

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2007-502250
(P2007-502250A)

(43) 公表日 平成19年2月8日(2007.2.8)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/18 (2006.01)	C07K 16/18 ZNA	2G045
A61K 39/395 (2006.01)	A61K 39/395 D	4B024
A61K 38/00 (2006.01)	A61K 39/395 N	4C084
A61K 38/43 (2006.01)	A61K 37/02	4C085
A61P 7/02 (2006.01)	A61K 39/395 Y	4H045

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 63 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2006-522852 (P2006-522852)
 (86) (22) 出願日 平成16年8月16日 (2004.8.16)
 (85) 翻訳文提出日 平成18年3月13日 (2006.3.13)
 (86) 国際出願番号 PCT/BE2004/000118
 (87) 国際公開番号 W02005/016455
 (87) 国際公開日 平成17年2月24日 (2005.2.24)
 (31) 優先権主張番号 0319118.6
 (32) 優先日 平成15年8月14日 (2003.8.14)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)
 (31) 優先権主張番号 0319345.5
 (32) 優先日 平成15年8月18日 (2003.8.18)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

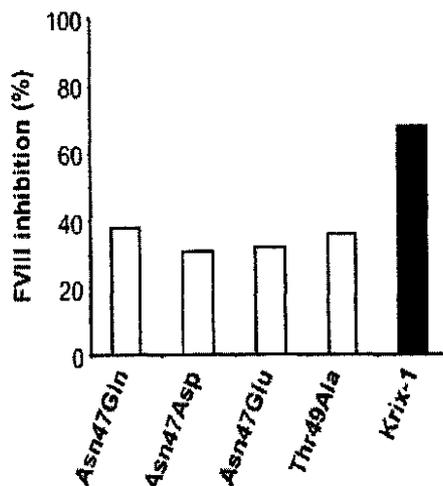
(71) 出願人 502014363
 ディ・コレン・リサーチ・ファウンデーション・フェレニゲン・ゾンデル・ウィンストメルク
 ベルギー、ペー-3000 リューフェン、ヘレストラート、49、オンダーバイス・エン・ナフォーシング・キャンパス・ガストハイスベルグ・カー・ユー・リューフェン
 (74) 代理人 100064746
 弁理士 深見 久郎
 (74) 代理人 100085132
 弁理士 森田 俊雄
 (74) 代理人 100083703
 弁理士 仲村 義平

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 可変抗体

(57) 【要約】

本発明は、酵素的脱グリコシル化または部位指向突然変異誘発のいずれかによって修飾されたグリコシル化を備える、第V I I I因子に対する阻害抗体を開示する。修飾されたグリコシル化を備える前記抗体は、F V I I I に対して同等の親和性を有するが、相違する阻害特性を示す。前記抗体の1つもしくは1つの混合物の使用は、第V I I I因子の阻害を40から95%の間のレベルまで変調することを可能にする。本発明は、修飾されたグリコシル化を備える第V I I I因子に対する阻害抗体、これらの抗体の組み合わせを含む医薬組成物、および前記抗体および抗体混合物を使用して止血障害を治療するための方法を開示する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

F V I I I に対する阻害抗体の修飾された抗体であって、その可変領域のグリコシル化が修飾されていること、そしてそれが天然抗体と比較して実質的に同一の親和性を有することを特徴とする抗体もしくはそのフラグメント。

【請求項 2】

グリコシル化の前記修飾が、その可変領域内の保存された N - グリコシル化コンセンサスパターンを備える抗体のグリコシル化を変調するステップによって得られる、請求項 1 に記載の抗体もしくはそのフラグメント。

【請求項 3】

グリコシル化の前記修飾が、前記可変領域内の N - グリコシル化コンセンサス配列のアミノ酸配列を修飾するステップによって得られる、請求項 1 に記載の抗体もしくはそのフラグメント。

【請求項 4】

グリコシル化の前記修飾が、前記抗体の可変領域内のグリコシル化コンセンサス配列の導入によって得られる、請求項 1 に記載の抗体もしくはそのフラグメント。

【請求項 5】

F V I I I に対する前記阻害抗体が K r i x - 1 である、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の抗体もしくはそのフラグメント。

【請求項 6】

前記抗体の親和性が 1 n M 未満である、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の抗体もしくはそのフラグメント。

【請求項 7】

K R I X - 1 Q もしくは K R I X - 1 A、またはモノクローナル抗体 K R I X - 1 Q もしくは K R I X - 1 A の s c F v フラグメント、F a b フラグメントもしくは F (a b ')₂ フラグメントである、請求項 5 に記載の抗体もしくはそのフラグメント。

【請求項 8】

s c F v フラグメントが配列番号 2 6 によって表される、請求項 5 に記載の抗体もしくはそのフラグメント。

【請求項 9】

配列番号 2 との少なくとも 7 0 % の配列類似性を有するアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖を含む、請求項 5 に記載の抗体もしくはそのフラグメント。

【請求項 1 0】

配列番号 1 との少なくとも 7 0 % の配列同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされる配列を含む免疫グロブリン重鎖を含む、請求項 5 に記載の抗体もしくはそのフラグメント。

【請求項 1 1】

配列番号 4 との少なくとも 7 0 % の配列類似性を有するアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖を含む、請求項 5 に記載の抗体もしくはそのフラグメント。

【請求項 1 2】

配列番号 3 との少なくとも 7 0 % の配列同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされる配列を含む免疫グロブリン軽鎖を含む、請求項 5 に記載の抗体もしくはそのフラグメント。

【請求項 1 3】

F V I I I に対する天然阻害抗体および請求項 1 から 1 2 のいずれか一項に記載の修飾された抗体からなる群から選択される 2 つ以上の抗体もしくは抗体フラグメントの混合物。

【請求項 1 4】

請求項 1 から 1 2 のいずれか一項に記載の抗体または請求項 1 3 に記載の混合物を含む医薬組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 15】

前記抗体が前記抗体によって認識される1種以上のリガンドの1つ以上の相互作用に及ぼす阻害効果を、前記リガンドと相互作用する他のタンパク質もしくは試薬を用いて修飾するために、前記抗体の抗原結合部位におけるグリコシル化部位を修飾もしくは導入するような方法で修飾された有効量の治療用モノクローナル抗体もしくはそのフラグメントを投与するステップを含む治療方法。

【請求項 16】

外科的介入、固定または慢性遺伝性もしくは後天性栓友病に続発性の深部静脈血栓症および肺動脈塞栓症の予防、ならびに深部静脈血栓症、肺動脈塞栓症、脳梗塞、心房細動、非Q波心筋梗塞、非ST上昇性心筋梗塞、不安定狭心症、敗血症もしくはSIRSの治療を含むがそれらに限定されない、有効量の請求項1から12のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体もしくはそのフラグメント、または請求項13に記載の混合物を投与するステップを含む、血栓塞栓性障害を治療および予防するための方法。

10

【請求項 17】

有効量の請求項1から12のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体もしくはそのフラグメント、または請求項13に記載の混合物および同時に投与されるアスピリンなどの血小板凝集を阻害する1種以上の薬物を投与するステップを含む、血栓塞栓性障害を治療および予防するための方法。

【請求項 18】

有効量の請求項1から12のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体もしくはそのフラグメント、または請求項13に記載の混合物、および同時に投与されるアブシキシマブ(Rheopro(登録商標))もしくは抗血栓溶解薬(組織プラスミノゲン活性化因子、スタフィロキナーゼもしくはマイクロプラスミンを含む)などの血小板凝集を阻害する1種以上の薬物を投与するステップを含む、急性心筋梗塞を治療するための方法。

20

【請求項 19】

前記モノクローナル抗体がKrix-1に由来する抗凝固性モノクローナル抗体であり、抗原結合部位のN-グリコシル化部位において突然変異を有する、請求項15から18のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

可変最高阻害活性および実質的に同一の活性を備える、第VII因子に対する少なくとも2つの阻害抗体からなるライブラリーを得るための方法であって、前記方法が、前記阻害抗体の可変領域内のグリコシル化を修飾するステップによってFVIIに対する阻害抗体もしくはそのフラグメントのサイズを修飾するステップと、およびそれに対する親和性が実質的に影響を受けていない少なくとも1つの抗体もしくはそのフラグメントを選択するステップと、を含む方法。

30

【請求項 21】

前記方法が、FVIIに対する阻害抗体もしくはそのフラグメントの可変領域内のグリコシル化を修飾するステップと、およびそれに対する親和性が実質的に影響を受けていない抗体を選択するステップと、を含む、請求項20に記載の方法。

【請求項 22】

前記第VII因子阻害抗体がFVIIのC1ドメインに対して向けられている、請求項20もしくは21に記載の方法。

40

【請求項 23】

前記第VII因子阻害抗体がKrix-1である、請求項20から22のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 24】

請求項20から23に記載の方法によって得られた第VII因子阻害抗体のライブラリー。

【請求項 25】

前記抗体もしくはそのフラグメントが飽和濃度でFVIIを20から85%阻害する

50

F V I I I 阻害抗体もしくはそのフラグメントを産生するための方法であって：

- 無傷 F V I I I 阻害抗体もしくはそのフラグメントを提供するステップと、および
- 翻訳後レベルで前記抗体もしくは抗体フラグメントのグリコシル化を修飾するステップ、または前記抗体の可変領域のグリコシル化コンセンサス配列内の必須アミノ酸を変化させるステップによって前記抗体もしくは抗体フラグメントのグリコシル化を修飾するステップと、を含む方法。

【請求項 26】

F V I I I 阻害抗体と競合する抗体を同定するための方法であって：

- F V I I I もしくは C 1 ドメインを含む F V I I I のフラグメントを第 1 阻害抗体および候補阻害抗体と接触させるステップと、および
- 前記候補抗体が F V I I I 阻害抗体の前記 F V I I I もしくは F V I I I のフラグメントへの結合に競合する能力をアッセイするステップと、を含む方法。

10

【請求項 27】

前記第 1 阻害抗体が K r i x - 1 である、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

前記第 2 抗体が F V I I I 活性を阻害する能力を決定するステップをさらに含む、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記第 2 抗体がモル過剰で存在する場合に、前記第 2 抗体の F V I I I 活性に及ぼす部分的阻害効果の存在を決定するステップをさらに含む、請求項 27 に記載の方法。

20

【請求項 30】

請求項 26 から 29 のいずれか一項に記載の方法によって得られる、K r i x - 1 もしくはその誘導体の F V I I I への結合に競合する、F V I I I に対する精製された抗体。

【請求項 31】

F V I I I 活性に対して阻害性である、請求項 30 に記載の精製された抗体。

【請求項 32】

F V I I I に比して抗体の混合物がたとえ過剰であっても、F V I I I 活性の所定の最高阻害を達成するために適切な比率で一緒に混合された、請求項 30 もしくは 31 に記載の 1 つ以上の精製された抗体もしくはその誘導体と、1 つ以上の K r i x - 1 抗体もしくはその誘導体との混合物。

30

【請求項 33】

可変最高阻害活性および実質的に同一の活性を備える第 V I I I 因子に対する少なくとも 2 つの阻害抗体からなるライブラリーを得るための方法であって、前記方法が、前記阻害抗体の可変領域内のグリコシル化を修飾するステップおよび/または前記阻害抗体の抗体フラグメントを精製するステップとによって F V I I I に対する阻害抗体もしくはそのフラグメントのサイズを修飾するステップと、それに対する親和性が実質的に影響を受けていない少なくとも 1 つの抗体もしくはそのフラグメントを選択するステップと、を含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0001】

本発明は、可変最高阻害活性を達成するための阻害抗体の修飾および抗血栓薬を開発する際のその適用ならびに当該抗体を含む医薬組成物および混合物に関する。

【背景技術】

【0002】

血餅の形成は、傷害の症例において出血を制限する（止血）だけではなく、重要な動脈もしくは静脈を閉塞させて重篤な臓器障害や死亡を引き起こすことがある。そこで血栓症とは不適切な時点および場所での血餅形成である。

【0003】

血管が損傷すると、凝固（凝血）系はトロンビンおよびマトリクスタンパク質へ付着す

50

る血小板の産生を開始し、これは順に、血液中のフィブリノーゲンから不溶性フィブリンへの転換と呼応してどんどん大きくなる血小板栓子への追加の血小板凝集を引き起こす。

【0004】

凝固サイクルの各段階では、凝固因子であるチモーゲンは限定されたタンパク質溶解を受け、それ自体が活性プロテアーゼになる。この凝固因子酵素は、フィブリノーゲンを不溶性フィブリン塊へ結び付けるトロンピンが生成されるまで次の凝固因子チモーゲンを活性化する。血液凝固因子には、第I因子(フィブリノーゲン)、第II因子(プロトロンピン)、組織因子(以前は第III因子と呼ばれていた)、第IV因子(Ca^{2+})、第V因子(不安定因子)、第VII因子(プロコンベルチン)、第VIII因子(抗血友病グロブリン、もしくは11AHG11)、第IX因子(クリスマス因子)、第X因子(スチュアート因子)、第XI因子(血漿トロンボプラスチン前駆体、もしくは「PTA」)、第XII因子(ハーゲマン因子)、第XIII因子(フィブリン安定化因子)、およびHMWK因子(高分子量キニノーゲン、もしくはフィッツジェラルド因子)、PREK(プレカリクレイン、もしくはフレッチャー因子)、Ka(カリクレイン)、およびPL(リン脂質)が含まれる。

10

【0005】

フィブリノーゲンは、プロトロンピン(第II因子)である循環しているチモーゲンの活性化によって凝固プロセス中に形成されるプロテアーゼである酵素トロンピン(第IIa因子)にとっての基質である。プロトロンピンは、活性化第V因子、 Ca^{2+} およびリン脂質の存在下で活性化された第X因子によって活性酵素トロンピンへ変換される。「内因系」および「外因系」と呼ばれる2つの別個の経路は、活性化された第X因子の形成をもたらす。内因系では、凝固のために必要なすべてのタンパク質因子が循環血中に存在する。外因系では、循環血液中に存在しない組織因子は、損傷した内皮上で活性化された単球、アテローム硬化性プラーク内の細胞または血管壁の外側の細胞によって発現する。組織因子は、次に第VII因子の結合のための受容体および必須補因子として作用し、結果として凝固の外因系経路を開始させるための生体分子酵素第VIIa組織因子を生じさせる。この機序は、凝固の内因系経路も活性化する。

20

【0006】

これらを要約すると、凝固系は循環血タンパク質(凝固因子)、血液細胞(特に血小板)および損傷した血管壁の要素の間の複雑かつ調節された生化学反応のカスケードを含んでいる。静脈血栓塞栓疾患(深部静脈血栓症、肺動脈塞栓症、心房細動)は、年間1,000人当たり1から3人の発生率および高い初期死亡率を伴う依然として重要な健康問題である(Nordstromら(1992), J Intern Med. 232, 155-160; Rosendaal(1997), Thromb Haemost 78, 1-6)。

30

【0007】

現在の抗凝固剤療法は、主としてヘパリン(もしくは低分子量ヘパリン)およびビタミンKアンタゴニストから構成されるが、それらは満足できるものではなく便利に使用することもできない。すべての治療には重大な出血のリスクがあり(Res, Comm. British Thoracic Soc. (1992), Lancet. 340 (8824): 873-6)、これは用量および治療期間のどちらも制限し、そして定期的な監視を必要とすることがある(Hylek & Singer(1994), Ann Intern Med. 120, 897-902; Cannegieterら(1995), N Engl J Med. 333, 11-17)。現在、新規薬物が開発されているが、いずれも有効性、安全性および便宜性の最高基準に適合するとは思われない。

40

【0008】

近年、抗凝固薬として凝固因子に向けられた抗体が開発された。第IX因子、第IXa因子、第X因子、第Xa因子、第XI因子、第XIa因子、第VIII因子、第VIIIa因子、第V因子、第Va因子、第VII因子、第VIIa因子、トロンピン、フォン・

50

ヴィレブラント因子、組織因子に対して向けられた抗体およびその他の凝固サイクルの要素については既に記載されている。

【0009】

PCT国際特許第97/26010号は、その中で「自己限定性方法」として記載されている凝固を阻害する抗体を開示している。これらの抗体は、高濃度のそのような抗体は限定された方法でのみAPTTなどの凝固試験を延長させ、ヘパリンなどの高用量の抗凝固薬とは対照的に血液を凝固不能にはしないであろうという事実を特徴としている。しかし、APTTにおける限定された増加は出血のリスクを排除しない。いわゆる「自己限定性中和活性」を有するこれらの抗体が、それらの標的凝固因子を完全に中和し、それによって患者を高い出血リスクに曝露することを回避できることは証明されていない。実際に、例えばFVIIもしくはFIXなどの凝固因子の完全な欠損症を有する患者においては、APTTもまた極めて限定的方法でしか延長されない。そのような患者の血液もまた、高用量ヘパリンを用いて処置された血液とは対照的に凝固不能ではない。しかし、重度のFVIIもしくはFIX欠損症を有するそのような患者は、血友病AもしくはBと呼ばれる劇的な出血性疾患に苦しんでいる。「自己限定性方法」で凝固因子を阻害する抗体はこれらの患者における血液欠陥を模倣する生物活性を有するので、それらは患者を高い出血リスクに曝す可能性がある。

10

【0010】

PCT国際特許第01/04269号は、FVIIに比して抗体がたとえ(モル)過剰であってもFVII活性を部分的にのみ阻害するヒトモノクローナル抗体Krix-1を開示している。FVIIのこの限定された不活性化は「プラトー作用」と呼ばれた。「自己限定性中和活性」を有する抗体と比較すると、Krix-1などの抗体は、それらが標的凝固因子を完全には不活性化できないという長所を有する。PCT国際特許出願第01/04269号は、限定されたこのFVII不活性化にもかかわらず、Krix-1が静脈血栓症のハムスターモデルにおける血栓症を予防する際に有効であったことを開示している。この抗体は、大静脈血栓症のマウスモデルにおいても有効であった(Singhら(2002), Blood 99, 3235-3240)。Krix-1は、正常ヒト血漿中で約90%のFVII活性(範囲: 85~95%)を阻害する。

20

【0011】

このため因子FVIIは、抗凝固薬のための潜在的標的であると思われる。しかし、抗FVII抗体の使用に関連する出血傾向は標的凝固因子の阻害度に関連するであろうと思われる。このため、有効性(抗血栓作用)と安全性(低出血傾向)の間の最適比を備える抗体調製物を生成するための方法を確立することが重要である。

30

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

これまで、臨床試験において試験されたすべての抗凝固剤には重要な出血リスクが結び付いている。さらに、LMWHは頻回な皮下投与を必要とし、クマリン誘導体は定期的監視を必要とする。

【0013】

このため、静脈血栓塞栓性疾患を予防および治療するためのより安全およびより効果的方法が望ましい。理想の抗凝固薬は、出血性合併症または過量投与のリスクを有してはならない。それらは定期的監視を必要とせず、容易に投与することができ、そして良好に忍容できなければならない。最後に、解毒剤を利用できなければならない。

40

【0014】

これらをまとめると、より良好な安全性/有効性比を備える優れた抗凝固療法に対する逼迫した必要が依然として存在する。

【課題を解決するための手段】

【0015】

本発明は、好ましくは親和性に重大な影響を及ぼすことなく、抗体の阻害活性を修飾す

50

るための方法に関する。本発明はさらに、そのような方法によって得られた抗体もしくはそのフラグメント、およびそれらのタンパク質標的の可変最高阻害活性を備える抗体混合物を開発する際におけるそれらの使用に関する。より詳細には、本発明は、様々な最も効果的な方法で凝固因子を部分的に阻害できるように抗体のサイズには影響を及ぼすがその親和性には影響を及ぼさない様々な方法で修飾されたヒトモノクローナル抗体もしくはそのフラグメントに関する。これらは抗血栓薬として使用できる。本発明はさらに、医薬調製物中において当該抗体および当該抗体のフラグメントを使用するステップに関する。

【0016】

そこで、本発明は、可変最高阻害活性および実質的に同一の親和性を備える、第V I I I因子に対する少なくとも2つの阻害抗体のライブラリーを得るための方法に関する。本方法は、F V I I Iに対する阻害抗体もしくはそのフラグメントのサイズを、前記阻害抗体の可変領域内のグリコシル化を修飾するステップ、もしくは前記抗体を抗原結合フラグメントへ縮小させるステップのいずれかによって修飾するステップを含んでおり、修飾後には、F V I I Iに対する親和性が実質的に影響を受けていない前記抗体もしくはフラグメントが選択される。

10

【0017】

本発明の第1実施形態によると、阻害抗体もしくはそのフラグメントの阻害活性を、例えば前記抗体の可変領域内のグリコシル化の修飾によって修飾するための方法が提供される。それらの標的タンパク質に対する前記抗体の親和性は、限定された方法でしか影響を受けない可能性がある。詳細には、本発明の第1の局面によると、修飾された抗体もしくはそのフラグメントの解離定数は、3未満、好ましくは2未満、最も好ましくは1.5未満の係数によって修飾される。本発明は、抗体の可変領域内のグリコシル化の修飾によって、修飾された阻害能力を備えるが、親和性が類似である抗体もしくはそのフラグメントを開発できることを証明している。より詳細には、本発明は、脱グリコシル化によって阻害抗体もしくはそのフラグメントの阻害活性を減少させる方法に関する。これらの抗体は、凝固の分野におけるような、標的タンパク質の可変もしくは準最大阻害が必要とされる状況において有用である。本発明の第2の局面によると、抗体フラグメントの産生を使用して阻害活性のさらなる変調が得られるが、そのフラグメント自体を脱グリコシル化によって修飾することができる。そのような方法で、様々な最高阻害活性を備える一連の様々な抗体が得られる。

20

30

【0018】

F V I I Iに対するヒトモノクローナル抗体もしくはそのフラグメントについての現在の限界は、血栓症を治療もしくは予防するために安全性と有効性の間の最適比を備える抗体もしくはそのフラグメントの選択を許容するであろう、所定の「プラトー阻害」を備える抗体の産生を可能にする方法がないことにある。

【0019】

本発明のさらなる局面は、より詳細には可変領域内のグリコシル化を修飾するステップによって、可変最高阻害活性を有するが親和性は類似である抗体もしくはそのフラグメントを得る方法に関する。1つの実施形態では、修飾されたグリコシル化を備える抗体もしくはそのフラグメントの親和性は1 n M未満である。理論によって限定せずとも、この方法は、抗原結合部位に対応する標的タンパク質のエピトープが前記タンパク質の活性もしくは相互作用部位の近位にはあるが正確には一致しない場合に、それらの抗体にとって特に適合する。グリコシル化の修飾は、任意に天然抗体もしくはそのフラグメントを炭水化物分解酵素もしくは形質転換酵素へ曝露させるステップによって得られる。あるいは、修飾されたグリコシル化を備える抗体は、適切なグリコシル化酵素を備える細胞株で抗体を産生するステップによって、または抗体を産生する細胞株のグリコシル化酵素の活性を修飾するために細胞培養条件を修飾するステップによって得られる。本発明のまた別の実施形態では、修飾されたグリコシル化を備える抗体は、例えば部位指向突然変異誘発によって、グリコシル化部位を除去または導入するために抗体を遺伝的に修飾するステップによって得られる。本発明のまた別の実施形態では、修飾されたグリコシル化を備える抗体は

40

50

化学合成によって得られる。フラグメントは完全抗体から得ることができ、また当技術分野において記載された方法による組換えもしくは化学合成によって直接的に生成できる。修飾された阻害能力（および好ましくは実質的に影響を受けていない親和性）を備える抗体もしくはそのフラグメントは、天然抗体の阻害能力（および親和性）を測定するステップと、前記抗体のグリコシル化を修飾するステップと、そして修飾された抗体の阻害能力（および親和性）を再度測定するステップとによって任意に同定される。そこで、特定の実施形態によると、本発明は、前記抗体もしくはそのフラグメントが飽和濃度でF V I I Iを20から85%阻害するF V I I I阻害抗体もしくはそのフラグメントを産生するための方法であって：

- 無傷F V I I I阻害抗体もしくはそのフラグメントを提供するステップと、
- 翻訳後レベルで前記抗体もしくは抗体フラグメントのグリコシル化を修飾するステップ、または前記抗体の可変領域のグリコシル化コンセンサス配列内の必須アミノ酸を改変するステップによって前記抗体もしくは抗体フラグメントのグリコシル化を修飾するステップと、を含む方法に関する。

【0020】

本発明のまたさらなる局面によると、本発明の方法は、複合体に含有されるタンパク質、すなわちその生物学的機能のために他のタンパク質との相互作用を必要とするタンパク質に対して向けられた抗体の開発に適用される。特定の実施形態によると、本発明の方法は、血液凝固への可変阻害効果を備える抗体を得るために、止血系の要素に対して、または止血系の要素へ結合するポリペプチドもしくは他の分子、またはさらにより詳細には凝固カスケードの因子に対して向けられた抗体もしくはそのフラグメントの阻害活性を修飾するために使用される抗体に関する。そこで、可変最高抗凝固活性を備える抗体を得ることができるように、第V因子、第V I I I因子、第V I I I因子（F V I I I）、第I X因子、第X因子、第X I因子、トロンビン、フォン・ヴィレブラント因子、または他の凝固カスケードの要素に対して向けられた阻害抗体の阻害効果を修飾する際に特に有用である方法が提供される。

【0021】

より特定の実施形態では、グリコシル化の修飾は、F V I I Iに対する抗体もしくはそのフラグメント、より詳細にはK r i x - 1モノクローナル抗体もしくはそのフラグメントに適用される。本発明の方法は、F V I I Iの可変最高阻害を示す修飾されたK r i x - 1抗体もしくはそのフラグメントを得るために使用される。より詳細には、20%から90%、より詳細には20%から80%、さらにより詳細には20%から70%、およびいっそうより詳細には20%から60%の阻害能力を備える修飾されたK r i x - 1抗体を得る方法が記載される。

【0022】

本発明はさらに、前記抗体もしくはそのフラグメントのそれらの標的タンパク質に対する親和性が実質的に影響を受けていないことを特徴とする、修飾されたグリコシル化および修飾された阻害活性を備える、本発明の方法によって得られる阻害抗体もしくはそのフラグメントに関する。本発明はさらに、前記抗体に類似するフラグメント、誘導体およびタンパク質に関する。本発明の抗体には、例えばF a bフラグメント、F (a b ')₂フラグメントおよびs c F vなどを含むがそれらに限定されず、そのフラグメントが含まれる。本発明のより特定の実施形態では、F V I I Iの可変最高阻害を示す抗体および抗体フラグメントが開示される。

【0023】

本発明は、F V I I I活性を約85、50、40、30および20%まで阻害する抗体もしくはそのフラグメントを開示する。より詳細には、本発明は、F V I I I活性の65%未満を阻害して血栓症の哺乳動物モデルにおける血栓症を予防する抗凝固因子モノクローナル抗体に関する。

【0024】

本発明はさらに、K r i x - 1と比較して、改変されたグリコシル化がF V I I I活性

10

20

30

40

50

の様々な最高阻害を生じさせるように修飾されたモノクローナル抗体もしくはそのフラグメントに関する。より詳細には、本発明は、F V I I I 活性の 65% 未満を阻害して血栓症の哺乳動物モデルにおける血栓症を予防する抗凝固因子モノクローナル抗体である修飾された K r i x - 1 抗体もしくはそのフラグメントに関する。

【0025】

本発明はさらに、修飾された阻害活性を備えるが F V I I I に対して K r i x - 1 と類似の親和性を維持している、K r i x - 1 と呼ばれる細胞株由来の F V I I I に対して向けられた阻害性もしくは抗凝固性の抗体およびそのフラグメントに関する。より特定の実施形態では、前記抗体は K r i x - 1 もしくはそのフラグメントまたはそのような修飾された抗体の組換え産生アナログ由来であり、より詳細には前記抗体の可変領域は K r i x - 1 抗体もしくはそのフラグメントとの少なくとも 80%、好ましくは少なくとも 90% 以上のアミノ酸類似性を有する。そのような抗体には、配列番号 2 との少なくとも 80%、好ましくは少なくとも 90%、より好ましくは少なくとも 95%、最も好ましくは少なくとも 98% の配列相同性を有する配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域を含む抗体もしくはそのフラグメントが含まれるが、このとき 47 位の A s n はグルタミン、アスパラギン酸、もしくはグルタミン酸へ組換えられている、または 49 位の T h r がアラニンへ組換えられている。

10

【0026】

そのような抗体には、それによって抗体の抗原結合部位が修飾された K r i x - 1 のエピトープ特異性を有する、例えば K R I X - 1 Q もしくは K R I X - 1 A のエピトープ特異性を有する鎖シャッフリングによって得られる抗体が含まれる。そのような抗体には、それらが抗凝固活性を有することを前提に、修飾された K r i x - 1 のフラグメントもしくは本発明によって修飾された K r i x - 1 のフラグメントが含まれる。そこで、本発明はさらに重鎖および軽鎖を含むキメラ抗体に関するが、このとき前記抗体の可変領域は N - グリコシル化部位を導入もしくは除去するように修飾され、前記抗体は限定された方法で凝固因子の機能を阻害することによって特徴付けられ、それによって血栓が阻害され、そして凝固の部分的阻害が達成される。

20

【0027】

本発明の特定の実施形態では、前記抗体は、いずれか適切な宿主細胞、例えば C H O 細胞中で産生した、K r i x - 1 の組換え抗体もしくはそのフラグメントである。いっそうより特定の実施形態では、前記抗体は可変領域内の修飾された N - グリコシル化を備える、より詳細には A s n 47 位から T h r 49 位で突然変異グリコシル化部位を備える、さらにより詳細には A s n 47 が G l n 47 (K R I X - 1 Q)、G l u 47 (K R I X - 1 E) もしくは A s p 47 (K R I X - 1 D) へ組換えられたおよび/または T h r 49 が A l a 49 (K R I X - 1 A) へ組換えられた K r i x - 1 の突然変異体である。

30

【0028】

さらに、本発明は、本発明による抗体を産生する細胞株、より詳細には変更された翻訳後修飾、より詳細には K r i x - 1、K R I X - 1 Q もしくは K R I X - 1 A の特性を備える抗体を産生する細胞株に関する。

【0029】

本発明のまた別の局面によると、リガンドの相違する最高阻害を備える 2 つ以上の抗体もしくは抗体フラグメントを組み合わせて中間阻害活性を備える混合物を生じさせることができる。本発明の特定の実施形態は、F V I I I に対して抗体の混合物がたとえ過剰であっても F V I I I の所定の最高阻害を保証する、F V I I I に対する 2 つ以上の阻害抗体もしくはそのフラグメントの混合物である。特定比率にある相違する阻害抗体および/またはそのフラグメントの組み合わせを使用すると、F V I I I の特異的阻害活性を備える混合物を得ることができる。そこで、本発明は相違する最高阻害活性を備える 2 つ以上の抗体もしくは抗体フラグメントの組み合わせに関する。特定実施形態によると、天然抗体がより低い阻害活性を有する 1 つ以上の抗体もしくはそのフラグメントと結合される。さらにまた別の実施形態によると、天然抗体は、天然抗体に関して修飾されたグリコシル

40

50

化を備える抗体もしくは抗体フラグメントと組み合わせられる。そのような組み合わせもしくは混合物は、例えば本明細書に記載する患者特異的医薬品の開発におけるように、抗体の阻害活性をさらに調整するために重要である。

【0030】

本発明はさらに、より詳細には治療用途における生物学的プロセスの調節された阻害のための本発明の抗体および抗体フラグメントの使用に関する。本発明はさらに、治療用組成物としてのF V I I Iの様々な最高阻害活性を備える抗体もしくはそのフラグメントの組み合わせの使用に関する。本発明の特定実施形態は、それらの共通リガンドの調節された阻害のために、修飾されたグリコシル化を有する本発明の1つ以上の抗体もしくはフラグメントと対応する未修飾抗体もしくはフラグメントとの混合物の使用に関する。そこで、本発明の別の局面は、1つ以上の抗体もしくはそのフラグメント、より詳細には修飾されたグリコシル化を有する1つ以上の抗体もしくはそのフラグメントおよび医薬上許容される担体を含む医薬組成物である。

10

【0031】

より詳細には、修飾された阻害活性を備える抗体の有用性は、凝固障害の分野において証明されている。本発明による抗体およびそのフラグメントは、凝固の調節された阻害のために有用である。そこで、本発明は、凝固障害、より詳細には静脈血栓塞栓性疾患に苦しんでいる被験者を治療するために有用な医薬品の製造における、凝固因子の修飾された阻害活性を備える抗体もしくはそのフラグメントの使用に関する。本発明はさらに、前記抗体もしくはフラグメントを使用することによって凝固障害を治療するための方法に関する。本発明の特定の目的は、動物における、詳細にはヒトにおける出血のリスクが減少している有効な抗血栓療法を提供することである。これは、凝固因子の修飾された最高阻害活性を備える本発明の抗体もしくはフラグメントおよびそれらの混合物を使用して、より詳細には修飾された最高阻害活性を備えるF V I I Iに対して向けられた阻害抗体もしくはフラグメントを使用して達成される。

20

【0032】

したがって、本発明の1つの局面は、前記抗体が前記抗体によって認識されるリガンドの活性および/または相互作用における前記抗体の阻害効果を、前記リガンドと相互作用する他のタンパク質もしくは試薬を用いて修飾するために、前記抗体のグリコシル化部位を修飾もしくは導入するような方法で修飾された有効量の治療用モノクローナル抗体もしくはそのフラグメントを投与するステップを含む治療方法である。

30

【0033】

詳細には、本発明によると、有効量の凝固に関係する因子を阻害する1つ以上のモノクローナル抗体もしくはそのフラグメントを投与するステップを含む、血栓症を阻害するための方法が提供される。本発明の特定実施形態では、前記抗体によって認識されるリガンドの相互作用における前記抗体の阻害効果を、前記リガンドと相互作用する他のタンパク質もしくは試薬を用いて修飾するために、抗体もしくは少なくとも1つの抗体が抗体内のグリコシル化部位を修飾もしくは導入できるような方法で修飾される。本発明の特定の実施形態は、抗凝固抗体もしくはそのフラグメントの最高阻害活性を変化させることに基づいて患者の臨床状態へ抗血栓療法を調整するための方法である。そこで、本発明は、患者の臨床状態を考慮に入れて、血栓症を治療もしくは予防するための、前記治療のために適切な最高阻害活性を得るための1つ以上の抗体の選択を含む医薬品の調製に関する。

40

【0034】

したがって、本発明の1つの局面は、患者の臨床的必要性に基づいて調整できる、有効量の、任意で未修飾K r i x - 1との混合物中において可変領域内のグリコシル化が修飾されているK r i x - 1由来の抗凝固モノクローナル抗体もしくはそのフラグメントを含む血栓症を阻害するための医薬調製物である。

【0035】

あるいは、そのような医薬組成物は、天然K r i x - 1、天然K r i x - 1のフラグメント、可変領域内の修飾されたグリコシル化を備えるK r i x - 1および可変領域内の修

50

飾されたグリコシル化を備える K r i x - 1 のフラグメントからなる群から選択される 2 つの化合物の混合物である。

【 0 0 3 6 】

より詳細には、本医薬化合物は、A s n 4 7 - T h r 4 9 の領域内のグリコシル化が修飾されている 1 つ以上のモノクローナル抗体を含んでいる。任意で、この修飾は、より詳細には A s n 4 7 が G l n 4 7 (K R I X - 1 Q)、G i u 4 7 (K R I X - 1 E) もしくは A s p 4 7 (K R I X - 1 D) へ組換えられたおよび / または T h r 4 9 が A l a 4 9 (K R I X - 1 A) へ組換えられた突然変異である。あるいは、この修飾は天然 K r i x - 1 抗体もしくはそのフラグメントを、A s n 4 7 - 4 9 でのグリコシル化の修飾を保証する条件と接触させるステップによって得られる (脱グリコシル化酵素の上昇したレベルもしくはグリコシル化に関する酵素の上昇したレベル、抗体を発現させるための様々な細胞株または細胞株の培養に使用される培地調製物など) 。

【 0 0 3 7 】

したがって、本発明の 1 つの局面は F V I I I の可変最高阻害能力を備えるが F V I I I に対する類似の親和性を備える少なくとも 2 つの抗凝固抗体を含むライブラリーである。特定の実施形態によると、前記ライブラリーは、K r i x - 1 の可変領域のグリコシル化の変調による K r i x - 1 由来の抗体を含む。本発明はさらに、本発明のライブラリーからの K r i x - 1 由来の前記 1 つ以上の抗凝固モノクローナル抗体のうち 1 つ以上を選択するステップを含む、血栓症の治療における調節された治療もしくは凝固の阻害のための医薬品を製造するための方法に関する。詳細には、本ライブラリーは、A s n 4 7 - T h r 4 9 に位置するグリコシル化部位の脱グリコシル化による K r i x - 1 由来の抗体を含んでいる。

【 0 0 3 8 】

本発明のさらにまた別の局面は、F V I I I 阻害抗体と競合する抗体を同定するための方法であって、F V I I I もしくは C 1 ドメインを含む F V I I I のフラグメントを第 1 阻害抗体および候補阻害抗体と接触させるステップと、前記候補抗体が F V I I I 阻害抗体の前記 F V I I I もしくは F V I I I のフラグメントへの結合に競合する能力をアッセイするステップと、を含む方法に関する。本発明の特定の実施形態では、新規の競合抗体を同定するために使用される既知の F V I I I 阻害抗体は K r i x - 1 である。本発明の特定の実施形態によると、そのような方法で得られた抗体は、それらの F V I I I 阻害活性についてさらにスクリーニングされる。そこで本発明はさらに、K r i x - 1 もしくは本発明によるその修飾と一緒に備える混合物中で、そして医薬組成物の生成において使用できる、この方法から得られた (精製された) 抗体に関する。

【 0 0 3 9 】

本明細書および実施例では、以下の配列を参照されたい。

- 配列番号 1 : K r i x - 1 重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列
- 配列番号 2 : K r i x - 1 重鎖 C D R 領域を含むアミノ酸配列
- 配列番号 3 : K r i x - 1 軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列
- 配列番号 4 : K r i x - 1 軽鎖 C D R 領域を含むアミノ酸配列
- 配列番号 5 : 組換え K r i x - 1 フォワードプライマーの重鎖
- 配列番号 6 : 組換え K r i x - 1 リバースプライマーの重鎖
- 配列番号 7 : 組換え K r i x - 1 フォワードプライマーの軽鎖
- 配列番号 8 : 組換え K r i x - 1 リバースプライマーの軽鎖
- 配列番号 9 : K r i x - 1 Q フォワードプライマー
- 配列番号 10 : K r i x - 1 Q リバースプライマー
- 配列番号 11 : K r i x - 1 A フォワードプライマー
- 配列番号 12 : K r i x - 1 A リバースプライマー
- 配列番号 13 : K r i x - 1 E フォワードプライマー
- 配列番号 14 : K r i x - 1 E リバースプライマー
- 配列番号 15 : K r i x - 1 D フォワードプライマー

10

20

30

40

50

- 配列番号 16 : K r i x - 1 D リバースプライマー
- 配列番号 17 : s c F v - K R I X - 1 V L フォワードプライマー
- 配列番号 18 : s c F v - K R I X - 1 V L リバースプライマー
- 配列番号 19 : s c F v - K R I X - 1 V H フォワードプライマー
- 配列番号 20 : s c F v - K R I X - 1 V H リバースプライマー
- 配列番号 21 : H i s (6) タグを含む s c F v - K R I X - 1 V L V H のフォワード
プライマー
- 配列番号 22 : H i s (6) タグを含む s c F v - K R I X - 1 V L V H のリバースプ
ライマー
- 配列番号 23 : s c F v - A s n 4 7 G l n K R I X - 1 V L V H (H i s) のフォ 10
ワードプライマー
- 配列番号 24 : s c F v - A s n 4 7 G l n K R I X - 1 V L V H (H i s) のリバ
ースプライマー
- 配列番号 25 : s c F v - A s n 4 7 G l n K R I X - 1 V L V H (H i s) を含
むヌクレオチド配列
- 配列番号 26 : s c F v - A s n 4 7 G l n K R I X - 1 V L V H (H i s) を含む
アミノ酸配列
- 配列番号 27 : C H O - s c F v K R I X - 1 V L V H Q (H i s) のフォワードプ
ライマー
- 配列番号 28 : C H O - s c F v K R I X - 1 V L V H Q (H i s) のリバースプ
ライマー 20
- 配列番号 29 : R H D 5 V H 領域をコードするヌクレオチド配列
- 配列番号 30 : R H D 5 V H 領域を含むアミノ酸配列
- 配列番号 31 : R H D 5 V L 領域をコードするヌクレオチド配列
- 配列番号 32 : R H D 5 V L 領域を含むアミノ酸配列

用語の定義

本明細書で使用する用語「抗体」(「Ab」)は、モノクローナルもしくはポリクローナル抗体分子を意味する。抗体の「フラグメント」には:

任意で例えば一方もしくは両方のCDRで約10アミノ酸配列までの隣接フレームワーク配列と一緒に、任意でそれらの定常領域(もしくはその部分)を含む、もしくは任意で 30
その定常領域もしくはその部分、詳細にはその特異性決定部分、すなわち抗体の可変領域、そのサブパート、詳細にはその高可変部分、例えば少なくとも1つのCDRを含むアミノ酸の伸長部を作り上げたペプチドなどの小さな修飾(アロタイプ変異体)を含む、重鎖および軽鎖の両方(例えばFab、F(ab)₂、F(ab')₂もしくはScFv)、または重鎖もしくは軽鎖の一方(例、軽鎖ダイマー)のいずれかを含む分子が含まれる。

【0040】

任意で、本発明によると、抗体はIgG抗体、詳細にはIgG1である。F(ab')₂は、ペプシン分解後に得ることができる抗体フラグメントを意味しており、軽鎖およびヒンジ領域を介して連結された重鎖ジスルフィドの部分の両方から形成されている。Fabフラグメントは無傷抗体から、またはヒンジ領域のパパイン消化によってF(ab')₂から得ることができ、一本の軽鎖および重鎖の一部を含有している。抗体のフラグメントは、さらに合成によって、または当技術分野において記載された組換え方法によって得ることができる。scFvフラグメントのようなフラグメントは、抗体ヌクレオチド配列の関連部分のPCR増幅およびこれらを発現ベクター内で例えばscFvフラグメントの場合にはリンカー配列などの適切な追加の配列と一緒にクローニングするステップによって得ることができる。

【0041】

本明細書で使用する用語「天然抗体」は、グリコシル化阻害抗体を意味する。「天然抗体」のグリコシル化は、前記抗体を産生するリンパ芽球様細胞株の標準培養下で観察される、すなわち酵素の添加もしくは突然変異によって修飾されていないグリコシル化である 50

。好ましくは、そのような天然抗体は野生型抗体であるが、それはグリコシル化コンセンサス配列とは相違する部位で修飾された抗体であってよいことは想定されている。さらに、F(a b)フラグメントもしくは抗体の他のフラグメントは、無傷抗体上に存在するグリコシル化パターンを含有しているので、この定義の状況における「天然」抗体フラグメントであってよい。本発明の状況では、天然K r i x - 1抗体と比較してK r i x - 1由来の抗体のグリコシル化について言及する場合は、標準培養条件下で、K r i x - 1細胞株(L M B P 5 0 8 9 C Bとして寄託されている)由来の抗体との比較が企図されている。

【0042】

本明細書で使用する用語「誘導體」は、その長さもしくは可変領域内のグリコシル化には影響を及ぼさない方法で化学的または遺伝的に改変されている抗体もしくはそのフラグメントを意味する。

【0043】

本明細書で使用する「修飾された抗体」もしくは「修飾された抗体フラグメント」は、野生型抗体と比較して、そのサイズに関して相違する、より詳細には、そのグリコシル化に関して相違するが、そのリガンドに対して野生型抗体と類似の親和性を備える抗体を意味する。本発明のまた別の実施形態によると、抗体の阻害活性は、親和性を修飾せずに抗体のサイズを縮小させるステップによって、例えばフラグメント(例、F a bフラグメントおよびS c F Vフラグメントなどの組換え発現フラグメント)を産生するステップによって修飾される。

【0044】

ジスルフィド架橋によって連結された重鎖および軽鎖の両方を有する(すなわち、野生型抗体と同一のサイズを有する)抗体は、(そのグリコシル化状態とは無関係に)「無傷」抗体であると言われる。

【0045】

本発明の概念は無傷抗体および抗体フラグメントの両方に適用できる、すなわち(本明細書に記載した様々な方法によって得ることができる)抗体のフラグメントは、さらなるフラグメント化もしくは脱グリコシル化のいずれかによってその阻害活性にさらに影響を及ぼすために修飾できることは理解されている。

【0046】

本明細書で使用する用語「修飾されたグリコシル化を備える抗体(もしくは抗体フラグメント)」は、それらのグリコシル化が天然抗体のグリコシル化とは相違する方法で設計された、もしくは産生された抗体もしくはそのフラグメントを意味するが、これはある種の余分な炭水化物が存在する、または相違する位置で天然抗体もしくはその組み合わせと比較してある種の炭水化物が欠失していることを意味する。本発明の状況では、抗体のグリコシル化における修飾は抗体の可変領域(すなわち、V Hおよび/またはV L)において発生する。

【0047】

本明細書で使用する「阻害抗体」もしくは「阻害活性を備える抗体」は、少なくとも部分的にその標的タンパク質の活性を阻害する抗体を意味する。本発明の特定の実施形態によると、阻害抗体はそれらの標的タンパク質と他のタンパク質との相互作用を阻害する。阻害抗体の特定の実施形態は、抗F V I I I抗体、より詳細にはF V I I Iの例えばv W Fおよび/またはリン脂質などの他の因子への結合を阻害する抗体である。好ましくは、抗体はF V I I IのC 1ドメインに対して向けられる。阻害抗体は、外因性F V I I Iに対する同種(異系)抗体であってよい。阻害抗体は、ヒトもしくは動物起源であってよい。本明細書では抗凝固抗体とも呼ばれる凝固カスケードの因子の活性を阻害する抗体の状況では、抗体の最高阻害は危機的であることがあり、凝固の完全な阻害は調節されない出血などの副作用を引き起こすことがある。

【0048】

本明細書で使用する可変最高阻害活性は、本発明による抗体もしくは抗体の混合物につ

10

20

30

40

50

いて規定したような、修飾できる最高阻害活性を意味する。例えば、本発明によると、F V I I I に対する抗体の最高阻害活性は、グリコシル化の修飾によって、より詳細には可変領域の脱グリコシル化によって減少させられる。そこで、可変最高阻害活性を備える抗体が得られる。本発明の状況では、阻害性と考えられる抗体については、その阻害効果は少なくとも1%でなければならないと理解されている。

【0049】

あるいは、本発明のまた別の実施形態では、F V I I I に対する抗体の最高阻害活性は、グリコシル化の修飾によって、より詳細には様々な細胞株もしくは細胞培養条件を用いる可変領域の過剰グリコシル化によって、そしてトランスジェニックグリコシル化酵素を有する細胞型において細胞を発現するステップによって増強される。そのような抗体は、

10

【0050】

本発明における「相補性決定領域(CDR)」は、抗原上でエピトープと相互作用する抗体可変領域内の高可変性アミノ酸配列を意味する。本発明の1つの実施形態では、CDR領域は、凝固サイクルの要素に対して向けられた抗体の可変軽鎖(VL)および重鎖(VH)各々のCDR1、CDR2およびCDR3領域(各々、L1、L2、L3およびH1、H2、H3)である。

【0051】

本明細書で使用する「ヒト化抗体」は、ヒト抗体により密接に近付けるために、アミノ

20

【0052】

本明細書で使用する「再構築されたヒト抗体」もしくは「ヒトハイブリッド抗体」は、抗原結合領域におけるアミノ酸が本発明による配列、例えばCDR、もしくはヒト抗体のレパトリー由来の可変領域の他の部分と置換されているヒト抗体を意味する。

【0053】

配列の比較。タンパク質もしくはヌクレオチド配列の比較は、配列同一性もしくは配列類似性によって指令される。本発明によって2つのVH領域もしくは2つのVL領域のアミノ酸配列間の比較が行なわれる場合は、またはCDRをコードする、もしくはCDRを含む2つのヌクレオチド配列間で比較が行なわれる場合は、2つの配列間の配列同一性もしくは類似性のレベルは、2つの配列間の少なくとも80%、好ましくは少なくとも80%以上、より好ましくは少なくとも90%、いっそうより好ましくは少なくとも95%、および最も好ましくは少なくとも99%の配列同一性もしくは類似性を有することが含まれる。

30

【0054】

「同一」であるヌクレオチドもしくはアミノ酸配列は、2つの配列をアライメントしたときに、配列同一性率、すなわち短い方の配列内のヌクレオチドもしくはアミノ酸の数で割った同一のヌクレオチドもしくはアミノ酸を有する位置の数が80%を超える、好ましくは少なくとも90%、いっそうより好ましくは少なくとも95%、および最も好ましくは少なくとも99%、より詳細には100%であることを意味する。2つのヌクレオチド

40

【0055】

2つのアミノ酸は、それらが次の群：G A S T C P ; V I L M ; Y W F ; D E Q N ; K H R のうちの1つに属する場合は「類似である」と考えられる。そこで、「類似」である配列は、2つのタンパク質配列をアライメントしたときに、短い方の配列内のヌクレオチドもしくはアミノ酸の数で割った同一もしくは類似のヌクレオチドもしくはアミノ酸を有する位置の数が80%を超える、好ましくは少なくとも90%、いっそうより好ましくは

50

少なくとも95%、および最も好ましくは少なくとも99%、より詳細には100%であることを意味する。

【0056】

用語「修飾された」は、単一もしくは多数のアミノ酸がいずれか他のアミノ酸残基によって置換されている、もしくは欠失しているあらゆるタンパク質（もしくはポリペプチド）分子を意味する。そのようなアミノ酸置換もしくは欠失は、タンパク質分子内のあらゆる場所に位置してよい。これはさらにまた、アミノ酸残基が2つ以上の場所で置換されている、および/または欠失しているタンパク質分子を意味する。後者の場合は、あらゆる置換および欠失の組み合わせを考慮に入れることができる。これはさらに多形性も意味する（すなわち、よりまれな対立遺伝子の頻度が、反復突然変異単独によって説明できるより高い場合、典型的には1%を超える場合は、遺伝子の2つ以上の対立遺伝子の単一異種交配集団内での規則的かつ同時の発生によって説明することができる）。

10

【0057】

用語「翻訳後レベルで抗体のグリコシル化を修飾するステップ」は、抗体もしくは抗体の一部を発現する細胞内で、またはこれらの酵素を用いて無傷抗体もしくはその一部を処理するステップのいずれかによって、抗体を発現する細胞の培養条件を変化させるステップ、抗体を発現するための細胞型を変化させるステップ、および脱グリコシル化および/またはグリコシル化酵素の使用などの修飾を意味する。

【0058】

本明細書で使用する用語「炭水化物分解酵素もしくは形質転換酵素」は、炭水化物、炭水化物構造の一部および/またはそれに結合した様々な分子（例、N-アセチル）をタンパク質、ペプチドもしくはその中のある種のアミノ酸から分解することができる、またはタンパク質もしくはペプチド上で炭水化物をアミノ酸もしくは他の炭水化物へ共有結合させることのできる酵素を意味する。そのような分解酵素の例は、N-グリコシダーゼFとも呼ばれるペプチドN-4（N-アセチル-β-D-グルコサミニル）アスパラギンアミダーゼF（PNGase F）、β-D-ガラクトシダーゼ、シアリダーゼ、α-D-マンノシダーゼ、α-D-フコシダーゼ、β-N-アセチルヘキソサミニダーゼ、およびヒアルロニダーゼである。グリコシル化酵素には、シアリルトランスフェラーゼおよび他のグリコシルトランスフェラーゼが含まれる。

20

【0059】

本明細書で使用する「抗原結合領域」は、抗原の結合に関係する抗体の領域を意味する。より詳細には、抗原結合領域は、非共有結合を介して標的タンパク質のアミノ酸もしくは分子に接触するアミノ酸およびそれらの置換基であると決定できる。

30

専門用語：リンパ芽球様細胞株（LCL）内で産生されたモノクローナル抗体KRIX-1は、Krix-1と呼ばれている。

【0060】

CHO細胞株内で産生されたモノクローナル抗体KRIX-1は、CHO-recKrix-1と呼ばれている。

【0061】

Asn47からGlnへの置換を備えるモノクローナル抗体KRIX-1は、Asn47GlnKrix-1もしくはKrix-1Qと呼ばれている。

40

【0062】

Asn47からAspへの置換を備えており、CHO細胞内で産生されたモノクローナル抗体KRIX-1抗体は、Asn47AspKrix-1もしくはKrix-1Dと呼ばれている。

【0063】

Asn47からGluへの置換を備えており、CHO細胞内で産生されたモノクローナル抗体KRIX-1抗体は、Asn47GluKrix-1もしくはKrix-1Eと呼ばれている。

【0064】

50

Thr49からAlaへの置換を備えており、CHO細胞内で産生されたモノクローナル抗体KRIX-1抗体は、Asn47Gln Krix-1もしくはKrix-1Aと呼ばれている。

【0065】

例として挙げたが本発明を特定実施形態に限定することは意図していない上記で詳述した説明は、参照して本明細書に組み込まれる添付の図面を結び付けると理解することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0066】

所定の実施形態および所定の図面を参照しながら本発明を説明するが、本発明はそれらには限定されず、特許請求項によってのみ限定される。 10

【0067】

近年、CHO細胞内で産生された組換え抗体が、ヒトリンパ芽球様細胞内で産生された抗体とは相違してFVIIを有意に阻害することが観察された。この予想外の観察所見は、翻訳後修飾がFVIIに対して向けられた抗体、より詳細にはKrix-1の阻害活性を変調できることを示した。Krix-1の可変領域内のグリコシル化部位の同定は、さらに前記可変領域のグリコシル化がKrix-1の活性を変調できることも示した。

【0068】

このため炭水化物構造を除去する酵素を用いて処理されたKrix-1の活性について調査した。Krix-1の脱グリコシル化は、その阻害活性を劇的に修飾した(約60%へ減少させた)。しかし、FVIIに対するKrix-1の親和性は、有意には変化しなかった。これらの観察所見は、グリコシル化が親和性もしくは特異性を改変することによる以外に抗体の機能を変調できることは以前に報告されていなかったもので、予想外であった。さらに、受容体のためのリガンドとして作用するグリカンは構造特異的方法で結合し、結果として、変調の影響を受けていないオン/オフシグナルを生じさせる。その特異性もしくは親和性を重大に修飾することなく抗体の活性を修飾する能力は、阻害活性を調整する、例えば抗凝固抗体の場合におけるように、可能性のある副作用を抑制するために阻害活性を制限することを可能にする。さらに、抗原に対する同一の親和性を有するが相違する阻害活性を備える抗体の選択が得られる可能性は、相違する(および極めて特異的な)最高阻害活性(「プラトー」)を備える抗体調製物を生成するために様々な「グリカン修飾」抗体を混合するステップを可能にする。さらに、可変領域へのグリコシル化の修飾の制限は、定常領域のグリコシル化によって影響を受けることが知られている抗体の他の特徴(例、半減期)が影響を受けないことを保証する。 20 30

【0069】

抗体の抗原結合部位のグリコシル化がそれらの親和性を重大に修飾することなくそれらの阻害能力を改変させることができたという事実は、グリコシル化部位において点突然変異を有する組換え抗体がFVII活性を40%しか阻害しなかったという観察所見によって確認された。より興味深いことに、組換えmAb-Krix-1の様々な修飾形の混合は、例えば過剰に投与された場合に、FVII阻害の様々なプラトーを備える組み合わせを得ることを可能にした。したがって、この戦略は、抗凝固作用と出血リスクとの間の最善比を選択することを可能にして、極めて広い治療範囲においてFVIIを阻害する抗凝固FVII調製物の産生を可能にする。これらの抗体の長い半減期は、長期間にわたりこれらの標的阻害を得ることを可能にする。 40

【0070】

理論に限定されなくとも、本発明は、KRIX-1のグリコシル化が標的凝固因子に対する親和性を重大に変化させず、それによって標的凝固因子への結合を改変させないことを証明しており、これはそれによってKRIX-1のグリコシル化がKRIX-1の阻害活性に影響を及ぼす機序が可変領域内の1つの部位での標的凝固因子と凝固カスケードの他のタンパク質との相互作用を改変させることによるものであることを示している。本発明は、抗体の可変領域のグリコシル化部位の修飾に基づく方法であって、1つの抗体によ 50

って認識される1つ以上のリガンドと前記リガンドと相互作用する他のタンパク質もしくは試薬との相互作用への前記抗体の阻害効果の修飾を生じさせる方法を含んでいる。本発明のまた別の実施形態によると、リガンド上の抗体の阻害効果は、前記リガンドに対する親和性を改変させずに前記抗体のサイズを変化させることによって修飾される。これは、阻害抗体のフラグメントの産生によって達成できる。

【0071】

そこで本発明は、任意でそれらの標的タンパク質に対する親和性もしくは特異性を重大に改変させることなく抗体によって発揮される最高阻害活性の修飾を生じさせる、天然抗体の抗原結合部位のグリコシル化の修飾により特徴づけられる様々な抗体およびそのフラグメントを提供する。本発明の所定の実施形態では、抗体は凝固系の1つの要素、より詳細には第V I I I因子に対して向けられている。さらに、任意にそれと組み合わせたまた別の阻害活性のバリエーションは、抗体のサイズを修飾するステップによって、すなわち抗体フラグメントを提供するステップによって得られる。

10

【0072】

本発明の1つの局面によると、その修飾は必ずしも前記抗原に対する親和性に重大な影響を及ぼさない。より詳細には、本発明の第1の局面によると、前記抗体の親和性は、前記抗体の解離定数 (K_d) が抗体の抗原に対する実質的に影響を受けていない親和性であると考えられる3未満の係数によって修飾されるような方法でグリコシル化における修飾のために変化させられる；好ましくは抗体の K_D は2.5未満、より好ましくは2未満、特に好ましくは1.5未満の係数によって修飾される。そこで抗原に対して実質的に同一の親和性を有する抗体は、抗体の K_D が2.5未満、より好ましくは2未満、特に好ましくは1未満の係数によって相違する抗体である。その抗原に対する抗体の親和性は、当業者に知られている様々な方法で測定できる。本発明の特定の実施形態によると、抗体の抗原に対する親和性は、本明細書に記載したように、表面プラズモン共鳴分析によって測定される。本発明の特定の実施形態によると、抗原に対する修飾された抗体の K_D は、 1×10^{-9} M未満、好ましくは 0.5×10^{-9} M未満である。

20

【0073】

そこで本発明は、修飾されたグリコシル化、修飾された阻害活性およびそれらの標的タンパク質に対する実質的に影響を受けていない親和性を備える抗体に関する。本発明はさらに、薬剤としての前記抗体の使用に関する。本発明はさらに、そのような抗体を調製するための方法、そのような抗体を選択するための方法、およびそれらを含む医薬組成物に関する。本発明はさらに、他の抗体との、例えばそれらの天然抗体との混合物中の前記抗体に関する。

30

【0074】

本発明の特定の実施形態では、抗体は、「複合体内に含まれるタンパク質」に対して向けられる。複合体内に含まれるタンパク質は、それらの特異的活性の遂行中にそれらの標的の隣にある1つの他の要素と相互作用するタンパク質であると規定できる。そのような他の要素は、タンパク質、ペプチド、リン脂質、塩、脂質、核酸、有機分子などであってよい。複合体内に含まれるタンパク質の例は、その活性を実施するとリン脂質および/またはフォン・ヴィレブラント因子と相互作用する第V I I I因子 (F V I I I a) である。

40

【0075】

本発明のより特定の実施形態では、抗体は止血系の1つの要素に対して向けられている。止血系の要素には、凝固カスケードの因子が含まれ、そして例えば第V因子、第V I I I因子、第V I I I I因子、第X因子、第X I因子、トロンピン、フォン・ヴィレブラント因子ならびに凝固サイクルの他の要素およびそれらの活性誘導体が含まれる。本発明のより特定の実施形態では、抗体は第V I I I I因子に対して、より詳細には第V I I I I因子のC1もしくはC2ドメインに対して向けられるが、それらに限定はされない。

【0076】

本発明はさらに、複合体内に含まれるタンパク質 (第V I I I I因子など) が関係している所定の障害に苦しんでいる被験者を治療するために有用である医薬品の製造における前記

50

抗体およびフラグメントの使用に関する。そのような疾患は、心血管疾患、癌、自己免疫疾患もしくは免疫関連障害、炎症性疾患、代謝性疾患、血液疾患もしくは呼吸器疾患から選択できる。本発明はさらに、より詳細には凝固障害、より詳細には静脈血栓塞栓性疾患に苦しんでいる被験者の前記抗体を用いた治療に関する。静脈血栓塞栓性疾患には、静脈血栓症、肺塞栓症および心房細動などの深部障害が含まれる。本発明はさらに、前記抗体を使用することによって凝固障害を治療する方法に関する。本発明の特定の実施形態によると、本発明の抗体およびフラグメントは、敗血症もしくはSIRSを治療するための医薬品の製造において有用である。

【0077】

このため本発明は、修飾されたグリコシル化、修飾された最高阻害を備えるがそれらの標的タンパク質に対する親和性が実質的に影響を受けていない抗体もしくはそのフラグメントに関する。抗体は、完全に、または部分的に脱グリコシル化されていてよい。抗体は、様々な部位で様々な炭水化物を有するように修飾することができ、また増加したグリコシル化を有していてよい。本発明の特定の実施形態では、抗体の最高阻害能力は減少もしくは増加させることができる。あるいは、最高阻害活性は、親和性が実質的に影響を受けないことを前提に、抗体もしくはフラグメントのサイズを減少させるステップによって減少させられる。本発明の特定の実施形態では、本発明の抗体の阻害能力は準最大（99%）であり、20%から99%の範囲に及んでよい。より詳細には、前記抗体の阻害活性は、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%もしくは20%であってよい。前記抗体の阻害活性は、当技術分野において知られているいずれかの方法によって測定できる。凝固の分野のためには、例えばFVIIに対する抗体の阻害活性はBethesdaアッセイを用いて決定できる。

【0078】

本発明はさらに、（天然）阻害抗体から、修飾されたグリコシル化、修飾された阻害能力および実質的に類似の親和性を備える修飾された抗体から調製するための方法であって、前記方法が天然抗体の阻害能力および親和性を測定するステップと、前記抗体のグリコシル化を修飾するステップと、および修飾された抗体の阻害能力および親和性を再度測定するステップと、を含むことを特徴とする方法に関する。

【0079】

本発明はさらに、相違するグリコシル化、相違する阻害能力および実質的に類似の親和性を備える少なくとも2つの阻害抗体を開発する方法に関する。本発明の抗体を開発する方法は、所定の標的タンパク質に対する（天然）阻害抗体の調製および開発から開始される。本発明の特定の実施形態によると、天然抗体は標的タンパク質の活性部位もしくは標的タンパク質の活性にとって重要なタンパク質の部位に近い抗原に向けられる、または前記抗原に効果的に「結合」する。より詳細には、抗体は標的タンパク質の生理的に機能的な（例えば、複合体の他のタンパク質への標的タンパク質の結合）部位から所定の間隔をあけて位置するエピトープに対して向けることができる。これはこのエピトープを用いた免疫化によって達成できる。抗体の選択は、その阻害活性に基づいている。次のステップは、様々な方法（酵素的分解、炭水化物の酵素的付加、突然変異など）による天然抗体の可変領域のグリコシル化を修飾するステップである。任意で、これはグリコシル化部位および抗原との相互作用の利用可能性を考慮に入れて実施される。あるいは、選択は天然抗体と比較して（または相互に比較して）影響を受けていない親和性および修飾された阻害活性に基づく。

【0080】

本発明の特定の実施形態では、FVIIに対して向けられた、可変領域内の相違するグリコシル化、相違する阻害能力および実質的に類似の親和性を備える少なくとも2つの抗体のライブラリーが提供される。そこで、本発明は天然阻害抗体の、修飾された阻害能力および天然抗体と比較して実質的に影響を受けていない親和性を備えるが、修飾された阻害能力を備える修飾された抗体の産生に関する。本発明の特定の実施形態では、（前記ライブラリー内で使用するための）前記修飾された抗体は、例えばCHO細胞などの適切

な宿主細胞内の組換え抗体として天然抗体を産生するステップによって得られる。あるいは、前記抗体もしくは抗体フラグメントは、部位指向突然変異誘発によって調製され、より詳細には前記抗体は可変領域内でN-グリコシル化を有していない。また別の実施形態では、前記抗体もしくは抗体フラグメントは抗体を炭水化物分解酵素へ曝すステップによって調製される。さらにまた別の実施形態では、前記抗体もしくは抗体フラグメントは化学合成によって生成される。特定の実施形態によると、前記抗体もしくは抗体フラグメントは、20%から90%、より詳細には30%から80%、さらにより詳細には40%から70%、およびいっそうより詳細には50%から60%またはそのいずれかの組み合わせのV I I I因子阻害能力を有する。

【0081】

本発明のまた別の実施形態では、第V I I I因子に対して向けられた修飾された抗体は、K r i x - 1と呼ばれる細胞株もしくは同一特性を備える抗体を産生する細胞株によって産生される。より特定の実施形態では、前記抗体はK r i x - 1もしくはそのフラグメントである天然抗体または修飾されたK r i x - 1の組換え産生アナログに由来し、より詳細には前記抗体はK r i x - 1抗体もしくはそのフラグメントとの少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%のアミノ酸類似性を有する。本発明のさらにより特定の実施形態では、前記抗体は、C H O細胞中で産生された約84%の阻害活性を備える組換え抗体K r i x - 1もしくはそのフラグメントである。コンセンサスグリコシル化配列A s n 47 - X - T h r 49 - Y内のA s n 47でのK r i x - 1のグリコシル化の除去は、数種の方法で達成できる。A s n 47からいずれかのアミノ酸への突然変異またはT h r 49からセリンとは相違するいずれかのアミノ酸への突然変異は、グリコシル化の不在を生じさせるであろう。突然変異T h r 49 S e rはグリコシル化へ何の影響も及ぼさないが、タンパク質配列中で発生するあらゆる潜在的コンセンサスグリコシル化部位が発現したタンパク質中で効果的にグリコシル化されるわけではないので、同様に修飾されたグリコシル化パターンまたはグリコシル化の不在さえ生じさせることができよう。あるいは、48位もしくは50位でのプロリンへのアミノ酸の突然変異はグリコシル化を防止するが、しかしそれに加えて抗体の三次構造の局所的歪みを引き起こすことがある。いっそうより特定の実施形態では、前記抗体は、突然変異したA s n 47位からT h r 49位を備える、より詳細にはA s n 47からG l n 47 (K R I X - 1 Q)、G l u 47 (K R I X - 1 E) もしくはA s p 47 (K R I X - 1 D) への変化および/またはT h r 49からA l l a 49 (K R I X - 1 A) への変化を備えるK r i x - 1の突然変異体である。本発明はさらに、天然抗体をN-グルコシダーゼ-Fなどの炭水化物分解酵素と一緒にインキュベートするステップによってK r i x - 1由来の抗体、より詳細にはこの方法で得られて約50%の阻害活性を備える抗体に関する。K r i x - 1由来の抗体は、少なくとも20%、より詳細には少なくとも40%、50%もしくは80%の阻害活性を有してよい。

【0082】

組換えテクノロジーによって発現したフラグメント(例、s c F vフラグメント)が使用される場合は、脱グリコシル化型はグリコシル化欠損酵母株内にグリコシル化コンセンサス配列を含むタンパク質の発現によって、またはグリコシル化を全く実施しない細菌内での発現によって得ることができる。

【0083】

可変領域内、任意でC D R内もしくはC D Rの近位で修飾されたグリコシル化を有するこれらの抗体およびそのフラグメントは、天然抗体と同様に抗体がモル過剰にある場合でさえ標的タンパク質を部分的にのみ不活性化させながら、それらが天然抗体とは相違する治療的に有用な最高阻害活性を示すという有益な特性を有している。このためこれらのグリカン修飾抗体およびそのフラグメントは、標的タンパク質の部分的阻害のみを得るための薬剤として、より詳細には凝固系における要素に対して向けられた抗体の場合には天然抗体の届かないところで凝固因子の所望の部分的阻害を達成することを可能にする抗凝固剤として有用である。同様に、無傷抗体と同一の親和性を有するが、より低い阻害活性を

10

20

30

40

50

有する未修飾フラグメントは、特定の阻害を保証する混合物を得るために任意で修飾された無傷抗体と組み合わせて使用できる。そこで、本発明は、特定阻害能力を備える抗体の選択もしくは開発によって、凝固を明確に規定された方法で調節するための医薬品の調製を可能にする。

【0084】

本発明の修飾された抗体の親和性が重大には変化していないという事実は、混合物中でそれらを使用するために極めて重要であり、修飾された抗体は、天然抗体と類似して天然リガンドを置換するであろうことを意味する。これは、明確に規定された阻害活性を得るために抗体の混合物の調製を可能にする。より詳細には、これは、最高阻害活性が極めて重要である抗凝固抗体の分野において重要である。例えば、一部の臨床状況では、相違する阻害活性を備える抗第V I I I因子抗体が必要とされることがある。例えば、外科的インターベンション後の血栓症の短期間の予防は、例えば心房細動などの慢性状態を治療するために必要とされる力価とは相違する力価を備える薬物で最適に処置することができる。

10

【0085】

そこで、本発明の特定の実施形態によると、修飾された抗体もしくは抗体フラグメントが同一標的タンパク質に対して向けられた他の抗体、さらにより詳細には同一抗原に対して特に向けられた、または同一細胞株由来の他の抗体との混合物中で使用される。この混合物は、同一標的タンパク質に対して向けられた修飾された抗体と一緒に天然抗体を含んでいてよい、またはこの混合物はそれらのグリコシル化パターンが相違する方法で修飾された2つの抗体を含んでいてよい。混合物の相違する部分は、いずれか望ましい阻害活性を得られるような量で混合することができる。

20

【0086】

本発明は、修飾されたグリコシル化および修飾された最高阻害を備えるが、それらの標的タンパク質に対する親和性もしくは特異性が改変されていない抗体を調製するための方法に関する。このため本発明は、抗体を炭水化物分解酵素もしくは形質転換酵素へ曝すステップを含む、前記抗体を産生するための方法に関する。あるいは、本発明の調製方法は、適切なグリコシル化酵素を備える細胞株内で抗体を産生するステップ、または抗体を産生する細胞株のグリコシル化酵素の活性を修飾するための細胞培養条件を修飾するステップを含む。本発明のまた別の実施形態では、前記抗体を調製するための方法は、例えば部位指向突然変異誘発によって、グリコシル化部位を除去もしくは導入するために、抗体の抗原結合部位を遺伝的に修飾するステップを含んでいる。

30

【0087】

本発明の特定の実施形態では、抗体のグリコシル化はその可変領域内または抗原結合領域の近位にあるアミノ酸内で修飾される。

【0088】

そこで本発明は、天然抗体に比較して修飾されたグリコシル化パターンを有する抗体に関する。

【0089】

天然抗体は、当技術分野において知られている方法によって調製できる。様々な細胞株内で発現する無傷抗体、脱グリコシル化酵素を用いて処置される無傷抗体、およびグリコシル化コンセンサスサイズの部位指向突然変異誘発に関する初期データは、そのような抗体の阻害効果がグリコシル化のサイズと相関していることを証明している。本発明は、K r i x - 1などの阻害抗体については、抗体の阻害効果が三次元サイズに伴って減少するという概念を提示している。この概念は、無傷抗体より低い阻害レベルを有するK r i x - 1のF a bフラグメントおよびs c F vフラグメントの使用によって確認される。

40

【0090】

本発明は、同一天然無傷抗体に由来する、相違する個別阻害活性を備える阻害抗体の混合物が、中間阻害活性が得られる混合物を生じさせることをさらに示す。これは同様に、

50

例えば K r i x - 1 モノクローナル抗体 (第 1 抗体) と R H D 5 細胞株から得られた第 2 モノクローナル抗体の混合物などの、相互に競合性である相違する天然および無傷抗体の混合物にも当てはまる。

【 0 0 9 1 】

本発明のさらにまた別の局面は、K r i x - 1 などの既知の阻害抗体と競合するそれらの能力に基づいて、本発明によって使用できるまた別の阻害抗体を単離するための方法を提供する。そこで本発明は、K r i x - 1 から出発して、K r i x - 1 結合と競合する追加の抗体を同定するための方法およびツールを提供する。そのような抗体は、任意に阻害性であり、そしてさらに任意でプラトー効果を有する。そのような方法の実験構成については実施例 1 3 に記載する。

10

【 0 0 9 2 】

所定の標的タンパク質に対するモノクローナル抗体は、K o h l e r a n d M i l l s t e i n によって最初に開発されたハイブリドーマ技術 (K o h l e r a n d M i l l s t e i n (1 9 7 5) , N a t u r e 2 5 6 , 4 9 5 - 4 9 7) 、ならびに t r i o m a 技術、ヒト B 細胞ハイブリドーマ技術 (K o z b o r a (1 9 8 3) , I m m u n o l . T o d a y 4 , 7 2) 、ヒトモノクローナル抗体などを産生するための E B V - ハイブリドーマ技術 (C o l e a (1 9 8 5) 、 「モノクローナル抗体および癌療法 (M o n o c l o n a l A n t i b o d i e s a n d C a n c e r T h e r a p y) 」 、A l a n R . L i s s , I n c . 、第 7 7 ~ 9 6 頁) などの培養中での連続継代細胞株による抗体分子の産生を提供するいずれかの技術によって産生できるが、それらはすべて本発明の範囲内に含まれる。

20

【 0 0 9 3 】

モノクローナル抗体は、ヒトモノクローナル抗体もしくはキメラヒト - マウス (もしくは他の種) モノクローナル抗体であってよい、または例えばラクダもしくはラマ由来などの、当技術分野において知られているいずれか他の種類由来でさえあってよい。ヒトモノクローナル抗体は、当技術分野において知られているいずれか多数の技術から作製することができる (例、T e n g a (1 9 8 3) , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A . 8 0 , 7 3 0 8 - 7 3 1 2 ; K o z b o r a (1 9 8 3) , I m m u n o l . T o d a y 4 , 7 2 - 7 9 , O l s s o n a (1 9 8 2) , M e t h o d s . E n z y m o l . 9 2 , 3 - 1 6) 。ヒト定常領域とともにマウス抗原結合ドメインを含有するキメラ抗体分子を調製できる (M o r r i s o n a (1 9 8 4) , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A . 8 1 , 6 8 5 1 ; T a k e d a a (1 9 8 5) , N a t u r e 3 1 4 , 4 5 2) 。

30

【 0 0 9 4 】

当技術分野において知られている様々な方法を使用すると、標的タンパク質のエピトープに対するポリクローナル抗体を産生することができる。抗体を産生するために、特異的タンパク質、またはそのフラグメントもしくは誘導体を注射することによって、ウサギ、マウスおよびラットを含むがそれらに限定されない様々な宿主動物を免疫化することができる。宿主の種に依存して、免疫学的応答を増加させるためには、(完全および不完全) フロイント、水酸化アルミニウムなどのミネラルゲル、リゾレシチン、プルロニックポリオールなどの界面活性剤、ポリアニオン、ペプチド、油乳剤、アオガイヘモシアニン、ジニトロフェノール、ならびに例えば B C G (カルメットゲラン菌) および C o r y n e b a c t e r i u m p a r v u m (コリネバクテリウム・パルブム) を含むがそれらに限定されない様々なアジュバントを使用できる。

40

【 0 0 9 5 】

選択されたタンパク質エピトープに対する抗体の分子クローンは、既知の技術によって調製できる。組換え DNA 方法 (例えば、M a n i a t i s a (1 9 8 2) 、 「分子クローニング、実験マニュアル (M o l e c u l a r C l o n i n g , A L a b o r a t o r y M a n u a l) 」 、C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y 、ニューヨークを参照されたい) を使用すると、モノクローナル抗体分子、もしくは

50

はその抗原結合領域をコードする核酸配列を構築することができる。

【0096】

本発明は、抗体分子ならびにそのような抗体分子のフラグメントを提供する。本発明の特定の局面は、無傷抗体と同一の親和性を備える抗体フラグメントを提供するが、しかし分子のイディオタイプを含有する抗体フラグメントは知られている技術によって生成できる。例えば、そのようなフラグメントには抗体分子のペプシン消化によって生成できるF(a b')₂フラグメント、F(a b')₂フラグメントのジスルフィド架橋を減少させるステップによって生成できるF a b'フラグメントならびにパピインおよび還元剤を用いて抗体分子を処理するステップによって生成できるF a bフラグメントが含まれるが、それらに限定されない。抗体分子は、既知の技術、例えば免疫吸着もしくはイムノアフィニティクロマトグラフィー、HPLC（高性能液体クロマトグラフィー）などのクロマトグラフィー法またはそれらの組み合わせなどによって精製できる。

10

【0097】

本発明の抗体は、限定された最高阻害活性を備える新規抗体を生成するための従来型ハイブリドーマ技術、ファージディスプレイ、コンビナトリアルライブラリー、免疫グロブリン鎖シャッフリング、部位指向突然変異誘発およびヒト化技術によって調製できる。

【0098】

本発明は、PCT国際特許第97/26010号および/または第01/04269号に記載されたように、例えばマウスにヒト第V I I I因子を注射するステップと、次に脾臓リンパ球とマウス骨髄腫細胞株とを融合させるステップと、さらに抗第V I I I因子抗体を産生する細胞培養を同定かつクローニングするステップとによって、動物、好ましくはマウスにおいて意図的ヒト化によって生成される天然モノクローナル抗体に由来する修飾された抗体を提供する。より詳細には、本発明の状況では、前記抗原の「活性」もしくは「相互作用性」（例えば、複合体の他の因子と結合する）部位に隣接している抗原のエピトープは、抗体の阻害効果がCDRを通して抗原の結合へ直接的には連結されていない抗体の開発を促進する目的で、免疫化のために使用できる。

20

【0099】

本発明の1つの局面は、それらのグリコシル化パターンで修飾される抗体を提供する。天然抗体のグリコシル化の修飾は、当技術分野において知られている様々な方法を通して得られる。本発明の抗体の抗原結合部位におけるグリコシル化パターンの修飾は、精製された抗体の酵素処理によって達成できる。あるいは、本発明の抗体のグリカンの修飾は、適切なグリコシル化酵素を備える細胞株内で抗体を産生するステップ、または抗体を産生する細胞株のグリコシル化酵素の活性を修飾するために細胞培養条件を修飾するステップによって達成できる。あるいは、本発明の抗体は、グリコシル化部位を除去する、または導入するために抗体の抗原結合部位を遺伝的に修飾するステップによっても産生できる。

30

【0100】

多数の炭水化物分解酵素もしくは形質転換酵素を適用すると、天然抗体のグリコシル化パターンを修飾することができる。グリコシル化は、完全もしくは部分的に増加もしくは減少させることができる。特定の実施形態では、修飾は抗体の抗原結合領域内で得られる。酵素は、様々なグリコシル化パターンを備える抗体を得るために、様々な順序および様々な状況（濃度、時間、温度、バッファなど）下で天然抗体に適用できる。

40

【0101】

例えばN-グリコシダーゼFとも呼ばれるペプチド、N-4(N-アセチル- -グルコサミニル)アスパラギンアミダーゼF(PNGase F)などの酵素を使用できる。この酵素は広範囲の特異性を有しており、タンパク質からほぼすべての知られているN-結合オリゴ糖鎖を放出する(Plummer TH Jrら(1984), J Biol Chem. 259, 10700-10704)。この酵素は、四本鎖型および五本鎖型糖鎖を放出する。酵素の活性は、グリコシル化が完全に変性している場合にしか予測できないことは注目すべきことである。したがって、無傷抗体へ前記酵素が及ぼす活性は各々の場合に調節されなければならない。抗体の脱グリコシル化を調節するための方法

50

は、「タンパク質科学における最新プロトコール (Current Protocols in Protein Science)」、G. Taylor 編集、Unit 12.4; John Wiley & Sons, Inc に記載されている。

【0102】

詳細には、グリコシル化および脱グリコシル化抗体が等電点分画電気泳動法によって比較される。

【0103】

IgG の短縮型グリコフォームは、Mimura ら (2001), J Biol Chem. 276, 45539-45547 に記載されており、図1および図2に要約した連続的酵素処理によって生成できる。

10

【0104】

シアル酸は、多数のN-およびO-結合オリゴ糖上の末端糖である。シアル酸を除去するためには、酢酸バッファ (pH 5.0) 中の天然 IgG がシアリダーゼ (Arthrobacter ureafaciens, Roche Molecular Diagnostics 社、英国イーストサセックスからのシアリダーゼなど) へ 37 °C で 24 時間にわたり曝露させる。シアル酸の除去は、タンパク質の等電点の上昇を生じさせる。このため、IEF を使用するとシアル酸の除去を調節することができる。

【0105】

シアル酸を除去すると、酢酸バッファ中で - ガラクトシダーゼ (Diplococcus pneumoniae, Roche Molecular Biological 社) を用いた 37 °C での 24 時間にわたる処理によってガラクトースを除去できる。シアル酸およびガラクトースの除去に続いて、N-アセチル - D-グルコサミニダーゼ (D. pneumoniae, Roche Molecular Biochemicals 社) を用いた 37 °C での 24 時間にわたる処理によって N-アセリルグルコサミンを分解することができる。マンノース残基は、次に - マンノシダーゼ (jack bean, Glyko 社、英国オックスフォードシャー) を用いた 37 °C での 48 時間にわたる処理によって除去することができる (Mimura Y. ら、上記)。

20

【0106】

様々なタイプのシアリダーゼについてもまた記載されている。Arthrobacter ureafaciens 由来のシアリダーゼ (ノイラミニダーゼ) は、2, 3-および 2, 6-結合シアル酸の両方を放出するが、他方ニューカッスル病ウイルス由来のシアリダーゼは 2, 3-結合シアル酸しか放出しない (Jassal ら (2001), Biochem Biophys Res Comm. 286:243-249)。エンドグリコシダーゼ F2 はコア領域内の 2 つの GlcNAc 残基間の結合を開裂させて、まだ前記タンパク質に結合した 1 つの GlcNAc を残す。エンドグリコシダーゼ F2 は、糖タンパク質から二本鎖複合体型のオリゴ糖鎖を放出するが、三本鎖型もしくは四本鎖型糖鎖は開裂しない。

30

【0107】

エンドグリコシダーゼ F3 は、狭い基質範囲を備えるまた別のエンドグリコシダーゼである：これは三本鎖型糖鎖を開裂する。コアフコシル化二本鎖型糖鎖は、唯一のまた別の証明された基質である。これは高マンノースハイブリッドの非フコシル化二本鎖型もしくは四本鎖型糖鎖を開裂しない。エンドグリコシダーゼ F2 および F3 によって開裂できる全結合は、成熟抗体では曝露させられない。抗体をこれらのエンドグリコシダーゼによって有用に修飾できるかどうかを判定するために適切な方法には、SDS-PAGE、上述したようにトウゴマ (Ricinus communis) アグルチニン-1 および IEF を用いるレクチン結合法が含まれる。

40

【0108】

これとは逆に、グリカン残基は、抗体の可変部分内で発現した炭水化物へ酵素を使用して付加することができる。例えば、上述したようにシアリダーゼを用いた処理後には、適切なバッファ中のガラクトシル-トランスフェラーゼおよび UDP-Gal を用いた処理

50

を続けることができる (K r a p p ら (2 0 0 3) , J M o l B i o l . 3 2 5 , 9 7 9 - 9 8 9) 。 修飾された抗体は、その後は炭水化物鎖のガラクトシル化のために均質である (二本鎖型ジガラクトシル化グリコフォーム)。

【0109】

相違するオリゴ糖を有する抗体の精製についても、当業者には知られている。相違するオリゴ糖を有する抗体は、コンカナバリンAなどのレクチンアフィニティークロマトグラフィーによって精製できる (二等分 G l c N A c への結合)。A l e u r i a a u r a n t i a (ヒイロチャワンタケ) はコアフコシル化に基づいて分化する。R i c i n u s c o m m u n i s (トウゴマ) アグルチニン1は、このレクチンがガラクトースで終了するオリゴ糖に対する特異的親和性を示すために、ガラクトース残基の数によって分画化 10

【0110】

すべての炭水化物残基が成熟抗体内で露出させられるのではない。抗体が上記のレクチンを用いて陽性的もしくは陰的に精製できるかどうかを決定するために適切な方法は、当業者にはよく知られている。未結合抗体が第V I I I因子に及ぼす阻害活性を決定するためには、B e t h e s d a法を用いて試験できる (K a s p e r ら (1 9 7 5) , T h r o m b D i a t h H a e m o r r h 3 4 , 6 1 2) 。 同様に、カラム上に捕捉されて適切なバッファを用いて溶離された抗体の活性は、B e t h e s d a法を用いて試験できる (上記参照)。

【0111】

抗体のグリコシル化を修飾するためのまた別の方法は、それらのレパトリーのグリコシル化酵素の機能として選択された細胞株内で組換え抗体を産生するステップによって修飾されたグリコシル化パターンを備える組換え抗体を生成するための方法である。チャイニーズハムスター卵巣細胞 (C H O) は、そのような細胞株のよく知られた例である。

【0112】

C H O細胞はヒトレパトリーのグリコシル化酵素のほとんどを有するが、それらには特定グリコシルトランスフェラーゼが欠けている。詳細には、2, 6 - シアリル - トランスフェラーゼ遺伝子 (1, 2) はC H O細胞内では内因性で発現しない。この酵素は、G a l 1, 4 - G l c N A c - R配列上の2, 6位置において末端ガラクトース糖にシアル酸を付加する。しかし、C H O細胞は、末端シアル酸がガラクトースへの2, 3 30 結合内にあるように機能的2, 3 - シアリル - トランスフェラーゼを発現する。- 3 / 4フコシルトランスフェラーゼもまたこれらの細胞によって合成もされない (G r a b e n h o r s t ら (1 9 9 9) , G l y c o c o n j . J . 1 6 , 8 1) 。

【0113】

修飾されたグリコシル化パターンを備える組換え抗体を産生するまた別の方法は、他の株由来のグリコシル化酵素を発現するように遺伝的に修飾された細胞株を使用する方法である。詳細には、また別の株からクローニングされた2, 6 - シアリルトランスフェラーゼ遺伝子を用いてトランスフェクトされたC H O - K 1細胞株を使用できる (上記参照)。

【0114】

修飾されたグリコシル化パターンを備える組換え抗体を生成するためには、酵母 (例えば、S a c c h a r o m y c e s (サッカロミセス)、P i c h i a (ピチア)、H a n s e n u l a (ハンゼヌラ))、昆虫細胞 (バキュロウイルス発現)、植物細胞もしくは植物、または哺乳動物細胞などのあらゆる発現系が適合する可能性がある。抗体のフラグメントを発現させるためには、酵母の発現は昆虫もしくは哺乳動物細胞の発現のための代替物を提供する。グリコシル化が全く必要とされない場合は、細菌内の発現が考慮に入れられる。

【0115】

酵母に関しては、メチロトロフ酵母P i c h i a p a s t o r i sが平均8 ~ 14 マンノース単位、すなわち1グリコシル化部位につきM a n (8 - 1 4) G l c N A c (50

2) を付加させることが報告されており (Tschopp による欧州特許第 0 2 5 6 4 2 1 号)、そして N-結合オリゴ糖の約 85% は Man (8-14) GlcNAc (2) のサイズ範囲内にある (Grinna and Tschopp (1989), Yeast 5, 107-115.)。Aspergillus niger (黒色アスペルギルス) は、N-グリコシル化部位へ Man (5-10) GlcNAc (2) を付加する (Panchal and Wodzinski (1998), Prep Biochem Biotechnol. 28, 201-217)。Saccharomyces cerevisiae (サッカロミセス・セレビスシアエ) グリコシル化欠損性突然変異体 mnn9 は、mnn9 細胞が過剰グリコシル化タンパク質の代わりに Man (9-13) GlcNAc (2) からなる修飾されたオリゴ糖を備えるグリコシル化タンパク質を産生する点で野生型 S. cerevisiae とは相違する (米国特許第 5, 135, 854 号における Mackay ら)。しかし、S. cerevisiae (野生型および mnn9 突然変異体) コアオリゴ糖についての特徴は、末端 -1, 3-結合マンノース残基の存在である (Montesino ら (1998), Protein Expr Purif. 14, 197-207.)。P. pastoris もしくは S. cerevisiae och1 mnn1 内で発現したタンパク質の N-グリコシル化部位に付加されたオリゴ糖には、そのような末端 1, 3-結合マンノースが欠けている (Gellissen ら (2000) Appl Microbiol Biotechnol. 54, 741-750)。末端 1, 3-結合マンノースはアレルギー性であると考
えられる (Jenkins ら (1996), Nat. Biotechnol. 14, 975-981)。このため、それらのオリゴ糖の末端 1, 3-結合マンノース残基上に担持されているタンパク質は、おそらく診断もしくは治療目的には適合しない。

【0116】

グリコシル化酵素のレパートリーは、細胞型毎に相違する。所望のグリコシル化パターンを得るために、1つ以上のグリコシル化酵素を一過性もしくは安定性トランスフェクションによって (過剰) 発現させることができる。同様に、1つ以上のグリコシル化酵素を一時的に (例えばアンチセンスもしくは siRNA テクノロジーによって) または永久的に (遺伝子不活性化によって) 阻害することができる。所定の実施形態では、グリコシル化に関係する限定されたレパートリーの酵素を有する酵母細胞が使用される。この場合は、所望のグリコシル化パターンを得るために、グリコシル化に関係する 1つ以上のヒト遺
伝子を導入できる。

【0117】

一般に、グリコシル化はしばしばタンパク質の溶解度を向上させる。所定の実施形態では、広範囲のグリコシル化 (および優れた溶解度) を備える組換えタンパク質を発現する、そして脱グリコシル化酵素を用いて組換えタンパク質を後向きに処理することが有益である。

【0118】

所定の実施形態では、増殖培地内にタンパク質を差し向ける (開裂可能な) 分泌シグナルを備える組換えタンパク質を発現させるのが有益である。これは、例えば溶解させるのが困難な酵母細胞の場合である。さらに、組換えタンパク質は、精製を促進するためにタグ (例、His タグ) または追加のドメインを有してよい。前記タグもしくはドメインもまた (例えば、トロンピンもしくは第 X 因子によって) 開裂可能である。

【0119】

本発明の特定の実施形態では、これらの発現系のいずれかにおいて産生した組換え抗体の第 VII 因子阻害活性は次に、上述したように修正 Nijmegen 法を使用する Bethesda アッセイにおいて評価できる。

【0120】

さらに、組換え抗体のグリコシル化を修飾するために培養条件を活用することもできる。血清無含有培地中の定常状態で溶解した酸素の濃度は、抗体のグリコシル化に影響を及ぼす。グリコシル化の程度は、溶解酸素濃度が減少するに伴って低下する (Kunkel

ら(1998), *J Biotechnol.* 62, 55-71)。培地に20mMを越えるN-アセチルグリコサミンを補給すると、さらに新規抗体グリコフォームも誘導することができる(Tachibanaら(1992), *Biochem Biophys Res Commun.* 189, 625-32; Tachibanaら(1996), *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 32, 178-183)。グルコシル化の変調に関係している(Canella and Margni(2002), *Hybrid Hybridomics* 21, 203)。グリコシル化に影響を及ぼすその他の因子は、培地のpHにおける変化ならびに前駆体および栄養素の適合性である。

10

【0121】

このため、細胞株および細胞培養条件の選択は、グリコシル化パターンに大きな影響を及ぼす可能性がある。

【0122】

酵素的修飾および抗体の組換え産生にとってのまた別の代替法は、(部位指向)突然変異誘発を使用する方法である。この技術を用いて、新規グリコシル化部位を導入できる、または既存グリコシル化部位を除去できる。抗体の可変領域内の部位指向突然変異誘発によってN-グリコシル化部位を導入することができる。好ましくは、抗原に対する抗体の親和性へアミノ酸置換が及ぼす効果を最小限に抑えるために、突然変異は単一アミノ酸変化として導入される。N-グリコシル化部位の付加は、Asn-X-Ser/Thr配列の作製によって、最も一般的にはAsnをコードするようにコドン我突然変異させることによって実施される。さらに、追加のグリコシル化のための部位は、グリコシルトランスフェラーゼに接近可能であると予測された位置で選択されることが好ましい。あるいは、N-グリコシル化部位を含有するアミノ酸ストレッチは、可変領域内でグリコシル化された抗体の公表された配列内で選択できる。所望の方法でのFVII活性を阻害する抗体の選択は、Bethesdaアッセイを用いて行なうことができる(Kasperら(1975)、上記参照)。タンパク質構造は、グリコシル化を間接的に修飾するために修飾することもできる(Lundら(1996), *J Immunol.* 157, 4963、Lundら(2000), *Eur J Biochem.* 267, 7246)。部位指向突然変異誘発は当業者によく知られた方法であり、Zoller and Smith方法を含んでいる(Zoller and Smith(1987), *Methods Enzymol.* 154:329-50)。

20

30

【0123】

本発明は、例えばFab、Fab'、F(ab')₂、scFv、CDR、単一可変ドメインならびにこれらの誘導體、ホモログおよび組み合わせなどの上述したモノクローナル抗体のいずれかのフラグメントをさらに提供する。

【0124】

本発明の特定実施形態では、抗体は凝固系の要素に対して、より詳細には第VII因子に対して向けられている。

【0125】

このため本発明は、Krix-1に由来する抗体、より詳細にはKrix-1に由来するそれらのグリコシル化パターンが修飾されていて修飾された第VII因子阻害活性を備える抗体に関する。詳細には、グリカン修飾抗体はヒトモノクローナル抗体Krix-1、そのフラグメントに由来する、その1つもしくは数個の相補性決定領域を含有する。修飾されたグリコシル化部位を備える代表的な抗体は、N-グリコシダーゼFを用いたKrix-1の処理によって産生した抗体である。詳細には、Krix-1の重鎖のCDR1内に突然変異Asn47Glu(Krix-1E)およびThr49Ala(Krix-1A)を含有する遺伝的に修飾された抗体である。

40

【0126】

グリコシル化の修飾は、mAb-Krix-1の第VII因子阻害活性を修飾する。

50

修飾されたグリコシル化パターンを備える抗体の阻害活性を評価するための特定の方法は、修正Nijmegen法(Verbruggenら(1995), Thromb Haemost. 73, 247-251)を用いたBethesda法である(Kasperら(1975)、上記を参照)。このアッセイでは、FVIIII源として使用される正常プール血漿が等量の抗体と混合される。抗体を用いた2時間のインキュベーション後に、残留FVIIII活性が因子クロモジェニックアッセイもしくはクロッティングアッセイによって測定された。

【0127】

Krix-1と名付けられた細胞株はPCT国際特許第01/04269号の中で開示されており、Dr. Marc Jacquemin、(分子血管生物学センター(Center for Molecular and Vascular Biology)、Onderwijs & Navorsing、3000ベルギー国ルーバン、ヘラストラート通り49)によって1999年7月1日にアクセッション番号LMBP5089CBを付けてBCCM/LMBP(Belgian Co-ordinated Collections of Microorganisms/Plasmid Collection Laboratorium voor Moleculaire Biologie、B-9000 Gnent, BE、K.L. Ledeganckstraat 35)に寄託された。

10

【0128】

FVIIII活性の部分的阻害は、所定の抗体による第VIIII因子活性の最高阻害が、例えばBethesdaアッセイなどの適切な試験方法を用いて決定したときに99%以下であることを意味している。残留第VIIII因子活性は、次に凝固もしくは第VIIII因子クロモジェニックアッセイを用いて測定される。適切なクロモジェニックアッセイは、例えばCoatest(登録商標)(Chromogenix-Instrumentation Laboratory SpA、イタリア国ミラノ)である。

20

【0129】

本発明に記載した抗体は、様々な疾患の治療もしくは予防において有用であり得る。凝固系の要素に対して向けられた抗体の場合には、これらの抗体は、心筋梗塞、不安定狭心症、心房細動、脳梗塞、腎障害、肺塞栓症、深部静脈血栓症、経皮経管的冠動脈形成術、播種性血管内凝固症候群、敗血症、臓器移植、シャントに関連する血栓性障害のための治療用医薬組成物中において有用である。

30

【0130】

本発明は、一方では第VIIII因子の部分的阻害が所望であるが、他方では所定レベルの残留第VIIII因子活性が前記障害もしくは症候群の治療もしくは予防において有益である障害もしくは症候群を治療および予防するための医薬組成物の生成を可能にする。その1つの例は、肺炎、虚血、多発外傷および組織傷害、出血性ショック、免疫媒介性臓器障害および感染症を含む多数の臨床状態の可能性のある終点である全身性炎症である。初期の原因とは独立して全身性炎症では極めて類似する生理的变化が観察されるので、用語「全身性炎症性応答症候群」(以下ではSIRSという)は一般にそのような変化を意味すると一般に言われており、このため本出願ではR.C. Boneら、Chest(1992), 101, 1644-1655によって考案されたアメリカ胸部医師会(American College of Chest Physicians)の勧告にしたがって使用した。SIRSの定義および病因はさらにNystrom(1998), J. Antimicrob. Chemother. 41 Suppl A, 1-7に記載されている。敗血症は、感染症に関連するSIRSを表している。ショックは、敗血症起源であろうとなかろうと、つまり(a)適正な急速輸液にもかかわらず持続する低血圧、および(b)低灌流もしくは臓器機能不全に関連する異常を特徴とする。

40

【0131】

Boneら、Chest(1997)112, 235-43によると、SIRSから切り離せない部分である早期全身性炎症は、通常は後期抗炎症性応答によって補償される

50

。炎症促進性事象と抗炎症性事象との間の平衡は好都合な臨床転帰をもたらす。しかし、これらの2つの拮抗事象間の平衡は、多くの相互作用性メディエーターが関係するために、脆弱で容易に崩壊させられる。近年、SIRSの病理生理学および関連性敗血正ショックの発生に関しては多くの知識が蓄積されてきており、そのパラダイムはグラム陰性細菌による感染症のためである。そこでこのような細菌から遊離したエンドトキシンは、多数の宿主細胞、そして詳細には単球およびマクロファージを活性化する。これは腫瘍壊死因子（以下ではTNFと呼ぶ）、インターロイキン1、6および8（以下ではIL-1、IL-6およびIL-8と呼ぶ）を含む炎症促進性サイトカインの産生を生じさせる。同一細胞によって産生された酵素は、凝固系、補体系およびブラジキニン系の活性化をもたらす。血小板活性化因子（以下ではPAFと呼ぶ）を含むスーパーオキシドラジカルおよびアラキドン酸の代謝産物は、Parilloら、Ann Intern. Med (1990), 113, 227-242にしたがって産生される。

【0132】

凝固系の活性化は、微小血管構造内での血栓の形成を生じさせるために、血管内皮への多形白血球および血小板の接着とともに、SIRSの病因において不可欠である。血栓は、臓器灌流を損傷させ、最終的には臓器機能障害もしくは不全を生じさせる。腸レベルでは、これは腸内細菌叢由来のエンドトキシンの上昇した吸収を産生し、さらに炎症促進性サイトカインの遊離および臓器機能障害を増大させる。播種性血管内凝固症候群（以下ではDICと呼ぶ）は、このため敗血症および敗血性ショックの病態生理の必須成分である。

【0133】

後期に補償性抗炎症性応答が出現するが、敗血症の臨床転帰はそれに左右されるであろう。弱すぎる、または強すぎる応答はDICを調節する失敗によって、またはさらに感染症に対する上昇した感受性を備える調節されない出血および免疫抑制をもたらすことによって臨床状態を悪化させる可能性がある。この抗炎症相に介入する個別の因子はすべてが確実に同定されている訳ではないが、多数の分子が明確に関係すると見なされている。そこで凝固カスケードにおける様々なステップで作用する3種の強力な阻害剤であるアンチトロンビン（以下ではATと呼ぶ、 $3\mu\text{mol/L}$ の正常血漿中濃度を備える血漿中セリンプロテアーゼ阻害剤）、活性化タンパク質C（APC）および組織因子経路阻害剤（以下ではTFPIと呼ぶ、また別の内皮結合タンパク質）は、E. F. Mammen, Intensive Care Med. (1998), 24, 649-50によると、敗血症中には重度に減少し、それらの血漿中濃度は不良な臨床的予後と逆相関している。そのような減少したレベルは、つまり肝臓による消費の増加および合成の減少の両方に起因する。

【0134】

凝固系は現在、開始期、増幅期および伝播期に分けられている。開始は、組織因子（TF）上の第VII因子の活性化または第XI接触因子によって発生する。これは少量のトロンビンの生成を生じさせ、増幅ループを活性化してより多くのトロンビン形成をもたらす。この増幅ループにおいて2つの補因子である第V因子および第VIII因子は活性化されるが、それらの機能はプロトロンビンおよび第X因子の開裂を各々数対数の大きさまで増加させることである。凝固カスケードの伝播期は、最終的にはフィブリンの形成および血餅退縮をもたらす。このため、トロンピンは他の起源の敗血症もしくはSIRSに関連するDICの発達において中心的役割を果たす。この発見は、トロンピン形成を減少させる治療的試みをもたらした。ヒトにおいては、アンチトロンピンを合成プロテアーゼ阻害剤（Makiら、Gynecol. Obstet. Invest (1987), 23:230-240）またはヘパリン（Blauhutら、Thromb. Res. (1985), 39:81-89）と比較する試験は、アンチトロンピン処置後の播種性血管内凝固症候群の有意な減弱を証明したが、いずれの試験もプラシーボコントロール群を含んでいなかった。Fourrierら、DIC, Excerpta Medica, Amsterdam (1993), 221-226によると、敗血性ショック

およびDICを有する患者を対象としてアンチトロンビンの血漿濃縮液を用いた治療を実施したブラシーボ対照二重盲験試験はDICの有意な初期補正を達成したが、統計的に有意な方法で死亡率を減少させることはできなかった。近年には、Eiseleら、Intensive Care Med. (1998), 24:663-72によると、血漿由来もしくは組換えATが敗血症のコントロールにおいて試験されている。しかし、これらすべての実施形態は重篤な問題に遭遇した。天然血漿中アンチトロンピンは、トロンビンの相当に不良な阻害剤であるが(トロンビンの完全阻害を達成するが、これは極めて高い濃度の場合だけである)、しかしその阻害効果はヘパリンの存在下では10,000倍に上昇する。Bufferら、Am. J. Med. (1989), 87:44-48
およびVinazzer, Clin. Appl. Thromb/Hemost (1995) 1:62-65によると、敗血症の動物モデルにおいてショックを予防するためには高濃度のアンチトロンピンが必要である。循環内でのアンチトロンピンの中等度の生存時間(Schwartzら、Am. J. Med. (1989) 87:53-60
およびMenacheら、Blood (1990) 75:33-39によって約3日間の半減期が報告された)およびSIRSにおけるその消費のために、その活性は定期的に監視されなければならない。理論的には、アンチトロンピンおよびヘパリン併用療法は、ショックの管理においてアンチトロンピン単独より有効なはずであるが、あいにくなことこの形態の治療はショックを発生した患者における転帰を改善せず、上昇した出血リスクと関連していた。

10

20

30

40

50

【0135】

治療有効量は、アンチトロンピンおよび/または活性化タンパク質Cおよび/または組織因子経路阻害剤の血漿中レベルを回復する量であると規定できる。そのような血漿レベルは、例えばLaboratory Haematology (1989)、Chanarin編集、Churchill Livingstoneおよび「血栓症における実験技術、マニュアル; ECATアッセイ方法の改訂第二版(Laboratory techniques in Thrombosis, a manual; (2nd revised edition of ECAT assay procedures)」、Jespersenら編集、Kluwer Academic Publishers (1999)の中で開示された方法を使用することによって当業者であれば容易かつ直接的に測定できる。大多数のヒトIgG抗体の長い半減期を考えると、前記クラスのモノクローナル抗体である本発明の部分阻害剤が、ほとんどの場合に、単回投与で効率的な予防および/または治療を提供するであろうことは理解されるであろう。

【0136】

本発明において使用した修飾されたグリコシル化を備える第VII因子の部分阻害剤は、以下の長所を示す：

- それらはトロンビンの形成を減少させる、もしくは部分的に阻害するために十分な程度までFVIIの機能を阻害する。トロンビンの形成の減少、しかし完全ではない抑制は正常な血餅形成を許容しながら播種性血管内凝固症候群(DIC)の発生を予防する。DICの予防は、正常臓器灌流を維持し、臓器機能障害および不全を回避する。

【0137】

- トロンビンの形成をコントロールより下に維持すると、補償性抗炎症性応答の活性化が減少する。そこで、活性化タンパク質Cは直接的トロンピン分解によって生成され、組織因子経路阻害剤の効果は、その活性化が第VII因子補因子活性に直接的に左右される第X活性化因子の存在に左右される。トロンピンと直接的に結合する循環中アンチトロンピン(AT)の限定された枯渇もまた発生する。これを言い換えると、炎症促進性および抗炎症性両方の補償性応答が、トロンビンの形成速度を調節するステップによってコントロールより下に維持される。

【0138】

プラトー効果は、グリコシル化パターンを備え、このためその阻害プラトーが改変された単一抗体を用いることによって、または個別化合物のプラトー効果間に位置する所望の

プラトール効果を得るためにそのような比率で抗体混合物を用いることによってのいずれかで本発明の抗体のグリコシル化を修飾することによって、微調整することができる。炎症誘導性障害に対しては、改変されたグリコシル化を備える阻害抗体は、第V I I I因子活性をトロンピン情報の阻害と活性化タンパク質Cの生成との間で適切な平衡が得られるレベルまで阻害することを可能にする。

【0139】

本発明は、動物、より詳細にはヒトにおいて凝固障害を予防もしくは治療するための医薬組成物であって、有効成分として修飾されたグリコシル化パターンおよび阻害活性を備えるが親和性は影響を受けていない、上記で開示したような抗体およびその修飾バージョンを医薬上許容される担体との混合物中に含む医薬組成物をさらに提供する。

10

【0140】

本発明の医薬組成物中において使用するために適切な医薬担体は、例えばレミントンの製薬科学第16版 (Remington's Pharmaceutical Sciences 16 ed. (1980)) に記載されており、それらの処方当業者にはよく知られている。それらにはいずれかおよびすべての溶媒、分散媒体、コーティング剤、抗菌剤および抗真菌剤 (例えば、フェノール、ソルビン酸、クロロブタノール)、等張剤 (例、糖もしくは塩化ナトリウム) などが含まれる。組成物中のモノクローナル抗体有効成分の作用期間を調節するために追加の成分を含むことができる。

【0141】

放出制御型組成物は、例えばポリエステル、ポリアミノ酸、ポリビニルピロリドン、エチレン-酢酸ビニルコポリマー、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、硫酸プロタミンなどの適切なポリマー担体を選択することによって得ることができる。薬物放出速度および作用期間は、モノクローナル抗体有効成分をヒドロゲル、ポリ乳酸、ヒドロキシメチルセルロース、ポリメチルメタクリレートおよびその他の上述したポリマーなどのポリマー物質の微粒子内、例えばマイクロカプセル内に組み込むことによって調節できる。そのような方法には、リポソーム、マイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、ナノカプセルなどのようなコロイド状薬物送達システムが含まれる。投与経路に依存して、有効成分を含む医薬組成物は保護コーティングを必要とすることがある。注射使用のために適切な医薬形状には、無菌水溶液もしくは分散液およびその即時の調製のための無菌粉末が含まれる。このため、典型的な担体には、生体適合性水性バッファ、エタノール、グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールおよびそれらの混合物が含まれる。

20

30

【0142】

以下では、特定の非限定的実施例を参照しながら本発明を説明する。

【実施例1】

【0143】

Krix-1によるF V I I I阻害に脱グリコシル化の効果

K R I X - 1 (P B S 中 で 0 . 5 m g / m L) を 最 終 濃 度 2 U / m L と な る よ う に N - グリコシダーゼ - F (R o c h e D i a g n o s t i c s G m b H 社、ドイツ国マンハイム) と混合した。この混合物を穏やかに攪拌しながら 37 で 72 時間インキュベートした。

40

【0144】

天然および脱グリコシル化 K R I X - 1 の阻害活性を B e t h e s d a アッセイにおいて評価した (K a s p e r ら (1 9 7 5)、上記参照)。このため、T B S (20 m M の T r i s、0 . 1 5 M の N a C l、p H 7 . 4) 中 の 様 々 な 希 釈 率 の 1 容 量 の 抗 体 を 1 容 量 の 正 常 ヒ ト プ ル 血 漿 と 混 合 し、37 で 2 時 間 イ ン キ ュ ベ ー ト し た。正 常 プ ル 血 漿 は、10 人の健常者由来の血漿が混合され、最終濃度 10 m M と なる よ う に H e p e s (100 m M) の 添 加 に よ っ て 緩 衝 さ れ て い た。次 に 修 正 D A D E F V I I I クロモジェニックアッセイ (D a d e A G 社、ドイツ国マールブルク) を用いて残留 F V I I I 活性を測定した。このアッセイでは、トロンピン活性化 F V I I I は第 I X a 因子、P L お

50

よびカルシウムイオンの存在下で第 X 因子から第 X a 因子への転換を促進した；第 X a 因子活性を次に p - ニトロアニリド基質の加水分解によって評価した。製造業者の取扱説明書にしたがって再構成した試薬は、ウシ第 X 因子 (1 m M)、第 I X a 因子 (0 . 3 m M) およびトロンビン (0 . 3 m M)；CaCl₂ (3 0 m M)、PL (6 0 m M)、クロモジェニック第 X a 因子基質 (CH₃OCO - D - CHG - Gly - Arg - pNA . AcOH；3 . 4 m M)、およびトロンビン阻害剤 (L - アミジノフェニルアラニンピペリジン) を含んでいた。2 時間のインキュベーション時間の終了後に 3 0 μ L の血漿 / 抗体混合物を回収し、マイクロタイトレーションプレート内へ広げた；3 0 μ L の第 X 因子および第 I X a 因子 / トロンビン試薬を連続的に添加した。9 0 秒後、6 0 μ L のクロモジェニック基質を添加し、インキュベーションを 3 7 °C で 1 0 分間延長した。次に 3 0 μ L のクエン酸 (1 M) の添加により反応を遮断し、4 0 5 n m で OD を測定した。残留 F V I I I 活性は、試験サンプルの OD_{4 0 5 n m} と既知の濃度の F V I I I 溶液を用いて得られた OD_{4 0 5 n m} とを比較することによって決定した。残留 F V I I I 活性は、全実験を通して試験サンプルとして正確に取扱い、希釈した血漿アリコート中で測定した活性のパーセンテージとして表した。

10

【 0 1 4 5 】

天然 K R I X - 1 は F V I I I 活性の 9 0 % まで阻害した。対照的に、脱グリコシル化 K R I X - 1 を用いた場合は 5 0 % の最高阻害 (プラトー阻害) しか達成されなかった (図 3)。

【 実施例 2 】

20

【 0 1 4 6 】

天然および脱グリコシル化 K R I X - 1 を混合すると、様々なレベルまで F V I I I を阻害する抗体混合物の選択を可能にする。

【 0 1 4 7 】

相違する比率の N - グリコシダーゼ F を用いた脱グリコシル化対天然 K R I X - 1 を含有する混合物を調製した。各混合物を 0 . 0 5 から 2 5 μ g / m L の範囲内の様々な抗体濃度へ希釈した。1 容量の各希釈液を 1 容量の正常ヒトプール血漿と混合した。3 7 °C で 2 時間のインキュベーション後、クロモジェニックアッセイ (第 V I I I 因子クロモジェニックアッセイ、D a d e B e h r i n g 社、ドイツ国マールブルク) を用いて残留 F V I I I を評価した。天然および脱グリコシル化 K R I X - 1 は、F V I I I 活性を各々約 9 0 % および 5 0 % 阻害した (図 4)。これとは対照的に 1 の脱グリコシル化抗体に対して 4 . 5 の天然抗体の混合物は約 8 0 % の最高 F V I I I 阻害を生じさせたが、他方 1 の天然抗体に対して 1 . 5 の天然 K R I X - 1 を含有する混合物は F V I I I 活性を約 6 5 % 阻害した (図 4)。5 0 から 9 0 % のいずれかのレベルへ F V I I I 活性を阻害する混合物は、天然および脱グリコシル化 K R I X - 1 の比率を変動させることによって同様に得ることができる。

30

【 実施例 3 】**【 0 1 4 8 】**

CHO 細胞中で産生した組換え K r i x - 1 (C H O - r e c K R I X - 1) は、K r i x - 1 (ヒトリンパ芽球様細胞株によって産生) より低い F V I I I 阻害活性を有した。

40

【 0 1 4 9 】

K R I X - 1 E B V - 不死化ヒト B 細胞由来の R N A は、製造業者 (L i f e T e c h n o l o g i e s 社) の取扱説明書にしたがって T R I z o l 試薬を用いて単離した。c D N A は、第 1 鎖 c D N A 合成のための S u p e r S c r i p t 予備増幅システムを用いて合成した。

【 0 1 5 0 】

重鎖もしくは軽鎖をコードする配列は、Q u i c k P r e p (登録商標) M i c r o m R N A 精製キット (A m e r s h a m P h a r m a c i a B i o t e c h 社、オランダ国ローゼンダール) を使用して K R I X - 1 細胞から調製した m R N A についての R T - P C R によって増幅した。重鎖のための特異的 P C R プライマーは次のとおりであっ

50

た：フォワードプライマー：cDNA配列（PCT国際特許出願第01/04269号）の（nt）1から21ヌクレオチド（大文字）に対応し、そしてクローニングのためのKpnI部位（下線付き）およびKozak配列（太字のイタリック）を含有する5'-cgggggtaccaccaccATGGACTGGACCTGGAGGATC-3'（配列番号5）；リバープライマー：ヒト4-定常領域の3'末端のnt1800-1780（大文字）（アクセッション番号K01316）に対応し、停止コドン（太字のイタリック）およびクローニングのためのSalI部位（下線付き）を含有する、5'-tatggccgacgtcgaactcATTTACCCGGAGACAGGGAGAG-3'（配列番号6）。軽鎖のための特異的プライマーは次のとおりであった：フォワードプライマー：cDNA配列（PCT国際特許出願第01/04269号）のnt1から20（大文字）に対応し、そしてクローニングのためのHindIII部位（下線付き）およびKozak配列（太字のイタリック）を含有する5'-cccaagcttccaccATGGAAACCCAGCKCAGCT-3'（配列番号7）；リバープライマー：ヒト定常領域の3'末端のnt653-635（アクセッション番号V00557）に対応し、停止コドン（太字のイタリック）およびクローニングのためのXbaI部位（下線付き）を含有する、5'-aaacagccctctagactAACACTCTCCCTGTTGAAG-3'（配列番号8）であった。配列検証後、重鎖および軽鎖配列は、上記に記載した制限部位を使用してEF1-およびCMVプロモーター各々の制御下で真核細胞中での二重遺伝子発現のために設計されたpBudCE4プラスミド（Invitrogen社、ベルギー国メレルベーク）内へ連続的にクローン化した。FuGENE6系（Roche Diagnostics社、ベルギー国ブルッセル）を製造業者の取扱説明書にしたがって用いて、CKO-K1細胞の安定性トランスフェクションのために最終ベクターを使用した。トランスフェクトした細胞は、ゼオシン（0.7mg/mLの選択濃度もしくは0.35mg/mLの維持濃度；Life Technologies, Invitrogen社）の存在下で10% FCS、4mmol/Lのグルタミンおよび80mg/Lのゲンタマイシン（Geomycin（登録商標）、Schering-Plough社、ベルギー国ヘイスト・オブ・デン・ベルフ）を補給したDMEM（Life Technologies社、英国ベイズリー）中で培養し、ELISAによって抗体産生について検証した（下記参照）。細胞は、0%へのFCSの段階的減少によって血清無含有培地中での増殖に適応させ、クローン希釈後、機能性（huFVIIIについて）のELISA）ならびに発現（抗ヒトIgG4検出抗体を用いたELISA）に関してバッチ産生のための最高プロデューサーを使用した。抗FVIII抗体を検出するために、グリシン緩衝化生理食塩液（GBS）中で希釈した50μLのrfVIII（1μg/mL）を直接的に用いて4で2時間プレートをインキュベートすることによってrfVIIIを不溶化した。これらのプレートを上述したように洗浄し、さらに4で2時間インキュベートするために50μLの培養上清を添加した。洗浄後、Tris-カゼイン中で1,000倍に希釈した50μLのペロキシダーゼ標識抗ヒトFcガンマギIgG（Sigma社）を添加した。室温での2時間後、プレートを再び洗浄し、100μLのOPDを補給した。結果として生じたODは、Emaxマイクロプレートリーダー（Molecular Devices社、カリフォルニア州メンロパーク）内で492nmで読み取った。陰性および陽性コントロールは、各々培養培地および高力価阻害剤血友病A患者から精製したIgGであった。

【0151】

組換え抗体は、固定タンパク質A（High-TRAP Protein A、Pharmacia社、スウェーデン国ウプサラ）上の吸着によって細胞培養上清から精製した。培養上清は、1mL/分の流量でHigh-TRAP（登録商標）Protein A（Pharmacia社、スウェーデン国ウプサラ）を通過させた。結合したIgGは100mMのクエン酸（pH3）を用いて溶出した。Tris（pH9）を用いたpH中和後、リン酸緩衝化生理食塩液（PBS）に対してIgGを透析した。タンパク質の濃度はBio-Radアッセイ（Biorad社）を用いて決定した。

【0152】

CHO細胞中で産生した組換え抗体をCHO-recKRIX-1と呼んだ。興味深いことに、大きく過剰なこの抗体中で観察された最高阻害は75-85%のFVII活性にしか到達せず、これはFVIIがKRIX-1(ヒトリンパ芽球様細胞株によって産生した)と一緒にインキュベートしたときに観察された85-95%の最高(プラトー)阻害より低かった(図5)。

【実施例4】

【0153】

マウスにおけるCHO-recKRIX-1を用いた大静脈血栓症の予防

血栓は、以前に記載したモデル(Singhら、2002、上記参照)を用いて成熟雄性野生型マウス(体重:18g~31g、年齢:8~10週齢)の下大静脈内で生成した。マウスにイソフルランを用いて麻酔し、正中開腹術を介して下大静脈を腎静脈の下方まで露出させ、神経外科用血管クリップ(Braun Medical社)を大静脈のセグメントへ30秒間あけて15秒間ずつ2回装着した。次に5/0プロレン(prolene)系を大静脈の周囲に配置し、4/0絹縫合糸を大静脈およびプロレン系に結び付けることによって狭窄を生成した。糸を取り除いて、血流を再開させた。腹部を閉鎖し、動物が回復するに任せた。4時間後、マウスに再度麻酔し、大静脈の1cm部分(結紮点と腸骨動脈分岐部との間)を切開し、血栓の存在について検査した。切開したセグメントを次に10% PBS中で洗浄し、1%パラホルムアルデヒド中に一晚浸漬した。血管セグメントをパラフィンろう中に包埋し、結紮部から下方へ0.5mm間隔で7×10μmの横断切片を切除した。これらの切片は、haematoxylin and eosin(ヘマトキシリン&エオシン)、Martius Scarlet Blue(マルチウス・スカーレット・ブルー:MSB)およびウサギ抗血小板抗体(Accurate Chemical & Scientific Corporation、11590ニューヨーク州ウェストベリー)によって染色した。MSBは新鮮フィブリンを赤色、もしくは成熟フィブリンを青色/灰色、赤血球を黄色、そしてコラーゲンを淡青色に染色した。血栓のサイズは、血栓の存在について7切片をスコア付けすることによって測定し、各々血栓が存在する場合は1、存在しない場合は0のスコアを付けた。次に各動物についてスコアを合計した。手術および顕微鏡分析を実施する試験者は治療群について知らされていなかった。

【0154】

血栓症は、150μgの抗体もしくは生理食塩液の皮下注射16時間後に3群の野生型マウスにおいて誘導した。Fischerの直接確率検定(両側)を用いて、血栓の存在もしくは不在に関して群間の統計的有意差を評価した。血栓サイズに及ぼす効果は、Mann-Whitney(マン・ホイットニー)U検定を用いて血栓スコアを比較することによって試験した。生理食塩液を注射したマウス14匹中10匹は肉眼で見える血栓を発生したが、これに比してKRIX-1もしくはCHO-recKRIX-1を用いて前処置した各群において血栓を発生した動物は7匹中1匹もいなかった(P<0.01)。

【0155】

組織学的分析はコントロール動物14匹中11匹においてそして、KRIX-1もしくはCHO-recKRIX-1を用いて処置した動物では各々1、1および2例の血栓を同定した(図6)。したがって、CHO-recKRIX-1はKRIX-1より有意に低くFVII活性を阻害したが、CHO-recKRIX-1は血栓を極めて効率的に阻害するので、このため天然KRIX-1抗体より優れた安全性/有効性プロファイルを提供する。

【実施例5】

【0156】

II型ヘパリン結合部位(HBS)アンチトロンピン欠損症(AT^{m/m})を備えるマウスにおけるCHO-recKRIX-1の抗血栓活性

II型ヘパリン結合部位(HBS)アンチトロンピン欠損症を備えるマウスにおける血

栓性持続勃起症モデルを用いて、CHO-recKRIX-1の抗血栓活性を評価した(Dewerchinらの提示)。

【0157】

マウスはR48C突然変異の標的化ノックインによって事前に生成した(ヒトにおける「Toyama」R47C突然変異に対応する、結果として生命を脅かす、様々な部位、最も顕著には心臓、肝臓、および眼血管、胎盤血管および陰茎血管における特発性血栓を生じさせる(Dewerchinら、公表のために提出済み)、アンチトロンビンのHB S(AT)(AT^{m/m}マウス)中で硫酸ヘパリン/ヘパラン結合および補因子活性を取り除く(Koideら(1983), Thromb Res. 31, 319-328; Koideら(1984), Natl. Proc Natl Acad Sci USA. 81, 289-293)。雄性マウスAT^{m/m}の交配後の持続勃起症発生の観察は、血栓性転帰の明確なエンドポイントおよび容易な等級付けを提供し、静脈血栓症の生理学的モデルの開発の根拠を提供した。

10

【0158】

性的に成熟した雄性マウスの年齢適合群(2~4月齢)に100μLの生理食塩液、または100μLのKrix-1、100μLのCHO-recKRIX-1QもしくはCHO-recKRIX-1の1mg/mL溶液を2回(交配3日前および交配当日)皮下注射した。第2回注射後、各雄性マウスを2匹の野生型Swiss系雌性マウスと交配させ、交配3日後には新しい2匹の雌性マウスと取り替えて交配させた。全雌性マウスについて最近の交配を示す膣粘液栓子の形成を毎日記録し、確認された性活動を示した雄性マウスについて得られた結果だけを分析に組み入れた。雄性マウスを持続勃起症の発生について毎日検査し、持続勃起症が観察された時点、または実験が終了する初期交配8日後に致死させた。致死時に、上述したように残留FVII活性およびヒトIgGレベルの決定のために血液サンプルを採取した。陰茎を解剖し、目視検査によって背側陰茎静脈および海綿体静脈内の血栓の存在を決定した。

20

【0159】

致死後、解剖した陰茎をパラホルムアルデヒドにより固定し、パラフィン包埋し、組織学分析のために処理した。ヘマトキシリン/エオシンを用いて顕微鏡分析のために7μmの横断切片を染色した。

30

【0160】

スコア付け：血栓性転帰は4つのカテゴリーを用いてスコア付けした：0、血栓なし；1、顕微鏡による陰茎静脈の血栓；2、肉眼で見える陰茎静脈の血栓；3、不可逆性血栓性持続勃起症。肉眼で見える血栓が観察されず、技術的理由から陰茎静脈の組織学検査結果を得ることができなかった場合も、動物は1とスコア付けした。注射およびマウスの監視を実施する試験者は処置群について遮蔽されていた。血栓スコア間の統計的有意差は、Kruskal-Wallis(クルスカル・ウォリス)もしくはMann-Whitney U検定を用いて試験した。抗体もしくは生理食塩液を用いて処置したこれらの各雄性マウスに対してフォローアップ期間内の少なくとも2匹の雌性マウスにおける膣粘液栓子の存在は、これらの雄性マウスの実際の性活動を確証した。

40

【0161】

KRIX-1、CHO-rec-KRIX-1は、試験した全マウスにおいて持続勃起症を予防できた(生理食塩液に対して、 $p < 0.05$) (図7)。2×100μgのKRIX-1抗体を注射した群では、5匹の雄性マウスはいずれも持続勃起症を発生しなかったそれらのうち4匹は目視監査および実験終了時の顕微鏡分析でも血栓を有していなかった；残り1匹は肉眼的血栓を示さなかった。技術的理由から、組織学的分析を実施することができなかったためこれらの動物は、分析が実施されていれば判定された可能性がある最高スコアの1とスコア付けした(図7)。

【0162】

組換えCHO-rec-KRIX-1抗体についても類似の結果が観察された：処置された雄性マウス7匹中持続勃起症を発生したマウスはいなかった；5匹のマウスは肉眼的

50

血栓も顕微的血栓も有していなかった(図7); 1匹は顕微鏡検査で検出可能な血栓だけを示し(スコア1)(図7)、1匹は肉眼で見える血栓は有していなかったが、顕微鏡検査により分析できなかったために、このため同様に1とスコア付けした(図3)。

【実施例6】

【0163】

II型ヘパリン結合部位(HBS)アンチトロンビン欠損症(AT^{m/m})を備えるマウスにおけるCHO-recKRIX-1Qの抗血栓活性

実施例5において概説したように、II型ヘパリン結合部位(HBS)アンチトロンビン欠損症を備えるマウスにおける血栓性持続勃起症モデルを用いて、CHO-recKRIX-1Qの抗血栓効率を評価した(Dewerchinら(2003), Circ Res 93, 1120-1126)。

10

【0164】

本実施例では、性的に成熟した雄性マウスの年齢適合群に100μLの生理食塩液、または100μLのKrix-1、100μLのCHO-recKRIX-1Qの1mg/mL溶液、FVIIを認識しないコントロールヒトIgG4モノクローナル抗体、またはピヒクル(PBS)を2回(交配3日前および交配当日)皮下注射した。

【0165】

CHO-recKRIX-1は、血栓の発生を減少させることができた(PBSおよびコントロールIgG4に対して $p < 0.05$)(図12)。2×100μgのCHO-recKRIX-1Q抗体を注射した群では、死亡した、あるいは持続勃起症を発生した雄性マウスは1匹もいなかった。CHO-recKRIX-1Qを用いて処置した全動物もまた、目視検査では血栓を有していなかった。技術的理由から組織学的分析を実施することができなかったため、このため動物は、分析が実施されていれば判定される可能性のあった最高スコアの1とスコア付けした(図12)。これとは対照的に、PBSもしくはコントロールヒトIgG4モノクローナル抗体を用いて処置した群では、数匹の動物が死亡した、または持続勃起症を発生した($p < 0.01$ 、CHO-recKRIX-1Q群対PBSおよびコントロールIgG4群)。

20

【実施例7】

【0166】

抗原結合部位におけるN-グリコシル化部位が欠けているCHO-recKRIX-1の変異体の産生および特徴づけ

30

CHO-recKrix-1Qは、Asn47-Thr49でのN-結合グリコシル化部位を崩壊させるためにAsn47をGln47へ改変させる重鎖内の単一アミノ酸変化を結果として生じさせるpCR4-Blunt-TOPO-Krix-1Hプラスミド上の部位指向突然変異誘発によって産生した。本発明の状況では、Krix-1抗体のコーディング配列を含む他のプラスミドを同様に使用できる。Krix-1の重鎖および軽鎖のCDRを含むアミノ酸配列は、各々配列番号2および配列番号4に提供した。Krix-1の重鎖および軽鎖のCDRの配列をコードするヌクレオチド配列は、各々配列番号1および配列番号3に提供した。

【0167】

40

Asn47での突然変異誘発は、次の特異的PCRプライマーと組み合わせて部位指向突然変異誘発キット(Stratagene社、カリフォルニア州、ラ・ホーヤ)を使用して得た:

フォワードプライマー: 2つの改変ヌクレオチド(aからcおよびcからa; 太字のイタリック)を含有するKrix-1重鎖配列のnt119から164(大文字)に対応する5'-CCTGCAAGACCTCTGGATACcAaTTCACCGGCTACTCTGCTTCTGG-3'(配列番号9);

リバープライマー: 2つの改変ヌクレオチド(gからtおよびtからg; 太字のイタリック)を含有するKrix-1重鎖配列のnt119から164(大文字)に対応する5'-CCAGAAGCAGAGTAGCCGGTGAAtTgGTATCCAGAGGT

50

C T T G C A G G - 3' (配列番号10) ;

CHO-recKrix-1Aは、Asn47-Thr49でのN-結合グリコシル化部位を崩壊させるためにThr49からAla49へ改変されている単一アミノ酸変化を生じさせる部位指向突然変異誘発によって産生した。

【0168】

これは、次の特異的PCRプライマーと組み合わせて部位指向突然変異誘発キット(Stratagene社、カリフォルニア州、ラ・ホーヤ)を使用して得た：

フォワードプライマー：2つの改変ヌクレオチド(aからgおよびcからt；太字のイタリック)を含有するKrix-1重鎖配列のnt128から164(大文字)に対応する5'-CCTCTGGATACAACCTTCgCtGGCTACTCTGCTTCTGG-3'(配列番号11)；

リバースプライマー：2つの改変ヌクレオチド(gからaおよびtからc；太字のイタリック)を含有するKrix-1重鎖配列のnt128から164(大文字)に対応する5'-CCAGAAAGCAGAGTAGCCaGcGAAGTTGTATCCAGAGG-3'(配列番号12)；

CHO-recKrix-1Eは、Asn47-Thr49でのN-結合グリコシル化部位を崩壊させるためにAsn47からGlu47へ改変されている単一アミノ酸変化を生じさせる部位指向突然変異誘発によって産生した。

フォワードプライマー：2つの改変ヌクレオチド(aからgおよびcからg；太字のイタリック)を含有するKrix-1重鎖配列のnt119から164(大文字)に対応する5'-CCTGCAAGACCTCTGGATACgAgTTCAACCGGCTACTCTGCTTCTGG-3'(配列番号13)；

リバースプライマー：2つの改変ヌクレオチド(gからcおよびtからc；太字のイタリック)を含有するKrix-1重鎖配列のnt119から164(大文字)に対応する5'-CCAGAAAGCAGAGTAGCCGGTGAAcTcGTATCCAGAGGTCTTGCAGG-3'(配列番号14)；

CHO-recKrix-1Dは、Asn47-Thr49でのN-結合グリコシル化部位を崩壊させるためにAsn47からAsp47へ改変されている単一アミノ酸変化を生じさせる部位指向突然変異誘発によって産生した。

フォワードプライマー：1つの改変ヌクレオチド(aからg；太字のイタリック)を含有するKrix-1重鎖配列のnt119から164(大文字)に対応する5'-CCTGCAAGACCTCTGGATACgACTTCAACCGGCTACTCTGCTTCTGG-3'(配列番号15)；

リバースプライマー：1つの改変ヌクレオチド(tからc；太字のイタリック)を含有するKrix-1重鎖配列のnt119から164(大文字)に対応する5'-CCAGAAAGCAGAGTAGCCGGTGAAGTcGTATCCAGAGGTCTTGCAGG-3'(配列番号16)。

【0169】

配列を検証した後、突然変異型重鎖および野生型(天然)Krix-1軽鎖を各々pEE6.4およびpEE14.4ベクター(Lonza Biologics社、ニュージャージー州ボーツマス)内へクローン化した。2つのベクターは、両方のベクター内に存在するNotIおよびSalI制限部位を用いて重鎖および軽鎖の両方を含有する二重遺伝子ベクターへ結合した。真核細胞内での重鎖および軽鎖発現は、hCMV-MIEプロモーター(pEE14.4およびpEE6.4内に存在する)のコントロール下にある。二重遺伝子ベクターは、トランスフェクション前にSalIを用いて直鎖状化した。

【0170】

FuGENE6トランスフェクション試薬(Roche Diagnostics社、ベルギー国ブリュッセル)を製造業者の取扱説明書にしたがって用いてCKO-K1細胞の安定性トランスフェクションのために直鎖状ベクターを使用した。トランスフェクトした細胞は、選択のために10%のFBS、GS補給剤(JRH Biosciences社

、カンザス州レネクサ)および25 μ MのL-メチオニンスルホキシミン(MSX)(Sigma-Aldrich社、ベルギー国ボーン)を補給したグルタミン無含有DME M(JRH Biosciences社、カンザス州レネクサ)中で培養した。

【0171】

最高のプロデューサーは、25 μ MのMSXおよびGS補給剤を補給した血清無含有培地(EX-CELL 302血清無含有培地w/o L-グルタミン、JRHBiosciences社、カンザス州レネクサ)中で増殖させるためにFBSを0%へ段階的に減少させることによって適応させた。接着性もしくは懸濁性細胞株のいずれかを使用して、突然変異rec-mAb-Krix-1のバッチ生産のために、最高に発現する(抗ヒトIgG4検出抗体を用いたELISA)機能的細胞株を使用した。

10

【0172】

組換え抗体は、HiTrap rProtein A FFカラム(Amersham Biosciences社、スウェーデン国ウプサラ)を用いるアフィニティークロマトグラフィーによって細胞培養上清から精製した。濃縮後、rec-mAb-KRIX-1Q(各々、A、EおよびD)を機能性についてアッセイした(突然変異rec-mAb Krix-1がfVII活性を阻害する能力を評価するクロモジェニックアッセイ)。fVIIに対する阻害能力を野生型rec-mAb Krix-1と比較した(図8および9)。これらの突然変異体によるfVII阻害の範囲は30から40%に及んだ。

表面プラズモン共鳴(SPR)の測定

20

Pharmacia製バイオセンサーBIAcore(商標)設備(Pharmacia Biosensor AB社)を用いて、CHO-rec-KRIX-1Q、CHO-rec-KRIX-1Aおよび天然CHO-rec-KRIX-1へのfVIIの会合および解離速度を分析した。精製した抗体(10mMの酢酸ナトリウムバッファ(pH 5.0)中の20 μ g/mL)を、製造業者の取扱説明書にしたがって、CM5センサーチップの活性化表面上で固定した。すべての結合実験は、HBS内で10 μ L/分の一定流量で、実施した。Hepes緩衝化生理食塩液(HBS)中のfVIIを、センサーチップ表面上にコーティングした抗体の上方に様々な濃度で注入した。各サイクルの終了時に、pH2のHClを36秒間フラッシュすることによって再生させた。コントロール実験は、fVIIが不溶化抗体にしか結合しないことを確認した。そこで、rfVIIは抗体の不在下ではセンサーチップに結合せず、チップへの添加前に可溶性抗体とのrfVIIのプレインキュベーションはfVII結合を完全に妨害した。

30

【0173】

会合および解離速度定数は、BIA評価2.1ソフトウェア(Pharmacia Biotech社、スウェーデン国ウプサラ)を用いて個別センサーグラムデータ(O'Shanessyら、1993, Analyt Biochem 212:457)の非線形当てはめによって決定した。 k_{ass} および k_{diss} の数値は、様々な分析物濃度を用いて確立した個別曲線について得た数値を平均化することによって決定した。 k_{diss} の数値は、分析物の遊離固定リガンドへの再結合に起因する偏りを減少させるために、最高分析物濃度だけを用いて得た個別曲線から決定した。全データは、会合および解離中に得られた反応から分析物(rfVII)の注射前に観察された反応を減じることによってベースライン値を補正した後に分析した。

40

【0174】

CHO-rec-KRIX-1Q、CHO-rec-KRIX-1Aおよび天然CHO-rec-KRIX-1からのfVIIの解離定数(K_D)は極めて類似していた(表1)。したがって、mAb Krix-1の抗原結合部位のグリコシル化部位は抗体阻害活性に影響を及ぼすが、fVIIへの結合には有意には寄与しない。

【0175】

【表 1】

表 1. mAb Krix-1 およびその誘導体への FVIII 結合についての
表面プラズモン共鳴分析

修饰した mAb Krix-1 (LCL):	K _D (nM)
CHO-recKRIX-1	0,14 ± 0,03
CHO-recKRIX-1Q	0,17 ± 0,02
CHO-recKRIX-1A	0,13 ± 0,01

10

【実施例 8】

【0176】

ヒヒにおける動脈および静脈血栓の予防
方法
プロトコール

雄性ヒヒ (Papiou ursinus) を使用した。動物の体重は 8 ~ 17 kg であり、少なくとも実験前 6 カ月間は疾患を有していなかった。すべての方法は、南アフリカにおける薬物および関連物質の研究、境域、診断および試験における動物の使用に関する国内規約に従って、自由州立大学の動物実験倫理委員会によって承認された。

20

【0177】

永久的ポリテトラフルオロエチレン (Teflon) およびシリコンゴム (Silastic) 動静脈 (AV) シャントをヒヒ大腿血管内に移植した。シャントを通る血流量は 100 から 120 mL / 分の間で変動した。ヒヒの取扱いは、塩酸ケタミンを用いた麻酔を通して達成した (Anakiet - V. Centaur Laboratory)。

【0178】

各実験では、血液 - 空気界面を回避するために生理食塩液が充填されたトロンボゲン形成装置を Teflon 製コネクタによって永続的動静脈シャント内への延長セグメントとして組み込んだ (Kotzeら (1983), Thromb Haemost. 70, 672 - 675)。Hansonら (1985), Arteriosclerosis 5, 595 - 603 にしたがって Silastic 製チューブ (内径: 3 mm) の壁の中に Dacron を挿入することによって血小板依存性動脈血栓を誘導した (図 10)。

30

【0179】

Dacron 製人工血管材料 (1.26 cm²) が血小板依存性動脈型血栓の発生装置として機能した。凝固依存性静脈血栓を生成するためには膨張チャンバー (3.77 cm²) を使用した。血液は約 120 mL / 分の速度でトロンボゲン形成装置の中を流れた。初期剪断応力は、Dacron 区域に対しては 318 / 秒であり、膨張チャンバーに対しては 10 / 秒であった。

40

【0180】

コントロール試験では、これらの装置を 60 分間もしくはそれらが閉塞するまでそのまま維持し、その後それらを取り除き、永続的 AV シャントを通る血流を再確立させた。次に 1.25 もしくは 5 mg / kg の CHO-rec-Krix-1Q の単回静脈内ボラス投与によりヒヒを処置した。トロンボゲン形成装置は抗体注射 1 時間後から 60 分間にわたり配置し、その後で装置を取り除き、永続的 AV シャント内を通る血流を再確立した。さらに抗体ボラス注射の 24 時間後および 48 時間後に 60 分間の試験を実施した。最後の血栓実験後に、体外シャントを取り除いた。血液サンプルは、シャントから直接的に、もしくは静脈穿刺のいずれかによってサンプリングスケジュールにしたがって採取した。FVIII 活性、mAb Krix-1 濃度を監視し、PT、APTT、フィブリ

50

ノーゲンを全サンプル上で測定した。

人工血管のイメージング

自己血小板を¹¹¹In-トロポロンを用いて標識し、コントロール実験の開始1時間前に動物に再注入した。これによって第0、1および2日に画像獲得が可能になった。第6もしくは14日に画像獲得を提供するために、標識手順を繰り返した。人工血管の画像獲得は、高分解能コリメータを装備したガンマシンチレーション・カメラを用いて実施した。これらの画像を保存し、シンチレーションカメラと接続されたコンピュータ・イメージングおよび分析システムを用いて分析した。動態画像獲得、血中放射能を決定するために人工血管をイメージングするたびに5 mLの自己血液サンプルの3分間画像も獲得した(血液標準)。動態画像内の沈着放射能および循環中放射能を決定するために、人工血管および膨張セグメントの当該領域を選択した。人工血管材料上および膨張チャンパー内に沈着した血小板の総数を計算した。

10

【0181】

CHO-rec-KRIX-1Eを用いて処置した動物6匹では、血小板沈着は、静脈および動脈血栓チャンパーのどちらにおいても生理食塩液で処置したコントロール動物におけるより低かった(図11)。

【実施例9】

【0182】

修飾されたグリコシル化を備える第VII因子に対する阻害抗体を用いた、敗血症関連状態の治療

20

エンドキシンの注射は炎症促進性サイトカインの産生を誘発するが、それらの中では凝固系との相互作用を示すためにIL-6およびTNF- α が重要である。そこで、IL-6は組織因子の産生を増加させ、そして結果としてトロンビンの生成を増加させる。これはさらに、独立機序によるフィブリノーゲンの産生を増加させる。TNF- α は、プラスミノゲン活性化阻害因子1型(PAI-1)のレベルおよびそれによってフィブリン溶解を減少させる。

【0183】

各処置に対してマウス6匹(C57BI/6)の群を構成した。

野生型およびFVIIノックアウトマウスに30および100 μ gの下記の抗体を静脈内注射した：

30

- 抗体なし
- コントロール抗体(IgG4)
- CHO細胞内で発現したKrix-1抗体(CHO-recKRIX-1)
- Asn47で突然変異したKrix-1(CHO-recKRIX-1Q)
- 1/4もしくはその他の比率にある(KRIX-1)/(CHO-recKRIX-1Q)

試験のために天然もしくは脱グリコシル化Krix-1のフラグメント(より詳細には、FabもしくはscFvフラグメント)を含む混合物などのKrix-1を含むその他の混合物を想定した。Krix-1および第2抗体を含む他の混合物(実施例13に開示した)もしくはその誘導體もまた考慮の対象とした。特定の混合物は、Krix-1およびRHD5またはKrix-1および/またはRHD5のフラグメントを含んでいた。

40

【0184】

抗体の投与60分後に、様々なマウス集団に体重20g当たり4 μ gもしくは40 μ gもしくは400 μ gいずれかのリポ多糖(E. coli血清型0:111:B4から)を腹腔内注射した。90分後に、各実験設定のために心穿刺によって、サイトカインの評価および凝固因子レベルを評価するために集団の一部から血液をクエン酸バッファ内に採取した。血漿は、5,000 rpmで5分間の遠心分離によって得た。

【0185】

残りのマウスの生存について1週間追跡した。

体重20g当たり40 μ gのリポ多糖注射によるフィブリン溶解性経路の程度は2つの

50

主要な経路不活性化因子、つまりP A I - 1 (プラスミノゲン活性化阻害因子1) および₂ - アンチプラスミンの濃度を、評価下の分子の様々な部位に向けて立てられた2種の特異的モノクローナル抗体を用いるサンドイッチ型E L I S Aを使用して評価した。

【0186】

血漿中フィブリノーゲン濃度の展開をフィブリンへの転換の示度として使用した。

チモーゲンおよび活性化タンパク質Cの決定は、例えばR i c h a r d sら(1990), Clin. Chem. 36, 1892 - 1896にしたがって測定できる。

【0187】

本実験は、エンドトキシン関連性敗血症を予防するために適切な抗体もしくは抗体混合物の同定を可能にした。他の成分、または炎症性サイトカインI L - 6および/またはT N F - のアップレギュレーションを引き起こす状態に対しても類似の実験を想定できた。

10

【実施例10】

【0188】

天然および脱グリコシル化K r i x - 1の抗原結合フラグメント(F a b)の産生

L C L - およびC H O - K R I X - 1 (P B S中で0.5mg/mL)を最終濃度2U/mLでN - グリコシダーゼ - F (R o c h e D i a g n o s t i c s G m b h社、ドイツ国マンハイム)と混合した。この混合物を穏やかに攪拌しながら37で72時間インキュベートした。

【0189】

F a bフラグメントは、リン酸バッファ(0.039MのK H₂ P O₄、0.068MのN a₂ H P O₄、p H 7.0)中のL C L - およびC H O - K R I X - 1 (0.5mg/mL)をシステイン(0.05M)、E D T A (1mM)およびパパイン(10μg/mL)と一緒にインキュベートするステップによって生成した。37での3時間のインキュベーション後に、0.075Mのヨードアセトアミンの添加によって反応を停止させた。

20

【0190】

20での30分後、混合物をリン酸緩衝化生理食塩液(P B S)に対して透析した。未消化抗体は、H i T r a p P r o t e i n A (P h a r m a c i a社)上への吸着によって除去した。

30

【0191】

天然および脱グリコシル化K R I X - 1の阻害活性をB e t h e s d aアッセイ(K a s p e rら(1975)、上記参照)において評価し、図13に示した。

【実施例11】

【0192】

K R I X - 1およびK R I X - 1 Q s c F vフラグメントの産生および特徴づけ

ピチア発現ベクター内でのs c F v - K R I X - 1 V L V Hのクローニング

K R I X - 1のs c F vフラグメントは、K R I X - 1軽鎖可変部分(V L)の3'末端と重鎖可変部分(V H)の5'末端との間のリンカー配列を付加することによって構築した。これは、次のプライマーを用いてK R I X - 1軽鎖および重鎖のP C R増幅によって得た：

40

軽鎖については：フォワードプライマー：K r i x - 1 V L配列の5'末端(大文字)に対応し、そしてX h o l制限部位(下線付き)およびK E X 1配列(太字のイタリック)を含有する5' - g t a t c t c t c g a g a a a g a G A A A T T G T G T T G A C G C A G T C T C C A G G C - 3' (配列番号17)；リバースプライマー：K R I X - 1 J k配列の3'末端(大文字)に対応し、そしてリンカー配列の一部(イタリック)を含有する5' - c g c c a g a g c c a c c t c c g c c t g a a c c g c c t c c a c c T C G T T T G A T C T C C A C C T T G G T C (配列番号18)。

【0193】

重鎖については：フォワードプライマー：K r i x - 1 V H配列の5'末端(大文字

50

)に対応し、そしてリンカー配列の一部(イタリック)を含有する5'-c a g g c g g a g g t g g c t c t g g c g g t g g c g g a t c g C A G G T M C A G C T G G T G C A G T C T G G G - 3' (配列番号19);リバースプライマー:K R I X - 1 J H 配列の3'末端(大文字)に対応し、そしてX b a l制限部位(下線付き)を含有する5'-g a t c t c t a g a T G A G G A G A C G G T G A C C A G G G T T C C (配列番号20)。

【0194】

PCR産物をアニーリングし、軽鎖のためのフォワードプライマー(配列番号17)および重鎖のためのリバースプライマー(配列番号20)を用いて第2回PCRを実施した。結果として生じたs c F v - K R I X - 1 V L V Hをp P I C Z a l p h a C発現ベクター(In v i t r o g e n社、ベルギー国メレルベーク)内にクローニングした。ピチア発現ベクター内でのH i s (6)タグを用いたs c F v - K R I X - 1 V L V Hのクローニング

10

p P I C Z a l p h a C発現ベクター(In v i t r o g e n社、ベルギー国メレルベーク)内に含まれるH i s (6)配列を用いてそれをフレーム内にクローニングするために、S a l I制限部位をs c F v - K R I X - 1 V L V H配列内に付加した。これはフォワードプライマーを用いるPCRによって得た:K r i x - 1 V L配列の5'末端(大文字)に対応し、そしてX h o l制限部位(下線付き)およびK E X 1配列(太字のイタリック)を含有する5'-g t a t c t c t c g a g a a a a g a G A A A T T G T G T T G A C G C A G T C T C C A G G C - 3' (配列番号21);およびリバースプライマー:K R I X - 1 重鎖J H配列の3'末端(大文字)に対応し、そしてS a l I制限部位(下線付き)を含有する5'-c a t g g t c g a c T G A G G A G A C G G T G A C C A G G G T T C C C C G G C C - 3' (配列番号22)。

20

【0195】

s c F v産生のためにX33細胞を形質転換させるために最終p P I C Z a l p h a C - s c F v - K R I X - 1 V L V H (H i s)ベクターを使用した。機能的s c F vフラグメントの存在を証明するために上清を試験した。

【0196】

s c F vフラグメントはH i s T r a pキット(A m e r s h a m P h a r m a c i a B i o t e c h社、スウェーデン国ウプサラ)を用いて精製した。濃縮後、s c F v K R I X - 1 V L V H (H i s)がF V I I I活性を阻害する能力を評価するために、F V I I Iクロモジェニックアッセイにおいてs c F v K R I X - 1 V L V H (H i s)を試験した。F V I I I阻害能力は、実施例1に記載の方法によってB e t h e s d aアッセイにおいて評価し、図14に示した。

30

ピチア発現ベクター内でのH i s (6)タグを用いたs c F v - K R I X - 1 V L V H Qのクローニング

s c F v - K R I X - 1 V L V H Q (H i s)は、A s n 4 7 - T h r 4 9でのN-結合グリコシル化部位を崩壊させるためにA s n 4 7がグルタミンに置換されている単一アミノ酸変化を結果として生じさせるp P I C Z a l p h a C - s c F v - K R I X - 1 V L V H (H i s)上の部位指向突然変異誘発によって産生した。

40

【0197】

これは、次の特異的PCRプライマーと組み合わせて部位指向突然変異誘発キット(S t r a t a g e n e社、カリフォルニア州、ラ・ホーヤ)を使用して得た:

フォワードプライマー:2つの改変ヌクレオチド(aからcおよびcからa;太字のイタリック)を含有するK R I X - 1重鎖配列のn t 1 1 9から1 6 4(大文字)に対応する5'-C C T G C A A G A C C T C T G G A T A C c A a T T C A C C G G C T A C T C T G C T T C T G G - 3' (配列番号23);

リバースプライマー:2つの改変ヌクレオチド(gからtおよびtからg;太字のイタリック)を含有するK R I X - 1重鎖配列のn t 1 1 9から1 6 4(大文字)に対応する5'-C C A G A A G C A G A G T A G C C G G T G A A t T g G T A T C C A G A G G

50

T C T T G C A G G - 3 ' (配列番号 2 4) ;

H i s (6) タグを備える s c F v - K R I X - 1 V L V H Q の全長配列は、配列番号 2 5 および 2 6 に記載した。

C H O 発現ベクター内での H i s (6) タグを用いた s c F v - K R I X - 1 V L V H および s c F v K R I X - 1 V L V H Q (H i s) のクローニング

K R I X - 1 軽鎖リーダー配列は、リーダー配列を含有する p C R 4 - K R I X - 1 L の H i n d I I I / P s t I 制限フラグメントを H i n d I I I / P s t I 消化 p P I C Z C - s c F v - K R I X - 1 V L V H および p P I C Z C - K R I X - 1 V L V H Q 各々の中にクローニングすることによって p P I C Z a l p h a C - s c F v - K R I X - 1 V L V H (H i s) および p P I C Z a l p h a C - s c F v - K R I X - 1 V L V H Q (H i s) 内へ挿入した。結果として生じた s c F v 配列は、次の特異的プライマーを使用する P C R によってクローニングおよび発現目的のために適応させた：

フォワードプライマー：K R I X - 1 軽鎖配列の 5 ' 末端（大文字）に対応し、そして H i n d I I I 部位（下線付き）および K o z a k 配列（太字のイタリック）を含有する 5 ' - c c c a a g c t t g c c g c c a c c A T G G A A A C C C C A G C K C A G C T T C - 3 ' (配列番号 2 7) ;

リバープライマー：K R I X - 1 重鎖 J H 配列の 3 ' 末端（大文字）に対応し、そして E c o R 1 部位（下線付き）、停止シグナル配列（太字のイタリック）および H i s (6) タグ配列（イタリック）を含有する 5 ' - c c g g a a t t c t c a a t g a t g a t g a t g a t g T G A G G A G A C G G T G A C C A G G G T T C C - 3 ' (配列番号 2 8) ;

結果として生じた P C R 産物を p G E M - T - E a s y ベクター（P r o m e g a 社、オランダ国ライデン）内にクローニングした。配列検証後に、s c F v K R I X - 1 V L V H (H i s) および s c F v - K R I X - 1 V L V H Q (H i s) を p E E 1 4 . 4 ベクター（L o n z a B i o l o g i c s 社、ニューハンプシャー州ポーツマス）内にクローニングした。結果として生じたベクターは、トランスフェクション前に S a l I を用いて直鎖状化した。

【0198】

F u G E N E 6 トランスフェクション試薬（R o c h e D i a g n o s t i c s 社、ベルギー国ブリュッセル）を製造業者の取扱説明書にしたがって用いて C K O - K 1 細胞の安定性トランスフェクションのために直鎖状ベクターを使用した。トランスフェクトした細胞は、選択のために 1 0 % の F B S、G S 補給剤（J R H B i o s c i e n c e s 社、カンザス州レネクサ）および 5 0 μ M の L - メチオニンスルホキシミン（M S X）（S i g m a - A l d r i c h 社、ベルギー国ボーン）を補給したグルタミン無含有 D M E M（J R H B i o s c i e n c e s 社、カンザス州レネクサ）中で培養した。

【0199】

最高のプロデューサーは、G S 補給剤および M S X を各濃度で補給した血清無含有培地（E X - C E L L 3 0 2 血清無含有培地 w / o L - グルタミン、J R H B i o s c i e n c e s 社、カンザス州レネクサ）中で増殖させるために F B S を 0 % へ段階的に減少させることによって適応させた。

【0200】

実施例において記載したように F V I I I クロモジェニックアッセイにおいて s c F v - K R I X - 1 V L V H (H i s) および s c F v - K R I X - 1 V L V H Q (H i s) の産生について上清をアッセイした。培養上清の F V I I I 阻害能力は図 1 5 に示した。

【実施例 1 2】

【0201】

ヒトモノクローナル抗体 R H D 5 と K R I X - 1 との間の競合

ヒトリンパ芽球様細胞株 R H D 5 は、(J a c q u e m i n ら (1 9 9 8) , B l o o d 9 2 , 4 9 6 - 5 0 6) に記載された方法によって F V I I I に対する自己免疫応答を発生した患者からの B リンパ球の不死化に由来した。手短には、1 0 ⁷ 個の末梢血単

10

20

30

40

50

核球を2 mLの培養培地中に再懸濁させ、200 µLのエプスタイン・バーウイルス(B95-8株)上清と一緒に37 °Cで2時間インキュベートした。次に細胞はフィーダー細胞(7,000ラッドを用いて照射された3T6-TRAP細胞)を含有する96ウエルマイクロタイタープレート(Nunc社)内に5,000 cells/ウエルで播種した。150 µLの培養上清は、新鮮培養培地と毎週取り替えた。6週間後、抗FVIIII抗体の存在について酵素結合免疫吸着アッセイにおいて培養上清を試験した。陽性細胞株を24ウエルプレートへ移し、直ちにフィーダー細胞を有していない96ウエルプレート1枚につき60 cellsでクローニングした。RHD5と呼ばれる抗体を産生する1個のクローンを選択した。

【0202】

モノクローナル抗体RHD5を産生するこの細胞株は、2004年8月にD. Colleen研究財団(Onderwijs & navorsing, B-3000ベルギー国ルーベンHerestraat 49, Campus Gasthuisberg)を寄託者としてアントワープ大学Technologiepark 927, B-9052 Zwijnaarde所在のBCCM/LMBP(Belgian Co-ordinated Collections of Microorganisms/Plasmid Collection), Laboratorium voor Moleculaire Biologieに寄託された(アクセッション番号xxxxxxx)。

10

【0203】

RHD5をコードする再配列された免疫グロブリン遺伝子の配列解析は上述した Jacqueminら、Blood 1998に記載されたとおりに実施した。

20

【0204】

RHD5重鎖および軽鎖の可変領域のヌクレオチドおよびアミノ酸配列は配列番号29から32に列挙した。

【0205】

培養上清中に存在する抗体は、HiTRAPタンパク質A(Pharmacia社)上への吸着によって精製した。

【0206】

実施例1に記載したように、天然および脱グリコシル化KRIX-1の阻害活性をBethesdaアッセイにおいて評価した(Kasperら(1975)、上記参照)。RHD5は、試験した最高濃度までFVIIII活性を部分的にしか阻害しなかった。200 µg/mLでの1容量の抗体またはコントロールバッファを1容量の血漿と混合することによって実施したBethesdaアッセイでは、残留FVIIIIレベルは各々7.0 ± 0.2および251.9 ± 18.8 ng/mLであった(3回の試験の平均SD)。このため100 µg/mLのRHD5の最終濃度に到達したFVIIII活性の阻害は97%であった。同様に、200 µg/mLでの1容量の抗体またはコントロールバッファを1容量の全長組換えFVIIII(Recombinate(登録商標)、Baxter社)と混合することによって実施したBethesdaアッセイでは、残留FVIIIIレベルは各々8.0 ± 0.2および399.7 ± 18.8 ng/mLであった(3回の試験の平均SD)。このため100 µg/mLのRHD5の最終濃度に到達したFVIIII活性の阻害は98%であった。

30

40

【0207】

KRIX-1がFVIIII結合に対してRHD5と競合する能力をELISAにおいて試験した。ポリスチレン製マイクロタイタープレートは、リン酸緩衝化生理食塩液(PBS)中で2 µg/mLの50 µLのRHD5と4 °Cで一晩インキュベートした。プレートはPBS-Tweenを用いて4回洗浄した。Tris-BSA-Tween中のビオチニル化組換えFVIIII(0.5 µg/mL)は、RHD5コーティングプレートへ添加する前に様々な濃度でRHD5もしくはKrix-1と混合した。

【0208】

4 °Cでの2時間のインキュベーション期間後、プレートを4回洗浄し、結合ビオチニル

50

化FV I I Iを1 μ g/mLのアビジンペルオキシダーゼ(Sigma社)の添加によって検出した。室温での30分間後、プレートを再び洗浄し、100 μ LのOPDを補給した。結果として生じたODは、Emaxマイクロプレートリーダー(Molecular Devices社、カリフォルニア州メンロパーク)内で490nmで読み取った。

【0209】

上記の実験で使用したビオチニル化FV I I Iは、Hepesバッファ(10mMのHepes、0.15MのNaCl、10mMのCaCl₂、pH8.5)中で透析した組換えFV I I I(100 μ g/mL)を1 μ g/mLのスルホ-NHS-LC-ビオチン(Pierce社)と一緒に室温で2時間インキュベートすることによって調製した。調製物を次にHepesバッファに対して透析し、80 で保存した。

10

【0210】

図16に示したように、Krix-1はRHD5へのFV I I I結合を完全に防止することができた。Krix-1とRHD5との間のこの競合は、実施例2におけるKrix-1およびKrix-1Qを混合することによって達成された様々な阻害活性に類似して、様々な比率での2種の抗体の混合がCHO-Krix-1(85%)を用いて達成される阻害活性とRHD5(97~98%)を用いて達成される阻害活性の間の範囲内の阻害活性を備える抗体混合物の産生を可能にする。同様に、RHD5およびKRIX-1Qの混合は、45%から98%の範囲内の極めて広範囲の阻害活性を備える抗体混合物の産生を可能にすると予想される。さらにまた、KRIX-1QのFabフラグメントをRHD5を混合するステップは、20%から98%の範囲内のいっそうより広範囲の阻害性混合

20

【実施例13】

【0211】

FV I I Iに対するまた別の阻害抗体の同定

本実施例では、Krix-1などの第1阻害抗体から出発して、Krix-1などの第1阻害抗体の結合と競合するという事実に基づいて追加の第2抗体を同定できる方法について記載する。好ましくは、この方法で同定した抗体は阻害性であり、さらにプラトー効果(FV I I Iに比してモル過剰(5、10、20、50、もしくは100倍さえるモル過剰)での部分的阻害)を有する。以下に記載する方法は、Krix-1の代わりにRHD5を用いて同様に実施できる。

30

【0212】

これは例えば、標識Krix-1(放射標識もしくはビオチンもしくは発色団を用いて標識された)が第V I I I因子へ結合させられるアッセイを用いて達成される。多数の特徴づけられていない抗体をそれらがKrix-1のFV I I Iへの結合を崩壊させる能力についてスクリーニングした。

【0213】

あるいは、特徴づけられていない抗体が最初にマイクロタイタープレート上で不溶化されたFV I I Iと一緒にインキュベートされ、その後に標識Krix-1が添加されて、そのFV I I Iへの結合についてアッセイされた。あるいは、Krix-1および第2抗体と一緒に混合され、その後にKrix-1のFV I I Iへの残留結合がアッセイされ

40

【0214】

これらのアッセイで使用したKrix-1は、グリコシル化、部分グリコシル化もしくは完全脱グリコシル化することができる(グリコシル化コンセンサス配列における必須位置での広範囲の酵素処理もしくは部位指向突然変異誘発)。これらのアッセイにおいて使用されるKrix-1は無傷、F(ab)₂フラグメント、F(ab)フラグメント、scFv scFvフラグメントまたはFV I I IのC1ドメインに結合する能力を備えるKrix-1のまた別のフラグメントであってよい。

【0215】

これらのアッセイを用いて、FV I I IのC1ドメインへのKrix-1の結合を損傷

50

させる抗体を同定できる。この損傷は、K r i x - 1に対するなどのC 1ドメイン内の同一エピトープに向けられた抗体、C 1ドメイン内のK r i x - 1の1つであるまた別のエピトープに向けられた抗体、またはC 1ドメインの外側にあるがC 1ドメイン内のそのエピトープへのK r i x - 1抗体の結合と立体的に競合する抗体によって達成できる。この状況では、重度にグリコシル化されている無傷K r i x - 1が使用されるアッセイは、K r i x - 1もしくは脱グリコシル化K r i x - 1のフラグメントよりK r i x - 1干渉抗体を生成する可能性が高いと思われる。

【0216】

抗体についてのスクリーニングは、まず最初にヒトF V I I Iへ結合する、そしてより詳細には第V I I I因子のC 1ドメインへ結合するs c F vフラグメントについてのs c F vライブラリーをスクリーニングすることによって開始できる。この技術については、抗体フラグメントは抗体遺伝子をコードする線維状ファージの表面上に提示されている (H o o g e n b o o m a n d W i n t e r (1 9 9 2) , J M o l B i o l . 2 2 7 , 3 8 1 - 3 8 8 ; V a u g h a n ら (1 9 9 6) , N a t B i o t e c h n o l . 1 4 , 3 0 9 - 3 1 4 ; T o m l i n s o n ら (1 9 9 2) , H u m M o l G e n e t . 3 , 8 5 3 - 8 6 0 ; N i s s i m ら (1 9 9 4) , E M B O J . 1 3 , 6 9 2 - 6 9 8 ; G r i f f i t h s ら (1 9 9 4) , E M B O J . 1 2 , 7 2 5 - 7 3 4) 。可変重鎖 (V H) および可変軽鎖 (V L) 免疫グロブリンライブラリーはファージ内で開発されてきた。これらのファージは、抗体をパニングするステップによって選択できる。コードされた抗体フラグメントは、次に感染した細菌からの可溶性フラグメントとして分泌させることができる。ファージ上の抗体のこの提示および抗原を用いた選択は免疫選択を模倣しており、単一ファージライブラリーから出発する免疫を行わずに抗体を作製するために使用できる (H o o g e n b o o m a n d W i n t e r (1 9 9 2) , J M o l B i o l . 2 2 7 , 3 8 1 - 3 8 8) 。ヒト合成V HおよびV s c F vライブラリーはl o xライブラリーベクターからの重鎖および軽鎖可変領域を再クローニングすることによって作製したが、このとき重鎖および軽鎖V遺伝子は無作為にシャッフリングし、線維状ファージの表面上のF v (s c F v) フラグメントとしての提示についてファージミドベクターp H E N 2内へクローニングした (G r i f f i t h s ら (1 9 9 4) , E M B O J . 1 2 , 7 2 5 - 3 4) D r . G . W i n t e r の タ ン パ ク 質 エ ン ジ ニ ア リ ン グ セ ン タ ー 、 L M B - M R C 、 英 国 ケ ン プ リ ッ ジ]) 。

【0217】

そのようなライブラリーを用いると、K r i x - 1などの抗体のF V I I Iへの結合と競合する抗体フラグメントを同定できる。その後、これらのフラグメントをそれらがF V I I Iへ結合する親和性について、引き続いてそれらがF V I I I活性を阻害する能力およびモル過剰でF V I I I活性を阻害するプラトー効果の存在についてスクリーニングすることができる。フラグメントのサイズを考慮に入れると、これらのフラグメントのサイズを拡大すると、これらのs c F vフラグメントを完全抗体内へクローニングすることによって、上昇した阻害活性を生じさせることが想定されている。本発明によると、新しく同定されたs c F vフラグメントおよび対応する抗体のグリコシル化もまた、本発明に記載した技術を用いて修飾することができる。

【0218】

あるいは、血友病患者から単離された抗体またはより一般的にはいずれが存在する抗体をK r i x - 1もしくはR H D 5などの抗体と競合する能力についてアッセイできる。

【0219】

上述したアッセイを用いて得られている抗体もしくはフラグメントは、F V I I I活性へのそれらの阻害効果および/またはF V I I Iおよび例えばv W Fとの複合体を崩壊させるそれらの能力について試験される。さらに、阻害抗体もしくはフラグメントは、次に生理学的過剰での部分的F V I I I阻害の存在 (「 プ ラ ト ー 効 果 」) についてスクリーニングされる。

【0220】

K r i x - 1 結合と競合するいずれかの第2抗体は、第2抗体が阻害活性を有していない、またはK r i x - 1より低いプラトー効果を有している場合は、K r i x - 1より低いF V I I I活性阻害を得るために、天然K r i x - 1もしくはK r i x - 1の天然フラグメント、または修飾されたグリコシル化を備えるK r i x - 1もしくはフラグメントとの混合物中に使用できる。あるいは天然K r i x - 1もしくはK r i x - 1の天然フラグメント、またはK r i x - 1もしくは修飾されたグリコシル化を備えるフラグメントと第2抗体との混合物は、第2抗体が十分な阻害活性を有している、またはK r i x - 1より高いプラトー効果を有している場合は、K r i x - 1もしくはそのフラグメントより高いF V I I I活性阻害を生じさせる。同様に、これらの混合物中では、第2抗体はF (a b)₂、F a b、s c F vもしくは他のフラグメントと置換できる、またはそのような第2抗体上で発生する場合は、可変領域内で修飾されたグリコシル化を有している可能性がある。

10

【図面の簡単な説明】

【0221】

【図1】抗体の抗原結合部分において最も一般的に見いだされる二本鎖型構造の略図である。N e u A c = N - アセチルノイラミン酸 (シアル酸) ; G a l = ガラクトース ; G l c N a c = N - アセチルグルコサミン ; M a n = マンノース ; F u c = フコース ; A s n = アスパラギン。

【図2】連続的酵素処理によるグリカンの除去の略図。シアル酸を除去するためには、天然I g Gをシアリダーゼに曝露させる。シアル酸を除去すると、 - ガラクトシダーゼを用いた処理によってガラクトースを除去することができる。シアル酸およびガラクトースの除去後に、N - アセチル - D - グルコサミニダーゼを用いた処理によってN - アセチルグルコサミンを分解することができる。マンノース残基は、次に - マンノシダーゼを用いた処理によって除去できる。

20

【図3】本発明の1つの実施形態による、天然および脱グリコシル化K R I X - 1の阻害活性を示している実験結果のグラフである。K R I X - 1はN - グリコシダーゼ - Fを用いた処理によって脱グリコシル化した。天然 (N A T ; 黒塗り記号) および脱グリコシル化K R I X - 1 (D E G ; 白抜き記号) の阻害活性を評価するために、様々な希釈率の1容量の抗体を1容量の正常ヒトプール血漿と混合し、37 で2時間インキュベートした。次に残留F V I I I活性をクロモジェニックアッセイにおいて測定した。

30

【図4】本発明の1つの実施形態による、脱グリコシル化K R I X - 1と天然K R I X - 1を混合するステップがF V I I Iの最高「プラトー」阻害を減少させることを示している実験結果のグラフである。正常血漿を37 で2時間、様々な濃度のK r i x - 1、脱グリコシル化K r i x - 1、および4 . 5 : 1 . 5の天然対脱グリコシル化抗体の比率にある天然および脱グリコシル化K r i x - 1の混合物と一緒にインキュベートした。37 で2時間のインキュベーション期間後、残留F V I I I活性をF V I I Iクロモジェニックアッセイにおいて測定した。

【図5】本発明の1つの実施形態による、血漿中のF V I I I活性に及ぼすC H O - r e c K R I X - 1およびK R I X - 1の阻害活性を示している実験結果のグラフである。ヒト細胞株によって産生した抗体 (K R I X - 1) およびC H O内で産生した組換え抗体 (C H O - r e c K R I X - 1) の阻害活性を評価するために、様々な希釈率の1容量の抗体を1容量の正常ヒトプール血漿と混合し、37 で2時間インキュベートした。次に残留F V I I I活性をクロモジェニックアッセイにおいて測定した。

40

【図6】本発明の1つの実施形態による、マウスにおける大静脈血栓症に及ぼすK R I X - 1およびC H O - r e c K R I X - 1の効果を示している実験結果のグラフである。150 μ gのK R I X - 1およびC H O - r e c K R I X - 1もしくは生理食塩液の皮下投与16時間後に下大静脈内で血栓が誘導された。動物は4時間後に致死させた。腎臓下大静脈を通して0 . 5 m mの間隔をあけて5つの横断セグメントを、血栓が存在する場合は1、存在しない場合は0と記録し、このスコアを合計した。

50

【図7】本発明の1つの実施形態による、K R I X - 1、C H O - r e c - K R I X - 1が交配した雄性マウス A T^m / ^mにおける陰茎血栓症および持続勃起症から保護することを示している実験結果のグラフである。雄性マウスにはビヒクル (P B S)、または100 μgの抗体 m A b K r i x - 1もしくは r e c - m A B K r i x - 1を交配の3日前および交配当日に2回皮下注射した。血栓性転帰は、8日間のフォローアップ期間終了時にマウスに血栓が見られない場合は0、持続勃起症を伴わない顕微的血栓症が観察された場合は1、持続勃起症を伴わない肉眼的血栓が発生した場合は2、そして雄性マウスが不可逆性持続勃起症を伴う重度血栓症が発生した場合は3とスコア付けした。(#) m A b K r i x - 1もしくは r e c - m A b K r i x - 1処置群中の各1匹のマウスには実験の終了時に肉眼的血栓は見られなかったが、顕微鏡で分析することができなかつたので、このため1とスコア付けした。 10

【図8】本発明の1つの実施形態による、C H O - r e c K R I X - 1および可変領域内のN - グリコシル化部位を伴う突然変異した抗体の阻害活性を示している実験結果のグラフである。抗体の阻害活性を評価するために、様々な希釈率の1容量の抗体を1容量の正常ヒトプール血漿と混合し、37 °Cで2時間インキュベートした。次に残留F V I I I活性をクロモジェニックアッセイにおいて測定した。

【図9】本発明の1つの実施形態による、C H O - r e c K R I X - 1およびC H O - r e c K R I X - 1 Qの阻害活性を示している実験結果のグラフである。抗体の阻害活性を評価するために、様々な希釈率の1容量の抗体を1容量の正常ヒトプール血漿と混合し、37 °Cで2時間インキュベートした。次に残留F V I I I活性をクロモジェニックアッセイにおいて測定した。 20

【図10】ヒビにおける体外血栓症についての実験プロトコールを表している図である。動脈およびトロンボゲン形成装置。動静脈シャントを雄性ヒビ大腿血管内に移植した。生理食塩液を充填したトロンボゲン形成装置が永続的動静脈シャント内への伸長セグメントとして組み込んだ。S i l a s t i c製チューブの壁の中にD a c r o nを挿入することによって血小板依存性動脈血栓を誘導した。凝固依存性静脈血栓が膨張チャンパー内で生成された。ガンマシンチレーション・カメラを用いて自己由来放射標識血小板の沈着を追跡した。

【図11】本発明の1つの実施形態による、C H O - r e c K R I X - 1 Qの投与前後の動脈および静脈血栓チャンパー内の血小板沈着の阻害を示している実験結果のグラフである。血小板沈着は、大腿血管間に移植された体外動静脈シャント内に組み込まれた膨張(「静脈」)血栓チャンパー(A)およびD a c r o n(「動脈」)血栓チャンパー(B)内の時間の関数として記録した。コントロール試験では、装置は60分間、またはカテーテルが閉塞するまでそのまま維持した。次に抗体の単回静脈内ボラス投与によりヒビを処置した。次に新しいトロンボゲン形成装置をボラス注射後60分間、1時間、24時間にわたって配置した。次に、体外シャントを取り外した。 30

【図12】本発明の1つの実施形態による、C H O - r e c K R I X - 1 Qが交配した雄性 A T^m / ^mマウスにおける陰茎血栓症および持続勃起症から保護することを示している実験結果のグラフである。雄性マウスにはビヒクル (P B S)、または100 μgの抗体 C H O - r e c K R I X - 1 Qもしくはコントロール I g G 4ヒトモノクローナル抗体 (I g G 4)を交配の3日前および交配当日に2回皮下注射した。血栓性転帰は、8日間のフォローアップ期間終了時にマウスに血栓が見られない場合は0、持続勃起症を伴わない顕微的血栓症が観察された場合は1、持続勃起症を伴わない肉眼的血栓が発生した場合は2、そして雄性マウスが不可逆性持続勃起症を伴う重度血栓症が発生した場合は3とスコア付けした。(#)実験終了時に顕微的血栓症を有していないが顕微鏡で分析できなかつた動物は1とスコア付けした。 40

【図13】本発明の1つの実施形態による、L C L - K R I X - 1およびC H O - K R I X - 1の天然および脱グリコシル化 F a bフラグメントの阻害活性を示している実験結果のグラフである。K R I X - 1はN - グリコシダーゼ - Fを用いた処理によって脱グリコシル化し、そしてパインを用いた消化によってF a bを生成した。天然および脱グリコ 50

シル化Fabの阻害活性を評価するために、様々な希釈率の1容量の抗体を1容量の正常ヒトプール血漿と混合し、37℃で2時間インキュベートした。次に残留FVII活性をクロモジェニックアッセイにおいて測定した。

【図14】本発明の1つの実施形態による、*Pichia pastoris*内で生成したKRIX-1のscFvフラグメント(scFv-KRIX-1VLVH(His))の阻害活性を示している実験結果のグラフである。scFv-KRIX-1VLVH(His)の阻害活性を評価するために、様々な濃度のscFv-KRIX-1VLVH(His)を含む1容量のバッファを1容量の正常ヒトプール血漿と混合し、37℃で2時間インキュベートした。次に残留FVII活性をクロモジェニックアッセイにおいて測定した。

10

【図15】本発明の1つの実施形態による、KRIX-1およびKRIX-1QのscFvフラグメントのFVII阻害活性を示している実験結果のグラフである。KRIX-1およびKRIX-1QのscFvフラグメントの阻害活性を評価するために、様々な希釈率のscFv-KRIX-1VLVH(His)（白抜き記号）もしくはscFv-KRIX-1VLVHQ(His)（黒塗り記号）に対する発現ベクターを用いてトランスフェクトした1容量のCHO細胞の培養上清を1容量の正常ヒトプール血漿と混合し、37℃で2時間インキュベートした。次に残留FVII活性をクロモジェニックアッセイにおいて測定した。

【図16】Krix-1およびRHD5によるRHD5へのFVII結合の阻害を示している実験結果のグラフである。RHD5塗布プレートへ添加する前に、ビオチニル化rFVIIを様々な濃度のRHD5（黒塗り記号）もしくはKrix-1（白抜き記号）と混合した。プレートを次に4℃で2時間インキュベートし、アビジンペルオキシダーゼおよびOPDの添加によってFVIIの結合を検出した。

20

【図17】Krix-1可変重鎖および軽鎖のヌクレオチドおよびアミノ酸配列である（グリコシル化コンセンサス部位のAsnおよびThr残基を星印で示した）。

【図18】Krix-1QのscFvフラグメントのヌクレオチドおよびアミノ酸配列である。突然変異Gln47残基を示した。

【図19】RHD5可変重鎖および軽鎖のヌクレオチドおよびアミノ酸配列（推定グリコシル化コンセンサス部位のAsnおよびThr残基を星印で示した）。

【 図 1 】

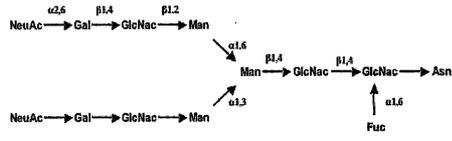


Figure 1

【 図 2 】



Figure 2

【 図 3 】

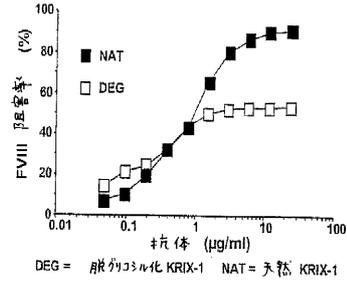


Figure 3

【 図 4 】

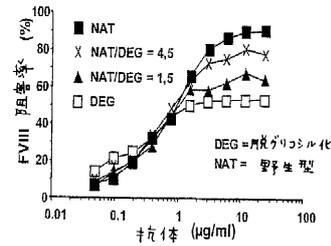


Figure 4

【 図 5 】

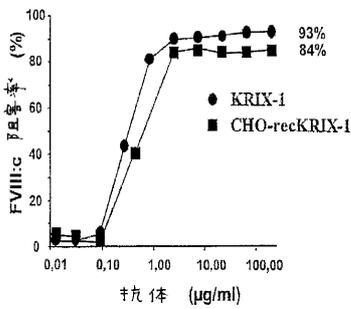


Figure 5

【 図 7 】

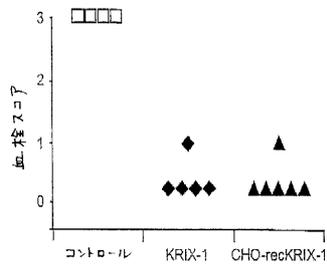


Figure 7

【 図 6 】

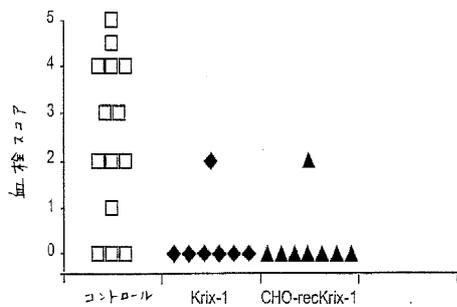


Figure 6

【 図 8 】

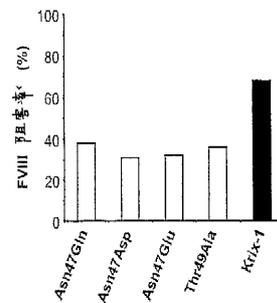


Figure 8

【 図 9 】

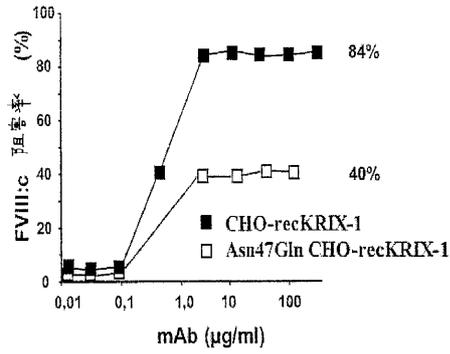


Figure 9

【 図 1 1 】

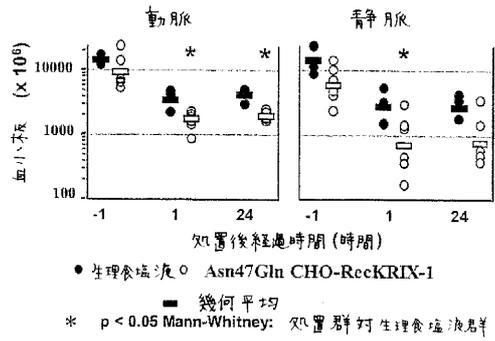


Figure 11

【 図 1 0 】

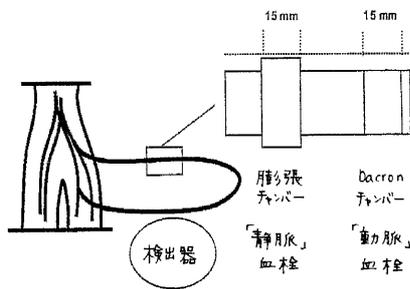


Figure 10

【 図 1 2 】

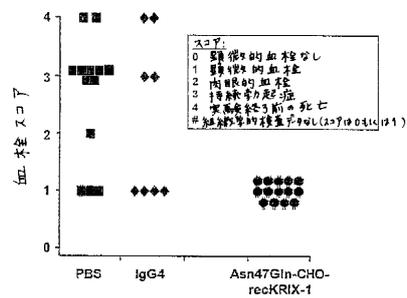


Figure 12

【 図 1 3 】

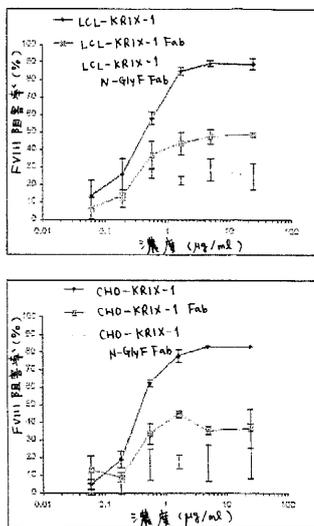


Figure 13

【 図 1 5 】

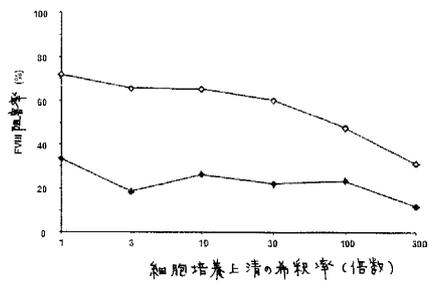


Figure 15

【 図 1 4 】

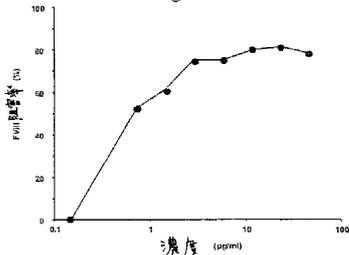


Figure 14

【 図 1 6 】

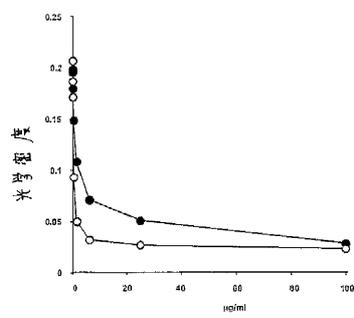


Figure 16

【 17 - 1 】

Krix-1 可變區全長 (配列番号 1 から 2)

1/1 31/11
ATG GAC TGG ACC TGG AGG ATC CTC TTC TTG CTG GCA GCA GCC ACA GGA GCC CAC TCC CAG
M D W T W R I L F L V A A A T G A H S Q
Leader peptide
61/21 91/31
CTG CAA CTG GTG CAA TCT GGG GCT GAG GTC AAG AAG CCT GGG GGC TCA CTG AAG GTC TCC
V Q L V Q S G A E V K K P G A S V R V S
121/41 47 49 151/51
TGC AAG ACC TCT GGA TAC AAC TTC ACC GGC TAC TCT GCT TCT GGA CAT ATC TTC ACC GGC
C K T S G Y N F T G Y S A S G H I F T A
CDR1
181/61 211/71
TAC TCT GTG CAC TGG CTG CSA CAG GCC CTT GGA CAA GGG CTT GAG TGG ATG GGA AGG ATC
Y S V H W V R Q A P G Q G L E W M G R I
CDR2
241/81 271/91
AAG CCT AAC AAT CCT GCC ACA GAG TAT GCA CAG AAA TTT CAG GGC AGC GTC ACC ATG TCC
N P N S G A T D Y A H K F Q G R V T M S
CDR3
301/101 331/111
AGG GAC ACC TCC ATC AGC ACA GCC TAC ATG GAA CTG AGC AGC GTC ACA TCT GAC CAC ACC
R D T S I S T A Y M E L S R L T S D D T
361/121 391/131
GCC ATG TAT TAC TGT GCG AGA GCC GAC AAC TAT TTC CAT ATT GTC ACT GGC TAT ACT TCT
A M Y Y C A R A D N Y F D I V T C Y T S
CDR3
421/141 451/151
CAT TAC TTT GAC TAC TGG GGC CCG GGA ACC CTG GTC ACC CTC TCC TCA GCC TCC ACC AAG
H Y F D Y W G R G T L V T V S S A S T K
481/161
GGC CCA TCG GTC TTC C
G P S V F

Figure 17

【 17 - 2 】

Krix-1 可變區全長 (配列番号 3 から 4)

1/1 31/11
ATG GAA ACC CCA GCT CAG CTT CTC TTC CTC CTG CEA CTC TGG CTC CCA GAT ACC ACC GGA
M E T P A Q L L F L L L L W L P D T T G
Leader
61/21 91/31
GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA GCC ACC
E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T
121/41 151/51
CTC TCC TGC AAG GCC AGT CAG AGT GTT GCC AGC GCC TAC TTA GCC TGG TAC CAG CAA AAA
L S C R A S Q S V A S A Y L A W Y Q Q K
CDR1
181/61 211/71
CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGT AGG GCC ACC GAC ATC CCA
P G Q A E R L L I Y G A S S R A T D I P
CDR2
241/81 271/91
CAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG
H R F S G S G S G T D F T L T I S R L E
301/101 331/111
CCT GAA GAT TTT GCA CTG TAC TAC TGT CAG CAA TAT GGT ACC TCA GCC TTA CTC ACT TTC
P E D F A V Y Y C Q Q Y G T S A L L T F
CDR3
361/121 391/131
GGC GGA GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA CGA ACT GTC GCT GCA CCA TCT GTC TTC ATC TTC
G G G T K V E I K R T V A A P S V F I F
421/141
CGA CCA TCT
P P S

Figure 17 (続き)

【 18 - 1 】

scFvLE2E9VLVH Q(His) (配列番号 25 から 26)

1/1 31/11
atg gaa acc cca gag cag att ctc ttc ctc ctg cta ctc tgg ctc cca gat aac acc gga
M E T P A Q L L F L L L L W L P D T T G
Leader peptide
61/21 91/31
gaa att gty tgy aag cag tet cca ggc acc ctg tct tgg tct cca ggg gaa aga gcc acc
E I V L T Q S P G T L S L S F G E R A T
121/41 151/51
ctc tcc tgc agy gcc agt cag att gtt gcc ago gcc lac tca gcc tgy tac cag caa aaa
L S C R A S Q S V A S A Y L A W Y Q Q K
181/61 211/71
cct ggc cag gct ccc agy ctc ctc atc tct ggt gca tcc agt agy gcc acc gac atc cca
P G Q A P R L L I Y G A S S R A T D I P
VLHk
241/81 271/91
cag agy ttc agt ggc agt ggt tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc ago aga ctg gag
H E F S G S F S G T D F T L T I S R L E
301/101 331/111
cct gaa gat ttt gca gty tac tcc tgt cag caa tat ggt acc tca gcc tta ctc act ttc
P E D F A V Y Y C Q Q Y G T S A L L T F
361/121 391/131
ggc gga ggg acc aag ctg gag atc aaa cga ggt gga ggc ggt tca ggc gga ggt ggc tct
G G G T K V E I K R G G G S G G G S
Linker
421/141 451/151
ggc ggc ggc ggc tgc cag gta cag ctg gty cag tct ggg gct gag gty aag aag cct ggg
G G G S Q V Q L V Q S G A E V K K R G
481/161 511/171
goc toa gty aag gtc tcc tgc aag acc tct gga tac caa ttc acc ggc tac tct gct tct
A S V R V S C K T S G Y Q F T G Y S A S
Gln47 Thr49
541/181 571/191
gga cat atc ttc acc gcc taa tct gty caa tgg gty gga cag gcc cct gga caa ggg ctt
G H I F T A Y S V H W V R Q A P G Q G L

Figure 18

【 18 - 2 】

601/201 631/211
gag tgg atg gaa agy atc aac oct aac agt ggt gcc aca gac tat gca cat aaa ttt cag
E W H G R I N F N S G A T D Y A H K F Q
VHDIH
661/221 691/231
ggc agy gtc acc atg tcc agy gac aoy tcc ate ago aca gcc tac atg gaa ctg agc agg
G R V T M S R D T S I S T A F M E L S R
721/241 751/251
ctg aca tct gac aca gcc atg tat tac tgt ggg aga gcc gac aac tct tcc gat att
L T S D D T A M Y Y C A R A D N Y F D I
781/261 811/271
gty act ggc tat act tct cat tac ttt gac tac tgg ggc cgy gga acc ctg gtc acc gtc
V T G Y T S H I F D Y W G R G T L V T V
841/281
tcc tca aat cat cat cat cat tga
S S H H H H H H
His(6)tag

Figure 18 (続き)

【 図 19 - 1 】

RHD5 重鎖可変領域 (配列番号 29 および 30)

```

1/1          31/11
ATG GAC TGG ACC TGG AGG TTC CTC TTT GTG GCA GCA GGT GCA GAT GTC CAG TCC CAG
M D W T W R F L F V V A A A A G V Q S Q
----- Leader peptide -----
61/21
GTG CAG CTG CTG CAG TCT GGG GGT GAG GTG AAG AAG CCG GGG TCG TCG GTG ATG GTG TCC
V Q L V Q S G A E V K K P G S S V M V S
----- Leader peptide -----
121/41      151/51
TGC AAG GCT TCT GGA GGC ACC TTC AGC AGC TTT GGT ATC AGC TGG GTG CGA CAG GCC CCT
C K A S G G T F S S F G I S W V R Q A P
----- CDR1 -----
181/61      211/71
GGA CAA GGG CTT GAG TGG CTG GGA GGG ATC ATC CCT ATC TTT GGT ACA GCA AAC ACC GCA
G Q G L E W V G G I I P T F G T A N T A
----- CDR2 -----
241/81      271/91
CGG AAC TTC CAG AAT AGA GTC ACC ATT ACC GGG GAC GAA TTC ACC AGC ACA GCC TAC ATA
R N F Q K R V T I T A D E F T S T A Y I
----- Leader peptide -----
301/101     331/111
CGA CTG AGG AGC CTG ACA TCT GAA GAT AGC GCC GTG TAT TAC TGT GTC GGC GGT CGA GAT
R L R S L R S E D T A V Y T C V G G R D
----- CDR3 -----
361/121     391/131
GCC TAC AGC TTT GAT GGT TTT GAT GTC TGG GGC CAA GGG ACA ATG GTC ACC GTC TCT TCA
A Y S F D C P D V W G Q G T M V T V S S
----- CDR3 -----
421/141
GCC TCC ACC AAG GGC CCA TCG GTC TTC CCC
A S T K G P S V F P
----- constant region -----

```

【 図 19 - 2 】

RHD5 軽鎖可変領域 (配列番号 31 および 32)

```

1/1          31/11
ATG GCA TGG ATC CCT CTC TTC CTC GGC GTC CTT GTT TAC TGC ACA GGA TCC GTG GCC TCC
M A W I P L F L G V L V Y C T G S V A S
----- Leader peptide -----
61/21      91/31
TCT GGG CTG ACT CAG CCA CAC TCA GTG TCC GTG TCC CCA GGA CAG ACA GCC AAC ATC ACC
S G L T Q P H S V S V S P G Q T A N I T
----- Leader peptide -----
121/41     151/51
TGC TCT AGA GAT AAG TTG GGT CAT AAA TTT GCT TCC TGG TAT CAA CAG AAG CCA GGC CAG
C S R D K L G H K F A S W Y Q Q K P G Q
----- CDR1 -----
181/61     211/71
TCC CCT GGT CTT CTC ATC TAT CAA GAC AGC AAG CCG CCC TCA GGG ATC CCT GAG CGA TTC
S F A L L I Y Q D S K R P S S G I P E R F
----- CDR2 -----
241/81     271/91
TCT GGC TCC AAC TCT GGG AAC ACA GCC ACT CTG ACC ATC AGC GGG ACC CAG GGT ATG GAT
S G S N S G N T A T L T I S G T Q A M D
----- Leader peptide -----
301/101    331/111
GAG GCT GAC TAT TAC TGT CAG GCG TGG GAC AAC ACC ACT GCC GTA TTC GGC GGA GGG ACC
E A D Y Y C Q A W D N T A V F G G G T
----- CDR3 -----
361/121    391/131
AAG TTG ACA GTC CTA AGT CAG CCC AAG GCT GGC CCG TCC GTC ACT CTG TTC CCG CCC TCC
K L T V L S Q P K A A P S V T L F P P S
----- constant region -----

```

Figure 19

Figure 19 (続き)

【 配列表 】

2007502250000001.app

【 手続補正書 】

【 提出日 】平成17年4月27日 (2005.4.27)

【 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 】

修飾された K r i x - 1 抗体であって、天然 K r i x - 1 抗体と比較して修飾された最高阻害活性を生じるようにその可変領域のグリコシル化が修飾されていることを特徴とする抗体もしくはそのフラグメント。

【 請求項 2 】

グリコシル化の前記修飾が、前記 K r i x - 1 抗体の可変領域内の保存された N - グリコシル化コンセンサスパターンのグリコシル化を変調するステップによって得られる、請求項 1 に記載の抗体もしくはそのフラグメント。

【 請求項 3 】

グリコシル化の前記修飾が、前記 K r i x - 1 抗体の可変領域内の N - グリコシル化コンセンサス配列のアミノ酸配列を修飾するステップによって得られる、請求項 1 に記載の抗体もしくはそのフラグメント。

【 請求項 4 】

グリコシル化の前記修飾が、前記 K r i x - 1 抗体の可変領域内のグリコシル化コンセンサス配列の導入によって得られる、請求項 1 に記載の抗体もしくはそのフラグメント。

【請求項 5】

前記抗体の親和性が 1 n M 未満である、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の抗体もしくはそのフラグメント。

【請求項 6】

K R I X - 1 Q もしくは K R I X - 1 A、またはモノクローナル抗体 K R I X - 1 Q もしくは K R I X - 1 A の s c F v フラグメント、F a b フラグメントもしくは F (a b ')₂ フラグメントである、請求項 1 に記載の抗体もしくはそのフラグメント。

【請求項 7】

K R I X - 1 D もしくは K R I X - 1 E、またはモノクローナル抗体 K R I X - 1 D もしくは K R I X - 1 E の s c F v フラグメント、F a b フラグメントもしくは F (a b ')₂ フラグメントである、請求項 1 に記載の抗体もしくはそのフラグメント。

【請求項 8】

s c F v フラグメントが配列番号 26 によって表される、請求項 1 に記載の抗体もしくはそのフラグメント。

【請求項 9】

C D R 領域内の配列番号 2 との少なくとも 80 % の配列類似性を有するアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖を含む、請求項 1 に記載の抗体もしくはそのフラグメント。

【請求項 10】

配列番号 1 との少なくとも 70 % の配列同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされる配列を含む免疫グロブリン重鎖を含む、請求項 1 に記載の抗体もしくはそのフラグメント。

【請求項 11】

配列番号 4 との少なくとも 70 % の配列類似性を有するアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖を含む、請求項 1 に記載の抗体もしくはそのフラグメント。

【請求項 12】

配列番号 3 との少なくとも 70 % の配列同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされる配列を含む免疫グロブリン軽鎖を含む、請求項 1 に記載の抗体もしくはそのフラグメント。

【請求項 13】

F V I I I に対する天然 K r i x - 1 阻害抗体および請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載の修飾された K r i x - 1 抗体からなる群から選択される 2 つ以上の抗体もしくは抗体フラグメントの混合物。

【請求項 14】

請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載の抗体または請求項 13 に記載の混合物を含む医薬組成物。

【請求項 15】

前記 K r i x - 1 抗体が前記 K r i x - 1 抗体によって認識される 1 種以上のリガンドの 1 つ以上の相互作用に及ぼす阻害効果を、前記リガンドと相互作用する他のタンパク質もしくは試薬を用いて修飾するために、前記 K r i x - 1 抗体の抗原結合部位におけるグリコシル化部位を修飾もしくは導入するような方法で修飾された有効量の K r i x - 1 抗体もしくはそのフラグメントを投与するステップを含む治療方法。

【請求項 16】

外科的介入、固定または慢性遺伝性もしくは後天性栓友病に続発性の深部静脈血栓症および肺動脈塞栓症の予防、ならびに深部静脈血栓症、肺動脈塞栓症、脳梗塞、心房細動、非 Q 波心筋梗塞、非 S T 上昇性心筋梗塞、不安定狭心症、敗血症もしくは S I R S の治療を含むがそれらに限定されない、有効量の請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体もしくはそのフラグメント、または請求項 13 に記載の混合物を投与するステップを含む、血栓塞栓性障害を治療および予防するための方法。

【請求項 17】

有効量の請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体もしくはそのフ

ラグメント、または請求項 13 に記載の混合物および同時に投与されるアスピリンなどの血小板凝集を阻害する 1 種以上の薬物を投与するステップを含む、血栓塞栓性障害を治療および予防するための方法。

【請求項 18】

有効量の請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体もしくはそのフラグメント、または請求項 13 に記載の混合物、および同時に投与されるアブシキシマブ (Rheopro (登録商標)) もしくは抗血栓溶解薬 (組織プラスミノゲン活性化因子、スタフィロキナーゼもしくはマイクロプラスミンを含む) などの血小板凝集を阻害する 1 種以上の薬物を投与するステップを含む、急性心筋梗塞を治療するための方法。

【請求項 19】

前記モノクローナル抗体が Krix-1 に由来する抗凝固性モノクローナル抗体であり、抗原結合部位の N-グリコシル化部位において突然変異を有する、請求項 15 から 18 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

可変最高阻害活性を備える第 V I I I 因子に対する少なくとも 2 つの阻害抗体からなるライブラリーを得るための方法であって、前記方法が、前記阻害抗体の可変領域内のグリコシル化を修飾するステップと、および相違する最高阻害活性を有する少なくとも 1 つの抗体もしくはそのフラグメントを選択するステップとを含む方法。

【請求項 21】

前記方法が、F V I I I に対する阻害抗体もしくはそのフラグメントの可変領域内のグリコシル化を修飾するステップと、およびそれに対する親和性が実質的に影響を受けていない抗体を選択するステップと、を含む、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記第 V I I I 因子阻害抗体が F V I I I の C 1 ドメインに対して向けられている、請求項 20 もしくは 21 に記載の方法。

【請求項 23】

前記第 V I I I 因子阻害抗体が Krix-1 である、請求項 20 から 22 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 24】

請求項 20 から 23 に記載の方法によって得られた第 V I I I 因子阻害抗体のライブラリー。

【請求項 25】

前記抗体もしくはそのフラグメントが飽和濃度で F V I I I を 20 から 85 % 阻害する F V I I I 阻害抗体もしくはそのフラグメントを産生するための方法であって：

- 無傷 F V I I I 阻害抗体もしくはそのフラグメントを提供するステップと、および
- 翻訳後レベルで前記抗体もしくは抗体フラグメントのグリコシル化を修飾するステップ、または前記抗体の可変領域のグリコシル化コンセンサス配列内の必須アミノ酸を変化させるステップによって前記抗体もしくは抗体フラグメントのグリコシル化を修飾するステップと、を含む方法。

【請求項 26】

修飾されたグリコシル化パターンを有する修飾された Krix-1 阻害抗体である、F V I I I 阻害抗体と競合する抗体を同定するための方法であって：

- C 1 ドメインを含む F V I I I もしくは F V I I I のフラグメントを、修飾されたグリコシル化パターンを有する修飾された Krix-1 阻害抗体である、第 1 阻害抗体、および候補阻害抗体と接触させるステップと、および

- 前記候補抗体が 前記修飾された Krix-1 阻害抗体 の前記 F V I I I もしくは F V I I I のフラグメントへの結合に競合する能力をアッセイするステップと、を含む方法。

【請求項 27】

前記第 1 阻害抗体が Krix-1 A、Krix-1 Q、Krix-1 D または Krix-1 E である、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

前記第2抗体がF V I I I活性を阻害する能力を決定するステップをさらに含む、請求項27に記載の方法。

【請求項 29】

前記第2抗体がモル過剰で存在する場合に、前記第2抗体のF V I I I活性に及ぼす部分的阻害効果の存在を決定するステップをさらに含む、請求項27に記載の方法。

【請求項 30】

請求項1から12のいずれか一項に記載の抗体とF V I I Iに対する阻害抗体である他の抗体とを含む混合物。

【請求項 31】

前記他の抗体がR H D 5である、請求項30に記載の混合物。

【請求項 32】

前記抗体が、F V I I Iに比して抗体混合物がたとえ過剰であっても、F V I I I活性の所定の最高阻害を達成するために適切な比率で混合される、請求項13、30もしくは31の混合物。

【請求項 33】

請求項30から32のいずれか一項に記載の混合物を含む医薬組成物。

【手続補正書】

【提出日】平成18年4月28日(2006.4.28)

【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】

F V I I Iに対する阻害抗体の修飾された抗体であって、その可変領域のグリコシル化が修飾されていること、および天然抗体と比較して同一の親和性を実質的に有することを特徴とする抗体もしくはそのフラグメント。

【請求項2】

グリコシル化の前記修飾が、その可変領域内の保存されたN-グリコシル化コンセンサスパターンを備える抗体のグリコシル化を変調するステップによって得られる、請求項1に記載の抗体もしくはそのフラグメント。

【請求項3】

グリコシル化の前記修飾が、前記可変領域内のN-グリコシル化コンセンサス配列のアミノ酸配列を修飾するステップによって得られる、請求項1に記載の抗体もしくはそのフラグメント。

【請求項4】

グリコシル化の前記修飾が、前記抗体の可変領域内のグリコシル化コンセンサス配列の導入によって得られる、請求項1に記載の抗体もしくはそのフラグメント。

【請求項5】

F V I I Iに対する前記阻害抗体がK r i x - 1である、請求項1から4のいずれか一項に記載の抗体もしくはそのフラグメント。

【請求項6】

前記抗体の親和性が1 n M未満である、請求項1から5のいずれか一項に記載の抗体もしくはそのフラグメント。

【請求項7】

K R I X - 1 QもしくはK R I X - 1 A、またはモノクローナル抗体K R I X - 1 QもしくはK R I X - 1 Aのs c F vフラグメント、F a bフラグメントもしくはF (a b ')₂フラグメントである、請求項5に記載の抗体もしくはそのフラグメント。

【請求項 8】

s c F vフラグメントが配列番号 2 6 によって表される、請求項 5 に記載の抗体もしくはそのフラグメント。

【請求項 9】

配列番号 2 との少なくとも 7 0 % の配列類似性を有するアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖を含む、請求項 5 に記載の抗体もしくはそのフラグメント。

【請求項 1 0】

配列番号 1 との少なくとも 7 0 % の配列同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされる配列を含む免疫グロブリン重鎖を含む、請求項 5 に記載の抗体もしくはそのフラグメント。

【請求項 1 1】

配列番号 4 との少なくとも 7 0 % の配列類似性を有するアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖を含む、請求項 5 に記載の抗体もしくはそのフラグメント。

【請求項 1 2】

配列番号 3 との少なくとも 7 0 % の配列同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされる配列を含む免疫グロブリン軽鎖を含む、請求項 5 に記載の抗体もしくはそのフラグメント。

【請求項 1 3】

F V I I I に対する天然阻害抗体および請求項 1 から 1 2 のいずれか一項に記載の修飾された抗体からなる群から選択される 2 つ以上の抗体もしくは抗体フラグメントの混合物。

【請求項 1 4】

請求項 1 から 1 2 のいずれか一項に記載の抗体または請求項 1 3 の混合物を含む医薬組成物。

【請求項 1 5】

血栓塞栓性障害の治療もしくは予防において使用するための請求項 1 から 1 2 のいずれか一項に記載の抗体もしくはそのフラグメントまたは請求項 1 3 に記載の混合物を含む組成物。

【請求項 1 6】

前記血栓塞栓性障害が深部静脈血栓症、肺動脈塞栓症、栓友病、脳梗塞、心房細動、非 Q 波心筋梗塞、非 S T 上昇性心筋梗塞、不安定狭心症、敗血症もしくは S I R S である、請求項 1 5 に記載の組成物。

【請求項 1 7】

血小板凝集を阻害する 1 種以上の薬物をさらに含む、請求項 1 5 または 1 6 に記載の組成物。

【請求項 1 8】

血小板凝集を阻害する前記 1 種以上の薬物が、アスピリン、アブシキシマブ (R h e o p r o (登録商標)) もしくは抗血栓溶解薬 (組織プラスミノゲン活性化因子、スタフィロキナーゼもしくはマイクロプラスミンを含む) からなる群から選択される、請求項 1 7 に記載の組成物。

【請求項 1 9】

可変最高阻害活性および実質的に同一の親和性を備える、第 V I I I 因子に対する少なくとも 2 つの阻害抗体からなるライブラリーを得るための方法であって、前記方法が、前記阻害抗体もしくはそのフラグメントの可変領域内のグリコシル化を修飾するステップによって F V I I I に対する阻害抗体もしくはそのフラグメントのサイズを修飾するステップと、それに対する親和性が実質的に影響を受けていない少なくとも 1 つの抗体もしくはそのフラグメントを選択するステップと、を含む方法。

【請求項 2 0】

前記方法が、F V I I I に対する阻害抗体もしくはそのフラグメントの可変領域内のグリコシル化を修飾するステップと、およびそれに対する親和性が実質的に影響を受けてい

ない抗体を選択するステップと、を含む、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

請求項 19 または 20 に記載の方法によって得られた第 V I I I 因子阻害抗体のライブラリー。

【請求項 22】

前記抗体もしくはそのフラグメントが飽和濃度で F V I I I を 20 から 85 % 阻害する F V I I I 阻害抗体もしくはそのフラグメントを産生するための方法であって：

- 無傷 F V I I I 阻害抗体もしくはそのフラグメントを提供するステップと、および
- 翻訳後レベルで前記抗体もしくは抗体フラグメントのグリコシル化を修飾するステップ、または前記抗体の可変領域のグリコシル化コンセンサス配列内の必須アミノ酸を変化させるステップによって前記抗体もしくは抗体フラグメントのグリコシル化を修飾するステップと、を含む方法。

【請求項 23】

前記抗体が、F V I I I に比して抗体混合物がたとえ過剰であっても、F V I I I 活性の所定の最高阻害を達成するために適切な比率で混合される、請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載の 2 つ以上の抗体もしくはそのフラグメントの混合物。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0064

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0064】

Thr49 から Ala への置換を備えており、CHO 細胞内で産生されたモノクローナル抗体 KRIX - 1 抗体は、Thr49Ala Krix - 1 もしくは Krix - 1 A と呼ばれている。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0202

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0202】

モノクローナル抗体 RHD5 を産生するこの細胞株は、2004 年 8 月に D. Colleen 研究財団 (Onderwijs & navorsing, B - 3000 ベルギー国ルーベン Herestraat 49, Campus Gasthuisberg) を寄託者として Gent 大学 Technologiepark 927, B - 9052 Zwijnaarde 所在の BCCM / LM BP (Belgian Co - ordinated Collections of Microorganisms / Plasmid Collection), Laboratorium voor Moleculaire Biologie に寄託された (アクセッション番号 LMBP6165CB)

。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PC1/BE2004/000118
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61P07/02 A61K39/395 C07K16/36		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/04269 A (SAINT REMY JEAN MARIE R ; JACQUEMIN MARC G (BE); LEUVEN RES & DEV VZW) 18 January 2001 (2001-01-18) page 25, line 4 - page 26, line 8 examples 5,7 figures 8,9	30,31
X	KALLAS ADE ET AL: "Epitope specificity of anti-FVIII antibodies during immune tolerance therapy with factor VIII preparation containing von Willebrand factor." THROMBOSIS RESEARCH, vol. 107, no. 6, 15 September 2002 (2002-09-15), pages 291-302, XP008041463 ISSN: 0049-3848 page 295, right-hand column, paragraph 2	26,30,31
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
19 January 2005		02/02/2005
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer COVONE-VAN HEES, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal Application No
PCT/BE2004/000118

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SINGH INDERJIT ET AL: "Antithrombotic effects of controlled inhibition of factor VIII with a partially inhibitory human monoclonal antibody in a murine vena cava thrombosis model." BLOOD. 1 MAY 2002, vol. 99, no. 9, 1 May 2002 (2002-05-01), pages 3235-3240, XP002314128 ISSN: 0006-4971	30, 31
A	the whole document	15-19
A	WRIGHT A: "ANTIBODY VARIABLE REGION GLYCOSYLATION: POSITION EFFECTS ON ANTIGEN BINDING AND CARBOHYDRATE STRUCTURE" EMBO JOURNAL, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 10, no. 10, 1 October 1991 (1991-10-01), pages 2717-2723, XP000219694 ISSN: 0261-4189 page 2717, right-hand column, lines 25-31 page 2720, right-hand column, lines 1-6 page 2721, left-hand column, lines 14-17 table II	1-33
A	KATO MASATOSHI ET AL: "Activity enhancement of a lung cancer-associated human monoclonal antibody HB4C5 by N-deglycosylation" HUMAN ANTIBODIES AND HYBRIDOMAS, vol. 4, no. 1, 1993, pages 9-14, XP008041607 abstract	1-33
A	SATO KOH ET AL: "Humanization of an anti-human IL-6 mouse monoclonal antibody glycosylated in its heavy chain variable region" HUMAN ANTIBODIES AND HYBRIDOMAS, vol. 7, no. 4, 1996, pages 175-183, XP008041468 ISSN: 0956-960X abstract	1-33
A	KHURANA SUMIT ET AL: "The variable domain glycosylation in a monoclonal antibody specific to GnRH modulates antigen binding" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 234, no. 2, 1997, pages 465-469, XP008041466 ISSN: 0006-291X page 467, left-hand column, paragraph 2	1-33

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte - 1al Application No
PC 1/ bE2004/000118

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 822 255 A (WELLCOME FOUND) 4 February 1998 (1998-02-04) the whole document	1
P,X	----- DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 16 November 2003 (2003-11-16), JACQUEMIN MARC G ET AL: "Glycosylation of a type 2 factor VIII inhibitor determines its maximum level of FVIII inhibition." XP002314129 Database accession no. PREV200400181293 abstract	1-33
P,X	& BLOOD, vol. 102, no. 11, 16 November 2003 (2003-11-16), page 163a, 45TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY; SAN DIEGO, CA, USA; DECEMBER 06-09, 2003 ISSN: 0006-4971 -----	1-33

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/BE2004/000118

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 15-19 (partially)
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 15-19 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/BE2004/000118

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0104269	A	18-01-2001	AU 6273000 A	30-01-2001
			CA 2381125 A1	18-01-2001
			WO 0104269 A1	18-01-2001
			EP 1194528 A1	10-04-2002
			JP 2003504045 T	04-02-2003
EP 0822255	A	04-02-1998	EP 1247865 A2	09-10-2002
			EP 0822255 A2	04-02-1998
			AT 176926 T	15-03-1999
			AU 645355 B2	13-01-1994
			AU 8591491 A	30-04-1992
			CA 2053585 A1	18-04-1992
			DE 69130912 D1	01-04-1999
			DE 69130912 T2	02-09-1999
			DK 481790 T3	27-09-1999
			EP 1484402 A2	08-12-2004
			EP 0481790 A2	22-04-1992
			ES 2131507 T3	01-08-1999
			GR 3030289 T3	30-09-1999
			IE 913558 A1	22-04-1992
			JP 6090752 A	05-04-1994
			NZ 240249 A	25-03-1994
			US 2002182208 A1	05-12-2002
			US 2003035799 A1	20-02-2003
			US 5545403 A	13-08-1996
			US 5545404 A	13-08-1996
US 5545405 A	13-08-1996			
US 2004228857 A1	18-11-2004			
ZA 9108248 A	16-04-1993			

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 K 37/48	
A 6 1 P 9/08 (2006.01)	A 6 1 P 7/02	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	A 6 1 P 9/08	
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
	G 0 1 N 33/50	Z
	G 0 1 N 33/53	N

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T E F L O N

(74) 代理人 100096781

弁理士 堀井 豊

(74) 代理人 100098316

弁理士 野田 久登

(74) 代理人 100109162

弁理士 酒井 将行

(72) 発明者 サン・ルミ, ジャン・マリー

ベルギー、ベ - 1 3 9 0 グル・ドゥワソー、リュ・デュ・ランベ、7 9

(72) 発明者 ジャックマン, マルク

ベルギー、ベ - 5 3 3 0 サルーベルナール、リュ・モリモン、4 5

F ターム(参考) 2G045 AA40 BB03 BB20 CB01 DA37 FB03

4B024 AA01 AA11 BA61 CA01 CA05 CA11 CA20 DA02 EA04 GA11

HA01 HA11

4C084 AA02 AA07 DC01 DC21 MA02 NA05 NA14 ZA362 ZA392 ZA542

ZB072 ZB352

4C085 AA13 AA14 AA33 BB11 BB31 CC02 CC05 CC21 CC22 CC23

EE01 EE03

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA65 DA75 EA24 EA50

FA74

专利名称(译)	可变抗体		
公开(公告)号	JP2007502250A	公开(公告)日	2007-02-08
申请号	JP2006522852	申请日	2004-08-16
[标]申请(专利权)人(译)	Diko莱恩研究基金会的Ferre救灾环勒温探头默克斯托尔		
申请(专利权)人(译)	迪科伦研究基金会-Ferenigengu-Zonderu赢默克斯托尔		
[标]发明人	サンルミジャンマリー ジャックマンマルク		
发明人	サン-ルミ,ジャン-マリー ジャックマン,マルク		
IPC分类号	C07K16/18 A61K39/395 A61K38/00 A61K38/43 A61P7/02 A61P9/10 A61P9/08 A61P31/04 C12N15/09 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 C07K16/36		
CPC分类号	C07K16/36 A61K2039/505 C07K2317/21 C07K2317/41 C07K2317/55 C07K2317/56 C07K2317/622 C07K2317/70		
FI分类号	C07K16/18.ZNA A61K39/395.D A61K39/395.N A61K37/02 A61K39/395.Y A61K37/48 A61P7/02 A61P9/10 A61P9/08 A61P31/04 C12N15/00.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.N		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/DA37 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA61 4B024/CA01 4B024/CA05 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA11 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/DC01 4C084/DC21 4C084/MA02 4C084/NA05 4C084/NA14 4C084/ZA362 4C084/ZA392 4C084/ZA542 4C084/ZB072 4C084/ZB352 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA33 4C085/BB11 4C085/BB31 4C085/CC02 4C085/CC05 4C085/CC21 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/EE01 4C085/EE03 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA65 4H045/DA75 4H045/EA24 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	森田俊夫 堀井裕 酒井 将行		
优先权	2003019118 2003-08-14 GB 2003019345 2003-08-18 GB		
其他公开文献	JP4934796B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明公开了针对因子VIII的抑制性抗体，其包含通过酶促去糖基化或定点诱变修饰的糖基化。具有修饰的糖基化的所述抗体具有与FVIII相当的亲和力，但显示出不同的抑制特性。使用一种抗体或所述抗体的混合物使得可以将因子VIII的抑制调节至40%至95%之间的水平。本发明公开了具有修饰的糖基化的针对因子VIII的抑制性抗体，包含这些抗体的组合的药物组合物，以及使用所述抗体和抗体混合物治疗止血性疾病的方法。

