

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)公開番号

特開2023-106635

(P2023-106635A)

(43)公開日 令和5年8月2日(2023.8.2)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	2 G 0 4 5
C 0 7 K 16/36 (2006.01)	C 0 7 K 16/36	Z N A 4 B 0 6 3
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	4 B 0 6 4
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	Z 4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z 4 C 0 8 5
審査請求 未請求 請求項の数 28		O L (全30頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2020-74338(P2020-74338)

(22)出願日 令和2年4月17日(2020.4.17)

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

(71)出願人 000003311

中外製薬株式会社  
東京都北区浮間5丁目5番1号

(74)代理人 100102118

弁理士 春名 雅夫

(74)代理人 100102978

弁理士 清水 初志

(74)代理人 100160923

弁理士 山口 裕孝

(74)代理人 100119507

弁理士 刑部 俊

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 二重特異性抗原結合分子ならびに、それに関連する組成物、組成物の製造のための使用、キット、および方法

(57)【要約】 (修正有)

【課題】安全に血友病患者の出血を防ぐ治療方法の提供。

【解決手段】種々の血液凝固関連因子のうち特定の2種の因子の両方を認識する二重特異性抗原結合分子、ならびにそれを含む組成物およびキット。非限定的な一態様において、本開示の二重特異性抗原結合分子、組成物、およびキットは、出血、出血を伴う疾患、もしくは出血に起因する疾患の予防および/または治療に用いられる。また、本開示は、当該二重特異性抗原結合分子を用いて血液凝固を促進する方法も提供する。さらに、本開示は、出血、出血を伴う疾患、もしくは出血に起因する疾患の予防および/または治療に有効な物質のスクリーニング方法も提供する。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

以下の (a) ~ (g) のいずれかに記載の二重特異性抗原結合分子：

- (a) 活性化血液凝固第 XI 因子と血液凝固第 X 因子の両方を認識する二重特異性抗原結合分子；
- (b) 活性化血液凝固第 X 因子と血液凝固第 X 因子の両方を認識する二重特異性抗原結合分子；
- (c) 活性化血液凝固第 VII 因子と血液凝固第 X 因子の両方を認識する二重特異性抗原結合分子；
- (d) 活性化血液凝固第 VII 因子-Tissue Factor complex と血液凝固第 X 因子の両方を認識する二重特異性抗原結合分子；
- (e) 活性化血液凝固第 XII 因子と血液凝固第 X 因子の両方を認識する二重特異性抗原結合分子；
- (f) Thrombin と血液凝固第 X 因子の両方を認識する二重特異性抗原結合分子；または
- (g) 活性化血液凝固第 XII 因子と血液凝固第 IX 因子の両方を認識する二重特異性抗原結合分子。

10

## 【請求項 2】

二重特異性抗体である、請求項 1 記載の二重特異性抗原結合分子。

## 【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載の抗原結合分子および薬学的に許容される担体を含む、組成物

20

## 【請求項 4】

出血、出血を伴う疾患、もしくは出血に起因する疾患の予防および/または治療に用いられる医薬組成物である、請求項 3 に記載の組成物。

## 【請求項 5】

出血、出血を伴う疾患、もしくは出血に起因する疾患が、血液凝固第 IX 因子および/または活性化血液凝固第 IX 因子の活性の低下ないし欠損によって発症および/または進展する疾患である、請求項 4 に記載の組成物。

## 【請求項 6】

血液凝固第 IX 因子および/または活性化血液凝固第 IX 因子の活性の低下ないし欠損によって発症および/または進展する疾患が、血友病 B である、請求項 5 に記載の組成物。

30

## 【請求項 7】

血液凝固第 IX 因子および/または活性化血液凝固第 IX 因子の活性の低下ないし欠損によって発症および/または進展する疾患が、血液凝固第 IX 因子および/または活性化血液凝固第 IX 因子に対するインヒビターが出現している疾患である、請求項 5 に記載の組成物。

## 【請求項 8】

出血、出血を伴う疾患、もしくは出血に起因する疾患が、血液凝固第 VIII 因子および/または活性化血液凝固第 VIII 因子の活性の低下ないし欠損によって発症および/または進展する疾患である、請求項 4 に記載の組成物。

## 【請求項 9】

血液凝固第 VIII 因子および/または活性化血液凝固第 VIII 因子の活性の低下ないし欠損によって発症および/または進展する疾患が、血友病 A、後天性血友病、またはフォンビルブランド病である、請求項 8 に記載の組成物。

40

## 【請求項 10】

血液凝固第 VIII 因子および/または活性化血液凝固第 VIII 因子の活性の低下ないし欠損によって発症および/または進展する疾患が、血液凝固第 VIII 因子および/または活性化血液凝固第 VIII 因子に対するインヒビターが出現している疾患である、請求項 8 に記載の組成物。

## 【請求項 11】

出血、出血を伴う疾患、もしくは出血に起因する疾患が、血液凝固第 XI 因子および/ま

50

たは活性化血液凝固第XI因子の活性の低下ないし欠損によって発症および/または進展する疾患である、請求項4に記載の組成物。

【請求項12】

血液凝固第XI因子および/または活性化血液凝固第XI因子の活性の低下ないし欠損によって発症および/または進展する疾患が、血友病Cである、請求項11に記載の組成物。

【請求項13】

血液凝固第XI因子および/または活性化血液凝固第XI因子の活性の低下ないし欠損によって発症および/または進展する疾患が、血液凝固第XI因子および/または活性化血液凝固第XI因子に対するインヒビターが出現している疾患である、請求項11に記載の組成物。

10

【請求項14】

請求項1または2に記載の二重特異性抗原結合分子の、請求項3～13のいずれかに記載した組成物の製造のための使用。

【請求項15】

少なくとも請求項1もしくは2に記載の二重特異性抗原結合分子、または請求項3に記載の組成物を含む、出血、出血を伴う疾患、もしくは出血に起因する疾患を予防および/または治療する方法に用いるためのキット。

【請求項16】

少なくとも請求項1もしくは2に記載の二重特異性抗原結合分子、または請求項3に記載の組成物を含み、かつ血液凝固第IX因子を含む、出血、出血を伴う疾患、もしくは出血に起因する疾患を、血液凝固第IX因子と併用して、予防および/または治療する方法に用いるためのキット。

20

【請求項17】

少なくとも請求項1もしくは2に記載の二重特異性抗原結合分子、または請求項3に記載の組成物を含み、かつ血液凝固第VIII因子を含む、出血、出血を伴う疾患、もしくは出血に起因する疾患を、血液凝固第VIII因子と併用して、予防および/または治療する方法に用いるためのキット。

【請求項18】

少なくとも請求項1もしくは2に記載の二重特異性抗原結合分子、または請求項3に記載の組成物を含み、かつ血液凝固第XI因子を含む、出血、出血を伴う疾患、もしくは出血に起因する疾患を、血液凝固第XI因子と併用して、予防および/または治療する方法に用いるためのキット。

30

【請求項19】

少なくとも請求項1もしくは2に記載の二重特異性抗原結合分子、または請求項3に記載の組成物を含み、かつ出血、出血を伴う疾患、もしくは出血に起因する疾患を、パイパス製剤と併用して、予防および/または治療する方法に用いるためのキット。

【請求項20】

活性化血液凝固第XI因子と血液凝固第X因子の両方を認識する二重特異性抗原結合分子を用いて血液凝固を促進する方法。

【請求項21】

出血、出血を伴う疾患、もしくは出血に起因する疾患の予防および/または治療に有効な物質のスクリーニング方法であって、

40

(1) 試験物質と活性化血液凝固第XI因子との結合を評価する工程、および

(2) 試験物質と血液凝固第X因子との結合を評価する工程

を含む、スクリーニング方法。

【請求項22】

さらに以下の工程を含む、請求項21に記載のスクリーニング方法：

(3) 試験物質を用いて活性化血液凝固第XI因子による血液凝固第X因子の活性化反応を評価する工程。

【請求項23】

50

出血、出血を伴う疾患、もしくは出血に起因する疾患の予防および/または治療に有効な物質もしくは組成物の品質試験方法であって、

(1) 試験物質もしくは試験組成物と活性化血液凝固第XI因子との結合を評価する工程、および

(2) 試験物質もしくは試験組成物と血液凝固第X因子との結合を評価する工程を含む、品質試験方法。

【請求項24】

さらに以下の工程を含む、請求項23に記載の品質試験方法：

(3) 試験物質もしくは試験組成物を用いて活性化血液凝固第XI因子による血液凝固第X因子の活性化反応を評価する工程。

10

【請求項25】

請求項1に記載の二重特異性抗原結合分子または請求項2に記載の二重特異性抗体をコードする核酸。

【請求項26】

請求項25に記載の核酸が挿入されたベクター。

【請求項27】

請求項25に記載の核酸または請求項26に記載のベクターを含む細胞。

【請求項28】

請求項27に記載の細胞を培養することにより、請求項1に記載の二重特異性抗原結合分子または請求項2に記載の二重特異性抗体を製造する方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、種々の血液凝固関連因子のうち特定の2種の因子の両方を認識する二重特異性抗原結合分子、ならびにそれを含む組成物、組成物の製造のための使用、およびキットに関する。また、本開示は、当該二重特異性抗原結合分子を用いて血液凝固を促進する方法に関する。さらに、本開示は、出血、出血を伴う疾患、もしくは出血に起因する疾患の予防および/または治療に有効な物質のスクリーニング方法に関する。

【背景技術】

【0002】

血液凝固は、一連の成分、特にフィブリノーゲン、血液凝固第II因子、第V因子、第VII因子、第VIII因子、第IX因子、第X因子、第XI因子、第XII因子（それぞれF.II、F.V、F.VII、F.VIII、F.IX、F.X、F.XI、F.XII）およびそれらの活性型（それぞれF.IIa、F.Va、F.VIIa、F.VIIIa、F.IXa、F.Xa、F.XIa、F.XIIa）、ならびにフォン・ヴィレブランド因子の連続的な相互作用を含む複雑な過程である。

30

【0003】

血友病は、これらの成分が欠損、またはその機能性が阻害されることで、血液凝固不能が引き起こされる出血性疾患である。F.VIIIが原因である場合は血友病Aと呼ばれ、F.IXが原因である場合は血友病Bと呼ばれる。血友病患者においては、関節内、筋肉内などの深部組織に出血症状が見られ、重篤な例では頭蓋内出血も生じる。

40

【0004】

血友病の重症度は、血液中のF.VIII活性又はF.IX活性に基づいて分類される。具体的には、健常者のF.VIII活性又はF.IX活性を100%として、活性が1%未満の患者を重症に、活性が1%以上5%未満の患者を中等症に、活性が5%以上40%未満の患者を軽症に分類する。重症血友病患者は、中等症及び軽症の患者に比べて顕著に高い頻度で出血症状を呈する。しかし、F.VIII又はF.IXの補充療法により、患者の血液中のF.VIII活性又はF.IX活性を1%以上に維持することで、出血の頻度を劇的に減少させることができる。補充療法には、主に、血漿から精製されたか又は遺伝子組換え技術により作製された凝固因子製剤が用いられる。

【0005】

50

血友病A患者の出血に対しては、F.VIII製剤が通常投与される（on-demand投与）。また、近年は、出血イベントを防ぐために、予防的に、F.VIII製剤が投与される（非特許文献1、2）（予防投与）。F.VIII製剤の血中半減期は、約12～16時間程度である。それ故、継続的な予防のためには、週に3回、F.VIII製剤が、患者に投与される（非特許文献3、4）。また、on-demand投与においては、再出血を防ぐため、F.VIII製剤を、必要に応じ、一定間隔で追加投与する。また、F.VIII製剤の投与は静脈内に実施される。また、時折F.VIIIに対する抗体（インヒビター）が、血友病患者に発生する。インヒビターは、F.VIII製剤の効果を打ち消す。従って、F.VIII製剤と比べて投与の負担が少なく、インヒビターの存在に左右されない薬剤が強く求められていた。

【0006】

これらの課題を解決する手段として、F.VIIIの機能を代替する二重特異性抗体及びその使用が報告されている（特許文献1、2、3および4）。F.IXaとF.Xに対する二重特異性抗体は、両因子を近傍に位置付けることによって、F.VIII補因子機能代替の活性を発揮し、F.VIIIの機能を代替することが可能である（非特許文献5）。該抗体の一つであり、高いF.VIII補因子機能代替活性を有するACE910(Emicizumab)は健常人を対象とした臨床試験において、優れた薬物動態（長い半減期）と忍容性が確認され（非特許文献6）、インヒビター非保有、保有の血友病Aの患者を対象とした臨床試験において、ACE910(Emicizumab)の投与前と比較して、ACE910(Emicizumab)投与により顕著な出血回数の抑制が認められた（非特許文献7）。

【0007】

血友病B患者の出血に対しては、F.IX製剤が定期投与される。しかしながら、標準的な半減期を有する従来F.IX製剤は、週2回の静脈内投与が必要であり、頻回投与は患者・家族にとっての負担となっている。さらに、止血管理中に抗F.IX抗体(インヒビター)が発生することがある。その結果、止血管理がしばしば困難となる。F.IXインヒビター患者においては、F.VIIIのインヒビターには見られない特徴的な副反応としてアナフィラキシー症状を示すことが良く知られており問題となっている（非特許文献8）。従って、F.IX製剤と比べて投与の負担が少なく、インヒビターの存在に左右されない薬剤が強く求められていた。

【0008】

F.XIはF.XIaのプロテアーゼ前駆体であり、F.IXの活性化を通じて止血に寄与している。近年、高濃度のF.XIaをF.Xに加えることで、F.Xのactivation peptideを切断できること、F.Vに加えることでF.Vaを生成することが報告された（非特許文献9）。また、F.IXを遺伝的に欠損させた血友病Bモデルマウスにおいて、過剰量のF.XIa(想定血漿中濃度60 nM)を静脈内投与することによって出血持続時間を減少させることが報告されている（非特許文献10）。従って、過剰量のF.XIあるいはF.XIaを血友病Bの患者に投与することでインヒビターの有無にかかわらず、出血回数を抑制する可能性がある。しかしながら、F.XI製剤はF.XI欠損患者に投与した際に血栓症を起こした報告があり、安全な治療方法として確立されていない（非特許文献11）。これはF.XI製剤がF.XIaを含んでしまうことが原因である可能性があり、F.XIa製剤の投与も安全な治療方法とはいえない。従って、F.XI製剤もしくはF.XIa製剤を過剰投与する以外の方法で安全に血友病患者の出血を防ぐ治療方法が求められていた。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】WO 2005/035754

【特許文献2】WO 2005/035756

【特許文献3】WO 2006/109592

【特許文献4】WO 2012/067176

【非特許文献】

【0010】

10

20

30

40

50

- 【非特許文献 1】Blood 58, 1-13 (1981)
- 【非特許文献 2】Nature 312, 330-337(1984)
- 【非特許文献 3】Nature 312, 337-342(1984)
- 【非特許文献 4】Biochim.Biophys.Acta 871, 268-278(1986)
- 【非特許文献 5】Nat Med. 2012 Oct;18(10):1570-4.
- 【非特許文献 6】Blood. 2016, Vol.127, 13: 1633-1641.
- 【非特許文献 7】New Eng J Med 2016 , 374;21, 2044-2053
- 【非特許文献 8】Semin Thromb Hemost. 2018;44(6):578-589.
- 【非特許文献 9】J Thromb Haemost. 2013;11(12):2118-2127.
- 【非特許文献 10】J Thromb Haemost. 2018;16(10):2044-2049. 10
- 【非特許文献 11】Haemophilia. 2015;21(4):477-480.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

本開示中の発明は上記のような状況に鑑みてなされたものであり、非限定的な一態様において、出血、出血を伴う疾患、もしくは出血に起因する疾患の予防および/または治療に用いられる新規分子の提供を目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0012】

非限定的な一態様において、本発明者らは、鋭意研究の結果、生体内で互いに近接させる補因子が確認されていない2種の血液凝固関連因子を認識する二重特異性抗原結合分子の作製に成功した。また、当該二重特異性抗原結合分子が血液凝固の促進に寄与することを見出した。 20

【0013】

本開示はこのような知見に基づくものであり、具体的には以下に例示的に記載する実施態様を包含するものである。

〔A〕酵素、及び前記酵素の触媒反応を受け得る基質の両方を認識する二重特異性抗原結合分子、ただし生体に発現するペプチド性補因子またはヘパリンの機能を代替する二重特異性抗原結合分子を除く。

〔B〕酵素、及び前記酵素の触媒反応を受け得る基質の両方を認識する二重特異性抗原結合分子であって、該酵素による該基質の加水分解を促進する〔A〕記載の二重特異性抗原結合分子。 30

〔C〕酵素、及び前記酵素の触媒反応を受け得る基質の両方を認識する二重特異性抗原結合分子であって、該酵素による該基質の活性化を促進する〔A〕記載の二重特異性抗原結合分子。

〔D〕酵素がプロテアーゼである〔A〕から〔C〕のいずれか一つに記載の二重特異性抗原結合分子。

〔E〕酵素がセリンプロテアーゼである〔A〕から〔C〕のいずれか一つに記載の二重特異性抗原結合分子。

〔F〕酵素が血液凝固系の酵素であり、前記酵素の触媒反応を受けうる基質が血液凝固系の基質である〔A〕から〔E〕のいずれか一つに記載の二重特異性抗原結合分子。 40

〔G〕生体に発現するペプチド性補因子である血液凝固第V因子、血液凝固第VIII因子、組織因子(TF)、トロンボモデュリン(TM)、プロテインS(PS)、プロテインZ(PZ)補体C4b、補体制御タンパクH因子(complement regulatory Factor H)、membrane cofactor Protein(MCP)、complement receptor1(CR1)からなる群から選択される少なくとも一の補因子あるいはヘパリンの機能を代替する二重特異性抗原結合分子を除く、〔A〕から〔F〕のいずれか一つに記載の二重特異性抗原結合分子。

〔G〕二重特異性抗体である、〔A〕から〔G〕のいずれか一つに記載の二重特異性抗原結合分子

〔1〕以下の(a)~(g)のいずれかに記載の二重特異性抗原結合分子： 50

- (a) 活性化血液凝固第XI因子と血液凝固第X因子の両方を認識する二重特異性抗原結合分子；
- (b) 活性化血液凝固第X因子と血液凝固第X因子の両方を認識する二重特異性抗原結合分子；
- (c) 活性化血液凝固第VII因子と血液凝固第X因子の両方を認識する二重特異性抗原結合分子；
- (d) 活性化血液凝固第VII因子-Tissue Factor complexと血液凝固第X因子の両方を認識する二重特異性抗原結合分子；
- (e) 活性化血液凝固第XII因子と血液凝固第X因子の両方を認識する二重特異性抗原結合分子；
- (f) Thrombinと血液凝固第X因子の両方を認識する二重特異性抗原結合分子；または
- (g) 活性化血液凝固第XII因子と血液凝固第IX因子の両方を認識する二重特異性抗原結合分子。

10

〔 2 〕 二重特異性抗体である、〔 1 〕記載の二重特異性抗原結合分子。

〔 3 〕 〔 1 〕または〔 2 〕に記載の抗原結合分子および薬学的に許容される担体を含む、組成物。

〔 4 〕 出血、出血を伴う疾患、もしくは出血に起因する疾患の予防および/または治療に用いられる医薬組成物である、〔 3 〕に記載の組成物。

〔 5 〕 出血、出血を伴う疾患、もしくは出血に起因する疾患が、血液凝固第IX因子および/または活性化血液凝固第IX因子の活性の低下ないし欠損によって発症および/または進展する疾患である、〔 4 〕に記載の組成物。

20

〔 6 〕 血液凝固第IX因子および/または活性化血液凝固第IX因子の活性の低下ないし欠損によって発症および/または進展する疾患が、血友病Bである、〔 5 〕に記載の組成物。

〔 7 〕 血液凝固第IX因子および/または活性化血液凝固第IX因子の活性の低下ないし欠損によって発症および/または進展する疾患が、血液凝固第IX因子および/または活性化血液凝固第IX因子に対するインヒビターが出現している疾患である、〔 5 〕に記載の組成物。

〔 8 〕 出血、出血を伴う疾患、もしくは出血に起因する疾患が、血液凝固第VIII因子および/または活性化血液凝固第VIII因子の活性の低下ないし欠損によって発症および/または進展する疾患である、〔 4 〕に記載の組成物。

30

〔 9 〕 血液凝固第VIII因子および/または活性化血液凝固第VIII因子の活性の低下ないし欠損によって発症および/または進展する疾患が、血友病A、後天性血友病、またはフォンビルブランド病である、〔 8 〕に記載の組成物。

〔 10 〕 血液凝固第VIII因子および/または活性化血液凝固第VIII因子の活性の低下ないし欠損によって発症および/または進展する疾患が、血液凝固第VIII因子および/または活性化血液凝固第VIII因子に対するインヒビターが出現している疾患である、〔 8 〕に記載の組成物。

〔 11 〕 出血、出血を伴う疾患、もしくは出血に起因する疾患が、血液凝固第XI因子および/または活性化血液凝固第XI因子の活性の低下ないし欠損によって発症および/または進展する疾患である、〔 4 〕に記載の組成物。

40

〔 12 〕 血液凝固第XI因子および/または活性化血液凝固第XI因子の活性の低下ないし欠損によって発症および/または進展する疾患が、血友病Cである、〔 11 〕に記載の組成物。

〔 13 〕 血液凝固第XI因子および/または活性化血液凝固第XI因子の活性の低下ないし欠損によって発症および/または進展する疾患が、血液凝固第XI因子および/または活性化血液凝固第XI因子に対するインヒビターが出現している疾患である、〔 11 〕に記載の組成物。

〔 14 〕 〔 1 〕または〔 2 〕の二重特異性抗原結合分子の、〔 3 〕～〔 13 〕のいずれかに記載した組成物の製造のための使用。

〔 15 〕 少なくとも〔 1 〕もしくは〔 2 〕に記載の二重特異性抗原結合分子、または〔 3

50

に記載の組成物を含む、出血、出血を伴う疾患、もしくは出血に起因する疾患を予防および/または治療する方法に用いるためのキット。

〔16〕少なくとも〔1〕もしくは〔2〕に記載の二重特異性抗原結合分子、または〔3〕に記載の組成物を含み、かつ血液凝固第IX因子を含む、出血、出血を伴う疾患、もしくは出血に起因する疾患を、血液凝固第IX因子と併用して、予防および/または治療する方法に用いるためのキット。

〔17〕少なくとも〔1〕もしくは〔2〕に記載の二重特異性抗原結合分子、または〔3〕に記載の組成物を含み、かつ血液凝固第VIII因子を含む、出血、出血を伴う疾患、もしくは出血に起因する疾患を、血液凝固第VIII因子と併用して、予防および/または治療する方法に用いるためのキット。

10

〔18〕少なくとも〔1〕もしくは〔2〕に記載の二重特異性抗原結合分子、または〔3〕に記載の組成物を含み、かつ血液凝固第XI因子を含む、出血、出血を伴う疾患、もしくは出血に起因する疾患を、血液凝固第XI因子と併用して、予防および/または治療する方法に用いるためのキット。

〔19〕少なくとも〔1〕もしくは〔2〕に記載の二重特異性抗原結合分子、または〔3〕に記載の組成物を含み、かつ出血、出血を伴う疾患、もしくは出血に起因する疾患を、バイパス製剤と併用して、予防および/または治療する方法に用いるためのキット。

〔20〕活性化血液凝固第XI因子と血液凝固第X因子の両方を認識する二重特異性抗原結合分子を用いて血液凝固を促進する方法。

〔21〕出血、出血を伴う疾患、もしくは出血に起因する疾患の予防および/または治療に有効な物質のスクリーニング方法であって、

20

(1) 試験物質と活性化血液凝固第XI因子との結合を評価する工程、および

(2) 試験物質と血液凝固第X因子との結合を評価する工程

を含む、スクリーニング方法。

〔22〕さらに以下の工程を含む、〔21〕に記載のスクリーニング方法

(3) 試験物質を用いて活性化血液凝固第XI因子による血液凝固第X因子の活性化反応を評価する工程。

〔23〕出血、出血を伴う疾患、もしくは出血に起因する疾患の予防および/または治療に有効な物質もしくは組成物の品質試験方法であって、

(1) 試験物質と活性化血液凝固第XI因子との結合を評価する工程、および

(2) 試験物質と血液凝固第X因子との結合を評価する工程

を含む、品質試験方法。

30

〔24〕さらに以下の工程を含む、〔23〕に記載の品質試験方法：

(3) 試験物質を用いて活性化血液凝固第XI因子による血液凝固第X因子の活性化反応を評価する工程。

〔25〕〔1〕に記載の二重特異性抗原結合分子または〔2〕に記載の二重特異性抗体をコードする核酸。

〔26〕〔25〕に記載の核酸が挿入されたベクター。

〔27〕〔25〕に記載の核酸または〔26〕に記載のベクターを含む細胞。

〔28〕〔27〕に記載の細胞を培養することにより、〔1〕に記載の二重特異性抗原結合分子または〔2〕に記載の二重特異性抗体を製造する方法。

40

〔29〕以下の(h)~(g)のいずれかに記載の二重特異性抗原結合分子：

(h) 活性化血液凝固第XI因子と血液凝固第X因子の両方を認識する二重特異性抗原結合分子であって、血液凝固第X因子を活性化する二重特異性抗原結合分子；

(i) 活性化血液凝固第X因子と血液凝固第X因子の両方を認識する二重特異性抗原結合分子であって、血液凝固第X因子を活性化する二重特異性抗原結合分子；

(j) 活性化血液凝固第VII因子と血液凝固第X因子の両方を認識する二重特異性抗原結合分子であって、血液凝固第X因子を活性化する二重特異性抗原結合分子；

(k) 活性化血液凝固第VII因子-Tissue Factor complexと血液凝固第X因子の両方を認識する二重特異性抗原結合分子であって、血液凝固第X因子を活性化する二重特異性抗原

50



結合分子；

(l)活性化血液凝固第XII因子と血液凝固第X因子の両方を認識する二重特異性抗原結合分子であって、血液凝固第X因子を活性化する二重特異性抗原結合分子；

(m)Thrombinと血液凝固第X因子の両方を認識する二重特異性抗原結合分子であって、血液凝固第X因子を活性化する二重特異性抗原結合分子；または

(n)活性化血液凝固第XII因子と血液凝固第IX因子の両方を認識する二重特異性抗原結合分子であって、血液凝固第IX因子を活性化する二重特異性抗原結合分子。

〔30〕二重特異性抗体である、〔29〕記載の二重特異性抗原結合分子。

〔31〕〔29〕または〔30〕に記載の抗原結合分子および薬学的に許容される担体を含む、組成物。

〔32〕出血、出血を伴う疾患、もしくは出血に起因する疾患の予防および/または治療に用いられる医薬組成物である、〔31〕に記載の組成物。

〔33〕出血、出血を伴う疾患、もしくは出血に起因する疾患が、血液凝固第IX因子および/または活性化血液凝固第IX因子の活性の低下ないし欠損によって発症および/または進展する疾患である、〔32〕に記載の組成物。

〔34〕血液凝固第IX因子および/または活性化血液凝固第IX因子の活性の低下ないし欠損によって発症および/または進展する疾患が、血友病Bである、〔33〕に記載の組成物。

〔35〕血液凝固第IX因子および/または活性化血液凝固第IX因子の活性の低下ないし欠損によって発症および/または進展する疾患が、血液凝固第IX因子および/または活性化血液凝固第IX因子に対するインヒビターが出現している疾患である、〔33〕に記載の組成物。

〔36〕出血、出血を伴う疾患、もしくは出血に起因する疾患が、血液凝固第VIII因子および/または活性化血液凝固第VIII因子の活性の低下ないし欠損によって発症および/または進展する疾患である、〔32〕に記載の組成物。

〔37〕血液凝固第VIII因子および/または活性化血液凝固第VIII因子の活性の低下ないし欠損によって発症および/または進展する疾患が、血友病A、後天性血友病、またはフォンビルブランド病である、〔36〕に記載の組成物。

〔38〕血液凝固第VIII因子および/または活性化血液凝固第VIII因子の活性の低下ないし欠損によって発症および/または進展する疾患が、血液凝固第VIII因子および/または活性化血液凝固第VIII因子に対するインヒビターが出現している疾患である、〔36〕に記載の組成物。

〔39〕出血、出血を伴う疾患、もしくは出血に起因する疾患が、血液凝固第XI因子および/または活性化血液凝固第XI因子の活性の低下ないし欠損によって発症および/または進展する疾患である、〔32〕に記載の組成物。

〔40〕血液凝固第XI因子および/または活性化血液凝固第XI因子の活性の低下ないし欠損によって発症および/または進展する疾患が、血友病Cである、〔39〕に記載の組成物。

〔41〕血液凝固第XI因子および/または活性化血液凝固第XI因子の活性の低下ないし欠損によって発症および/または進展する疾患が、血液凝固第XI因子および/または活性化血液凝固第XI因子に対するインヒビターが出現している疾患である、〔39〕に記載の組成物。

〔42〕〔29〕または〔30〕の二重特異性抗原結合分子の、〔31〕～〔41〕のいずれかに記載した組成物の製造のための使用。

〔43〕少なくとも〔29〕もしくは〔30〕に記載の二重特異性抗原結合分子、または〔31〕に記載の組成物を含む、出血、出血を伴う疾患、もしくは出血に起因する疾患を予防および/または治療する方法に用いるためのキット。

〔44〕少なくとも〔29〕もしくは〔30〕に記載の二重特異性抗原結合分子、または〔31〕に記載の組成物を含み、かつ血液凝固第IX因子を含む、出血、出血を伴う疾患、もしくは出血に起因する疾患を、血液凝固第IX因子と併用して、予防および/または治

10

20

30

40

50

療する方法に用いるためのキット。

〔 4 5 〕 少なくとも〔 2 9 〕もしくは〔 3 0 〕に記載の二重特異性抗原結合分子、または〔 3 1 〕に記載の組成物を含み、かつ血液凝固第VIII因子を含む、出血、出血を伴う疾患、もしくは出血に起因する疾患を、血液凝固第VIII因子と併用して、予防および/または治療する方法に用いるためのキット。

〔 4 6 〕 少なくとも〔 2 9 〕もしくは〔 3 0 〕に記載の二重特異性抗原結合分子、または〔 3 1 〕に記載の組成物を含み、かつ血液凝固第XI因子を含む、出血、出血を伴う疾患、もしくは出血に起因する疾患を、血液凝固第XI因子と併用して、予防および/または治療する方法に用いるためのキット。

〔 4 7 〕 少なくとも〔 2 9 〕もしくは〔 3 0 〕に記載の二重特異性抗原結合分子、または〔 3 1 〕に記載の組成物を含み、かつ出血、出血を伴う疾患、もしくは出血に起因する疾患を、バイパス製剤と併用して、予防および/または治療する方法に用いるためのキット

。〔 4 8 〕 活性化血液凝固第XI因子と血液凝固第X因子の両方を認識する二重特異性抗原結合分子を用いて血液凝固を促進する方法。

〔 4 9 〕 出血、出血を伴う疾患、もしくは出血に起因する疾患の予防および/または治療に有効な物質のスクリーニング方法であって、

( 1 ) 試験物質と活性化血液凝固第XI因子との結合を評価する工程、および

( 2 ) 試験物質と血液凝固第X因子との結合を評価する工程

を含む、スクリーニング方法。

〔 5 0 〕 さらに以下の工程を含む、〔 4 9 〕に記載のスクリーニング方法

( 3 ) 試験物質を用いて活性化血液凝固第XI因子による血液凝固第X因子の活性化反応を評価する工程。

〔 5 1 〕 出血、出血を伴う疾患、もしくは出血に起因する疾患の予防および/または治療に有効な物質もしくは組成物の品質試験方法であって、

( 1 ) 試験物質と活性化血液凝固第XI因子との結合を評価する工程、および

( 2 ) 試験物質と血液凝固第X因子との結合を評価する工程

を含む、品質試験方法。

〔 5 2 〕 さらに以下の工程を含む、〔 5 1 〕に記載の品質試験方法：

( 3 ) 試験物質を用いて活性化血液凝固第XI因子による血液凝固第X因子の活性化反応を評価する工程。

〔 5 3 〕 〔 2 9 〕に記載の二重特異性抗原結合分子または〔 3 0 〕に記載の二重特異性抗体をコードする核酸。

〔 5 4 〕 〔 5 3 〕に記載の核酸が挿入されたベクター。

〔 5 5 〕 〔 5 3 〕に記載の核酸または〔 5 4 〕に記載のベクターを含む細胞。

〔 5 6 〕 〔 5 5 〕に記載の細胞を培養することにより、〔 2 9 〕に記載の二重特異性抗原結合分子または〔 3 0 〕に記載の二重特異性抗体を製造する方法。

【発明の効果】

【 0 0 1 4 〕

非限定的な一態様において、本開示の二重特異性抗原結合分子、組成物、およびキットは、血液凝固の促進に寄与し、ひいては出血、出血を伴う疾患、もしくは出血に起因する疾患の予防および/または治療に有用であり得る。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 5 〕

【図 1】本発明の基本コンセプトを図示した。ペプチド性補因子が生体に存在しないような関係性である酵素Aと基質Bはそのままでは反応がほとんど進行しない(上図)。しかし、該酵素Aと基質Bを認識するような二重特異性抗原結合分子を添加することで、酵素Aによる基質Bの加水分解反応などの酵素反応を促進することが出来る(下図)。

【図 2】血液凝固カスケードの模式図(内因系・外因系)を示した。

【図 3】In vitro酵素反応系における、抗F.XIa、F.X二重特異性抗体の、F.XIaによる

F.X活性化促進活性の測定結果を示した。作製した抗F.XIa、F.X二重特異性抗体は、F.XIaによるF.X活性化促進活性を示した。

【図4】F.IX欠乏血漿における凝固時間（APTT）を示した。作製した抗F.XIa、F.X二重特異性抗体は同血漿の凝固促進活性を示した。

【発明を実施するための形態】

【0016】

I. 定義

本明細書で用語「抗原結合分子」は、その最も広い意味において、抗原決定基（エピトープ）に特異的に結合する分子を指す。一態様において、抗原結合分子は、抗体、抗体断片、または抗体誘導体である。一態様において、抗原結合分子は、非抗体タンパク質、またはその断片、もしくはその誘導体である。 10

【0017】

本発明における二重特異性抗原結合分子は、異なる抗原またはエピトープに対して特異性を有する2種類の抗原結合ドメインを含む抗原結合分子である。一態様において、本発明における二重特異性抗原結合分子は二重特異性抗体である。二重特異性抗体は特に制限されないが、モノクローナル抗体であることが好ましい。

【0018】

本明細書において「抗原結合ドメイン」とは、抗原の一部または全部に特異的に結合し且つ相補的である領域をいう。本明細書において、抗原結合分子は抗原結合ドメインを含んで成る。抗原の分子量が大きい場合、抗原結合ドメインは抗原の特定部分にのみ結合することができる。当該特定部分はエピトープと呼ばれる。一態様において、抗原結合ドメインは特定の抗原に結合する抗体断片を含む。抗原結合ドメインは一または複数の抗体の可変ドメインより提供され得る。非限定的な一態様において、抗原結合ドメインは抗体軽鎖可変領域（VL）と抗体重鎖可変領域（VH）とを含む。こうした抗原結合ドメインの例としては、「scFv（single chain Fv）」、「単鎖抗体（single chain antibody）」、「Fv」、「scFv2（single chain Fv 2）」、「Fab」または「Fab'」等が挙げられる。別の態様において、抗原結合ドメインは特定の抗原に結合する非抗体タンパク質またはその断片を含む。特定の態様において、抗原結合ドメインはヒンジ領域を含む。 20

【0019】

本明細書において「特異的に結合する」とは、特異的に結合する分子の一方の分子がその一または複数の結合する相手方の分子以外の分子に対しては何ら有意な結合を示さない状態で結合することをいう。また、抗原結合ドメインが、ある抗原中に含まれる複数のエピトープのうち特定のエピトープに対して特異的である場合にも用いられる。また、抗原結合ドメインが結合するエピトープが複数の異なる抗原に含まれる場合には、当該抗原結合ドメインを有する抗原結合分子は当該エピトープを含む様々な抗原と結合することができる。 30

【0020】

本明細書で用語「抗体」は、最も広い意味で使用され、所望の抗原結合活性を示す限りは、これらに限定されるものではないが、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、抗体断片および抗体修飾物を含む、種々の抗体構造を包含する。 40

【0021】

「結合活性（binding activity）」は、分子（例えば、抗体）の1個またはそれ以上の結合部位と、分子の結合パートナー（例えば、抗原）との間の、非共有結合的な相互作用の合計の強度のことをいう。ここで、結合活性は、ある結合対のメンバー（例えば、抗体と抗原）の間の1：1相互作用に厳密に限定されない。例えば、結合対のメンバーが1価での1：1相互作用を反映する場合、結合活性は固有の結合アフィニティ（「アフィニティ」）のことをいう。結合対のメンバーが、1価での結合および多価での結合の両方が可能である場合、結合活性は、これらの結合力の総和となる。分子XのそのパートナーYに対する結合活性は、一般的に、解離定数（KD）または「単位リガンド量当たりのアナ 50

ライト結合量」により表すことができる。結合活性は、本明細書に記載のものを含む、当該技術分野において知られた通常の方法によって測定され得る。

【0022】

本明細書でいう用語「モノクローナル抗体」は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体のことをいう。すなわち、その集団を構成する個々の抗体は、生じ得る変異抗体（例えば、自然に生じる変異を含む変異抗体、またはモノクローナル抗体調製物の製造中に発生する変異抗体。そのような変異体は通常若干量存在している。）を除いて、同一でありおよび/または同じエピトープに結合する。異なる決定基（エピトープ）に対する異なる抗体を典型的に含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物の各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対するものである。したがって、修飾語「モノクローナル」は、実質的に均一な抗体の集団から得られるものである、という抗体の特徴を示し、何らかの特定の方法による抗体の製造を求めるものと解釈されるべきではない。例えば、本発明にしたがって用いられるモノクローナル抗体は、これらに限定されるものではないが、ハイブリドーマ法、組換えDNA法、ファージディスプレイ法、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の全部または一部を含んだトランスジェニック動物を利用する方法を含む、様々な手法によって作成されてよく、モノクローナル抗体を作製するためのそのような方法および他の例示的な方法は、本明細書に記載されている。

10

【0023】

「天然型抗体」は、天然に生じる様々な構造を伴う免疫グロブリン分子のことをいう。例えば、天然型IgG抗体は、ジスルフィド結合している2つの同一の軽鎖と2つの同一の重鎖から構成される約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。N末端からC末端に向かって、各重鎖は、可変重鎖ドメインまたは重鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（VH）を有し、それに3つの定常ドメイン（CH1、CH2、およびCH3）が続く。同様に、N末端からC末端に向かって、各軽鎖は、可変軽鎖ドメインまたは軽鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（VL）を有し、それに定常軽鎖（CL）ドメインが続く。抗体の軽鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ（ $\kappa$ ）およびラムダ（ $\lambda$ ）と呼ばれる、2つのタイプの1つに帰属させられてよい。

20

【0024】

用語「キメラ」抗体は、重鎖および/または軽鎖の一部が特定の供給源または種に由来する一方で、重鎖および/または軽鎖の残りの部分が異なった供給源または種に由来する抗体のことをいう。

30

【0025】

抗体の「クラス」は、抗体の重鎖に備わる定常ドメインまたは定常領域のタイプのことをいう。抗体には5つの主要なクラスがある：IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgMである。そして、このうちいくつかはさらにサブクラス（アイソタイプ）に分けられてもよい。例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、およびIgA2である。異なるクラスの免疫グロブリンに対応する重鎖定常ドメインを、それぞれ、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\mu$ 、および $\lambda$ と呼ぶ。

【0026】

本発明の一つの実施態様としての定常領域とは、好ましくは抗体定常領域であり、より好ましくはIgG1、IgG2、IgG3、IgG4型の抗体定常領域であり、さらにより好ましくはヒトIgG1、IgG2、IgG3、IgG4型の抗体定常領域である。また本発明の別の一つの実施態様としての定常領域とは、好ましくは重鎖定常領域であり、より好ましくはIgG1、IgG2、IgG3、IgG4型の重鎖定常領域であり、さらにより好ましくはヒトIgG1、IgG2、IgG3、IgG4型の重鎖定常領域である。ヒトIgG1定常領域、ヒトIgG2定常領域、ヒトIgG3定常領域およびヒトIgG4定常領域のアミノ酸配列は公知である。ヒトIgG1、ヒトIgG2、ヒトIgG3、ヒトIgG4抗体の定常領域としては、遺伝子多型による複数のアロタイプ配列がSequences of proteins of immunological interest, NIH Publication No.91-3242に記載されているが、本発明においてはそのいずれであっても良い。なお本発明のアミノ酸が改変された定常領域は、本発明のアミノ酸変異を含むものであ

40

50

る限り、他のアミノ酸変異や修飾を含んでもよい。

【0027】

「ヒンジ領域」という用語は、野生型抗体重鎖においてCH1ドメインおよびCH2ドメインを連結する、例えばEUナンバリングシステムによれば216位あたりから230位あたりまでの、またはKabatナンバリングシステムによれば226位あたりから243位あたりまでの、抗体重鎖ポリペプチド部分を意味する。天然型IgG抗体において、ヒンジ領域におけるEUナンバリング220位のシステイン残基は、抗体軽鎖における214位のシステイン残基とジスルフィド結合を形成することが知られている。さらに、2つの抗体重鎖の間では、ヒンジ領域におけるEUナンバリング226位のシステイン残基どうし、および229位のシステイン残基どうしがジスルフィド結合を形成することが知られている。本明細書におけるヒンジ領域は、野生型のほか、野生型においてアミノ酸残基の置換、付加、または欠失させた改変体も包含する。

【0028】

本明細書で用語「Fc領域」は、少なくとも定常領域の一部を含む免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するために用いられる。この用語は、天然型配列のFc領域および変異体Fc領域を含む。一態様において、ヒトIgG重鎖Fc領域はCys226から、またはPro230から、重鎖のカルボキシル末端まで延びる。ただし、Fc領域のC末端のリジン (Lys447) またはグリシン リジン (Gly446-Lys447) は、存在していてもしていなくてもよい。本明細書では別段特定しない限り、Fc領域または定常領域中のアミノ酸残基の番号付けは、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD 1991 に記載の、EUナンバリングシステム (EUインデックスとも呼ばれる) にしたがう。

【0029】

用語「可変領域」または「可変ドメイン」は、抗体を抗原へと結合させることに関与する、抗体の重鎖または軽鎖のドメインのことをいう。天然型抗体の重鎖および軽鎖の可変ドメイン (それぞれVHおよびVL) は、通常、各ドメインが4つの保存されたフレームワーク領域 (FR) および3つの超可変領域 (HVR) を含む、類似の構造を有する。(例えば、Kindt et al. Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007) 参照。) 1つのVHまたはVLドメインで、抗原結合特異性を与えるに充分である。さらに、ある特定の抗原に結合する抗体は、当該抗原に結合する抗体からのVHまたはVLドメインを使ってそれぞれVLまたはVHドメインの相補的ライブラリをスクリーニングして、単離されてもよい。例えばPortolano et al., J. Immunol. 150:880-887 (1993); Clarkson et al., Nature 352:624-628 (1991) 参照。

【0030】

本明細書で用いられる用語「超可変領域」または「HVR」は、配列において超可変であり (「相補性決定領域」または「CDR」(complementarity determining region))、および/または構造的に定まったループ (「超可変ループ」) を形成し、および/または抗原接触残基 (「抗原接触」) を含む、抗体の可変ドメインの各領域のことをいう。通常、抗体は6つのHVRを含む: VHに3つ (H1、H2、H3)、およびVLに3つ (L1、L2、L3) である。本明細書での例示的なHVRは、以下のものを含む:

(a) アミノ酸残基26-32 (L1)、50-52 (L2)、91-96 (L3)、26-32 (H1)、53-55 (H2)、および96-101 (H3)のところで生じる超可変ループ (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987));

(b) アミノ酸残基24-34 (L1)、50-56 (L2)、89-97 (L3)、31-35b (H1)、50-65 (H2)、および95-102 (H3)のところで生じるCDR (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991));

(c) アミノ酸残基27c-36 (L1)、46-55 (L2)、89-96 (L3)、30-35b (H1)、47-58 (H2)、および93-101 (H3) のところで生じる抗原接触 (MacCallum et al. J.

10

20

30

40

50

Mol. Biol. 262: 732-745 (1996)); ならびに、

(d) HVRアミノ酸残基46-56 (L2)、47-56 (L2)、48-56 (L2)、49-56 (L2)、26-35 (H1)、26-35b (H1)、49-65 (H2)、93-102 (H3)、および94-102 (H3)を含む、(a)、(b)、および/または(c)の組合せ。

別段示さない限り、HVR残基および可変ドメイン中の他の残基(例えば、FR残基)は、本明細書では上記のKabatらにしたがって番号付けされる。

【0031】

「フレームワーク」または「FR」は、超可変領域(HVR)残基以外の、可変ドメイン残基のことをいう。可変ドメインのFRは、通常4つのFRドメイン:FR1、FR2、FR3、およびFR4からなる。それに応じて、HVRおよびFRの配列は、通常次の順序でVH(またはVL)に現れる:FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

10

【0032】

用語「全長抗体」、「完全抗体」、および「全部抗体」は、本明細書では相互に交換可能に用いられ、天然型抗体構造に実質的に類似した構造を有する、または本明細書で定義するFc領域を含む重鎖を有する抗体のことをいう。

【0033】

用語「宿主細胞」、「宿主細胞株」、および「宿主細胞培養物」は、相互に交換可能に用いられ、外来核酸を導入された細胞(そのような細胞の子孫を含む)のことをいう。宿主細胞は「形質転換体」および「形質転換細胞」を含み、これには初代の形質転換細胞および継代数によらずその細胞に由来する子孫を含む。子孫は、親細胞と核酸の内容において完全に同一でなくてもよく、変異を含んでいてもよい。オリジナルの形質転換細胞がスクリーニングされたまたは選択された際に用いられたものと同じ機能または生物学的活性を有する変異体子孫も、本明細書では含まれる。

20

【0034】

本明細書で用いられる用語「ベクター」は、それが連結されたもう1つの核酸を増やすことができる、核酸分子のことをいう。この用語は、自己複製核酸構造としてのベクター、および、それが導入された宿主細胞のゲノム中に組み入れられるベクターを含む。あるベクターは、自身が動作的に連結された核酸の、発現をもたらすことができる。そのようなベクターは、本明細書では「発現ベクター」とも称される。

【0035】

「ヒト抗体」は、ヒトもしくはヒト細胞によって産生された抗体またはヒト抗体レパートリーもしくは他のヒト抗体コード配列を用いる非ヒト供給源に由来する抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を備える抗体である。このヒト抗体の定義は、非ヒトの抗原結合残基を含むヒト化抗体を、明確に除外するものである。

30

【0036】

「ヒト化」抗体は、非ヒトHVRからのアミノ酸残基およびヒトFRからのアミノ酸残基を含む、キメラ抗体のことをいう。ある態様では、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的にすべてを含み、当該可変領域においては、すべてのもしくは実質的にすべてのHVR(例えばCDR)は非ヒト抗体のものに対応し、かつ、すべてのもしくは実質的にすべてのFRはヒト抗体のものに対応する。ヒト化抗体は、任意で、ヒト抗体に由来する抗体定常領域の少なくとも一部分を含んでもよい。抗体(例えば、非ヒト抗体)の「ヒト化された形態」は、ヒト化を経た抗体のことをいう。

40

【0037】

一態様において、抗原結合分子は、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型抗原結合分子である。(例えば、Borrebæck CAK and Larrick JW, THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990 参照)。組換え型抗原結合分子は、それをコードするDNAをハイブリドーマ、または抗原結合分子を産生する感作リンパ球等の抗原結合分子産生細胞からクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることにより得ることができる。

50

## 【0038】

さらに、抗原結合分子は、抗体に限定されず、アプタマーであってよい。抗原結合分子が抗体断片である場合における抗体断片としては、ダイアボディ(diabody; Db)、線状抗体、VHH(variable domain of heavy chain of heavy chain antibody)、一本鎖抗体(以下、scFvとも記載する)分子などが含まれる。ここで、「Fv」断片は最小の抗体断片であり、完全な抗原認識部位と結合部位を含む。「Fv」断片は1つの重(H)鎖可変領域(V<sub>H</sub>)および軽(L)鎖可変領域(V<sub>L</sub>)が非共有結合により強く連結されたダイマー(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>ダイマー)である。各可変領域の3つの相補鎖決定領域(complementarity determining region; CDR)が相互作用し、V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>ダイマーの表面に抗原結合部位を形成する。6つのCDRが抗体に抗原結合部位を付与している。しかしながら、1つの可変領域(または、抗原に特異的な3つのCDRのみを含むFvの半分)であっても、全結合部位よりも親和性は低いが、抗原を認識し、結合する能力を有する。

10

## 【0039】

また、Fab断片(F(ab)とも呼ばれる)はさらに、L鎖の定常領域およびH鎖の定常領域(CH1)を含む。Fab'断片は、抗体のヒンジ領域からの1またはそれ以上のシステインを含むH鎖CH1領域のカルボキシ末端由来の数残基を付加的に有する点でFab断片と異なっている。Fab'-SHとは、定常領域の1またはそれ以上のシステイン残基が遊離のチオール基を有するFab'を示すものである。F(ab')断片は、F(ab')<sub>2</sub>ペプシン消化物のヒンジ部のシステインにおけるジスルフィド結合の切断により製造される。化学的に結合されたその他の抗体断片も当業者には知られている。

20

## 【0040】

ダイアボディは、遺伝子融合により構築された二価(bivalent)の抗体断片を指す(Holiger P et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90: 6444-6448 (1993)、EP404,097号、WO93/11161号等)。ダイアボディは、2本のポリペプチド鎖から構成されるダイマーであり、ポリペプチド鎖は各々、同じ鎖中でL鎖可変領域(V<sub>L</sub>)及びH鎖可変領域(V<sub>H</sub>)が、互いに結合できない位に短い、例えば、5残基程度のリンカーにより結合されている。同一ポリペプチド鎖上にコードされるV<sub>L</sub>とV<sub>H</sub>とは、その間のリンカーが短いため単鎖可変領域フラグメントを形成することが出来ず二量体を形成するため、ダイアボディは2つの抗原結合部位を有することとなる。

## 【0041】

一本鎖抗体またはscFv抗体断片には、抗体のV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>領域が含まれ、これらの領域は単一のポリペプチド鎖中に存在する。一般に、FvポリペプチドはさらにV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>領域の間にポリペプチドリッカーを含んでおり、これによりscFvは、抗原結合のために必要な構造を形成することができる(scFvの総説については、Pluckthun『The Pharmacology of Monoclonal Antibodies』Vol.113 (Rosenburg and Moore ed (Springer Verlag, New York) pp.269-315, 1994)を参照)。本発明におけるリンカーは、その両端に連結された抗体可変領域の発現を阻害するものでなければ特に制限されない。

30

## 【0042】

IgGタイプ二重特異性抗体はIgG抗体を産生するハイブリドーマ二種を融合することによって生じるhybrid hybridoma(quadroma)によって分泌させることが出来る(Milstein C et al. Nature 1983, 305: 537-540)。また目的の二種のIgGを構成するL鎖及びH鎖の遺伝子、合計4種の遺伝子を細胞に導入することによって共発現させることによって分泌させることが出来る。

40

## 【0043】

しかし、これらの方法で産生されるIgGのH鎖とL鎖の組合せは理論上10通りにもなる。10種類のIgGから目的の組み合わせのH鎖L鎖からなるIgGを精製することは困難である。さらに目的の組み合わせのものの分泌量も理論上著しく低下するため、大きな培養規模が必要になり、製造上のコストはさらに増大する。

## 【0044】

50

この際H鎖のCH3領域に適当なアミノ酸置換を施すことによってH鎖についてヘテロな組合せのIgGを優先的に分泌させることも出来る (Ridgway JB et al. Protein Engineering 1996, 9: 617-621、Merchant AM et al. Nature Biotechnology 1998, 16: 677-681)。

【0045】

また、L鎖に関しては、H鎖可変領域に比べてL鎖可変領域の多様性が低いことから、両H鎖に結合能を与え得る共通のL鎖が得られることが期待される。この共通L鎖と両H鎖遺伝子を細胞に導入することによってIgGを発現させることで効率の良い二重特異性IgGの発現が可能となる (Nature Biotechnology. 1998, 16, 677-681)。しかし任意に2種の抗体を選んだ場合、同じL鎖を含む可能性は低く上記のアイデアを実行することは困難であり、任意の異なるH鎖に対応し高い結合能を示す共通L鎖を選択する方法も提案されている (WO2004/065611)。上記変異 (Nature Biotechnology. 1998, 16, 677-681) CH3を有するH鎖は、相手側のH鎖が存在しない場合ほとんど分泌されない。この特徴を利用してまず右腕のL鎖とH鎖を誘導発現させ、これを止めた後、左腕のL鎖とH鎖を誘導発現させることによって目的の組み合わせのIgGの発現比率を高めることが出来る (PCT/JP2004/008585)。

10

Fab' を化学的に架橋することによっても二重特異性抗原結合分子を作製し得る。例えば一方の抗体から調製したFab' をo-PDM(ortho-phenylenedi-maleimide)にてマレイミド化し、これともう一方の抗体から調製したFab' を反応させることにより、異なる抗体由来Fab' 同士を架橋させ二重特異性 F(ab')<sub>2</sub>を作製することが出来る (Keler T et al. Cancer Research 1997, 57: 4008-4014)。またFab' -チオニトロ安息香酸(TNB)誘導体とFab' -チオール(SH)等の抗体断片を化学的に結合する方法も知られている (Brennan M et al. Science 1985, 229: 81-83)。

20

【0046】

化学架橋の代わりにFos, Junなどに由来するロイシンジッパーを用いることも出来る。Fos, Junはホモダイマーも形成するが、ヘテロダイマーを優先的に形成することを利用する。Fosロイシンジッパーを付加したFab' とJunのそれを付加したもう一方のFab' を発現調製する。温和な条件で還元した単量体Fab' -Fos, Fab' -Junを混合し反応させることによって二重特異性 F(ab')<sub>2</sub>が形成できる (Kostelny SA et al. J of Immunology, 1992, 148: 1547-53)。この方法はFab' には限定されず、scFv, Fvなどにおいても応用可能である。

30

【0047】

ダイアボディにおいても二重特異性抗原結合分子を作製し得る。二重特異性ダイアボディは二つのcross-over scFv断片のヘテロダイマーである。つまり二種の抗体A,B由来のV<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>を5残基前後の比較的短いリンカーで結ぶことによって作製されたV<sub>H</sub>(A)-V<sub>L</sub>(B), V<sub>H</sub>(B)-V<sub>L</sub>(A)を用いてヘテロダイマーを構成することによって出来る (Holliger P et al. Proc of the National Academy of Sciences of the USA 1993, 90: 6444-6448)。

【0048】

この際、二種のscFvを15残基程度の柔軟な比較的長いリンカーで結ぶ(一本鎖ダイアボディ: Kipriyanov SM et al. J of Molecular Biology. 1999, 293: 41-56)、適当なアミノ酸置換(knobs-into-holes: Zhu Z et al. Protein Science. 1997, 6: 781-788)を行うことによって目的の構成を促進させることも出来る。

40

【0049】

二種のscFvを15残基程度の柔軟な比較的長いリンカーで結ぶことによって作製できるsc(Fv)<sub>2</sub>も二重特異性抗原結合分子となり得る (Mallender WD et al. J of Biological Chemistry, 1994, 269: 199-206)。

【0050】

抗体修飾物としては、例えば、ポリエチレングリコール(PEG)等の各種分子と結合した抗体を挙げることができる。本発明の抗体修飾物においては、結合される物質は限定

50



されない。このような抗体修飾物を得るには、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。これらの方法はこの分野において既に確立されている。

【0051】

本発明の抗原結合分子は、ヒト抗体、マウス抗体、ラット抗体など、その由来は限定されない。またキメラ抗体やヒト化抗体などの遺伝子改変抗体でもよい。

【0052】

ヒト抗体の取得方法は既に知られており、例えば、ヒト抗体遺伝子の全てのレポーターを有するトランスジェニック動物を目的の抗原で免疫することで目的のヒト抗体を取得することができる（国際特許出願公開番号WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096, WO 96/33735参照）。

10

【0053】

遺伝子改変抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。具体的には、たとえばキメラ抗体は、免疫動物の抗体のH鎖、およびL鎖の可変領域と、ヒト抗体のH鎖およびL鎖の定常領域からなる抗体である。免疫動物由来の抗体の可変領域をコードするDNAを、ヒト抗体の定常領域をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることによって、キメラ抗体を得ることができる。

【0054】

ヒト化抗体は、再構成 (reshaped) ヒト抗体とも称される改変抗体である。ヒト化抗体は、免疫動物由来の抗体のCDRを、ヒト抗体の相補性決定領域へ移植することによって構築される。その一般的な遺伝子組換え手法も知られている。

20

【0055】

具体的には、マウス抗体のCDRとヒト抗体のフレームワーク領域 (framework region; FR) を連結するように設計したDNA配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドからPCR法により合成する。得られたDNAを、ヒト抗体定常領域をコードするDNAと連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることにより得られる（欧州特許出願公開番号EP 239400、国際特許出願公開番号WO 96/02576参照）。CDRを介して連結されるヒト抗体のFRは、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域におけるフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい (Sato K et al, Cancer Research 1993, 53: 851-856)。また、様々なヒト抗体由来のフレームワーク領域に置換してもよい（国際特許出願公開番号WO 99/51743参照）。

30

【0056】

一態様としては、酵素および該酵素の触媒反応を受け得る基質の両方を認識して該酵素が該基質を加水分解するが、血液凝固第V因子、血液凝固第VIII因子、組織因子(TF)、トロンボモデュリン(TM)、プロテインS(PS)、プロテインZ(PZ)補体C4b、補体制御タンパクH因子(complement regulatory Factor H)、membrane cofactor Protein(MCP)、complement receptor1(CR1)からなる群から選択される少なくとも一の補因子あるいはヘパリンの機能を代替しない二重特異性抗原結合分子が提供される。別の態様においては、酵素および該酵素の触媒反応を受け得る基質の両方を認識するが、天然に存在する血液凝固系補因子の機能を代替しない二重特異性抗原結合分子が提供される。これらの態様における、酵素は、生体で起こる化学反応に対する触媒活性を有する分子である限り、特に制限されない。酵素は、プロテアーゼ、アミラーゼ、セルラーゼ、リパーゼが例示される。プロテアーゼには、血液凝固系のセリンプロテアーゼが例示される。特定の態様において、酵素は血液凝固系酵素であり得る。血液凝固系酵素であるセリンプロテアーゼとして、例えばF.XII(a)、F.XI(a)、F.IX(a)、F.X(a)、F.VII(a)、F.IIIaが挙げられる。なお、F.XII(a)はF.XII及び/またはF.XIIaを意味し、他も同様である。

40

【0057】

本願でいう前記酵素の触媒反応を受け得る基質とは、強制的に近接させた場合に酵素の触媒反応が起こる基質を言う。酵素の触媒反応が起こることは、基質を加水分解させるこ

50

とを意味する。基質の加水分解は、本願の二重特異性抗原結合分子がない場合と比較して、基質が加水分解されていればよい。基質の加水分解反応は、例えばProtein Assay Kit II (Bio-Red)を用いて、Bradford法等によって二重特異性抗原結合分子添加後の継時的なタンパク質量の測定で比較できる。あるいは、二重特異性抗原結合分子の添加前後のタンパク質を用いたSDS-PAGE分析やウエスタン・ブロッティング(WB)によって測定できる。あるいは二重特異性抗原結合分子の添加前後のタンパク質の質量分析(MALDI-TOFMS等)を行うことやN末端アミノ酸配列分析(プロテインシーケンス)を行うことで測定できる。基質の加水分解は例えば、血液凝固第X因子または血液凝固第IX因子の活性化が挙げられる。基質の活性化は該酵素・該基質を含む反応系を用い、該抗原結合分子を加えることによる該酵素活性(基質分解能)の上昇を指標とすることができ、例えば該酵素、該基質、活性化された基質の合成基質、リン脂質、Ca<sup>2+</sup>から成る測定系で、該酵素による該基質活性化促進活性で評価できる。その結果を以って、該活性を有する二重特異性抗原結合分子として、原則本測定系で該酵素添加群のみ0.1以上の該酵素による該基質活性化促進活性を示したものを選択できる。なお、ここでいう該酵素による該基質活性化促進活性とは、抗原結合分子溶液の合成基質添加30分後の吸光度の値で測定することができる。

10

## 【0058】

酵素および基質が血液凝固線溶関連因子である態様における酵素(「血液凝固酵素」とも呼ぶ)、および基質(「血液凝固基質」とも呼ぶ)の具体例としては、例えば、以下の表1の組合せを挙げることができる。

20

## 【0059】

## 【表1】

	血液凝固酵素	血液凝固基質
a	活性化血液凝固第XI因子(F.XIa)	血液凝固第X因子(F.X)
b	活性化血液凝固第X因子(F.Xa)	血液凝固第X因子(F.X)
c	活性化血液凝固第VII因子(F.VIIa)	血液凝固第X因子(F.X)
d	活性化血液凝固第VII因子-Tissue Factor complex (F.VIIa-TF複合体:F.VIIaとTFとで形成された複合体)	血液凝固第X因子(F.X)
e	活性化血液凝固第XII因子(F.XIIa)	血液凝固第X因子(F.X)
f	Thrombin(F.IIa)	血液凝固第X因子(F.X)
g	活性化血液凝固第XII因子(F.XIIa)	血液凝固第IX因子(F.IX)

30

## 【0060】

二重特異性抗原結合分子を得る方法は特に制限されず、どのような方法で取得されてもよい。例えば、酵素A及び基質Bに対する二重特異性抗原結合分子を得る場合、酵素A、基質Bそれぞれを免疫動物に免疫し、抗酵素A抗体及び抗基質B抗体を取得する。その後、抗酵素A抗体のH鎖可変領域とL鎖可変領域及び抗基質B抗体のH鎖可変領域とL鎖可変領域を含む二重特異性抗原結合分子を作製する。ここで、抗酵素A抗体と抗基質B抗体はそれぞれ複数種得られていることが望ましく、これらを用いてなるべく多くの組合せの二重特異性抗原結合分子を作製することが好ましい。二重特異性抗原結合分子を作製後、基質Bを活性化させる抗原結合分子を選択する。

40

## 【0061】

酵素あるいは基質に対する抗原結合分子は、当業者に公知の方法により得ることができる。例えば、免疫動物に対して抗原を免疫することにより調製することができる。動物を免疫する抗原としては、免疫原性を有する完全抗原と、免疫原性を有さない不完全抗原(ハプテンを含む)が挙げられる。免疫に際しては、抗原結合分子が結合する酵素あるいは基質、もしくはそれらを発現する核酸を、上記抗原(免疫原)として使用する。免疫する

50

動物として、例えば、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、ニワトリまたはアカゲザル等を用いることができる。これら動物に対して、抗原を免疫することは、当業者においては、周知の方法によって行うことができる。好ましくは、免疫された動物または該動物の細胞から抗体のL鎖およびH鎖の可変領域の回収を行う。この操作は、当業者においては一般的に公知の技術を用いて行うことができる。抗原によって免疫された動物は、とりわけ脾臓細胞において該抗原に対する抗体を発現する。従って、例えば、免疫された動物の脾臓細胞からmRNAを調製し、該動物の可変領域に対応するプライマーを用いて、RT-PCRによりL鎖およびH鎖の可変領域の回収を行うことができる。

#### 【0062】

詳細には、動物に酵素、基質それぞれを免疫する。免疫原とする酵素、基質は、蛋白質全体、もしくは該蛋白質の部分ペプチドであってもよい。また、動物を免疫するのに用いる免疫原としては、場合により抗原となるものを他の分子に結合させ可溶性抗原とすることも可能であり、また、場合によりそれらの断片を用いてもよい。

#### 【0063】

免疫されたマウスの脾臓から脾細胞を単離し、マウスミエローマ細胞と融合し、ハイブリドーマを作製する。抗原に結合するハイブリドーマをそれぞれ選択し、可変領域に対応するプライマーなどを用いてRT-PCRにてL鎖、H鎖の可変領域を回収することが出来る。CDRに対応するプライマー、CDRよりも多様性の低いフレームワークに対応するプライマー、あるいはシグナル配列とCH1もしくはL鎖定常領域(C<sub>L</sub>)に対応するプライマーを用いることもできる。

あるいは、当業者公知の方法であるB細胞クローニング技術(Proc Natl Acad Sci U S A. 1996;93(15):7843-7848.; WO2008/045140; およびWO2009/113742)によって生成されうるが、これらに限定されない。

#### 【0064】

あるいは、免疫された動物の脾細胞からmRNAを抽出し、可変領域付近に対応するプライマーを用いてRT-PCRにてL鎖、H鎖可変領域のcDNAを回収する。また、in vitroにおいてリンパ球を免疫することもできる。これを用いてscFvもしくはFabを提示するライブラリーを構築する。パンニングによって抗原結合抗体クローンを濃縮・クローン化し、可変領域を得ることが出来る。この際、ヒトや免疫していない動物の末梢血単核球、脾臓、扁桃腺などに由来するmRNAを材料とする同様のライブラリーを用いてスクリーニングを行うことも可能である。

#### 【0065】

その可変領域を用いて抗原結合分子発現ベクターを作製する。抗酵素抗原結合分子発現ベクターと抗基質抗原結合分子発現ベクターを同一の細胞に導入し、抗原結合分子を発現させることにより二重特異性抗原結合分子を得ることができる。

#### 【0066】

本発明における抗原結合分子の選択は、例えば、以下のような方法により行うことができる。

(1) 該酵素・該基質を含む反応系を用い、該抗原結合分子を加えることによる該酵素活性(基質分解能)の上昇を指標とし、選択する。

(2) 該酵素・該基質・該補因子が関わる生体機能を測定するあるいは模倣する系(例えば、血漿凝固測定系)を用い、該酵素・該基質・該補因子のうち少なくとも1つの非存在条件下にて該抗原結合分子を加えることによる機能回復活性を指標とし、選択する。

#### 【0067】

得られた抗原結合分子は、均一にまで精製することができる。抗原結合分子の分離、精製は通常の蛋白質で使用されている分離、精製方法を使用すればよい。例えばアフィニティークロマトグラフィー等のクロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動等を適宜選択、組合せれば、抗体を分離、精製することができる(Antibodies: A Laboratory Manual, Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)が、これらに

10

20

30

40

50

限定されるものではない。アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、プロテインAカラム、プロテインGカラムなどが挙げられる。

【0068】

本発明の二重特異性抗原結合分子は、例えば酵素および基質の組合せが、血液凝固線溶関連因子のF.XIa、及びF.Xである場合には、好ましくは、抗F.XIa抗体における可変領域と、抗F.X抗体における可変領域とを含む構造を有する。

【0069】

二重特異性抗原結合分子は以下の方法で作製できる。例えば酵素および基質の組合せがF.XIa及びF.Xの場合、市販のF.XIa及びF.Xをそれぞれマウスの皮下に免疫した。抗体価の上昇した免疫マウスの脾臓から脾細胞を単離し、マウスミエローマ細胞と融合し、ハイブリドーマを作製した。抗原(F.XIa、F.X)に結合するハイブリドーマをそれぞれ選択し、可変領域に対応するプライマーを用いてRT-PCRにてL鎖、H鎖の可変領域を回収した。L鎖可変領域はC<sub>L</sub>を含むL鎖発現ベクターに、H鎖可変領域はH鎖定常領域を含むH鎖発現ベクターにそれぞれ組み込んだ。また、この免疫マウスの脾臓からmRNAを抽出し、可変領域に対応するプライマーを用いてRT-PCRにてL鎖、H鎖可変領域のcDNAを回収した。これら可変領域を用いてscFvを提示するファージライブラリーを構築した。パンニングによって抗原結合抗体クローンを濃縮・クローン化し、その可変領域を用いて抗原結合分子発現ベクターを作製した。あるいは当業者公知の方法でB細胞クローニング技術によって生成されうる。抗F.XIa抗体(H鎖、L鎖)の発現ベクターとF.X抗体(H鎖、L鎖)の発現ベクターを同一の細胞に導入し、抗原結合分子を発現させることにより二重特異性抗原結合分子を得た。

【0070】

得られた二重特異性抗原結合分子に関しては、F.XIa、F.X、F.Xaの合成基質(S-2222)、リン脂質から成る測定系で、F.XIaによるF.X活性化促進活性を評価した。その結果を以って、有する二重特異性抗原結合分子として、原則本測定系で0.1以上のF.XIaによるF.X活性化促進活性を示したものを選択した。なお、ここでいうF.XIaによるF.X活性化促進活性とは、抗原結合分子溶液の合成基質添加30分後の吸光度の値である。

【0071】

上記で選択された二重特異性抗原結合分子あるいはその類縁の二重特異性抗原結合分子に関しては、血液凝固因子欠乏ヒト血漿を用いた凝固時間測定系を用い、凝固回復能を測定した。その結果、抗体無添加時に比べて、凝固時間を短縮する二重特異性抗原結合分子を得た。ここでいう凝固時間は、血液凝固第九因子欠乏ヒト血漿を用いた活性化部分トロンボプラスチン時間を測定したものである。それら二重特異性抗原結合分子の中で、最も好ましい二重特異性抗原結合分子は60秒以上の凝固時間短縮能を有していた。

【0072】

本発明の抗原結合分子は、特に制限されず、表1に記載のいずれかの組合せの酵素及び基質の両方を認識する二重特異性抗原結合分子が挙げられる。

【0073】

本発明で開示されている可変領域を用いて全長抗体を作製する場合、定常領域は特に制限されず、当業者に公知の定常領域を用いることが可能であり、例えば、Sequences of proteins of immunological interest, (1991), U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service National Institutes of Health や、An efficient route to human bispecific IgG, (1998). Nature Biotechnology vol. 16, 677-681、等に記載されている定常領域を用いることができる。

【0074】

本発明における抗原結合分子の1つの態様としては、抗原結合分子は少なくとも生体に発現するペプチド性補因子またはヘパリンの機能を代替しないが、酵素と該酵素の触媒反応を受け得る基質の関係において補因子様の機能を果たすことから、ある補因子、酵素、基質の活性(機能)低下や欠損に起因する疾病に対して、有効な薬剤となることが期待される。本発明の抗原結合分子が結合する酵素及び基質が血液凝固線溶関連因子である場合

には、上記疾病として、例えば、出血、出血を伴う疾患、もしくは出血に起因する疾患等を挙げることができる。特に、F.VIII/F.VIIIa、F.IX/F.IXa、F.XI/F.XIaの機能低下や欠損は、血友病と呼ばれる出血異常症を引き起こすことで知られる。

【0075】

血友病のうち、先天性のF.VIII/F.VIIIa機能低下または欠損による出血異常症は血友病Aと呼ばれ、F.IX/F.IXa機能低下または欠損による出血異常症は血友病Bと呼ばれる。血友病A患者が出血した場合はF.VIII製剤の補充療法が行われ、血友病B患者が出血した場合はF.IX製剤の補充療法が行われる。また、激しい運動や遠足の当日、頻回に関節内出血を来たす場合、あるいは重症血友病に分類される場合には、これらの製剤の予防投与が行われることがある。

10

【0076】

F.VIII製剤の血中半減期は短く、約12～16時間程度である。それ故、継続的な予防のためには、F.VIII製剤を週に3回程度投与する必要がある。これは、F.VIII活性として、概ね1%以上を維持することに相当する。同様に、標準的な半減期を有するF.IX製剤は、週に2回程度投与する必要がある。また、出血時の補充療法においても、出血が軽度な場合を除き、再出血を防ぎ、完全な止血を行うため、一定期間、F.VIII製剤やF.IX製剤を定期的に追加投与する必要がある。

【0077】

また、F.VIII製剤及びF.IX製剤は、静脈内に投与される。静脈内投与実施には、技術的な困難さが存在する。特に年少の患者に対する投与においては、投与に用いられる静脈が細い故、困難さが一層増す。

20

【0078】

前述の、F.VIII製剤及びF.IX製剤の予防投与や、出血の際の緊急投与においては、多くの場合、家庭療法・自己注射が用いられる。頻回投与の必要性と、投与の際の技術的困難さは、投与に際し患者に苦痛を与えるだけでなく、家庭療法・自己注射の普及を妨げる要因となっている。

従って、現存の血液凝固第VIII因子製剤及び第IX因子製剤に比し、投与間隔が広い薬剤、あるいは投与が簡単な薬剤が、強く求められていた。

【0079】

さらに、血友病A患者、特に重症血友病A患者には、インヒビターと呼ばれるF.VIIIに対する抗体が発生する場合がある。同様に、血友病B患者には、インヒビターと呼ばれるF.IXに対する抗体が発生する場合がある。インヒビターが発生すると、F.VIII製剤またはF.IX製剤の効果がインヒビターにより妨げられる。その結果、患者に対する止血管理が非常に困難になる。

30

【0080】

このような血友病Aインヒビター患者が出血を来した場合は、通常、大量のF.VIII製剤を用いる中和療法か、複合体製剤 (complex concentrate) あるいはF.VIIa製剤を用いるバイパス療法が、実施される。しかしながら、中和療法では、大量のF.VIII製剤の投与が、逆に、インヒビター (抗F.VIII抗体) 力価を上げてしまう場合がある。また、バイパス療法では、複合体製剤やF.VIIa製剤の短い血中半減期 (約2～8時間) が問題となっている。その上、それらの作用機序が、F.VIII/F.VIIIaの機能、すなわちF.IXaによるF.X活性化を触媒する機能に非依存であるため、場合によっては、止血機構をうまく機能させられず、不応答になってしまうケースがある。そのため、血友病Aインヒビター患者では、非インヒビター血友病A患者に比し、十分な止血効果を得られない場合が多いのである。血友病Bインヒビター患者についても同様である。

40

【0081】

従って、インヒビターの存在に左右されず、且つF.VIII/F.VIIIaまたはF.IX/F.IXaの機能を代替する薬剤が、強く求められていた。

【0082】

さて、(i)投与間隔が広く、(ii)投与が簡単であり、(iii)インヒビターの存在に左右さ

50

れず、(iv) F.VIII/F.VIIIaまたはF.IX/F.IXa非依存的にその機能を代替する医薬品の創製には、抗体を利用する方法が考えられる。抗体の血中半減期は、一般に、比較的長く、数日から数週間である。また、抗体は、一般に、皮下投与後に血中に移行することが知られている。すなわち、一般に抗体医薬品は、上記の(i)、(ii)を満たしている。

#### 【0083】

本発明では、本発明の抗原結合分子を有効成分として含有する医薬組成物を提供する。例えば、本発明の抗原結合分子が表1に記載の組合せの酵素及び基質の両方を認識する抗原結合分子のうち、該血液凝固因子欠乏血漿において血液凝固反応を促進する抗原結合分子である場合には、該抗原結合分子は、出血、出血を伴う疾患、もしくは出血に起因する疾患の予防あるいは治療のための医薬品(医薬組成物)もしくは薬剤となることが期待される。

10

#### 【0084】

治療または予防目的で使用される本発明の抗原結合分子を有効成分として含む医薬組成物は、必要に応じて、それらに対して不活性な適当な薬学的に許容される担体、媒体等と混和して製剤化することができる。例えば、滅菌水や生理食塩水、安定剤、賦形剤、酸化防止剤(アスコルビン酸等)、緩衝剤(リン酸、クエン酸、他の有機酸等)、防腐剤、界面活性剤(PEG、Tween等)、キレート剤(EDTA等)、結合剤等を挙げることができる。また、その他の低分子量のポリペプチド、血清アルブミン、ゼラチンや免疫グロブリン等の蛋白質、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン及びリシン等のアミノ酸、多糖及び単糖等の糖類や炭水化物、マンニトールやソルビトール等の糖アルコールを含んでい

20

#### 【0085】

また、必要に応じて本発明の抗原結合分子をマイクロカプセル(ヒドロキシメチルセルロース、ゼラチン、ポリ[メチルメタクリル酸]等のマイクロカプセル)に封入したり、コロイドドラッグデリバリーシステム(リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル等)とすることもできる("Remington's Pharmaceutical Science 16th edition", Oslo Ed. (1980)等参照)。さらに、薬剤を徐放性の薬剤とする方法も公知であり、本発明の抗原結合分子に適用し得る(Langer et al., J.Biomed.Mater.Res. 15: 267-277 (1981); Langer, Chemtech. 12: 98-105 (1982); 米国特許第3,773,919号; 欧州特許出願公開(EP)第58,481号; Sidman et al., Biopolymers 22: 547-556 (1983); EP第133,988号)。

30

#### 【0086】

本発明の抗原結合分子または組成物は、血液凝固第VIII因子と併用することができる。血液凝固第VIII因子はヒトの血液から作られたものであっても、遺伝子組み換えにより作られたものであってもよい。本発明の抗原結合分子または組成物は、血液凝固第VII因子と同時に投与してもよく、または、時期をずらして投与してもよい。また、本発明の抗原結合分子または医薬組成物と血液凝固第VIII因子を組み合わせたキットとして実施してもよい。さらに、本発明の抗原結合分子または医薬組成物と血液凝固第VIII因子を併用する場合は、いずれかを単独で用いる場合に比べて、所望により各々の投与量を少なくすることも可能である。

40

#### 【0087】

本発明の抗原結合分子または組成物は、血液凝固第IX因子と併用することができる。血液凝固第IX因子はヒトの血液から作られたものであっても、遺伝子組み換えにより作られたものであってもよい。本発明の抗原結合分子または組成物は、血液凝固第IX因子と同時に投与してもよく、または、時期をずらして投与してもよい。また、本発明の抗原結合分子または医薬組成物と血液凝固第IX因子を組み合わせたキットとして実施しても

50

よい。さらに、本発明の抗原結合分子または医薬組成物と血液凝固第IX因子を併用する場合は、いずれかを単独で用いる場合に比べて、所望により各々の投与量を少なくすることも可能である。

【0088】

本発明の抗原結合分子または組成物は、血液凝固第XI因子と併用することができる。血液凝固第XI因子はヒトの血液から作られたものであっても、遺伝子組み換えにより作られたものであってもよい。本発明の抗原結合分子または組成物は、血液凝固第XI因子と同時に投与してもよく、または、時期をずらして投与してもよい。また、本発明の抗原結合分子または医薬組成物と血液凝固第XI因子を組み合わせたキットとして実施してもよい。さらに、本発明の抗原結合分子または医薬組成物と血液凝固第XI因子を併用する場合は、いずれかを単独で用いる場合に比べて、所望により各々の投与量を少なくすることも可能である。

10

【0089】

本発明の抗原結合分子または組成物は、バイパス製剤と併用することができる。バイパス製剤はヒトの血液から作られたものであっても、遺伝子組み換えにより作られたものであってもよく、例えば血漿由来活性型プロトロンビン複合体製剤（APCC製剤）、遺伝子組換え型活性化第VII因子製剤（rFVIIa製剤）、乾燥濃縮人血液凝固第X因子加活性化第VII因子製剤（FVIIa/FX製剤）である。本発明の抗原結合分子または組成物は、バイパス製剤と同時に投与してもよく、または、時期をずらして投与してもよい。また、本発明の抗原結合分子または医薬組成物とバイパス製剤を組み合わせたキットとして実施してもよい。さらに、本発明の抗原結合分子または医薬組成物とバイパス製剤を併用する場合は、いずれかを単独で用いる場合に比べて、所望により各々の投与量を少なくすることも可能である。

20

【0090】

本発明の医薬組成物の投与量は、剤型の種類、投与方法、患者の年齢や体重、患者の症状、疾患の種類や進行の程度等を考慮して、最終的には医師の判断により適宜決定されるものであるが、一般に大人では、1日当たり、0.1~2000mgを1~数回に分けて投与することができる。より好ましくは1~1000mg/日、更により好ましくは50~500mg/日、最も好ましくは100~300mg/日である。これらの投与量は患者の体重や年齢、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。投与期間も、患者の治癒経過等に応じて適宜決定することが好ましい。

30

【0091】

また、本発明の抗原結合分子をコードする遺伝子を遺伝子治療用ベクターに組み込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。投与方法としては、nakedプラスミドによる直接投与の他、リポソーム等にパッケージングするか、レトロウィルスベクター、アデノウィルスベクター、ワクシニアウィルスベクター、ポックスウィルスベクター、アデノウィルス関連ベクター、HVJベクター等の各種ウィルスベクターとして形成するか（Adolph『ウィルスゲノム法』, CRC Press, Florid (1996)参照）、または、コロイド金粒子等のビーズ担体に被覆（WO93/17706等）して投与することができる。また、本発明の抗原結合分子をコードする核酸は直接生体に投与してもよく、またエレクトロポレーション法により直接生体に投与してもよい。例えば、本発明の抗原結合分子をコードするmRNAに生体内でのmRNAの安定性を高めるための化学修飾を施し、当該mRNAをヒトに直接投与し、生体内で本発明の抗原結合分子を発現させる方法により本発明の抗原結合分子を投与する（EP2101823B、WO2013/120629参照）。しかしながら、生体内において抗原結合分子が発現され、その作用を発揮できる限りいかなる方法により投与してもよい。好ましくは、適当な非経口経路（静脈内、腹腔内、皮下、皮内、脂肪組織内、乳腺組織内、吸入または筋肉内の経路を介して注射、注入、またはガス誘導性粒子衝撃法（電子銃等による）、点鼻薬等粘膜経路を介する方法等）により十分な量が投与される。ex vivoにおいてリポソームトランスフェクション、粒子衝撃法（米国特許第4,945,050号）、またはウィルス感染を利用して血液細胞及び骨髄由来細胞等に投与して、該細胞を動物

40

50

に再導入することにより本発明の抗原結合分子をコードする遺伝子を投与してもよい。

【0092】

また本発明は、本発明の抗原結合分子もしくは組成物を投与する工程を含む、出血、出血を伴う疾患、または出血に起因する疾患の予防および/または治療するための方法を提供する。抗原結合分子もしくは組成物の投与は、例えば、前記の方法により実施することができる。

一態様において、出血、出血を伴う疾患、または出血に起因する疾患は、血液凝固第IX因子および/または活性化血液凝固第IX因子の活性の低下ないし欠損によって発症および/または進展する疾患（例えば、血友病B）である。特定の態様において、当該疾患は、血液凝固第IX因子もしくは活性化血液凝固第IX因子に対するインヒビターが出現している疾患である。特定の態様において、本発明の抗原結合分子または組成物は、血液凝固第IX因子または活性化血液凝固第IX因子に対するインヒビターを保有する対象（インヒビター保有患者）に投与される。特定の態様において、本発明の方法は、血液凝固第IX因子を投与する工程をさらに含む。

10

別の態様において、出血、出血を伴う疾患、または出血に起因する疾患は、血液凝固第VIII因子および/または活性化血液凝固第VIII因子の活性の低下ないし欠損によって発症および/または進展する疾患（例えば、血友病A、後天性血友病、またはフォンビルブランド病）である。特定の態様において、当該疾患は、血液凝固第VIII因子もしくは活性化血液凝固第VIII因子に対するインヒビターが出現している疾患である。特定の態様において、本発明の抗原結合分子または組成物は、血液凝固第VIII因子または活性化血液凝固第VIII因子に対するインヒビターを保有する対象（インヒビター保有患者）に投与される。特定の態様において、本発明の方法は、血液凝固第VIII因子を投与する工程をさらに含む。

20

別の態様において、出血、出血を伴う疾患、または出血に起因する疾患は、血液凝固第XI因子および/または活性化血液凝固第XI因子の活性の低下ないし欠損によって発症および/または進展する疾患（例えば、血友病C、または後天性血友病）である。特定の態様において、当該疾患は、血液凝固第XI因子もしくは活性化血液凝固第XI因子に対するインヒビターが出現している疾患である。特定の態様において、本発明の抗原結合分子または組成物は、血液凝固第XI因子または活性化血液凝固第XI因子に対するインヒビターを保有する対象（インヒビター保有患者）に投与される。特定の態様において、本発明の方法は、血液凝固第XI因子を投与する工程をさらに含む。

30

【0093】

また本発明は、本発明の抗原結合分子の、本発明の（医薬）組成物の製造のための使用に関する。

【0094】

さらに本発明は、少なくとも本発明の抗原結合分子もしくは組成物を含む、上記方法に用いるためのキットを提供する。該キットには、その他、注射筒、注射針、薬学的に許容される媒体、アルコール綿布、絆創膏、または使用方法を記載した指示書等をパッケージしておくこともできる。一態様において、本発明のキットは、出血、出血を伴う疾患、もしくは出血に起因する疾患を予防および/または治療する方法に用いるためのものである。特定の態様において、本発明のキットは、本発明の抗原結合分子もしくは組成物に加えて、血液凝固第IX因子または第VIII因子を含む。

40

【0095】

別の局面において、本発明は、表1に記載のいずれかの組合せの酵素及び基質の両方を認識する二重特異性抗原結合分子を用いて血液凝固を促進する方法に関する。当該局面の一態様において、本発明の血液凝固促進方法は、表1に記載のいずれかの組合せの酵素及び基質の両方を認識する二重特異性抗原結合分子を投与する工程を含む。抗原結合分子の投与は、例えば、前記の投与方法により実施することができる。前記局面の特定の態様において、本発明の血液凝固促進方法に用いられる二重特異性抗原結合分子は、活性化血液凝固第XI因子と血液凝固第X因子の両方を認識する二重特異性抗原結合分子である。

50



## 【0096】

さらにまた別の局面において、本発明は、出血、出血を伴う疾患、もしくは出血に起因する疾患の予防および/または治療に有効な物質のスクリーニング方法に関する。当該局面の一態様において、本発明のスクリーニング方法は、(1)試験物質と、表1に記載のいずれかの組合せの酵素との結合を評価する工程、および(2)試験物質と、表1に記載の当該組合せの基質との結合を評価する工程を含む。特定の態様において、本発明のスクリーニング方法は、(1)試験物質と活性化血液凝固第XI因子との結合を評価する工程、および(2)試験物質と血液凝固第X因子との結合を評価する工程を含む。特定の態様において、本発明のスクリーニング方法は、表1に記載のいずれかの組合せの酵素及び基質の両方と結合する試験物質を、出血、出血を伴う疾患、もしくは出血に起因する疾患の予防および/または治療に有効な物質の候補として選択する工程をさらに含む。

10

## 【0097】

「試験物質」は、特に限定されるものではなく、例えば天然化合物、有機化合物、無機化合物、核酸、タンパク質、ペプチド等の単一物質、並びに化合物ライブラリー、核酸ライブラリー、ペプチドライブラリー、遺伝子ライブラリーの発現産物、細胞抽出物、細胞培養上清、発酵微生物産物、海洋生物抽出物、植物抽出物、原核細胞抽出物、真核単細胞抽出物もしくは動物細胞抽出物等を挙げることができる。上記被験物質は必要に応じて適宜標識して用いることができる。標識としては、例えば、放射標識、蛍光標識等を挙げることができる。また、上記被験物質に加えて、これらの被験物質を複数種混合した混合物も含まれる。

20

## 【0098】

さらにまた別の局面において、本発明は、出血、出血を伴う疾患、もしくは出血に起因する疾患の予防および/または治療に有効な物質もしくは組成物の品質試験方法に関する。当該局面の一態様において、本発明の品質試験方法は、(1)試験物質もしくは試験組成物と、表1に記載のいずれかの組合せの酵素との結合を評価する工程、および(2)試験物質もしくは試験組成物と、表1に記載の当該組合せの基質との結合を評価する工程を含む。特定の態様において、本発明の品質試験方法は、(1)試験物質もしくは試験組成物と活性化血液凝固第XI因子との結合を評価する工程、および(2)試験物質もしくは試験組成物と血液凝固第X因子との結合を評価する工程を含む。特定の態様において、本発明の品質試験方法は、表1に記載のいずれかの組合せの酵素及び基質の両方と結合する試験物質もしくは組成物を、出血、出血を伴う疾患、もしくは出血に起因する疾患の予防および/または治療に有効な物質もしくは組成物としての品質を評価する工程をさらに含む。

30

## 【0099】

「試験組成物」は、特に限定されるものではなく、例えば医薬品、試薬などが挙げられる。

## 【0100】

(1)試験物質と活性化血液凝固第XI因子との結合を評価する工程としては、例えば、ELISA法(Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)、表面プラズモン共鳴(Surface plasmon resonance: SPR)法、例えばBiacore シリーズ(GE Healthcare)を用いた測定、バイオセンサー技術(BLI法)を用いた生体分子間相互作用解析システム、例えばOctetシステム(Fortebio社)によって評価できる。

40

## 【0101】

(2)試験物質と血液凝固第X因子との結合を評価する工程としては、例えば、ELISA法(Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)、表面プラズモン共鳴(Surface plasmon resonance: SPR)法、例えばBiacore シリーズ(GE Healthcare)を用いた測定、バイオセンサー技術(BLI法)を用いた生体分子間相互作用解析システム、例えばOctetシステム(Fortebio社)によって評価できる。

## 【0102】

(3)試験物質を用いて活性化血液凝固第XI因子による血液凝固第X因子の活性化反応

50

を評価する工程としては、例えば、該酵素、該基質、活性化された基質の合成基質、リン脂質、Ca<sup>2+</sup>から成る測定系で、該酵素による該基質活性化促進活性で評価できる。その結果を以って、該活性を有する二重特異性抗原結合分子として、原則本測定系で該酵素添加群のみ0.1以上の該酵素による該基質活性化促進活性を示したものを選択できる。なお、ここでいう該酵素による該基質活性化促進活性とは、抗原結合分子溶液の合成基質添加30分後の吸光度の値で測定することができる。

【0103】

なお本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

【実施例】

【0104】

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

【0105】

〔実施例1〕抗F.XIa, F.X 二重特異性抗体の調製

抗F.XIa抗体調製のために、WO2010080623A2に記載されている14E11の可変領域配列(重鎖可変領域配列番号:1, 軽鎖可変領域配列番号:2)を用いた。抗F.X抗体調製のためにWO2005035756A1に記載されているSB04由来のF10B1(重鎖可変領域配列番号:3, 軽鎖可変領域配列番号:4)と、WO2019065795A1に記載されているJ327の重鎖可変領域配列とJNL095の軽鎖可変領域の配列に二つのアミノ酸置換を導入した配列からなるF10B2(重鎖可変領域配列番号:5, 軽鎖可変領域配列番号:6)を用いた。いずれの抗体の可変領域配列も重鎖定常領域あるいは軽鎖定常領域配列と連結させ、抗体配列全長をコードする遺伝子を含む発現ベクターを構築した。発現ベクターをExpi293細胞(Thermo Fisher Scientific)に、一過性に導入し抗体の発現を行った。得られた培養上清から、Protein A等を用いたアフィニティ精製により当業者公知の方法で精製した。さらに、これらの抗F.XIa抗体と抗F.X抗体からなる二重特異性抗体を当業者公知の方法で調製した。各抗体の可変領域と定常領域の配列番号の対応は表2の通りであり、それぞれの単一特異性抗体の名称と二重特異性抗体の名称も表2の通りに命名した。

【0106】

【表2】

二重特異性 抗体名称	抗FXI(a)抗体					抗FX抗体				
	単一 特異性 抗体名称	重鎖 可変領域 配列番号	重鎖 定常領域 配列番号	軽鎖 可変領域 配列番号	軽鎖 定常領域 配列番号	単一 特異性 抗体名称	重鎖 可変領域 配列番号	重鎖 定常領域 配列番号	軽鎖 可変領域 配列番号	軽鎖 定常領域 配列番号
	14E11//F10B1	14E11	1	7	2	9	F10B1	3	8	4
14E11//F10B2	14E11	1	7	2	9	F10B2	5	8	6	10

【0107】

〔実施例2〕in vitro酵素反応測定系によるF.XIa、FX二重特異性抗体の、FXIaによるFX活性化促進活性の測定

作製した抗F.XIa, F.X二重特異性抗体の、F.XIaによるF.X活性化促進活性の有無を、合成発色基質を用いたin vitro酵素反応測定系を用いて評価した。具体的には以下の手順で測定を行い、反応は全て室温で行った。48 ng/mLのF.XIa(Enzyme Research Laboratories)5 μLと各濃度の抗体溶液5 μLの混合液を384穴プレート中で30分間インキュベーションした。さらにその混合液に、22.9 μg/mLのF.X(Enzyme Research Laboratories)5 μLを添加し、酵素反応を開始させた。60分間反応させたのち、50 μM Aprotinin(Sigma Aldrich)5 μLを加えることにより酵素反応を停止さ

10

20

30

40

50

せた。続いて、F.Xaにより呈色する合成発色基質溶液5  $\mu$ Lをそれぞれのウェルに加え、30分後の波長405 nmにおける吸光度をSpectraMax340PC (Molecular Devices) により測定した。F.XIa、FX二重特異性抗体の、FXIaによるFX活性化促進活性は、発色基質溶液添加30分間後の吸光度の値として表した[図3]。なお、抗体の濃度は酵素反応中の溶液中濃度として示した。

評価の結果、F.XIa及びF.Xを含むin vitro試験系において、二重特異性抗体を添加した群では吸光度で示されるF.Xa量の抗体濃度依存的な上昇が確認された。一方、吸光度の上昇は二重特異性抗体の代わりに単一特異性抗体を添加した群においては確認されなかった。以上より、F.XIa、F.X二重特異性抗体はin vitro 酵素反応測定系においてF.XIa及びF.X両者への結合依存的にF.X活性化を促進することが示唆された。

10

抗体溶液の溶媒には、0.1 %ウシ血清アルブミンを含むトリス緩衝生理食塩液(以下、TBSBと称す)を用いた。また、F.XIa及びF.Xの溶媒には1.5 mM CaCl<sub>2</sub>及び4.0  $\mu$ Mのリン脂質(Sysmex)を含むTBSB(以下、TBCPと称す)を用いた。発色基質溶液は、精製水を用いて調製した1.47 mg/mLの発色基質S-2222 (Chromogenix) 溶液を用いた。

#### 【0108】

〔実施例3〕 活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)による血漿凝固活性の測定  
血液凝固反応は複数のセリンプロテアーゼによる逐次的基質活性化反応である。F.X活性化促進活性を有する抗F.XIa、F.X二重特異性抗体が、血友病B血漿中においても同反応を促進し凝固能を是正するか明らかにするため、F.IX欠乏血漿を用いて臨床の凝固機能診断として広く用いられる指標である活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)に対する同抗体の影響を検討した。APTT測定は当業者公知の方法で実施し、具体的には以下の手順で実施した。TBSBを用いて各濃度に調製した抗体溶液、あるいは各濃度に調製したF.IX(クリスマシン、日本血液製剤機構)15  $\mu$ L及びF.IX欠乏血漿(Sysmex)135  $\mu$ Lを混合し、抗体を含む血漿サンプルを調製した。血漿サンプル50  $\mu$ L及びAPTT試薬(Sysmex)50  $\mu$ Lの混合液を37  $^{\circ}$ Cで190秒間加温した。凝固反応は0.02 M塩化カルシウム液(Sysmex)50  $\mu$ Lを同混合液に加えることにより開始させた。凝固時間は透過度の低下が最大低下時の50%となる時間を基準としてCS-2000i(Sysmex)を用いて測定し、APTTとして示した[図4]。なお、抗体濃度は抗体を含む血漿サンプル中の濃度として示した。

20

30

評価の結果、F.IX欠乏血漿において、F.IX添加群と同様に、二重特異性抗体添加群では抗体濃度依存的なAPTT短縮効果を示した。以上の結果から抗F.XIa、F.X二重特異性抗体は、F.IX欠乏血漿において凝固促進作用を有することが示され、抗F.XIa、F.X二重特異性抗体は血友病Bの治療薬として臨床で用いられるF.IXと同様に血友病B患者血漿の凝固能を是正する可能性が示唆された。

#### 【0109】

他の血液凝固因子への応用可能性

酵素の基質特異性はトロンピンやF.XIaに代表されるようにエキソサイトによる標的基質への結合によって与えられるものも多い(Mol Aspects Med. 2008 Aug; 29(4): 203-254., Thromb Res. 2018 Jan; 161: 94-105., J Thromb Haemost. 2005; 3(1): 54-67.)。したがって、上述のFXIa、FX二重特異性抗体による酵素反応促進ならびに血液凝固能に対する結果に基づき、酵素Aによる基質Bの反応を促進するような高分子ポリペプチドである補因子が生体に存在しないような組み合わせの酵素と基質でも、二重特異性抗原結合分子によって両者を強制的に近接させることによって反応を促進できると考えられる。

40

#### 【0110】

血液凝固系における他の凝固因子に対する適用

血液凝固反応は、血漿中のセリンプロテアーゼ凝固因子前駆体の逐次的活性化により生成したトロンピンがフィブリノーゲンをフィブリンに変換することにより完結する。主要な血液凝固カスケードの模式図を図2に示した(Blood. 2010; 115(13): 2569-2577.

50

を参考にして作製)。F.XII(a)、F.XI(a)、F.IX(a)、F.X(a)、F.VII(a)、F.IIIaはセリンプロテアーゼであり、図2に記載されるようにF.XIIaはF.XIを、F.XIaはF.IXを、F.IXaはF.Xを、F.VIIaはF.Xを、F.Xaはプロトロンビンをそれぞれ活性化して凝固反応を進める。

【0111】

血友病は図2におけるF.VIIIa, F.IX, F.XIが先天的、あるいは後天的に活性低下することによって引き起こされる出血性疾患である。一方で疾患状態を引き起こしている血液凝固因子以外の血液凝固因子は正常な機能を有している。したがって、これらの正常な活性を有する血液凝固因子に本コンセプトを適用することで、血友病状態の血漿で内因性凝固カスケードを正常化させる、あるいは外因系カスケードの反応を促進して出血傾向を抑制することができる。

10

具体的には、表1に記載したa~gの酵素と基質の組合せに結合する二重特異性抗原結合分子を作製することで血友病における出血傾向を抑制することができる。

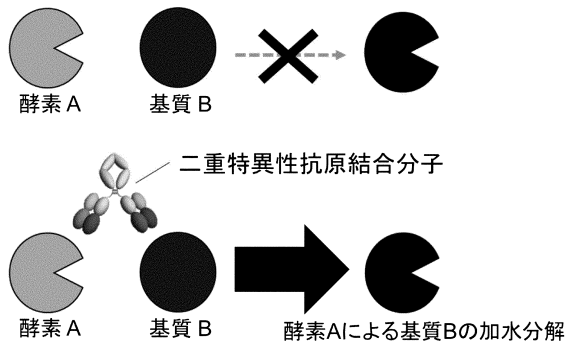
【産業上の利用可能性】

【0112】

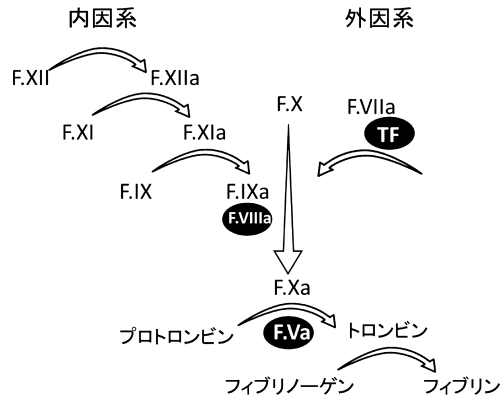
本開示の二重特異性抗原結合分子は、血液凝固の促進に寄与し、ひいては出血、出血を伴う疾患、もしくは出血に起因する疾患の予防および/または治療に有用であり得る。

【図面】

【図1】



【図2】



20

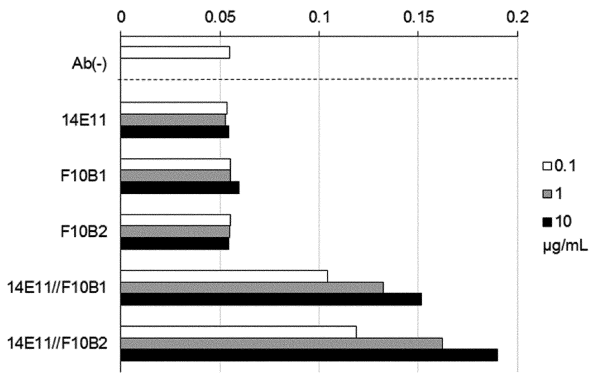
30

40

50

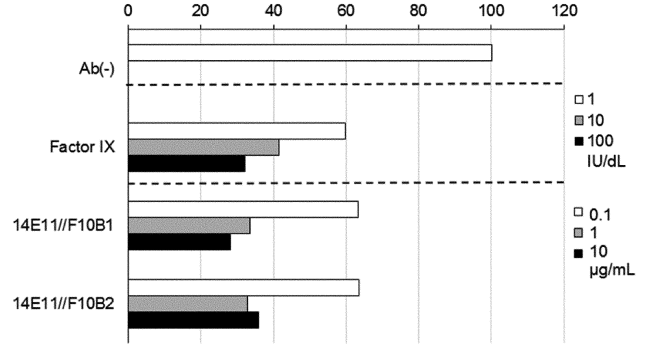
【 図 3 】

抗F.XIa, F.X二重特異性抗体の、F.XIaによる  
F.X活性化促進活性: OD 405 nm



【 図 4 】

凝固時間: APTT (sec)



10

【 配列表 】

2023106635000001.app

20

30

40

50

## フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 Q 1/56 (2006.01)	C 1 2 Q 1/56	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 7/04 (2006.01)	A 6 1 P 7/04	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 Q 1/37 (2006.01)	C 1 2 Q 1/37	

(74)代理人 100128048  
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506  
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707  
弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340  
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889  
弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072  
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 古賀 光  
静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内

F ターム (参考) 2G045 AA10 AA11 AA13 AA25 AA40 BA13 BB20 CA25 CA26 CB01  
CB17 CB20 CB21 DA13 DA14 DA20 DA36 DA39 DA40 DA41 FA11  
FA29 FA34 FB01 FB02 FB03 FB08 FB12 FB15 GC10 JA01  
4B063 QA20 QQ13 QR56 QS33 QX02  
4B064 AG27 CA02 CA05 CA06 CA10 CA19 CC24  
4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AB01 BA02 CA25 CA44  
4C085 AA14 AA15 CC23 DD62 EE01  
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 DA76 EA24 FA74