

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2018年2月1日(01.02.2018)



(10) 国際公開番号

WO 2018/021450 A1

(51) 国際特許分類:
C07K 16/46 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2017/027152

(22) 国際出願日: 2017年7月27日(27.07.2017)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2016-150769 2016年7月29日(29.07.2016) JP

(71) 出願人: 中外製薬株式会社(CHUGAI SEIYAKU
KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1158543 東京都
北区浮間5丁目5番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 井川 智之 (IGAWA, Tomoyuki);
〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁目135
番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 寺
西 佑理 (TERANISHI, Yuri); 〒4128513 静岡県
御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬
株式会社内 Shizuoka (JP). 加藤 一希 (KATO,
Kazuki); 〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁
目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka
(JP). 古賀 光 (KOGA, Hikaru); 〒4128513 静
岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外
製薬株式会社内 Shizuoka (JP).

(74) 代理人: 春名 雅夫, 外(HARUNA, Masao et al.);
〒3000847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関
鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH,
KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY,

MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,
NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT,
QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保
護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS,
MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,
TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ,
DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT,
LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS,
SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

規則4.17に規定する申立て:

一 出願し及び特許を与えられる出願人の資格に関
する申立て (規則4.17(ii))

添付公開書類:

一 国際調査報告 (条約第21条(3))
一 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則5.2(a))

(54) Title: BISPECIFIC ANTIBODY EXHIBITING INCREASED ALTERNATIVE FVIII-COFACTOR-FUNCTION
ACTIVITY

(54) 発明の名称: 増強されたFV III 補因子機能代替活性を有する二重特異性抗体

(57) Abstract: The present invention provides a light-chain amino acid substitution that enhances the alternative FVIII-cofactor-function activity of ACE910 (Emicizumab), a new light chain that exhibits alternative FVIII-cofactor-function activity, and a heavy-chain amino acid substitution that enhances the alternative FVIII-cofactor-function activity of a bispecific antibody having the new light chain.

(57) 要約: 本発明は、ACE910(Emicizumab)のFVIII補因子機能代替活性を向上させる軽鎖のアミノ酸置換、FVIII補因子機能代替活性を示す新規軽鎖、および、新規軽鎖を有する二重特異性抗体のFVIII補因子機能代替活性を向上させる重鎖のアミノ酸置換を提供する。



WO 2018/021450 A1

明 細 書

発明の名称：

増強されたF V I I I 補因子機能代替活性を有する二重特異性抗体

技術分野

[0001] 本発明は、増強されたFVIII補因子機能代替活性を有する抗体、そのような抗体を有効成分として含有する薬学的製剤、及び前記抗体を製造する方法等に関する。より具体的にはACE910(Emicizumab)よりも高いFVIII補因子機能代替活性を有する二重特異性抗体に関する。

背景技術

[0002] 血友病Aは、先天性の血液凝固第VIII因子（FVIII）の機能低下または欠損による出血異常症である。血友病A患者の出血に対しては、FVIII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、FVIII製剤が投与される（非特許文献1、2）（予防投与）。FVII I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、FVIII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、FVIII製剤を、必要に応じ、一定間隔で追加投与する。また、FVIII製剤の投与は静脈内に実施される。従って、FVIII製剤と比べて投与の負担が少ない薬剤が、強く求められていた。

[0003] 時折、FVIII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、FVIII製剤の効果を打ち消す。インヒビターが発生した患者（インヒビター患者）の出血に対しては、バイパス製剤が投与される。それらの作用機序は、FVIIIの機能、すなわち活性化血液凝固第IX因子（FIXa）による血液凝固第X因子（FX）の活性化を触媒する機能に非依存である。そのため、バイパス製剤が、出血を十分止められないケースがある。従って、インヒビターの存在に左右されず、且つFVIIIの機能を代替する薬剤が、強く求められていた。

[0004] これらの課題を解決する手段として、FVIII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）。FIXaとFX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、FVII補因子機能代替の活性を発揮し、FVIIIの機能を代替することが可能である（非特許文献5）。なお、FIXaとFXに対する二重特異性抗体のFVIII補因子機能代替活性は比色定量法を用いたFIXaによるFX活性化反応試験、及び血友病A血漿を用いたトロンビン生成試験から算出された活性を指す。該抗体のFVIII補因子機能代替活性はFIXaとFXに対する親和性を最適化することにより向上できることが報告されている（非特許文献6）。また、該抗体のFVIII補因子機能代替活性はIgGのアイソタイプ、ジスルフィド結合パターン、ヒンジ領域のアミノ酸配列、Fc領域の糖鎖の有無によって影響を受けることが知られている（非特許文献7）。該抗体の一つであり、高いFVIII補因子機能代替活性を有するACE910(Emicizumab)はサル血友病モデルで止血効果を発揮することが報告されている（非特許文献8、9）。さらに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10）、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11）。

[0005] このように臨床試験において出血回数の抑制効果が認められたACE910(Emicizumab)であるが、FVIII欠乏血漿を用いたin vitroトロンビン生成試験での最大トロンビン生成量（Peak height）におけるACE910(Emicizumab)による改善効果は、正常レベルの100 U/dLのFVIII活性と比較して低いこと（非特許文献8）から、一層の薬効の増強が望まれるとともに、比活性向上によるさらなる投与量の減少等が可能な二重特異性抗体が求められている。

[0006] ACE910(Emicizumab)は、動物免疫より取得された抗FIX抗体および／または抗FIXa抗体ならびに抗FX抗体をヒト化することによって得られたhBS1をリード抗体として、リード抗体に多数のアミノ酸置換を導入することで多面的に

最適化された二重特異性抗体であり、高いFVIII補因子機能代替活性を有するが（非特許文献6、特許文献4）、薬効の増強や比活性向上のためには、ACE910(Emicizumab)よりも高い最大活性（FVIII補因子機能代替活性の最大活性）を有し、且つ、ACE910(Emicizumab)よりも低い濃度でFVIII補因子機能代替活性を発揮することができるFVIII機能代替の二重特異性抗体が必要である。しかしながら、これまでに最大活性および濃度の観点でACE910(Emicizumab)よりも高いFVIII補因子機能代替活性を有する二重特異性抗体は報告されていない。

先行技術文献

特許文献

- [0007] 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

- [0008] 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：PLoS One. 2013;8(2):e57479.
非特許文献7：MAbs. 2015;7(1):120-8.
非特許文献8：J Thromb Haemost. 2014 Feb;12(2):206-213.
非特許文献9：Blood. 2014 Nov 13;124(20):3165-71.
非特許文献10：Blood. 2016 Mar 31;127(13):1633-1641
非特許文献11：New Eng J Med 2016 May 26;374(21):2044-2053

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 本発明は上記のような状況に鑑みてなされたものであり、FVIII補因子機能代替活性が増強された抗体、そのような抗体を有効成分として含有する薬学的製剤、それらの製造方法等を提供することを目的とする。より具体的にはACE910(Emicizumab)よりも高いFVIII補因子機能代替活性を有する二重特異性抗体を作製するための重鎖および軽鎖の可変領域部位の変異あるいはACE910(Emicizumab)とは異なる新規軽鎖のCDR配列、および、同変異あるいは同CDR配列を有するFIXおよび／またはFIXaならびにFXを認識する二重特異性抗体、当該抗体の製造方法、当該抗体を有効成分として含む薬学的製剤、または当該薬学的製剤による血友病Aの治療方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは上記課題を解決すべく、ACE910(Emicizumab)の軽鎖可変領域の様々な部位にアミノ酸置換を導入した変異体を作製したところ、FVIII補因子機能代替活性を増強するアミノ酸置換を見出すことに成功した。また、ヒト抗体ライブラリからFVIII補因子機能代替活性を有するACE910とは異なる配列を有する新規軽鎖を取得することに成功し、該軽鎖においてFVIII補因子機能代替活性を増強するアミノ酸置換を見出すことに成功した。また該軽鎖を用いた二重特異性抗体の重鎖可変領域の様々な部位にアミノ酸置換を導入した変異体を作製したところ、FVIII補因子機能代替活性を増強するアミノ酸置換を見出すことに成功した。本発明はこのような知見に基づくものであり、具体的には下記〔1〕～〔12〕を提供するものである。

〔1〕抗体軽鎖可変ドメインを含むポリペプチドであって、配列番号：7、8、9に記載の軽鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を有する抗体軽鎖可変ドメインあるいは配列番号：47に記載のアミノ酸配列を有する抗体軽鎖可変ドメインを含み、ここで、K a b a t 番号付けシステムに従って番号付けられた、K24、A25、S26、R27、N28、I29、E30、R31、Q32、L33、A34、Q50、A51、S52、R53、K54、E55、S56、Q89、Q90、Y91、S92、D93、P94、P95、L96及びT97からなる群か

ら選択される1つ以上のアミノ酸が、システイン以外の任意のアミノ酸に置換されている、ポリペプチド。

〔2〕FIXおよび／またはFIXaならびにFXを認識する二重特異性抗体であって、配列番号：7、8、9に記載の軽鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を有する抗体軽鎖可変ドメインあるいは配列番号：47に記載のアミノ酸配列を有する抗体軽鎖可変ドメインを含み、ここで、K a b a t 番号付けシステムに従って番号付けられた、K24、A25、S26、R27、N28、I29、E30、R31、Q32、L33、A34、Q50、A51、S52、R53、K54、E55、S56、Q89、Q90、Y91、S92、D93、P94、P95、L96及びT97からなる群から選択される1つ以上のアミノ酸が、システイン以外の任意のアミノ酸に置換されている、抗体。

〔3〕FIXおよび／またはFIXaならびにFXを認識する二重特異性抗体であって、第一のポリペプチドと第三のポリペプチドが対を形成し、第二のポリペプチドと第四のポリペプチドが対を形成し、第一のポリペプチドは配列番号：45に記載の抗体重鎖可変ドメインのアミノ酸配列、第二のポリペプチドは配列番号：46に記載の抗体重鎖可変ドメインのアミノ酸配列をそれぞれ含み、第三のポリペプチド及び第四のポリペプチドのいずれか一方のポリペプチドは配列番号：47に記載の抗体軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列を含み、他方のポリペプチドは、配列番号：7、8、9に記載の軽鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を有する抗体軽鎖可変ドメインあるいは配列番号：47に記載のアミノ酸配列を有する抗体軽鎖可変ドメインを含み、ここで、他方のポリペプチドはK a b a t 番号付けシステムに従って番号付けられた、K24、A25、S26、R27、N28、I29、E30、R31、Q32、L33、A34、Q50、A51、S52、R53、K54、E55、S56、Q89、Q90、Y91、S92、D93、P94、P95、L96及びT97からなる群から選択される1つ以上のアミノ酸が、システイン以外の任意のアミノ酸に置換されている、抗体。

〔4〕抗体重鎖可変ドメインを含むポリペプチドであって、配列番号：1、

2、3に記載の重鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメインあるいは配列番号：45に記載のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメインを含み、ここで、Kabat番号付けシステムに従って番号付けられた、Y31、Y32、D33、I34、Q35、S50、I51、S52、P52a、S53、G54、Q55、S56、T57、Y58、Y59、R60、R61、E62、V63、K64、G65、R95、T96、G97、R98、E99、Y100、G100a、G100b、G100c、W100d、Y100e、F100f、D101およびY102からなる群から選択される1つ以上のアミノ酸が、システイン以外の任意のアミノ酸に置換されている、ポリペプチド。

〔5〕FIXおよび／またはFIXaならびにFXを認識する二重特異性抗体であって、配列番号：1、2、3に記載の重鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメインあるいは配列番号：45に記載のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメインを含み、ここで、Kabat番号付けシステムに従って番号付けられた、Y31、Y32、D33、I34、Q35、S50、I51、S52、P52a、S53、G54、Q55、S56、T57、Y58、Y59、R60、R61、E62、V63、K64、G65、R95、T96、G97、R98、E99、Y100、G100a、G100b、G100c、W100d、Y100e、F100f、D101およびY102からなる群から選択される1つ以上のアミノ酸が、システイン以外の任意のアミノ酸に置換されている、抗体。

〔6〕抗体重鎖可変ドメインを含むポリペプチドであって、配列番号：4、5、6に記載の重鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメインあるいは配列番号：46に記載のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメインを含み、ここで、Kabat番号付けシステムに従って番号付けられた、D31、N32、N33、M34、D35、D50、I51、N52、T52a、R53、S54、G55、G56、S57、I58、Y59、N60、E61、E62、F63、Q64、D65、R95、K96、S97、Y98、G99、Y100、Y100a、L100b、D101およびE102からなる群から選択される1つ以上のアミノ酸が、システイン以外の任意のアミノ酸に置換さ

れている、ポリペプチド。

〔7〕FIXおよび／またはFIXaならびにFXを認識する二重特異性抗体であって、配列番号：4、5、6に記載の重鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメインあるいは配列番号：46に記載のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメインを含み、ここで、Kabat番号付けシステムに従って番号付けられた、D31、N32、N33、M34、D35、D50、I51、N52、T52a、R53、S54、G55、G56、S57、I58、Y59、N60、E61、E62、F63、Q64、D65、R95、K96、S97、Y98、G99、Y100、Y100a、L100b、D101およびE102からなる群から選択される1つ以上のアミノ酸が、システイン以外の任意のアミノ酸に置換されている、抗体。

〔8〕FIXおよび／またはFIXaならびにFXを認識する二重特異性抗体であって、第一のポリペプチドと第三のポリペプチドが対を形成し、第二のポリペプチドと第四のポリペプチドが対を形成し、第二のポリペプチドは配列番号：46に記載の抗体重鎖可変ドメインのアミノ酸配列、第三のポリペプチドは配列番号：42に記載の抗体軽鎖のアミノ酸配列、第四のポリペプチドは配列番号：44に記載の抗体軽鎖のアミノ酸配列をそれぞれ含み、第一のポリペプチドは、配列番号：1、2、3に記載の重鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメインあるいは配列番号：45に記載のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメインを含み、ここで、第一のポリペプチドはKabat番号付けシステムに従って番号付けられた、Y31、Y32、D33、I34、Q35、S50、I51、S52、P52a、S53、G54、Q55、S56、T57、Y58、Y59、R60、R61、E62、V63、K64、G65、R95、T96、G97、R98、E99、Y100、G100a、G100b、G100c、W100d、Y100e、F100f、D101およびY102からなる群から選択される1つ以上のアミノ酸が、システイン以外の任意のアミノ酸に置換されている、抗体。

〔9〕FIXおよび／またはFIXaならびにFXを認識する二重特異性抗体であって

、第一のポリペプチドと第三のポリペプチドが対を形成し、第二のポリペプチドと第四のポリペプチドが対を形成し、第一のポリペプチドは配列番号：45に記載の抗体重鎖のアミノ酸配列、第三のポリペプチドは配列番号：43に記載の抗体軽鎖のアミノ酸配列、第四のポリペプチドは配列番号：44に記載の抗体軽鎖のアミノ酸配列をそれぞれ含み、第二のポリペプチドは、配列番号：4、5、6に記載の重鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメインあるいは配列番号：46に記載のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメインを含み、ここで、第二のポリペプチドはKabat番号付けシステムに従って番号付けられた、D31、N32、N33、M34、D35、D50、I51、T52a、N52、R53、S54、G55、G56、S57、I58、Y59、N60、E61、E62、F63、Q64、D65、R95、K96、S97、Y98、G99、Y100、Y100a、L100b、D101およびE102からなる群から選択される1つ以上のアミノ酸が、システイン以外の任意のアミノ酸に置換されている、抗体。

〔10〕抗体軽鎖であって、下記(a1)から(a6)、(b1)から(b23)及び(c1)から(c3)から選ばれるいずれかのアミノ酸配列を含む抗体軽鎖。

- (a1) 配列番号：13に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖 (QNK131)
- (a2) 配列番号：14に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖 (QNK284)
- (a3) 配列番号：15に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖 (QNK315)
- (a4) 配列番号：16に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖 (QNL182)
- (a5) 配列番号：17に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖 (QNL492)
- (a6) 配列番号：18に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖 (QNL576)
- (b1) 配列番号：19に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖 (JNK131)
- (b2) 配列番号：20に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖 (JNK163)
- (b3) 配列番号：21に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖 (JNK252)
- (b4) 配列番号：22に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖 (JNK263)
- (b5) 配列番号：23に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖 (JNK339)
- (b6) 配列番号：24に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖 (JNK348)

- (b7) 配列番号：25に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖 (JNK351)
- (b8) 配列番号：26に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖 (JNK360)
- (b9) 配列番号：27に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖 (JNK378)
- (b10) 配列番号：28に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖 (JNK382)
- (b11) 配列番号：29に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖 (JNL036)
- (b12) 配列番号：30に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖 (JNL072)
- (b13) 配列番号：31に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖 (JNL095)
- (b14) 配列番号：32に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖 (JNL176)
- (b15) 配列番号：33に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖 (JNL208)
- (b16) 配列番号：34に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖 (JNL224)
- (b17) 配列番号：35に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖 (JNL260)
- (b18) 配列番号：36に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖 (JNL056)
- (b19) 配列番号：37に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖 (JNL059)
- (b20) 配列番号：38に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖 (JNL226)
- (b21) 配列番号：39に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖 (JNL250)
- (b22) 配列番号：40に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖 (JNL263)
- (b23) 配列番号：41に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖 (JNL281)
- (c1) 配列番号：42に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖 (QAL187)
- (c2) 配列番号：43に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖 (QAL201)
- (c3) 配列番号：44に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖 (JYL280)

[11] FIXおよび／またはFIXaならびにFXを認識する二重特異性抗体であって、第一のポリペプチド(d)と第三のポリペプチド(f)が対を形成し、第二のポリペプチド(e)と第四のポリペプチド(g)が対を形成し、それぞれのポリペプチドが以下に記載のポリペプチドである抗体。

(d) 第一のポリペプチドは(d1)又は(d2)である。

(d1) 配列番号：1、2、3に記載の重鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメイン、あるいは配列番号：45に記載のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメインを含むポリペプチド

(d 2) 配列番号: 1、2、3に記載の重鎖CDR 1、2、3のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメインあるいは配列番号: 4 5に記載のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメインを含むポリペプチドであって、K a b a t 番号付けシステムに従って番号付けられた、Y3 1、Y3 2、D3 3、I3 4、Q3 5、S5 0、I5 1、S5 2、P5 2 a、S5 3、G5 4、Q5 5、S5 6、T5 7、Y5 8、Y5 9、R6 0、R6 1、E6 2、V6 3、K6 4、G6 5、R9 5、T9 6、G9 7、R9 8、E9 9、Y1 0 0、G1 0 0 a、G1 0 0 b、G1 0 0 c、W1 0 0 d、Y1 0 0 e、F1 0 0 f、D1 0 1 およびY1 0 2 からなる群から選択される1つ以上のアミノ酸が、システイン以外の任意のアミノ酸に置換されている、ポリペプチド。

(e) 第二のポリペプチドは (e 1) 又は (e 2) である。

(e 1) 配列番号: 4、5、6に記載の重鎖CDR 1、2、3のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメインあるいは配列番号: 4 6に記載のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメインを含むポリペプチド

(e 2) 配列番号: 4、5、6に記載の重鎖CDR 1、2、3のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメインあるいは配列番号: 4 6に記載のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメインを含むポリペプチドであって、K a b a t 番号付けシステムに従って番号付けられた、D3 1、N3 2、N3 3、M3 4、D3 5、D5 0、I5 1、T5 2 a、N5 2、R5 3、S5 4、G5 5、G5 6、S5 7、I5 8、Y5 9、N6 0、E6 1、E6 2、F6 3、Q6 4、D6 5、R9 5、K9 6、S9 7、Y9 8、G9 9、Y1 0 0、Y1 0 0 a、L1 0 0 b、D1 0 1 およびE1 0 2 からなる群から選択される1つ以上のアミノ酸が、システイン以外の任意のアミノ酸に置換されている、ポリペプチド。

(f) 第三のポリペプチドは (f 1)、(f 2) 又は (f 3) である。

(f 1) 配列番号: 7、8、9に記載の軽鎖CDR 1、2、3のアミノ酸配列を有する抗体軽鎖可変ドメイン、あるいは配列番号: 4 7に記載のアミノ酸配列を有する抗体軽鎖可変ドメインを含むポリペプチド

(f 2) 配列番号: 7、8、9に記載の軽鎖CDR 1、2、3のアミノ酸配列を

有する抗体軽鎖可変ドメインあるいは配列番号：47に記載のアミノ酸配列を有する抗体軽鎖可変ドメインを含むポリペプチドであって、Kabat番号付けシステムに従って番号付けられた、K24、A25、S26、R27、N28、I29、E30、R31、Q32、L33、A34、Q50、A51、S52、R53、K54、E55、S56、Q89、Q90、Y91、S92、D93、P94、P95、L96及びT97からなる群から選択される1つ以上のアミノ酸が、システイン以外の任意のアミノ酸に置換されている、ポリペプチド。

(f3) [10]に記載の(a1)から(a6)、および(c1)～(c2)のいずれかに記載のポリペプチド

(g) 第四のポリペプチドは(g1)、(g2)又は(g3)である。

(g1) 配列番号：7、8、9に記載の軽鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を有する抗体軽鎖可変ドメイン、あるいは配列番号：47に記載のアミノ酸配列を有する抗体軽鎖可変ドメインを含むポリペプチド

(g2) 配列番号：7、8、9に記載の軽鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を有する抗体軽鎖可変ドメインあるいは配列番号：47に記載のアミノ酸配列を有する抗体軽鎖可変ドメインを含むポリペプチドであって、Kabat番号付けシステムに従って番号付けられた、K24、A25、S26、R27、N28、I29、E30、R31、Q32、L33、A34、Q50、A51、S52、R53、K54、E55、S56、Q89、Q90、Y91、S92、D93、P94、P95、L96及びT97からなる群から選択される1つ以上のアミノ酸が、システイン以外の任意のアミノ酸に置換されている、ポリペプチド。

(g3) [10]に記載の(b1)から(b23)、および(c3)のいずれかに記載のポリペプチド。

[12] Emicizumab改変体を製造する方法であって、以下の工程(a)を含む、方法。

(a) 以下の(i)～(iii)のうち一以上により置換する工程であって、ここで、番号付けはKabat番号付けシステムに従う、工程；

(i) 配列番号：7、8、9に記載の軽鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を含

む抗体軽鎖可変ドメインにおいて、K24、A25、S26、R27、N28、I29、E30、R31、Q32、L33、A34、Q50、A51、S52、R53、K54、E55、S56、Q89、Q90、Y91、S92、D93、P94、P95、L96及びT97からなる群から選択される1つ以上のアミノ酸における置換

(ii) 配列番号：1、2、3に記載の重鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を含む抗体重鎖可変ドメインにおいて、Y31、Y32、D33、I34、Q35、S50、I51、S52、P52a、S53、G54、Q55、S56、T57、Y58、Y59、R60、R61、E62、V63、K64、G65、R95、T96、G97、R98、E99、Y100、G100a、G100b、G100c、W100d、Y100e、F100f、D101およびY102からなる群から選択される1つ以上のアミノ酸における置換

(iii) 配列番号：4、5、6に記載の重鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を含む抗体重鎖可変ドメインにおいて、D31、N32、N33、M34、D35、D50、I51、T52a、N52、R53、S54、G55、G56、S57、I58、Y59、N60、E61、E62、F63、Q64、D65、R95、K96、S97、Y98、G99、Y100、Y100a、L100b、D101およびE102からなる群から選択される1つ以上のアミノ酸における置換

[13] Emicizumab改変体を単離する方法であって、以下の工程(a)～(c)を含む、方法。

(a) 以下の(i)～(iii)のうち一以上によりEmicizumab改変体を産生する工程であって、ここで、番号付けはKabat番号付けシステムに従う、工程；

(i) 配列番号：7、8、9に記載の軽鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖可変ドメインにおいて、K24、A25、S26、R27、N28、I29、E30、R31、Q32、L33、A34、Q50、A51、S52、R53、K54、E55、S56、Q89、Q90、Y91、S92、D93、P94、P95、L96及びT97からなる群から選択される1つ以上のアミノ酸における置換

換

(ii) 配列番号：1、2、3に記載の重鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を含む抗体重鎖可変ドメインにおいて、Y31、Y32、D33、I34、Q35、S50、I51、S52、P52a、S53、G54、Q55、S56、T57、Y58、Y59、R60、R61、E62、V63、K64、G65、R95、T96、G97、R98、E99、Y100、G100a、G100b、G100c、W100d、Y100e、F100f、D101およびY102からなる群から選択される1つ以上のアミノ酸における置換

(iii) 配列番号：4、5、6に記載の重鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を含む抗体重鎖可変ドメインにおいて、D31、N32、N33、M34、D35、D50、I51、T52a、N52、R53、S54、G55、G56、S57、I58、Y59、N60、E61、E62、F63、Q64、D65、R95、K96、S97、Y98、G99、Y100、Y100a、L100b、D101およびE102からなる群から選択される1つ以上のアミノ酸における置換

(b) (a)において産生された該改変体のFVIII補因子機能代替活性を測定する工程；ならびに

(c) Emicizumabと比べてFVIII補因子機能代替活性が向上したEmicizumab改変体を選択する工程
を包含する、方法。

[0011] さらに下記〔14〕～〔26〕を提供するものである。

〔14〕抗体である、〔1〕、〔4〕および〔6〕のうちいずれか1つに記載のポリペプチド。

〔15〕ヒト化抗体、又はヒト抗体である、〔2〕、〔3〕、〔5〕、〔7〕～〔9〕、〔11〕および〔14〕のうちいずれか1つに記載の抗体。

〔16〕Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、ダイアボディ、線状抗体、単鎖抗体分子および抗体断片から形成された多重特異性抗体からなる群から選択される抗体である、〔2〕、〔3〕、〔5〕、〔7〕～〔9〕、〔11〕、〔14〕および〔15〕のいずれか1つに記載の抗体。

〔17〕〔2〕、〔3〕、〔5〕、〔7〕～〔9〕、〔11〕および〔14〕～〔16〕のいずれか1つに記載の抗体をコードする核酸。

〔18〕〔17〕に記載の核酸が挿入されたベクター。

〔19〕〔17〕に記載の核酸または〔17〕に記載のベクターを含む細胞。

〔20〕〔2〕、〔3〕、〔5〕、〔7〕～〔9〕、〔11〕および〔14〕～〔16〕のいずれかに記載の抗体ならびに薬学的に許容される担体を含む、薬学的製剤。

〔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/または治療に用いられる薬学的製剤であって、該疾患が、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、〔20〕に記載の薬学的製剤。

〔22〕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である、〔21〕に記載の薬学的製剤。

〔23〕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VII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、〔22〕に記載の薬学的製剤。

〔24〕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、後天性血友病である、〔21〕に記載の薬学的製剤。

〔25〕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、フォンビルブランド病である、〔21〕に記載の薬学的製剤。

〔26〕少なくとも〔2〕、〔3〕、〔5〕、〔7〕～〔9〕、〔11〕および〔14〕～〔16〕のいずれか1つに記載の抗体を含む、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

いるための治療用品の商用パッケージ。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]新規L鎖を有する二重特異性抗体のFVIII補因子機能代替活性を示すグラフである。

[図2]Q499/QAL201//J327/JYL280およびQ499/L404//J327/L404のFVIII補因子機能代替活性を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0013] 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）および抗体断片を含む、種々の抗体構造を包含する。

[0014] 「抗体断片」は、完全抗体が結合する抗原に結合する当該完全抗体の一部を含む、当該完全抗体以外の分子のことをいう。抗体断片の例は、これらに限定されるものではないが、Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂；ダイアボディ；線状抗体；単鎖抗体分子（例えば、scFv）；および、抗体断片から形成された多重特異性抗体を含む。

[0015] 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、 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 、および μ と呼ぶ。

[0016] ある剤（例えば、薬学的製剤）の「有効量」は、所望の治療的または予防的結果を達成するために有効である、必要な用量におけるおよび必要な期間にわたっての、量のことをいう。

[0017] 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。

[0018] 「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。

[0019] 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。

[0020] 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。

[0021] 「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。

[0022] 「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。

[0023] 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. 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。

[0024] 「単離された」抗体は、そのもともとの環境の成分から分離されたものである。いくつかの態様において、抗体は、例えば、電気泳動（例えば、SDS-PAGE、等電点分離法（isoelectric focusing: IEF）、キャピラリー電気泳動）またはクロマトグラフ（例えば、イオン交換または逆相HPLC）で測定して、95%または99%を超える純度まで精製される。抗体の純度の評価のための方法の総説として、例えば、Flatman et al., J. Chromatogr. B 848:79-87 (2007)を参照のこと。

[0025] 「単離された」核酸は、そのもともとの環境の成分から分離された核酸分子のことをいう。単離された核酸は、その核酸分子を通常含む細胞の中に含まれた核酸分子を含むが、その核酸分子は染色体外に存在しているかまたは本来の染色体上の位置とは異なる染色体上の位置に存在している。

[0026] 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。

- [0027] 「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（ κ ）およびラムダ（ λ ）と呼ばれる、2つのタイプの1つに帰属させられてよい。
- [0028] 用語「添付文書」は、治療用品の商用パッケージに通常含まれ、そのような治療用品の使用に関する、適応症、用法、用量、投与方法、併用療法、禁忌、および／または警告についての情報を含む使用説明書のことをいうために用いられる。
- [0029] 用語「薬学的製剤」は、その中に含まれた有効成分の生物学的活性が効果を発揮し得るような形態にある調製物であって、かつ製剤が投与される被験体に許容できない程度に毒性のある追加の要素を含んでいない、調製物のことをいう。
- [0030] 「薬学的に許容される担体」は、被験体に対して無毒な、薬学的製剤中の有効成分以外の成分のことをいう。薬学的に許容される担体は、これらに限定されるものではないが、緩衝液、賦形剤、安定化剤、または保存剤を含む。
- [0031] 本明細書でいう用語「FIX」、「FIXa」及び「FX」は、別段示さない限り、霊長類（例えば、ヒト）およびげっ歯類（例えば、マウスおよびラット）な

どの哺乳動物を含む、任意の脊椎動物供給源からの任意の天然型FIX、FIXa及びFXのことをいう。この用語は、「全長」のプロセッシングを受けていないFIX、FIXa及びFXも、細胞中でのプロセッシングの結果生じるいかなる形態のFIX、FIXa及びFXも包含する。この用語はまた、自然に生じるFIX、FIXa及びFXの変異体、例えば、スプライス変異体や対立遺伝子変異体も包含する。

[0032] 本明細書で用いられる「治療」（および、その文法上の派生語、例えば「治療する」、「治療すること」など）は、治療される個体の自然経過を改変することを企図した臨床的介入を意味し、予防のためにも、臨床的病態の経過の間にも実施され得る。治療の望ましい効果は、これらに限定されるものではないが、疾患の発生または再発の防止、症状の軽減、疾患による任意の直接的または間接的な病理的影響の減弱、転移の防止、疾患の進行速度の低減、疾患状態の回復または緩和、および寛解または改善された予後を含む。いくつかの態様において、本発明の抗体は、疾患の発症を遅らせる、または疾患の進行を遅くするために用いられる。

[0033] 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ろう。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。

[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] FIXおよび／またはFIXaならびにFXの双方に結合し、FVIIIの機能を代替する二重特異性抗体であるEmicizumab (ACE910) は以下に記載したとおりである。第一のポリペプチドと第三のポリペプチドが対を形成し、第二のポリペプチドと第四のポリペプチドが対を形成する二重特異性抗体であって、第一のポリペプチドが配列番号：1、2、3 (Q499のH鎖CDR) に記載のH鎖CDR 1、2、3のアミノ酸配列を含むH鎖、第二のポリペプチドが配列番号：4、5、6 (J327のH鎖CDR) に記載のH鎖CDR 1、2、3のアミノ酸配列を含むH鎖、第三のポリペプチドと第四のポリペプチドが配列番号：7、8、9 (L404のL鎖CDR) に記載のL鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を含む共通L鎖からなる二重特異性抗体 (Q499-z121/J327-z119/L404-k) 。

さらに具体的には、前記二重特異性抗体は、第一のポリペプチドと第三のポリペプチドが対を形成し、第二のポリペプチドと第四のポリペプチドが対を形成する二重特異性抗体であって、第一のポリペプチドが配列番号：45に記載の抗体重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を含むH鎖、第二のポリペプチドが配列番号：46に記載の抗体重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を含むH鎖、および第三のポリペプチドと第四のポリペプチドが配列番号：47に記載の抗体軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列を含む共通L鎖からなる二重特異性抗体 (Q499-z121/J327-z119/L404-k) である。

さらに具体的には、前記二重特異性抗体は、第一のポリペプチドと第三のポリペプチドが対を形成し、第二のポリペプチドと第四のポリペプチドが対を形成する二重特異性抗体であって、第一のポリペプチドが配列番号：10に記載のアミノ酸配列を含むH鎖、第二のポリペプチドが配列番号：11に記載のアミノ酸配列を含むH鎖、および第三のポリペプチドと第四のポリペプチドが配列番号：12に記載のアミノ酸配列を含む共通L鎖からなる二重特異性抗体 (Q499-z121/J327-z119/L404-k) である。

このような抗体は、例えばW02005/035756、W02006/109592、W02012/067176などに記載の方法に従って取得することができる。以下、本明細書ではEmicizumabとACE910は同義である。

[0036] 一局面において、本発明における「Emicizumab改変体」とは、Emizicumabの重鎖可変領域あるいは軽鎖可変領域のアミノ酸配列の少なくとも一つ以上がEmizicumabのアミノ酸配列と異なるポリペプチドあるいは抗体を意味し、本発明の目的を達成できる範囲であらゆる改変体が含まれる。一つの態様として、改変体の一部の重鎖あるいは軽鎖の可変領域のすべてがEmicizumabの可変領域と異なっても、本発明の改変体に含みうる。

例えばEmicizumab改変体とは以下にあげるポリペプチド及び抗体であるが、これらに限定されるものではない。

[0037] 一局面において、本発明は、抗体軽鎖可変ドメインを含むポリペプチドであって、配列番号：7、8、9に記載の軽鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を有する抗体軽鎖可変ドメインあるいは配列番号：47に記載のアミノ酸配列を有する抗体軽鎖可変ドメインを含み、ここで、K a b a t 番号付けシステムに従って番号付けられた、K24、A25、S26、R27、N28、I29、E30、R31、Q32、L33、A34、Q50、A51、S52、R53、K54、E55、S56、Q89、Q90、Y91、S92、D93、P94、P95、L96及びT97からなる群から選択される1つ以上のアミノ酸が、システイン以外の任意のアミノ酸に置換されている、ポリペプチドを提供する。

[0038] 別の局面において、本発明は、FIXおよび／またはFIXaならびにFXを認識する二重特異性抗体であって、配列番号：7、8、9に記載の軽鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を有する抗体軽鎖可変ドメインあるいは配列番号：47に記載のアミノ酸配列を有する抗体軽鎖可変ドメインを含み、ここで、K a b a t 番号付けシステムに従って番号付けられた、K24、A25、S26、R27、N28、I29、E30、R31、Q32、L33、A34、Q50、A51、S52、R53、K54、E55、S56、Q89、Q90、Y91、S92、D93、P94、P95、L96及びT97からなる群から選択される1つ以上のアミノ

酸が、システイン以外の任意のアミノ酸に置換されている、抗体を提供する。

[0039] 別の局面において、本発明は、FIXおよび／またはFIXaならびにFXを認識する二重特異性抗体であって、第一のポリペプチドと第三のポリペプチドが対を形成し、第二のポリペプチドと第四のポリペプチドが対を形成し、第一のポリペプチドは配列番号：45に記載の抗体重鎖可変ドメインのアミノ酸配列、第二のポリペプチドは配列番号：46に記載の抗体重鎖可変ドメインのアミノ酸配列をそれぞれ含み、第三のポリペプチド及び第四のポリペプチドのいずれか一方のポリペプチドは配列番号：47に記載の抗体軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列を含み、他方のポリペプチドは、配列番号：7、8、9に記載の軽鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を有する抗体軽鎖可変ドメインあるいは配列番号：47に記載のアミノ酸配列を有する抗体軽鎖可変ドメインを含み、ここで、他方のポリペプチドはKabat番号付けシステムに従って番号付けられた、K24、A25、S26、R27、N28、I29、E30、R31、Q32、L33、A34、Q50、A51、S52、R53、K54、E55、S56、Q89、Q90、Y91、S92、D93、P94、P95、L96及びT97からなる群から選択される1つ以上のアミノ酸が、システイン以外の任意のアミノ酸に置換されている、抗体を提供する。

[0040] 別の局面において、本発明は、抗体重鎖可変ドメインを含むポリペプチドであって、配列番号：1、2、3に記載の重鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメインあるいは配列番号：45に記載のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメインを含み、ここで、Kabat番号付けシステムに従って番号付けられた、Y31、Y32、D33、I34、Q35、S50、I51、S52、P52a、S53、G54、Q55、S56、T57、Y58、Y59、R60、R61、E62、V63、K64、G65、R95、T96、G97、R98、E99、Y100、G100a、G100b、G100c、W100d、Y100e、F100f、D101およびY102からなる群から選択される1つ以上のアミノ酸が、システイン以外の任意のアミノ酸に置換されている、ポリペプチ

ドを提供する。

[0041] 別の局面において、本発明は、FIXおよび／またはFIXaならびにFXを認識する二重特異性抗体であって、配列番号：1、2、3に記載の重鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメインあるいは配列番号：45に記載のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメインを含み、ここで、K a b a t 番号付けシステムに従って番号付けられた、Y31、Y32、D33、I34、Q35、S50、I51、S52、P52a、S53、G54、Q55、S56、T57、Y58、Y59、R60、R61、E62、V63、K64、G65、R95、T96、G97、R98、E99、Y100、G100a、G100b、G100c、W100d、Y100e、F100f、D101およびY102からなる群から選択される1つ以上のアミノ酸が、システイン以外の任意のアミノ酸に置換されている、抗体を提供する。

[0042] 別の局面において、本発明は、抗体重鎖可変ドメインを含むポリペプチドであって、配列番号：4、5、6に記載の重鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメインあるいは配列番号：46に記載のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメインを含み、ここで、K a b a t 番号付けシステムに従って番号付けられた、D31、N32、N33、M34、D35、D50、I51、N52、T52a、R53、S54、G55、G56、S57、I58、Y59、N60、E61、E62、F63、Q64、D65、R95、K96、S97、Y98、G99、Y100、Y100a、L100b、D101およびE102からなる群から選択される1つ以上のアミノ酸が、システイン以外の任意のアミノ酸に置換されている、ポリペプチドを提供する。

[0043] 別の局面において、本発明は、FIXおよび／またはFIXaならびにFXを認識する二重特異性抗体であって、配列番号：4、5、6に記載の重鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメインあるいは配列番号：46に記載のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメインを含み、ここで、K a b a t 番号付けシステムに従って番号付けられた、D31、N32、N33、M34、D35、D50、I51、N52、T52a、R53、S54、G55、G56

、S57、I58、Y59、N60、E61、E62、F63、Q64、D65、R95、K96、S97、Y98、G99、Y100、Y100a、L100b、D101およびE102からなる群から選択される1つ以上のアミノ酸が、システイン以外の任意のアミノ酸に置換されている、抗体を提供する。

[0044] 別の局面において、本発明は、FIXおよび／またはFIXaならびにFXを認識する二重特異性抗体であって、第一のポリペプチドと第三のポリペプチドが対を形成し、第二のポリペプチドと第四のポリペプチドが対を形成し、第二のポリペプチドは配列番号：46に記載の抗体重鎖可変ドメインのアミノ酸配列、第三のポリペプチドは配列番号：42に記載の抗体軽鎖のアミノ酸配列、第四のポリペプチドは配列番号：44に記載の抗体軽鎖のアミノ酸配列をそれぞれ含み、第一のポリペプチドは、配列番号：1、2、3に記載の重鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメインあるいは配列番号：45に記載のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメインを含み、ここで、第一のポリペプチドはKabat番号付けシステムに従って番号付けられた、Y31、Y32、D33、I34、Q35、S50、I51、S52、P52a、S53、G54、Q55、S56、T57、Y58、Y59、R60、R61、E62、V63、K64、G65、R95、T96、G97、R98、E99、Y100、G100a、G100b、G100c、W100d、Y100e、F100f、D101およびY102からなる群から選択される1つ以上のアミノ酸が、システイン以外の任意のアミノ酸に置換されている、抗体を提供する。

[0045] 別の局面において、本発明は、FIXおよび／またはFIXaならびにFXを認識する二重特異性抗体であって、第一のポリペプチドと第三のポリペプチドが対を形成し、第二のポリペプチドと第四のポリペプチドが対を形成し、第一のポリペプチドは配列番号：45に記載の抗体重鎖のアミノ酸配列、第三のポリペプチドは配列番号：43に記載の抗体軽鎖のアミノ酸配列、第四のポリペプチドは配列番号：44に記載の抗体軽鎖のアミノ酸配列をそれぞれ含み、第二のポリペプチドは、配列番号：4、5、6に記載の重鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメインあるいは配列番号：46に記

載のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメインを含み、ここで、第二のポリペプチドはK a b a t 番号付けシステムに従って番号付けられた、D31、N32、N33、M34、D35、D50、I51、T52a、N52、R53、S54、G55、G56、S57、I58、Y59、N60、E61、E62、F63、Q64、D65、R95、K96、S97、Y98、G99、Y100、Y100a、L100b、D101およびE102からなる群から選択される1つ以上のアミノ酸が、システイン以外の任意のアミノ酸に置換されている、抗体を提供する。

[0046] 別の局面において、本発明は、抗体軽鎖であって、下記 (a1) から (a6) 及び (b1) から (b23) から選ばれるいずれかのアミノ酸配列を含む新規な抗体軽鎖を提供する。当該軽鎖は、Emicizumabに含まれる共通軽鎖を代替する軽鎖として使用することが出来る。下記 (a1) から (a6) の軽鎖はFIXおよび/またはFIXaと結合する軽鎖であり、下記 (b1) から (b23) のL鎖は、FXと結合する軽鎖の一例である。

(a1) 配列番号：13に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖 (QNK131)

(a2) 配列番号：14に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖 (QNK284)

(a3) 配列番号：15に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖 (QNK315)

(a4) 配列番号：16に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖 (QNL182)

(a5) 配列番号：17に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖 (QNL492)

(a6) 配列番号：18に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖 (QNL576)

(b1) 配列番号：19に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖 (JNK131)

(b2) 配列番号：20に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖 (JNK163)

(b3) 配列番号：21に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖 (JNK252)

(b4) 配列番号：22に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖 (JNK263)

(b5) 配列番号：23に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖 (JNK339)

(b6) 配列番号：24に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖 (JNK348)

(b7) 配列番号：25に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖 (JNK351)

(b8) 配列番号：26に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖 (JNK360)

- (b9) 配列番号：27に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖 (JNK378)
 - (b10) 配列番号：28に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖 (JNK382)
 - (b11) 配列番号：29に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖 (JNL036)
 - (b12) 配列番号：30に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖 (JNL072)
 - (b13) 配列番号：31に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖 (JNL095)
 - (b14) 配列番号：32に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖 (JNL176)
 - (b15) 配列番号：33に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖 (JNL208)
 - (b16) 配列番号：34に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖 (JNL224)
 - (b17) 配列番号：35に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖 (JNL260)
 - (b18) 配列番号：36に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖 (JNL056)
 - (b19) 配列番号：37に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖 (JNL059)
 - (b20) 配列番号：38に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖 (JNL226)
 - (b21) 配列番号：39に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖 (JNL250)
 - (b22) 配列番号：40に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖 (JNL263)
 - (b23) 配列番号：41に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖 (JNL281)
- 特定の態様において、本発明は、上記 (a1) から (a6) 及び (b1) から (b23) の抗体L鎖の変異体を提供する。

[0047] 一態様において、本発明は、以下の抗体L鎖変異体を提供する。

- (c1) 配列番号：13に記載の抗体軽鎖の変異体であって配列番号：42に記載のアミノ酸配列を有する抗体軽鎖 (QAL187)
- (c2) 配列番号：13に記載の抗体軽鎖の変異体であって配列番号：43に記載のアミノ酸配列を有する抗体L鎖 (QAL201)
- (c3) 配列番号：31に記載の抗体軽鎖の変異体であって配列番号：44に記載のアミノ酸配列を有する抗体L鎖 (JYL280)

[0048] 別の局面において、本発明は、FIXおよび／またはFIXaならびにFXを認識する二重特異性抗体であって、第一のポリペプチド (d) と第三のポリペプチド (f) が対を形成し、第二のポリペプチド (e) と第四のポリペプチド (g) が対を形成し、それぞれのポリペプチドが以下に記載のポリペプチドである

抗体を提供する。

(d) 第一のポリペプチドは (d 1) 又は (d 2) である。

(d 1) 配列番号: 1、2、3に記載の重鎖CDR 1、2、3のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメイン、あるいは配列番号: 4 5に記載のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメインを含むポリペプチド

(d 2) 配列番号: 1、2、3に記載の重鎖CDR 1、2、3のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメインあるいは配列番号: 4 5に記載のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメインを含むポリペプチドであって、K a b a t 番号付けシステムに従って番号付けられた、Y3 1、Y3 2、D3 3、I3 4、Q3 5、S5 0、I5 1、S5 2、P5 2 a、S5 3、G5 4、Q5 5、S5 6、T5 7、Y 5 8、Y5 9、R6 0、R6 1、E6 2、V6 3、K6 4、G6 5、R9 5、T9 6、G9 7、R9 8、E9 9、Y1 0 0、G1 0 0 a、G1 0 0 b、G1 0 0 c、W1 0 0 d、Y1 0 0 e、F1 0 0 f、D1 0 1 および Y1 0 2 からなる群から選択される 1 つ以上のアミノ酸が、システイン以外の任意のアミノ酸に置換されている、ポリペプチド。

(e) 第二のポリペプチドは (e 1) 又は (e 2) である。

(e 1) 配列番号: 4、5、6に記載の重鎖CDR 1、2、3のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメイン、あるいは配列番号: 4 6に記載のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメインを含むポリペプチド

(e 2) 配列番号: 4、5、6に記載の重鎖CDR 1、2、3のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメインあるいは配列番号: 4 6に記載のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメインを含むポリペプチドであって、K a b a t 番号付けシステムに従って番号付けられた、D3 1、N3 2、N3 3、M3 4、D3 5、D5 0、I5 1、T5 2 a、N5 2、R5 3、S5 4、G5 5、G5 6、S5 7、I5 8、Y5 9、N6 0、E6 1、E6 2、F6 3、Q6 4、D6 5、R9 5、K9 6、S9 7、Y9 8、G9 9、Y1 0 0、Y1 0 0 a、L1 0 0 b、D1 0 1 および E1 0 2 からなる群から選択される 1 つ以上のアミノ酸が、システイン以外の任意のアミノ酸に置換されている、ポリペプチド。

(f) 第三のポリペプチドは (f 1)、(f 2) 又は (f 3) である。

(f 1) 配列番号: 7、8、9 に記載の軽鎖 CDR 1、2、3 のアミノ酸配列を有する抗体軽鎖可変ドメイン、あるいは配列番号: 47 に記載のアミノ酸配列を有する抗体軽鎖可変ドメインを含むポリペプチド

(f 2) 配列番号: 7、8、9 に記載の軽鎖 CDR 1、2、3 のアミノ酸配列を有する抗体軽鎖可変ドメインあるいは配列番号: 47 に記載のアミノ酸配列を有する抗体軽鎖可変ドメインを含むポリペプチドであって、Kabat 番号付けシステムに従って番号付けられた、K24、A25、S26、R27、N28、I29、E30、R31、Q32、L33、A34、Q50、A51、S52、R53、K54、E55、S56、Q89、Q90、Y91、S92、D93、P94、P95、L96 及び T97 からなる群から選択される 1 つ以上のアミノ酸が、システイン以外の任意のアミノ酸に置換されている、ポリペプチド。

(f 3) [11] に記載の (a1) から (a6)、および (c1) ~ (c2) のいずれかに記載のポリペプチド

(g) 第四のポリペプチドは (g 1)、(g 2) 又は (g 3) である。

(g 1) 配列番号: 7、8、9 に記載の軽鎖 CDR 1、2、3 のアミノ酸配列を有する抗体軽鎖可変ドメイン、あるいは配列番号: 47 に記載のアミノ酸配列を有する抗体軽鎖可変ドメインを含むポリペプチド

(g 2) 配列番号: 7、8、9 に記載の軽鎖 CDR 1、2、3 のアミノ酸配列を有する抗体軽鎖可変ドメインあるいは配列番号: 47 に記載のアミノ酸配列を有する抗体軽鎖可変ドメインを含むポリペプチドであって、Kabat 番号付けシステムに従って番号付けられた、K24、A25、S26、R27、N28、I29、E30、R31、Q32、L33、A34、Q50、A51、S52、R53、K54、E55、S56、Q89、Q90、Y91、S92、D93、P94、P95、L96 及び T97 からなる群から選択される 1 つ以上のアミノ酸が、システイン以外の任意のアミノ酸に置換されている、ポリペプチド。

(g 3) [11] に記載の (b1) から (b23)、および (c3) のいずれかに記載のポリペプチド。

[0049] 一局面において、本発明は、配列番号：7、8、9に記載の軽鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を有する抗体軽鎖可変ドメインにおける下記位置におけるアミノ酸残基、あるいは配列番号：47に記載の抗体軽鎖可変ドメインにおける下記位置におけるアミノ酸残基、の少なくとも一つ以上が、以下に記載のアミノ酸残基のいずれかである、ポリペプチドあるいは抗体を提供する。

前記ポリペプチドあるいは抗体において、配列番号：7、8、9に記載の軽鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を有する抗体軽鎖可変ドメインと異なるアミノ酸残基、あるいは配列番号：47に記載の抗体軽鎖可変ドメインと異なるアミノ酸残基の数は一つ以上であればよく、好ましくは2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20であり、さらに好ましくは21以上である。尚、置換位置はK a b a t 番号付けシステムに従って番号付けられる位置を示す。

K24 : A、I、L、M、P、V、G、N、Q、S、T、D、E、H、R、F、W、Y

A25 : I、L、M、P、V、G、N、Q、S、T、D、E、H、K、R、F、W、Y

S26 : A、I、L、M、P、V、G、N、Q、T、D、E、H、K、R、F、W、Y

R27 : A、I、L、M、P、V、G、N、Q、S、T、D、E、H、K、F、W、Y

N28 : A、I、L、M、P、V、G、Q、S、T、D、E、H、K、R、F、W、Y

I29 : A、L、M、P、V、G、N、Q、S、T、D、E、H、K、R、F、W、Y

E30 : A、I、L、M、P、V、G、N、Q、S、T、D、H、K、R、F、W、Y

R31 : A、I、L、M、P、V、G、N、Q、S、T、D、E、H、K、F、W、Y

Q32 : A、I、L、M、P、V、G、N、S、T、D、E、H、K、R、F、W、Y

L33 : A、I、M、P、V、G、N、Q、S、T、D、E、H、K、R、F、W、Y

A34 : I、L、M、P、V、G、N、Q、S、T、D、E、H、K、R、F、W、Y

Q50 : A、I、L、M、P、V、G、N、S、T、D、E、H、K、R、F、W、Y

A51 : I、L、M、P、V、G、N、Q、S、T、D、E、H、K、R、F、W、Y

S52 : A、I、L、M、P、V、G、N、Q、T、D、E、H、K、R、F、W、Y

R53 : A、I、L、M、P、V、G、N、Q、S、T、D、E、H、K、F、W、Y

K54 : A、I、L、M、P、V、G、N、Q、S、T、D、E、H、R、F、W、Y
E55 : A、I、L、M、P、V、G、N、Q、S、T、D、H、K、R、F、W、Y
S56 : A、I、L、M、P、V、G、N、Q、T、D、E、H、K、R、F、W、Y
Q89 : A、I、L、M、P、V、G、N、S、T、D、E、H、K、R、F、W、Y
Q90 : A、I、L、M、P、V、G、N、S、T、D、E、H、K、R、F、W、Y
Y91 : A、I、L、M、P、V、G、N、Q、S、T、D、E、H、K、R、F、W
S92 : A、I、L、M、P、V、G、N、Q、T、D、E、H、K、R、F、W、Y
D93 : A、I、L、M、P、V、G、N、Q、S、T、E、H、K、R、F、W、Y
P94 : A、I、L、M、V、G、N、Q、S、T、D、E、H、K、R、F、W、Y
P95 : A、I、L、M、V、G、N、Q、S、T、D、E、H、K、R、F、W、Y
L96 : A、I、M、P、V、G、N、Q、S、T、D、E、H、K、R、F、W、Y
T97 : A、I、L、M、P、V、G、N、Q、S、D、E、H、K、R、F、W、Y

[0050] 一局面において、本発明は、配列番号：1、2、3に記載の重鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメインにおける下記位置におけるアミノ酸残基、あるいは配列番号：45に記載の抗体重鎖可変ドメインにおける下記位置におけるアミノ酸残基、の少なくとも一つ以上が、以下に記載のアミノ酸残基のいずれかである、ポリペプチドあるいは抗体を提供する。

前記ポリペプチドあるいは抗体において、配列番号：1、2、3に記載の重鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメインと異なるアミノ酸残基、あるいは配列番号：45に記載の抗体重鎖可変ドメインと異なるアミノ酸残基の数は一つ以上であればよく、好ましくは2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20であり、さらに好ましくは21以上である。尚、置換位置はK a b a t 番号付けシステムに従って番号付けられる位置を示す。

Y31 : A、I、L、M、P、V、G、N、Q、S、T、D、E、H、K、R、F、W
Y32 : A、I、L、M、P、V、G、N、Q、S、T、D、E、H、K、R、F、W
D33 : A、I、L、M、P、V、G、N、Q、S、T、E、H、K、R、F、W、Y

I34 : A, L, M, P, V, G, N, Q, S, T, D, E, H, K, R, F, W, Y
Q35 : A, I, L, M, P, V, G, N, S, T, D, E, H, K, R, F, W, Y
S50 : A, I, L, M, P, V, G, N, Q, T, D, E, H, K, R, F, W, Y
I51 : A, L, M, P, V, G, N, Q, S, T, D, E, H, K, R, F, W, Y
S52 : A, I, L, M, P, V, G, N, Q, T, D, E, H, K, R, F, W, Y
P52a : A, I, L, M, V, G, N, Q, S, T, D, E, H, K, R, F, W, Y
S53 : A, I, L, M, P, V, G, N, Q, T, D, E, H, K, R, F, W, Y
G54 : A, I, L, M, P, V, N, Q, S, T, D, E, H, K, R, F, W, Y
Q55 : A, I, L, M, P, V, G, N, S, T, D, E, H, K, R, F, W, Y
S56 : A, I, L, M, P, V, G, N, Q, T, D, E, H, K, R, F, W, Y
T57 : A, I, L, M, P, V, G, N, Q, S, D, E, H, K, R, F, W, Y
Y58 : A, I, L, M, P, V, G, N, Q, S, T, D, E, H, K, R, F, W
Y59 : A, I, L, M, P, V, G, N, Q, S, T, D, E, H, K, R, F, W
R60 : A, I, L, M, P, V, G, N, Q, S, T, D, E, H, K, F, W, Y
R61 : A, I, L, M, P, V, G, N, Q, S, T, D, E, H, K, F, W, Y
E62 : A, I, L, M, P, V, G, N, Q, S, T, D, H, K, R, F, W, Y
V63 : A, I, L, M, P, G, N, Q, S, T, D, E, H, K, R, F, W, Y
K64 : A, I, L, M, P, V, G, N, Q, S, T, D, E, H, R, F, W, Y
G65 : A, I, L, M, P, V, N, Q, S, T, D, E, H, K, R, F, W, Y
R95 : A, I, L, M, P, V, G, N, Q, S, T, D, E, H, K, F, W, Y
T96 : A, I, L, M, P, V, G, N, Q, S, D, E, H, K, R, F, W, Y
G97 : A, I, L, M, P, V, N, Q, S, T, D, E, H, K, R, F, W, Y
R98 : A, I, L, M, P, V, G, N, Q, S, T, D, E, H, K, F, W, Y
E99 : A, I, L, M, P, V, G, N, Q, S, T, D, H, K, R, F, W, Y
Y100 : A, I, L, M, P, V, G, N, Q, S, T, D, E, H, K, R, F, W
G100a : A, I, L, M, P, V, N, Q, S, T, D, E, H, K, R, F, W, Y
G100b : A, I, L, M, P, V, N, Q, S, T, D, E, H, K, R, F, W, Y
G100c : A, I, L, M, P, V, N, Q, S, T, D, E, H, K, R, F, W, Y

W100d : A、I、L、M、P、V、G、N、Q、S、T、D、E、H、K、R、F、Y

Y100e : A、I、L、M、P、V、G、N、Q、S、T、D、E、H、K、R、F、W

F100f : A、I、L、M、P、V、G、N、Q、S、T、D、E、H、K、R、W、Y

D101 : A、I、L、M、P、V、G、N、Q、S、T、E、H、K、R、F、W、Y

Y102 : A、I、L、M、P、V、G、N、Q、S、T、D、E、H、K、R、F、W

[0051] 一局面において、本発明は、配列番号：4、5、6に記載の重鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメインにおける下記位置におけるアミノ酸残基、あるいは配列番号：46に記載の抗体重鎖可変ドメインにおける下記位置におけるアミノ酸残基、の少なくとも一つ以上が、以下に記載のアミノ酸残基のいずれかである、ポリペプチドあるいは抗体を提供する。

前記ポリペプチドあるいは抗体において、配列番号：4、5、6に記載の重鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメインと異なるアミノ酸残基、あるいは配列番号：46に記載の抗体重鎖可変ドメインと異なるアミノ酸残基の数は一つ以上であればよく、好ましくは2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20であり、さらに好ましくは21以上である。尚、置換位置はKabat番号付けシステムに従って番号付けられる位置を示す。

D31 : A、I、L、M、P、V、G、N、Q、S、T、E、H、K、R、F、W、Y

N32 : A、I、L、M、P、V、G、Q、S、T、D、E、H、K、R、F、W、Y

N33 : A、I、L、M、P、V、G、Q、S、T、D、E、H、K、R、F、W、Y

M34 : A、I、L、P、V、G、N、Q、S、T、D、E、H、K、R、F、W、Y

D35 : A、I、L、M、P、V、G、N、Q、S、T、E、H、K、R、F、W、Y

D50 : A、I、L、M、P、V、G、N、Q、S、T、E、H、K、R、F、W、Y

I51 : A、L、M、P、V、G、N、Q、S、T、D、E、H、K、R、F、W、Y

N52 : A、I、L、M、P、V、G、Q、S、T、D、E、H、K、R、F、W、Y

T52a : A、I、L、M、P、V、G、N、Q、S、D、E、H、K、R、F、W、Y

R53 : A、I、L、M、P、V、G、N、Q、S、T、D、E、H、K、F、W、Y

S54 : A、I、L、M、P、V、G、N、Q、T、D、E、H、K、R、F、W、Y
G55 : A、I、L、M、P、V、N、Q、S、T、D、E、H、K、R、F、W、Y
G56 : A、I、L、M、P、V、N、Q、S、T、D、E、H、K、R、F、W、Y
S57 : A、I、L、M、P、V、G、N、Q、T、D、E、H、K、R、F、W、Y
I58 : A、L、M、P、V、G、N、Q、S、T、D、E、H、K、R、F、W、Y
Y59 : A、I、L、M、P、V、G、N、Q、S、T、D、E、H、K、R、F、W
N60 : A、I、L、M、P、V、G、Q、S、T、D、E、H、K、R、F、W、Y
E61 : A、I、L、M、P、V、G、N、Q、S、T、D、H、K、R、F、W、Y
E62 : A、I、L、M、P、V、G、N、Q、S、T、D、H、K、R、F、W、Y
F63 : A、I、L、M、P、V、G、N、Q、S、T、D、E、H、K、R、W、Y
Q64 : A、I、L、M、P、V、G、N、S、T、D、E、H、K、R、F、W、Y
D65 : A、I、L、M、P、V、G、N、Q、S、T、E、H、K、R、F、W、Y
R95 : A、I、L、M、P、V、G、N、Q、S、T、D、E、H、K、F、W、Y
K96 : A、I、L、M、P、V、G、N、Q、S、T、D、E、H、R、F、W、Y
S97 : A、I、L、M、P、V、G、N、Q、T、D、E、H、K、R、F、W、Y
Y98 : A、I、L、M、P、V、G、N、Q、S、T、D、E、H、K、R、F、W
G99 : A、I、L、M、P、V、N、Q、S、T、D、E、H、K、R、F、W、Y
Y100 : A、I、L、M、P、V、G、N、Q、S、T、D、E、H、K、R、F、W
Y100a : A、I、L、M、P、V、G、N、Q、S、T、D、E、H、K、R、F、W
L100b : A、I、M、P、V、G、N、Q、S、T、D、E、H、K、R、F、W、Y
D101 : A、I、L、M、P、V、G、N、Q、S、T、E、H、K、R、F、W、Y
E102 : A、I、L、M、P、V、G、N、Q、S、T、D、H、K、R、F、W、Y

[0052] 一態様において、本発明は、FIXおよび／またはFIXaならびにFXを認識する二重特異性抗体であって、第一のポリペプチドと第三のポリペプチドが対を形成し、第二のポリペプチドと第四のポリペプチドが対を形成し、第一のポリペプチドは配列番号：45に記載の抗体重鎖可変ドメインのアミノ酸配列、第二のポリペプチドは配列番号：46に記載の抗体重鎖可変ドメインのアミノ酸配列、第四のポリペプチドは配列番号：47に記載の抗体軽鎖可変ド

メインのアミノ酸配列をそれぞれ含み、第三のポリペプチドは上記 (a1) から (a6) から選ばれるいずれかのアミノ酸配列を含む抗体軽鎖を含む、抗体を提供する。

[0053] 別の態様において、本発明は、FIXおよび／またはFIXaならびにFXを認識する二重特異性抗体であって、第一のポリペプチドと第三のポリペプチドが対を形成し、第二のポリペプチドと第四のポリペプチドが対を形成し、第一のポリペプチドは配列番号：45に記載の抗体重鎖可変ドメインのアミノ酸配列、第三のポリペプチドは配列番号：47に記載の抗体軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列、第二のポリペプチドは配列番号：46に記載の抗体重鎖可変ドメインのアミノ酸配列をそれぞれ含み、第四のポリペプチドは上記 (b1) から (b23) から選ばれるいずれかのアミノ酸配列を含む抗体軽鎖を含む、抗体を提供する。

[0054] 特定の態様において、本発明は、本明細書で提供されるポリペプチド及び抗体の変異体を提供する。

特定の態様において、本明細書で提供される変異体には、アミノ酸配列中のアミノ酸残基の欠失、および／またはアミノ酸配列中へのアミノ酸残基の挿入、および／またはアミノ酸配列中のアミノ酸残基の置換が行われた変異体が含まれる。最終構築物が向上したFVIII補因子機能代替活性を備えることを前提に、欠失、挿入、および置換の任意の組合せが、最終構築物に至るために行われ得る。

[0055] A. 例示的抗FIX(a)/FX二重特異性抗体

以下に本明細書で提供されるFIXおよび／またはFIXaならびにFXを認識する二重特異性抗体（以下、単に「抗FIX(a)/FX二重特異性抗体」という）の例を記載するが、以下は本明細書で提供される他の抗体及びポリペプチドにも同様に当てはまる。尚、本明細書において、FIX(a)はFIXおよび／またはFIXaを意味する。

[0056] 1. 抗体断片

特定の態様において、本明細書で提供される抗体は、抗体断片である。抗

体断片は、これらに限定されるものではないが、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv、および scFv断片、ならびに、後述する他の断片を含む。特定の抗体断片についての総説として、Hudson et al. Nat. Med. 9:129-134 (2003) を参照のこと。scFv断片の総説として、例えば、Pluckthun, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp.269-315 (1994) ; 加えて、W093/16185 ; ならびに米国特許第5,571,894号および第5,587,458号を参照のこと。サルベージ受容体結合エピトープ残基を含みインビボ (in vivo) における半減期の長くなったFabおよびF(ab')₂断片についての論説として、米国特許第5,869,046号を参照のこと。

[0057] ダイアボディは、二価または二重特異的であってよい、抗原結合部位を2つ伴う抗体断片である。例えば、EP404,097号; W01993/01161; Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003); Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993) 参照。トリアボディ (triabody) やテトラボディ (tetrabody) も、Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003) に記載されている。

[0058] シングルドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインのすべてもしくは一部分、または軽鎖可変ドメインのすべてもしくは一部分を含む、抗体断片である。特定の態様において、シングルドメイン抗体は、ヒトシングルドメイン抗体である (Domantis, Inc., Waltham, MA ; 例えば、米国特許第6,248,516号B1参照) 。

[0059] 抗体断片は、これらに限定されるものではないが、本明細書に記載の、完全抗体のタンパク質分解的消化、組み換え宿主細胞 (例えば、大腸菌 (E. coli) またはファージ) による産生を含む、種々の手法により作ることができる。

[0060] 2. ヒト抗体

特定の態様において、本明細書で提供される抗体は、ヒト抗体である。ヒト抗体は、当該技術分野において知られる種々の手法によって製造され得る

。ヒト抗体は、van Dijk and van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5: 368-74 (2001) および Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.*, 20:450-459 (2008) に、概説されている。

[0061] ヒト抗体は、抗原チャレンジ（負荷）に応答して完全ヒト抗体またはヒト可変領域を伴う完全抗体を産生するように改変されたトランスジェニック動物へ免疫原を投与することにより、調製されてもよい。そのような動物は、典型的にはヒト免疫グロブリン遺伝子座の全部もしくは一部分を含み、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の全部もしくは一部分は、内因性の免疫グロブリン遺伝子座を置き換えるか、または、染色体外にもしくは当該動物の染色体内にランダムに取り込まれた状態で存在する。そのようなトランスジェニックマウスにおいて、内因性の免疫グロブリン遺伝子座は、通常不活性化されている。トランスジェニック動物からヒト抗体を得る方法の総説として、Lonberg, *Nat. Biotech.*, 23:1117-1125 (2005) を参照のこと。また、例えば、XENOMOUSE（商標）技術を記載した米国特許第6,075,181号および第6,150,584号；HUMAB（登録商標）技術を記載した米国特許第5,770,429号；K-M MOUSE（登録商標）技術を記載した米国特許第7,041,870号；ならびに、VELOCIMOUSE（登録商標）技術を記載した米国特許出願公開第2007/0061900号を、併せて参照のこと。このような動物によって生成された完全抗体からのヒト可変領域は、例えば、異なるヒト定常領域と組み合わせるなどして、さらに修飾されてもよい。

[0062] ヒト抗体は、ハイブリドーマに基づいた方法でも作ることができる。ヒトモノクローナル抗体の製造のための、ヒトミエローマおよびマウス-ヒトヘテロミエローマ細胞株は、既に記述されている。（例えば、Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984)；Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp.51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)；およびBoerner et al., *J. Immunol.*, 147: 86 (1991) 参照。) ヒトB細胞ハイブリドーマ技術を介して生成されたヒト抗体も、Li et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006) に述べられている。追加

的な方法としては、例えば、米国特許第7,189,826号（ハイブリドーマ細胞株からのモノクローナルヒトIgM抗体の製造を記載）ならびにNi, Xiandai Mian yixue, 26(4):265-268 (2006)（ヒト-ヒトハイブリドーマを記載）に記載されたものを含む。ヒトハイブリドーマ技術（トリオーマ技術）も、Vollmers and Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) およびVollmers and Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005)に記載されている。

[0063] ヒト抗体は、ヒト由来ファージディスプレイライブラリから選択されたFvクローン可変ドメイン配列を単離することでも生成できる。このような可変ドメイン配列は、次に所望のヒト定常ドメインと組み合わせることができる。抗体ライブラリからヒト抗体を選択する手法を、以下に述べる。

[0064] 3. ライブラリ由来抗体

本発明の抗体は、所望の1つまたは複数の活性を伴う抗体についてコンビナトリアルライブラリをスクリーニングすることによって単離してもよい。例えば、ファージディスプレイライブラリの生成や、所望の結合特性を備える抗体についてそのようなライブラリをスクリーニングするための、様々な方法が当該技術分野において知られている。そのような方法は、Hoogenboom et al. in *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) において総説されており、さらに例えば、McCafferty et al., *Nature* 348:552-554; Clackson et al., *Nature* 352: 624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Marks and Bradbury, in *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34):12467-12472 (2004); およびLee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004) に記載されている。

[0065] 特定のファージディスプレイ法において、VHおよびVL遺伝子のレパートリ

ーは、ポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction: PCR) により別々にクローニングされ、無作為にファージライブラリ中で再結合され、当該ファージライブラリは、Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994) に述べられているようにして、抗原結合ファージについてスクリーニングされ得る。ファージは、典型的には、単鎖Fv (scFv) 断片としてまたはFab断片としてのいずれかで、抗体断片を提示する。免疫化された供給源からのライブラリは、ハイブリドーマを構築することを要せずに、免疫源に対する高アフィニティ抗体を提供する。あるいは、Griffiths et al., *EMBO J.*, 12: 725-734 (1993) に記載されるように、ナイーブレパートリーを (例えば、ヒトから) クローニングして、免疫化することなしに、広範な非自己および自己抗原への抗体の単一の供給源を提供することもできる。最後に、ナイーブライブラリは、Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992) に記載されるように、幹細胞から再編成前のV-遺伝子セグメントをクローニングし、超可変CDR3領域をコードしかつインビトロ (in vitro) で再構成を達成するための無作為配列を含んだPCRプライマーを用いることにより、合成的に作ることもできる。ヒト抗体ファージライブラリを記載した特許文献は、例えば：米国特許第5,750,373号、ならびに、米国特許出願公開第2005/0079574号、2005/0119455号、第2005/0266000号、第2007/0117126号、第2007/0160598号、第2007/0237764号、第2007/0292936号、および第2009/0002360号を含む。

[0066] ヒト抗体ライブラリから単離された抗体または抗体断片は、本明細書ではヒト抗体またはヒト抗体断片と見なす。

[0067] 多重特異性抗体を作製するための手法は、これらに限定されるものではないが、異なる特異性を有する2つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖ペアの組み換え共発現 (Milstein and Cuello, *Nature* 305: 537 (1983)、W093/08829、およびTraunecker et al., *EMBO J.* 10: 3655 (1991) 参照)、およびknob-in-hole技術 (例えば、米国特許第5,731,168号参照) を含む。多重特異性抗体は、Fcヘテロ二量体分子を作製するために静電ステアリング効果 (electrostatic

steering effects) を操作すること (W02009/089004A1) ; 2つ以上の抗体または断片を架橋すること (米国特許第4,676,980号およびBrennan et al., Science, 229: 81 (1985)参照) ; ロイシンジッパーを用いて2つの特異性を有する抗体を作成すること (Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992) 参照) ; 「ダイアボディ」技術を用いて二重特異性抗体断片を作製すること (Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993) 参照) ; および、単鎖Fv (scFv) 二量体を用いること (Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994) 参照) ; および、例えばTutt et al. J. Immunol. 147: 60 (1991) に記載されるように三重特異性抗体を調製すること、によって作製してもよい。

[0068] a) 置換、挿入、および欠失変異体

特定の態様において、1つまたは複数のアミノ酸置換を有する抗体変異体が提供される。置換的変異導入の目的部位は、HVRおよびFRを含む。保存的置換を、表1の「好ましい置換」の見出しの下に示す。より実質的な変更を、表1の「例示的な置換」の見出しの下に提供するとともに、アミノ酸側鎖のクラスに言及しつつ下で詳述する。アミノ酸置換は目的の抗体に導入されてもよく、産物は、例えば、保持／改善された抗原結合性、減少した免疫原性、または改善したFVIII補因子機能代替活性、ADCCまたはCDCなどの、所望の活性についてスクリーニングされてもよい。

[0069]

[表1]

| 元の残基 | 例示的な置換 | 好ましい置換 |
|---------|---------------------------------|--------|
| Ala (A) | Val; Leu; Ile | Val |
| Arg (R) | Lys; Gln; Asn | Lys |
| Asn (N) | Gln; His; Asp, Lys; Arg | Gln |
| Asp (D) | Glu; Asn | Glu |
| Cys (C) | Ser; Ala | Ser |
| Gln (Q) | Asn; Glu | Asn |
| Glu (E) | Asp; Gln | Asp |
| Gly (G) | Ala | Ala |
| His (H) | Asn; Gln; Lys; Arg | Arg |
| Ile (I) | Leu; Val; Met; Ala; Phe; ノルロイシン | Leu |
| Leu (L) | ノルロイシン; Ile; Val; Met; Ala; Phe | Ile |
| Lys (K) | Arg; Gln; Asn | Arg |
| Met (M) | Leu; Phe; Ile | Leu |
| Phe (F) | Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr | Tyr |
| Pro (P) | Ala | Ala |
| Ser (S) | Thr | Thr |
| Thr (T) | Val; Ser | Ser |
| Trp (W) | Tyr; Phe | Tyr |
| Tyr (Y) | Trp; Phe; Thr; Ser | Phe |
| Val (V) | Ile; Leu; Met; Phe; Ala; ノルロイシン | Leu |

[0070] アミノ酸は、共通の側鎖特性によって群に分けることができる：

- (1) 疎水性：ノルロイシン、メチオニン (Met)、アラニン (Ala)、バリン (Val)、ロイシン (Leu)、イソロイシン (Ile)；
- (2) 中性の親水性：システイン (Cys)、セリン (Ser)、トレオニン (Thr)、アスパラギン (Asn)、グルタミン (Gln)；
- (3) 酸性：アスパラギン酸 (Asp)、グルタミン酸 (Glu)；
- (4) 塩基性：ヒスチジン (His)、リジン (Lys)、アルギニン (Arg)；
- (5) 鎖配向に影響する残基：グリシン (Gly)、プロリン (Pro)；

(6) 芳香族性：トリプトファン (Trp)、チロシン (Tyr)、フェニルアラニン (Phe)。

非保存的置換は、これらのクラスの1つのメンバーを、別のクラスのものに交換することをいう。

[0071] 置換変異体の1つのタイプは、親抗体（例えば、ヒト化またはヒト抗体）の1つまたは複数の超可変領域残基の置換を含む。通常、その結果として生じ、さらなる研究のために選ばれた変異体は、親抗体と比較して特定の生物学的特性における修飾（例えば、改善）（例えば、増加したFVIII補因子機能代替活性やアフィニティ、減少した免疫原性）を有する、および／または親抗体の特定の生物学的特性を実質的に保持しているであろう。

[0072] 特定の態様において、置換、挿入、または欠失は、そのような改変が抗原に結合する抗体の能力を実質的に減少させない限り、1つまたは複数のHVR内で行われ得る。例えば、FVIII補因子機能代替活性を実質的に減少させない保存的改変（例えば、本明細書で提供されるような保存的置換）が、HVRにおいて行われ得る。

[0073] 変異導入のために標的化され得る抗体の残基または領域を同定するのに有用な方法は、Cunningham and Wells (1989) Science, 244:1081-1085によって記載される、「アラニンスキニング変異導入」と呼ばれるものである。この方法において、一残基または一群の標的残基（例えば、荷電残基、例えばアルギニン、アスパラギン酸、ヒスチジン、リジン、およびグルタミン酸）が同定され、中性または負に荷電したアミノ酸（例えば、アラニンもしくはポリアラニン）で置き換えられ、抗体と抗原の相互作用が影響を受けるかどうか決定される。この初期置換に対して機能的感受性を示したアミノ酸位置に、さらなる置換が導入され得る。あるいはまたは加えて、抗体と抗原の間の接触点を同定するために、抗原抗体複合体の結晶構造を解析してもよい。そのような接触残基および近隣の残基を、置換候補として標的化してもよく、または置換候補から除外してもよい。変異体は、それらが所望の特性を含むかどうかを決定するためにスクリーニングされ得る。

[0074] アミノ酸配列の挿入は、配列内部への単一または複数のアミノ酸残基の挿入と同様、アミノ末端および／またはカルボキシル末端における1残基から100残基以上を含むポリペプチドの長さの範囲での融合も含む。末端の挿入の例は、N末端にメチオニル残基を伴う抗体を含む。抗体分子の他の挿入変異体は、抗体のN-またはC-末端に、酵素（例えば、ADEPTのための）または抗体の血漿半減期を増加させるポリペプチドを融合させたものを含む。

[0075] b) グリコシル化変異体

特定の態様において、本明細書で提供される抗体は、抗体がグリコシル化される程度を増加させるまたは減少させるように改変されている。抗体へのグリコシル化部位の追加または削除は、1つまたは複数のグリコシル化部位を作り出すまたは取り除くようにアミノ酸配列を改変することにより、簡便に達成可能である。

[0076] 抗体がFc領域を含む場合、そこに付加される炭水化物が改変されてもよい。哺乳動物細胞によって産生される天然型抗体は、典型的には、枝分かれした二分岐のオリゴ糖を含み、当該オリゴ糖は通常Fc領域のCH2ドメインのAsn297にN-リンケージによって付加されている。例えば、Wright et al, TIBTECH 15:26-32 (1997) 参照。オリゴ糖は、例えば、マンノース、N-アセチルグルコサミン (GlcNAc)、ガラクトース、およびシアル酸などの種々の炭水化物、また、二分岐のオリゴ糖構造の「幹」中のGlcNAcに付加されたフコースを含む。いくつかの態様において、本発明の抗体中のオリゴ糖の修飾は、特定の改善された特性を伴う抗体変異体を作り出すために行われてもよい。

[0077] 一態様において、Fc領域に（直接的または間接的に）付加されたフコースを欠く炭水化物構造体を有する抗体変異体が提供される。例えば、そのような抗体におけるフコースの量は、1%~80%、1%~65%、5%~65%または20%~40%であり得る。フコースの量は、例えばW02008/077546に記載されるようにMALDI-TOF質量分析によって測定される、Asn297に付加されたすべての糖構造体（例えば、複合、ハイブリッド、および高マンノース構造体）の和に対する、Asn297における糖鎖内のフコースの平均量を計算することによって

決定される。Asn297は、Fc領域の297位のあたりに位置するアスパラギン残基を表す（Fc領域残基のEUナンバリング）。しかし、複数の抗体間のわずかな配列の多様性に起因して、Asn297は、297位の±3アミノ酸上流または下流、すなわち294位～300位の間にも位置することもあり得る。そのようなフコシル化変異体は、改善されたADCC機能を有し得る。例えば、米国特許出願公開第2003/0157108号（Presta, L.）；第2004/0093621号（Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd）を参照のこと。「脱フコシル化」または「フコース欠損」抗体変異体に関する刊行物の例は、US2003/0157108；W02000/61739；W02001/29246；US2003/0115614；US2002/0164328；US2004/0093621；US2004/0132140；US2004/0110704；US2004/0110282；US2004/0109865；W02003/085119；W02003/084570；W02005/035586；W02005/035778；W02005/053742；W02002/031140；Okazaki et al. *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004)；Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004) を含む。脱フコシル化抗体を産生することができる細胞株の例は、タンパク質のフコシル化を欠くLec13 CHO細胞（Ripka et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986)；米国特許出願公開第US2003/0157108号A1、Presta, L；およびW02004/056312A1、Adams et al.、特に実施例11）およびノックアウト細胞株、例えばアルファ-1,6-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子FUT8ノックアウトCHO細胞（例えば、Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004)；Kanda, Y. et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680-688 (2006)；およびW02003/085107を参照のこと）を含む。

[0078] 例えば抗体のFc領域に付加された二分枝型オリゴ糖がGlcNAcによって二分されている、二分されたオリゴ糖を有する抗体変異体がさらに提供される。そのような抗体変異体は、減少したフコシル化および／または改善されたADCC機能を有し得る。そのような抗体変異体の例は、例えば、W02003/011878（Jean-Mairet et al.）；米国特許第6,602,684号（Umaña et al.）；およびUS2005/0123546（Umaña et al.）に記載されている。Fc領域に付加されたオリゴ糖中に少なくとも1つのガラクトース残基を有する抗体変異体も提供される。

そのような抗体変異体は、改善されたCDC機能を有し得る。そのような抗体変異体は、例えば、W01997/30087 (Patel et al.) ; W01998/58964 (Raju, S.) ; およびW01999/22764 (Raju, S.) に記載されている。

[0079] c) Fc領域変異体

特定の態様において、本明細書で提供される抗体のFc領域に1つまたは複数のアミノ酸修飾を導入して、それによりFc領域変異体を生成してもよい。Fc領域変異体は、1つまたは複数のアミノ酸ポジションのところでアミノ酸修飾（例えば、置換）を含む、ヒトFc領域配列（例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4のFc領域）を含んでもよい。

[0080] 特定の態様において、すべてではないがいくつかのエフェクター機能を備える抗体変異体も、本発明の考慮の内であり、当該エフェクター機能は、抗体を、そのインビボでの半減期が重要であるが、特定のエフェクター機能（補体およびADCCなど）は不要または有害である場合の適用に望ましい候補とするものである。CDCおよび／またはADCC活性の減少／欠乏を確認するために、インビトロ および／またはインビボ の細胞傷害測定を行うことができる。例えば、Fc受容体 (FcR) 結合測定は、抗体がFc γ R結合性を欠く（よってADCC活性を欠く蓋然性が高い）一方でFcRn結合能を維持することを確認するために行われ得る。ADCCを媒介するプライマリ細胞であるNK細胞はFc γ R1IIIのみを発現するが、一方単球はFc γ R1、Fc γ R2、Fc γ R3を発現する。造血細胞上のFcRの発現は、Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991) の第464頁のTable 3にまとめられている。目的の分子のADCC活性を評価するためのインビトロ測定法（アッセイ）の非限定的な例は、米国特許第5,500,362号（例えば、Hellstrom, I. et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986) 参照）および Hellstrom, I et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985) ; 米国特許第5,821,337号 (Bruggemann, M. et al., *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987) 参照) に記載されている。あるいは、非放射性的の測定法を用いてもよい（例えば、ACT1 (商標) non-radioactive cytotoxicity assay for flow cytometry (CellTechnology, Inc.

Mountain View, CA) ; および、CytoTox 96 (登録商標) non-radioactive cytotoxicity assays 法 (Promega, Madison, WI) 参照)。このような測定法に有用なエフェクター細胞は、末梢血単核細胞 (peripheral blood mononuclear cell: PBMC) およびナチュラルキラー (natural killer: NK) 細胞を含む。あるいはまたは加えて、目的の分子のADCC活性は、例えば、Clynes et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998) に記載されるような動物モデルにおいて、インビボで評価されてもよい。また、抗体がC1qに結合できないこと、よってCDC活性を欠くことを確認するために、C1q結合測定を行ってもよい。例えば、W02006/029879 および W02005/100402のC1qおよびC3c結合ELISAを参照のこと。また、補体活性化を評価するために、CDC測定を行ってもよい (例えば、Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996) ; Cragg, M.S. et al., Blood 101:1045-1052 (2003) ; およびCragg, M.S. and M.J. Glennie, Blood 103:2738-2743 (2004) 参照)。さらに、FcRn結合性およびインビボでのクリアランス/半減期の決定も、当該技術分野において知られた方法を用いて行い得る (例えばPetkova, S.B. et al., Int'l. Immunol. 18(12):1759-1769 (2006) 参照)。

[0081] 減少したエフェクター機能を伴う抗体は、Fc領域残基238、265、269、270、297、327、および329の1つまたは複数の置換を伴うものを含む (米国特許第6,737,056号)。このようなFc変異体は、残基265および297のアラニンへの置換を伴ういわゆる「DANA」Fc変異体 (米国特許第7,332,581号) を含む、アミノ酸ポジション265、269、270、297、および327の2つ以上の置換を伴うFc変異体を含む。

[0082] FcRsへの増加または減少した結合性を伴う特定の抗体変異体が、記述されている。(米国特許第6,737,056号 ; W02004/056312、およびShields et al., J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001) を参照のこと。)

[0083] いくつかの態様において、例えば米国特許第6,194,551号、W099/51642、およびIdusogie et al. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000) に記載されるように、改変された (つまり、増加したか減少したかのいずれかである) C1q結

合性および／または補体依存性細胞傷害（CDC）をもたらす改変が、Fc領域においてなされる。

[0084] 増加した半減期、および新生児型Fc受容体（FcRn：母体のIgG類を胎児に移行させる役割を負う（Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) and Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)））に対する増加した結合性を伴う抗体が、米国特許出願公開第2005/0014934号A1(Hinton et al.)に記載されている。これらの抗体は、Fc領域のFcRnへの結合性を増加する1つまたは複数の置換をその中に伴うFc領域を含む。このようなFc変異体は、Fc領域残基：238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424、428、434または436の1つまたは複数のところでの置換（例えば、Fc領域残基434の置換（米国特許第7,371,826号））を伴うものを含む。

[0085] また、リウマトイド因子への結合が抑制されたFc領域変異体を本発明の抗体に用いることができ、このような変異体はW02013/046704に記載されており、例えばQ438R/S440E、Q438R/S440D、Q438K/S440E又はQ438K/S440Dで示される変異の組み合わせを双方のH鎖に有する変異体を挙げることができる。

[0086] また、FcRnへの結合が増強し、リウマトイド因子への結合が抑制されたFc領域変異体を本発明の抗体に使用することが出来る。より具体的には、以下のa)～f)のいずれか一つに示す変異の組み合わせを双方のH鎖に有するFc領域変異体を挙げることができる。

- a) N434A/Y436T/Q438R/S440E
- b) N434A/Y436V/Q438R/S440E
- c) M428L/N434A/Y436T/Q438R/S440E
- d) M428L/N434A/Y436V/Q438R/S440E
- e) M428L/N434A/Q438R/S440E
- f) N434A/Q438R/S440E

[0087] Fc領域変異体の他の例については、Duncan & Winter, Nature 322:738-40 (1988)；米国特許第5,648,260号；米国特許第5,624,821号；およびW094/2935

1も参照のこと。

[0088] d) 抗体誘導体

特定の態様において、本明細書で提供される抗体は、当該技術分野において知られておりかつ容易に入手可能な追加の非タンパク質部分を含むように、さらに修飾されてもよい。抗体の誘導体化に好適な部分は、これに限定されるものではないが、水溶性ポリマーを含む。水溶性ポリマーの非限定的な例は、これらに限定されるものではないが、ポリエチレングリコール (PEG)、エチレングリコール／プロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ1,3ジオキサラン、ポリ1,3,6, トリオキサン、エチレン／無水マレイン酸コポリマー、ポリアミノ酸（ホモポリマーまたはランダムコポリマーのいずれでも）、および、デキストランまたはポリ（*n*-ビニルピロリドン）ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド／エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール類（例えばグリセロール）、ポリビニルアルコール、および、これらの混合物を含む。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは、その水に対する安定性のために、製造において有利であるだろう。ポリマーは、いかなる分子量でもよく、枝分かれしていてもしていなくてもよい。抗体に付加されるポリマーの数には幅があってよく、1つ以上のポリマーが付加されるならそれらは同じ分子であってもよいし、異なる分子であってもよい。一般的に、誘導体化に使用されるポリマーの数および／またはタイプは、これらに限定されるものではないが、改善されるべき抗体の特定の特性または機能、抗体誘導体が規定の条件下での療法に使用されるか否か、などへの考慮に基づいて、決定することができる。

[0089] B. 組み換えの方法および構成

例えば、米国特許第4,816,567号に記載されるとおり、抗体は組み換えの方法や構成を用いて製造することができる。一態様において、本明細書に記載の抗FIX(a)/FX二重特異性抗体をコードする、単離された核酸が提供される。

そのような核酸は、抗体のVLを含むアミノ酸配列および／またはVHを含むアミノ酸配列（例えば、抗体の軽鎖および／または重鎖）をコードしてもよい。さらなる態様において、このような核酸を含む1つまたは複数のベクター（例えば、発現ベクター）が提供される。さらなる態様において、このような核酸を含む宿主細胞が提供される。このような態様の1つでは、宿主細胞は、(1)抗体のVLを含むアミノ酸配列および抗体のVHを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含むベクター、または、(2)抗体のVLを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第一のベクターと抗体のVHを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第二のベクターを含む（例えば、形質転換されている）。一態様において、宿主細胞は、真核性である（例えば、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞）またはリンパ系の細胞（例えば、Y0、NS0、Sp2/0細胞）。一態様において、抗FIX(a)/FX二重特異性抗体の発現に好適な条件下で、上述のとおり当該抗体をコードする核酸を含む宿主細胞を培養すること、および任意で、当該抗体を宿主細胞（または宿主細胞培養培地）から回収することを含む、抗FIX(a)/FX二重特異性抗体を作製する方法が提供される。

[0090] 抗FIX(a)/FX二重特異性抗体の組み換え製造のために、（例えば、上述したものなどの）抗体をコードする核酸を単離し、さらなるクローニングおよび／または宿主細胞中での発現のために、1つまたは複数のベクターに挿入する。そのような核酸は、従来の手順を用いて容易に単離および配列決定されるだろう（例えば、抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを用いることで）。

[0091] 抗体をコードするベクターのクローニングまたは発現に好適な宿主細胞は、本明細書に記載の原核細胞または真核細胞を含む。例えば、抗体は、特にグリコシル化およびFcエフェクター機能が必要とされない場合は、細菌で製造してもよい。細菌での抗体断片およびポリペプチドの発現に関して、例えば、米国特許第5,648,237号、第5,789,199号、および第5,840,523号を参照のこと。（加えて、大腸菌における抗体断片の発現について記載したCharlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press

, Totowa, NJ, 2003), pp.245-254も参照のこと。) 発現後、抗体は細菌細胞ペーストから可溶性フラクション中に単離されてもよく、またさらに精製することができる。

[0092] 原核生物に加え、部分的なまたは完全なヒトのグリコシル化パターンを伴う抗体の産生をもたらす、グリコシル化経路が「ヒト化」されている菌類および酵母の株を含む、糸状菌または酵母などの真核性の微生物は、抗体コードベクターの好適なクローニングまたは発現宿主である。Gerngross, Nat. Biotech. 22:1409-1414 (2004)および Li et al., Nat. Biotech. 24:210-215 (2006) を参照のこと。

[0093] 多細胞生物（無脊椎生物および脊椎生物）に由来するものもまた、グリコシル化された抗体の発現のために好適な宿主細胞である。無脊椎生物細胞の例は、植物および昆虫細胞を含む。昆虫細胞との接合、特に *Spodoptera frugiperda* 細胞の形質転換に用いられる、数多くのバキュロウイルス株が同定されている。

[0094] 植物細胞培養物も、宿主として利用することができる。例えば、米国特許第5,959,177号、第6,040,498号、第6,420,548号、第7,125,978号、および第6,417,429号（トランスジェニック植物で抗体を産生するための、PLANTIBODIES（商標）技術を記載）を参照のこと。

[0095] 脊椎動物細胞もまた宿主として使用できる。例えば、浮遊状態で増殖するように適応された哺乳動物細胞株は、有用であろう。有用な哺乳動物宿主細胞株の他の例は、SV40で形質転換されたサル腎CV1株（COS-7）；ヒト胎児性腎株（Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977) などに記載の293または293細胞）；仔ハムスター腎細胞（BHK）；マウスセルトリ細胞（Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980) などに記載のTM4細胞）；サル腎細胞（CV1）；アフリカミドリザル腎細胞（VERO-76）；ヒト子宮頸部癌細胞（HELA）；イヌ腎細胞（MDCK）；Buffalo系ラット肝細胞（BRL 3A）；ヒト肺細胞（W138）；ヒト肝細胞（Hep G2）；マウス乳癌（MMT 060562）；TRI細胞（例えば、Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982) に記載）；MRC5細胞；および

、FS4細胞などである。他の有用な哺乳動物宿主細胞株は、DHFR- CHO細胞 (Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)) を含むチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞 ; およびY0、NS0、およびSp2/0などの骨髓腫細胞株を含む。抗体産生に好適な特定の哺乳動物宿主細胞株の総説として、例えば、Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B. K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003) を参照のこと。

[0096] C. 測定法 (アッセイ)

本明細書で提供される抗FIX(a)/FX二重特異性抗体は、当該技術分野において知られている種々の測定法によって、同定され、スクリーニングされ、または物理的/化学的特性および/または生物学的活性について明らかにされてもよい。

[0097] 1. 結合測定法およびその他の測定法

一局面において、本発明の抗体は、例えばELISA、ウエスタンブロット等の公知の方法によって、その抗原結合活性に関して試験される。

[0098] 2. 活性測定法

一局面において、生物学的活性を有する抗FIX(a)/FX二重特異性抗体のそれを同定するための測定法が提供される。生物学的活性は、例えば、FVIII補因子機能代替活性を含んでよい。また、このような生物学的活性をインビボおよび/またはインビトロで有する抗体が、提供される。

[0099] 特定の態様において、本発明の抗体は、このような生物学的活性について試験される。

[0100] 本発明において「FVIII補因子機能代替活性」、「FVIII代替活性」および「FVIIIの機能を代替する活性」は同義に用いられ、FIXおよび/またはFIXaならびにFXを認識し、FXの活性化を促進する (FXa産生を促進する) 活性を意味する。

[0101] 本発明における「FVIII補因子機能代替活性」は、例えば、比色定量法を用いたFIXaによるFX活性化反応試験、及び血友病A血漿を用いたトロンビン生成

試験から算出された活性を意味する。より具体的には、本発明の抗体と、例えば、FIXa、FX、合成基質S-2222 (FIXaの合成基質)、リン脂質から成る測定系で評価することによって確認することができる。本測定系は血友病A症例における疾患の重症度および臨床症状と相関性を示す(Rosen S, Andersson M, Blombäck M et al. Clinical applications of a chromogenic substrate method for determination of FVIII activity. *Thromb Haemost* 1985; 54: 811-23)。

[0102] D. 薬学的製剤

本明細書に記載の抗FIX(a)/FX二重特異性抗体の薬学的製剤は、所望の純度を有する抗体を、1つまたは複数の任意の薬学的に許容される担体 (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)) と混合することによって、凍結乾燥製剤または水溶液の形態で、調製される。薬学的に許容される担体は、概して、用いられる際の用量および濃度ではレシピエントに対して非毒性であり、これらに限定されるものではないが、以下のものを含む：リン酸塩、クエン酸塩、および他の有機酸などの緩衝液；アスコルビン酸およびメチオニンを含む、抗酸化剤；保存料（オクタデシルジメチルベンジル塩化アンモニウム；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム；塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチル、またはベンジルアルコール；メチルまたはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン；カテコール；レソルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；およびm-クレゾールなど）；低分子（約10残基未満）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、またはリジンなどのアミノ酸；グルコース、マンノース、またはデキストリンを含む、単糖、二糖、および他の炭水化物；EDTAなどのキレート剤；スクロース、マンニトール、トレハロース、ソルビトールなどの、砂糖類；ナトリウムなどの塩形成対イオン類；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）；および／またはポリエチレングリコール (PEG) などの非イオン系表

面活性剤。本明細書の例示的な薬学的に許容される担体は、さらに、可溶性中性活性型ヒアルロニダーゼ糖タンパク質 (sHASEGP) (例えば、rHuPH20 (HY LENEX (登録商標)、Baxter International, Inc.) などのヒト可溶性PH-20ヒアルロニダーゼ糖タンパク質) などの間質性薬剤分散剤を含む。特定の例示的sHASEGPおよびその使用方法は (rHuPH20を含む)、米国特許出願公開第2005/0260186号および第2006/0104968号に記載されている。一局面において、sHASEGPは、コンドロイチナーゼなどの1つまたは複数の追加的なグリコサミノグリカナーゼと組み合わせられる。

[0103] 有効成分は、例えば液滴形成 (コアセルベーション) 手法によってまたは界面重合によって調製されたマイクロカプセル (それぞれ、例えば、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチンマイクロカプセル、およびポリ (メタクリル酸メチル) マイクロカプセル) に取り込まれてもよいし、コロイド状薬剤送達システム (例えば、リポソーム、アルブミン小球体、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、およびナノカプセル) に取り込まれてもよいし、マクロエマルジョンに取り込まれてもよい。このような手法は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980) に開示されている。

[0104] 徐放性製剤を調製してもよい。徐放性製剤の好適な例は、抗体を含んだ固体疎水性ポリマーの半透過性マトリクスを含み、当該マトリクスは例えばフィルムまたはマイクロカプセルなどの造形品の形態である。

[0105] 生体内 (in vivo) 投与のために使用される製剤は、通常無菌である。無菌状態は、例えば滅菌ろ過膜を通して濾過することなどにより、容易に達成される。

[0106] E. 治療的方法および治療用組成物

本明細書で提供される抗FIX(a)/FX二重特異性抗体のいずれも、治療的な方法において使用されてよい。

一局面において、医薬品としての使用のための、抗FIX(a)/FX二重特異性抗体が提供される。さらなる局面において、出血、出血を伴う疾患、もしくは

出血に起因する疾患の治療における使用のための、抗FIX(a)/FX二重特異性抗体が提供される。特定の態様において、治療方法における使用のための、抗FIX(a)/FX二重特異性抗体が提供される。特定の態様において、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を有する個体を治療する方法であって、当該個体に抗FIX(a)/FX二重特異性抗体の有効量を投与する工程を含む方法における使用のための、抗FIX(a)/FX二重特異性抗体を提供する。このような態様の1つにおいて、方法は、当該個体に少なくとも1つの（例えば後述するような）追加治療剤の有効量を投与する工程を、さらに含む。さらなる態様において、本発明は、FVIII機能の代替における使用のための抗FIX(a)/FX二重特異性抗体を提供する。特定の態様において、本発明は、個体においてFVIIIの機能を代替する方法であって、FVIIIの機能を代替するために当該個体に抗FIX(a)/FX二重特異性抗体の有効量を投与する工程を含む方法における使用のための、抗FIX(a)/FX二重特異性抗体を提供する。上記態様の任意のものによる「個体」は、好適にはヒトである。

[0107] 本発明における抗体の1つの態様としては、補因子FVIIIを代替する機能を有することから、本発明の抗体は、該補因子の活性（機能）低下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。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、好ましくはFVIIIおよび／または活性化血液凝固第VIII因子(FVIIIa)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。このような疾患としては、例えば血友病A、FVIII/FVIIIaに対するインヒビターが出現している疾患、後天性血友病、フォンビルブランド病等を挙げることができるが、これら疾患に特に制限されない。

[0108] さらなる局面において、本発明は医薬品の製造または調製における抗FIX(a)/FX二重特異性抗体の使用を提供する。一態様において、医薬品は、出血、出血を伴う疾患、もしくは出血に起因する疾患の治療のためのものである。さらなる態様において、医薬品は、出血、出血を伴う疾患、もしくは出血に起因する疾患を治療する方法であって、出血、出血を伴う疾患、もしくは出

血に起因する疾患を有する個体に医薬品の有効量を投与する工程を含む方法における使用のためのものである。このような態様の1つにおいて、方法は、当該個体に少なくとも1つの（例えば後述するような）追加治療剤の有効量を投与する工程を、さらに含む。さらなる態様において、医薬品は、FVIII機能の代替のためのものである。さらなる態様において、医薬品は、個体においてFVIII機能を代替する方法であって、FVIII機能を代替するために当該個体に医薬品の有効量を投与する工程を含む方法における使用のためのものである。上記態様の任意のものによる「個体」は、ヒトであってもよい。

[0109] さらなる局面において、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を治療する方法を提供する。一態様において、方法は、そのような出血、出血を伴う疾患、もしくは出血に起因する疾患を有する個体に抗FIX(a)/FX二重特異性抗体の有効量を投与する工程を含む。そのような態様の1つにおいて、方法は、当該個体に少なくとも1つの（後述するような）追加治療剤の有効量を投与する工程を、さらに含む。上記態様の任意のものによる「個体」は、ヒトであってもよい。

[0110] さらなる局面において、本発明は個体においてFVIII機能を代替する__ための方法を提供する。一態様において、方法は、FVIII機能を代替するために個体に抗FIX(a)/FX二重特異性抗体の有効量を投与する工程を含む。一態様において、「個体」は、ヒトである。

[0111] さらなる局面において、本発明は、本明細書で提供される抗FIX(a)/FX二重特異性抗体の任意のものを含む、薬学的製剤を提供する（例えば上述の治療的方法の任意のものにおける使用のための）。一態様において、薬学的製剤は、本明細書で提供される抗FIX(a)/FX二重特異性抗体の任意のもの、と、薬学的に許容される担体とを含む。別の態様において、薬学的製剤は、本明細書で提供される抗FIX(a)/FX二重特異性抗体の任意のもの、と、少なくとも1つの（例えば後述するような）追加治療剤とを含む。

[0112] 本発明の抗体は、療法において、単独または他の剤との組み合わせのどちらでも使用され得る。例えば、本発明の抗体は、少なくとも1つの追加の治療

剤と同時投与されてもよい。特定の態様において、追加治療剤は、FVIII製剤である。

[0113] 上述したような併用療法は、併用投与（2つ以上の治療剤が、同じまたは別々の製剤に含まれる）、および個別投与を包含し、個別投与の場合、本発明の抗体の投与が追加治療剤の投与に先立って、と同時に、および／または、続いて、行われ得る。一態様において、抗FIX(a)/FX二重特異性抗体の投与および追加治療剤の投与は、互いに、約1か月以内、または約1、2、または3週間以内、または約1、2、3、4、5、または6日以内に行われる。

[0114] 本発明の抗体（および、任意の追加治療剤）は、非経口投与、肺内投与、および経鼻投与、また局所的処置のために望まれる場合は病巣内投与を含む、任意の好適な手段によって投与され得る。非経口注入は、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内、または皮下投与を含む。投薬は、投与が短期か長期かに一部応じて、例えば、静脈内注射または皮下注射などの注射によるなど、任意の好適な経路によってなされ得る。これらに限定されるものではないが、単回投与または種々の時点にわたる反復投与、ボラス投与、および、パルス注入を含む、種々の投薬スケジュールが本明細書の考慮の内である。

[0115] 本発明の抗体は、優良医療規範（good medical practice）に一致したやり方で、製剤化され、投薬され、また投与される。この観点から考慮されるべきファクターは、治療されているその特定の障害、治療されているその特定の哺乳動物、個々の患者の臨床症状、障害の原因、剤を送達する部位、投与方法、投与のスケジュール、および医療従事者に公知の他のファクターを含む。抗体は、必ずしもそうでなくてもよいが、任意で、問題の障害を予防するまたは治療するために現に使用されている1つまたは複数の剤とともに、製剤化される。そのような他の剤の有効量は、製剤中に存在する抗体の量、障害または治療のタイプ、および上で論じた他のファクターに依存する。これらは通常、本明細書で述べたのと同じ用量および投与経路で、または本明細書で述べた用量の約1から99%で、または経験的／臨床的に適切と判断される任意の用量および任意の経路で、使用される。

[0116] 疾患の予防または治療のために、本発明の抗体の適切な用量（単独で用いられるときまたは1つまたは複数の他の追加治療剤とともに用いられるとき）は、治療される疾患のタイプ、抗体のタイプ、疾患の重症度および経過、抗体が予防的目的で投与されるのか治療的目的で投与されるのか、薬歴、患者の臨床歴および抗体に対する応答、ならびに、主治医の裁量に依存するだろう。抗体は、患者に対して、1回で、または一連の処置にわたって、好適に投与される。疾患のタイプおよび重症度に応じて、例えば、1回または複数回の別々の投与によるにしても連続注入によるにしても、約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ から $15\text{mg}/\text{kg}$ （例えば、 $0.1\text{mg}/\text{kg}$ ～ $10\text{mg}/\text{kg}$ ）の抗体が、患者に対する投与のための最初の候補用量とされ得る。1つの典型的な1日用量は、上述したファクターに依存して、約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ から $100\text{mg}/\text{kg}$ 以上まで、幅があってもよい。数日またはより長くにわたる繰り返しの投与の場合、状況に応じて、治療は通常疾患症状の所望の抑制が起きるまで維持される。抗体の1つの例示的な用量は、約 $0.05\text{mg}/\text{kg}$ から約 $10\text{mg}/\text{kg}$ の範囲内である。よって、約 $0.5\text{mg}/\text{kg}$ 、 $2.0\text{mg}/\text{kg}$ 、 $4.0\text{mg}/\text{kg}$ 、もしくは $10\text{mg}/\text{kg}$ の1つまたは複数の用量（またはこれらの任意の組み合わせ）が、患者に投与されてもよい。このような用量は、断続的に、例えば1週間毎にまたは3週間毎に（例えば、患者が約2から約20、または例えば約6用量の抗体を受けるとともに）、投与されてもよい。高い初回負荷用量の後に、1回または複数回の低用量が投与されてもよい。この療法の経過は、従来の手法および測定法によって、容易にモニタリングされる。

[0117] F. 製品

本発明の別の局面において、上述の障害の治療、予防、および／または診断に有用な器材を含んだ製品が、提供される。製品は、容器、および当該容器上のラベルまたは当該容器に付属する添付文書を含む。好ましい容器としては、例えば、ボトル、バイアル、シリンジ、IV溶液バッグなどが含まれる。容器類は、ガラスやプラスチックなどの、様々な材料から形成されていてよい。容器は組成物を単体で保持してもよいし、症状の治療、予防、および／または診断のために有効な別の組成物と組み合わせて保持してもよく、ま

た、無菌的なアクセスポートを有していてもよい（例えば、容器は、皮下注射針によって突き通すことのできるストッパーを有する静脈内投与用溶液バッグまたはバイアルであってよい）。組成物中の少なくとも1つの有効成分は、本発明の抗体である。ラベルまたは添付文書は、組成物が選ばれた症状を治療するために使用されるものであることを示す。さらに製品は、(a)第一の容器であって、その中に収められた本発明の抗体を含む組成物を伴う、第一の容器；および、(b)第二の容器であって、その中に収められたさらなる細胞傷害剤またはそれ以外で治療的な剤を含む組成物を伴う、第二の容器を含んでもよい。本発明のこの態様における製品は、さらに、組成物が特定の症状を治療するために使用され得ることを示す、添付文書を含んでもよい。あるいはまたは加えて、製品はさらに、注射用制菌水（BWFI）、リン酸緩衝生理食塩水、リンガー溶液、およびデキストロース溶液などの、薬学的に許容される緩衝液を含む、第二の（または第三の）容器を含んでもよい。他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針、およびシリンジなどの、他の商業的観点またはユーザの立場から望ましい器材をさらに含んでもよい。

[0118] 一局面において、本発明は、Emicizumab改変体を製造する方法であって、以下の工程（a）を含む、方法である。

（a）以下の（i）～（iii）のうち一以上により置換する工程であって、ここで、番号付けはK a b a t 番号付けシステムに従う、工程；

（i）配列番号：7、8、9に記載の軽鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖可変ドメインにおいて、K24、A25、S26、R27、N28、I29、E30、R31、Q32、L33、A34、Q50、A51、S52、R53、K54、E55、S56、Q89、Q90、Y91、S92、D93、P94、P95、L96及びT97からなる群から選択される1つ以上のアミノ酸における置換

（ii）配列番号：1、2、3に記載の重鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を含む抗体重鎖可変ドメインにおいて、Y31、Y32、D33、I34、Q35、S50、I51、S52、P52a、S53、G54、Q55、S56、T57、Y58

、Y59、R60、R61、E62、V63、K64、G65、R95、T96、G97、R98、E99、Y100、G100a、G100b、G100c、W100d、Y100e、F100f、D101およびY102からなる群から選択される1つ以上のアミノ酸における置換

(iii) 配列番号：4、5、6に記載の重鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を含む抗体重鎖可変ドメインにおいて、D31、N32、N33、M34、D35、D50、I51、T52a、N52、R53、S54、G55、G56、S57、I58、Y59、N60、E61、E62、F63、Q64、D65、R95、K96、S97、Y98、G99、Y100、Y100a、L100b、D101およびE102からなる群から選択される1つ以上のアミノ酸における置換。

上記置換する個所は1以上であればよく、また(i)と(ii)の組み合わせ、(i)と(iii)の組み合わせ、(ii)と(iii)の組み合わせ、(i)と(ii)と(iii)の組み合わせであってもよい。

[0119] 一局面において、本発明は、Emicizumab改変体を単離する方法であって、以下の工程(a)～(c)を含む、方法である。

(a) 以下の(i)～(iii)のうち一以上によりEmicizumab改変体を産生する工程であって、ここで、番号付けはK a b a t 番号付けシステムに従う、工程；

(i) 配列番号：7、8、9に記載の軽鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖可変ドメインにおいて、K24、A25、S26、R27、N28、I29、E30、R31、Q32、L33、A34、Q50、A51、S52、R53、K54、E55、S56、Q89、Q90、Y91、S92、D93、P94、P95、L96及びT97からなる群から選択される1つ以上のアミノ酸における置換

(ii) 配列番号：1、2、3に記載の重鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を含む抗体重鎖可変ドメインにおいて、Y31、Y32、D33、I34、Q35、S50、I51、S52、P52a、S53、G54、Q55、S56、T57、Y58

、Y59、R60、R61、E62、V63、K64、G65、R95、T96、G97、R98、E99、Y100、G100a、G100b、G100c、W100d、Y100e、F100f、D101およびY102からなる群から選択される1つ以上のアミノ酸における置換

(iii) 配列番号：4、5、6に記載の重鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を含む抗体重鎖可変ドメインにおいて、D31、N32、N33、M34、D35、D50、I51、T52a、N52、R53、S54、G55、G56、S57、I58、Y59、N60、E61、E62、F63、Q64、D65、R95、K96、S97、Y98、G99、Y100、Y100a、L100b、D101およびE102からなる群から選択される1つ以上のアミノ酸における置換

(b) (a)において産生された該改変抗体のFVIII補因子機能代替活性を測定する工程；ならびに

(c) Emicizumabと比べてFVIII補因子機能代替活性が向上したEmicizumab改変抗体を選択する工程。

上記置換する個所は1以上であればよく、また(i)と(ii)の組み合わせ、(i)と(iii)の組み合わせ、(ii)と(iii)の組み合わせ、(i)と(i)と(iii)の組み合わせであってもよい。

実施例

[0120] 以下は、本発明の方法および組成物の実施例である。上述の一般的な記載に照らし、種々の他の態様が実施され得ることが、理解されるであろう。

[0121] 前述の発明は、明確な理解を助ける目的のもと、実例および例示を用いて詳細に記載したが、本明細書における記載および例示は、本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。本明細書で引用したすべての特許文献および科学文献の開示は、その全体にわたって、参照により明示的に本明細書に組み入れられる。

[0122] [実施例1] FVIII補因子機能代替活性が向上する改変抗体のスクリーニング
ACE910は、FVIII補因子機能代替活性を示す抗FIX(a)および抗FXからなるヒト化IgG4抗体であり、FIX(a)およびFXそれぞれを認識する2種類の重鎖(Q4

99およびJ327) と共通L鎖 (L404) から構成される (重鎖配列番号: 45および46、軽鎖配列番号: 47)。本発明者らは、変異導入のためのPCR等の当業者公知の方法により、L404に対してアミノ酸改変を網羅的に導入し、大規模にFVIII補因子機能代替活性のスクリーニングを実施することで、ACE910のFVIII補因子機能代替活性を向上させるL鎖のアミノ酸置換を見出した。

[0123] ACE910の抗FIX(a)抗体側 (重鎖配列番号: 45、軽鎖配列番号: 47) のL鎖をL404 (配列番号: 47) に固定し、ACE910の抗FX抗体側 (重鎖配列番号: 46、軽鎖配列番号: 47) のL鎖はL404の全CDRをシステインを除くアミノ酸に改変した置換体を作製した。また、抗FX抗体側 (重鎖配列番号: 46、軽鎖配列番号: 47) のL鎖をACE910のL404に固定し、抗FIX(a)抗体側のL鎖はL404の全CDRをシステインを除くアミノ酸に改変した置換体を作製した。二重特異性抗体の発現および精製は当業者公知の方法で実施した。

[0124] 精製された各種二重特異性抗体を用いて当業者公知の方法によりFVIII補因子機能代替活性を評価した。具体的には、以下の方法で測定した。反応はすべて室温で行われた。0.1%牛血清アルブミンを含むトリス緩衝生理食塩水 (以下、TBSBと称す) で希釈した抗体溶液5 μ Lを、600ng/mLのHuman Factor IX a beta (Enzyme Research Laboratories) 5 μ Lと混合した後、384穴plate中にて室温で30分インキュベーションした。この混合液中の酵素反応は、24.7 μ g/mLのHuman Factor X (Enzyme Research Laboratories) 5 μ Lを添加して開始させ、4分後、0.5 M EDTA 5 μ Lを添加して停止させた。発色反応は、発色基質溶液 (S-2222、SEKISUI MEDICAL) 5 μ Lを添加することによって、開始させた。30分間の発色反応後、405 nmの吸光度変化はSpectraMax 340PC384 (Molecular Devices) を用いて測定した。

[0125] その結果、以下の表2に示すいくつかのアミノ酸置換が親抗体であるACE910に対してFVIII補因子機能代替活性を向上させることが可能であることが明らかとなった。表2には変異箇所のKabat numbering (左端の「position」列に記載された数字)、ACE910におけるアミノ酸 (左から2番目の列に記載されたアミノ酸 (一文字表記))、変異後のアミノ酸 (最上段の行に記載され

たアミノ酸（一文字表記）、ACE910(精製抗体)に対する比活性を算出して、ACE910(培養上清)の比活性値で補正した（表中の各数値）。表2の(-)は、抗体の発現量が低かったことを示し、"/"は、それ自身と同じアミノ酸のため、作製していないことを示す。

[0126] [表2]

Q499/L404//J327/L404(ACE910)に対してアミノ酸置換を行った
改変二重特異性抗体のFVIII 補因子機能代替活性

抗 FIX(a)抗体の L 鎖を改変

| position | mutation | A | I | L | M | P | V | G | N | Q | S | T | D | E | H | K | R | F | W | Y |
|----------|----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 24 | K | 1.96 | 1.51 | 2.22 | 2.05 | 0.91 | 1.47 | 1.42 | 1.18 | 2.01 | 2.17 | 1.50 | 1.54 | 1.81 | 2.06 | 0.86 | 0.69 | 2.09 | 1.61 | 0.89 |
| 25 | A | / | 1.91 | 2.13 | 2.26 | 1.18 | 2.25 | 1.89 | 1.16 | 0.73 | 2.36 | 2.34 | 0.26 | 0.19 | 0.49 | 0.86 | 0.69 | 2.09 | 1.61 | 0.89 |
| 26 | S | 2.76 | 1.02 | 1.79 | 2.18 | 2.63 | 2.93 | 2.62 | 2.51 | 3.52 | / | 2.82 | 2.05 | 2.62 | 3.17 | 3.49 | 4.26 | 3.60 | 2.45 | 3.83 |
| 27 | R | 1.03 | - | 1.29 | 1.64 | 0.07 | 1.02 | 2.05 | 1.02 | 2.06 | 1.07 | - | 0.96 | 0.99 | 1.57 | 2.79 | / | 0.80 | 1.16 | 1.15 |
| 28 | N | 1.55 | 1.75 | 0.89 | 1.77 | 2.00 | 1.77 | 1.66 | / | 3.12 | 1.73 | 1.93 | 1.35 | 0.07 | 1.84 | 1.22 | 1.20 | 1.42 | 2.72 | 1.75 |
| 29 | I | 2.37 | / | 1.17 | 1.87 | 1.20 | 2.35 | 1.27 | 2.10 | 1.19 | 2.20 | 2.97 | 0.07 | 0.07 | 0.94 | 0.92 | 1.13 | 0.69 | 0.98 | 0.89 |
| 30 | E | 2.82 | 1.84 | 0.07 | 3.32 | 1.59 | 1.81 | 2.59 | 3.75 | 2.21 | 1.55 | 0.07 | 2.74 | / | 1.52 | 1.93 | 1.78 | 3.60 | 3.87 | 3.59 |
| 31 | R | 0.54 | 0.74 | 0.66 | 0.51 | 0.07 | 0.61 | 0.49 | 0.41 | 1.01 | 1.08 | 0.59 | 0.07 | 0.07 | 0.49 | 1.36 | / | 0.07 | 0.83 | 0.07 |
| 32 | Q | 1.17 | 0.84 | 1.58 | 1.96 | 0.07 | 1.07 | 2.26 | 1.70 | / | 1.21 | 0.93 | 0.97 | 1.05 | 1.28 | 3.28 | 3.23 | - | 1.00 | 2.03 |
| 33 | L | 1.65 | 1.96 | / | 1.62 | 0.07 | 1.71 | 0.82 | 1.16 | 2.10 | 1.89 | 1.96 | 1.01 | 1.29 | 1.15 | 1.01 | 0.31 | 1.30 | 0.07 | 0.68 |
| 34 | A | / | 1.39 | 0.07 | 0.07 | - | 1.22 | 1.77 | 0.07 | 0.07 | 1.66 | 1.98 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 |
| 50 | Q | 1.42 | 1.00 | 1.18 | 1.15 | 0.15 | 1.32 | 1.08 | 0.83 | / | 1.27 | 1.07 | 0.96 | 1.05 | 1.23 | 1.43 | 1.71 | 1.06 | 1.16 | 0.07 |
| 51 | A | / | - | - | - | 0.31 | 0.96 | 1.16 | - | 0.36 | 1.08 | 1.26 | 0.25 | 0.07 | 0.77 | - | - | - | - | - |
| 52 | S | 0.92 | 0.99 | 0.94 | 0.77 | 0.07 | 1.06 | 1.06 | 0.90 | 1.00 | / | 1.11 | 0.68 | 0.89 | 1.08 | 0.07 | 1.11 | 0.95 | 1.04 | 1.03 |
| 53 | R | 0.79 | 1.24 | 1.15 | 1.28 | 0.91 | 0.97 | 0.95 | 0.84 | 0.86 | 0.98 | 0.92 | 0.44 | 0.38 | 0.94 | 1.10 | / | 1.45 | 0.97 | 1.05 |
| 54 | K | 1.26 | 1.38 | 1.22 | 1.24 | 1.14 | 1.12 | 1.28 | 0.53 | 1.27 | 1.31 | 1.09 | 1.01 | 0.91 | 1.21 | / | 1.27 | 1.46 | 1.45 | 1.47 |
| 55 | E | 1.24 | 1.39 | 1.18 | 1.23 | 1.10 | 1.13 | 1.14 | 1.28 | 0.07 | 0.07 | 1.21 | 1.25 | / | 1.06 | 1.04 | 0.94 | 1.10 | 0.98 | 0.07 |
| 56 | S | 1.15 | 1.18 | 1.07 | 1.14 | 1.11 | 1.28 | 1.22 | 1.08 | 1.12 | / | 1.16 | 1.02 | 1.07 | 1.16 | 1.46 | 1.20 | 1.21 | 1.21 | 1.12 |
| 89 | Q | 1.39 | - | 0.78 | 0.38 | - | 0.82 | 0.61 | - | / | 1.08 | 1.01 | 0.52 | 1.06 | 0.40 | 0.68 | 0.20 | - | 0.94 | 1.08 |
| 90 | Q | 0.90 | 0.37 | 0.51 | 0.85 | - | 0.71 | 0.69 | 0.73 | / | 0.99 | 0.53 | - | 0.52 | 1.23 | 0.45 | 0.24 | 0.10 | 0.07 | 0.07 |
| 91 | Y | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.12 | 0.07 | 0.11 | 0.13 | 0.14 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.13 | 0.07 | 0.26 | 0.11 | 0.07 | 0.92 | 0.60 | / |
| 92 | S | 0.99 | 1.07 | 0.72 | 0.92 | 0.22 | 0.56 | 0.94 | 1.12 | 0.79 | / | 0.76 | 0.85 | 0.57 | 1.19 | 1.13 | 1.10 | 0.94 | 0.66 | 0.99 |
| 93 | D | 0.96 | 0.07 | 1.06 | 1.12 | 0.63 | 1.20 | 0.93 | 1.34 | 1.34 | 1.26 | 1.12 | / | 0.84 | 1.14 | 1.28 | 1.53 | 1.33 | 0.96 | 1.32 |
| 94 | P | 0.68 | 0.74 | 0.40 | 0.63 | / | 0.65 | 0.50 | 0.32 | 0.31 | 0.39 | 0.21 | 0.07 | 0.07 | 0.44 | 0.10 | 0.12 | 0.12 | 0.07 | 0.29 |
| 95 | P | 0.86 | 0.56 | 0.62 | 0.61 | / | 0.94 | 1.14 | 0.75 | 0.55 | 0.94 | 0.90 | 0.84 | 0.82 | 0.80 | 1.91 | 0.82 | 0.44 | 0.53 | 0.36 |
| 96 | L | 1.27 | 0.78 | / | 1.16 | 1.19 | 0.93 | 1.32 | 1.00 | 1.07 | 1.10 | 0.99 | 0.44 | 0.07 | 0.91 | 0.63 | 0.31 | 1.10 | 1.17 | 0.07 |
| 97 | T | - | 1.20 | 0.94 | 0.07 | 0.49 | 0.98 | 1.15 | 0.07 | 1.02 | 1.28 | / | 0.64 | 0.81 | 0.89 | 0.99 | 0.90 | 0.74 | 0.73 | 0.94 |

抗 FX 抗体の L 鎖を改変

| position | mutation | A | I | L | M | P | V | G | N | Q | S | T | D | E | H | K | R | F | W | Y |
|----------|----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 24 | K | 1.06 | 1.06 | 1.11 | 1.07 | 0.06 | 1.02 | 0.96 | 0.06 | 1.11 | 1.07 | 1.08 | 1.13 | 1.06 | 1.02 | / | 1.02 | - | 1.09 | 1.05 |
| 25 | A | / | 0.68 | 0.67 | 0.59 | 0.87 | 0.73 | 0.06 | 0.98 | 0.53 | 1.18 | 1.05 | 0.22 | 0.49 | 0.31 | - | - | 0.34 | 0.32 | - |
| 26 | S | 1.05 | 0.99 | 1.10 | 0.06 | 1.25 | 0.90 | 1.07 | 1.00 | 1.05 | / | 1.02 | 1.01 | 0.06 | 1.06 | 1.13 | 1.17 | 0.98 | 1.11 | 0.92 |
| 27 | R | 0.80 | 0.75 | 0.97 | 1.06 | 0.70 | 1.15 | 0.99 | 1.08 | 1.09 | - | 1.09 | 0.90 | 1.03 | 1.11 | 1.12 | / | 0.77 | 0.06 | 0.06 |
| 28 | N | 1.20 | 1.12 | 1.16 | 1.14 | 1.04 | 1.12 | 0.97 | / | 0.06 | 1.01 | 0.98 | 1.20 | 1.02 | 0.94 | 0.93 | 0.94 | 0.06 | 0.82 | 0.99 |
| 29 | I | 0.45 | / | 0.90 | 0.99 | 0.79 | 0.87 | 0.06 | 0.28 | 1.12 | 0.33 | 0.62 | 0.20 | 0.15 | 0.18 | 0.11 | 0.15 | 1.05 | 0.25 | 0.35 |
| 30 | E | 1.09 | 1.11 | 1.06 | 1.15 | 0.73 | 1.16 | 0.98 | 1.7 | 0.88 | 0.84 | 0.71 | 0.84 | / | 1.23 | 1.29 | 1.37 | 1.13 | 1.09 | 1.00 |
| 31 | R | 0.81 | 0.88 | 0.89 | 0.78 | 0.84 | 0.86 | 0.73 | 0.89 | 0.77 | 0.72 | 0.81 | 0.70 | 0.80 | 0.83 | 0.92 | / | 0.82 | 0.91 | 0.85 |
| 32 | Q | 0.89 | 0.25 | 0.84 | 1.04 | 0.76 | 0.35 | 1.09 | 0.83 | / | 1.14 | 0.69 | 0.74 | 0.59 | 0.79 | 1.29 | 1.31 | 0.67 | 0.74 | 0.83 |
| 33 | L | 1.02 | 0.97 | / | 1.01 | 0.38 | 0.87 | 0.80 | 1.06 | 0.94 | 0.86 | 1.10 | 0.06 | - | 0.85 | 0.21 | - | 1.16 | 0.40 | 0.30 |
| 34 | A | / | 1.13 | 0.71 | 0.72 | - | 1.06 | 1.08 | 0.69 | 1.00 | 1.03 | 0.82 | 0.38 | 0.98 | 0.88 | 0.06 | 0.06 | 0.53 | 0.29 | 0.42 |
| 50 | Q | 0.96 | 0.92 | 0.91 | 0.87 | 0.82 | 0.84 | 0.91 | 0.74 | / | 0.91 | 0.82 | 0.82 | 0.85 | 0.93 | 1.29 | 1.34 | 1.01 | 0.91 | 1.04 |
| 51 | A | / | 1.02 | - | 1.19 | 0.74 | 1.04 | 0.06 | - | 0.84 | 1.16 | 0.94 | 0.78 | 0.86 | 0.88 | - | - | 0.99 | - | - |
| 52 | S | 1.17 | 1.21 | 1.27 | 0.98 | 0.70 | 1.12 | 0.97 | 1.07 | 0.97 | / | 1.03 | 1.00 | 0.79 | 1.07 | 0.73 | 1.01 | 1.10 | 0.96 | 0.93 |
| 53 | R | 0.76 | 0.72 | 0.86 | 0.81 | 0.77 | 0.89 | 0.91 | 0.79 | 0.78 | 0.80 | 0.82 | 0.66 | 0.72 | 0.83 | 1.02 | / | 0.75 | 0.76 | 0.74 |
| 54 | K | 0.91 | 0.90 | 1.15 | 1.22 | 0.99 | 0.96 | 0.57 | 0.92 | 1.01 | 0.90 | 0.85 | 0.80 | 0.91 | 0.99 | / | 0.90 | 1.02 | 0.81 | 0.98 |
| 55 | E | 1.37 | 1.37 | - | 1.14 | 1.17 | 1.10 | 1.29 | 1.31 | 0.06 | 1.21 | 1.13 | 1.03 | / | 1.26 | 1.23 | 1.37 | 1.18 | - | 1.30 |
| 56 | S | 0.99 | 0.88 | 0.86 | 0.83 | 0.87 | 0.81 | 0.91 | 0.86 | 0.91 | / | 0.90 | 0.85 | 0.90 | 0.88 | 1.15 | 0.96 | 0.88 | 0.88 | 0.86 |
| 89 | Q | 0.90 | - | 0.92 | 1.04 | - | 1.02 | 0.78 | - | / | 0.79 | 0.96 | - | 1.00 | 0.77 | 0.93 | 0.06 | - | 0.50 | 0.68 |
| 90 | Q | 0.23 | 0.21 | 0.31 | - | 0.27 | 0.17 | 0.12 | 0.58 | / | 0.36 | 0.17 | - | 0.64 | 0.45 | - | 0.46 | - | 0.09 | 0.19 |
| 91 | Y | 0.06 | 0.26 | 0.20 | 0.17 | 0.10 | 0.13 | 0.06 | 0.14 | - | 0.06 | 0.11 | 0.06 | 0.06 | 0.09 | 0.23 | 0.21 | 0.15 | - | / |
| 92 | S | 0.79 | 0.74 | 0.87 | 0.93 | 0.44 | 0.88 | 0.82 | 0.88 | 0.81 | / | 0.80 | 0.90 | 0.86 | 0.98 | 1.20 | 1.14 | 0.90 | 0.93 | 0.82 |
| 93 | D | 1.11 | 1.04 | 1.17 | 1.10 | 0.88 | 0.94 | 1.01 | 0.95 | 1.01 | 0.96 | 1.13 | / | 1.04 | 1.15 | 1.13 | 1.26 | 1.06 | 1.17 | 1.12 |
| 94 | P | 1.03 | 1.21 | 1.02 | 1.08 | / | 1.09 | 0.69 | 0.68 | - | 1.20 | 0.97 | 0.41 | 0.28 | 1.07 | 0.63 | 0.60 | 0.51 | 0.64 | 1.23 |
| 95 | P | 0.26 | 0.22 | 0.36 | 0.29 | / | 0.23 | 0.17 | 0.31 | 0.30 | 0.33 | 0.45 | 0.24 | 0.23 | 0.31 | 0.37 | 0.24 | 0.29 | 0.28 | 0.21 |
| 96 | L | 1.03 | 1.02 | / | 0.69 | - | 0.96 | - | 0.47 | 0.93 | 0.87 | 1.09 | 0.31 | 0.43 | 0.41 | 0.15 | 0.06 | 0.76 | 0.85 | 0.84 |
| 97 | T | - | 1.18 | 0.56 | 0.80 | 0.68 | 1.12 | 0.54 | 0.58 | 0.68 | 1.23 | / | 0.65 | 0.77 | 0.61 | 1.12 | - | 0.67 | 0.52 | - |

[0127] [実施例2] ACE910の各H鎖に適合する新規L鎖の取得

実施例1で示したように、ACE910の共通L鎖であるL404に対してアミノ酸改

変を網羅的に加えることにより、FVIII補因子機能代替活性を向上させることができた。一方、ACE910のFVIII補因子機能代替活性を向上させる方法として、抗FIX(a)抗体および抗FX抗体のそれぞれのH鎖（Q499およびJ327）に対して共通L鎖とは全く異なる配列を有する新規L鎖をヒト抗体ライブラリから取得する方法が考えられた。

[0128] 本発明者らは、当業者公知の方法、具体的には、(Biochemical and Biophysical Research Communications, (2000), 275, 2, 553-557)などを参照し、ACE910抗体のL鎖部分をヒトL鎖ライブラリで置換したライブラリを新たに作製後、ビオチン標識ヒトFIXaあるいはビオチン標識ヒトFXに対してパニング操作を実施し、FVIII補因子機能代替活性を有する新規L鎖を有した抗体を取得することに成功した。

[0129] その結果、FVIII補因子機能代替活性を有する二重特異性抗体として、抗ヒトFIX(a)抗体L鎖としてQNK131（重鎖配列番号：45、軽鎖配列番号：13）、QNK284（重鎖配列番号：45、軽鎖配列番号：14）、QNK315（重鎖配列番号：45、軽鎖配列番号：15）、QNL182（重鎖配列番号：45、軽鎖配列番号：16）、QNL492（重鎖配列番号：45、軽鎖配列番号：17）、QNL576（重鎖配列番号：45、軽鎖配列番号：18）、抗ヒトFX抗体L鎖として、JNK131（重鎖配列番号：46、軽鎖配列番号：19）、JNK163（重鎖配列番号：46、軽鎖配列番号：20）、JNK252（重鎖配列番号：46、軽鎖配列番号：21）、JNK263（重鎖配列番号：46、軽鎖配列番号：22）、JNK339（重鎖配列番号：46、軽鎖配列番号：23）、JNK348（重鎖配列番号：46、軽鎖配列番号：24）、JNK351（重鎖配列番号：46、軽鎖配列番号：25）、JNK360（重鎖配列番号：46、軽鎖配列番号：26）、JNK378（重鎖配列番号：46、軽鎖配列番号：27）、JNK382（重鎖配列番号：46、軽鎖配列番号：28）、JNL036（重鎖配列番号：46、軽鎖配列番号：29）、JNL072（重鎖配列番号：46、軽鎖配列番号：30）、JNL095（重鎖配列番号：46、軽鎖配列番号：31）、JNL176（重鎖配列番号：46、軽鎖配列番号：32）、JNL208（重鎖配列番号：46、軽鎖配列番号：33）

、JNL224（重鎖配列番号：46、軽鎖配列番号：34）、JNL260（重鎖配列番号：46、軽鎖配列番号：35）、JNL056（重鎖配列番号：46、軽鎖配列番号：36）、JNL059（重鎖配列番号：46、軽鎖配列番号：37）、JNL226（重鎖配列番号：46、軽鎖配列番号：38）、JNL250（重鎖配列番号：46、軽鎖配列番号：39）、JNL263（重鎖配列番号：46、軽鎖配列番号：40）、JNL281（重鎖配列番号：46、軽鎖配列番号：41）を見出した。

[0130] これらの新規L鎖を有する各種二重特異性抗体を当業者公知の方法で発現、精製した。調製した抗体を表3に示す（クローン名、重鎖配列番号、抗FIX(a)軽鎖配列番号若しくは抗FX軽鎖配列番号を示す）。なお、新規L鎖は一方にのみ使用し、他方はACE910の共通L鎖であるL404を用いた。精製された各種二重特異性抗体のFVIII補因子機能代替活性を測定した結果を図1に示す。いずれの新規L鎖を有する二重特異性抗体もFVIII補因子機能代替活性を有することが確認された。

[0131]

[表3]

調製した新規 L 鎖を有する二重特異性抗体

| Clone name | 重鎖配列番号 | 軽鎖配列番号 |
|------------|--------|--------|
| QNK131 | 45 | 13 |
| QNK284 | 45 | 14 |
| QNK315 | 45 | 15 |
| QNL182 | 45 | 16 |
| QNL492 | 45 | 17 |
| QNL576 | 45 | 18 |
| JNK131 | 46 | 19 |
| JNK163 | 46 | 20 |
| JNK252 | 46 | 21 |
| JNK263 | 46 | 22 |
| JNK339 | 46 | 23 |
| JNK348 | 46 | 24 |
| JNK351 | 46 | 25 |
| JNK360 | 46 | 26 |
| JNK378 | 46 | 27 |
| JNK382 | 46 | 28 |
| JNL036 | 46 | 29 |
| JNL072 | 46 | 30 |
| JNL095 | 46 | 31 |
| JNL176 | 46 | 32 |
| JNL208 | 46 | 33 |
| JNL224 | 46 | 34 |
| JNL260 | 46 | 35 |
| JNL056 | 46 | 36 |
| JNL059 | 46 | 37 |
| JNL226 | 46 | 38 |
| JNL250 | 46 | 39 |
| JNL263 | 46 | 40 |
| JNL281 | 46 | 41 |

[0132] [実施例3] 新規L鎖を有する二重特異性抗体の改変体作製

実施例2において取得した新規L鎖を有する二重特異性抗体のFVIII補因子機能代替活性を向上させるために、抗FIX(a)抗体の新規L鎖であるQNK131（軽鎖配列番号：13）に対してアミノ酸置換改変を導入し、QAL187（軽鎖配列番号：42）、QAL201（軽鎖配列番号：43）を取得した。同様に、抗FX抗体の新規L鎖であるJNL095（軽鎖配列番号：31）に対してアミノ酸置換改変を導

入し、JYL280（軽鎖配列番号：44）を取得した。一例として、重鎖Q499と軽鎖QAL201からなる抗FIX(a)抗体および、重鎖J327と軽鎖JYL280からなる抗FX抗体から構成される二重特異性抗体（Q499/QAL201//J327/JYL280）を当業者公知の方法で発現、精製し、FVIII補因子機能代替活性を測定した結果を図2に示す。

[0133] 〔実施例4〕新規L鎖を有する二重特異性抗体のH鎖の改変体作製

FVIII補因子機能代替活性が向上した新規L鎖（抗FIX(a)抗体はQAL187、抗FX抗体はJYL280）を用い、Q499およびJ327に対して、アミノ酸変異を網羅的に導入し、大規模にFVIII補因子機能代替活性のスクリーニングを実施することで、FVIII補因子機能代替活性を向上させるアミノ酸置換を見出した。

[0134] 抗FIX(a)抗体側の重鎖と軽鎖をそれぞれQ499およびQAL201に固定し、抗FX抗体側の軽鎖をJYL280に固定し、J327の全CDRをシステインを除くアミノ酸に改変した置換体を作製した。抗FX抗体側の重鎖と軽鎖をそれぞれJ327およびJYL280に固定し、抗FIX(a)抗体側の軽鎖をQAL187に固定し、Q499の全CDRに対してシステインを除く全アミノ酸への置換体を作製した。二重特異性抗体の発現および精製は当業者公知の方法で実施した。

精製された各種二重特異性抗体を用いて当業者公知の方法によりFVIII補因子機能代替活性を評価した。

[0135] その結果、以下の表4に示すいくつかのアミノ酸置換が親二重特異性抗体であるQ499/QAL187//J327/JYL280あるいはQ499/QAL201//J327/JYL280に対してFVIII補因子機能代替活性を向上させることが可能であることが明らかとなった。表4には変異箇所のKabat numbering（左端の「position」列に記載された数字）、親抗体におけるアミノ酸（左から2番目の列に記載されたアミノ酸（一文字表記））、変異後のアミノ酸（最上段の行に記載されたアミノ酸（一文字表記））、ACE910(精製抗体)に対する比活性を示した（表中の各数値）。表4の(-)は、抗体の発現量が低かったことを示し、"/"は、それ自身と同じアミノ酸のため、作製していないことを示す。

[0136]

[表4]

Q499/QAL187//J327/JYL280 の Q499 に対してアミノ酸置換を行った
改変二重特異性抗体の FVIII 補因子機能代替活性

Table with 21 columns (position, mutation, A, I, L, M, P, V, G, N, Q, S, T, D, E, H, K, R, F, W, Y) and 28 rows of mutation data for Q499.

Q499/QAL201//J327/JYL280 の J327 に対してアミノ酸置換を行った
改変二重特異性抗体の FVIII 補因子機能代替活性

Table with 21 columns (position, mutation, A, I, L, M, P, V, G, N, Q, S, T, D, E, H, K, R, F, W, Y) and 28 rows of mutation data for J327.

産業上の利用可能性

[0137] 本発明により、ACE910 (Emicizumab) のFVIII補因子機能代替活性を向上させる軽鎖のアミノ酸置換、FVIII補因子機能代替活性を示す新規軽鎖、および、新規軽鎖を有する二重特異性抗体のFVIII補因子機能代替活性を向上させる重鎖のアミノ酸置換が見いだされた。これらのアミノ酸置換や新規軽鎖は、ACE910 (Emicizumab) よりも優れたFVIII補因子機能代替活性を有する二重特異性抗体の創製に有用である。

請求の範囲

- [請求項1] 抗体軽鎖可変ドメインを含むポリペプチドであって、配列番号：7、8、9に記載の軽鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を有する抗体軽鎖可変ドメインあるいは配列番号：47に記載のアミノ酸配列を有する抗体軽鎖可変ドメインを含み、ここで、Kabat番号付けシステムに従って番号付けられた、K24、A25、S26、R27、N28、I29、E30、R31、Q32、L33、A34、Q50、A51、S52、R53、K54、E55、S56、Q89、Q90、Y91、S92、D93、P94、P95、L96及びT97からなる群から選択される1つ以上のアミノ酸が、システイン以外の任意のアミノ酸に置換されている、ポリペプチド。
- [請求項2] FIXおよび／またはFIXaならびにFXを認識する二重特異性抗体であって、配列番号：7、8、9に記載の軽鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を有する抗体軽鎖可変ドメインあるいは配列番号：47に記載のアミノ酸配列を有する抗体軽鎖可変ドメインを含み、ここで、Kabat番号付けシステムに従って番号付けられた、K24、A25、S26、R27、N28、I29、E30、R31、Q32、L33、A34、Q50、A51、S52、R53、K54、E55、S56、Q89、Q90、Y91、S92、D93、P94、P95、L96及びT97からなる群から選択される1つ以上のアミノ酸が、システイン以外の任意のアミノ酸に置換されている、抗体。
- [請求項3] FIXおよび／またはFIXaならびにFXを認識する二重特異性抗体であって、第一のポリペプチドと第三のポリペプチドが対を形成し、第二のポリペプチドと第四のポリペプチドが対を形成し、第一のポリペプチドは配列番号：45に記載の抗体重鎖可変ドメインのアミノ酸配列、第二のポリペプチドは配列番号：46に記載の抗体重鎖可変ドメインのアミノ酸配列をそれぞれ含み、第三のポリペプチド及び第四のポリペプチドのいずれか一方のポリペプチドは配列番号：47に記載の

抗体軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列を含み、他方のポリペプチドは、配列番号：7、8、9に記載の軽鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を有する抗体軽鎖可変ドメインあるいは配列番号：47に記載のアミノ酸配列を有する抗体軽鎖可変ドメインを含み、ここで、他方のポリペプチドはK a b a t 番号付けシステムに従って番号付けられた、K24、A25、S26、R27、N28、I29、E30、R31、Q32、L33、A34、Q50、A51、S52、R53、K54、E55、S56、Q89、Q90、Y91、S92、D93、P94、P95、L96及びT97からなる群から選択される1つ以上のアミノ酸が、システイン以外の任意のアミノ酸に置換されている、抗体。

[請求項4] 抗体重鎖可変ドメインを含むポリペプチドであって、配列番号：1、2、3に記載の重鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメインあるいは配列番号：45に記載のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメインを含み、ここで、K a b a t 番号付けシステムに従って番号付けられた、Y31、Y32、D33、I34、Q35、S50、I51、S52、P52a、S53、G54、Q55、S56、T57、Y58、Y59、R60、R61、E62、V63、K64、G65、R95、T96、G97、R98、E99、Y100、G100a、G100b、G100c、W100d、Y100e、F100f、D101およびY102からなる群から選択される1つ以上のアミノ酸が、システイン以外の任意のアミノ酸に置換されている、ポリペプチド。

[請求項5] FIXおよび／またはFIXaならびにFXを認識する二重特異性抗体であって、配列番号：1、2、3に記載の重鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメインあるいは配列番号：45に記載のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメインを含み、ここで、K a b a t 番号付けシステムに従って番号付けられた、Y31、Y32、D33、I34、Q35、S50、I51、S52、P52a、S53、G54、Q55、S56、T57、Y58、Y59、R60、R61、E62、V63、

K64、G65、R95、T96、G97、R98、E99、Y100、G100a、G100b、G100c、W100d、Y100e、F100f、D101およびY102からなる群から選択される1つ以上のアミノ酸が、システイン以外の任意のアミノ酸に置換されている、抗体。

[請求項6] 抗体重鎖可変ドメインを含むポリペプチドであって、配列番号：4、5、6に記載の重鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメインあるいは配列番号：46に記載のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメインを含み、ここで、Kabat番号付けシステムに従って番号付けられた、D31、N32、N33、M34、D35、D50、I51、N52、T52a、R53、S54、G55、G56、S57、I58、Y59、N60、E61、E62、F63、Q64、D65、R95、K96、S97、Y98、G99、Y100、Y100a、L100b、D101およびE102からなる群から選択される1つ以上のアミノ酸が、システイン以外の任意のアミノ酸に置換されている、ポリペプチド。

[請求項7] FIXおよび／またはFIXaならびにFXを認識する二重特異性抗体であって、配列番号：4、5、6に記載の重鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメインあるいは配列番号：46に記載のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメインを含み、ここで、Kabat番号付けシステムに従って番号付けられた、D31、N32、N33、M34、D35、D50、I51、N52、T52a、R53、S54、G55、G56、S57、I58、Y59、N60、E61、E62、F63、Q64、D65、R95、K96、S97、Y98、G99、Y100、Y100a、L100b、D101およびE102からなる群から選択される1つ以上のアミノ酸が、システイン以外の任意のアミノ酸に置換されている、抗体。

[請求項8] FIXおよび／またはFIXaならびにFXを認識する二重特異性抗体であって、第一のポリペプチドと第三のポリペプチドが対を形成し、第二

のポリペプチドと第四のポリペプチドが対を形成し、第二のポリペプチドは配列番号：46に記載の抗体重鎖可変ドメインのアミノ酸配列、第三のポリペプチドは配列番号：42に記載の抗体軽鎖のアミノ酸配列、第四のポリペプチドは配列番号：44に記載の抗体軽鎖のアミノ酸配列をそれぞれ含み、第一のポリペプチドは、配列番号：1、2、3に記載の重鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメインあるいは配列番号：45に記載のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメインを含み、ここで、第一のポリペプチドはK a b a t 番号付けシステムに従って番号付けられた、Y31、Y32、D33、I34、Q35、S50、I51、S52、P52a、S53、G54、Q55、S56、T57、Y58、Y59、R60、R61、E62、V63、K64、G65、R95、T96、G97、R98、E99、Y100、G100a、G100b、G100c、W100d、Y100e、F100f、D101およびY102からなる群から選択される1つ以上のアミノ酸が、システイン以外の任意のアミノ酸に置換されている、抗体。

[請求項9]

FIXおよび／またはFIXaならびにFXを認識する二重特異性抗体であって、第一のポリペプチドと第三のポリペプチドが対を形成し、第二のポリペプチドと第四のポリペプチドが対を形成し、第一のポリペプチドは配列番号：45に記載の抗体重鎖のアミノ酸配列、第三のポリペプチドは配列番号：43に記載の抗体軽鎖のアミノ酸配列、第四のポリペプチドは配列番号：44に記載の抗体軽鎖のアミノ酸配列をそれぞれ含み、第二のポリペプチドは、配列番号：4、5、6に記載の重鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメインあるいは配列番号：46に記載のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメインを含み、ここで、第二のポリペプチドはK a b a t 番号付けシステムに従って番号付けられた、D31、N32、N33、M34、D35、D50、I51、T52a、N52、R53、S54、G55、G56、S57、I58、Y59、N60、E61、E62、F63、Q64

、D65、R95、K96、S97、Y98、G99、Y100、Y100a、L100b、D101およびE102からなる群から選択される1つ以上のアミノ酸が、システイン以外の任意のアミノ酸に置換されている、抗体。

[請求項10]

抗体軽鎖であって、下記(a1)から(a6)、(b1)から(b23)及び(c1)から(c3)から選ばれるいずれかのアミノ酸配列を含む抗体軽鎖。

(a1) 配列番号：13に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖(QNK131)

(a2) 配列番号：14に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖(QNK284)

(a3) 配列番号：15に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖(QNK315)

(a4) 配列番号：16に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖(QNL182)

(a5) 配列番号：17に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖(QNL492)

(a6) 配列番号：18に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖(QNL576)

(b1) 配列番号：19に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖(JNK131)

(b2) 配列番号：20に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖(JNK163)

(b3) 配列番号：21に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖(JNK252)

(b4) 配列番号：22に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖(JNK263)

(b5) 配列番号：23に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖(JNK33

- 9)
(b6) 配列番号：24に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖（JNK348)
- 8)
(b7) 配列番号：25に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖（JNK351)
- (b8) 配列番号：26に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖（JNK360)
- (b9) 配列番号：27に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖（JNK378)
- (b10) 配列番号：28に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖（JNK382)
- (b11) 配列番号：29に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖（JNL036)
- (b12) 配列番号：30に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖（JNL072)
- (b13) 配列番号：31に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖（JNL095)
- (b14) 配列番号：32に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖（JNL176)
- (b15) 配列番号：33に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖（JNL208)
- (b16) 配列番号：34に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖（JNL224)
- (b17) 配列番号：35に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖（JNL260)
- (b18) 配列番号：36に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖（JNL056)
- (b19) 配列番号：37に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖（JNL0

59)

(b20) 配列番号：38に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖（JNL226)

(b21) 配列番号：39に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖（JNL250)

(b22) 配列番号：40に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖（JNL263)

(b23) 配列番号：41に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖（JNL281)

(c1) 配列番号：42に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖（QAL187)

(c2) 配列番号：43に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖（QAL201)

(c3) 配列番号：44に記載のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖（JYL280)

[請求項11]

FIXおよび／またはFIXaならびにFXを認識する二重特異性抗体であって、第一のポリペプチド（d）と第三のポリペプチド（f）が対を形成し、第二のポリペプチド（e）と第四のポリペプチド（g）が対を形成し、それぞれのポリペプチドが以下に記載のポリペプチドである抗体。

（d）第一のポリペプチドは（d1）又は（d2）である。

（d1）配列番号：1、2、3に記載の重鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメイン、あるいは配列番号：45に記載のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメインを含むポリペプチド

（d2）配列番号：1、2、3に記載の重鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメインあるいは配列番号：45に記載のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメインを含むポリペプチドであって、Kabat番号付けシステムに従って番号付けられた、Y31

、Y32、D33、I34、Q35、S50、I51、S52、P52a、S53、G54、Q55、S56、T57、Y58、Y59、R60、R61、E62、V63、K64、G65、R95、T96、G97、R98、E99、Y100、G100a、G100b、G100c、W100d、Y100e、F100f、D101およびY102からなる群から選択される1つ以上のアミノ酸が、システイン以外の任意のアミノ酸に置換されている、ポリペプチド。

(e) 第二のポリペプチドは(e1)又は(e2)である。

(e1) 配列番号:4、5、6に記載の重鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメインあるいは配列番号:46に記載のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメインを含むポリペプチド

(e2) 配列番号:4、5、6に記載の重鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメインあるいは配列番号:46に記載のアミノ酸配列を有する抗体重鎖可変ドメインを含むポリペプチドであって、Kabat番号付けシステムに従って番号付けられた、D31、N32、N33、M34、D35、D50、I51、T52a、N52、R53、S54、G55、G56、S57、I58、Y59、N60、E61、E62、F63、Q64、D65、R95、K96、S97、Y98、G99、Y100、Y100a、L100b、D101およびE102からなる群から選択される1つ以上のアミノ酸が、システイン以外の任意のアミノ酸に置換されている、ポリペプチド。

(f) 第三のポリペプチドは(f1)、(f2)又は(f3)である。

。

(f1) 配列番号:7、8、9に記載の軽鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を有する抗体軽鎖可変ドメイン、あるいは配列番号:47に記載のアミノ酸配列を有する抗体軽鎖可変ドメインを含むポリペプチド

(f2) 配列番号:7、8、9に記載の軽鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を有する抗体軽鎖可変ドメインあるいは配列番号:47に記載の

アミノ酸配列を有する抗体軽鎖可変ドメインを含むポリペプチドであって、K a b a t 番号付けシステムに従って番号付けられた、K 2 4、A 2 5、S 2 6、R 2 7、N 2 8、I 2 9、E 3 0、R 3 1、Q 3 2、L 3 3、A 3 4、Q 5 0、A 5 1、S 5 2、R 5 3、K 5 4、E 5 5、S 5 6、Q 8 9、Q 9 0、Y 9 1、S 9 2、D 9 3、P 9 4、P 9 5、L 9 6 及び T 9 7 からなる群から選択される1つ以上のアミノ酸が、システイン以外の任意のアミノ酸に置換されている、ポリペプチド。

(f 3) 請求項10に記載の(a1)から(a6)、および(c1)～(c2)のいずれかに記載のポリペプチド

(g) 第四のポリペプチドは(g1)、(g2)又は(g3)である。

(g1) 配列番号:7、8、9に記載の軽鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を有する抗体軽鎖可変ドメイン、あるいは配列番号:47に記載のアミノ酸配列を有する抗体軽鎖可変ドメインを含むポリペプチド

(g2) 配列番号:7、8、9に記載の軽鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を有する抗体軽鎖可変ドメインあるいは配列番号:47に記載のアミノ酸配列を有する抗体軽鎖可変ドメインを含むポリペプチドであって、K a b a t 番号付けシステムに従って番号付けられた、K 2 4、A 2 5、S 2 6、R 2 7、N 2 8、I 2 9、E 3 0、R 3 1、Q 3 2、L 3 3、A 3 4、Q 5 0、A 5 1、S 5 2、R 5 3、K 5 4、E 5 5、S 5 6、Q 8 9、Q 9 0、Y 9 1、S 9 2、D 9 3、P 9 4、P 9 5、L 9 6 及び T 9 7 からなる群から選択される1つ以上のアミノ酸が、システイン以外の任意のアミノ酸に置換されている、ポリペプチド。

(g3) 請求項10に記載の(b1)から(b23)、および(c3)のいずれかに記載のポリペプチド。

[請求項12]

Emicizumab改変体を製造する方法であって、以下の工程(a)を含む、方法。

(a) 以下の(i)～(iii)のうち一以上により置換する工程で

あって、ここで、番号付けはK a b a t 番号付けシステムに従う、工程；

(i) 配列番号：7、8、9に記載の軽鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖可変ドメインにおいて、K24、A25、S26、R27、N28、I29、E30、R31、Q32、L33、A34、Q50、A51、S52、R53、K54、E55、S56、Q89、Q90、Y91、S92、D93、P94、P95、L96及びT97からなる群から選択される1つ以上のアミノ酸における置換

(ii) 配列番号：1、2、3に記載の重鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を含む抗体重鎖可変ドメインにおいて、Y31、Y32、D33、I34、Q35、S50、I51、S52、P52a、S53、G54、Q55、S56、T57、Y58、Y59、R60、R61、E62、V63、K64、G65、R95、T96、G97、R98、E99、Y100、G100a、G100b、G100c、W100d、Y100e、F100f、D101およびY102からなる群から選択される1つ以上のアミノ酸における置換

(iii) 配列番号：4、5、6に記載の重鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を含む抗体重鎖可変ドメインにおいて、D31、N32、N33、M34、D35、D50、I51、T52a、N52、R53、S54、G55、G56、S57、I58、Y59、N60、E61、E62、F63、Q64、D65、R95、K96、S97、Y98、G99、Y100、Y100a、L100b、D101およびE102からなる群から選択される1つ以上のアミノ酸における置換。

[請求項13] Emicizumab改変体を単離する方法であって、以下の工程(a)～(c)を含む、方法。

(a) 以下の(i)～(iii)のうち一以上によりEmicizumab改変体を産生する工程であって、ここで、番号付けはK a b a t 番号付けシステムに従う、工程；

(i) 配列番号：7、8、9に記載の軽鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖可変ドメインにおいて、K24、A25、S26、R27、N28、I29、E30、R31、Q32、L33、A34、Q50、A51、S52、R53、K54、E55、S56、Q89、Q90、Y91、S92、D93、P94、P95、L96及びT97からなる群から選択される1つ以上のアミノ酸における置換

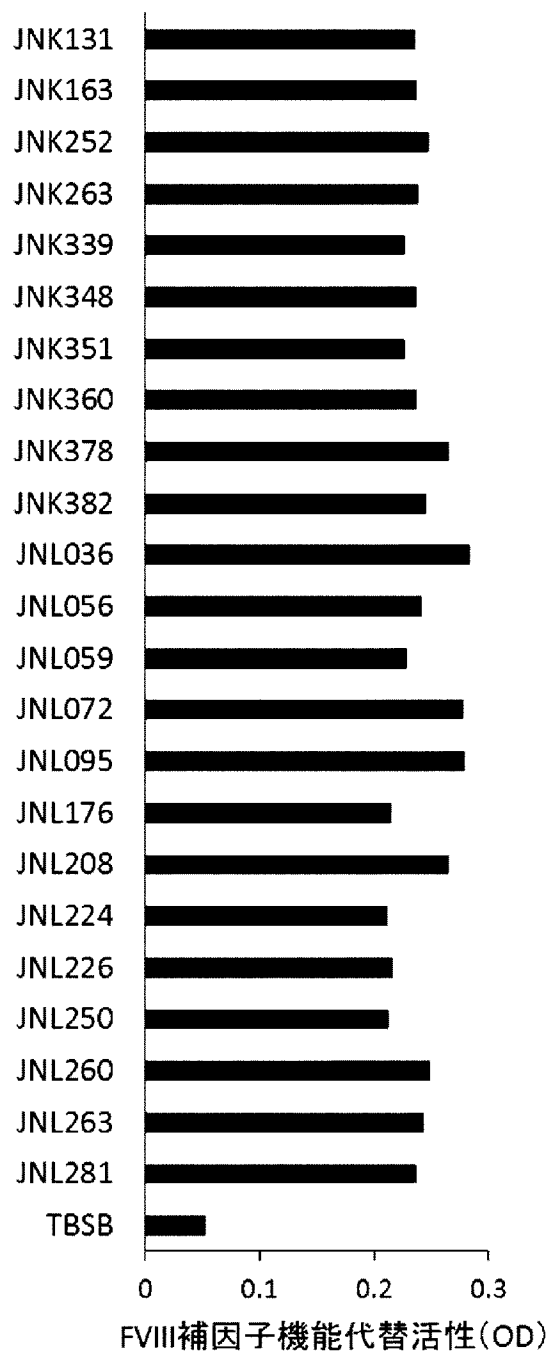
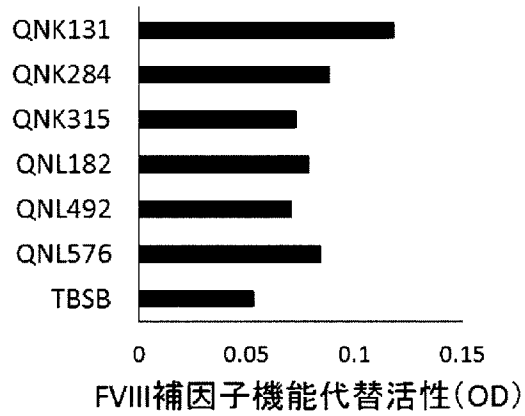
(ii) 配列番号：1、2、3に記載の重鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を含む抗体重鎖可変ドメインにおいて、Y31、Y32、D33、I34、Q35、S50、I51、S52、P52a、S53、G54、Q55、S56、T57、Y58、Y59、R60、R61、E62、V63、K64、G65、R95、T96、G97、R98、E99、Y100、G100a、G100b、G100c、W100d、Y100e、F100f、D101およびY102からなる群から選択される1つ以上のアミノ酸における置換

(iii) 配列番号：4、5、6に記載の重鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を含む抗体重鎖可変ドメインにおいて、D31、N32、N33、M34、D35、D50、I51、T52a、N52、R53、S54、G55、G56、S57、I58、Y59、N60、E61、E62、F63、Q64、D65、R95、K96、S97、Y98、G99、Y100、Y100a、L100b、D101およびE102からなる群から選択される1つ以上のアミノ酸における置換

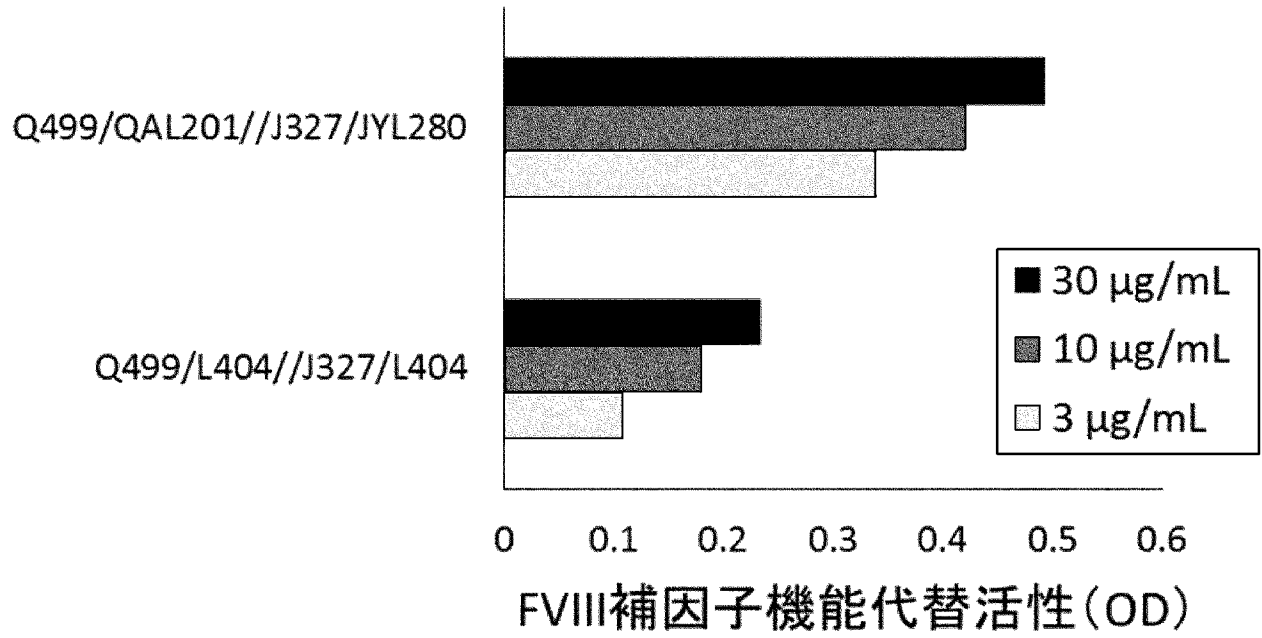
(b) (a)において産生された該改変体のFVIII補因子機能代替活性を測定する工程；ならびに

(c) Emicizumabと比べてFVIII補因子機能代替活性が向上したEmicizumab改変体を選択する工程
を包含する、方法。

[図1]



[図2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2017/027152

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C07K16/46(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n

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)
C07K16/46, C12P21/08, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

| | | | |
|---------------------------|-----------|----------------------------|-----------|
| Jitsuyo Shinan Koho | 1922-1996 | Jitsuyo Shinan Toroku Koho | 1996-2017 |
| Kokai Jitsuyo Shinan Koho | 1971-2017 | Toroku Jitsuyo Shinan Koho | 1994-2017 |

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), WPIDS/WPIX(STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-------------|---|-------------------------------------|
| X Y A | WO 2015/194233 A1 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 23 December 2015 (23.12.2015), paragraphs [0014], [0015], [0026], [0049] & EP 3159006 A1 paragraphs [0014], [0015], [0027], [0052] | 1, 2, 4-7, 11 1-7, 11-13 8-10 |
| X A | WO 2016/001810 A1 (PFIZER INC.), 07 January 2016 (07.01.2016), table 6 & JP 2017-520575 A & US 2016/0002357 A1 & EP 3164417 A1 | 10 1-9, 11-13 |

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

| | |
|---|--|
| * Special categories of cited documents: | "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 |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | "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 |
| "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date | "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 |
| "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) | "&" document member of the same patent family |
| "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 | |

| | |
|---|--|
| Date of the actual completion of the international search 05 October 2017 (05.10.17) | Date of mailing of the international search report 17 October 2017 (17.10.17) |
|---|--|

| | |
|--|---|
| Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan | Authorized officer Telephone No. |
|--|---|

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/027152

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| Y A | WO 2012/067176 A1 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 24 May 2012 (24.05.2012), paragraphs [0067] to [0077] & US 2013/0330345 A1 paragraphs [0354] to [0364] & EP 2644698 A1 | 1-7, 11-13 8-10 |
| Y A | JP 2015-504434 A (Bayer Intellectual Property GmbH), 12 February 2015 (12.02.2015), example 1 & WO 2013/076186 A1 example 1 & US 2014/0322220 A1 & EP 2782934 A1 | 10 1-9, 11-13 |
| Y A | GRIFFITHS, A.D., et al., Human anti-self antibodies with high specificity from phage display libraries, EMBO J., 1993, vol.12, no.2, p.725-734, ISSN 0261-4189, particularly, Abstract, Materials and methods | 10 1-9, 11-13 |
| Y A | CARDOSO, D.F., et al., Neutralizing Human Anti Crotoxin scFv Isolated from a Nonimmunized Phage Library, Scand. J. Immunol., 2000, vol.51, issue 4, p.337-344, ISSN 0300-9475, particularly, MATERIALS AND METHODS | 10 1-9, 11-13 |

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. C07K16/46(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n

B. 調査を行った分野
 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. C07K16/46, C12P21/08, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの
 日本国実用新案公報 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2017年
 日本国実用新案登録公報 1996-2017年
 日本国登録実用新案公報 1994-2017年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)、CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)、WPIDS/WPIX (STN)、
 GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq、UniProt/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求項の番号 |
|-----------------|---|-------------------------------------|
| X Y A | WO 2015/194233 A1 (中外製薬株式会社) 2015.12.23, 段落[0014], [0015], [0026], [0049] & EP 3159006 A1, 段落[0014], [0015], [0027], [0052] | 1, 2, 4-7, 11 1-7, 11-13 8-10 |
| X A | WO 2016/001810 A1 (PFIZER INC.) 2016.01.07, 表6 & JP 2017-520575 A & US 2016/0002357 A1 & EP 3164417 A1 | 10 1-9, 11-13 |

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

| | |
|---|--|
| * 引用文献のカテゴリー | の日の後に公表された文献 |
| 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの | 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの |
| 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの | 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの |
| 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) | 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの |
| 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 | 「&」同一パテントファミリー文献 |
| 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 | |

| | |
|---|--|
| 国際調査を完了した日 05.10.2017 | 国際調査報告の発送日 17.10.2017 |
| 国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 | 特許庁審査官 (権限のある職員) 池上 文緒 電話番号 03-3581-1101 内線 3448 |

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|--|--------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求項の番号 |
| Y A | WO 2012/067176 A1 (中外製薬株式会社) 2012.05.24, 段落[0067]-[0077] & US 2013/0330345 A1, 段落[0354]-[0364] & EP 2644698 A1 | 1-7, 11-13 8-10 |
| Y A | JP 2015-504434 A (バイエル・インテレクチュアル・プロパティ・ ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンクテル・ハフツング) 2015.02.12, 実施例1 & WO 2013/076186 A1, 実施例1 & US 2014/0322220 A1 & EP 2782934 A1 | 10 1-9, 11-13 |
| Y A | GRIFFITHS, A.D., et al., Human anti-self antibodies with high specificity from phage display libraries, EMBO J., 1993, vol.12, no.2, p.725-734, ISSN 0261-4189, 特に Abstract, Materials and methods | 10 1-9, 11-13 |
| Y A | CARDOSO, D.F., et al., Neutralizing Human Anti Crotoxin scFv Isolated from a Nonimmunized Phage Library, Scand. J. Immunol., 2000, vol.51, issue 4, p.337-344, ISSN 0300-9475, 特に MATERIALS AND METHODS | 10 1-9, 11-13 |