Cドメインにおいて位置136、142、145、及び197で異なっている。この相違は、マウスTFに対する10H10の低い結合親和性と一致する。

10

【0102】

図2はまた、三元複合体への会合を説明する理論的3Dモデル(図3)に基づいた、FVII及びFXに関するヒトTF上の相互作用部位を示す(Norledgeら、Proteins 53:640~648, 2003)。抗体5G9は、FX結合部位と部分的に重なっているエピトープにおいてTFに結合する。したがって、5G9はFXと競合し、これにより凝固カスケードの障害が引き起こされる。10H10は、凝固を障害しないが、TF関連PARを介したシグナル伝達を効果的に遮断するという点で、5G9と異なる。三元TF/FVII/FX複合体のモデルに基づき、10H10エピトープはTFの自由表面上にあり、残基K149~D150を中心としていることが予想された。突然変異誘発によりマッピングされた10H10の結合及びペプチドエピトープマッピングは、これが事実であるということを初期に証明した。

20

【0103】

TF ECDと10H10 Fabとの間の複合体の本発明の結晶構造は、FVII及びFXがTFと又は互いに相互作用するのを妨げることなく、抗体がTFに結合できる方法の空間マッピングを提供する。この構造によって明らかにされるような10H10エピトープは、三元複合体に理論的に存在する場合、TFの自由表面を覆う。更に、10H10エピトープは、凝固障害MAb(5G9)エピトープと部分的に重なり(Huang 1998、上記)、共通の残基はK149及びN171である。10H10又は5G9はいずれも、TFに対するFVIIの結合を障害しない。10H10及びFXのエピトープもまた重ならないが、現行モデルのFabの定常ドメインとFXのプロテアーゼ(球状)ドメインとの間に立体衝突が生じる。しかしながら、FXの配向は実際にはモデルと異なり、FXとTFとの間の会合は、プロテアーゼドメインにおけるいくつかの柔軟性を可能にすることに留意されたい。Fabの変域ドメインと定常ドメインとの間の肘角度にもかなりの柔軟性があり、これは、10H10が三元複合体に結合する際の衝突を回避できるようにし得る。

30

【0104】

実施例3：結合ドメインをヒトで用いるために適合させる

40

治療用タンパク質の有効性は、望ましくない免疫反応によって制限され得る。非ヒトモノクローナル抗体は、ヒトでの免疫応答を誘発することができる、かなりの線形アミノ酸配列鎖と、局所的な構造コンフォメーションを有し得る。非ヒトMAbの標的結合の免疫特異性に関与している残基のヒト抗体骨格への移動は、しばしば、標的抗原に対する結合親和性の大きな損失をもたらす。したがって、ヒトに注入されたときに、親非ヒト分子の結合及び生物物理学的プロファイルを保持すると同時に、最小免疫原性反応を誘発する抗体分子を作成するための、しっかりした設計原理を用いることが極めて重要である。

【0105】

米国特許出願第20090118127A1号において前述されたように、またFranssonら、2010 J Mol Biol 398:214~231で例示された

50

ように、ヒトTFと結合するとマウス抗体10H10の標的効果を示す、本発明の抗体種を産生するために、結合親和性をヒト化しかつ回復又は強化させるために、2工程プロセスを用いた。ヒトフレームワーク適合(HFA)と呼ばれる2工程プロセスは、1)ヒトフレームワーク選択、及び2)親和性成熟工程から成る。

【0106】

HFAプロセスにおいて、結合部位残基(CDR)は、配列相同性及び構造的考察に基づいて選択されたヒト生殖系列遺伝子と結合される。抗体のCDR割り当てのための2つの体系は、抗体配列の可変性に基づいているKabattの定義、及び抗体の3次元構造の解析に基づいているChothiaの定義である。6個のCDRの間で、それらが異なる場合には、一方又は他方の体系が用いられる場合がある。軽鎖CDRの場合、Kabattの定義を使用する。

10

【0107】

重鎖CDR3の場合、Kabatt及びChothiaの両定義は同一である。重鎖CDR1の場合、Chothiaの定義を使用して開始を定義し、Kabattの定義を使用して終結を定義する(パターンは、Wの後にV、I、又はAのような疎水性アミノ酸が続くことによって定義される)。VH-CDR2の場合、Kabattの定義を使用した。しかしながら、ほとんどの抗体構造において、この配列に基づく定義は、CDR2に属するようにFR3の一部に割り当てる。即ち、このCDRのより短い変更体(これはこのCDRのC末端領域について7残基前に終了する)も使用することができ、本明細書ではKabatt-7と呼ばれる。

20

【0108】

ヒトFR選択

抗原結合部位に含まれないV領域内の領域であると定義されるヒトFR領域は、機能的ヒト生殖細胞系IGHV及びIGHJ遺伝子のレパートリーから選択された。ヒト生殖系列遺伝子配列のレパートリーは、IMGTデータベース(Lefranc 2005)を検索し、「01」対立遺伝子を一括してコンパイルすることによって得た。このコンパイルから、重複遺伝子(アミノ酸レベルで100%同一)及び対を成さないシステイン残基を有する遺伝子はコンパイルから除外された。遺伝子コンパイルの最終更新は、2007年10月1日に行われた。

【0109】

30

VHのHFAのヒト配列の最初の選択は、FR-1~3、並びにH-CDR-1及びH-CDR-2を含むマウスVH領域の全長に対する、ヒトVH生殖系列遺伝子の配列相同性に基づいた。次の段階で、選択されたヒト配列は、CDRの長さ、及びマウスのCDRとヒト配列との間の配列類似性の両方を考慮したスコアを用いてランク順序付けされた。BLOSUM 62置換マトリックスのような標準突然変異マトリックス(Henikoff and Henikoff 1992 Proc Natl Acad Sci USA 15; 89(22): 10915~9)を、マウス及びヒト配列のCDRのアライメントを採点するために使用し、そして挿入及び/又は欠失がCDRループにある場合、大きなペナルティを適用する。ヒトFR-4は、IGHJ生殖系列遺伝子(Lefranc 2005)とマウス10H10配列、IGHJ4(配列番号60)の配列相同性に基づいて選択された。

40

【0110】

VLのヒトFRの選択にも同様の方法を用いた。この場合、IGHV遺伝子で使用されたのと同じ手順で選択された生殖系列遺伝子IGVKは、FR 1~3及びL-CDR 1~3を選択するための遺伝子としての役割を果たした。ヒトIGJ-K2遺伝子(配列番号61)は、全ての変異体のFR4として選択された。

【0111】

11個のVH及び7つのVL生殖細胞系列鎖が選択された。選択したVH遺伝子は、主にIGVH-1遺伝子ファミリーから選択され、6個の配列はIGVH1からであり、IGVH1-69及びIGVH1-fはより長い及びより短いH-CDR2と共に用いられ

50

、２個の配列は I G V H 3 からであり、１個の配列は I G V H 5 遺伝子からであり、長い及び短い H - C D R 2 共に用いられた。V L 遺伝子は、６個が I G V K 2 遺伝子ファミリーのものであり、１個が I G V K 4 遺伝子ファミリーのものであった。

【 0 1 1 2 】

したがって、より長い H - C D R 2 (配列番号 7) を有する V H 変異体 H 1 5 、 H 1 9 、及び H 2 1 は、それぞれ、より短いマウス C D R - H 2 (配列番号 2 7) を用いた H 2 2 、 H 2 3 、及び H 2 4 に対応した。接頭辞「 s 」は、β鎖領域により少ないマウス残基及びより多くのヒト残基を有する試験変異体を意味する。用いた V 領域表記及び用いた遺伝子配列は、下記の表 2 及び 3 に示されている。

【 0 1 1 3 】

10

【表 2】

表 2.

ポリペプチドID	用いたIMGT遺伝子
H13	VH-10H10
H14	IGHV1-2
H15	IGHV5-a
H16	IGHV1-46
H17	IGHV1-3
H18	IGHV3-74
H19	IGHV1-69
H20	IGHV1-18
H21	IGHV1-f
H22	s1_IGHV5-a
H23	s1_IGHV1-69
H24	s1_IGHV1-f

20

30

【 0 1 1 4 】

【表 3】

表 3.

ペプチドID	IMGT遺伝子名
L1	VL-10H10
L2	IGKV4-1_B3
L3	IGKV2D40_O1
L4	IGKV2D-28_A3
L5	IGKV2D-29_A2
L6	IGKV2-30_A17
L7	IGKV2-24_A232
L8	IGKV2D-26_A21

40

【 0 1 1 5 】

1 1 本の重鎖及び 7 つの軽鎖ヒト F R 変異体、更にはマウス 1 0 H 1 0 キメラ鎖を示す 9 6 の M A b のライブラリを、一次スクリーニング用の上清を提供するために、9 6 ウェル形式において H E K 2 9 3 E 細胞で発現させた。一次スクリーニング用に、9 6 ウェ

50

ルプレートの H E K 293E 細胞において一時的に発現する完全 M A b を形成するために、標準的な組換え方法を用いて、選択された可変ドメインをコードする D N A を組み換えた。培養物からの上清液を、トランスフェクションから 96 時間後に活性（結合）に関して試験した。

【0116】

一次スクリーニングの結果に基づき、19 個の変異体を、H E K 293 - F 細胞におけるパイロットスケールでの発現及び精製用に選択した。パイロットスケールでの発現は、750 mL の量の H E K 293 F 細胞又は C H O - S 中で一時的に行われた。採取した上清をタンパク質 A クロマトグラフィで精製し、精製タンパク質を、それらの親和性及び機能活性について評価した。更に、精製タンパク質を、S D S - P A G E 、 S E - H P L C 、及び相互作用クロマトグラフィ（C I C ）による生物物理学的特徴付けに供した。理論的等電点（p I ）を、各変異体についても計算した。パイロットスケールでの特徴付けから、最終的な有力候補の組を W A V E 生物反応器にトランスフェクトし、タンパク質 A クロマトグラフィ（chromatography）で精製した。

10

【0117】

結合性評価

ヒト及びカニクイザル T F の両方に対する親キメラ抗体、M 1、及び H F A 変異体の結合は、化学発光による検出を用いる直接 E L I S A 形式として行われた。粗上清中のライブラリ変異体の一次スクリーニングでは、試料又は対照は、消費 F r e e S t y l e 293 H E K 培地（G i b c o ）内で 50 n g / m L に正規化され、単一濃度測定で検定された。本発明のアッセイでは、抗体の濃度は 5 n g （0.1 mL 使用）であり、T F E C D 及び抗原は、H i s 6 - T F - E C D₁₋₂₁₉ であり、最終濃度 10 n g / ウェルで用いられた。

20

【0118】

全コンビナトリアルライブラリのスクリーニングの結果は、H 14 を除いて他の全ての V H が、様々な強度で h T F に結合したことを示した。親 10 H 10 （H 13、L 1）、特に一部の L 3 及び L 5 の組み合わせよりも強い結合シグナルを与えたいくつかの H F A 変異体が存在する。H 18 及び H 21 は、ヒト抗原及び V H に結合せず、カニクイザル抗原に対するわずかな結合を示した。V L の中でも、L 6 及び L 8 はいずれの抗原にも結合せず、他の V L は検出可能レベルで結合した。H 14 及び L 8 もまた、任意の V L と組み合わせられると低発現を示した。表 4 に示されるように、T F 結合を示したのは、77 個の抗体（V H、V L の組み合わせ）のうち 50 個であった。

30

【0119】

【表 4 - 1】

表 4. ヒト F R 変異体に結合する 50 個のヒト T F の V H 及び V L 配列 I D

抗体ID	軽鎖ペプチドID	軽鎖配列番号	重鎖ペプチドID	重鎖配列番号
M1	L1	5	H13	4
M9	L2	22	H15	12
M10	L3	23	H15	12
M11	L4	24	H15	12
M12	L5	25	H15	12
M14	L7	26	H15	12
M16	L2	22	H16	13
M17	L3	23	H16	13
M18	L4	24	H16	13
M19	L5	25	H16	13
M21	L7	26	H16	13
M23	L2	22	H17	14
M24	L3	23	H17	14
M25	L4	24	H17	14
M26	L5	25	H17	14
M28	L7	26	H17	14
M30	L2	22	H18	15
M31	L3	23	H18	15
M32	L4	24	H18	15
M33	L5	25	H18	15
M35	L7	26	H18	15
M37	L2	22	H19	16
M38	L3	23	H19	16
M39	L4	24	H19	16
M40	L5	25	H19	16
M42	L7	26	H19	16

10

20

30

40

【 0 1 2 0 】

【表 4 - 2】

(表 4 の続き)

抗体ID	軽鎖ペプチドID	軽鎖配列番号	重鎖ペプチドID	重鎖配列番号
M44	L2	22	H20	17
M45	L3	23	H20	17
M46	L4	24	H20	17
M47	L5	25	H20	17
M49	L7	26	H20	17
M51	L2	22	H21	18
M52	L3	23	H21	18
M53	L4	24	H21	18
M54	L5	25	H21	18
M56	L7	26	H21	18
M58	L2	22	H22	19
M59	L3	23	H22	19
M60	L4	24	H22	19
M61	L5	25	H22	19
M63	L7	26	H22	19
M65	L2	22	H23	20
M66	L3	23	H23	20
M67	L4	24	H23	20
M68	L5	25	H23	20
M70	L7	26	H23	20
M72	L2	22	H24	21
M73	L3	23	H24	21
M74	L4	24	H24	21
M75	L5	25	H24	21
M77	L7	26	H24	21

10

20

30

40

【 0 1 2 1 】

E L I S A を用いた T F に対する相対結合親和性に基づき、発現の増強及び精製のための 10 個の変異体を選択した。B I A c o r e により測定した K_D の要約、E L I S A アッセイデータ、全細胞結合、50 nM の F V I I a 及び 2 μ g / mL の M A b による M D A - M B 2 3 1 細胞からの I L - 8 誘導の阻害、及び T h e r m o f l o u r アッセイにより測定された T_m が、表 5 に示されている。

【 0 1 2 2 】

【表 5】

表 5.

MAb	VH	VL	Biacore K_D (nM) ヒト カニクイザル		Hu TF EC50 (ng/mL)	カニクイザルTF EC50 (ng/mL)	全細胞結合、 平均(%)	IL-8誘導、 平均(%)阻害	Tm °C
M1	H13	L1	0.56	1.34	11.71	17.33	101%	106%	74.18
M10	H15	L3	0.77	1.57	10.47	19.63	98%	104%	75.01
M11	H15	L4	0.37	1.52	9.94	18.69	114%	93%	75.86
M12	H15	L5	0.55	2.24	10.05	22.8	124%	102%	79.72
M16	H16	L2	0.66	1.96	9.31	23.39	109%	109%	78.56
M19	H16	L5	0.41	2.81	9.22	29.61	111%	106%	77.58
M58	H22	L2	0.2	1.18	9.03	19.81	94%	106%	82.18
M59	H22	L3	0.4	1.28	8.8	18.67	95%	103%	75.94
M60	H22	L4	0.47	1.31	8.35	17.79	101%	106%	76.77
M61	H22	L5	0.21	1.71	8.3	24.07	111%	112%	81.16
M9	H15	L2	0.61	1.55	9.8	19.93	107%	106%	79.43

10

【0123】

新規ヒトMAb変異体のいくつかは、M1(10H10可変鎖：H13及びL1を有する)よりもTFに対して高い親和性を示し、いくつかは低かった。M61の K_D (0.21nM)は、マウス親MAb(K_D = 0.56nM)の K_D より2.5倍低い。表5のデータは、共に同じ生殖系列遺伝子(IGHV5-a)から構築された、H15を含む4つのMabと、H22を含む4つのMabとを含む。H22、及びより短いH-CDR2を有するMabは概ね、対応するH15を有する分子よりも高い結合親和性を示した。新規変異体の多くはカニクイザルTFに結合したが、カニクイザル結合親和性のランクは、ヒトTFに対する結合のランクと異なった。

20

【0124】

マウス10H10 MabのTmは74.2であった。選択された分子のTmは、75~82.2のTmの範囲であった。このように、HFAプロセスは、ヒト及び非ヒト霊長類TFに対する高い結合親和性を有する新規Fd領域を有する抗体構築物の産生をもたらし、更に、ヒトドメインを有する安定した完全抗体変異体を産生させた。

30

【0125】

新規抗体構築物の追加的特徴付けは、その抗体が、ヒト腫瘍組織由来の細胞(MDA-MB231乳癌由来細胞)の天然TFを認識することができ、また、MDA-MB231からのIL-8の誘導抑制によって測定した場合、VIL-8aの存在下でTFシグナル伝達を低減することができることを立証した。

【0126】

更なる生物物理学的特徴(溶解度及び相互作用クロマトグラフィ)及びアッセイの結果から、可変領域H22及びL3から成るM59を、親和性成熟のために選択するよう導かれた。

【0127】

実施例4：抗体成熟

40

Fabライブラリは、米国特許第6,472,147号(Scrrips)及び、国際公開特許第2009/085462号として発行された本出願人による同時継続中の出願に記載されている、pIXファージディスプレイシステムにおいて、制限酵素部位に若干の変更を加えて構築された。

【0128】

hTF複合体を形成する10H10の実験的構造に基づいて、VL及びVHの両方の多様化のため、H116(配列番号19)及びL3(配列番号23)の対合であるM59を開始する2つのライブラリを設計した。これらライブラリは、多様化の標的となる位置に関して異なり、並びに標的位置を多様化するために用いられるアミノ酸が異なっていた。一方のライブラリは、以前にTFと接触していることが示された各CDRを示す合計で8

50

つの位置を多様化した。設計する際には、L 1、L 3、H 1、及びH 2に重点が置かれた。L 2の接触位置は多様化されず、H 3の位置のほとんども多様化されなかった。C y s及びM e tなどの不安定な又は反応性のアミノ酸は避けた。

【0129】

2つ目のライブラリは、結合及び非結合F a b結晶構造の溶媒接触性を算定することによって決定された抗原結合部位の周囲のアミノ酸を多様化するように設計された。結合すると埋もれるが、なおも溶媒分子と接触している残基は、多様化の標的となった。合計で12個の残基(V_Lで6及びV_Hで6)を、この方法を用いて特定し、A r g (R)、A s n (N)、A s p (D)、G l y (G)、H i s (H)、S e r (S)、T r p (W)、及びT y r (Y)を含む8個のアミノ酸の縮小集合で多様化した。結合したライブラリのサイズは、8¹²又は10¹⁰個の変異体であると予想され、標準的ライブラリ限定クローニング技術を用いてカバーされ得る。

10

【0130】

C D R接触残基ライブラリでは、位置は、ヌクレオチド二量体(N - 二量体)合成法を用いて、15個のアミノ酸(全てM e t、C y s、L y s、G l n、及びG l uを除く)で多様化された。

【0131】

遅い解離速度(解離速度値の増加)又は早い結合速度(結合速度値の減少)を選択するか、又はその両方を用いることによって親和性を高めることを目的として、ファージコートタンパク質I XにディスプレイされるF a bライブラリを、当該技術分野において周知のパンニング法に従って、ビオチン化h T - E C Dに対してパンニングした。パンニングは、ヒト及びカニクイザルT Fの両方を標的抗原として用いた。ファージは、ヘルパーファージ感染によって生成された。パインダーは、ビーズ/抗原/ファージ複合体を形成するS Aビーズの添加により回収された。最終洗浄の後、対数増殖期T G - 1大腸菌細胞の感染により、ファージをレスキューした。ファージを再度生成し、更なる一連のパンニングに供した。

20

【0132】

p I X遺伝子をN h e I / S p e I消化によって、選択したクローンから切除し、再連結の後、D N AをT G - 1細胞に転換し、L B / 寒天平板培地で一晚増殖させた。一晚培養物は、(i)コロニーP C R及びV - 領域のシーケンシング、並びに(ii)可溶性F a b産生で用いられる。可溶性のF a bタンパク質を、多クローン性抗F d (C H 1)抗体によりプレート上に捕捉した。適切な洗浄及び阻害の後、ビオチン化h T Fを0.2 n M濃度で加え、ビオチン化h T Fを、上記と同様に、H R P共役ストレプトアビジン及び化学発光読取値によって検出した。このh T F濃度で、親の結合百分率として定義される(全てのプレートに対照として存在する親F a bを100%結合と定義する)F a b変異体のランク付けが可能である。

30

【0133】

この基準により、M 5 9 F a bと比べて100%以上の高さでヒトT Fに結合する3 8 1 F a bが選択された。

【0134】

V領域(配列番号4又は19)の位置27及び30~32に対応する重鎖C D R 1(配列番号6)のY 2、I 5、T 6、及びY 7に一定の改変を示した、選択したクローンの解析は、成功であった。接触残基ではないが、位置27のみが芳香族アミノ酸(T y r及びP h e)を受容した。10 H 1 0 F a bにおけるヒトT F配列番号1(図1)のK 6 8、T 1 0 1、Y 1 0 3、及びL 1 0 4と直接接触する位置30~32に関し、位置30は比較許容性であるが、31及び32は制限的であった(表6)。

40

【0135】

10 H 1 0 F a bのヒトT F配列番号1(図1)のP 1 9 4、S 1 9 5、及びT 1 9 7と直接接触する残基である、配列番号4又は19の位置L 5 2、S 5 5、及びS 5 7に対応するL 3、S 6、及びS 8(配列番号7)におけるL - C D R 2の改変では、置換許

50

容がいくぶん制限された組が存在した。

【 0 1 3 6 】

H - C D R 3では、ヒト T F - E D (配列番号 1) の F 1 4 7、G 1 4 8、及び K 1 4 9 と直接接触する、配列番号 4 又は 1 9 の N 1 0 4 に対応する N 6 位置 (配列番号 8) は、制限されていることが明らかであった。

【 0 1 3 7 】

ファージパニング、及び 0 . 2 n M のヒト T F - E C D 1 ~ 2 1 9 を用いる固相捕捉アッセイにおける同等な結合親和性のスクリーニングによって選択されたライブラリ位置のそれぞれで、可能となるアミノ酸改変が表 6 に示されている。

【 0 1 3 8 】

【 表 6 】

表 6.

	HC_CDR1				HC_CDR2						HC_CDR3	
抗原との接触	なし	あり	あり	あり	あり	なし	あり	なし	あり	なし	あり	なし
HC(配列番号19)における位置	Y27	I30	T31	Y32	L52	G54	S55	G56	S57	N59	N104	S105
配列多様性	Y	I	T	Y	L	G	S	G	S	N	N	S
	F	V	P	H	I	W	T	N	Y	V	S	A
		G	A	F	V	A	V	S	W	T		
		N	S			H	P	L	F	L		
		A				V		R	A	I		
		T				Y			H	H		
		R				F				W		
		S								A		
		L								D		
		P								R		
		Y								F		
		A										
		D										
		H										

【 0 1 3 9 】

選択されたクローンの V L に関し、エピトープマッピングではヒト T F 配列番号 1 (図 1) の E 1 7 4、D 1 2 9、S 1 4 2、R 1 4 4、及び D 1 4 5 と接触して示される、L C 可変領域 (配列番号 5 又は 2 3) の位置 3 2、3 3、3 4 及び 3 6 に対応する L - C D R 1 (配列番号 9) の S 9、G 1 0、N 1 1、及び K 1 3 における改変が、比較的許容性であるとして図 7 に示されている。L - C D R 2 に関し、配列番号 5 又は 2 3 の残基 W 1、位置 5 6 (K a b a t 残基番号 5 0) は接触残基である一方、残基 E 6 1 は、置換に対する制限された許容性を示した。ヒト T F 配列番号 1 (図 1) の K 1 4 9、D 1 5 0、N 1 7 1、及び T 1 7 2 と直接接触する、配列番号 5 又は 2 3 の残基位置 9 7 ~ 1 0 0 に対応する軽鎖 C D R 3 (配列番号 9) では、位置 D 9 7 (K a b a t 位置 9 1) は制限された。ヒト T F - E C D 1 ~ 2 1 9 クローン許容性アミノ酸使用に対する親和性結合に基づく選択が、表 7 にまとめられている。

【 0 1 4 0 】

10

20

30

40

【表 7】

表 7.

	LC-CDR1					LC-CDR2		LC-CDR3			
抗原との接触	あり	あり	あり	あり	あり	あり	なし	あり	あり	あり	あり
LCにおける位置 (配列番号23)	S31	S32	G33	N34	K36	W56	E61	D97	Y98	T99	Y100
配列多様性	A	A	A	A	A	A	A	D	A	A	F
	D	F	F	F	H	G	D		D	D	H
	F	G	G	G	I	H	E		F	F	I
	G	H	H	I	L	W	G		G	G	L
	H	I	I	L	N		H		H	H	N
	I	L	L	N	P		N		I	L	W
	L	N	N	P	R		P		L	N	Y
	N	P	P	R	S		S		N	R	
	P	R	R	S	V		T		S	S	
	S	S	S	T			V		T	T	
	T	T	T	V			Y		V	V	
	V	V	V	Y					Y	Y	
	W	W	W								
	Y	Y	Y								

10

20

30

【0141】

要約すると、一連の親和性が改善された Fab 変異体は、可変ドメイン H22 (配列番号 19) 及び L3 (配列番号 23) に対する、抗原ヒト TF との接触位置にあるアミノ酸の CDR 位置の直接多様化、それに続くパニング、及び出発配列と比べて同等又はそれ以上の結合のスクリーニングアッセイにおける親和性を有する種の選択に基づくファージライブラリの構築を通して特定された。

【0142】

全体的としては、設計された HFA ライブラリから選択される VH 及び VL の対に対する親和性の穏やかな増加が得られた。しかしながら、接触残基が多様化された VH ライブラリから、ストリンジェントなファージパニングの後に親アミノ酸が再度選択された。構造解析から説明されるように、2つのパラトープ位置だけが有意に改変された。親和性成熟中に CDR に導入されたこれら 2つのアミノ酸置換、T31P 及び S57F は、接触残基に関与する。5倍の親和性改善は、TF の S195 と接触する F57 の接点が増加したことに起因し得る。VL と TF の相互作用は塑性であり、接触残基並びに隣接残基に対する多くの改変を可能にするように思われる。

40

【0143】

381個の VH と VL の対の中から、43個を更なる特徴付けのために選択した。選択した 43個の MA b は、27個の異なる VH、及び 8個の VL を示し (重鎖及び軽鎖配列の対に関しては表 8 を参照のこと)、3つのサブグループに分類することができる。グループ 1 は、同じ軽鎖を有する変異体であり (L3、配列番号 23)、グループ 2 及びグル

50

ープ 3 は、2 つの異なる重鎖と対になった 8 つの軽鎖によって示される（それぞれ、H 1 1 6 及び H 1 7 1、配列番号 1 3 1 及び 6 7 ）。

【 0 1 4 4 】

【 表 8 - 1 】

表 8.

MAb ID	LC ID	LC配列番号	HC ID	HC配列番号
M1583	L3	23	H177	129
M1584	L3	23	H173	130
M1585	L3	23	H139	131
M1586	L3	23	H164	132
M1587	L3	23	H116	133
M1588	L3	23	H179	134
M1589	L3	23	H187	135
M1590	L3	23	H117	136
M1591	L3	23	H122	137
M1592	L3	23	H165	138
M1593	L3	23	H171	139
M1594	L3	23	H158	140
M1595	L3	23	H160	141
M1596	L3	23	H185	142
M1597	L3	23	H134	143
M1598	L3	23	H137	144
M1599	L3	23	H130	145
M1601	L3	23	H105	146
M1602	L3	23	H106	147
M1604	L3	23	H138	148
M1605	L3	23	H168	149
M1606	L3	23	H181	150

【 0 1 4 5 】

10

20

30

【表 8 - 2】

(表 8 の続き)

MAb ID	LC ID	LC配列番号	HC ID	HC配列番号
M1607	L3	23	H189	151
M1610	L3	23	H115	153
M1611	L3	23	H128	154
M1612	L3	23	H133	155
M1613	L3	23	H136	156
M1638	L138	157	H22	19
M1639	L320	158	H22	19
M1640	L327	159	H22	19
M1641	L335	160	H22	19
M1642	L369	161	H22	19
M1643	L162	162	H22	19
M1644	L225	163	H22	19
M1645	L283	164	H22	19
M1646	L138	157	H171	139
M1647	L320	158	H171	139
M1648	L327	159	H171	139
M1649	L335	160	H171	139
M1650	L369	161	H171	139
M1651	L162	162	H171	139
M1652	L225	163	H171	139
M1653	L283	164	H171	139

10

20

30

40

【 0 1 4 6 】

M 5 9 のような同じ軽鎖を有する 2 7 個の抗体のグループのうち (L 3 、 配列番号 2 3) 、 2 7 の重鎖は、H - C D R 1 の 3 つの位置で異なっており (G Y T F X ₁ X ₂ X ₃ W I E) (配列番号 8 3) 、ここで、X 1 は、A、D、G、I、L、N、P、R、S、T、V、Y から選択され、X 2 は、A、P、S、及び T から選択され、X 3 は、F、H、及び Y から選択される；(H - C D R 1 が G F T F I T Y W I A (配列番号 8 1) である H 1 8 9 を除く) 、H - C D R 2 は 4 つの位置で異なっており (D I X ₁ P G X ₂ G X ₃ T X ₄) (配列番号 1 0 7) 、ここで、X 1 は I 及び L から選択され、X 2 は S 及び T から選択され、X 3 は、A、F、H、及び w から選択され、X 4 は、D、H、I、L、及び N から選択される；(H - C D R 2 が D I L P A S S S T N (配列番号 1 0 5) である H 1 8 9 を除く) 、一方、H - C D R 3 及び F R は、H 2 2 配列 (配列番号 1 9) から変更されず、S G Y Y G N S G F A Y (配列番号 8) であった。これら 2 7 個の M A b の重鎖の特有の組成は次の通りである (表 9) 。

【 0 1 4 7 】

【表 9】

表 9.

MAb	LC 配列番号	HC ID	HC 配列番号	HC-CDR 1	H-CDR1 配列番号	HC-CDR 2	H-CDR2 配列番号
M1583	23	H177	129	GYTFGPYWIE	82	DIIPGSGWTN	100
M1584	23	H173	130	GYTFVTVWIE	77	DILPGTGYTV	99
M1585	23	H139	131	GYTFSPFWIE	70	DIIPGTGYTN	93
M1586	23	H164	132	GYTFPTYWIE	73	DIIPGTGWTN	95
M1587	23	H116	133	GYTFIPYWIE	63	DILPGSGFTT	86
M1588	23	H179	134	GYTFGPFWIE	78	DILPGSGYTN	101
M1589	23	H187	135	GYTFGPHWIE	80	DILPGTGYTN	104
M1590	23	H117	136	GYTFLPYWIE	64	DIIPGTGFTN	88
M1591	23	H122	137	GYTFRPYWIE	65	DIIPGTGYTN	93
M1592	23	H165	138	GYTFSPHWIE	74	DILPGSGYTI	96
M1593	23	H171	139	GYTFAPYWIE	67	DILPGTGFTT	98
M1594	23	H158	140	GYTFPPYWIE	72	DILPGTGYTV	99
M1595	23	H160	141	GYTFYPYWIE	72	DILPGTGFTN	94
M1596	23	H185	142	GYTFTPYWIE	68	DILPGSGHTT	103
M1597	23	H134	143	GYTFSSYWIE	70	DILPGTGATH	90
M1598	23	H137	144	GYTFTPYWIE	68	DILPGTGYTV	99
M1599	23	H130	145	GYTFGPYWIE	82	DILPGTGYTL	89
M1601	23	H105	146	GYTFGPYWIE	82	DILPGTGYTV	99
M1602	23	H106	147	GYTFDAHWE	62	DILPGSGFTD	84
M1604	23	H138	148	GYTFAPYWIE	76	DILPGTGYTW	92
M1605	23	H168	149	GYTFGTYWIE	75	DILPGTGHTT	97
M1606	23	H181	150	GYTFIPHWIE	79	DILPGSGWTN	102
M1607	23	H189	151	GFTFITYWIA	81	DILPASSSTN	105
M1610	23	H115	153	GYTFAPYWIE	76	DIIPGTGYTT	85
M1611	23	H128	154	GYTFGPYWIE	82	DILPGSGYTT	88
M1612	23	H133	155	GYTFNPYWIE	66	DILPGTGYTN	104
M1613	23	H136	156	GYTFSSHWE	69	DILPGSGFTH	91

10

20

30

【 0 1 4 8 】

H 1 7 1 (配列番号 1 3 9) は、H 1 1 6 と比べると H - C D R 1 及び H - C D R 2 に更なる改変を含み、I 3 1 A 及び S 5 5 T である。

【 0 1 4 9 】

M a b の 2 つのグループは、2 つの異なる H C、つまり、H 2 2 (配列番号 1 9) 又は重鎖 H 1 7 1 (配列番号 1 3 9) の一方と対になる 8 つの L C によって表わされる (表 1 0)。8 つの軽鎖は全て、L 3 の R F を有し (I G K V 2 4 0 _ O 1 由来)、並びに、L - C D R 1 の 5 つの位置で配列改変を有し (K S S Q S L L X₁ X₂ X₃ X₄ Q X₅ N Y L T (配列番号 1 1 6)、ここで、X₁ は、F、P、S、T、W、及び Y から選択され、X₂ は、F、S、T、R、及び V から選択され、X₃ は、A、G、P、S、W、Y、及び V から選択され、X₄ は、G、N、及び T から選択され、X₅ は、K、R、及び S から選択される)、L - C D R 2 の 2 つの位置で改変を有し (X₁ A S T R X₂ S (配列番号 1 2 0)、ここで、X₁ は、H 及び W から選択され、X₂ は、D、E 及び S から選択される)、また L - C D R 3 の 4 つの位置で改変を有する (Q N D X₁ X₂ X₃ P X₄ T (配列番号 1 2 8)、ここで、X₁ は、D、F、及び L から選択され、X₂ は、S、T、及び Y から選択され、X₃ は、W 及び Y から選択され、X₄ は、L 及び M から選択される)。8 つの L C の組成は表 1 0 に示されている。

40

【 0 1 5 0 】

【表 10】

表 10.

LC ID	LC 配列番号	L-CDR1の 配列番号	L-CDR1の配列	L-CDR2の 配列番号	L-CDR2の 配列	L-CDR3の 配列番号	L-CDR3の配列
L138	156	108	KSSQSLLWFVNQKNYLT	117	HASTRES	122	QNDDSYPLT
L162	161	109	KSSQSLLYVYGQKNYLT	10	WASTRES	121	QNDFSWPLT
L225	162	110	KSSQSLLFRPTQKNYLT	10	WASTRES	122	QNDDSYPLT
L283	163	111	KSSQSLLYTSNGKNYLT	10	WASTRES	123	QNDDYWPLT
L320	157	112	KSSQSLLYSGNQKNYLT	118	WASTRSS	124	QNDDTYPMT
L327	158	113	KSSQSLLPSWNQSNYLT	10	WASTRES	125	QNDFTYPLT
L335	159	114	KSSQSLLFSANQKNYLT	119	WASTRDS	126	QNDDTYPLT
L369	160	115	KSSQSLLTSYNGKNYLT	10	WASTRES	127	QNDLTYPLT

10

【0151】

これら M A b のいくつかを、更なる特徴付けに供し、生体内異種移植モデルで試験した（実施例 5）。

【0152】

実施例 5：M A B の特徴付け

単一 L C 可変領域（L 3、配列番号 23）及び単一 H C 可変領域（H 22、配列番号 19）を含み、いくつかの C D R 残基に異なる残基を有する、M 59 に基づく変異体の、ヒトフレームワーク適応及びライブラリ再選択の後、この新規 M a b を、生物物理学的及び生理活性アッセイに供し、また、異なるパラトープ残基を有する一対（paring）、M 1587 を用いて、T F - E C D に対する 10H10 F a b の結合に関して初めに特徴付けされたエピトープ（実施例 2）が変わったどうかを再度調べた。

20

【0153】

ヒト T F E C D：M 1587 接点

10H10 C D R、M 1587（L 3 及び H 116）に基づいたヒトに適合しかつ親和性の成熟抗体と、T F E C D との共結晶化を、M 1587 - F a b：T F 複合体が、16%の P E G 3350、0.2 M の酢酸アンモニウム、0.1 M の酢酸ナトリウム、p H 4.5 を含有する溶液から結晶化されたことを以外は、10H10（実施例 3）と同様の方法で行った。

【0154】

ヒト T F E C D の共結晶構造と親和性成熟 M 1587 F a b の共結晶構造との比較は、10H10 のヒト適合及び親和性成熟は、図 2 に示される抗体エピトープのフットプリントを変化させず、また C D R のコンフォメーションも変化させなかったことを示す。3 つのアミノ酸置換（T 31P、S 57F、及び N 59T）は、H 116（配列番号 133）の残基 31 及び 57 に接触残基（T 31P 及び S 57F である）を含む、ヒトフレームワーク適合及び親和性成熟（配列番号 6 及び 7 は配列番号 63 及び 86 で置き換えられた）の間に、H - C D R 1 及び H - C D R 2（それぞれ、配列番号 6 及び 27、実施例 2 に記載の C D R 定義を使用）に導入された。親和性改善は 5 倍であり、これは、T F の S 195 と接触する F 57 の接点が増加したことに起因し得る。たとえ H - C D R 1 及び H - C D R 2 パラトープ残基に変更がなされたとしても、H F A 及び親和性成熟中にエピトープが保存されることが、ヒト T F E C D と M 1587 F a b のとの構造により確認された。

30

40

【0155】

生物物理学的及び生物学的アッセイの結果

これら抗体の、B i a c o r e による K D 分析（表 11）、ヒト T F によるヒト血漿の凝固時間（表 12）、及び F V I I a で刺激された M D - M B - 231 細胞からの I L 8 放出に関する E C 50（表 13、14、及び図 5）に関する要約データが、以下に示されている。

【0156】

43 個の選択された親和性成熟 M a b に関し、マウス 10H10、及び M A b（M 1）と、10H10 からの非修飾 C D R を有する選択されたヒトフレームワーク適合変異体と

50

のキメラバージョンのために生成されたデータを含む K_D が (M 数は 100 未満)、表 11 に示されている。したがって、ヒトフレームワーク選択と CDR 残基置換との組み合わせは、 K_D が 80 ~ 950 pM の範囲であり、解離速度 (K_{off}) が 2.2×10^{-5} 秒⁻¹ ~ 2.6×10^{-3} 秒⁻¹ の範囲であり、結合速度 (K_{on}) が 10^4 M⁻¹ 秒⁻¹ ~ 2.3×10^5 M⁻¹ 秒⁻¹ の範囲である、ヒト抗体を産生させた。新規 Mab は、最初のマウス 10H10 又はキメラ構築物の値と比べて、最大で 10 倍も小さい平衡解離定数 (K_D) (0.77 nM ~ 0.08 nM) を有し、より速い結合速度 ($K_{on} > 10^5$ M⁻¹ 秒⁻¹) を有し、又はより遅い解離速度 ($K_{off} = 10^5$ 秒⁻¹) を示す。これら特性を用いて、滞留時間又は組織を通過する能力のいずれかが所望される、特定用途の Mab を選択する際に利益をもたらすことができる。

10

【0157】

【表 11 - 1】

表 11.

抗体ID	$k_a(1/Ms)10^4$	$k_d(1/s)10^{-4}$	$K_D(nM)$
M1639	4.69	3.71	0.08
M1645	5.21	4.12	0.08
M1647	3.87	4.02	0.1
M1652	4.44	4.82	0.11
M1641	4.56	5.46	0.12
M1644	5.81	7.19	0.12
M1587	15.7	0.23	0.14
M1604	15.2	0.22	0.14
M1653	2.31	3.76	0.16
M1649	3.85	6.46	0.17
M1593	13.8	0.25	0.18
M1606	16.55	0.29	0.18
M1643	4.52	8.13	0.18
M1646	3.5	6.47	0.19
M1650	2.33	4.5	0.19
M1651	2.01	3.88	0.19
M58	9.48	0.18	0.19
M1638	4.89	9.92	0.2
M61	9.41	0.19	0.2
M1584	18.4	0.56	0.3
M1611	19.2	0.59	0.31
M1596	13.1	0.43	0.33
M1598	19.2	0.63	0.33
M1601	13.7	0.46	0.33
M1588	17.3	0.6	0.35
M1594	12.4	0.43	0.35
M1607	17	0.6	0.35
M11	9.73	0.35	0.36
M1612	16.5	0.63	0.38
M1595	17.6	0.68	0.39
M1599	13.8	0.53	0.39

20

30

40

【0158】

【表 1 1 - 2】

(表 1 1 の続き)

抗体ID	$k_a(1/\text{Ms})10^4$	$k_d(1/\text{s})10^{-4}$	$K_D(\text{nM})$
M1589	17. 4	0. 7	0. 4
M1592	19. 1	0. 77	0. 4
M1591	13. 4	0. 56	0. 41
M19	9. 88	0. 41	0. 41
M59	9. 33	0. 38	0. 41
M1583	23. 9	1	0. 42
M60	9. 75	0. 46	0. 47
M1585	18. 5	0. 9	0. 49
M46	9	0. 44	0. 49
M1610	18. 4	1	0. 54
M37	6. 9	0. 37	0. 54
M12	9. 22	0. 51	0. 55
M9	9. 73	0. 59	0. 61
M1602	13. 2	0. 82	0. 62
M1605	13. 5	0. 86	0. 64
M16	10. 2	0. 67	0. 66
M1590	15. 9	1. 09	0. 69
M1648	1. 02	7. 45	0. 73
M1640	1. 02	7. 8	0. 76
10H10	8. 88	0. 68	0. 76
M1	9. 52	0. 74	0. 77
M10	9. 26	0. 71	0. 77
M1586	18. 4	1. 43	0. 78
M1597	8. 34	0. 66	0. 8
M1613	7. 57	0. 7	0. 92
M1642	2. 74	26. 1	0. 95
M42	8. 04	0. 82	1. 02
M26	8. 26	0. 93	1. 13
M68	6. 43	1. 03	1. 6
M51	8. 11	2. 35	2. 9
M52	7. 4	2. 64	3. 57

【 0 1 5 9 】

凝固

新規 M a b は、カルシウム及び外から加えられたヒト T F の存在下で、生体外で測定した場合に、ヒト血漿の凝固を阻害せずにヒト T F に結合する能力によって特徴付けられる (表 1 2)。1 7 個の H F A (M 数は 1 0 0 未満) 変異体及び 3 8 個の親和性成熟変異体 (M 1 5 8 3 以上) を検定し、T 1 / 2 最大 (最大光学密度の 5 0 % に達する時間 (秒)) を報告した。

全て、1 0 H 1 0 (表 1 2) で観察されたのと同様の応答を示し、T 1 / 2 最大の値は 2 0 5 秒未満であり、このことは、 159 ± 17 ($n = 14$) であった抗体のない溶媒対照群と比較した場合に、これら抗体が凝固時間を長引かせないことを示している。前述したヒト T F 結合抗体であり (米国特許第 7 6 0 5 2 3 5 B 2 号)、T F に対する F X の結合を阻害するマウス抗体 5 G 9 由来の C N T O 8 6 0 は、凝固を長引かせ、同じアッセイで 1 8 0 0 秒以内に決して凝固に達しない。実施例 4 において変化した C D R を有する

と記載された43個のMAbのうち5個は、2mg/mL未満の開始濃度を有したので、凝固アッセイで試験しなかった。M1、M59、及びCNT0860の値は、複数回の試験にわたって平均化された。

【0160】

【表12】

表12.

MAb ID	T1/2最大 (秒)(n=2)	SD (秒)	抗体ID	T1/2最大 (秒)(n=2)	SD (秒)
10H10*	191	2	M1592	163	6
M1*	173	5	M1593	164	7
CNT0860*	>900	11	M1594	165	5
M9	198	3	M1595	163	5
M10	196	6	M1596	163	5
M11	195	5	M1597	157	6
M12	197	7	M1598	155	4
M16	198	5	M1599	151	6
M19	199	5	M1601	180	6
M26	186	4	M1602	163	7
M37	196	5	M1604	165	5
M42	202	7	M1605	160	5
M46	195	6	M1606	157	5
M51	207	7	M1607	152	6
M52	201	6	M1610	164	4
M58	192	5	M1611	154	10
M59*	169	4	M1612	163	11
M60	180	4	M1613	165	11
M61	186	10	M1638	163	12
M68	207	11	M1639	167	5
M1583	189	8	M1640	168	9
M1584	199	6	M1641	162	9
M1585	205	12	M1642	166	6
M1586	200	7	M1643	148	6
M1587	202	10	M1644	150	6
M1588	207	10	M1645	154	4
M1589	202	3	M1647	160	6
M1590	180	5	M1648	161	3
M1591	154	6	M1650	150	6

10

20

30

40

50

【0161】

シグナル阻害活性

新規MAbは、TF/FVIIa複合体を介してシグナル伝達を阻害する能力の観点からも説明され得る。乳癌細胞のTF/VIIa/PAR2シグナル伝達は、VEGF25

、C y r 6 1、V E G F - C、C T G F、C X C L 1、及びI L - 8などの血管新生促進因子の広範なレパートリーを誘導する。F V I I aが、T Fを発現するヒト乳癌細胞株であるM D A - M B - 2 3 1 ???において検出可能なI L - 8を誘導することは、既に報告されている(A l b r e k t s e n ら、J T h r o m b H a e m o s t 5 : 1 5 8 8 ~ 1 5 9 7 , 2 0 0 7)。したがって、このアッセイをバイオアッセイとして用いて、T F / V I I aの誘導によるI L - 8の産生を阻害する変異体抗体の能力を評価した。

【 0 1 6 2 】

このアッセイの詳細は本明細書において上記されており、実施例3のH F A (M 1 0 ~ M 6 8) 変異体のうちの19、及び実施例4のC D R 変異体のうちの29を試験した結果を、単一濃度(0 . 5 マイクログラム / m L) のT F にてI L - 8 産生を阻害する能力について検証した。組織因子に結合しない抗R S V 抗体(B 3 7) を、陰性対照として用いた。H F A M a b の多くは、この濃度で、I L - 8 誘導を67%を超えて阻害することができた(表13)。図5は、10H10のM A b (それぞれ配列番号6及び7) と比較した場合の、L3軽鎖(配列番号23) を共有し、かつH - C D R 1 又はH - C D R 2 に置換を有する27のM A b によるI L 8 放出の相対的阻害を示す。更に、これらのうち4つ(M 1 5 8 4、M 1 6 1 1、T F 7 M 1 6 1 2、及びT F 7 M 1 6 0 7) は、M と共に十分な滴定I L - 8 誘導アッセイに供された。計算された相対I C 5 0 値は、親和性が改善した変異体が、10H10のマウス - ヒトキメラであるM 1 と比べてより強力であるという知見を支持している(表14)。実施例4に記載された親和性成熟抗体の他の親和性成熟群は、同様の結果をもたらした。

【 0 1 6 3 】

10

20

【表 1 3】

表 1 3.

変異体ID	IL-8阻害(%)	SD
10H10	93. 9	8. 0
M1	96. 1	7. 6
M9	102. 7	4. 5
M10	90. 7	0. 0
M11	87. 9	9. 4
M12	98. 6	3. 1
M16	98. 3	6. 2
M19	87. 3	5. 8
M26	79. 1	1. 3
M37	71. 2	11. 6
M42	86. 0	20. 1
M46	82. 5	10. 7
M51	71. 5	9. 4
M52	67. 7	4. 0
M58	88. 5	8. 5
M59	83. 8	8. 0
M60	99. 6	4. 5
M61	106. 8	4. 9
M68	89. 8	11. 1

10

20

30

【 0 1 6 4 】

【表 1 4】

表 1 4.

MAb ID	IC50(ug/mL)
M1	0. 527
M59	0. 382
M1584	0. 332
M1607	0. 395
M1611	0. 398
M1612	0. 413

40

【 0 1 6 5 】

実施例 6：抗体の抗腫瘍活性

M D A - M B - 2 3 1 を有するマウス異種移植モデル

50

M D A - M B - 2 3 1 ヒト乳癌細胞を、10%のF B S 及び1%のL N N を有するD M E M 培地で培養し、トリプシン処理によって対数期に採取し、滅菌無血清D M E M 培地に 5×10^7 細胞/mLで再懸濁させた。20匹の雌S C I D ベージュ(C . B - 1 7 / I c r C r l - s c i d - b g B R) マウスをCharles River Laboratoriesから入手し、実験に先立って14日間順応させた。生後約8週目に、マウスの右腋窩乳腺脂肪体に 2.5×10^6 M D A - M B - 2 3 1 細胞を埋め込んだ。腫瘍のサイズが約 100 mm^3 になったとき、マウスを腫瘍サイズによって治療群に階層化した(N = 10 / 群)。階層化した日に、10 mg / 体重1 kg のD u l b e c c o リン酸緩衝生理食塩水(D P B S) 又はM 1 5 9 3 による腹腔内投与治療を開始し、週1回投与を続けて合計6回投与した。腫瘍及び体重を週1回記録した。各群の平均腫瘍容積が 1500 mm^3 に達した時点で研究を終了した。適用した統計検定は、反復測定二元配置分散分析(P R I Z M 4 . 0、Graph Pad)であった。

10

【0166】

M D A - M B - 2 3 1 異種移植モデルにおいて、M 1 5 9 3 は、22日目(* P < 0 . 0 1) に始まり、対照(D P B S 処理)群を安楽死させた29日目(* * P < 0 . 0 0 1) まで続いた腫瘍成長を、有意に阻害した。M 1 5 9 3 処理群は、36日目に安楽死させた。M 1 5 9 3 は、腫瘍成長を29日目で約49%阻害した。D P B S 処理対照群と比較して、M 1 5 9 3 処理群における腫瘍成長遅延は約11日であった(図6)。

【0167】

A 4 3 1 を有するマウス異種移植モデル

20

A 4 3 1 ヒト扁平上皮癌細胞を、10%のF B S 及び1%のL N N を有するD M E M 培地で培養し、トリプシン処理によって対数期に採取し、滅菌H B S S に 1×10^7 細胞/mLで再懸濁させた。20匹の雌S C I D ベージュ(C . B - 1 7 / I c r C r l - s c i d - b g B R) マウスをCharles River Laboratoriesから入手し、実験に先立って14日間順応させた。生後約8週目に、マウスの右脇腹に 2×10^6 A 4 3 1 細胞を埋め込んだ。腫瘍のサイズが約 118 mm^3 になったとき、マウスを腫瘍サイズによって治療群に階層化した(N = 10 / 群)。階層化した日に、10 mg / 体重1 kg のD P B S 又はM 1 5 9 3 による腹腔内投与治療を開始し、週1回投与を続けて合計6回投与した。腫瘍及び体重を週2回記録した。各群の平均腫瘍容積が 1000 mm^3 に達した時点で研究を終了した。適用した統計検定は、反復測定二元配置分散分析(P R I Z M 4 . 0、Graph Pad)であった。

30

【0168】

M 1 5 9 3 は、対照(D P B S 処理)群を安楽死させた22日目(* P = 0 . 0 0 6 7) における腫瘍成長を、有意に阻害した。C N T O 5 9 2 処理群は、39日目に安楽死させた。C N T O 5 9 2 は、腫瘍成長を22日目で約54%阻害した。D P B S 処理対照群と比較して、M 1 5 9 3 処理群における腫瘍成長遅延は約17日であった(図7)。

【0169】

実施例7：変化したF_cを有する抗体組成物

天然ヒトF_c受容体変異体は、ヒト抗体のF_cタンパク質に対して実質的に異なる親和性を有する。更に、臨床研究で、F_c操作されたmAbで治療された後、強力結合F_c遺伝子型を有する患者の奏効率及び生存率が改善したことが立証されている(Musolinoら2008 J Clin Oncol 26:1789~1796(2008); Bibeauら2009 J Clin Oncol 27:1122~1129)。

40

【0170】

T F シグナル伝達の阻害は、細胞応答を減少させ、腫瘍増殖、移動、及び転移性の広がりをもたらすと予想されるが、T F 抗原が腫瘍細胞上に提示されるという事実は、抗体F_cによるF_c受容体結合に関連する機序により、標的細胞の選択的殺傷手段を提供する。抗体のF_cドメインの表面特徴は、グリカン組成物、並びに重鎖の一次配列の影響を受けることが知られており、それらの一方又は両方による修飾は、F_c受容体結合を変化させることができる。

50

【 0 1 7 1 】

M 1 5 9 3 として特定される M A b は、低フコースグリカン修飾 I g G 1 として、及び更には I g G 1 - C H 2 ドメイン変異体として産生された (S 2 3 9 D、I 3 3 2 E の付番は、K a b a t E U システムのものである)。

【 0 1 7 2 】

M A b 組成物及び製造方法

フコース含有量が少ない抗体 (M 1 5 9 3 - L F) は、シグナルペプチドを有する以下に示される M 1 5 9 3 (I g G 1 / K a p p a) 鎖をコードするベクターを、C H O 宿主細胞株からタンパク質の低フコシル化のために選択された C H O 宿主細胞垂系統中に電気穿孔することによって産生された。配列番号 1 6 5 は、可変ドメイン、残基 1 ~ 1 1 3 (配列番号 2 3 及び F R 4、配列番号 6 1、下線)、及びヒト k a p p a 定常軽鎖ドメインを含む完全な軽鎖を示す。可変ドメイン残基 1 ~ 1 2 0 (配列番号 1 3 9 及び F R 4、配列番号 6 0 を含む、下線)、並びに K a b a t 位置 2 3 9 及び 3 3 2 (配列番号 1 6 7 の 2 4 2 及び 3 3 5) である野生型ヒト I g G アイソタイプ 1 C H 1、C H 2、及び C H 3 を含む重鎖は、変異体 M 1 5 9 3 - D E を産生するために、野生型残基 S 及び D からそれぞれ、D 及び E に変更された。

10

【 0 1 7 3 】

M 1 5 9 3 - 軽鎖

(配列表 1)

DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCKSSQSLLSSGNQKNYLTWYLOKPGQSPQLLIYWA
STRESGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCONDYTYPLTFGQGTKLEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

20

(配列番号165)

【 0 1 7 4 】

M 1 5 9 3 - K a b a t 位置 S 2 3 9 が D であり、I 3 3 2 が E である重鎖

(配列表 2)

EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFAPYWIEWVRQMPGKGLEWMGDILPGT
GFTTYSFQGHVTISADKSISTAYLQWSSSLKASDTAMYYCARSGYYGNISGFAYWG
QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK
THTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPKEE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMSHEALHNHYTQKSLSLSPG

30

K (配列番号167)

40

【 0 1 7 5 】

C H O 細胞は、宿主細胞株として用いられるべき天然低フコース細胞のプールを単離するために、陰性レクチン選択 (フコース結合レクチンに対する非結合の選択) 及び F A C S ソート を 4 回 繰 り 返 し た 後 に、サブクロニングすることによって生成された。この細胞株は、M 1 5 9 3 を産生するのに用いたのと同じ宿主細胞由来であったので、その細胞は、全く同じやり方で培養及び処理された。トランスフェクトされた細胞は、検出用タンパク質 G を用いてメチルセルロース播種によってスクリーニングされ、コロニーを採取して 9 6 ウェルプレートに入れた。培養を振盪フラスコに拡大し、力価測定した。上部の親クローンは、バッチ振盪フラスコ培養で M 1 5 9 3 - L F を 最 高 7 0 8 m g / L (標 準 培 地 中) 産 生 し た。

50

【 0 1 7 6 】

フコシル化パーセントを決定し、グリコシル化プロファイルの経時的安定性及び産生プロセスを評価するために、2つのM1593-LF産生クローン(C2452B及びC2452D)にLC-MS糖ペプチドマッピングを行った(表15)。試料は、継代1フェドバッチ及び継代10バッチ培養物から安定性試験中に収集され、精製された。バイオリアクター評価からの精製された試料を更に分析した。糖ペプチドマッピングは好ましいグリコシル化パターンを示し、C2452B及びC2452Dのフコシル化の割合は全体的に低かった。重要なことに、フコシル化パーセントは時間とともに有意に増加せず、これは宿主細胞のフコシル化が安定的であることを示唆している。このように、M1593-LFのフコース含有量は、10%未満、一般には5%未満、及び一部の調製物では2%未満である。レクチンを選択しない宿主CHO細胞で産生されるMabは、80%超過がフコシル化されるグリカン群を含んだ。

10

【 0 1 7 7 】

【 表 1 5 】

表15.

クローン	フコシル化(%)	分析試料
C2452B	2.81	継代1振盪フラスコフェドバッチ
C2452B	1.83	継代10安定性試験バッチ
C2452B	3.67	生物反応器
C2452D	2.20	継代1振盪フラスコフェドバッチ
C2452D	2.25	継代10安定性試験バッチ
C2452D	7.31	生物反応器

20

M1593のFc突然変異体(M1593-DE)では、M1593を発現するプラスミドが特定部位の突然変異誘発に供された。

【 0 1 7 8 】

30

生物活性

3つの抗ヒトTF Fc変異体(M1593、M1593-LF、及びM1593-DE)は、ヒト及びカニクイザルFc受容体の両方に対して親和性である(FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIIa)。これらアッセイは、本出願人による同時継続中の出願(米国特許出願第61/426619号)に記載される通りに、又はプラズモン共鳴(Biacore)に基づく結合アッセイ(?)を用いて行われた。

【 0 1 7 9 】

これらアッセイの結果は、両方のFc修飾抗TF抗体が、未修飾の親IgG1 M1593抗体よりもはるかに緊密に、18倍(M1593-LF)及び40倍(M1593-DE)の強さで組み換えヒトFcγRIIIa受容体に結合することを実証した(表16)。

40

【 0 1 8 0 】

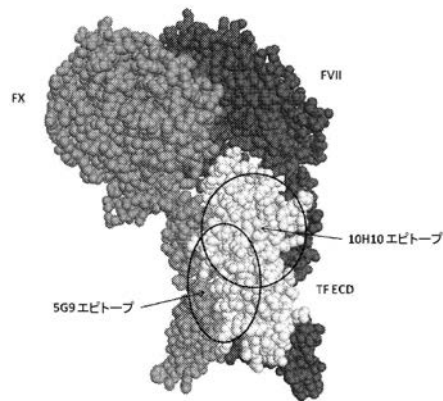
表16: ヒトFcγRIIIa受容体に対する抗TF抗体の親和性

10

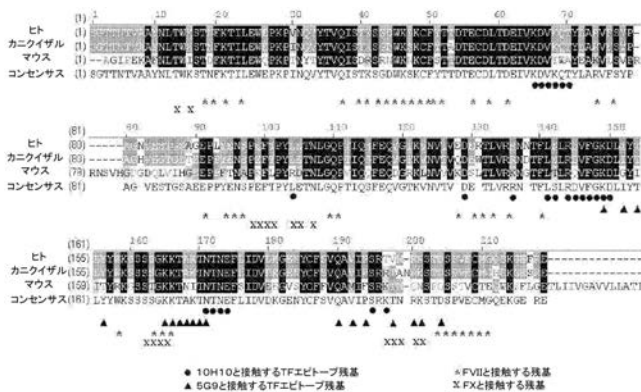
【 0 1 8 1 】

改善されたFc受容体結合は、ヒトPBMCをエフェクター細胞として用い、ヒト乳癌細胞株MDA-MB-231を標的細胞として用いる機能的生体外ADCCアッセイに反映された(図8)。

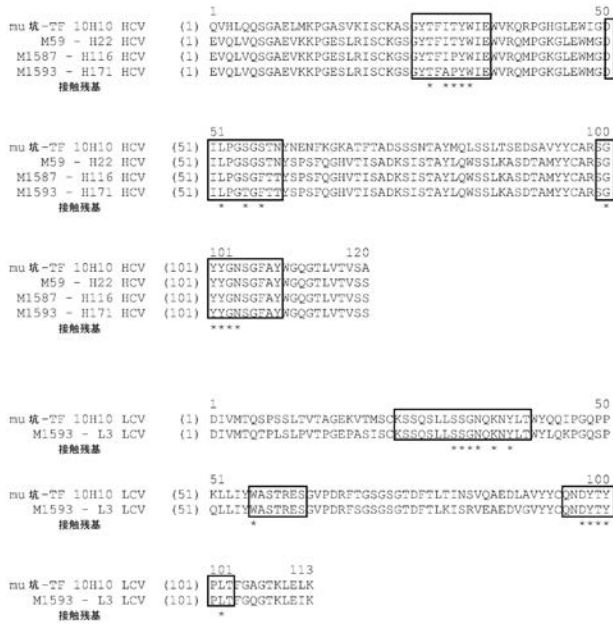
【 図 3 】



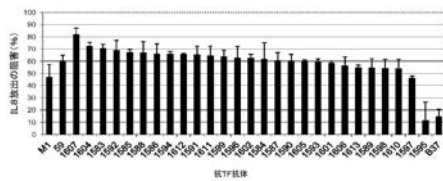
【圖 2】



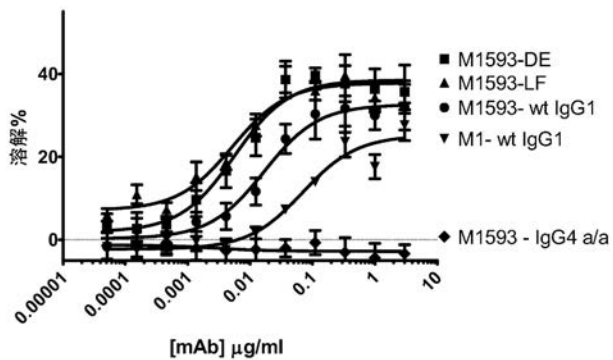
【図 4】



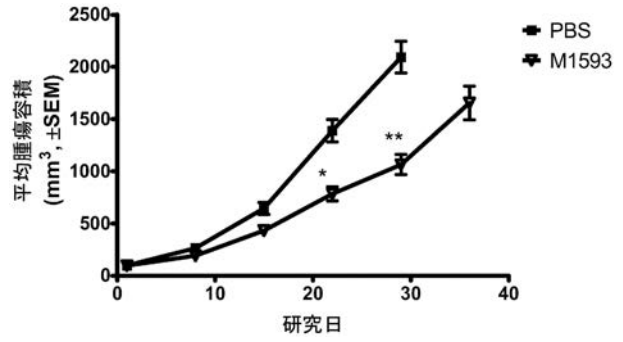
【図 5】



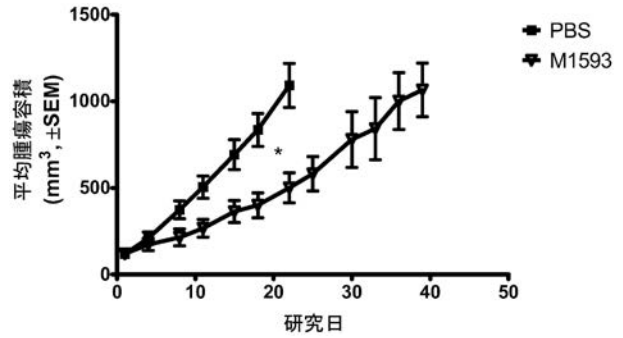
【図 8】



【図 6】



【図 7】



【配列表】

2017158564000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成29年5月11日(2017.5.11)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

単離された抗組織因子抗体であって、3つの重鎖CDR配列であるH-CDR1、H-CDR2及びH-CDR3がそれぞれ配列番号76、98及び8で示されるアミノ酸配列であり、かつ、3つの軽鎖CDR配列であるL-CDR1、L-CDR2及びL-CDR3がそれぞれ配列番号9、10及び11で示されるアミノ酸配列である、前記抗体。

【請求項2】

単離された抗組織因子抗体であって、配列番号23で示されるアミノ酸配列の軽鎖可変領域、又は配列番号139で示されるアミノ酸配列の重鎖可変領域を含む、前記抗体。

【請求項3】

配列番号23で示されるアミノ酸配列の軽鎖可変領域と、配列番号139で示されるアミノ酸配列の重鎖可変領域とを含む、請求項2記載の抗体。

【請求項4】

配列番号165で示されるアミノ酸配列の軽鎖可変領域を含む、請求項2記載の抗体。

【請求項5】

配列番号166又は167で示されるアミノ酸配列の重鎖可変領域を含む、請求項2記載の抗体。

【請求項6】

配列番号166で示されるアミノ酸配列の重鎖可変領域を含む、請求項5記載の抗体。

【請求項7】

配列番号167で示されるアミノ酸配列の重鎖可変領域を含む、請求項5記載の抗体。

【請求項8】

配列番号165で示されるアミノ酸配列の軽鎖可変領域と、配列番号166又は167で示されるアミノ酸配列の重鎖可変領域とを含む、請求項2記載の抗体。

【請求項9】

前記抗体が、
組織因子結合に関してFVIIaと競合せず、かつ、
TF-VIIa複合体の凝固促進活性、アミド分解活性を実質的に阻害しないが、MDA-MB-231細胞からのサイトカインIL-8放出によって測定される、TF-VIIaによって媒介されるシグナル伝達を阻害する
抗組織因子抗体である、請求項2記載の抗体。

【請求項10】

請求項1記載の抗体を含む、医薬組成物。

【請求項11】

請求項2記載の抗体を含む、医薬組成物。

【請求項12】

前記抗体が請求項4記載の抗体である、請求項11記載の医薬組成物。

【請求項13】

前記抗体が請求項5記載の抗体である、請求項11記載の医薬組成物。

【請求項14】

配列番号76、98及び8で示されるアミノ酸配列の重鎖CDR配列と、配列番号9、

１０及び１１で示されるアミノ酸配列の軽鎖ＣＤＲ配列とを含む抗体をコードする核酸。

【請求項１５】

配列番号２３で示されるアミノ酸配列の軽鎖可変領域、又は配列番号１３９で示されるアミノ酸配列の重鎖可変領域をコードする核酸。

【請求項１６】

配列番号１６５で示されるアミノ酸配列の軽鎖可変領域をコードする核酸。

【請求項１７】

配列番号１６６又は１６７で示されるアミノ酸配列の重鎖可変領域をコードする核酸。

【請求項１８】

請求項１４～１７に記載の核酸のうちの少なくとも１つを含む、ベクター。

【請求項１９】

請求項１８に記載のベクターを含む、宿主細胞。

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	

(74)代理人 100104282

弁理士 鈴木 康仁

(72)発明者 アルマグロ, ユアン, カルロス

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 4 4 6, ブルックリン, リンデン ストリート 7 5

(72)発明者 アンダーソン, グレン, マーク

アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 1 9 0 8 7, ラドナー, キング オブ プロイセン ロード
1 4 5

(72)発明者 チ, エレン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 1, サン ディエゴ, メリーフィールド ロウ 3
2 1 0

(72)発明者 マルチネス, クリスチャン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 1, サン ディエゴ, メリーフィールド ロウ 3
2 1 0

(72)発明者 ラグナタン, ゴパラン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 9, サン ディエゴ, クリークウッド コート 1
2 6 2 0

(72)発明者 スワンソン, ロナルド

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 1, サン ディエゴ, メリーフィールド ロウ 3
2 1 0

(72)発明者 テプリアコフ, アレクセイ

アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 1 9 0 8 7, ラドナー, キング オブ プロイセン ロード
1 4 5

(72)発明者 ツェ, カム - ファイ

アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 1 9 0 8 7, ラドナー, キング オブ プロイセン ロード
1 4 5

(72)発明者 ウ, シェン - ジウン

アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 1 9 0 8 7, ラドナー, キング オブ プロイセン ロード
1 4 5

(72)発明者 シュウ, ホン, ミミ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 1, サン ディエゴ, メリーフィールド ロウ 3
2 1 0

F ターム(参考) 4B065 AA01X AA57X AA87X AB01 AC14 BA02 CA25 CA44

4C085 AA14 AA16 BB36 CC23 EE01

4H045 AA11 AA20 AA30 DA76 EA24 FA74

【外国語明細書】
2017158564000001.pdf